

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET



Danijela Lj. Kornic

DOKTORSKA DISERTACIJA

**Značaj određivanja mijeloperoksidaze i raspodele
subfrakcija lipoproteinskih čestica niske i visoke gustine
kod dece i adolescenata sa hroničnim bolestima bubrega**

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY



Danijela Lj.Kornic

DOCTORAL DISSERTATION

**Determination of myeloperoxidase and lipoprotein
subclasses distribution in children and adolescents with
chronic kidney disease**

Belgrade, 2019

**UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET**

Komisija za odbranu doktorske disertacije:

MENTORI

Prof. dr Aleksandra Stefanović,
vanredni profesor Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Aleksandra Zeljković,
vanredni profesor Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE

Prof. dr Zorana Jelić-Ivanović,
profesor emeritus Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Jelena Kotur-Stevuljević,
redovni profesor Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Doc. dr Dušan Paripović,
docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

OCENA ZAVRŠNOG RADA: _____

DATUM ODBRANE: _____

Beograd, 2019

Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu pod mentorstvom prof. Dr Aleksandre Stefanović i prof. Dr Aleksandre Zeljković. Uzorci su sakupljeni u Univerzitetnoj dečijoj klinici Tiršova na Klinici za nefrologiju, Kliničkog centra Srbije, kao i u Domovima zdravlja Pančevo i Kovačica.

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija je nastala kao rezultat dugogodišnjeg, timskog rada sa kolegama i saradnicima na Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta.

Pre svega, duboku zahvalnost dugujem svojim mentorima prof. dr Aleksandri Stefanović i prof. dr Aleksandri Zeljković koje su me mudro usmeravale, dobronamerno savetovale, svesrdno pomagale kako bih prevazišla sve teškoće sa kojima sam se suočavala tokom izrade ove disertacije. Moji mentori su dali veliki doprinos mom profesionalnom usavršavanju i iskreno se zahvaljujem zbog neiscrpane energije i stalnog podsticaja da istrajem u svom radu, zahvaljujem na toplom i prijateljskom stavu i na velikoj podršci koju su mi pružile.

Prof. dr Zorani Jelić-Ivanović se iskreno zahvaljujem na korisnim sugestijama u svim fazama rada, od koje sam naučila da problem posmatram iz nekog novog ugla i kako da svakom izazovu pristupam strpljivo i analitično.

Prof. dr Jeleni Kotur-Stevuljević se zahvaljujem za veliko zalaganje i svesrdnu, nesebičnu i prijateljsku podršku u svim fazama rada, a posebno na savetima onda kada je bilo najteže, zahvaljujem joj se na znanju, iskustvu i idejama.

Doc. dr Dušanu Paripoviću i Prof. dr Amiri Peco-Antić se iskreno zahvaljujem na angažovanju oko kreiranja projekta i velikoj podršci tokom prikupljanja uzoraka biološkog materijala.

Prof. dr Vesni Spasojević Kalimanovskoj se zahvaljujem na svim sugestijama, velikoj podršci, a naročito zbog stručnih saveta i značajnih ideja u oblasti kliničke enzimologije, čime je pozitivno uticala na smer mog interesovanja i dalji istraživački rad.

Prof. dr Nataši Bogavac-Stanojević se zahvaljujem na velikoj podršci, korisnim savetima i sugestijama.

Zahvaljujem se prof. dr Jeleni Vekić i doc. dr Ani Ninić na pomoći prilikom eksperimentalne faze određivanja laboratorijskih parametara, takođe se zahvaljujem i zbog neiscrpane energije i stalnog podsticaja da istrajem u svom radu.

Želela bih da se zahvalim svim zaposlenima na Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta na podršci i pomoći u toku izrade doktorske disertacije.

Zahvaljujem se pedijatrima i osoblju laboratorija Domova zdravlja Pančevo i Kovačica za veliku pomoć u toku prikupljanja uzoraka.

Iskreno se zahvaljujem i osoblju Klinike za nefrologiju dečije bolnice Tiršova Kliničkog Centra Srbije i pomoći oko sakupljanja uzoraka.

Veliku zahvalnost dugujem Ružici Jevremović i Milici Benedik zbog nesebične pomoći koju su mi pružile.

Posebnu zahvalnost dugujem mojoj porodici čija mi je podrška i ljubav dala snage da ovakav rad započnem i završim. Neizmernu zahvalnost dugujem roditeljima Dragici i Ljubomiru i sestri Dragani koji su mi bili životni oslonac i podrška i koji su me pre svega naučili ljubavi, strpljenju i toleranciji tokom svih ovih godina. Veliku zahvalnost dugujem svom suprugu Srđanu i deci Ognjenu i Dušanu koji su sve vreme bili uz mene pružajući mi beskrajnu ljubav i strpljenje što mi je dalo posebnu snagu da ovaj rad završim. Moja najveća podrška, motiv, smisao i radost je moja voljena porodica i zato je ova doktorska disertacija posvećena svima vama.

IZVOD

Progresivan tok i razvoj komorbiditeta čine hroničnu bubrežnu bolest (HBB) velikim medicinskim izazovom u savremenom svetu. Veliki broj studija bavio se proučavanjem markera koji bi pomogli u ranoj detekciji bolesti, budući da je bolest u prvim fazama asimptomatska, a rano otkrivanje se povezuje sa povoljnijim ishodom i sa boljim kvalitetom života pacijenata. Deca sa HBB se smatraju pacijentima sa visokim rizikom za razvoj ubrzane ateroskleroze. Osim dislipidemije koja je karakteristična za HBB, inflamacija i oksidativni stres imaju važnu ulogu u razvoju ateroskleroze, između ostalog i zbog njihove uloge u modifikaciji lipoproteinskih čestica. Iako se generalno može reći da su lipoproteini niske gustine (LDL) proaterogene čestice, smatra se da najveći aterogeni potencijal imaju male, guste LDL čestice koje su bogate trigliceridima i podložnije oksidativnim modifikacijama. U fiziološkim uslovima, lipoproteini visoke gustine (HDL) imaju ateroprotektivnu ulogu i smatra se da male HDL 3 čestice imaju veći antiinflamatorni i antioksidativni potencijal od većih HDL 2 čestica. Inflamacija i oksidativni stres dovode do oksidativnih modifikacija lipoproteinskih čestica, a jedan od zajedničkih pokazatelja i stepena inflamacije i oksidativnog stresa jeste koncentracija enzima mijeloperoksidaze (MPO). Ciljevi naše studije su bili ispitivanje parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod pacijenata u različitim stadijumima HBB kao i povezanost ovih parametara sa drugim određivanim lipidnim i nelipidnim parametrima. Takođe cilj je bio utvrditi da li postoji razlika u koncentraciji enzima MPO između pacijenata u različitim stadijumima HBB i kontrolne grupe ispitanika, kao i povezanost koncentracije MPO sa lipidnim i nelipidnim parametrima. Osim toga, ispitivali raspodelu LDL i HDL subfrakcija, kao i povezanost karakteristika raspodele LDL i HDL subfrakcija sa drugim određivanim lipidnim i nelipidnim parametrima i parametrima oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite. U istraživanju je učestvovalo pedeset i jedno dete u različitim stadijumima HBB, dok je kontrolnu grupu su činilo pedeset zdrave dece i adolescenata koji su selektovani u toku redovnih sistematskih pregleda. Istraživanje je planirano i sprovedeno u skladu sa etičkim principima Helsinške deklaracije. Ispitivanjem parametara oksidativnog stresa i antioksidativne utvrđeno je da je koncentracija

tiobarbiturna kiselina reagujućih supstanci (TBKRS) bila značajno viša kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu (KG) ($p < 0,001$), dok je koncentracija uznapredovalih proizvoda oksidacije proteina (AOPP) bila značajno veća kod pacijenata na dijalizi u odnosu na KG ($p < 0,001$) i na pacijente u predijaliznom stadijumu (pdHBB) i pacijente nakon transplantacije (T) ($p < 0,001$). Ukupne sulfhidrilne grupe (SH-grupe) su bile statistički značajno niže kod pdHBB i D pacijenata u odnosu na KG, ali i u grupi D u poređenju sa pdHBB grupom ($p < 0,05$). Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) bila je statistički značajno viša u grupi D u poređenju sa pdHBB i T grupom ($p < 0,05$). Koncentracija enzima MPO bila je statistički značajno viša u grupi pdHBB, u odnosu na KG, T i D grupu ($p < 0,05$). Zbog specifičnosti dislipidemije u HBB koju karakteriše hipertrigliceridemija, u ovoj studiji smo ispitivali povezanost parametara oksidativno-stresnog statusa sa aterogenim indeksom plazme (AIP). Rezultati studije su pokazali da stepen oksidativnog stresa izražen preko koncentracije MPO i AOPP nezavisno od drugih ispitivanih parametara utiče na AIP u grupi pacijenata na dijalizi. Na taj način smo istakli značaj određivanja ovog parametra koji se dobija na osnovu rutinskih laboratorijskih testova, posebno kod pedijatrijskih pacijenata na dijalizi. Kada je u pitanju dominantni LDL dijametar, naši rezultati su pokazali da postoje statistički značajne razlike između ispitivanih grupa ($p < 0,001$). Dominantni LDL dijametar u KG bio je značajno viši u odnosu na pacijente u pdHBB grupi ($p < 0,01$). Statistički značajne razlike nađene su i prilikom poređenja dominantnog LDL dijametara kod dece pdHBB grupi u odnosu na D grupu ($p < 0,001$) i T grupu ($p < 0,01$). T grupa pacijenata je imala povoljniji LDL profil u odnosu na pdHBB i D grupu. Relativni udeli malih HDL subfrakcija bili su značajno viši ($p < 0,001$), a udeo velikih HDL 2b čestica i dominantni HDL dijametar značajno niži ($p < 0,001$) kod pacijenata sa HBB u odnosu T grupu. S obzirom na ulogu MPO i enzima paraoksonaze 1 (PON1) u nastanku i progresiji HBB, ispitivan je odnos ova dva parametra i pokazao trend ka višim vrednostima u grupama pacijenata sa HBB u odnosu na KG i T grupu. MPO/PON1 je bio u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa relativnim udelom HDL 3b ($p < 0,05$) u HBB grupi i sa relativnim udelom HDL 3a ($p < 0,05$) u T grupi. Dobijeni rezultati su pokazali da povišen odnos MPO/PON1 predstavlja značajan nezavisan faktor rizika za povećan udeo malih HDL subfrakcija u grupi pacijenata. Rezultati ove studije su ukazali na značaj određivanja

parametara oksidativno-stresnog statusa i raspodele lipoproteinskih subfrakcija kod dece i mladih sa HBB u cilju bolje procene rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti.

Ključne reči: Mijeloperoksidaza, subklase lipoproteinskih čestica, oksidativni stres, dislipidemija, inflamacija

Naučna oblast: Medicinske nauke – Farmacija

Uža naučna oblast: Medicinska biohemija

UDR broj: 612.015:[577.112.85-2-455/554:616-008.9(043.3)]

ABSTRACT

Chronic kidney disease (CKD) is a global health problem due to progressive course and development of comorbidities. Numerous studies investigated markers for early detection of CKD, because early detection is associated with a more favorable outcome and a higher quality of patient's life. Children with CKD are stratified to the highest category cardiovascular risk due to the development of accelerated atherosclerosis. Apart from dyslipidemia, which is characteristic for CKD, inflammation and oxidative stress are crucial in the development of atherosclerosis, mainly due to their role in the modification of lipoprotein particles. Although all low-density lipoproteins (LDL) are considered to be atherogenic, small LDL particles have the highest atherogenic potential and are more susceptible to oxidative modification. In physiological conditions, high density lipoproteins (HDL) have an atheroprotective role and small HDL 3 particles are considered to have higher antiinflammatory and antioxidant potential than HDL 2 particles. Myeloperoxidase is an enzyme associated with inflammation and oxidative stress and it is related to oxidative modification of lipoprotein particles. The aims of our study were to investigate the parameters of oxidative stress and antioxidant defence between different groups of patients with HBB, as well as the association with other lipid and non-lipid parameters. The aim was also to determine whether there is a difference in the concentration of MPO between patients with HBB and control group, as well as the relationship of MPO concentration with lipid and non-lipid parameters. The aim was also to examine the distribution of subfractions of LDL and HDL particles as well as the relationship between the distribution of LDL and HDL subfractions with other determined lipid and non-lipid parameters and also with parameters of oxidative stress and antioxidant defense. The study involved 51 pediatric patients in different CKD stages, while the control group consisted of 50 healthy children and adolescents who were selected during regular systemic examinations. The research was planned and implemented according to the ethical principles in accordance with the Helsinki Declaration. The concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) was significantly higher in patients compared to the control group (CG) ($p < 0.001$), while the concentration of advanced

protein oxidation products (AOPP) was significantly higher in patients on dialysis compared to CG ($p < 0.001$) and in comparison with patients in the pre-dialysis stage (pdCKD) and transplanted patients (T) ($p < 0.001$). SH groups were significantly lower in pdCKD and D patients compared to CG, but also in D patients compared with pdCKD group ($p < 0.05$). The activity of superoxide dismutase (SOD) was significantly higher in group D patients compared to pdCKD and T groups ($p < 0.05$) and significantly lower ($p < 0.05$) compared to pdCKD and T group with CG subjects. The concentration of MPO was significantly higher in the group of pdCKD patients, compared to CG, T and D groups ($p < 0.05$). According to the specific characteristic of dyslipidemia in CKD, we investigated associations of the atherogenic index of plasma (AIP) with oxidative status parameters. We found that the oxidative stress level measured with AOPP and MPO was independently associated with AIP in D patients. Our data showed that there are significant differences in the dominant LDL diameters between the test groups ($p < 0.001$). The dominant LDL diameter in CG was significantly higher than in the pdCKD group ($p < 0.01$). Significant differences were also found in the comparison of the dominant LDL diameters in children with pdCKD versus the group on dialysis treatment ($p < 0.001$) and the group of patients with a transplanted kidney ($p < 0.01$). Patients after transplantation have a more favorable LDL profile compared to pdCKD and D group. A relative proportion of small HDL subfractions was significantly higher ($p < 0.001$), and proportion of large HDL 2b particles and the dominant HDL diameter were significantly lower ($p < 0.001$) in patients with CKD when compared to T group. Given the role of MPO and paraoxonase 1 (PON1) PON1 in the onset and progression of CKD, the results showed a trend towards higher MPO/PON1 ratio in patients with CKD when compared to KG and T group. MPO/PON1 was in significant positive correlation with the relative portion of HDL 3b ($p < 0.05$) in the CKD group and with the relative portion of HDL 3a ($p < 0.05$) in the T group. The obtained results showed that the elevated MPO/PON1 ratio was a significant independent risk factor for the emergence of small HDL subfractions. It is important to note that although traditional risk parameters have regular values, a complex examination of the relationship between parameters of lipoprotein subfractions, markers of lipid status and oxidative status in relation to the degree of progression of CKD in pediatric patients can be used as a better diagnostic risk indicator for the development of cardiovascular complications.

Key words: Myeloperoxidase, lipoprotein subclasses, oxidative stress, dyslipidemia, inflammation

Scientific field: Medical sciences-Pharmacy

Special topic: Medical biochemistry

UDC N⁰: 612.015:[577.112.85-2-455/554:616-008.9(043.3)]

Skraćenice u tekstu:

ABCA1-ATP vezujući kasetni transporter A1

ACC-Zajednička karotidna arterija

ACI-Unutrašnja karotidna arterija

AHA-American Heart Association

AIP-Aterogeni indeks plazme

ANCA-Citoplazmatski antigeni neutrofila

ANOVA- Analiza varijanse

AOPP-Uznapredovali proizvodi oksidacije proteina

apoA-I-Apolipoprotein A-I

apoB-Apolipoprotein apoB-100

CAKUT-Kongenitalne anomalije bubrega i urinarnog trakta

CETP-Holesterol ester transferni protein

CI-Interval pouzdanosti

CTGF- Faktor rasta vezivnog tkiva

CaSR-Receptor za detekciju koncentracije kalcijuma

cIMT- Debljine intime-medije karotidnih arterija

cTGF-Faktor rasta vezivnog tkiva

D- Pacijenti na hemodijalizi

DM-Diabetes mellitus

DNK-Dezoksiribonukleinska kiselina

DTNB-2,2'-dinitro-5,5'-ditio-benzojeva kiselina

ELISA-Enzimski imunoesej

ESRD- Terminalna bubrežna slabost

GBM-Glomerulo-bazalna membrana

GFP-Jačina glomerulskog filtracionog pritiska

GH-Hormon rasta

GPX -Glutation peroksidaza

GSH-Glutation

GSPx-Glutation seleno peroksidaza

GSSG-Oksidovani glutation

HBB-Hronična bubrežna bolest
HDL-Lipoproteinske čestice visoke gustine
HDL-h-Koncentracija HDL holesterola
HUS -Hemolitički uremični sindrom
IGF I-Insulinu sličan faktora rasta I
IGFBP-Protein koji vezuje hormon rasta
IMHP-2-izopropil-4-metil-6-hidroksipirimidin
ISN-Međunarodno udruženje nefrologa
ITM-Indeks telesne mase
JGF-Jačina glomerularne filtracije
KDOQI-Nacionalna fondacija za bubrege Sjedinjenih Američkih Država
LCAT-Lecitin holesterol acil transferaza
LDL-Lipoproteinske čestice niske gustine
LDL-h-Koncentracija LDL holesterola
LK-leva srčana komora
MDA-Malondialdehid
MPO-Mijeloperoksidaza
NBT-Nitrobluetetrazolium(2,2'-di-p-nitrofenil-5,5'-difenil-3,3'-(3,3'-dimetoksi-4,4'-difenil)-ditetrazolium hlorid)
O₂⁻-superoksid anjon radikal
OK-Obim kukova
OS-Obim struka
Ox-LDL- Oksidovani LDL
PDAY-Studija patoloških determinanti ateroskleroze kod mladih
pdHBB- Pacijenti u predijaliznom stadijumu HBB
PON1-Paraoksonaza 1
PPAR- γ -Peroksizom proliferator aktiviranih receptor γ
PTH-Parathormon
Pb-Hidrostatski pritisak Boumanove kapsule
Pg-Hidrostatskom pritisku kapilara glomerula
Pgr-Onkotski pritisak plazme u glomerulima

RDA- Preporučeni dijetetski protokoli
RNK-Ribonukleinska kiselina
RNS- Reaktivna azotna jedinjenja
ROS-Reaktivna kiseonična jedinjenja
SH- sulfhidrilne grupe
SOD-Superoksid dizmutaza
T-Pacijenti sa transplantiranim bubregom
TBK-Tiobarbiturna kiselina
TBKRS-Tiobarbiturna kiselina reagujuće supstance
TG-Trigliceridi
TGF- β -Transformišući faktor rasta β
UH-Ukupni holesterol
VLDL-Lipoproteina veoma niske gustine
WHO-Svetska zdravstvena organizacija
 χ^2 - Chi-kvadrat

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Hronična bubrežna bolest	1
1.2. Fiziologija bubrega	2
1.2.1. Uloge bubrega u organizmu	2
1.2.2. Građa bubrega	3
1.3. Etiologija HBB kod dece	6
1.4. Patofiziologija razvoja HBB	7
1.4.1. Mehanizam oštećenja ćelija u HBB	9
1.5. Komplikacije HBB kod dece	14
1.5.1. Nutricioni status i rast	14
1.5.2. Renalna osteodistrofija	15
1.5.3. Anemija u HBB	16
1.5.4. Kardiovaskularne komplikacije kod dece sa HBB	16
1.6. Oksidativni stres	18
1.6.1. Vrste slobodnih radikala	18
1.6.2. Stvaranje slobodnih radikala	19
1.6.3. Dejstvo slobodnih radikala	21
1.6.4. Antioksidativna zaštita	23
1.6.5. Mijeloperoksidaza (MPO)	26
1.7. Dislipidemija u HBB	28
1.7.1. Heterogenost HDL i LDL čestica	29
1.7.2. Lipoproteini i ateroskleroza	33
1.7.3. Uloga MPO u stvaranju aterogenih LDL čestica	33
1.7.4. Uloga MPO u stvaranju disfunkcionalnih HDL čestica	35
1.8. Tretman pacijenata sa HBB	38
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	39
3. MATERIJAL I METODE	41
3.1. Ispitanici	41
3.2. Uzimanje i čuvanje uzoraka	43
3.3. Metode za određivanje biohemijskih i hematoloških parametara	43

3.4.	Merenje debljine cIMT	44
3.5.	Parametri oksidativnog stresa	45
3.6.	Određivanje parametara antioksidativne zaštite	46
3.7.	Određivanje koncentracije MPO	47
3.8.	Razdvajanje LDL i HDL subfrakcija	47
3.9.	Statistička analiza podataka	50
4.	Rezultati istraživanja	51
4.1.	Osnovni demografski podaci, antropometrijske karakteristike i rezultati biohemijskih parametara kod pacijenata sa HBB i zdravih ispitanika	51
4.2.	Analiza parametara za procenu bubrežne funkcije	54
4.3.	Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod bubrežnih pacijenata i zdravih ispitanika	55
4.3.1.	Korelacije između parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite i lipidnih i nelipidnih parametara	57
4.3.2.	Ispitivanje statusa enzima PON1 kod bubrežnih pacijenata i zdravih ispitanika	62
4.3.3.	Ispitivanje koncentracije enzima mijeloperoksidaze kod bubrežnih pacijenata i zdravih ispitanika	66
4.3.4.	Korelaciona analiza koncentracije enzima mijeloperoksidaze sa lipidnim i nelipidnim parametrima kod bubrežnih pacijenata i zdravih ispitanika.....	68
4.3.5.	Korelaciona analiza koncentracije enzima mijeloperoksidaze sa parametrima oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod bubrežnih pacijenata i zdravih ispitanika	69
4.4.	Ispitivanje povezanosti AIP sa lipidnim i nelipidnim parametrima kao i sa parametrima oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod bubrežnih pacijenata i zdravih ispitanika	70
4.4.1.	Korelaciona analiza AIP sa lipidnim i nelipidnim parametrima, parametrima oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod zdravih ispitanika	70
4.4.2.	Korelaciona analiza AIP sa lipidnim i nelipidnim parametrima, parametrima oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod predijalizijskih HBB pacijenata	72
4.4.3.	Korelaciona analiza AIP sa lipidnim i nelipidnim parametrima, parametrima	

oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod pacijenata na dijalizi	74
4.4.4. Korelaciona analiza AIP sa lipidnim i nelipidnim parametrima, parametrima oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod pacijenata nakon transplantacije bubrega.....	77
4.5. Veličina i raspodela lipoproteinskih subfrakcija u ispitivanim grupama	79
4.5.1. Korelacije karakteristika lipoproteinskih subfrakcija sa antropometrijskim parametrima i markerima lipidnog statusa u ispitivanim grupama	85
4.5.2. Korelacije karakteristika lipoproteinskih subfrakcija sa parametrima oksidativnog stresa u ispitivanim grupama	89
4.6. Povezanost Lp(a) sa karakteristikama lipoproteinskih subfrakcija u ispitivanim grupama.....	94
4.7. Leptin i adiponektin kod pacijenata sa HBB	94
4.8. Debljina intime-medije karotidne arterije (cIMT) kod pacijenata sa HBB i nakon transplantacije.....	99
4.9. Odnos MPO/PON1 u ispitivanim grupama	101
5. DISKUSIJA	105
6. ZAKLJUČCI.....	125
7. LITERATURA.....	129

1. UVOD

1.1. Hronična bubrežna bolest

Hronična bubrežna bolest (HBB) predstavlja globalni zdravstveni problem, pre svega zbog progresivnog toka i razvoja komorbiditeta. Smatra se da HBB nastaje kao posledica gubitka ili smanjenja broja funkcionalnih nefrona što vodi ka hroničnoj bubrežnoj slabosti ili terminalnoj bubrežnoj slabosti (engl. End stage renal disease-ESRD), čija incidenca u svetu eksponencijalno raste (1,2). Prema vodiču Nacionalne fondacije za bubrege Sjedinjenih Američkih Država (KDOQI- Kidney disease Outcomes Quality Initiative), HBB se definiše kao oštećenje strukture ili funkcije bubrega koje traje više od 3 meseca i/ili smanjenje jačine glomerularne filtracije (JGF) ispod 60 ml/min/1,73m² (3). Prema najnovijim podacima internacionalnih studija HBB se smatra važnim uzročnikom globalne smrtnosti, pri čemu je broj smrtnih slučajeva uzrokovan HBB porastao za 82,3 % u poslednje dve decenije (3,4).

S obzirom na činjenicu da u svetu iz godine u godinu raste broj pacijenata koji su tretirani nekim od terapijskih postupaka koje zamenjuju funkciju bubrega, HBB svakako postaje prioritet u oblasti javnog zdravlja. Globalno produženje životnog veka i starenje populacije, praćeno povišenom učestalošću diabetes mellitusa (DM) tipa 2 i hipertenzije, direktan je uzrok porasta incidence bolesti bubrega čime se ujedno opterećuju i resursi sistema zdravstvene zaštite (3,4). Jedan od glavnih problema kod bolesti bubrega jeste činjenica da bolest dugo protiče asimptomatski, a otkriva se tek u podmaklom stadijumu (6). Brojne studije se sprovode sa ciljem da se bolesti bubrega otkriju u ranim fazama, jer je rano otkrivanje bolesti povezano sa povoljnijim ishodom i višim kvalitetom života pacijenta (6,7).

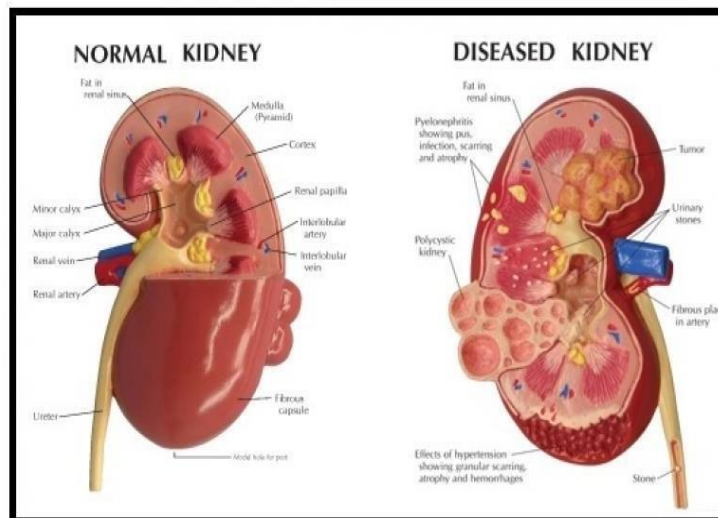
U zemljama u razvoju, oko 40 % osoba kojima se dijagnostifikuje bolest bubrega u programima skrininga u osnovi nemaju DM ili bilo kakvu kardiovaskularnu bolest (3-5). Uglavnom se radi o mlađim osobama što ukazuje da su zdravstveni i socijalni troškovi progresije bubrežne bolesti visoki i produženi. Upravo iz ovih razloga, rano

prepoznavanje HBB i pratećih komorbidnih stanja mogu potencijalno da uspore napredovanje bolesti do ESRD i poboljšaju kvalitet života, a smanje troškove zdravstvene zaštite. Zbog svih navedenih razloga, Svetska zdravstvena organizacija (WHO) i Međunarodno udruženje nefrologa (ISN) smatraju da je HBB patološko stanje koje zahteva razvoj specifične zdravstvene politike u cilju ranog otkrivanja i lečenja (3-6).

1.2. Fiziologija bubrega

1.2.1. Uloge bubrega u organizmu

Osnovna uloga bubrega u organizmu je uklanjanje produkata metabolizma (urea, kreatinin, mokraćna kiselina, elektroliti) i metabolita lekova, zatim reapsorpcija glukoze, amino kiselina i drugih malih molekula, te regulacija acido-bazne ravnoteže. Bubrezi (Slika 1) su uključeni u regulaciju zapremine i sastava telesnih tečnosti i krvnog pritiska, te produkciju hormona eritropoetina i renina. Takođe u bubrezima se odvija transformacija vitamina D u njegovu aktivnu formu kalcitriol (1,25-dihidroksiholekalciferol), kao i glukoneogeneza (9-11).

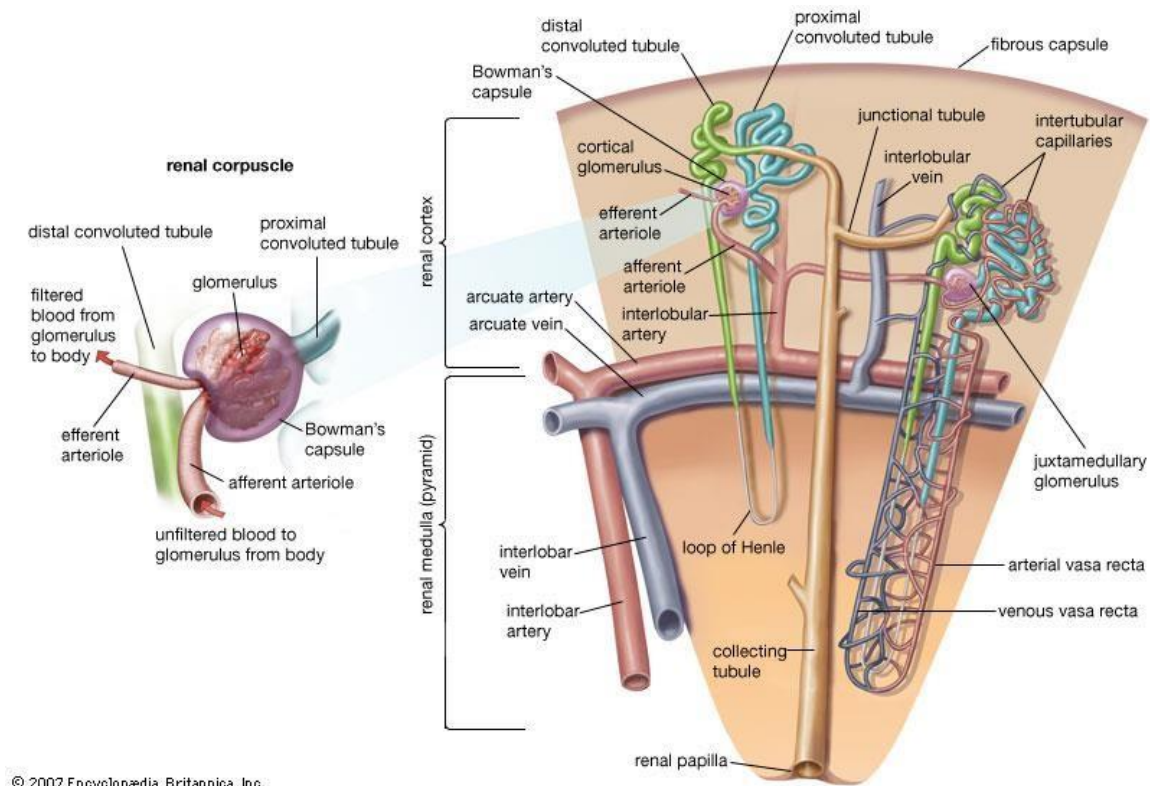


Slika 1. Izgled zdravog i obolelog bubrega

Preuzeto sa: <http://www.healthysi.com/chronic-kidney-disease-healthysi.com> (12)

1.2.2. Građa bubrega

Osnovna jedinica građe i funkcije bubrega je nefron (Slika 2) koji se sastoji iz glomerula, Boumanove kapsule, proksimalnog tubula, Henleove petlje, distalnih tubula i sabirnih kanalića (10).



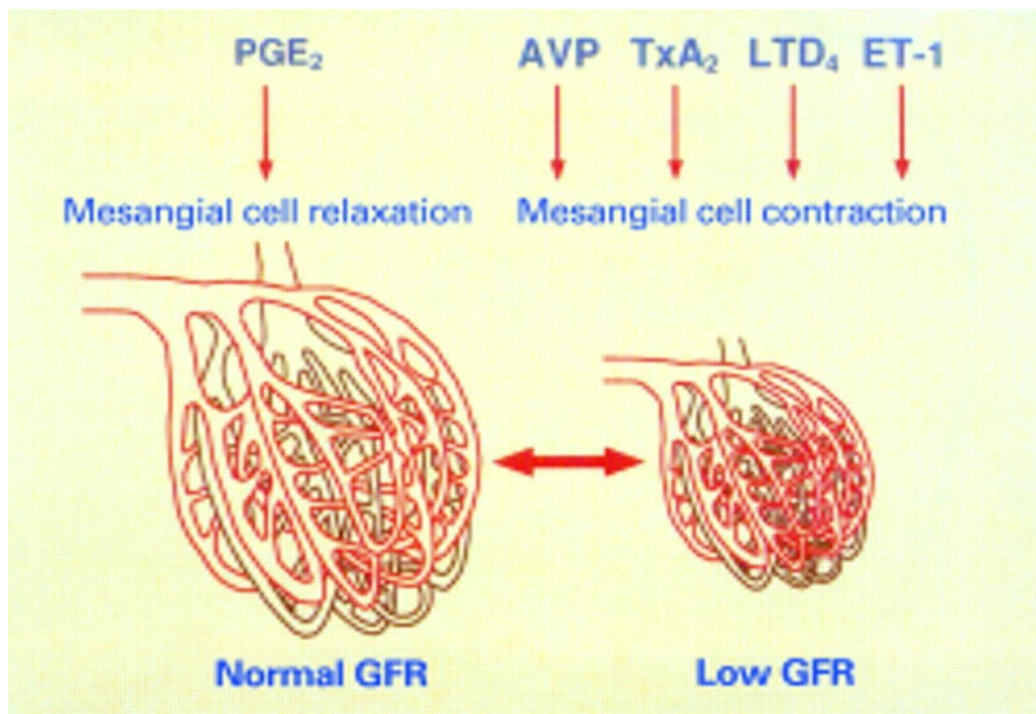
© 2007 Encyclopædia Britannica, Inc.

Slika 2. Nefron- funkcionalna jedinica bubrega

Preuzeto sa: <https://www.britannica.com/science/nephron> (13)

Glomerul je sastavljen iz mreže kapilara, pri čemu se dovodni arterijski sud (aferentna arteriola) grana u mrežu kapilara, a ponovnim spajanjem kapilara nastaje eferentna arteriola. Bazalne membrane endotelnih ćelija kapilara i bazalne membrane epitelnih ćelija Boumanove čaure čine glomerulo-bazalnu membranu (GBM) i na ovom mestu se stvara primarni ultrafiltrat plazme (14,15). U blizini GBM nalaze se i mezengijalne ćelije koje imaju značajnu ulogu u regulaciji jačine filtracije u glomerulima a ova uloga se ostvaruje preko kontraktilnih proteina (15,16).

Smanjenje JGF se postiže kontrakcijom kontraktilnih proteina mezengijalnih ćelija (Slika 3), a odvija se pod dejstvom sledećih faktora: angiotenzina II, vazopresina, endotelina, noradrenalina, histamina, aktivirajućeg faktora trombocita, tromboksana A₂, leukotriena C₄ i D₄ i prostaglandina F₂, dok se relaksacija kontraktilnih proteina, a samim tim i povećanje filtracije, odvija pod dejstvom prostaglandina E₂, dopamina i atrijalnog natriuretičnog peptida (15).



Slika 3. Kontrakcija i relaksacija kontraktilnih proteina mezengijalnih ćelija

Preuzeto iz : Dagher L, Moore K. The hepatorenal syndrome Gut 2001;49:729-737(17)

Pošto kroz bubrege svakog minuta protiče oko 1250-1300 ml krvi, ovako veliki protok se može postići jedino sadejstvom faktora nervne i humoralne regulacije (9). Primarni ultrafiltrat ima sastav sličan plazmi, a razlikuje se samo po sadržaju proteina koji zbog svoje veličine ne prolaze pore GBM. Filtracija u glomerulima je proces koji se vrši bez utroška energije, odnosno vrši se kao posledica razlike filtracionog pritiska sa dve strane membrane. Hidrostatskom pritisku kapilara glomerula (Pg) suprotstavlja se onkotski pritisak plazme u glomerulima (Pgr) i hidrostatski pritisak Boumanove kapsule (Pb) (9).

Jačina glomerulskog filtracionog pritiska (GFP) se može izračunati na sledeći način:

$$\text{GFP} = P_g - P_b - P_{gr}$$

GFP zavisi od arterijskog pritiska ali i od otpora aferentne i eferentne arteriole (9). Smatra se da bi porast arterijskog krvnog pritiska posledično povećao GFP, a na taj način došlo bi do povećanja brzine filtracije u glomerulima. Organizam pokušava da kompenzuje uticaj krvnog pritiska tako što dolazi do povećanja otpora aferentne arteriole i uzrokuje se vazokonstrikcija čime se smanjuje GFP, a JGF postiže fiziološke vrednosti (9). Sa druge strane ukoliko se snizi krvni pritisak, smanjuje se filtracija u glomerulima, a kao odgovor na ovu promenu dolazi do vazokonstrikcije eferentne arteriole, i na taj način se ponovo uspostavljaju fiziološke vrednosti JGF u glomerulima.

Prethodno opisani mehanizmi predstavljaju osnovu autoregulacije glomerularne filtracije, a veličina koja je opisuje je JGF. Smatra se da JGF predstavlja merilo funkcije bubrega (9,14). Prema dosadašnjim istraživanjima vrednosti JGF se razlikuju u zavisnosti od pola, starosti ali i od unosa proteina hranom. Rezultati različitih studija su pokazali da se sa starenjem fiziološki smanjuje broj funkcionalnih nefrona a time i JGF (7,18-20).

JGF se može posredno odrediti merenjem endogenih filtracionih markera (kreatinin i cistatin C) kao i egzogenih markera (Inulin, Iohexol, ⁵¹Cr-EDTA, ¹²⁵I-iothalamate). Međutim zbog visoke cene i specifičnosti izvođenja testova, metode koje koriste egzogene markere su napuštene. Većina vodiča za procenu funkcije bubrega preporučuje korišćenje koncentracije kreatinina u serumu, i određivanje klirensa kreatinina. Cistatin C se smatra pouzdanijim endogenim markerom funkcije bubrega od kreatinina, a preporuka je određivanje Cistatina C kod osoba sa JGF ispod 60ml/min/1,73m² (7,18-20).

1.3. Etiologija HBB kod dece

Uzroci koji dovode do HBB se značajno razlikuju kod dece u odnosu na populaciju odraslih pacijenata (21,22). Kod odraslih, bolest uglavnom nastaje kao posledica DM i hipertenzije, dok je kod dece uglavnom posledica primarnih kongenitalnih poremećaja (21). Smatra se da su najčešći uzroci HBB kod dece kongenitalne anomalije bubrega i urinarnog trakta (CAKUT), urođene nefropatije i glomerulonefritis. Kako uzrok HBB kod dece varira u zavisnosti od uzrasta, možemo reći da je kod dece mlađe od 12 godina najčešći uzrok CAKUT, a kod starije dece glomerulonefritis (22). Rezultati studije koja se bavila ispitivanjem HBB u pedijatrijskoj populaciji u našoj zemlji su pokazali da je u 58% slučajeva uzrok bolesti CAKUT, 14,6% čine nasledne bolesti bubrega, 11,9% bolesti glomerula, 14,6% ostala bubrežna oboljenja i 1,8% nepoznati uzroci pri čemu urođene anomalije bubrega i urinarnog trakta kod dece obuhvataju 72,6% svih anomalija dijagnostifikovanih prenatalno (23).

Dosadašnja istraživanja su pokazala da malformacije bubrega i urinarnog trakta mogu nastati usled teratogenih faktora, a njihov nastanak zavisi i od ishrane majke, kao i brojnih faktora koji utiču na tok trudnoće (3,21,24). Bubrežna funkcija u CAKUT je određena brojem funkcionalnih nefrona formiranih u toku embrionalnog razvoja (22). Smatra se da se urođeni defekti bubrega javljaju u toku intrauterinog razvoja ploda, a ovi nedostaci obuhvataju abnormalnosti veličine, strukture i položaja bubrega. U urođene defekte se ubrajaju: bubrežna ageneza (deca rođena samo sa jednim bubregom), bubrežna displazija (deca rođena sa dva bubrega od kojih jedan nije funkcionalan), ektopični bubrezi (deca rođena sa bubrezima koji se nalaze ispod, iznad ili na suprotnoj strani od uobičajenog položaja). Rezultati velikog broja studija su pokazali da deca sa bubrežnom agenezom ili displazijom imaju povećan rizik za razvoj bolesti bubrega. Značajno je naglasiti da se CAKUT otkrivaju samo kod 3% dece, dok su u 20% slučajeva uzrok perinatalne smrti novorođenčadi (22).

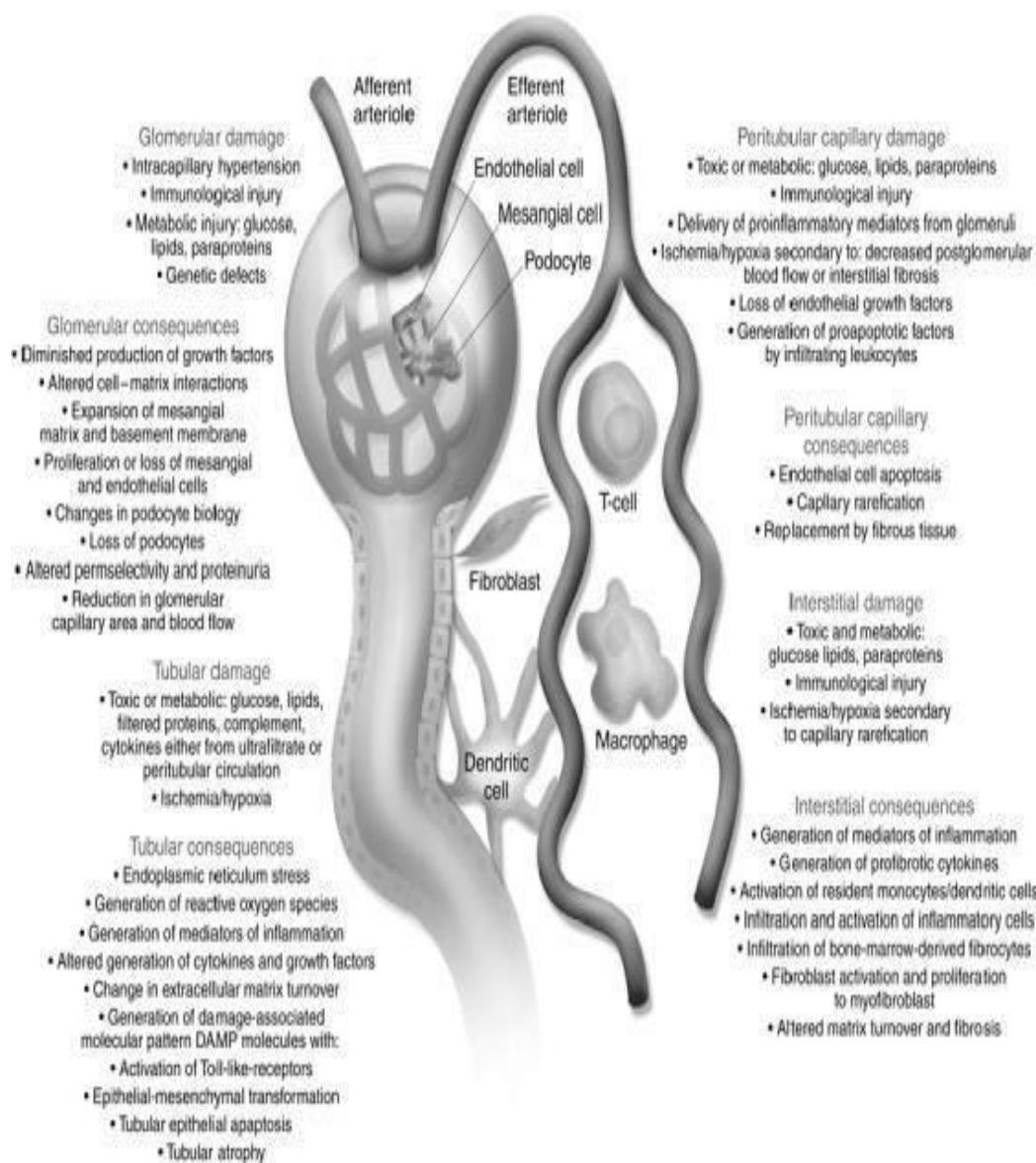
Osim naslednih bolesti bubrega, uzrok HBB kod dece mogu biti i infekcije urinarnog trakta. Naime, hemolitički uremični sindrom (HUS) je retka bolest koju uzrokuje *Escherichia Coli*, bakterija koja se nalazi u kontaminiranoj hrani, a sekretuje

crevne toksine koji oštećuju eritrocite i endotel krvnih sudova, uključujući i krvne sudove glomerula (24). Osim infekcije *E. coli*, značajan uzrok nastanka bubrežnih bolesti kod dece može biti i streptokok. Poststreptokokni glomerulonefritis je oboljenje koje može nastati posle infekcije grla ili kože bakterijama iz roda *Streptococcus*, nakon koje može doći do stimulacije imunog sistema i produkcije antitela koja se mogu deponovati u glomerulima, čime oštećuju bubrege. Većina slučajeva poststreptokoknog glomerulonefritisa se razvija 1-3 nedelje, a retko i do 6 nedelja posle infekcije. Bolest obično kratko traje i bubrezi se oporavljaju, ali u retkim slučajevima oštećenje bubrega može biti trajno (24).

Nefrotski sindrom je skup simptoma koji ukazuju na oštećenje bubrega a obuhvata: albuminuriju, hipoalbuminemiju, hiperlipidemiju, oticanje ekstremiteta i oticanje lica (3, 24). Nefrotski sindrom kod dece može biti uzrokovan fokalnom segmentalnom glomerulosklerozom, membranskim proliferativnim glomerulonefritisom, kao i sistemskim bolestima (sistemski eritemski lupus i DM) (3,24).

1.4. Patofiziologija razvoja HBB

Uprkos različitim etiologijama bolesti kod odraslih i dece, način razvijanja HBB je sličan (1). Protok krvi kroz bubrege je mnogo veći u odnosu na ostale organe, a kao posledica veće perfuzije tkivo bubrega je više izloženo potencijalno štetnim cirkulišućim supstancama (1, 25, 26). Brenner et al. (27) su okarakterisali glomerularnu hipertenziju i hiperfiltraciju kao glavne uzročnike progresije HBB kod odraslih (Slika 4). Smatra se da glomerulska membrana sadrži negativno naelektrisane molekule koje služe kao barijera anjonskim makromolekulama. Ukoliko dođe do oštećenja ove elektrostatičke barijere, proteini plazme mogu da se nađu u filtratu glomerula što ukazuje da sekvencijalna organizacija mikrovaskulature nefrona i niža pozicija tubula u odnosu na glomerule ne samo da održava glomerulo – tubularnu ravnotežu, već sprečava širenje oštećenja sa glomerula na tubule (1, 25, 26).



Slika 4. Shema puteva koji doprinose progresiji HBB

Preuzeto iz: Fuster V, Fallon JT, Badimon JJ, Nemerson Y. The unstable atherosclerotic plaque: clinical significance and therapeutic intervention. Thromb Haemost 1999;78:247-255 (28)

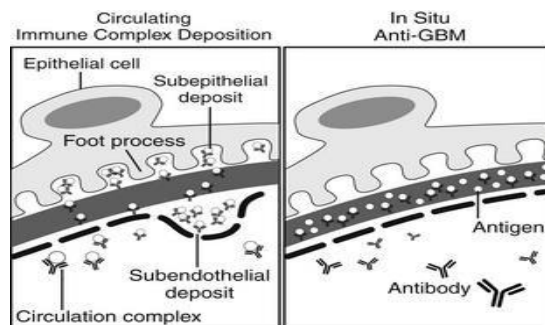
1.4.1. Mehanizam oštećenja ćelija u HBB

Najčešće stečene bolesti glomerula su izazvane imunološkim oštećenjima, mehaničkim ili metaboličkim stresom. Patogenetski bolesti glomerula možemo podeliti na tri grupe:

- 1) Neproliferativne - bez inflamacije glomerula i bez taloženja depozita imunoglobulina (Ig) (idiopatska fokalna ili segmentalna glomeruloskleroza), ili sa taloženjem Ig, ali bez inflamacije glomerula (membranska nefropatija)
- 2) Proliferativne glomerulske bolesti - sa taloženjem Ig koje dovodi do proliferacije ćelija (proliferativni glomerulonefritis-najčešći uzrok HBB kod dece, lupus nefritis)
- 3) Heterogena grupa glomerulskih bolesti koje nastaju kao posledica nekih sistemskih bolesti (DM, amiloidoza)

Inflamatorni proces počinje taloženjem Ig i aktivacijom komplementa. Smatra se da imuni kompleksi mogu da se talože u mezengijumu (IgA nefropatija, Lupus nefritis), u subendotelnom prostoru (Lupus nefritis klase III) ili subepitelnom prostoru (1, 29, 30). Brojne studije ukazuju da glomerulonefritis uzrokuju cirkulišuća antitela (Slika 5); naime ova antitela reaguju sa antigenima lociranim na membrani glomerula ili antigenima koji su dospeli u glomerule cirkulacijom (formacija imunih kompleksa *in situ*).

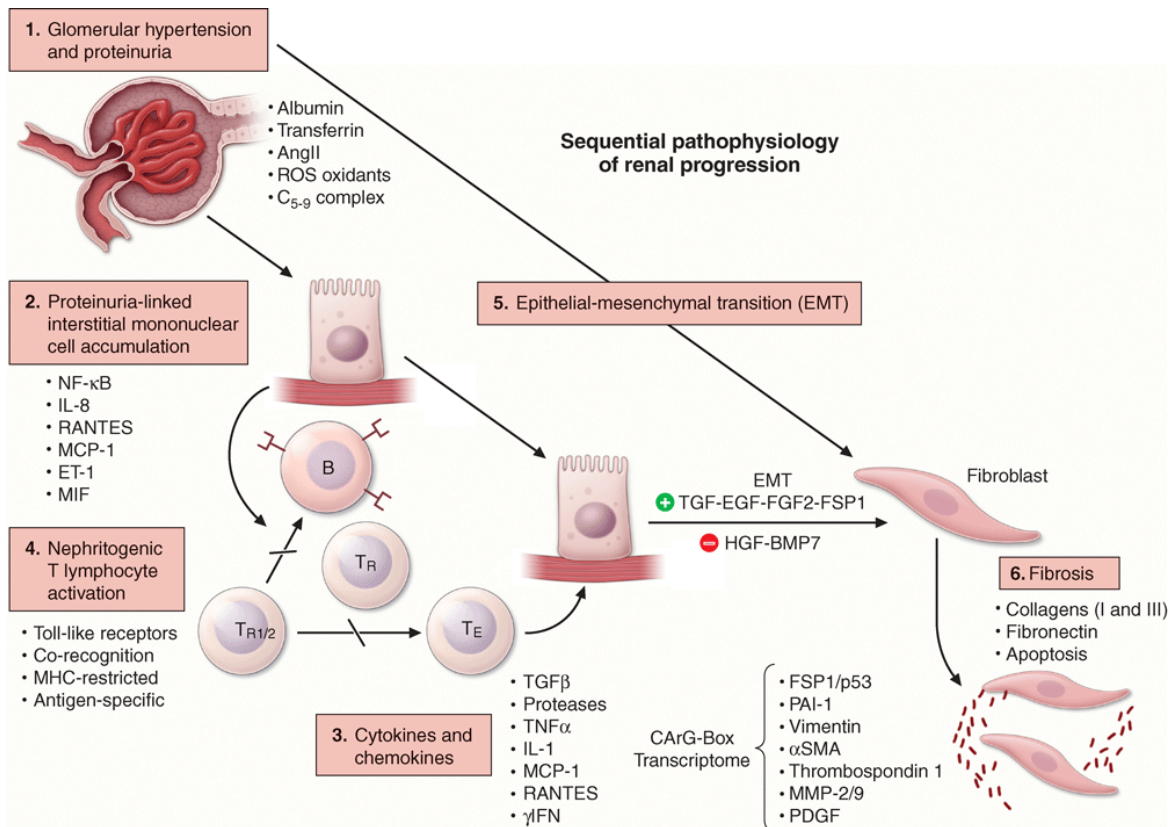
Aktivirane T ćelije mogu biti modulatori produkcije antitela u toku glomerulonefritisa, pri čemu interakciju ostvaruju preko svog površinskog receptora/CD3 kompleksa sa antigenima prisutnim na endotelnim, mezengijalnim i epitelnim glomerularnim ćelijama. Smatra se da solubilni faktori koje proizvode T ćelije učestvuju u patogenezi glomerularne fibrinogeneze (1). Osim aktiviranih T ćelija, smatra se da su i transformišući faktor rasta β (TGF- β) i faktor rasta vezivnog tkiva (CTGF) važni u glomerularnoj fibrogenezi, zato što stimulišu glomerularne ćelije da proizvode ekstracelularni matriks, a smatra se da je ovo ključni događaj u progresiji bubrežne bolesti, jer se inhibira sinteza tkivnih proteaza (matriks metaloproteinaze) (1).



Slika 5. Imunološki posredovan glomerulonephritis

Preuzeto sa: <https://veteriankey.com/diseases-of-the-glomerulus> (31)

Formirani imuni kompleksi mogu da se talože i stvaraju depozite u glomerulima. Takođe, oštećenje glomerula antitelima bez imunih kompleksa u glomerulima može uzrokovati i cirkulišuće antitelo protiv citoplazmatskih antigena neutrofila (ANCA) (1, 2, 7). Depo antitela koji je stvoren u mezengijalnom matriksu dovodi do nefritičkog odgovora, pri čemu se aktiviraju leukociti i trombociti iz krvi. Usled oslobađanja citokina i lizozomalnih enzima, komponente komplementa koje oštećuju vaskularni zid i filtracionu barijeru indukuju hemotaksu i akumulaciju dodatnih leukocita iz cirkulacije (26,29, 32). Smatra se da je glavni efektor povrede glomerula oslobađanje hemotaktičnih faktora C5a i C3a. Aktivirane T ćelije oslobađaju citokine i druge medijatore inflamacije i citotoksičnosti, te na taj način one deluju kao medijatori oštećenja glomerula (26, 29, 30).

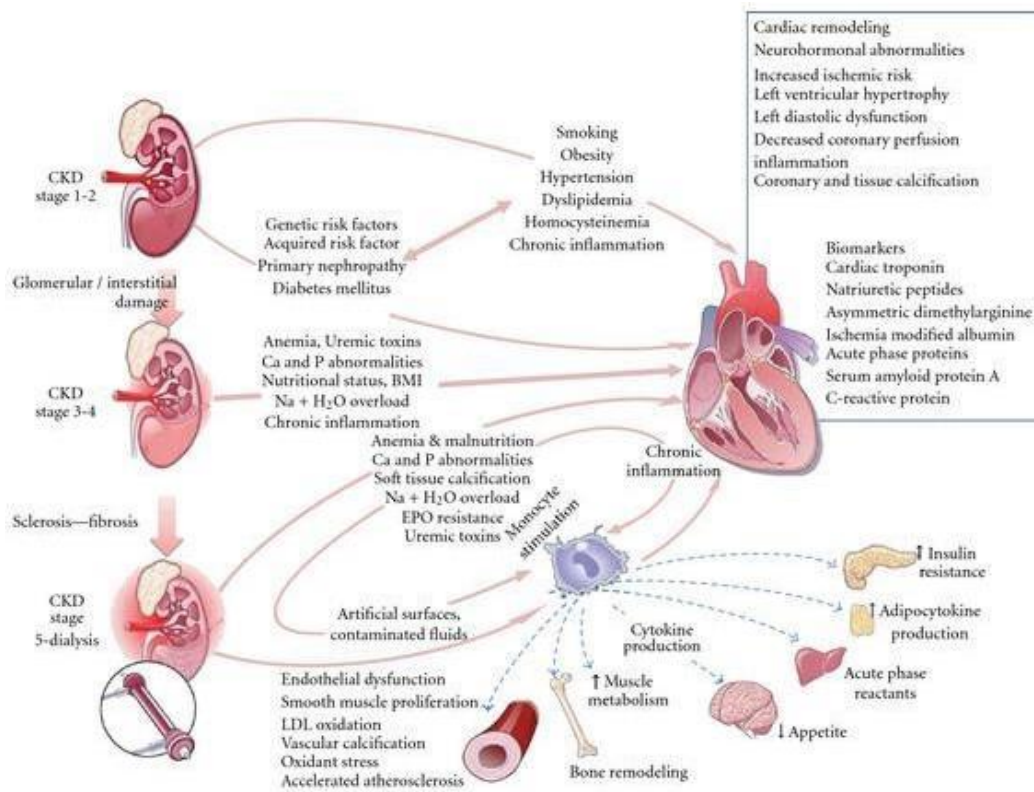


Slika 6. Adaptacija bubrega na povredu

Preuzeto iz: Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson J, Loscalzo J. eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine, 18e.* New York, NY: McGraw-Hill; 2012

(33)

Bubrezi su obično zaštićeni od sistemske hipertenzije, ali ukoliko dođe do gubitka nefrona, bez obzira na uzrok, u glomerulima se može razviti hipertenzija kao vid adaptivnog mehanizma (Slika 6). Tada se usled povećanja pritiska u glomerulima javlja hipertrofija glomerula, jer bubreg pokušava da se prilagodi gubitku nefrona kako bi održao konstantnu JGF (1, 26-29). Naime, bubrezi se u početku prilagođavaju oštećenju povećanjem stope filtracije u preostalim funkcionalnim nefronima, procesom koji se naziva adaptivna hiperfiltracija. Usled povećanog stvaranja angiotenzina II dolazi do ushodne regulacije TGF β, što dovodi do povećane sinteze kolagena, te renalnih ožiljaka unutar glomerula.



Slika 7. Patofiziologija razvoja HBB

Preuzeto sa: <https://www.hindawi.com/journals/crp/2011/963517/fig2/> (34)

Kada su u pitanju tubuli, dosadašnja istraživanja ukazuju da su promene na tubulima uglavnom posledica dužeg trajanja bolesti, zato što su ćelije tubula izložene proteinima koji se inače ne nalaze u normalnom glomerularnom filtratu. Smatra se da su sledeći faktori uključeni u formiranje tubulointersticijalnih inflamatornih infiltrata: inflamatorne mononuklearne ćelije (monociti/makrofage, T limfociti), imunološki depoziti, citokini (Angiotenzin II, TGF β), metabolička acidoza i profibrolitički citokini koji stimulišu fibroblaste da pređu u miofibroblaste (25, 26-29). Angiotenzin II zajedno sa faktorom rasta vezivnog tkiva (cTGF) indukuje hipertrofiju tubularnih ćelija. Za ekspresiju glatkog mišićnog aktina, fibroblasti moraju biti aktivirani citokinima koji menjaju njihov fenotip i dovode do prevođenja u miofibroblaste.

Bez obzira na etiologiju oštećenja bubrega, kaskada događaja koji slede je složena. Strukturne promene, kao i prateće biohemijske, ćelijske i molekularne promene (Slika 7), dovode do progresivnog oštećenja i gubitka funkcije bubrega (25-29). Upravo prema toku bolesti i stepenu oštećenja bubrega, HBB je klasifikovana u pet stadijuma (Tabela 1) (21).

Tabela 1. Klasifikacija HBB

Stadijum	Opis	JGF ml/min/1,73 m ²	Prevalenca, %
1.	Oštećenje bubrega sa normalnom ili povećanom GFR	> 90	3,3
2.	Oštećenje bubrega sa blagim smanjenjem GFR	60-89	3,0
3.A 3.B	Oštećenje bubrega umerenim smanjenjem GFR	49-59 30-44	4,3
4.	Teško smanjenje GFR	15-29	0,2
5.	Terminalna insuficijencija bubrega	<15 (Dijaliza)	0,2

Preuzeto iz: Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse, Ministarstvo zdravlja Republike Srbije. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za prevenciju, dijagnostifikovanje i lečenje hronične bolesti bubrega. Beograd 2013(21)

Prvi stadijum HBB podrazumeva da JGF iznosi 50-75% od normalne vrednosti za tu starosnu dob. Ova faza je uglavnom asimptomatska a povećanje koncentracije uree, kreatinina i parathormona (PTH) u cirkulaciji se javlja kada JGF padne ispod 50% od normalnih vrednosti (21, 25). U toku drugog stadijuma HBB vrednost JGF se kreće između 25-50% od normalne vrednosti. Prolazi asimptomatski, a mogu se javiti

proteinurija, nokturija i česte infekcije (21, 25). U trećem stadijumu bolesti javljaju se simptomi poput anemije, acidoze, hiperfosfatemije, hipokalcijemije, renalne osteodistrofije i rikecije, a JGF iznosi 10-25% od normalne vrednosti (21, 25). Četvrti i peti stadijum HBB podrazumevaju ispoljavanje neuroloških, kardiovaskularnih, intestinalnih i hematoloških poremećaja. Kako je HBB progredirala do ESRD treba pripremiti pacijenta za dijalizu ili transplantaciju kao terapijske metode (21, 25).

Iako se osnovni problem koji je pokrenuo HBB kod dece često i ne može lečiti, opsežna istraživanja na eksperimentalnim životinjama i preliminarni rezultati kliničkih studija sugerišu da je napredak do kasnih stadijuma bolesti u velikoj meri posledica sekundarnih faktora koji nisu u vezi sa početnim uzrokom. Adaptivna hiperfiltracija, iako je u početku korisna, dovodi do dugoročnog oštećenja glomerula preostalih nefrona, manifestuje se proteinurijom i progresivnom bubrežnom insuficijencijom a upravo ovaj ireverzibilan proces je odgovoran za razvoj krajnje faze bubrežne bolesti (32).

1.5. Komplikacije HBB kod dece

1.5.1. Nutricioni status i rast

Usled prisustva HBB kod dece često dolazi do značajnog zaostajanja u rastu (35). Ovaj efekat najčešće nastaje kao posledica disbalansa nutricionih, metaboličkih i endokrinih procesa (35-39). Naime, faktori koji utiču na smanjenje rasta uključuju proteinsku i kalorijsku malnutriciju, metaboličku acidozu, rezistenciju organa na dejstvo hormona rasta, anemiju i renalnu bolest kostiju, pri čemu su sve ove promene izraženije ukoliko se bolest razvila ranije. Ove činjenice ukazuju na neophodnost intervencija u ranom uzrastu kako bi se omogućio normalan rast dece sa HBB. Nizak rast je uglavnom više zastupljen kod dece sa kongenitalnim i naslednim bolestima bubrega (33).

Malnutricija je najčešći faktor koji dovodi do smanjenja rasta u prve 2 godine života, a rezultati mnogih studija su ukazali na potrebu za definisanjem optimalne proteinske ishrane koja bi pozitivno uticala na normalan rast (34). Smatra se da unošenje

suplemenata prema preporučenim dijetetskim protokolima (RDA) prevenira redukciju rasta (35, 38). Dve kliničke studije (36, 37) su pokazale da nije bilo razlike u progresiji renalnog oštećenja i linearnog rasta kod dece koja su bila na dijetetskoj proteinskoj restrikciji u odnosu na decu iz kontrolnih grupa, a dokazano je i dejstvo metaboličke acidoze na rast kod dece sa primarnom tubularnom acidozom. Naime, korekcija acidoze suplementima bikarbonata rezultirala je ubrzanim rastom i dostizanjem normalne visine za taj uzrast. Pretpostavlja se da metabolička acidoza dovodi do smanjenja sekrecije hormona rasta, kao i do redukcije nivoa insulinu sličnog faktora rasta I (IGF I) (36,37).

Nizak rast kod dece sa HBB uglavnom nastaje usled rezistencije na hormon rasta (GH), pri čemu serumski nivo hormona rasta može biti normalan ili povišen (37). Smanjenje rasta, iako postoje povećane koncentracije hormona rasta, se može objasniti rezistencijom organa na GH usled oštećenja bubrega, a povećana koncentracija IGF I i cirkulišućeg proteina koji vezuje hormon rasta (IGFBP) takođe ukazuju na neosetljivost ciljnih tkiva na GH. Naime smatra se da usled prisutne uremije kod dece u predijaliznom stadijumu bubrežne bolesti dolazi do poremećaja postreceptorskog efekta IGF I usled smanjenja aktivnosti tirozin - kinaze koja je značajna za proces autofosforilacije receptora za IGF I i njegovu aktivaciju (36-38). Kod dece sa HBB nivo cirkulišućih IGF I i IGF II je uglavnom normalan, ali je njihova bioaktivnost redukovana. Za tretman ovih komplikacija koristi se rekombinantni humani GH koji dovodi do povećanja nivoa IGF I, čime se postiže i njegova povećana bioaktivnost (32-34).

1.5.2. Renalna osteodistrofija

HBB je praćena smanjenim izlučivanjem fosfata čime se njegova koncentracija u krvi povećava, uz paralelno smanjenje koncentracije kalcijuma. Hiperfosfatemija i hipokalcemija mogu indukovati sekundarni hiperparatireoidizam i renalnu osteodistrofiju. Takođe, usled oštećenja bubrega onemogućena je sinteza aktivnih metabolita vitamina D, rezultujući malapsorpcijom kalcijuma preko intestinalnog trakta što produbljuje hipokalcemiju. Receptor za detekciju koncentracije kalcijuma (CaSR) lociran je na površini glavnih ćelija paratireoidne žlezde i ima centralnu ulogu u regulaciji sinteze i

sekrecije PTH, što ga čini važnim regulatorom homeostaze kalcijuma. Kod HBB sniženje koncentracije kalcijuma u serumu dovodi do inaktivacije CaSR i povećanja sinteze i sekrecije PTH, što rezultira povećanim oslobađanjem kalcijuma iz koštanog tkiva. Mehanizmi koji kontrolišu sintezu PTH su kompleksni i još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni (39).

Kao posledica uremije kod HBB dolazi do rezistencije kostiju na PTH što dodatno pogoršava hiperparatireoidizam. Smatra se da se smanjenje rasta javlja zbog destrukcije zone rasta na dugim kostima, što može dovesti do epifiziolize i frakture metafiza (35, 36).

1.5.3. Anemija u HBB

Kao posledica HBB kod dece često dolazi do razvoja anemije koja je praćena slabijim kvalitetom života, smanjenim neurokognitivnim sposobnostima i povećanim rizikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti. Anemija kod dece sa HBB nastaje usled smanjenja produkcije eritropoetina i usled loše regulacije nivoa gvožđa (36,37). Naime, patogenetski faktori koji utiču na razvoj anemije su smanjena eritropoeza, inhibitori eritropoeze, fibroza kostne srži, smanjenje životnog veka eritrocita, gubitak krvi, stanje deficijencije gvožđa ili folne kiseline. U terapiji anemije primenjuje se humani rekombinantni eritropoetin koji dovodi do bolje oksigenacije tkiva, poboljšava nutritivni status i smanjuje potrebu za transfuzionom terapijom (36, 40).

1.5.4. Kardiovaskularne komplikacije kod dece sa HBB

Kardiovaskularne bolesti su glavni uzrok smrtnosti kod pacijenata na dijalizi. Istraživanja ukazuju da iako je procenat preživljavanja dece sa ESRD poboljšan i dalje je za oko 30% niži u odnosu na zdravu decu (41). Brojne studije su pokazale da faktori rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti kod mladih sa HBB mogu biti identični faktorima rizika kod odraslih, pri čemu čvrsti dokazi ovih studija ukazuju da osim tradicionalnih faktora rizika, kombinacija hronične inflamacije i oksidativnog stresa može imati

osnovnu ulogu u razvoju kardiovaskularnih komplikacija (41-43).

Kardiovaskularne komplikacije u uznapredovaloj HBB obuhvataju hipertenziju i dislipidemiju i javljaju se kod 70-90% dece na hroničnoj dijalizi (42-44). Iako transplantacija poboljšava renalnu funkciju i eliminiše mnoge faktore rizika, hipertenzija i hiperlipidemija perzistiraju i nakon izvršene transplantacije (44,45). Za razvoj kardiovaskularnih komplikacija kod pacijenata sa HBB odgovorna su dva paralelna procesa. Prvi proces predstavlja odgovor na mehaničko ili hemodinamsko opterećenje srca u kojem dolazi do hipertrofije leve komore, koje može biti posledica hipertenzije, retencije natrijuma, anemije ili arterovenskog šanta. Eksperimentalni modeli srčane hipertrofije idu u prilog teoriji da mehanički stres usled povećanja pritiska jeste okidač koji dovodi do remodelovanja miokarda (46, 47). Faktori uključeni u remodelovanje su renin – angiotenzin - aldosteron mehanizam, adrenergični sistem, inflamatorni citokini, a vremenom u toku adaptivne faze hipertrofije leve komore (LK) dolazi do smanjenja kapilarne gustine, smanjenja koronarne rezerve i subendotelne rezerve, smanjenja subendokardijalne perfuzije, tendencije ka aritmiji i razvoju miokardijalne fibroze. Ukupno uzevši, može se smatrati da upravo ovi mehanizmi vode ka smrti miocita (47). Drugi proces uključuje vaskularnu povredu i razvoj ateroskleroze. Naime, formiranje ateroma počinje akumulacijom lipida, proliferacijom glatkih mišićnih ćelija i kolagenskih vlakana, a nastavak procesa podrazumeva kalcifikaciju intime medije krvnih sudova (13). Smatra se da ateroskleroza utiče na elastičnost arterija, ali je takođe povezana i sa vaskularnim remodelovanjem, pa dolazi do povećanja debljine zida arterije, te posledičnog povećanja sistolnog krvnog pritiska i pulsnoeg pritiska. Dalji razvoj ateroskleroze produbljuju oksidativni stres, dislipidemija i inflamacija koje se javljaju u hroničnim bolestima bubrega (48).

Brojne studije su pokazale da je dobar marker postojanja subkliničke ateroskleroze merenje debljine intime-medije karotidnih arterija (cIMT) (49). Dosadašnjim istraživanjima nađeno je da je cIMT povećana kod uremičnih i pacijenata na hemodijalizi u odnosu na zdrave osobe, a nađena je i pozitivna korelacija cIMT sa markerima oksidativnog stresa, te negativna sa antioksidansima (49).

1.6. Oksidativni stres

Oksidativni stres predstavlja stanje koje nastaje usled poremećaja ravnoteže oksidoredukcionih procesa u organizmu, odnosno prekomernog stvaranja slobodnih radikala koje ćelijski homeostatski mehanizmi nisu u stanju da neutrališu (50, 51).

Slobodni radikali mogu biti atomi, molekuli ili joni koji u svojoj spoljašnjoj orbiti imaju jedan nespareni elektron, zbog čega su reaktivni i brzo stupaju u reakciju sa molekulama koje se nalaze u okruženju. Smatra se da se tokom evolucije ljudski organizam prilagodio aerobnim uslovima života, pa je u cilju zaštite od slobodnih radikala stvorio odbrambene antioksidativne mehanizme zaštite (52). Antioksidativni mehanizmi podrazumevaju sistem koji neutrališe štetne slobodne radikale i sprečava njihovo prekomerno stvaranje (51).

1.6.1. Vrste slobodnih radikala

Slobodni radikali su po svojoj hemijskoj strukturi reaktivna kiseonična jedinjenja (ROS) i reaktivna azotna jedinjenja (RNS) (Slika 8). Stvaranje slobodnih radikala se neprestano odvija kao deo normalnih ćelijskih funkcija (53).

U fiziološkim uslovima, slobodni radikali kiseonika mogu nastati u svim ćelijama, a u najreaktivnije kiseonične radikale se ubrajaju hidrosil radikal i superoksidni anjon. Vodonik peroksid takođe pripada ovoj grupi zato što, iako nije slobodni radikal po svojoj strukturi, doprinosi stvaranju reaktivnih kiseoničnih radikala (53-55).

Reactive Oxygen Species (ROS) include:			
Radicals		Non-Radicals	
Hydroxyl	$\text{OH}\cdot$	Peroxynitrite	ONOO^-
Superoxide	$\text{O}_2^{\cdot-}$	Hypochloric acid	HOCl
Nitric Oxide	$\text{NO}\cdot$	Hydrogen Peroxide	H_2O_2
Thyl	$\text{RS}\cdot$	Singlet Oxygen	$^1\text{O}_2$
Peroxyl	$\text{RO}_2\cdot$	Ozone	O_3
Lipid peroxyl	$\text{LOO}\cdot$	Lipid peroxide	LOOH

Reactive Nitrogen Species (RNS) include:			
Nitrous oxide	$\text{NO}\cdot$	Nitrosyl cation	NO^+
Peroxynitrite	OONO^-	Nitrogen dioxide	$\text{NO}_2\cdot$
Peroxynitrous acid	ONOOH	Dinitrogen trioxide	N_2O_3
Nitroxyl anion	NO^-	Nitrous acid	HNO_2
Nitryl chloride	NO_2Cl		

Slika 8. Vrste slobodnih radikala

Preuzeto sa: <http://kisisel.ankara.edu.tr/pharmacy.ankara.edu.tr/sibel/antiox.htm> (56)

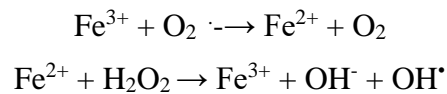
U reaktivna azotna jedinjenja svrstava se azot monoksid koji je vrlo značajan u brojnim fiziološkim procesima u organizmu, kao i peroksinitrit koji je najagresivniji predstavnik RNS i dovodi do lipidne peroksidacije i oštećenja ćelijske membrane (55).

1.6.2. Stvaranje slobodnih radikala

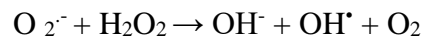
Produkcija slobodnih radikala se neprestano odvija u okviru normalnih ćelijskih procesa. Najveći deo slobodnih radikala nastaje u mitohondrijama kao posledica ćelijskog disanja, imunog odgovora ili reakcija enzima citohroma P450. Prema postojećim istraživanjima mesta koja su najkritičnija za “curenje” elektrona sa respiratornog lanca su koenzim Q i kompleksi I i III, pri čemu prisustvo slobodnih metala sa promenljivom valencom u značajnoj meri povećava verovatnoću oksidativnog stresa bez obzira na prisustvo antioksidativnih enzima. Smatra se da su mitohondrije, zbog kompenzatornog

prisustva značajne količine antioksidativnih enzima (mitohondrijalna superoksid dismutaza i katalaza) i nisko molekularnih antioksidanasa, sposobne za neutralizaciju stvorenih ROS (57).

Svi biološki sistemi koji stvaraju superoksid radikal takođe produkuju i H₂O₂ kao rezultat spontane reakcije dismutacije. Hidroksil radikal je najreaktivniji kiseonikov radikal. Nastaje u Fentonovoj reakciji u prisustvu Fe ili Cu. Fentonova reakcija se prvenstveno odvija u mitohondrijama, peroksizomima i mikrozmomima (54).



Haber- Vajsova reakcija (58) predstavlja zbir ove dve reakcije:



Hipohloritna kiselina, HClO, nastaje iz H₂O₂ delovanjem enzima mijeloperoksidaze (MPO). HClO je izuzetno reaktivna i oksiduje proteinske komponente (53-55) kao što su:

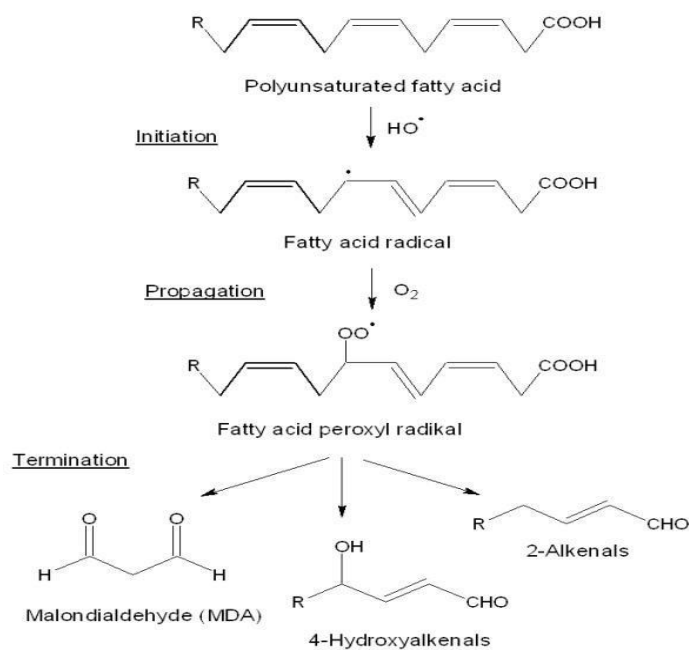
- 1) Tiol grupe koje stvaraju disulfidne mostove i tako formiraju ukrštene veze u molekulima proteina
- 2) Amino grupe koje stvaraju organski hloramin koji ima dug poluživot i sam poseduje oksidativnu sposobnost, čime omogućava stvaranje ukrštenih veza u proteinima i njihovu agregaciju.
- 3) Metionin

Promene na molekulima lipida obuhvataju peroksidaciju masnih kiselina fosfolipida ćelijske membrane što za posledicu ima oštećenje membrane, a povećavanje predispozicije ka aterosklerozi se dešava usled oksidacije lipoproteinskih čestica niske gustine (*eng. low density lipoprotein, LDL*) kojima se kao rezultat oksidativne modifikacije povećavaju proaterogena svojstva (14). Osim prethodno pobrojanih uticaja, promene na nukleinskim kiselinama (DNK, RNK) koje obuhvataju dezaminaciju, alkilaciju, deleciju ili inserciju pojedinih baza mogu dovesti i do promene u ekspresiji gena (32).

1.6.3. Dejstvo slobodnih radikala

Slobodni radikali u organizmu čoveka imaju i odbrambene i regulacione uloge. Oni učestvuju u neutralizaciji mikroorganizama zahvaljujući svom citocidnom dejstvu, pomažu pri detoksikaciji lekova, a važnu ulogu u ćelijskoj signalizaciji ostvaruju preko uloge glasnika, čime doprinose adaptaciji i poboljšanju antioksidativnog statusa organizma (59). U poslednjih nekoliko godina znatan broj dokaza podržava tezu o ulozi slobodnih radikala u mnogim drugim ćelijskim procesima, pa se oksidativni stres prepoznaje kao važan faktor u razvoju bolesti kao što su ateroskleroza, HBB i DM. Osnovne promene u ćelijama se odnose na strukturne i funkcionalne modifikacije: lipidna peroksidacija, oksidacija proteina i oksidativna modifikacija nukleinskih kiselina (54).

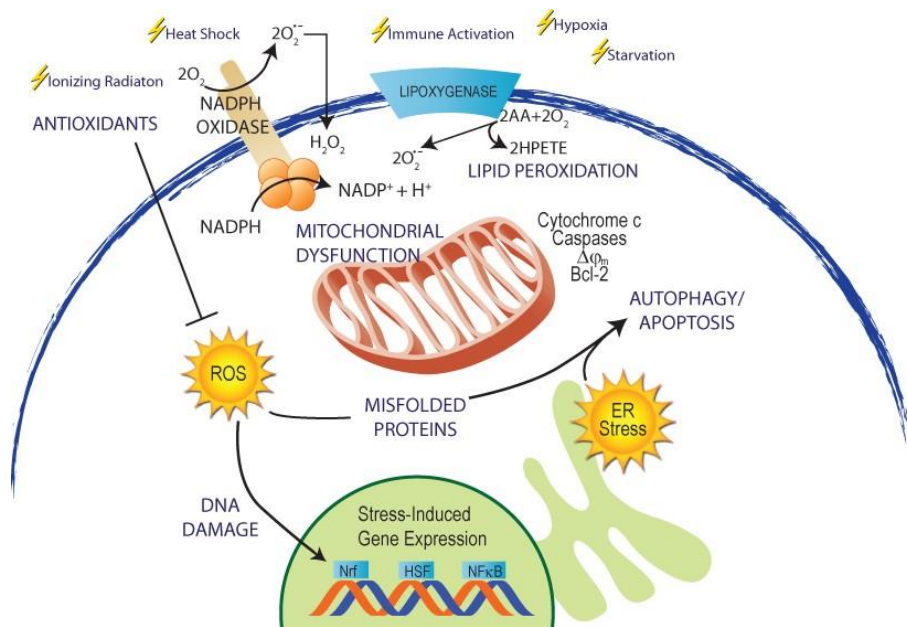
Slobodni radikali iniciraju oksidaciju LDL čestica i tako predstavljaju važan faktor u nastajanju ateroskleroze. Smatra se da proces lipidne peroksidacije započinje dejstvom hidroksil radikala na dvostruku vezu u molekulama lipida, a ovom reakcijom se molekul lipida prevodi u slobodni radikal, te dalje u prisustvu molekuskog kiseonika prelazi u peroksidikal, koji zbog izuzetne reaktivnosti može da utiče na susedne molekule lipida čime dolazi do propagacije procesa (Slika 9). Finalni proizvodi lipidne peroksidacije su lipidni hidroperoksidi i malondialdehid (MDA) (31).



Slika 9 Lipidna peroksidacija

Preuzeto sa: Mimica-Dukić N, Simin N, Svirčev E, Orčić D, Beara I, Lesjak M, Božin B. *The Effect of Plant Secondary Metabolites on Lipid Peroxidation and Eicosanoid Pathway, Lipid Peroxidation. InTech 2012:1-5 (60)*

Slobodni radikali imaju potencijal da oksiduju proteine plazme, a oksidacija se odvija uglavnom kao posledica inflamatornog procesa (52). Oksidacija obuhvata čitav niz strukturnih i funkcionalnih promena (Slika 10), pri čemu nastali karbonil metabolit i uznapredovali proizvodi oksidacije proteina (AOPP) blokiraju proces proteolize, tako da dolazi do akumulacije oksidovanih produkata proteina (6, 55)



Slika 10. Mehanizam dejstva slobodnih radikala

Preuzeto sa: <http://www.lookfeelbettertoday.com/free-radicals-enemies-within-formed/>(61)

1.6.4. Antioksidativna zaštita

Sistem antioksidativne odbrane organizma je od velikog značaja zato što štiti organizam od oksidativnog stresa, pri čemu se zaštita može postići neutralizacijom nastalih slobodnih radikala, kao i sprečavanjem nastajanja slobodnih radikala. Smatra se da se antioksidativna zaštita postiže preko enzimskog i neenzimskog antioksidativnog sistema (62, 63). Antioksidativni enzimi su nastali evolutivnom adaptacijom na aerobne uslove života i stvaranja slobodnih radikala u toku metabolizma u mitohondrijama i citozolu. Smatra se da je aktivnost antioksidativnih enzima izraženija u mitohondrijama jer se upravo u njima generiše više slobodnih radikala (62).

Superoxid dizmutaza (SOD) katalizuje dismutaciju superoksid anjon radikala do vodonik peroksida, dok dalju neutralizaciju H_2O_2 vrše glutation peroksidaza ili katalaza (64).



U ljudskom organizmu postoje tri forme SOD, pri čemu svaka ima specifičnu subćelijsku lokalizaciju i različitu tkivnu distribuciju. Tako se CuZn SOD nalazi u citoplazmi i organelama, Mn SOD je lokalizovana u mitohondrijama a EC SOD deluje u ekstracelularnom prostoru. EC SOD sintetišu fibroblasti i endotelne ćelije a važnu ulogu ostvaruje u regulaciji vaskularnog tonusa (65).

Glutation peroksidaza (GPX) je enzim lokalizovan u citozolu i mitohondrijama gde štiti fosfolipide i sfingolipide membrane, a katalizuje oksidaciju glutaciona uz utrošak hidroperoksida (66). Odnos redukovano i oksidovano glutaciona se uglavnom održava na visokom nivou zahvaljujući aktivnosti enzima glutation reduktaze, dok se NADPH koji je potreban za održavanje koncentracije redukovano glutaciona dobija iz pentoza fosfatnog puta (66).

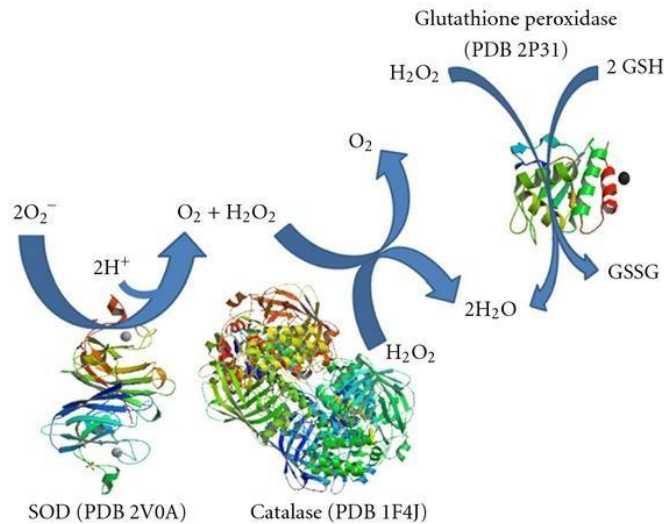
Katalaza je enzim koji katalizuje konverziju H_2O_2 u vodu i kiseonik. Ovaj enzim je lokalizovan unutar peroksizoma, dok je količinu katalaze u citoplazmi i ostalim ćelijskim elementima teško odrediti zbog toga što se peroksizomi brzo liziraju u toku manipulacije ćelijama (67).

Paraoksonaza 1 (PON1) je enzim udružen sa lipoproteinskim česticama visoke gustine (*engl. high density lipoprotein particles* – HDL) i ispoljava nekoliko tipova aktivnosti (paraoksonazna, diazoksonazna, arilesterazna), mada još uvek nije poznat tačan fiziološki supstrat (68, 69).

U proteinske antioksidanse ubrajamo proteine koji čine značajan deo antioksidativne zaštite u plazmi. Tako je transferin protein koji se sintetiše u jetri, a njegova osnovna uloga je transport gvožđa (Fe) kroz cirkulaciju. Feritin predstavlja glavni depo gvožđa u organizmu i smatra se da u zavisnosti od potreba organizma feritin može brzo da veže ili otpusti Fe i to zahvaljujući brzim reakcijama oksidacije i redukcije, a kako tranzicioni metali mogu da započnu lipidnu peroksidaciju, preuzimanje ovih metala i njihovo deponovanje ključno je u antioksidativnoj zaštiti (70). S druge strane, antioksidansi male molekulske mase imaju ulogu da spreče oksidaciju biomolekula. Mogu biti lokalizovani na membranama ćelija, u ćeliji ili u plazmi.

Glutation (GSH) je glavni endogeni antioksidans, a lokalizovan je u citoplazmi, jedru i mitohondrijama. Dejstvom H_2O_2 i hidroperoksida u prisustvu glutaciona

peroksidaze nastaje oksidovani glutation (GSSG), dok se regenerisanje redukovane forme vrši pomoću enzima glutation reduktaze u prisustvu NADPH (Slika 11) (71).



Slika 11.Mehanizam dejstva antioksidanasa

Preuzeto sa:

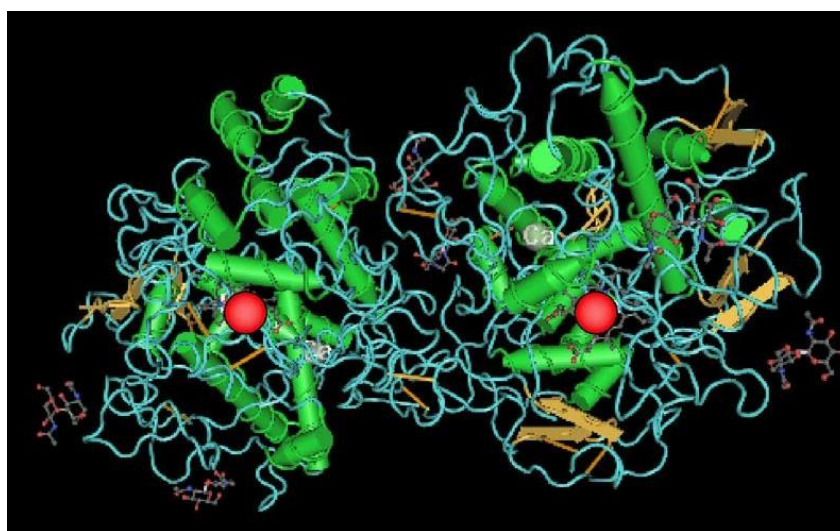
<http://www.graphicsbuzz.com/graphics/superoxide-graphics-2edb03.html> (72)

Kada se govori o antioksidativnoj zaštiti, potrebno je pomenuti i vitamine. Vitamin E (tokoferol) ispoljava svoje dejstvo u membranama ćelija i mitohondrija i zbog svoje liposolubnosti značajan je u procesima zaštite lipida ćelijske membrane od peroksidacije. Vitamin C (askorbinska kiselina) sprečava lipidnu peroksidaciju, štiti arterije od oksidativnog oštećenja, ali ima i sposobnost da regeneriše oksidovane forme vitamina E i GSH. Koenzim Q10 pripada grupi ubihonona i predstavlja liposolubilni antioksidans koji čini važnu kariku u odbrani LDL čestica od lipidne peroksidacije (71).

1.6.5. *Mijeloperoksidaza (MPO)*

Mijeloperoksidaza (MPO) je enzim specifičan za neutrofile. Ove ćelije sadrže tri tipa granula: azurofilne, specifične i želatinozne granule. Jedinstvene komponente azurofilnih granula kao što su mijeloperoksidaza (MPO) i serin - proteaze čuvaju se u aktivnoj formi, dok se proteaze specifičnih i želatinoznih granula čuvaju u neaktivnoj formi a aktiviraju se odmah posle egzocitoze (73).

MPO je član heterogene proteinske familije peroksidaza, a kompletno formiran enzim je dimer (Slika 12), sastavljen od identičnih monomernih jedinica koje sadrže kovalentno vezani HEM sa neuobičajenim spektralnim karakteristikama koje daju karakterističnu zelenu boju MPO (73). Ekspresija gena za MPO pojačana je za vreme promijelocitne faze mijeloidnog razvoja, a nakon formiranja primarnog produkta translacije prepro-MPO dolazi do njegove konverzije u pro-MPO insercijom HEM-a, pri čemu se ova konverzija dešava u endoplazmatičnom retikulumu. Sazrevanje pro-MPO i transformacija u zreli enzim dešava se u azurofilnim granulama nakon nekoliko kompleksnih konverzija koje još nisu u potpunosti razjašnjene (74).



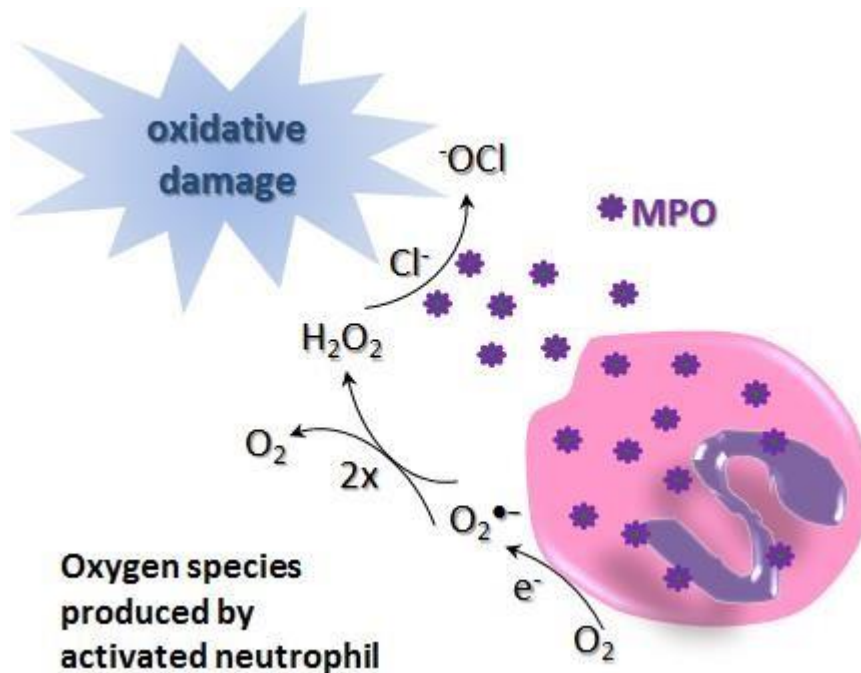
Slika 12. Mijeloperoksidaza

Preuzeto iz: Krauss R. *Lipids and Lipoproteins in Patients With Type 2. Diabetes Care* 2004; 27:1496–1504

(75)

Mijeloperoksidaza je najznačajnija komponenta antimikrobnog sistema polimorfonuklearnih neutrofila, ali se može naći i u humanim lizozomima monocita koji sadrže oko trećinu MPO koja je prisutna u neutrofilima. MPO katalizuje konverziju H_2O_2 i hloridnog jona u hipohlorastu kiselinu, a upravo hipohlorasta kiselina predstavlja najznačajniji oksidant koga proizvode neutrofil i može dovesti do inflamatornog oštećenja tkiva (74).

Kada se neutrofil aktiviraju, što se dešava kada stupe u kontakt sa patogenom, podležu procesu koji je označen kao “respiratorna eksplozija“. Posledica respiratorne eksplozije je produkcija superoksida, H_2O_2 i drugih ROS, a prilikom respiratorne eksplozije sadržaj granula se oslobađa u fagolizozomima, kao i izvan ćelije, pri čemu oslobođeni sadržaj dolazi u kontakt sa svim prisutnim mikrobima (74). Oslobođanje MPO i H_2O_2 u okolna tkiva može izazvati i njihovo oštećenje (Slika 13), a pretpostavlja se da neki aspekti hroničnog zapaljenja kao rezultat daju velika oštećenja u kojima agensi iz reakcija koje katalizuje MPO imaju značajnu ulogu (76).



Slika 13. Mehanizam dejstva MPO

Preuzeto iz: Kontush A, Chapman MJ. Functionally Defective High-Density Lipoprotein: A New Therapeutic Target at the Crossroads of Dyslipidemia, Inflammation, and Atherosclerosis. *Pharmacol Rev* 2006, 58(3):42-374

(77)

Za produkte MPO – H₂O₂ – Cl sistema se veruje da igraju važnu ulogu u uništavanju gljivica, parazita, protozoa, virusa, ćelija tumora i natural killer ćelija (NK), zbog čega osobe sa deficijencijom MPO imaju smanjen inflamatorni odgovor. Osim pobrojanih, funkcije MPO uključuju produkciju tirozil radikala i njihovu hloraciju, stvaranje tirozin- peroksida i oksidaciju serumskih lipoproteina pri čemu MPO može imati ulogu u razvoju ateroskleroze, karcinogeneze i degenerativnih neuroloških bolesti (73, 74, 76).

1.7. Dislipidemija u HBB

Renalna bolest, kako u ranim fazama tako i u uznapredovalom stadijumu, je povezana sa abnormalnostima u metabolizmu lipoproteina (41-44). Inflamacija i oksidativni stres imaju važnu ulogu u razvoju ateroskleroze, između ostalog i zbog njihove uloge u modifikaciji lipoproteinskih čestica. Na osnovu rezultata dosadašnjih istraživanja, deca sa HBB su stratifikovana u najvišu kategoriju kardiovaskularnog rizika upravo zbog tendencije razvoja ubrzane ateroskleroze. Osim toga, smatra se da je indeks telesne mase (ITM) kod ove populacije manji usled redukcije mišićne mase, a što je povezano sa povećanim rizikom od razvoja kardiovaskularnih bolesti (78).

Kod dece sa HBB i ESRD najčešći tip dislipidemije je hipertrigliceridemija (41-44). Dosadašnjim istraživanjima pokazano je da karakterističan profil dislipidemije kod dece sa HBB podrazumeva povećanje koncentracije ukupnog holesterola i triglicerida, smanjenje koncentracije holesterola sadržanog u česticama lipoproteina visoke gustine (HDL-h), dok koncentracija LDL holesterola (LDL-h), najčešće nije povišena (79,80). Smatra se da povišen nivo lipida kod dece koja nemaju renalnu bolest može ukazati na rizik od hiperlipidemije u starijem životnom dobu i rizik od razvoja kardiovaskularnih bolesti (81). Studija patoloških determinanti ateroskleroze kod mladih (PDAY) je pokazala da deca sa normalnom funkcijom bubrega mogu razviti masne pruge za vreme adolescencije, što može napredovati do aterosklerotskih plakova tokom ranog odraslog doba (82), a postoje i dokazi da deca sa hiperholesterolemijom i DM imaju

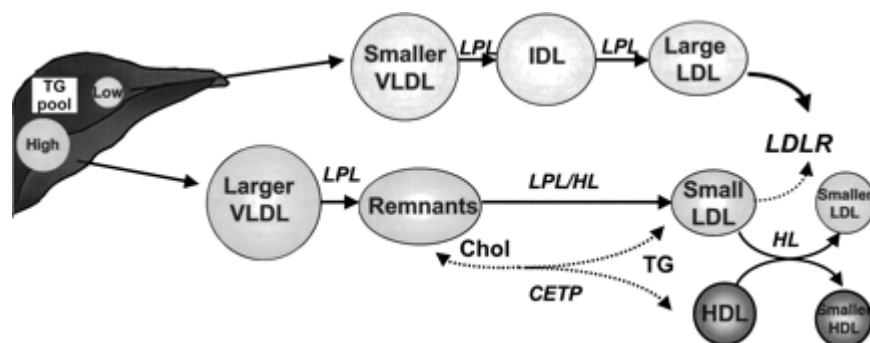
povećanu cIMT, što se takođe može dovesti u vezu sa ranim razvojem ateroskleroze (83). Relativni rizik za razvoj kardiovaskularnih bolesti kod dece sa HBB i ESRD u odnosu na opštu pedijatrijsku populaciju nije poznat zbog kratkog vremenskog okvira za praćenje, kao i zbog postojanja drugih faktora rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti. American Heart Association (AHA) navodi da je prevencija kardiovaskularnog rizika kod visoko rizičnih pedijatrijskih bolesnika opravdana s obzirom da je rizik veći u odnosu na odrasle pacijente (84).

1.7.1. Heterogenost HDL i LDL čestica

Cirkulišuće lipoproteinske čestice (HDL i LDL) su heterogene, pri čemu se njihova raznovrsnost ogleda u razlikama u veličini, gustini i sadržaju lipida i apolipoproteina. Istraživanja su pokazala da su upravo razlike u strukturnim karakteristikama subfrakcija odgovorne za različit stepen njihove aterogenosti (85).

LDL čestice se karakterišu veličinom od 20-30 nm. Lipidni omotač sadrži slobodni holesterol i fosfolipide, u jezgru dominira esterifikovani holesterol, dok su masne kiseline koje ulaze u sastav LDL čestica uglavnom polinezasićene masne kiseline (linolna i arahidonska kiselina) (87). U sastavu LDL čestica nalaze se i apolipoprotein apoB-100 (apoB), visoko polimorfan i hidrofoban ligand LDL receptora na ćelijama jetre i perifernim tkivima (86).

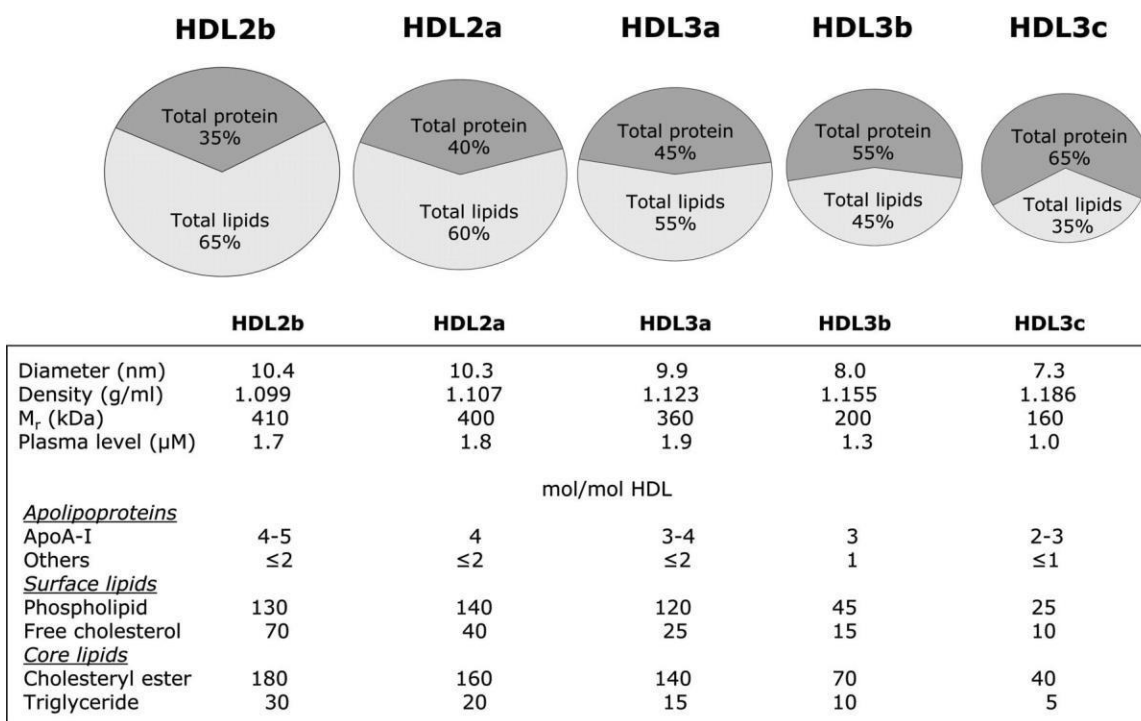
Elektroforezom na gradijent gelu može se izvršiti separacija sedam subfrakcija LDL čestica, koje se grupišu u četiri klase (I-IV), pri čemu sa povećanjem oznake klase raste gustina, a smanjuje se dijametar ovih čestica. Iako LDL čestice generalno imaju proaterogena svojstva, sa stanovišta ateroskleroze najinteresantnije su male, guste LDL čestice koje nastaju usled prekomerne sinteze lipoproteina veoma niske gustine (eng. very low density lipoprotein, VLDL) i rezultujuće povećane aktivnosti hepatične lipaze (Slika 14). Iako se kao laboratorijski marker rutinski određuje sadržaj holesterola u LDL česticama (LDL-h), zbog heterogenosti LDL subfrakcija jasno je da određivanje LDL-h ne pruža sveobuhvatan uvid u kvalitet LDL čestica (86).



Slika 14. Odnos izmenjenog metabolizma lipoproteina i razvoja aterogenog fenotipa lipoproteina
 Preuzeto iz: Krauss R. *Lipids and Lipoproteins in Patients With Type 2. Diabetes Diabetes Care* 2004;
 27:1496–1504 (75)

U prisustvu holesterol estar transfernog proteina (CETP) dolazi do procesa razmene triglicerida (TG) u sastavu pre svega VLDL čestica, sa estrima holesterola koje nose LDL i HDL čestice. Razmena TG i estara holesterola je naročito izražena u hipertrigliceridemiji, a rezultat ovog procesa je formiranje malih gustih LDL čestica koje su opterećene TG. Male guste LDL čestice karakteriše olakšano prodiranje kroz endotel i akumulacija u subendotelnom prostoru krvnih sudova (87). Važno je istaći da u stanjima inflamacije i pojačanog oksidativnog stresa, male guste LDL čestice mogu podleći oksidativnim modifikacijama i to kako zbog prisustva oksidanasa (88), tako i zbog smanjenja antioksidativnog potencijala HDL čestica (89, 90).

HDL čestice su lipoproteini sa najmanjim dijametrom i najvećom gustinom (Slika 15) (91). Nascentne HDL čestice uglavnom sadrže fosfolipide i apolipoprotein A-I (apoA-I), kao i vrlo malo holesterola, dok se u jezgru zrelih čestica uglavnom nalaze estri holesterola i manja količina triglicerida, a u omotaču pretežno fosfolipidi i slobodan holesterol.

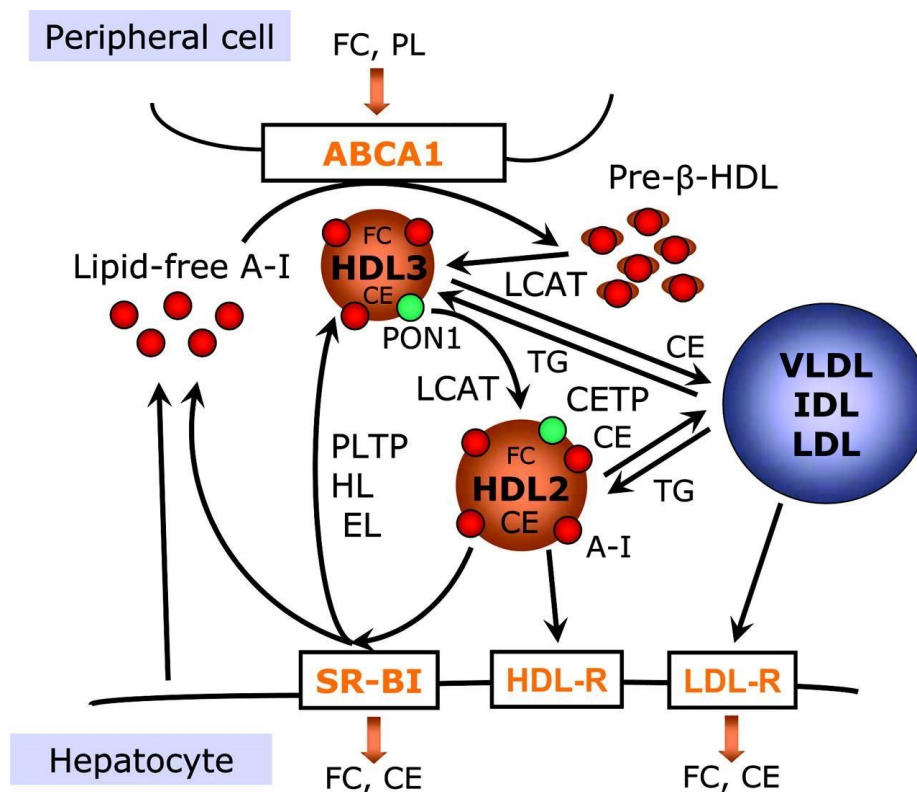


Slika 15. Kvalitativne i kvantitativne karakteristike subklasa HDL čestica

Preuzeto iz: Kontush A, Chapman MJ. *Functionally Defective High-Density Lipoprotein: A New Therapeutic Target at the Crossroads of Dyslipidemia, Inflammation, and Atherosclerosis. Pharmacol Rev 2006;58(3):342-374. (77)*

Glavni apolipoproteini su apoA-I i apoA-II, dok od ukupne količine proteina HDL čestica, manje od 10% čine apoA-IV, apoA-V, apoC-I, apoC-II, apoC-III, te apolipoproteini D, E, J i M (91). Apolipoproteini HDL čestica se mogu lako razmenjivati sa drugim apolipoproteinima lipoproteinskih čestica u toku metaboličkih reakcija zato što nisu čvrsto vezani za HDL čestice (Slika 16). HDL čestice sadrže i enzime PON1, glutation seleno peroksidazu (GSPx), α1 antitripsin i amiloid β (91).

Vertikalnom elektroforezom na gradijnt gelu izdvaja se pet subfrakcija HDL čestica. Nascentne HDL čestice su diskoidalnog oblika, sintetišu se u jetri ili intestinumu, a zatim se dodatno modifikuju u cirkulaciji dejstvom plazmatskih faktora. U cirkulaciji, HDL čestice sazrevavaju i remodeluju se pod dejstvom lecitin holesterol acil transferaze (LCAT), a modifikacija podrazumeva prelazak nascentne forme HDL čestica u HDL 3 formu, koja daljim reakcijama esterifikacije formira nepolarano jezgro i nastaje sferna HDL 2 čestica.



Slika 16. Metabolički putevi nastanka HDL subfrakcija

Preuzeto iz: Srinivasan SR, Myers L, Berenson GS. Distribution and correlates of non-high-density lipoprotein cholesterol in children: the Bogalusa Heart Study. *Pediatrics* 2002;110:e29 (81)

Brojne studije su demonstrirale da veličina HDL čestica nije od presudnog značaja za njihova ateroprotektivna svojstva, već da ova svojstva prevashodno zavise od kvaliteta tj. strukture HDL čestica (90-92). Istraživanja su pokazala da male HDL, odnosno subfrakcije HDL 3 čestica (HDL3a-3c) najviše podležu strukturnim modifikacijama, nakon čega njihova ateroprotektivna svojstva mogu biti smanjena, ili čak i potpuno izgubljena (90, 92).

1.7.2. Lipoproteini i ateroskleroza

Iako se generalno može reći da su sve LDL čestice aterogene, rezultati brojnih studija su pokazali da najveći aterogeni potencijal imaju male, guste LDL čestice (93). Male, guste LDL čestice imaju manji afinitet za LDL receptore koji se nalaze u jetri, dok je afinitet izraženiji za scavenger receptore, a usled disbalansa u količini holesterola i polinezasićenih masnih kiselina male guste LDL čestice su i podložnije oksidaciji (94-96).

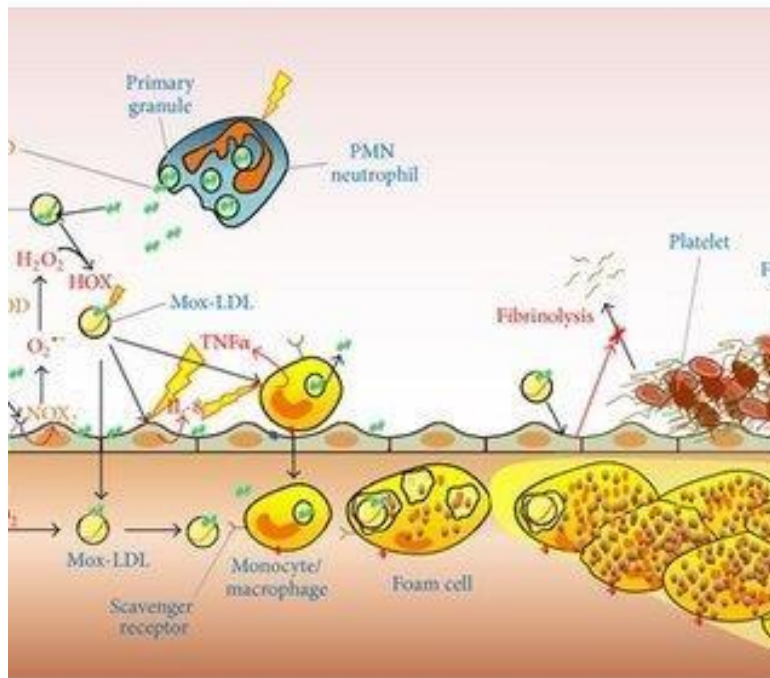
Antiaterogeni efekat HDL čestica podrazumeva funkcionalnost odnosno kvalitet HDL čestica, a ne samo kvantitet. Tokom prethodnih godina sprovedene su brojne studije sa ciljem da se utvrdi uzročno-posledična veza između promena u raspodeli HDL subfrakcija i rizika za razvoj KVB (90). Smatra se da male HDL 3 čestice imaju veći antiinflamatorni i antioksidativni potencijal od HDL 2 čestica, ali se ovaj zaključak odnosi samo na normalno sazrevanje HDL čestica u fiziološkim uslovima. Funkcionalne male HDL 3 čestice su bolji akceptori holesterola i potentniji inhibitori apoptoze endotelних ćelija, imaju veći antiinflamatorni efekat i antioksidativni potencijal od većih HDL 2 čestica. Međutim, dislipidemija, oksidativni stres i inflamacija mogu da uzrokuju promene u strukturi i funkciji HDL čestica što rezultuje gubitkom osnovne funkcije i, po nekim autorima, čak sticanjem proaterogenih karakteristika (90).

Procena funkcionalnosti HDL čestica je od velikog interesa ali je teško direktno odrediti ovaj parametar pri čemu savremeni koncept shvatanja antiaterogenog delovanja HDL-a podrazumeva funkcionalnost, a ne samo kvantitet njegovih subfrakcija (97).

1.7.3. Uloga MPO u stvaranju aterogenih LDL čestica

Kao što je već rečeno, najveći proaterogeni potencijal se na osnovu rezultata mnogobrojnih istraživanja pripisuje malim gustim LDL česticama (98-100). Oksidacija ovih čestica predstavlja jedan od najvažnijih mehanizama koji doprinosi njihovoj aterogenosti.

HOCl je najvažniji produkt MPO in vivo (98,101). HOCl oksidativno modifikuje apoB molekul LDL čestice (101,102). Interakcija se dešava zahvaljujući katjonskim karakteristikama MPO (99,100). Veza LDL-MPO se ostvaruje preko NH₂-β 1 domena apoB zato što je ovaj domen izložen sa spoljne strane lipoproteina, a zahvaljujući katjonskim karakteristikama smatra se da MPO može da se veže za apoB preko negativno naelektrisanih jona (asparaginske ili glutaminske kiseline). Smatra se da ključni korak u procesu nastanka ateroskleroze predstavlja migracija LDL čestica iz plazme u subendotelni prostor gde se vrši oksidacija. Naime, LDL čestice se oksiduju usled prisustva MPO i aktivacije NADPH oksidaze koja stvara O₂⁻ a LDL čestica koja je oksidovana MPO sistemom, se može vratiti u cirkulaciju povratnom difuzijom iz lezije.



Slika 17. Uloga MPO u razvoju inflamacije i ateroskleroze

Preuzeto iz: Huang Y et al. Myeloperoxidase, paraoxonase-1, and HDL form a functional ternary complex. *J Clin Invest.* 2013; 123(9): 3815–3828 (99)

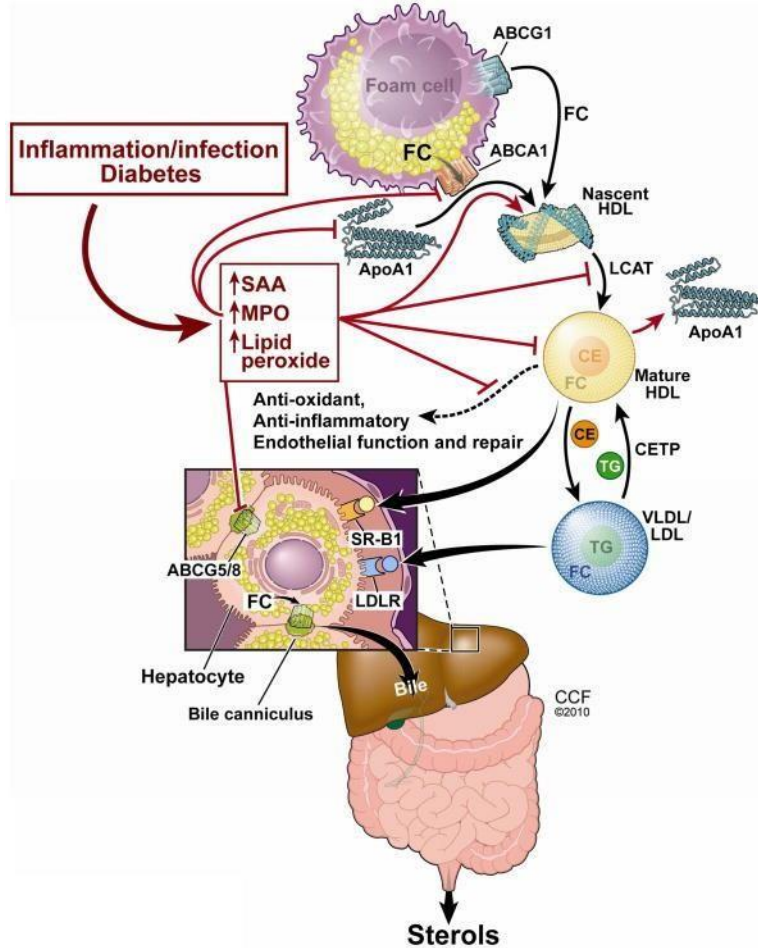
Oksidovani LDL (Ox-LDL) ima osobinu da aktivira brojne transkripcione faktore koji učestvuju u inflamatornom efektu u aterosklerozi i uključen je u aktivaciju monocita/makrofaga i inflamatornom odgovoru. Monociti su prve ćelije koje dolaze do

mesta upale (Slika 17), kakva je i aterosklerotska lezija (98, 101). Kada je aktiviran, ovaj tip ćelija dovodi do ekspresije leukocitnih adhezivnih molekula, a takođe produkuje i ROS i RNS, delom zahvaljujući MPO aktivnosti i uzrokuje oksidativnu transformaciju LDL čestica do forme koju lako preuzimaju makrofage. Ox-LDL ima kapacitet da aktivira monocite i poveća ekspresiju peroksisom proliferator aktiviranih receptora γ (PPAR- γ), regulatora ćelijske proliferacije, inflamacije, monocit/makrofaga diferencijacije, te da poveća ekspresiju CD 36 scavenger receptora na ćelijskoj površini (101). Smatra se da Ox-LDL inhibira lizosomalne proteaze, pri čemu doprinosi akumulaciji lipida u makrofagama i njihovoj transformaciji u penaste ćelije. LDL čestice oksidovane dejstvom MPO indukuju jači odgovor (aktivaciju) monocita/makrofaga nego LDL čestice koje su oksidovane drugim slobodnim radikalima (101,103). Prisustvo scavenger receptora na površini endotelnih ćelija povećava endocitozu Ox-LDL čestica, dok aktivirani monociti i endotelne ćelije sekretuju TNF α i IL-8. Endotelne ćelije i monociti uzrokuju otpuštanje ROS i MPO u ekstracelularni matriks, čime se uslovljava stvaranje novih Ox-LDL čestica (101, 103). Osim navedenog, dosadašnja istraživanja su pokazala da prisustvo Ox-LDL čestica ima inhibitorni efekat na fibrinolizu, a time takođe podstiče razvoj ateroskleroze (102, 103).

1.7.4. Uloga MPO u stvaranju disfunkcionalnih HDL čestica

Za razliku od LDL čestica, HDL čestice su ateroprotektivne zahvaljujući sposobnosti da uklanjaju holesterol iz penastih ćelija (makrofaga). Međutim uprkos ovoj činjenici brojne kliničke studije su potvrdile postojanje aterosklerotskih promena i kod osoba koje su imale normalan ili povišen nivo HDL-h (104, 105).

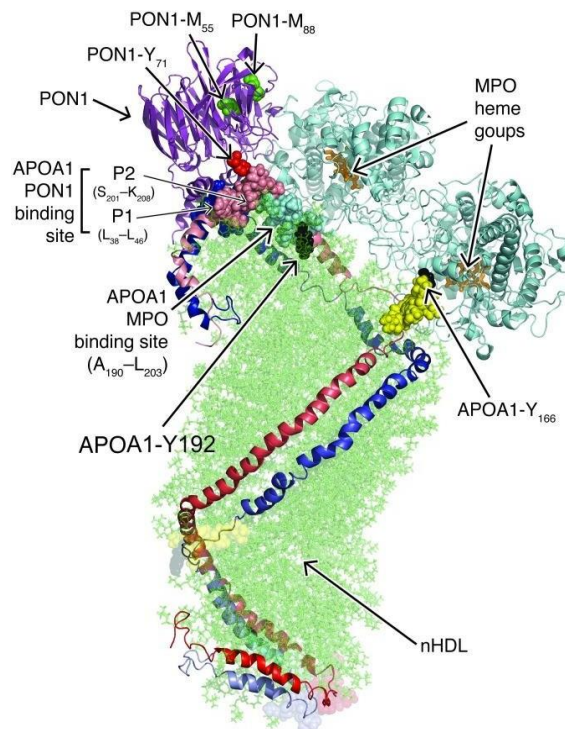
Proces transporta holesterola sa periferije ka jetri odvija se preko membranskog proteina, ATP vezujućeg kasetnog transportera A1 (ABCA1) (Slika 18). Dosadašnja istraživanja su pokazala da HOCl koga produkuje MPO može da dovede do oksidacije apoA-I i time da onemogući preuzimanje lipida preko ABCA 1 puta.



Slika 18. Mehanizam produkcije disfunkcionalnih HDL čestica

Preuzeto iz: Libetta C, Sepe V, Esposito P, Gall F, Canton D. Oxidative stress and inflammation: implications in uremia and hemodialysis. Clin Biochem 2011;44:1189-1198 (103)

Glavna meta delovanja HOCl su amino kiseline tirozin, metionin i fenilalanin u apoA-I, a brojna istraživanja su pokazala vezu između hlorinacije tirozina na položaju 192 i gubitka transportne aktivnosti preko ABCA1. Nakon oksidacije apoA-I dolazi do gubitka funkcije aktiviranja LCAT, što je naročito izraženo kod oksidacije HDL 3 čestica i sledstvenog gubitka funkcionalnih svojstava (Slika 19). Osim toga, pokazano je da oksidovani HDL gubi antiapoptotičke i antiinflamatorne aktivnosti (100, 103).



Slika 19. Ilustracija strukturnog modela kompleksa MPO-PON1-nHDL

Preuzeto iz: Huang Y et al. Myeloperoxidase, paraoxonase-1, and HDL form a functional ternary complex. *J Clin Invest.* 2013; 123(9): 3815–3828 (99)

Relativna distribucija HDL subfrakcija se menja kod HBB, uglavnom zbog smanjene konverzije HDL 3 do HDL 2, dok sa druge strane, to rezultira smanjenjem sposobnosti HDL da prenosi holesterol ka jetri (93, 100).

Aktivnost PON1 snižena je kod pacijenata sa HBB, što može uzrokovati povećanu oksidaciju i smanjenje funkcionalnosti HDL čestica (103). Mnogobrojne studije ukazuju da je rizik za kardiovaskularne bolesti negativno povezan sa udelom HDL 3 subfrakcija, pri čemu se mora uzeti u obzir da male HDL čestice mogu imati umanjen antiaterogeni potencijal usled promena koje prouzrokuju oksidativni stres i inflamacija (100, 106).

1.8. Tretman pacijenata sa HBB

Pacijenti sa HBB podvrgavaju se hemodijalizi kao vidu terapije. Hemodijaliza se sastoji u difuziji sastojaka krvi kroz semipermeabilnu membranu (dijalizna membrana). Na ovaj način se uklanjaju supstance koje su u višku i koje bi dovele do teških toksičnih efekata u organizmu. Iako je dijaliza terapijska procedura, veruje se da dijalizna membrana aktivira neutrofile i monocite i dovodi do produkcije reaktivnih intermedijera koji izazivaju oksidativnu neravnotežu i razvijaju oksidativni stres. Upravo zato je predloženo da se dijaliza može smatrati humanim modelom oksidativnog stresa (108). Danas je unapređenjem tehnologije moguće proizvoditi membrane koje oslobađaju mnogo manje slobodnih radikala, ali se ipak pacijenti se podvrgavaju antioksidativnoj terapiji (106, 108).

Bolji tretman trajnog gubitka bubrežne funkcije predstavlja obnavljanje funkcionalnog tkiva transplantacijom bubrega, pri čemu je pedijatrijska renalna transplantacija je moguća sa navršenih 6 meseci života ili sa 6 kg telesne mase. Posle izvršene transplantacije obavezna je upotreba imunosupresivne terapije, a time je smanjena odbrana organizma od razvoja bakterijskih i virusnih infekcija, ali i potencijalnih metaboličkih komplikacija (41,42).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Na osnovu prethodno navedenih činjenica, kao i efekata koje dislipidemija, oksidativni stres i inflamacija ostvaruju na metabolizam lipoproteina i razvoj ateroskleroze kod dece pacijenata sa HBB postavljeni su sledeći ciljevi ove studije:

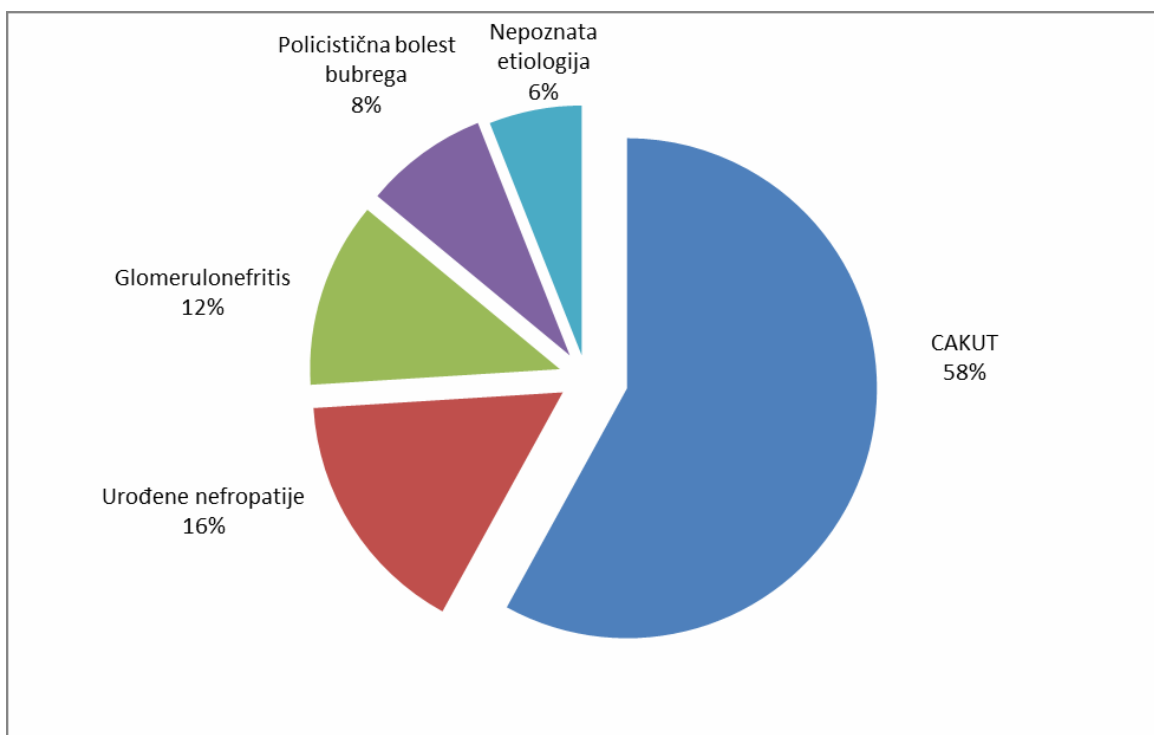
- 1) Ispitati da li postoji razlika u parametrima oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite između pacijenata sa HBB (pacijenti u predijaliznom stadijumu HBB, pacijenti na hemodijalizi i pacijenti sa transplantiranim bubregom) i kontrolne grupe ispitanika.
- 2) Ispitati povezanost parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite sa drugim određivanim lipidnim i nelipidnim parametrima kod pacijenata i kontrolne grupe ispitanika.
- 3) Odrediti status enzima PON1 u ispitivanim grupama.
- 4) Utvrditi da li postoji razlika u koncentraciji enzima MPO između pacijenata sa HBB (pacijenti u predijaliznom stadijumu HBB, pacijenti na hemodijalizi i pacijenti sa transplantiranim bubregom) i kontrolne grupe ispitanika. Utvrditi postojanje povezanosti između koncentracije enzima MPO sa lipidnim i nelipidnim parametrima u napred navedenim grupama ispitanika.
- 5) Ispitati povezanost AIP sa parametrima oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite.
- 6) Ispitati raspodelu subfrakcija LDL i HDL čestica i razlike u veličini ovih čestica, izraženoj preko dominantnog dijametra, kod pacijenata sa HBB u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika .
- 7) Ispitati povezanost karakteristika raspodele LDL i HDL subfrakcija sa drugim određivanim lipidnim i nelipidnim parametrima.
- 8) Ispitati povezanost karakteristika raspodele LDL i HDL subfrakcija sa parametrima oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite.

- 9) Ispitati da li postoji razlika u cIMT između pacijenata u predijaliznom stadijumu HBB, pacijenata na hemodijalizi i pacijenata sa transplantiranim bubregom.
- 10) Ispitati uticaj MPO na raspodelu lipoproteinskih subfrakcija.
- 11) Ispitati povezanost LDL i HDL subfrakcija sa cIMT kod pacijenata sa HBB.
- 12) Ispitati povezanost koncentracije MPO sa cITM kod pacijenata sa HBB.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Ispitanici

U ovoj studiji je učestvovalo: 10 pacijenata u predijaliznom stadijumu HBB (pdHBB), 20 pacijenata na hemodijalizi (D) i 21 pacijent sa transplantiranim bubregom (T). Ispitanici su bili starosti od 3 - 21 godina. Svi pacijenti su lečeni u Univerzitetској dečijoj klinici Tiršova na Klinici za nefrologiju, Kliničkog centra Srbije. HBB se kod oko 58% pacijenata razvila kao posledica kongenitalnih anomalija bubrega i urinarnog trakta (CAKUT), kod 16% kao posledica urođenih nefropatija, a 12% pacijenata je razvilo HBB usled posledica glomerulonefritisa, 8 % je policistične bolesti bubrega i 6 % nepoznate etiologije (Slika 20).



Slika 20. Etiologija HBB u grupi ispitanika

Kriterijumi za isključivanje pacijenata iz studije bili su prisustvo DM, pridružene manifestne kardiovaskularne bolesti, bolesti jetre, infektivne bolesti, maligne bolesti odbacivanje grafta, ili prisustvo bilo kog drugog akutnog patofiziološkog stanja. U ispitivanju su učestvovali pacijenti koji nisu na antioksidativnoj suplementaciji i koji ne piju hipolipemike. Terapijski režim pacijenata zavisio je od grupe ispitanika:

U grupi ispitanika koji su u predijaliznom stadijumu, 9 pacijenata je bilo na terapiji antihipertenzivima (Enalapril, Ramipril). Za korekciju poremećaja metabolizma kalcijuma i fosfata 7 ispitanika je primalo terapiju kalcijum karbonatom (CaCO₃) ili vitamin D. 7 pacijenata je u cilju tretmana metaboličke acidoze kao terapiju primalo NaHCO₃. U grupi pacijenata sa transplantiranim bubregom, ispitanici su primali trojnu imuno supresivnu terapiju, i to: jedanaest pacijenata kombinaciju Takrolimus/ Prednizon/ Mikofenolat mofetil, sedam pacijenata Prednizon/ Mikofenolat mofetil/ Ciklosporin, tri pacijenta Prednizon/ Azatioprin/ Ciklosporin, a jedan pacijent je primao Prednizon/ Takrolimus/ Azatioprin.

Ispitanici koji su bili na dijalizi imali su primali sledeću terapiju: 18 pacijenata terapijske doze CaCO₃, 9 pacijenata je primalo blokatore Ca kanala (Nifelat), 10 pacijenata je primalo eritropoetin u cilju lečenja anemije. Ova grupa pacijenata je takođe primala i vitaminske preparate: Vitamine A i D₃ (AD₃), Vitamin B₁, B₆, Vitamin C i Folan. Pacijenti su dijalizirani 3,5 – 4 sata, tri puta nedeljno, sa polisulfonskim membranama (Fresenius Medical Care Bad Hamburg, Nemačka). Za vreme postupka dijalize koristio se nefrakcionisani heparin.

Kontrolnu grupu su činila zdrava deca i adolescenti uzrasta 6,4 - 15 godina koja su selektovana u toku redovnih sistematskih pregleda u Domovima zdravlja Pančevo i Kovačica. Finalnu kontrolnu grupu je činilo 50 dece, od čega 27 dečaka i 23 devojčica, čime je zadovoljen kriterijum homogenosti po polu i starosti. U saradnji sa izabranim pedijatrima, za učešće u studiji su odabrana deca koja nisu ni na kakvoj hroničnoj ili akutnoj terapiji i kod kojih na sistematskom pregledu nisu konstatovani znaci infekcije ili prisustvo kardiovaskularnih, bubrežnih, hepatičnih ili malignih bolesti. Takođe su isključena deca koja su imala hirurške intervencije u prethodnom periodu od jedne godine.

Obučeno osoblje je anketiralo pacijente i njihove roditelje. Anketa je obuhvatala pitanja vezana za uzrok, tok i dužinu bubrežne bolesti, informacije o životnim navikama i o

eventualnom naslednom porodičnom riziku za nastanak HBB. Pre učešća u istraživanju roditelji su dali pismeni pristanak prema zahtevima etičkih smernica propisanih Helsinškom deklaracijom. Ovo istraživanje je odobreno od strane Etičkog komiteta Farmaceutskog fakuteta u Beogradu i Etičkog komiteta Kliničkog centra Srbije.

Svim učesnicima u studiji su određene osnovne antropometrijske karakteristike: telesna težina, telesna visina, obim struka (OS) i obim kukova (OK). ITM se računao kao količnik težine i kvadrata visine (kg/m^2) (108). Kao parametar za procenu abdominalne gojaznosti kod ispitanika izračunali smo odnos obima struka i obima kuka. Ispitanicima je meren i krvni pritisak, a po definiciji pod arterijskom hipertenzijom se smatraju vrednosti sistolnog krvnog pritiska ≥ 140 mmHg i dijastolnog krvnog pritiska ≥ 90 mmHg (110). Za procenu ranih aterosklerotskih promena pacijentima je merena cIMT metodom ultrasonografije (49).

3.2. Uzimanje i čuvanje uzoraka

Krv je uzimana nakon noćnog gladovanja. Deci koja su na tretmanu hemodijalizom, krv je vađena iz arteriovenske fistule ujutru pre dijalize. Ostalim pacijentima i deci iz kontrolne grupe krv je uzeta iz antekubitalne vene, vacutainer sistemom. Za dobijanje plazme kao antikoagulansi su se koristili EDTA i heparin, a za uzorak seruma epruvete bez antikoagulansa. Uzorci koji nisu odmah analizirani zamrznuti su na -80°C .

3.3. Metode za određivanje biohemijskih i hematoloških parametara

Broj leukocita je određen kombinacijom impedance i absorbance koristeći Pentra 60 C+ analizator (Horiba ABX, Montpellier, Francuska). Ukupni holesterol (UH) i trigliceridi (TG) su određeni rutinskim enzimatskim metodama (DIALAB, Neudorf, Austria) na ILAB 300+ biohemijskom analizatoru (Instrumentation laboratory,

Milano, Italija). Koncentracija HDL-h je određena metodom precipitacije lipoproteina koji sadrže apo B u plazmi sa fosfovolframovom kiselinom u prisustvu jona magnezijuma.

Vrednosti LDL-h smo dobili pomoću Friedewald-ove formule (111):

$$\text{LDL (mmol/L)} = \text{UH} - \text{HDL} - \text{TG}/2.22$$

ApoA-I I ApoB određivani su imunoturbidimetrijskom metodom na biohemijском analizatoru ILAB 600, pri čemu su korišćeni DIALAB, (Neudorf, Austria) reagensi. Koncentracije uree, kreatinina, ukupnih proteina su određivane rutinskim laboratorijskim metodama na biohemijском analizatoru ILAB 600, uz upotrebu komercijalnih DIALAB testova.

Koncentracija adiponektina u plazmi je merena u duplikatu ELISA metodom (Human Adiponectin/Acrp30 Immunoassay, Quantikine, R&D systems, Minneapolis, Minnesota, USA). Koncentracija leptina je određivana u plazmi korišćenjem ELISA komercijalnog testa (DRG Instruments, Marburg, Germany). Nivo Lp (a) je meren na biohemijском analizatoru ILAB 600 imunoturbidimetrijskom metodom pomoću specifičnih anti lipoprotein(a) antitela (Diazyme lipids, Dresden, Deutschland).

3.4. Merenje debljine cIMT

cIMT je merena koristeći ultrasonografiju visoke rezolucije na 7,5 MHz (SSH 140A, Toshiba Co LTD, Ottawa, Japan). U toku merenja pacijent se nalazio u supinom položaju sa glavom okrenutom kontralateralno, a što čini standardizovan način merenja. Merenje je vršeno 10 mm iznad bifurkacije zajedničkih karotidnih arterija i u nivou bifurkacije. Merenja su izvođena sa tri uzastopna srčana otkucaja i uzeta je srednja vrednost. U daljoj analizi korišćene su vrednosti cIMT izmerene u nivou zajedničke karotidne arterije (ACC) i unutrašnje karotidne arterije (ACI).

3.5. *Parametri oksidativnog stresa*

Oksidacijom lipida u prisustvu slobodnih radikala nastaju lipidni hidroperoksidi, a krajnji proizvodi lipidne peroksidacije se određuju kao tiobarbiturna kiselina reagujuće supstance (TBKRS). TBKRS reaguje sa tiobarbiturnom kiselinom (TBK) a ova metoda je pogodna određivanja sadržaja lipidnih peroksida u uzorcima. U prisustvu toplote i TBK, TBKRS reaguje i daju krajnji proizvod ružičaste boje koji apsorbuje svetlost na talasnim dužinama 530-540 nm. Intenzitet boje na 535 nm odgovara nivou lipidne peroksidacije u uzorku. Rezultati se računaju primenom molarnog apsorpcionog koeficijenta koji iznosi $1,56 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ za nastali obojeni kompleks (112).

Superoksidni anjon (O_2^-) ima osobinu da redukuje nitro grupu aromatičnog jedinjenja nitrobluetetrazolium (NBT, 2,2'- di - p- nitrofenil -5,5'- difenil - 3,3'- (3,3'- dimetoksi -4,4'- difenilen) -ditetrazolium hlorid). Ovu metodu su opisali Auclair i Voisin (113). NBT je jedinjenje koje je rastvorljivo u vodi, a nakon prevođenja u diformazan procesom redukcije ovo jedinjenje postaje nerastvorljivo. Kako bi se održala rastvorljivost diformazana, u reakcionu smešu se dodaje želatin. U reakcijama u kojima se stvara O_2^- , NBT se nepotpuno redukuje do monoformazana. Pri višim pH vrednostima dolazi do inhibicije reakcije spontane dismutacije kiseonika, a kao posledica toga dolazi do pojačane redukcije NBT-a. Uvođenjem azota pod pritiskom u NBT reagens jedan sat pre određivanja, smanjuje se pritisak kiseonika čime se postiže povećana redukcija NBT-a. Nivo O_2^- je određivan na automatskom analizatoru ILAB 300+.

Produkti oksidativne modifikacije proteina (AOPP) su određivani metodom koju su opisali Witko-Sarsat i saradnici (114). Metoda se zasniva na spektrofotometrijskom određivanju AOPP uz dodatak rastvora sirćetne kiseline i rastvora kalijum jodida, pri čemu se meri promena apsorpcije na 340 nm. ApSORBANCija linearno raste sa porastom koncentracije. Za izradu standardne krive koristi se rastvor hloramina T sa opsegom koncentracija od 10-100 $\mu\text{mol/L}$ u fosfatnom puferu pH 7,4.

3.6. Određivanje parametara antioksidativne zaštite

Aktivnost SOD određivana je na automatskom analizatoru ILAB 300 + nakon modifikacije originalne metode koja se zasniva na sposobnosti enzima SOD da inhibira spontanu autooksidaciju adrenalina u baznoj sredini pH 10,2 (115). Merenje apsorbancije nastalog ružičasto obojenog produkta oksidacije adrenalina vrši se bez prisustva SOD (kontrola) i u prisustvu SOD (analiza) na 480 nm. Aktivnost SOD se izražava u relativnim jedinicama i izračunava se kao procenat inhibicije autooksidacije adrenalina.

Metoda za određivanje ukupnog sadržaja sulfhidrilnih grupa (SH-grupe) zasniva se na reakciji 2,2'-dinitro-5,5'-ditio-benzojeve kiseline (DTNB) koja u baznoj sredini reaguje sa alifatičnim tiolima i pri tome nastaje žuto obojeni p-nitrofenol, a intenzitet reakcije meri se spektrofotometrijski na 412 nm (116).

Određivanje statusa enzima PON1 podrazumeva određivanje aktivnost enzima PON1 prema dva različita nefiziološka supstrata: paraoksonu (POazna aktivnost) i diazoksonu (DZOazna aktivnost) i na osnovu odnosa aktivnosti enzima prema ova dva supstrata, određivanje fenotipa aktivnosti za položaj 192 (PON1_{Q192R}). POazna i DZOazna aktivnost mogu se odrediti spektrofotometrijski kinetičkom metodom (117). Enzim PON1 katalizuje reakciju u kojoj dejstvom na supstrat paraokson, nastaje obojeni p-nitrofenol. Brzina reakcije se prati kinetički na 405 nm. Ova talasna dužina predstavlja apsorpcioni maksimum p-nitrofenoksidnog anjona koji prelazi u p-nitro fenol u baznoj sredini. Određivanje je vršeno na automatskom analizatoru ILAB 300 +. PON1 može da deluje na supstrat diazokson pri čemu ga konvertuje do 2-izopropil-4-metil-6-hidroksipirimidina (IMHP). Određivanjem odnosa POazna/DZOazna aktivnost može se odrediti fenotip PON1_{Q192R}. U koordinatni sistem se unesu na x-osu POazne, a na y-osu DZOazne aktivnosti i PON1_{Q192R} se određuje na osnovu položaja tačaka koje predstavljaju presek ove dve aktivnosti. Za svaku tačku se određuje kom od fenotipova na položaju 192 pripada (QQ, QR i RR). Naime polimorfizam PON1 na položaju 192 značajno utiče na katalitičku aktivnost enzima PON1 na supstrat specifičan način. Q varijanta ima izraženiji afinitet prema diazoksonu, dok R varijanta ima izraženiji afinitet prema paraoksonu kao supstratu. (118-120).

3.7. Određivanje koncentracije MPO

Koncentracija MPO određivana je komercijalnim sendvič ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) testom (Immunodiagnostik, Germany). U testu se koristi dvostruka sendvič tehnika sa dva selektovana antitela koja su specifična na humanu MPO. Standardi testa, kontrole i uzorci koji su razblaženi dodaju se u bunarčice ELISA ploče koji su komercijalno obloženi sa visoko afinitetnim poliklonskim anti-humanim MPO antitelima. Posle prvog inkubacionog perioda, antitela vezana za ploču reaguju sa MPO iz uzorka. Nakon toga se u svaki bunarčić ploče dodaje peroksidaza konjugovano poliklonsko anti humano MPO antitelo, pri čemu se formira sendvič antitelo-humana MPO-peroksidaza konjugat, a kao supstrat za peroksidazu koristi se tetrametilbenziliden. Da bi se reakcija zaustavila, dodaje se kiselina. Boja reakcione smeše se menja od plave do žute. Intenzitet žute boje je direktno proporcionalan koncentraciji MPO u uzorku. Merenje se izvodi na ELISA čitaču na 450 nm. Test sadrži standarde koji se koriste za konstruisanje standardne krive i kontrolne rastvore za kalibraciju testa.

3.8. Razdvajanje LDL i HDL subfrakcija

Za razdvajanje subfrakcija lipoproteina HDL i LDL koristi se metoda vertikalne elektroforeze na nedenaturišućem gradijentu poliakrilamidnog gela (121,123). Ovom metodom se postiže razdvajanje čestica na osnovu razlike u veličini.

Reagensi:

Tris pufer pH= 8,3 (90 mmol/L Tris, 80 mmol/L borne kiseline, 2.5 mmol/L Na₂EDTA

Rastvor akrilamida, 3% (28.8 g/L akrilamida i 1.2 g/L metilen-bis-akrilamida)

Rastvor akrilamida, 31 % (292.5 g/L akrilamida i 17.05 g/L metilen-bis-akrilamida)

Amonijum persulfat rastvor 100 mg/ 1 ml TRIS pufera (APS)

Tetrametilendiamid (TEMED)

Sudan black B boja (rastvor 5 g boje u 45 % etanolu na 500C uz mešanje u periodu od 6 sati

Coomassie brilliant blue G-250 0.75% (rastvor u odnosu etanol:sirćetna kiselina:voda= 3:1:8)

Postupak izvođenja elektroforeze:

Kompozitni gradijentni gelovi, formirani od dva rastvora poliakrilamida različitih koncentracija, se pripremaju po protokolu koji je razvijen u laboratoriji Katedre za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta (123). Nakon završene hemijske polimerizacije pod uticajem amonijum persulfata gelovi su spremni za korišćenje. Za izvođenje elektroforeze potrebno je aktivirati gelove u toku 50 minuta na 290 V. Na gel se zatim nanose uzorci plazme, a paralelno sa uzorcima nanose se i standardi. Uzorak se priprema tako što se 30 μ l plazme pomeša sa 10 μ l 0.1% rastvora bromfenol – plavog u 40% rastvoru saharoze i na gel se nanosi 25 μ l ove smeše.

Elektroforeza se izvodi u vertikalnoj kadi Hoefer SE 600 Ruby (Amersham Pharmacia Biotech, Vienna, Austria) na temperaturi od 8°C i uz TRIS pufer pH= 8,35. Za kalibraciju gelova koriste se sledeći proteinski standardi: tireoglobulin (17,0 nm), feritin (12.2 nm), laktat dehidrogenazu (8.4 nm) i albumin (7.1 nm), te karboksilovane polistirenske mikrosfere (40 nm) (Duke Scientific Corporation, Palo Alto, CA, USA), kao i standardizovana smeša humane plazme koja sadrži subfrakcije LDL čestica dijametra 26.99 nm i 25.52 nm.

Elektroforeza se vrši pri konstantnom naponu prema protokolu: prvih 13 minuta na 60 V, narednih 20 minuta na 170 V i kasnije u toku 20 sati na 300 V. Po završetku elektroforeze, gelovi se fiksiraju se u 10 % rastvoru trihlorsirćetne kiseline u toku sat vremena a nakon toga se sat vremena ispiraju pomoću 45 % rastvora etanola. Gelovi se boje sa pripremljenom bojom Sudan Black B a zatim se odbojavaju sa rastvorom 45 % etanola. Standardi se boje posebno sa pripremljenim rastvorom boje Coomassie brilliant blue G-250.

Denzitometriiranje gelova zajedno sa proteinskim standardima vršeno je na skeneru Image Scanner (Amersham Pharmacia Biotech, Vienna, Austria). Dve kalibracione krive zasnovane na inverznom odnosu relativne migracione daljine (R_f) i prirodnog logaritma

dijametara odgovarajućih standarda poslužile su za detekciju i određivanje raspodele i relativnog udela LDL i HDL subfrakcija.

Elektroforezom su razdvojene i identifikovane sledeće LDL subfrakcije:

LDL I (27,2-28,5 nm)

LDL IIA (26,5-27,2 nm)

LDL IIB (26,5-25,5 nm)

LDL IIIA (24,7-25,5 nm)

LDL IIIB (24,2-24,7 nm)

LDL IVA (23,3-24,2 nm)

LDL IVB (22,0-23,3 nm).

HDL čestice su razdvojene na sledeće subfrakcije:

HDL 2b (9,7-12,0nm)

HDL 2a (8,8-9,7nm)

HDL 3a (8,2-8,8 nm)

HDL 3b (7,8-8,2 nm)

HDL 3c (7,2-7,8nm).

Na osnovu denzitometrijskog prikaza razdvajanja lipoproteina moguće je odrediti dominantni LDL i HDL dijametar čestice. Ispitanici se u zavisnosti veličine dominantnog dijametara dele na one koji pripadaju LDL fenotipu A (dominantni dijametar $> 25,5$ nm) ili B (dominantni dijametar $\leq 25,5$ nm), odnosno HDL fenotipu 2 (dominantni dijametar $> 8,8$ nm) ili 3 (dominantni dijametar $\leq 8,8$ nm). Određivanje relativnog (%) udela pojedinačnih subfrakcije u ukupnom LDL ili HDL profilu ispitanika se može odrediti merenjem površine ispod denzitometrijskog pika koji odgovara svakoj pojedinačnoj subfrakciji. Zbir relativnih udela LDL III i IV subfrakcija jednak je relativnom udelu malih gustih LDL, a zbir relativnih udela HDL 3a, 3b i 3c subfrakcija jednak je relativnom udelu malih gustih HDL čestica.

3.9. Statistička analiza podataka

Rezultati u ovoj studiji su prikazani kao aritmetičke srednje vrednosti \pm standardne devijacije ukoliko su varijable sledile normalnu raspodelu, odnosno kao geometrijske srednje vrednosti i 95% intervali pouzdanosti (95% CI), ukoliko vrednosti nisu bile normalno distribuirane, ali su nakon logaritmovanja sledile normalnu raspodelu. Ukoliko parametri nisu sledili normalnu raspodelu nakon logaritmovanja, prikazani su kao medijane i interkvartilni rasponi. Kategorički podaci su prikazani kao apsolutne frekvence.

Poređenje kontinuiranih varijabli izvođeno je upotrebom Studentovog t-testa za normalno distribuirane varijable, ili Mann-Whitney testa za parametre koji nisu sledili normalnu raspodelu. Poređenje srednjih vrednosti više od dve grupe podataka rađeno je ednofaktorskom analizom varijanse sa Tukey-Snedecor-ovim post hoc testom. Razlike između kategoričkih varijabli proveravane su upotrebom χ^2 testa (tablice kontigencije). Korelacione analize su rađene pomoću Pearson-ovog i Spearman-ovog korelacionog testa, u zavisnosti od tipa distribucije podataka. Multipla regresiona analiza je korišćena za identifikaciju nezavisnih faktora uticaja na varijable od interesa. Rezultati Pearson-ove korelacione analize su korišćeni kao skrining test za odabir parametara koji su se uključili u multiplu regresionu analizu (uključeni su parametri kod kojih je $p \leq 0,1$). Multikolinearnost je ispitivana procenom vrednosti koeficijenta tolerancije i VIF-a (Variance Inflation Factor). Iz modela smo isključili sve parametre čija je vrednost koeficijenta korelacije bila manja od 0,1. Takođe, varijable sa vrednostima VIF-a višim od 10 su isključene iz primarnog modela. Logistička regresiona analiza korišćena je za identifikaciju nezavisnih prediktora povećanja udela HDL 3 subfrakcija

Minimalni uslov za postojanje statistički značajne razlike je bio kada je verovatnoća (p , nivo značajnosti) bio manji ili jednak 0,05.

Statistička obrada podataka izvedena je korišćenjem računarskih programa MS Excel i SPSS, verzija 22.0 (IBM, New York, USA).

4. Rezultati istraživanja

4.1. Osnovni demografski podaci, antropometrijske karakteristike i rezultati biohemijskih parametara kod pacijenata sa HBB i zdravih ispitanika

U tabeli 2. prikazani su osnovni demografski podaci i antropometrijske karakteristike 50 zdrave dece koja su činila kontrolnu grupu ispitanika (KG), 10 pacijenata sa HBB u predijaliznom stadijumu (pdHBB), 20 pacijenata na dijalizi (D) i 21 pacijenta sa transplantiranim bubregom (T). Nije uočena statistički značajna razlika u starosti između različitih grupa ispitanika (rezultat na granici značajnosti, Tabela 2). Takođe, grupe su bile homogene po polu ($p=0,704$).

Tabela 2. Demografske i antropometrijske karakteristike ispitivanih grupa

Parametar, jedinice	KG n= 50	pdHBB n= 10	D n= 20	T n= 21	P
Starost, godine	12,9 ± 2,82	15,8±4,44	11,9±4,58	15±3,21	0,043
Pol, m/ž	26/24	6/4	8/12	13/8	0,704
ITM, kg/m ²	19,7±3,96	18,9±4,59	16,9±2,34	20,2±3,58	0,135
OS/OK	0,76±0,09	0,83±0,06	0,86±0,07 ^{a*}	0,91±0,08 ^{a**}	<0,001
Sistolni krvni pritisak, mm Hg	114,4±10,03	110,2±17,3	131,3±26,4 ^{a*b*}	119,2±12,06	<0,05
Dijastolni krvni pritisak, mm Hg	74,8±7,21	68,7±12,21	76,5±8,9	74,5±20,13	0,269

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije za kontinuirane podatke koji slede normalnu raspodelu, odnosno kao apsolutne frekvence za kategoričke podatke.

¹ p dobijena ANOVOM za kontinuirane podatke i χ^2 testom za kategoričke

* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ (Tukey's *post hoc* test).

^a statistički značajno različito od kontrolne grupe (Tukey's *post hoc* test).

Nije uočena statistički značajna razlika u ITM između ispitivanih grupa, dok je odnos OS/OK bio statistički značajno viši kod pacijenata na dijalizi i nakon transplantacije u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika ($p < 0,001$). Pacijenti na dijalizi su imali statistički značajno viši sistolni pritisak u poređenju sa kontrolnom grupom ispitanika i pacijentima sa HBB, dok je dijastolni pritisak bio bez značajnije razlike u sve četiri grupe ispitanika.

Rezultati ispitivanja osnovnih biohemijskih parametara su prikazani u Tabeli 3. Koncentracija glukoze je bila najviša u grupi pacijenata na dijalizi ali razlika nije bila statistički značajna. Takođe, nije uočena statistički značajna razlika u koncentracijama parametara lipidnog profila, UH, LDL-h i HDL-ha. Koncentracija TG je bila statistički značajno viša u sve tri grupe pacijenata u poređenju sa kontrolnom grupom ispitanika (Tabela 3). Najviša koncentracija TG je bila u grupi pacijenata na dijalizi ali nije bila statistički značajno viša u odnosu na druge dve grupe pacijenata.

Koncentracija slobodnog holesterola je takođe bila statistički značajno viša u sve tri grupe pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu, dok između grupa pacijenata nije uočena značajna razlika. Koncentracija Lp a je bila najviša u grupi pacijenata na dijalizi ali razlika nije bila statistički značajna. Apo AI je bio značajno viši u grupi pacijenata na dijalizi u poređenju sa kontrolnom grupom i grupom predijaliznih pacijenata sa HBB. Koncentracija Apo B se nije razlikovala među ispitivanim grupama a očekivano, AIP je bio statistički značajno viši u grupi pacijenata na dijalizi i grupi pacijenata nakon transplantacije u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika ($p < 0,001$). Koncentracija ukupnih proteina bila je statistički značajno niža u grupi pacijenata na dijalizi u poređenju sa kontrolnom grupom ispitanika, dok između ostalih ispitivanih grupa nije uočena statistički značajna razlika.

Tabela 3. Osnovni biokemijski parametri u ispitivanim grupama

Parametar, jedinice	KG n= 50	pdHBB n= 10	D n= 20	T n= 21	P ¹
Glukoza, mmol/L	4,8±0,42		5,1±0,62	4,7±0,53	0,06
TG, mmol/L [#]	0,67 (0,58-0,77)	1,26 ^{a*} (0,73-1,99)	2,02 ^{a*} (1,4-2,89)	1,43 ^{a*} (1,08-1,89)	<0,001
UH, mmol/L	4,5±0,93	4,9±0,84	4,3±0,97	5,0±0,99	0,162
LDL-h, mmol/L	2,8±0,78	2,7±0,93	2,3±0,68	2,9±0,79	0,187
HDL-h, mmol/L	1,4±0,29	1,4±0,41	1,1±0,38	1,4±0,51	0,139
Slobodan-h, mmol/L	1,04±0,17	1,7±0,35 ^{a**}	1,5±0,39 ^{a**}	1,4±0,33 ^{a**}	<0,001
Apo AI (g/L)	1,7±0,27	1,9±0,38	1,4±0,4 ^{a*b*}	1,6±0,42	< 0,05
Apo B (g/L)	0,86±0,22	1,02±0,26	0,91±0,19	1,01±0,26	0,051
Lp a, mg/L [#]	0,9 (0,654-1,252)	0,62 (0,292-1,303)	1,55 (0,92-2,61)	0,58 (0,245-1,38 5)	0,053
AIP	-0,3±0,17	-0,04±0,34	0,2±0,312 ^{a**}	0,04±0,371 ^{a**}	<0,001
Ukupni proteini, g/L	70,6±4,45	68,6±2,35	63,6±7,5 ^{a**}	68,5±5,5	<0,05

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije za kontinuirane podatke koji slede normalnu raspodelu

[#] geometrijske srednje vrednosti i 95 CI za podatke koji slede normalnu raspodelu nakon logaritmovanja

¹ p dobijena ANOVOM

* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$ (Tukey' s *post hoc* test).

^a statistički značajno različito od kontrolne grupe (Tukey' s *post hoc* test).^b statistički značajno različito od pacijenata sa HBB (Tukey' s *post hoc* test).

4.2. Analiza parametara za procenu bubrežne funkcije

U tabeli 4. su prikazani parametri koji se tradicionalno koriste za procenu bubrežne funkcije. Dužina trajanja bolesti nije bila statistički značajno različita u tri ispitivane grupe pacijenata ($p= 0,454$). Koncentracija kreatinina je bila statistički značajno viša u grupi pacijenata na dijalizi u odnosu na predijaliznu HBB grupu ($p<0,001$), kao i u odnosu na grupu pacijenata koji su imali transplantiran bubreg ($p<0,001$). Takođe, grupa pacijenata sa transplantiranim bubregom imala je statistički značajno nižu koncentraciju kreatinina u poređenju sa predijaliznom HBB grupom ($p<0,05$).

Tabela 4. Parametri procene bubrežne funkcije u različitim grupama pacijenata

Parametar, jedinice	pdHBB n= 10	D n= 20	T n= 21	p ¹
Dužina trajanja bolesti, godine	9,9±5,8	7,1±5,8	9,8±5,8	0,454
Kreatinin, µmol/L	219,9±133,1	715,1±143,38 ^{a**}	95,4±33,62 ^{a*,b**}	< 0,001
Urea, mmol/L	14,2±7,25	25,8±5,4 ^{a**}	7,5±2,4 ^{a*,b**}	< 0,001

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije za kontinuirane podatke koji slede normalnu raspodelu

¹ p dobijena ANOVOM

* $p<0.05$; ** $p<0.001$ (Tukey' s *post hoc* test).

^a statistički značajno različito od HBB (Tukey' s *post hoc* test).^b statistički značajno različito od pacijenata na dijalizi (Tukey' s *post hoc* test).

Koncentracija ureje je bila statistički značajno viša kod pacijenata na dijalizi u poređenju sa predijaliznim HBB pacijentima i pacijentima kojima je transplantiran bubreg, dok su predijalizni HBB pacijenti imali statistički značajno višu koncentraciju ureje u odnosu na grupu pacijenata kojima je transplantiran bubreg.

4.3. Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod bubrežnih pacijenata i zdravih ispitanika

Rezultati ispitivanja parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite su prikazani u Tabeli 5. Koncentracija TBKRS je bila statistički značajno viša u sve tri grupe pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika. U grupi pacijenata na dijalizi ovaj parametar oksidativnog stresa je bio viši u odnosu na predijalizne HBB pacijente i pacijente sa transplantiranim bubregom ali razlike nisu bile statistički značajne. Iznenadjuće, nivoi O_2^- se nisu značajno razlikovali između kontrolne grupe ispitanika i pacijenata, kao ni između različitih grupa pacijenata ($p=0,573$). S druge strane, koncentracija AOPP bila je statistički značajno viša kod pacijenata na dijalizi i to i u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika ($p<0,001$) ali i u odnosu na predijalizne HBB pacijente ($p<0,001$) i u odnosu na grupu pacijenata sa transplantiranim bubregom ($p<0,05$). Predijalizni HBB pacijenti nisu imali statistički značajno više koncentracije AOPP u odnosu na kontrolnu grupu, dok je koncentracija ovog parametra bila viša kod transplantiranih pacijenata u poređenju sa zdravom decom ($p<0,05$).

Tabela 5. Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod bubrežnih pacijenata i zdravih ispitanika

Parametar, jedinice	KG n= 50	pdHBB n= 10	D n= 20	T n= 21	p ¹
TBKRS, μmol/L	1,1±0,36	1,5±0,26 ^{a*}	1,8±0,34 ^{a**}	1,5±0,39 ^{a**}	< 0,001
Ω ^{•-} μmol/min /L	211,4±59,2	195,5±49,98	207,3±58,75	190,1±52,47	0,573
AOPP, μmol/L	14,1±5,85	19,7±3,62	37,8±10,56 ^{a**,b**}	22,5±12,17 ^{a*,c*}	< 0,001
SH - grupe, mmol/L	0,51±0,07	0,49±0,06 ^{a*}	0,42±0,11 ^{a*,b*}	0,51±0,06 ^{b*,c*}	<0,05
SOD (kU/L)	113,0±25,13	84,4±25,14 ^{a*}	124,9±37,2 ^{b*}	93,8±12,38 ^{a*,c*}	< 0,001

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije za kontinuirane podatke koji slede normalnu raspodelu, odnosno kao apsolutne frekvence za kategoričke podatke.

geometrijske srednje vrednosti i 95 CI za podatke koji slede normalnu raspodelu nakon logaritmovanja

¹ p dobijena ANOVOM

* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$ (Tukey's *post hoc* test).

^a statistički značajno različito od kontrolne grupe (Tukey's *post hoc* test). ^b statistički značajno različito od pacijenata sa HBB (Tukey's *post hoc* test). ^c statistički značajno od grupe pacijenata na dijalizi (Tukey's *post hoc* test).

Koncentracija ukupnih SH- grupa, kao marker antioksidativne zaštite bila je slična kod zdrave dece i dece sa transplantiranim bubregom. Ovaj parametar je bio statistički značajno niži kod predijazlinih HBB pacijenata, kao i kod dece na dijalizi kod kojih je bio niži i u poređenju sa predijaliznom HBB grupom ($p < 0,05$). Aktivnost SOD bila je statistički značajno viša u grupi pacijenata na dijalizi u poređenju sa predijaliznom HBB grupom ($p < 0,05$), kao i u poređenju sa grupom ispitanika sa transplantiranim bubregom ($p < 0,05$). Takođe, u ove dve grupe pacijenata, aktivnost SOD je bila značajno niža u poređenju sa kontrolnom grupom ispitanika.

4.3.1. Korelacije između parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite i lipidnih i nelipidnih parametara

Da bi se ispitalo eventualno postojanje korelacija između parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite sa ostalim lipidnim i nelipidnim parametrima, korišćena je metoda Pearson-ove korelacione analize. Rezultati ove analize u kontrolnoj grupi ispitanika su prikazani u Tabeli 6.

Tabela 6. Korelacije između parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite i lipidnih i nelipidnih parametara u kontrolnoj grupi ispitanika

Parametar	TBKRS, μmol/L	O ₂ ⁻ μmol/min/L	AOPP, μmol/L	SH - grupe, mmol/L	SOD (kU/L)
Starost, godine	-0,269	0,174	-0,291	0,369*	-0,285
ITM, kg/m ²	0,007	0,033	0,031	0,223	-0,024
OS/OK	0,300*	0,106	0,184	-0,112	0,078
TG, mmol/L	0,027	0,046	0,056	-0,313	0,085
UH, mmol/L	-0,182	-0,182	-0,068	0,052	0,099
LDL-h, mmol/L	-0,284	-0,235	-0,134	0,138	0,037
HDL-h, mmol/L	0,149	0,072	0,115	-0,205	0,169
Lp a, mg/L	0,258	-0,042	0,129	0,239	0,074
Apo AI (g/L)	0,025	-0,214	-0,157	-0,235	-0,206
Apo B (g/L)	0,195	0,169	0,404*	0,265	0,243
Ukupni proteini, g/L	-0,115	0,041	0,206	0,443**	0,170

* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$; U tabeli su date vrednosti Pearson-ovog koeficijenta korelacije

Koncentracija TBKRS je bila statistički značajno povezana sa OS/OK, dok je koncentracija AOPP kao markera oksidativnog stresa pokazala statistički značajnu pozitivnu korelaciju sa Apo B ($p < 0,05$) u kontrolnoj grupi ispitanika. Od parametara oksidativnog stresa, koncentracija SH- grupa bila je u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa godinama starosti ispitanika i koncentracijom ukupnih proteina, što je očekivan rezultat. Nivo O_2^- i aktivnost SOD nisu bili značajno povezani sa ispitivanim lipidnim i nelipidnim parametrima.

Tabela 7. Korelacije između parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite i lipidnih i nelipidnih parametara u pdHBB grupi

Parametar	TBKRS, $\mu\text{mol/L}$	O_2^- $\mu\text{mol/min/L}$	AOPP, $\mu\text{mol/L}$	SH - grupe, mmol/L	SOD (kU/L)
Starost, godine	0,183	-0,076	0,099	0,847*	-0,128
Dužina trajanja bolesti, godine	0,180	0,074	-0,240	0,07	-0,085
ITM, kg/m^2	0,567	0,039	0,147	0,183	0,135
OS/OK	-0,047	0,345	-0,450	0,553	0,553
TG, mmol/L	0,601	0,335	0,380	-0,414	-0,581
UH, mmol/L	0,707*	0,450	-0,010	0,043	0,043
LDL-h, mmol/L	0,605	0,407	-0,262	-0,121	0,167
HDL-h, mmol/L	-0,52	0,505	0,037	0,291	0,291
Lp a, mg/L	0,447	-0,021	-0,072	0,221	0,221
Apo AI (g/L)	-0,161	0,275	0,077	-0,053	0,732*
Apo B (g/L)	0,846*	0,693	-0,116	-0,133	-0,133
Ukupni proteini, g/L	0,124	0,343	0,05	0,655	0,655

* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$; U tabeli su date vrednosti Pearson-ovog koeficijenta korelacije

U Tabeli 7 prikazani su rezultati korelacione analize u grupi predijaliznih pacijenata sa HBB. Kao što se može videti, koncentracija TBKRS je bila u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom Apo B, dok druga dva parametra oksidativnog stresa, TBKRS i O_2^- nisu pokazali značajnu povezanost sa ispitivanim lipidnim i nelipidnim parametrima. Koncentracija SH-grupa je bila u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa godinama starosti pacijenata dok je aktivnost SOD bila u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom Apo AI.

Rezultati korelacione analize u grupi pacijenata da dijalizi su prikazani u Tabeli 8. Od parametara oksidativnog stresa u grupi pacijenata na dijalizi, jedino je koncentracija TBKRS bila u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom UH i koncentracijom Apo B. Ostali ispitivani parametri oksidativnog stresa, kao i antioksidativne zaštite nisu pokazali značajnu povezanost sa lipidnim i nelipidnim parametrima u ovoj grupi pacijenata. Na kraju korelaciona analiza je urađena i u grupi pacijenata kojima je transplantiran bubreg. Rezultati su prikazani u Tabeli 9.

Tabela 8. Korelacije između parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite i lipidnih i nelipidnih parametara u grupi pacijenata na dijalizi

Parametar	TBKRS, μmol/L	Ω ⁻ μmol/min/L	AOPP, μmol/L	SH - grupe, mmol/L	SOD (kU/L)
Starost, godine	0,183	0,099	0,099	0,847**	-0,128
Dužina trajanja bolesti, godine	0,180	-0,240	-0,24	0,07	-0,085
ITM, kg/m ²	0,567	0,147	0,147	0,135	-0,128
OS/OK	-0,047	-0,450	-0,45	0,553	0,002
TG, mmol/L	0,601	0,380	0,380	-0,414	0,141
UH, mmol/L	0,707*	-0,010	-0,010	0,043	-0,308
LDL-h, mmol/L	0,605	-0,262	-0,262	0,167	-0,121
HDL-h, mmol/L	-0,520	0,037	0,037	0,291	-0,488
Lp a, mg/L	0,447	-0,072	-0,072	0,221	0,480
Apo AI (g/L)	-0,161	0,077	0,077	-0,053	0,732
Apo B (g/L)	0,846**	-0,116	-0,116	-0,133	-0,259
Ukupni proteini, g/L	0,124	-0,050	-0,050	0,655	-0,093

* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$; U tabeli su date vrednosti Pearson-ovog koeficijenta korelacije

Tabela 9. Korelacije između parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite i lipidnih i nelipidnih parametara u grupi pacijenata kojima je transplantiran bubreg

Parametar	TBKRS, μmol/L	O ₂ ⁻ μmol/min/L	AOPP, μmol/L	SH - grupe, mmol/L	SOD (kU/L)
Starost, godine	-0,086	0,413	0,419	0,509	-0,075
Dužina trajanja bolesti, godine	0,145	-0,044	-0,246	-0,180	-0,063
ITM, kg/m ²	0,285	0,513*	-0,105	0,246	0,322
OS/OK	-0,009	0,486*	-0,289	-0,246	0,06
TG, mmol/L	0,537*	0,339	0,073	0,413	-0,134
UH, mmol/L	0,179	0,562**	-0,144	-0,370	0,005
LDL-h, mmol/L	0,082	0,532**	-0,137	-0,150	-0,166
HDL-h, mmol/L	-0,199	-0,064	0,09	0,716**	0,367
Lp a, mg/L	-0,122	0,242	-0,204	0,339	0,043
Apo AI (g/L)	-0,169	0,04	-0,196	0,736**	0,396
Apo B (g/L)	0,244	0,643**	-0,067	-0,121	-0,160
Ukupni proteini, g/L	0,335	0,318	0,057	0,146	-0,304

* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$; U tabeli su date vrednosti Pearson-ovog koeficijenta korelacije

U grupi pacijenata sa transplantiranim bubregom, koncentracija TBKRS je bila u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom triglicerida. Nivo O_2^- je u ovoj grupi pacijenata bio u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa ITM, OS/OK, koncentracijama UH, LDL-h i ApoB. AOPP kao i aktivnost SOD nisu pokazali statistički značajnu vezu sa ispitivanim lipidnim i nelipidnim parametrima u ovoj grupi pacijenata, dok je koncentracija SH-grupa bila u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa HDL-holesterolom i Apo AI.

4.3.2. Ispitivanje statusa enzima PON1 kod bubrežnih pacijenata i zdravih ispitanika

Status enzima PON1 određivan je merenjem aktivnosti ovog enzima prema dva supstrata paraoksonu, POazna aktivnost i diazoksonu, DZOazna aktivnost. POazna aktivnost je bila slična u sve četiri ispitivane grupe ($p=0,261$), dok je DZOazna aktivnost bila viša u kontrolnoj grupi ispitanika u odnosu na grupe pacijenata ali razlika nije bila statistički značajna (Tabela 10).

Rezultati prethodnih studija na našoj populaciji su pokazale da odnos PON1 aktivnosti ≥ 60 predstavlja QQ fenotip, između 21 i 59 fenotip QR i odnos vrednosti ≤ 20 fenotip RR enzima PON1. Iz rezultata dobijenih χ^2 testom, može se zaključiti da ne postoji značajna razlika u distribuciji fenotipova PON1₁₉₂ između kontrolne grupe i grupe pacijenata. Udeo osoba sa QQ fenotipom u kontrolnoj grupi je bio veći u odnosu na predijaliznu HBB grupu pacijenata ali je ovaj rezultat bio na granici značajnosti ($p=0,058$). Rezultati ovog dela istraživanja su prikazani u Tabeli 10.

Tabela 10. Status enzima PON1 kod bubrežnih pacijenata i zdravih ispitanika

Parametar	KG	HBB	D	T	p
POazna aktivnost (U/L) #	356,7 (275,9-461,2)	342,4 (225,7-519,6)	218,9 (169,1-283,3)	368,5 (258,7-524,9)	0,261
DZOazna aktivnost (U/L)	11405±4631,9	9399±2450,2	9354±2337,6	9330±3962,2	0,167
PON1_{Q192R} fenotip					
QQ (n%)	15 (30%)	0 (0%)	4 (20%)	2 (10%)	0,215
QR (n%)	16 (32%)	7 (70%)	12 (60%)	10 (48%)	
RR (n%)	17 (34%)	3 (30%)	4 (20%)	9 (42%)	

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije za kontinuirane podatke koji slede normalnu raspodelu, odnosno kao apsolutne (relativne) frekvence za kategoričke podatke.

geometrijske srednje vrednosti i 95 CI za podatke koji slede normalnu raspodelu nakon logaritmovanja

Korelaciona analiza je primenjena da bi se utvrdilo postojanje povezanosti POazne i DZOazne aktivnosti sa ispitivanim lipidnim i nelipidnim parametrima u sve četiri grupe ispitanika. Rezultati korelacione analize prikazani u Tabelama 11 i 12.

Tabela 11. Pearson-ova parametarska korelaciona analiza POazne aktivnosti sa lipidnim i nelipidnim parametrima kod bubrežnih pacijenata i zdravih ispitanika

Parametar	KG		HBB		D		T	
	r	p	r	p	r	p	r	p
Starost, godine	-0,298	0,066	-0,610	0,061	0,02	0,995	0,301	0,197
Dužina trajanja bolesti, godine	-	-	-0,082	0,822	-0,736	<0,05	0,369	0,120
ITM, kg/m ²	0,069	0,676	-0,422	0,298	-0,166	0,647	0,359	<0,05
OS/OK	0,248	0,128	0,105	0,773	-0,730	<0,05	0,201	0,396
UH, mmol/L	-0,064	0,698	-0,274	0,476	0,063	0,863	-0,116	0,615
TG, mmol/L	0,032	0,847	-0,549	0,126	-0,163	0,653	-0,161	0,485
LDL-h, mmol/L	-0,127	0,443	-0,161	0,680	0,144	0,692	0,026	0,910
HDL-h, mmol/L	0,115	0,487	0,445	0,230	0,069	0,849	-0,209	0,364
Lp a, mg/L	-0,01	0,954	0,039	0,915	0,144	0,692	-0,095	0,684
Apo AI (g/L)	0,057	0,746	-0,031	0,933	0,295	0,408	-0,187	0,416
Apo B (g/L)	0,032	<0,05	-0,506	0,135	0,061	0,866	-0,056	0,808
Ukupni proteini, g/L	0,253	0,120	0,389	0,301	0,259	0,471	0,289	0,203

POazna aktivnost je bila u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom Apo B u kontrolnoj grupi ispitanika, a u negativnoj korelaciji sa dužinom trajanja bolesti i odnosom OS/OK u grupi pacijenata na dijalizi. U grupi pacijenata kojima je transplantiran bubreg, POazna aktivnost je bila u statistički značajnoj pozitivnoj

korelaciji sa ITM. Ostali ispitivani parametri nisu pokazali statistički značajnu povezanost.

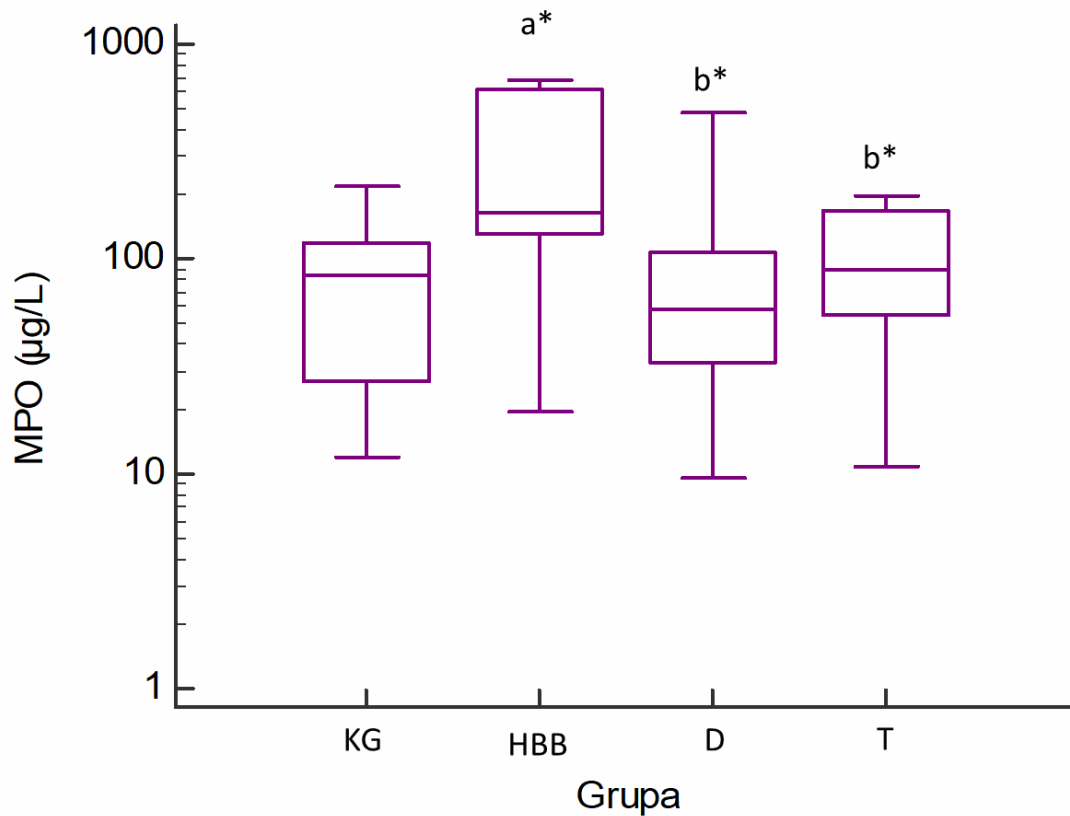
Tabela 12. Pearson-ova parametarska korelaciona analiza DZOazne aktivnosti sa lipidnim i nelipidnim parametrima kod bubrežnih pacijenata i zdravih ispitanika

Parametar	KG		HBB		D		T	
	r	p	r	p	r	p	r	p
Starost, godine	0,138	0,402	0,07	0,848	-0,007	0,985	-0,175	0,461
Dužina trajanja bolesti, godine	-	-	0,181	0,617	-0,526	0,118	-0,466	<0,05
ITM, kg/m ²	0,232	0,155	0,690	<0,05	0,136	0,707	0,058	0,809
OS/OK	0,178	0,278	-0,039	0,916	0,348	0,398	0,131	0,583
UH, mmol/L	0,220	0,179	0,723	<0,05	0,671	<0,05	0,160	0,490
TG, mmol/L	0,025	0,881	0,365	0,334	0,670	<0,05	-0,180	0,435
LDL-h, mmol/L	0,337	<0,05	0,588	0,096	0,492	0,148	0,123	0,594
HDL-h, mmol/L	-0,215	0,190	-0,17	0,661	0,051	0,888	0,265	0,245
Lp a, mg/L	-0,172	0,296	0,254	0,478	0,492	0,148	0,187	0,417
Apo AI (g/L)	0,257	0,137	0,243	0,499	0,207	0,566	0,342	0,129
Apo B (g/L)	0,137	0,405	0,686	<0,05	0,823	<0,05	0,022	0,925
Ukupni proteini, g/L	0,36	<0,05	0,541	0,132	-0,025	0,946	-0,022	0,926

DZOazna aktivnost je bila u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom LDL-holesterola i ukupnim proteinima u kontrolnoj grupi ispitanika. U grupi predijaliznih HBB pacijenata DZOazna aktivnost je bila u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa ITM, UH i Apo B, a u grupi dijaliznih pacijenata sa UH, TG i Apo B. U grupi pacijenata nakon transplantacije DZOazna aktivnost je bila samo u statistički značajnoj negativnoj korelaciji sa dužinom trajanja bolesti. Ostali ispitivani parametri nisu pokazali značajnu povezanost sa DZOaznom aktivnosti.

4.3.3. Ispitivanje koncentracije enzima mijeloperoksidaze kod bubrežnih pacijenata i zdravih ispitanika

Koncentracija antioksidativnog enzima mijeloperoksidaze je ispitivana u cilju detaljnije evaluacije antioksidativnog statusa dece u različitim stadijumima HBB, kao i kod dece nakon transplantacije i zdravih ispitanika. Rezultati ispitivanja su prikazani grafički na Slici 21.



Slika 21. Koncentracija enzima mijeloperoksidaze u ispitivanim grupama

^a statistički značajno različito od kontrolne grupe (Tukey' s *post hoc* test). ^b statistički značajno različito od pacijenata sa HBB (Tukey' s *post hoc* test). * $p < 0.05$;

Koncentracija enzima mijeloperoksidaze bila je statistički značajno viša u grupi predijaliznih HBB pacijenata, u odnosu na zdrave ispitanike, kao i u odnosu na pacijente na dijalizi i pacijente sa transplantiranim bubregom.

4.3.4. Korelaciona analiza koncentracije enzima mijeloperoksidaze sa lipidnim i nelipidnim parametrima kod bubrežnih pacijenata i zdravih ispitanika

Da bi se ispitalo postojanje povezanosti koncentracije enzima mijeloperoksidaze za lipidnim i nelipidnim parametrima u ispitivanim grupama, primenjena je Pearson-ova korelaciona analiza. Rezultati ove analize su prikazani u Tabeli 13.

Tabela 13. Pearsonova parametarska korelaciona analiza koncentracije enzima mijeloperoksidaze sa lipidnim i nelipidnim parametrima

Parametar	KG		HBB		D		T	
	r	p	r	p	r	p	r	p
Starost, godine	0,236	0,266	0,368	0,358	-0,08	0,838	0,365	0,587
ITM, kg/m ²	0,097	0,651	0,461	0,250	0,248	0,519	-0,76	0,758
OS/OK	-0,258	0,367	0,514	0,129	-0,504	0,89	-0,176	0,470
UH, mmol/L	-0,230	0,281	0,642	0,120	-0,14	0,72	-0,095	0,691
TG, mmol/L	0,082	0,703	-0,083	0,832	-0,572	0,107	0,313	0,179
LDL-h, mmol/L	-0,286	0,175	0,317	0,405	-0,210	0,587	-0,102	0,668
HDL-h, mmol/L	-0,106	0,623	0,464	0,209	0,537	0,136	-0,274	0,243
AIP	0,159	0,258	-0,294	0,442	0,596	<0,001	0,154	0,504

Rezultati korelacione analize su pokazali da je koncentracija enzima mijeloperoksidaze u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa AIP u grupi dijaliznih pacijenata. Ostali ispitivani lipidni i nelipidni parametri nisu pokazali značajnu povezanost ni u grupama pacijenata, ni u kontrolnoj grupi ispitanika.

4.3.5. Korelaciona analiza koncentracije enzima mijeloperoksidaze sa parametrima oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod bubrežnih pacijenata izdravih ispitanika

Pearson-ova parametarska korelaciona analiza je primenjena za ispitivanje povezanosti koncentracije enzima mijeloperoksidaze sa ispitivanim parametrima oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite. Rezultati su prikazani u Tabeli 14.

Tabela 14. Pearson-ova parametarska korelaciona analiza koncentracije enzima mijeloperoksidaze sa parametrima oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite

Parametar	KG		HBB		D		T	
	r	p	r	p	r	p	r	p
TBKRS, $\mu\text{mol/L}$	-0,15	0,518	0,199	0,582	0,563	<0,05	0,174	0,463
$\text{O}_2^{\cdot-}$ $\mu\text{mol/min/L}$	0,023	0,888	0,411	0,238	0,092	0,814	0,055	0,818
AOPP, $\mu\text{mol/L}$	-0,150	0,565	-0,171	0,636	0,458	0,215	0,687	<0,05
SH - grupe, mmol/L	0,219	0,327	0,114	0,754	0,094	0,825	-0,454	<0,05
SOD (kU/L)	-0,70	0,746	-0,244	0,497	-0,169	0,664	-0,003	0,989
POazna aktivnost (U/L)	0,297	0,169	-0,231	0,520	0,007	0,987	-0,138	0,562
DZOazna aktivnost (U/L)	-0,100	0,651	0,163	0,653	-0,189	0,626	-0,302	0,195

Koncentracija mijeloperoksidaze je bila u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom TBKRS u grupi pacijenata na dijalizi. U grupi pacijenata sa trasplantiranim bubregom, koncentracija mijeloperoksidaze je bila u pozitivnoj korelaciji sa AOPP i negativnoj korelaciji sa SH-grupama. U kontrolnoj grupi ispitanika i grupi HBB pacijenata, nije uočena značajna povezanost između koncentracije mijeloperoksidaze i ispitivanih parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite.

4.4. Ispitivanje povezanosti AIP sa lipidnim i nelipidnim parametrima kao i sa parametrima oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod bubrežnih pacijenata i zdravih ispitanika

Kako se AIP povezuje sa rizikom za razvoj KVB kod bubrežnih pacijenata, jedan od ciljeva ove studije bio je ispitivanje povezanosti AIP sa ostalim ispitivanim parametrima i to i kod zdrave dece i u sve tri grupe pacijenata.

4.4.1. Korelaciona analiza AIP sa lipidnim i nelipidnim parametrima, parametrima oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod zdravih ispitanika

Da bi se ispitalo eventualno postojanje korelacije između AIP i parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kao i ostalim lipidnim i nelipidnim faktorima rizika za razvoj KVB, korišćena je metoda Pearson-ove parametarske korelacione analize. Rezultati su prikazani u Tabeli 15.

Tabela 15. Korelaciona analiza AIP sa ispitivanim parametrima u grupi zdrave dece

Parametar	r	p
Starost, godine	0,284	0,875
ITM, kg/m ²	-0.09	0.607
OS/OK	0.240	0.164
Sistolni krvi pritisak, mm Hg	-0.328	0.082
Dijastolni krvni pritisak, mm Hg	-0.169	0.309
Glukoza, mmol/L	0.023	0.895
UH, mmol/L	0.076	0.666
LDL-h, mmol/L	0.142	0.417
MPO (µg/L)	0.360	<0.05
TBKRS (µmol/L)	0.197	0.287
O ₂ ⁻ (µmol/min/L)	-0.307	0.102
AOPP (µmol/L)	-0.397	0.057
SOD, kU/L	-0.085	0.634
SH-grupe, g/L	-0.391	0.385
POazna aktivnost, U/L	-0.179	0.320
DZOazna aktivnost, U/L	0.126	0.486

U grupi zdrave dece, rezultati korelacione analize su pokazali da je AIP u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom mijeloperoksidaze. Ostali ispitivani parametri nisu pokazali značajnu povezanost sa AIP.

4.4.2. Korelaciona analiza AIP sa lipidnim i nelipidnim parametrima, parametrima oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod predijaliznih HBB pacijenata

Rezultati statističke analize u HBB grupi pacijenata su pokazali da je AIP u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa ITM, sistolnim pritiskom i koncentracijom TBKRS. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 16.

Tabela 16. Pearson-ova parametarska korelaciona analiza AIP sa ispitivanim parametrima u predijaliznoj HBB grupi pacijenata

Parametar	r	p
Starost, godine	0,588	0,098
Dužina trajanja bolesti, godine	0,350	0,356
ITM, kg/m ²	0,857	<0,05
OS/OK	-0,217	0,576
Sistolni krvni pritisak, mm Hg	0,828	<0,05
Dijastolni krvni pritisak, mm Hg	0,424	0,256
UH, mmol/L	0,017	0,966
LDL-h, mmol/L	0,150	0,700
MPO (μg/L)	-0,283	0,460
TBKRS (μmol/L)	0,672	<0,05
O ₂ ⁻ (μmol/min/L)	-0,310	0,417
AOPP (μmol/L)	0,283	0,460
SOD, kU/L	0,417	0,265
SH-grupe g/L	-0,450	0,224
POazna aktivnost, U/L	-0,437	0,240
DZOazna aktivnost, U/L	0,317	0,406

Kako su rezultati Pearson-ove korelacione analize pokazali značajnu povezanost AIP sa ITM, sistolnim pritiskom i koncentracijom TBKRS univarijantnom linearnom regresionom analizom je detaljnije ispitana ova povezanost. AIP je označen zavisnom varijablom. Rezultati su prikazani u Tabeli 17.

Tabela 17. Linerana regersiona analiza za ispitivanje povezanosti AIP sa značajnim parametrima (univarijantna analiza)

	β	SE (β)	<i>P</i>	R ²	adjusted R ²
Starost, godine	0,565	0,046	0,113	0,319	0,222
ITM, kg/m²	0,710	0,023	0,074	0,504	0,404
Sistolni krvni pritisak, mm Hg	0,810	0,004	<0,05	0,656	0,607
TBKRS (μmol/L)	0,644	0,328	0,061	0,415	0,332

Rezultati univarijantne linerane regresione analize su pokazali da je AIP u ovoj grupi pacijenata značajno povezan sa sistolnim krvnim pritiskom dok su rezultati vezani za ITM i koncentraciju TBKRS bili na granici značajnosti.

Da bi se utvrdilo da li ispitivani parametri imaju nezavistan uticaj na AIP, primenjena je multipla linearna regresiona analiza. Model je napravljen na osnovu rezultata korelacione analize. Za nezavisne varijable u modelu uzete su one čija je značajnost za Pearson-ov koeficijent bila <0,1. Rezultati su prikazani u Tabeli 18.

Tabela 18. Multipla linearna regresiona analiza za ispitivanje nezavisnog uticaja ispitivanih parametara na AIP u predijaliznoj HBB grupi pacijenata

	AIP R² = 0,791 adjusted R² = 0,583		
	β	SE (β)	P
ITM, kg/m²	0,129	0,029	0,767
Sistolni krvi pritisak, mm Hg	0,445	0,007	0,328
TBKRS (μmol/L)	0,464	0,364	0,250

Rezultati multiple lineare regresione analize su pokazali da u grupi predijaliznih HBB pacijenata nijedan od parametara nema nezavistan uticaj na vrednosti AIP.

4.4.3. Korelaciona analiza AIP sa lipidnim i nelipidnim parametrima, parametrima oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod pacijenata na dijalizi

U grupi pacijenata na dijalizi, rezultati Pearson-ove korelacione analize su pokazali da je AIP u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa dužinom trajanja dijalize, ITM, dijastolnim krvnim pritiskom, koncentracijom MPO kao i koncentracijom AOPP. Rezultati su prikazani u Tabeli 19.

Tabela 19. Pearson-ova parametarska korelaciona analiza AIP sa ispitivanim parametrima u grupi pacijenata na dijalizi

Parametar	r	p
Starost, godine	0,528	0,236
Dužina trajanja bolesti, godine	0,289	0,056
ITM, kg/m ²	0.467	<0.05
OS/OK	-0.182	0.470
Sistolni krvni pritisak, mm Hg	0.422	0.064
Dijastolni krvni pritisak, mm Hg	0.540	<0.05
UH, mmol/L	0.160	0.499
LDL-h, mmol/L	0.007	0.977
MPO (µg/L)	0.595	<0.001
TBKRS (µmol/L)	0.394	0.096
O ₂ ⁻ (µmol/min/L)	0.433	0.064
AOPP (µmol/L)	0.744	<0.001
SOD, kU/L	-0.019	0.937
SH-grupe, g/L	-0.307	0.265
POazna aktivnost, U/L	-0.067	0.853
DZOazna aktivnost, U/L	0.515	0.128

Univarijantnom lineranom regresionom analizom, detaljnije je ispitivana povezanost svih parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod kojih je verovatnoća za koeficijent korelacije bila <0,1. Ovi rezultati su prikazani u Tabeli 20.

Tabela 20. Linerana regersiona analiza za ispitivanje povezanosti AIP sa značajnim parametrima (univarijantna analiza)

	β	SE (β)	<i>P</i>	R ²	adjusted R ²
MPO (µg/L)	0.515	0.001	<0.05	0.266	0.225
TBKRS (µmol/L)	0.407	0.198	0.084	0.165	0.116
O2- (µmol/min/L)	0.469	0.001	0.043	0.220	0.174
AOPP (µmol/L)	0.691	0.003	<0.001	0.478	0.447

Rezultati univarijantne linearne regresione analize su izdvojili koncentraciju MPO i koncentraciju AOPP, kao parametre oksidativnog stresa koji su značajno povezani sa AIP. Da bismo utvrdili da li su ovi parametri povezani sa AIP nezavisno od uticaja ostalih ispitivanih parametara, primenili smo metodu multiple linearne regresione analize. U modele su ušle varijable za koje je značajnost za koeficijent korelacije u neparametarskoj korelacionoj analizi bio <0,1. Oba parametra su zbog principa mutikolineranosti ispitivana u odvojenim modelima. Rezultati su prikazani u Tabelama 21 i 22.

Tabela 21. Multipla linearna regresiona analiza za ispitivanje nezavisnog uticaja ispitivanih parametara na AIP u grupi pacijenata na dijalizi

	AIP R² = 0,532 adjusted R² = 0,365		
	β	SE (β)	<i>P</i>
Dužina trajanja dijalize, meseci	0,089	0,002	0,702
ITM, kg/m²	0,243	0,025	0,320
Sistolni krvi pritisak, mm Hg	0,087	0,004	0,781
Dijastolni krvni pritisak, mmHg	-0,246	0,005	0,425
MPO (µmol/L)	0,503	0,001	<0,05

Rezultati multiple linearne regresione analize su pokazali da je koncentracija MPO nezavisno od uticaja drugih ispitivanih parametara povezana za AIP kod pacijenata na dijalizi. Čak 36,5% porasta AIP kod ovih pacijenata se može objasniti povećanjem koncentracije MPO.

Tabela 22. Multipla linearna regresiona analiza za ispitivanje nezavisnog uticaja ispitivanih parametara na AIP u grupi pacijenata na dijalizi

	AIP R ² = 679 adjusted R ² = 0,555		
	β	SE (β)	P
Dužina trajanja dijalize, meseci	-0,121	0,002	0,567
ITM, kg/m ²	0,266	0,021	0,582
Sistolni krvi pritisak, mm Hg	0,038	0,004	0,888
Dijastolni krvni pritisak, mmHg	-0,266	0,004	0,354
AOPP (μ mol/L)	0,658	0,003	<0,05

Koncentracija AOPP se takođe pokazala nezavisno povezanom sa AIP kod pacijenata na dijalizi. Preko 50% porasta AIP kod ovih pacijenata može se objasniti povećanjem koncentracije AOPP.

4.4.4. Korelaciona analiza AIP sa lipidnim i nelipidnim parametrima, parametrima oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod pacijenata nakon transplantacije bubrega

Pearson-ova korelaciona analiza u grupi pacijenata kojima je transplantiran bubreg je pokazala da je AIP u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa većim brojem ispitivanih parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite. Rezultati su prikazani u Tabeli 23.

Tabela 23. Pearson-ova parametarska korelaciona analiza AIP sa ispitivanim parametrima u grupi pacijenata nakon transplantacije bubrega

Parametar	r	p
Starost, godine	0,133	0,576
Dužina trajanja bolesti, godine	0,195	0,423
ITM, kg/m²	0,336	0,147
OS/OK	0,297	0,203
Sistolni krvi pritisak, mm Hg	-0,003	0,991
Dijastolni krvni pritisak, mm Hg	0,132	0,578
UH, mmol/L	0,09	0,699
LDL-h, mmol/L	0,204	0,375
MPO (µg/L)	0,505	<0.05
TBKRS (µmol/L)	0,471	<0.05
O₂⁻ (µmol/min/L)	0,350	0,120
AOPP (µmol/L)	0,404	0,077
SOD, kU/L	-0,044	0,849
SH-grupe, g/L	0,561	<0.05
POazna aktivnost, U/L	-0,30	0,899
DZOazna aktivnost, U/L	-0,257	0,260

Koncentracije MPO, TBKRS i SH-grupa bile su u značajnoj korelaciji sa vrednostima AIP kod ovih pacijenata, dok je vrednosti koeficijenata za AOPP bila na granici značajnosti.

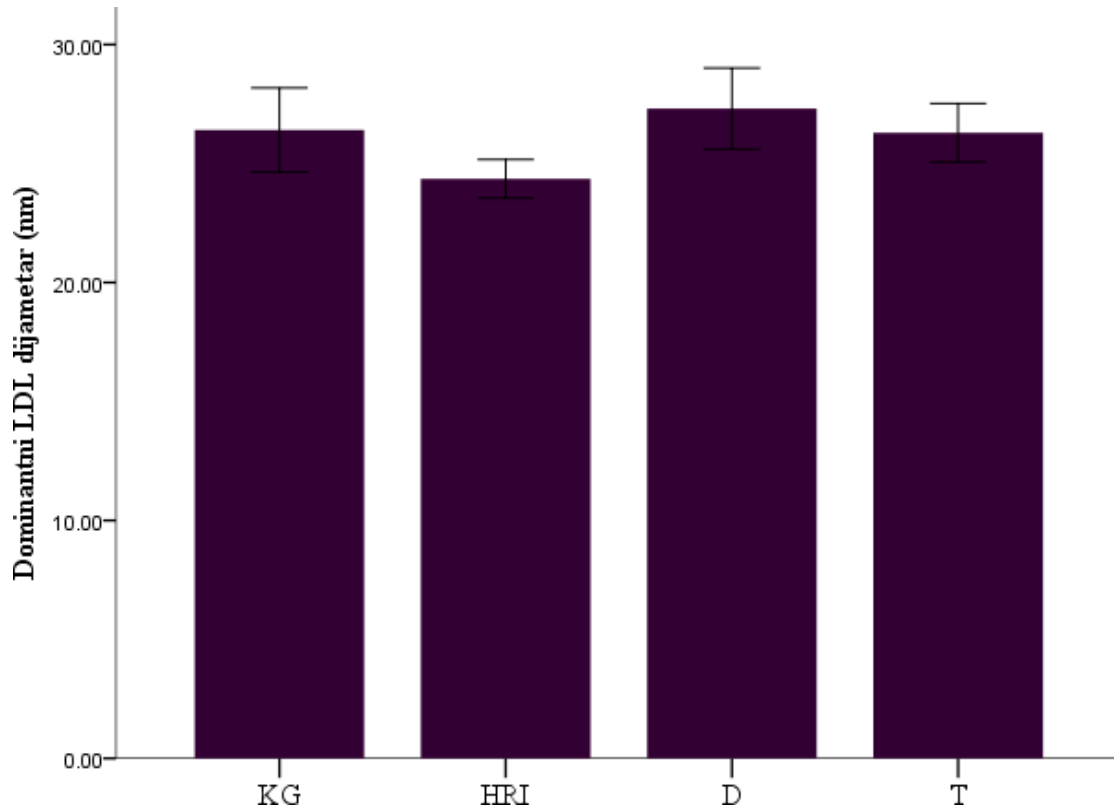
Međutim, univarijantna linerana regresiona analiza je pokazala da su jedino koncentracije TBKRS i AOPP značajno povezane sa AIP kod pacijenata nakon transplantacije bubrega. Kako ostali ispitivani parametri nisu pokazali značajnu povezanost u univarijantnoj analizi kod ove grupe pacijenata nije rađena multivarijantna linearna regresiona analiza. Rezultati su prikazani u tabeli 24.

Tabela 24. Linerana regersiona analiza za ispitivanje povezanosti AIP sa značajnim parametrima (univarijantna analiza)

	β	SE (β)	<i>P</i>	R ²	adjusted R ²
MPO ($\mu\text{g/L}$)	0,365	0,001	0,113	0,134	0,085
TBKRS ($\mu\text{mol/L}$)	0,462	0,190	<0,05	0,214	0,172
SH- grupe ($\mu\text{mol/min/L}$)	0,593	1,096	<0,05	0,351	0,311
AOPP ($\mu\text{mol/L}$)	0,003	0,007	0,992	0,001	0,056

4.5. Veličina i raspodela lipoproteinskih subfrakcija u ispitivanim grupama

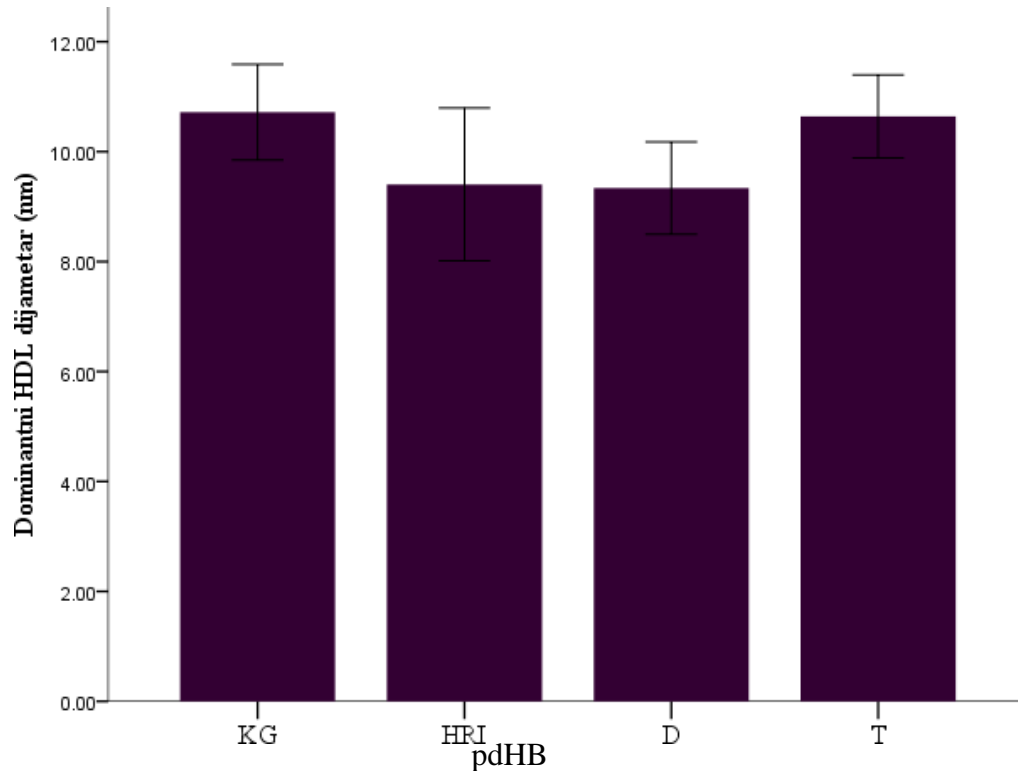
Ovaj deo istraživanja izveden je na uzorku koji je sastavljen od 50 zdravih ispitanika, 9 pacijenata u predijaliznom stadijumu HBB (pdHBB), 10 pacijenata na dijalizi (D) i 19 ispitanika nakon transplantacije bubrega (PT). Slike 22 i 23 prikazuju dominantne dijemetre LDL i HDL čestica u ispitivanim grupama.



Slika 22. Dominantni LDL dijametar u ispitivanim grupama

KG vs pdHBB: $p < 0,01$; KG vs D: $p = 0,364$; KG vs T: $p = 0,991$; pdHBB vs D: $p < 0,001$; pdHBB vs T: $p < 0,001$;
 D vs T: $p = 0,313$.

Kada je u pitanju dominantni LDL dijametar, naši podaci su pokazali da postoje statistički značajne razlike između ispitivanih grupa ($p < 0,001$, na osnovu ANOVA testa). U nastavku je primenjena *post hoc* analiza koja je pokazala da se dominantni LDL dijametar u kontrolnoj grupi razlikuje u odnosu na pacijente u pdHBB grupi ($p < 0,01$), dok nije bilo razlike između zdrave dece i dece na dijalizi i nakon transplantacije. Statistički značajne razlike nađene su i prilikom poređenja dominantnog LDL dijametra kod dece u predijaliznom stadijumu bolesti (pdHBB) u odnosu na grupu na dijaliznom tretmanu ($p < 0,001$) i grupu ispitanika sa transplantiranim bubregom ($p < 0,01$). Nije bilo statistički značajnih razlika između ostalih grupa.



Slika 23. Dominantni HDL dijametar u ispitivanim grupama

KG vs pdHBB: $p < 0,01$; KG vs D: $p < 0,001$; KG vs T: $p = 0,989$; pdHBB vs D: $p = 0,998$; pdHBB vs T: $p < 0,01$;

D vs T: $p < 0,01$.

Ista analiza je primenjena i na dominantni HDL dijametar (slika 23). Dobijeni rezultati pokazali su značajne razlike između ispitivanih grupa ($p < 0,001$). Dodatnom analizom utvrđeno je da zdrava deca imaju statistički značajno viši dijametar HDL čestica u odnosu na pdHBB i D grupu, ali nismo uočili značajne razlike u odnosu PT grupu. Slično tome, dominantni HDL dijametar kod dece nakon transplantacije bio je značajno veći u odnosu na druge dve grupe sa HBB, dok između pdHBB i D grupe nije bilo razlika.

U nastavku smo ispitivali relativne udele pojedinačnih LDL i HDL subfrakcija u četiri grupe ispitanika. Raspodela LDL subfrakcija je prikazana u tabeli 25. Relativni udele LDL subfrakcija grupisani su u 4 kategorije: LDL I, LDL II, LDL III i LDL IV. Dodatno, zbir relativnih udela LDL III i LDL IV subfrakcija predstavljao je male guste LDL čestice. ANOVA test dao je značajne razlike u nivou svih ispitivanih subfrakcija

LDL. Dodatnom *post hoc* analizom utvrđeno je da zdrava deca u kontrolnoj grupi imaju manje relativne udele velikih LDL I subfrakcija u odnosu na sve tri ostale grupe. Udeo LDL II bio je značajno veći kod zdrave dece u odnosu na decu u pdHBB i D grupama, a značajno manji od udela u posttransplantacionoj grupi. LDL III čestice bile su u kontrolnoj grupi značajno više nego u pdHBB i D grupi, ali se nisu razlikovale u odnosu na T grupu. Udeo malih gustih LDL bio je najveći u kontrolnoj grupi, a razlike su dostigle statističku značajnost u odnosu na grupu pacijenata na dijalizi i nakon transplantacije. Što se tiče raspodele LDL subfrakcija kod samih pacijenata sa HBB, uočeno je da pacijenti nakon transplantacije imaju povoljniji LDL profil u odnosu na pdHBB i D grupu, u smislu pomeranja ravnoteže ka većim česticama. Predijalizna HBB i D grupa se međusobno se razlikuju prema udelu LDL I i malih gustih LDL čestica.

Tabela 25. Procentualni udeli LDL subfrakcija u ispitivanim grupama

Parametar, jedinice	KG n= 50	pdHBB n= 9	D n= 10	T n= 19	P ¹
LDL I, %	18,9 ± 4,13	32,5 ± 5,09 a***	39,8 ± 4,30 a***; b**	22,2 ± 2,90 a*; b***; c***	<0,001
LDL II, %	24,7 ± 4,66	13,1 ± 4,72 a***	13,1 ± 2,03 a***	28,7 ± 2,14 a**; b***; c***	<0,001
LDL III, %	23,4 ± 4,82	16,8 ± 2,40 a***	15,4 ± 2,25 a***	21,1 ± 2,62 b*; c**	<0,001
LDL IV, %	33,0 ± 7,32	37,7 ± 2,78	31,7 ± 5,06	28,0 ± 3,50 a**; b***	<0,001
male, guste LDL, %	56,4 ± 6,95	54,5 ± 2,91	47,1 ± 4,58 a***; b*	49,1 ± 3,94 a***	<0,001

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije.

¹ Na osnovu rezultata ANOVA testa

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Tukey' s *post hoc* test).

^a statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu grupu (Tukey' s *post hoc* test).

^b statistički značajno različito u odnosu na pdHBB grupu (Tukey' s *post hoc* test).

^c statistički značajno različito u odnosu na D grupu (Tukey' s *post hoc* test).

Ispitivanje raspodele HDL subfrakcija je takođe pokazalo postojanje značajnih razlika između grupa ispitanika (tabela 26). Slično kao i u prethodnoj analizi, najznačajnije razlike uočene su između kontrolne grupe i pacijenata u grupi, dok je bilo manje razlika između zdrave dece i pacijenata sa transplantiranim bubregom. Dodatno, HDL profil pacijenata nakon transplantacije razlikovao se između dece sa transplantiranim bubregom, u odnosu na druge dve grupe sa HBB.

Tabela 26. Procentualni udeli HDL subfrakcija u ispitivanim grupama

Parametar, jedinice	KG n= 50	pdHBB n= 9	D n= 10	T n= 19	P ¹
HDL 2b, %	55,9 ± 7,52	37,1 ± 6,03 a***	40,2 ± 5,78 a***	49,0 ± 4,77 a**; b***; c**	<0,001
HDL 2a, %	20,4 ± 4,46	20,1 ± 2,52	22,0 ± 1,76	22,6 ± 2,13	0,083
HDL 3a, %	11,4 ± 3,37	16,4 ± 2,93 a***	17,0 ± 2,22 a***	13,8 ± 2,09 a*; c*	<0,001
HDL 3b, %	5,3 ± 2,18	10,4 ± 2,57 a***	10,3 ± 2,01 a***	7,4 ± 1,51 a**; b**, c**	<0,001
HDL 3c, %	7,0 ± 3,18	16,0 ± 9,16 a***	10,5 ± 2,57 b*	7,1 ± 1,53 b***	<0,001

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije.

¹ Na osnovu rezultata ANOVA testa

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Tukey' s *post hoc* test).

^a statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu grupu (Tukey' s *post hoc* test).

^b statistički značajno različito u odnosu na pdHBB grupu (Tukey' s *post hoc* test).

^c statistički značajno različito u odnosu na D grupu (Tukey' s *post hoc* test).

S obzirom na uočene razlike između podgrupa pacijenata sa HBB, specijalno u odnosu na status posle transplantacije, u daljem radu grupisali smo pacijente u predijaliznom i dijaliznom stadijumu u jednu grupu i uporedili ih sa ispitanicima kod kojih je izvršena transplantacija bubrega. Rezultati su prikazani u tabeli 27. Kao što se može uočiti, analiza procentualne zastupljenosti LDL subfrakcija dala je nekozistentne

rezultate, u smislu da je udeo i malih i velikih subfrakcija varirao između grupa. Ipak, nije bilo statistički značajne razlike ni u dominantnom LDL dijametri, ni u udelu malih, gustih LDL čestica između dece sa HBB i nakon transplantacije.

S druge strane, udeli malih HDL subfrakcija bili su značajno viši, a udeo velikih HDL 2b čestica i dominantni HDL dijametar značajno niži kod pacijenata sa HBB u odnosu na ispitanike sa transplantiranim bubregom.

Tabela 27. Karakteristike LDL i HDL subfrakcija kod dece sa HBB i nakon transplantacije

Parametar, jedinice	HBB n= 19	T n= 19	P ¹
LDL dijametar, nm	26,0 ± 1,96	26,2 ± 1,30	0,636
LDL I, %	36,1 ± 5,93	22,2 ± 2,90	< 0,001
LDL II, %	13,1 ± 3,53	28,7 ± 2,14	< 0,001
LDL III, %	16,1 ± 2,37	21,1 ± 2,62	< 0,001
LDL IV, %	34,7 ± 5,02	28,0 ± 3,50	< 0,001
Male, guste LDL, %	50,6 ± 5,41	49,4 ± 4,10	0,488
HDL dijametar, nm	9,5 ± 1,04	10,6 ± 0,80	< 0,01
HDL 2b, %	39,3 ± 5,43	48,6 ± 4,85	< 0,001
HDL 2a, %	21,3 ± 2,13	22,6 ± 2,28	0,077
HDL 3a, %	16,8 ± 2,60	14,0 ± 2,19	< 0,001
HDL 3b, %	10,1 ± 2,13	7,5 ± 1,53	< 0,001
HDL 3c, %	12,6 ± 6,52	7,2 ± 1,49	< 0,01

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije.

¹ Na osnovu rezultata ANOVA testa

4.5.1. Korelacije karakteristika lipoproteinskih subfrakcija sa antropometrijskim parametrima i markerima lipidnog statusa u ispitivanim grupama

U nastavku je ispitano postojanje značajnih korelacija između analiziranih rutinskih antropometrijskih i laboratorijskih parametara sa karakteristikama lipoproteinskih subfrakcija u sve četiri grupe učesnika u studiji.

U tabeli 28. prikazane su korelacije između karakteristika LDL i HDL čestica i parametara antropometrijskog i rutinskog lipidnog statusa u kontrolnoj grupi zdravih ispitanika. Godine starosti ispitanika bile su u značajnoj negativnoj korelaciji sa udelom LDL III i HDL 3a subfrakcija. Očekivano, našli smo pozitivnu korelaciju između ITM i obima kukova sa relativnim udelom LDL IV. Koncentracije UH i TG nisu značajno korelirali sa karakteristikama LDL i HDL subfrakcija. Koncentracija LDL-h negativno je korelirala sa relativnim udelom LDL III subfrakcija. Koncentracija HDL-h bila je u pozitivnoj korelaciji sa relativnim udelima HDL 3a i 3b, a u negativnoj korelaciji sa zastupljenošću HDL 2b. Koncentracija ApoA1 je pozitivno korelirala sa udelom LDL II, a negativno sa udelom HDL 3b.

Ista analiza sprovedena je kod pacijenata sa bubrežnim bolestima (tabela 29). Zbog male veličine uzorka u grupama pdHBB i D i mogućnosti dobijanja nepouzdanih rezultata, grupisali smo sve pacijente u ove dve kategorije u jednu zajedničku grupu. Dobijeni rezultati su pokazali korelaciju uzrasta ispitanika sa dominantnim dijametrom LDL čestica. S druge strane, ITM bio je u pozitivnoj korelaciji sa udelom LDL II subfrakcija, a u negativnoj korelaciji sa udelom LDL I subfrakcija. Obim struka je takođe bio u negativnoj korelaciji sa relativnim udelom LDL I subfrakcija, a obim kukova u negativnoj korelaciji sa dominantnim LDL dijametrom i udelom LDL I čestica. Kada su u pitanju parametri lipidnog statusa, UH nije bio u značajnoj korelacije ni sa jednom od ispitivanih karakteristika LDL i HDL čestica, dok su TG pozitivno korelirali sa relativnim udelom HDL 2a, a negativno sa relativnim udelom HDL 3c čestica. Koncentracija LDL-h i HDL-h nisu pokazivali značajne korelacije sa karakteristikama LDL i HDL subfrakcija. Kada su u pitanju apolipoproteini, uočena je pozitivna korelacija Apo B sa relativnim udelom malih gustih HDL 3c čestica.

Tabela 28. Korelacije antropometrijskih parametara i markera lipidnog statusa sa karakteristikama LDL i HDL subfrakcija u kontrolnoj grupi

Parametar, jedinice	Uzrast god	ITM, kg/m ²	Obim strukac m	Obim kuka cm	UH mmol/L	TG mmol/L	LDL-h mmol/L	HDL-h mmol/L	ApoA1 g/L	apo B g/L
LDL dijametar, nm	0,258	0,107	0,098	0,083	0,095	-0,116	0,148	-0,010	-0,060	-0,087
LDL I, %	-0,042	-0,126	-0,077	-0,068	-0,008	-0,127	-0,012	0,087	-0,220	0,110
LDL II, %	-0,208	-0,134	-0,026	-0,150	0,236	0,109	0,283	-0,055	0,338 *	-0,043
LDL III, %	-0,362 *	-0,091	-0,079	-0,238	-0,335	-0,159	-0,408 *	0,094	0,151	0,027
LDL IV, %	0,345	0,330 *	0,113	0,356 *	0,075	0,108	0,095	-0,076	-0,208	0,072
Male, guste LDL, %	0,146	0,164	0,064	0,141	-0,153	0,003	-0,183	-0,015	-0,114	0,095
HDL dijametar, nm	0,167	0,106	0,062	0,024	-0,066	-0,154	-0,054	0,027	-0,052	-0,080
HDL 2b, %	0,282	0,065	0,066	0,055	0,080	0,035	0,204	-0,310 *	0,291	-0,084
HDL 2a, %	0,132	-0,047	-0,069	0,050	-0,183	-0,212	-0,136	0,102	0,066	-0,025
HDL 3a, %	-0,421 **	-0,158	-0,143	-0,184	0,072	-0,011	-0,062	0,418 **	-0,142	0,035
HDL 3b, %	-0,214	-0,009	0,037	-0,020	-0,035	0,052	-0,195	0,381 *	-0,394 *	0,071
HDL 3c, %	-0,151	0,037	0,053	-0,006	-0,017	0,135	-0,111	0,157	-0,309	0,128

Prema Pearson-ovoj korelacionoj analizi.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Tabela 29. Korelacije antropometrijskih parametara i markera lipidnog statusa sa karakteristikama LDL i HDL subfrakcija u grupi pacijenata sa HBB u predijaliznom i dijaliznom stadijumu

Parametar, jedinice	Uzrast, god	ITM, kg/m ²	Obim strukacm	Obim kuka cm	UH mmol/L	TG mmol/L	LDL-h mmol/L	HDL-h mmol/L	ApoA 1 g/L	apo B g/L
LDL dijametar, nm	-0,465 *	-0,331	-0,450	-0,598 **	0,080	0,391	-0,004	-0,118	-0,151	-0,017
LDL I, %	-0,041	-0,551 *	-0,489 *	-0,550 *	-0,068	0,221	-0,088	-0,097	-0,224	-0,181
LDL II, %	-0,574	0,814 **	0,513	0,341	0,519	0,243	0,513	-0,220	-0,200	0,500
LDL III, %	-0,382	0,256	-0,208	-0,167	0,047	0,323	-0,264	0,215	0,171	-0,032
LDL IV, %	0,299	0,082	0,283	0,399	0,011	-0,267	0,072	0,085	0,223	0,101
Male, guste LDL, %	0,339	-0,167	0,041	0,217	-0,310	0,582	-0,585	-0,193	-0,065	-0,104
HDL dijametar, nm	0,328	0,019	0,075	0,135	0,118	0,248	0,030	-0,187	0,084	0,277
HDL 2b, %	0,341	0,100	0,205	0,235	0,013	0,389	-0,083	-0,285	-0,090	0,090
HDL 2a, %	-0,146	0,079	0,224	0,067	0,139	0,469 *	0,130	-0,337	0,084	0,235
HDL 3a, %	0,023	-0,209	-0,202	-0,062	0,056	0,102	0,134	-0,187	0,178	-0,345
HDL 3b, %	-0,211	0,115	-0,097	-0,143	0,204	-0,024	0,248	0,033	0,094	0,164
HDL 3c, %	-0,180	-0,063	-0,140	-0,146	-0,145	-0,504 *	-0,104	0,402	-0,024	0,505 *

Prema Pearson-ovoj korelacionoj analizi.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Na kraju, korelaciona analiza izvedena je i u grupi ispitanika sa transplantiranim bubregom. Rezultati su prikazani u tabeli 30.

Tabela 30. Korelacije antropometrijskih parametara i markera lipidnog statusa sa karakteristikama LDL i HDL subfrakcija u grupi pacijenata sa transplantiranim bubregom

Parametar, jedinice	Uzrast god	ITM, kg/m ²	Obim strukacm	Obim kuka cm	UH mmol/L	TG mmol/L	LDL-h mmol/L	HDL-h mmol/L	ApoA 1 g/L	apo B g/L
LDL dijametar, nm	0,048	0,456 *	0,317	0,265	0,026	-0,021	0,319	-0,469 *	-0,507 *	0,088
LDL I, %	0,129	0,404	0,180	0,069	0,011	-0,237	0,315	-0,325	-0,369	0,090
LDL II, %	-0,068	0,423	0,472 *	0,397	0,293	0,326	0,336	-0,203	-0,147	0,334
LDL III, %	0,113	-0,265	-0,133	0,038	-0,125	0,259	-0,173	-0,179	-0,106	-0,053
LDL IV, %	-0,147	-0,392	-0,334	-0,324	-0,095	-0,196	-0,336	0,525 *	0,473 *	-0,239
Male, guste LDL, %	-0,059	-0,530 *	-0,390	-0,268	-0,167	-0,002	-0,414	0,349	0,351	-0,248
HDL dijametar, nm	-0,261	-0,082	-0,417	-0,559 **	0,048	-0,535 *	0,058	0,409	0,350	-0,105
HDL 2b, %	-0,398	-0,283	-0,248	-0,192	0,082	-0,291	-0,161	0,690 **	0,588 **	-0,232
HDL 2a, %	0,229	0,350	0,247	0,292	0,002	0,082	0,235	-0,455 *	-0,381	0,157
HDL 3a, %	0,229	0,095	0,131	0,179	-0,085	0,362	0,045	-0,534 *	-0,455 *	0,161
HDL 3b, %	0,491 *	0,067	0,033	0,034	-0,152	0,252	0,058	-0,596 **	-0,613 **	0,171
HDL 3c, %	0,166	0,238	0,260	-0,050	0,065	0,069	0,133	-0,225	-0,116	0,180

Prema Pearson-ovoj korelacionoj analizi.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Kao što se vidi iz prikazanih rezultata, uzrast pacijenata sa transplantiranim bubregom je pozitivno korelirao sa relativnim udelom HDL 3b subfrakcija, dok je ITM pozitivno korelirao sa LDL dijametrom, a negativno sa relativnim udelom malih, gustih LDL čestica. Obim struka bo je u pozitivnoj korelaciji sa udelom LDL II subfrakcija, a obim kukova u negativnoj sa dominantnim HDL dijametrom. Koncentracija UH nije bila u značajnoj korelaciji ni sa jednim od ispitivanih odlika LDL i HDL čestica. Koncentracija TG je negativno korelirala sa dominantnim HDL dijametrom, dok nije utvrđeno postojanje značajnih korelacija između koncentracije LDL-h i drugih ispitivanih markera. Koncentracija HDL-h bila je u pozitivnoj korelaciji sa relativnim udelom HDL 2b i LDL IV subfrakcija, a u negativnoj sa dominantnim LDL dijametrom i relativnim udelima HDL 2a, 3a i 3b subfrakcija. Nivo ApoA1 bio je u negativnoj korelaciji sa dominantnim LDL dijametrom i relativnim udelima HDL 3a i 3b subfrakcija, a u pozitivnom odnosu sa relativnim udelom LDL IV i HDL 2b.

4.5.2. Korelacije karakteristika lipoproteinskih subfrakcija sa parametrima oksidativnog stresa u ispitivanim grupama

Na isti način kao i u prethodnoj analizi ispitana je korelacija karakteristika LDL i HDL čestica sa parametrima oksidativnog stresa. U tabeli 31. su prikazani rezultati korelacione analize za zdrave ispitanike. Dobijeni rezultati pokazali su značajnu pozitivnu korelaciju paraoksonazne aktivnosti PON1 sa relativnim udelom LDL III subfrakcija i negativnu korelaciju diazoksonazne aktivnosti PON1 sa udelom LDL I čestica. SH grupe su pozitivno korelirale sa HDL 2b i 3a subfrakcijama, a negativno sa udelom HDL 3b čestica. Aktivnost SOD je korelirala pozitivno sa relativnim udelom LDL IV subfrakcija, a superoksidni anjon negativno sa relativnim udelom HDL 2a. Koncentracija TBKRS je bila u pozitivnoj korelaciji sa relativnim udelom sa LDL III i HDL 3a subfrakcija. Koncentracija MPO je negativno korelirala sa relativnim udelima HDL 3a i HDL 3b subfrakcija u ovoj grupi ispitanika.

Analogna analiza je izvršena i u grupi pacijenata sa HBB u predijaliznom i dijaliznom statusu bolesti. Rezultati su prikazani u tabeli 32. PON1 paraoksonazna

aktivnost bila je u negativnoj korelaciji sa relativnim udelom HDL 2a subfrakcija, a u pozitivnoj sa udelom HDL 3c subfrakcija. Aktivnost SOD je negativno korelirala sa udelom LDL IV subfrakcija. Koncentracija TBKRS je bila u pozitivnoj korelaciji sa dominantnim LDL dijametrom i relativnim udelom HDL 2b subfrakcija, a u negativnoj sa relativnim udelom HDL 3c čestica. Na kraju, koncentracija MPO negativno korelirala sa dominantnim LDL dijametrom i relativnim udelom LDL I subfrakcija, a pozitivno sa relativnim udelom HDL 3b subfrakcija.

Finalno, ispitivanje povezanosti karakteristika LDL i HDL subfrakcija i parametara oksidativnog stresa izvršeno je i u grupi pacijenata sa transplantiranim bubregom. Rezultati su prikazani u tabeli 33. Na osnovu dobijenih rezultata uočava se pozitivna korelacija PON1 paraoksonazne aktivnosti sa relativnim udelom HDL 2a subfrakcija. SH grupe su negativno korelirale sa dominantnim HDL dijametrom i udelom HDL 2b čestica, a pozitivno sa relativnim udelima HDL 3a i 3b čestica. Od ostalih ispitivanih parametara, samo je koncentracija MPO bila u pozitivnoj korelaciji sa relativnim udelom subfrakcije HDL 3a.

Tabela 31. Korelacije parametara oksidativnog stresa sa karakteristikama LDL i HDL subfrakcija u kontrolnoj grupi

Parametar, jedinice	PON1 (POase) IU/L	PON1 (Doase) IU/L	SH grupe g/L	SOD kIU/L	O ₂ ⁻ μmol/min /L	TBKRS μmol/L	AOPP μmol/L	MPO μg/L
LDL dijametar, nm	0,058	-0,095	0,005	-0,243	-0,093	0,029	-0,107	0,100
LDL I, %	-0,166	-0,380 *	-0,159	-0,113	-0,284	-0,120	0,147	-0,069
LDL II, %	-0,084	-0,080	-0,074	-0,316	-0,010	-0,052	0,161	-0,168
LDL III, %	0,333 *	-0,037	-0,169	-0,119	0,001	0,388 *	0,151	-0,037
LDL IV, %	0,036	0,291	0,184	0,350 *	0,166	-0,151	-0,262	0,162
Male, guste LDL, %	0,182	0,285	0,099	0,307	0,175	0,105	-0,200	0,148
HDL dijametar, nm	-0,113	-0,294	0,085	-0,242	0,097	0,021	-0,331	0,220
HDL 2b, %	0,167	0,121	0,354 *	-0,124	0,287	-0,294	-0,097	0,323
HDL 2a, %	0,078	0,089	-0,156	0,258	-0,385 *	-0,028	-0,020	0,078
HDL 3a, %	-0,143	-0,274	0,426 *	-0,064	-0,231	0,339 *	0,156	-0,421 *
HDL 3b, %	-0,236	-0,185	-0,390 *	0,058	-0,139	0,395 *	0,250	-0,445 *
HDL 3c, %	-0,256	-0,017	0,060	0,122	0,160	0,130	-0,044	-0,121

Prema Pearson-ovoj korelacionoj analizi.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Tabela 32. Korelacije parametara oksidativnog stresa sa karakteristikama LDL i HDL subfrakcija u grupi pacijenata sa HBB u predijaliznom i dijaliznom stadijumu

Parametar, jedinice	PON1 (POase) IU/L	PON1 (Doase) IU/L	SH grupe g/L	SOD kIU/L	O ₂ ⁻ μmol/min/L	TBKRS μmol/L	AOPP μmol/L	MPO μg/L
LDL dijamet ar, nm	-0,247	0,336	-0,075	0,234	0,294	0,454 *	0,230	-0,453 *
LDL I, %	-0,202	0,148	-0,215	0,384	0,002	0,296	0,192	-0,540 *
LDL II, %	0,018	0,223	0,505	0,179	0,065	0,427	-0,155	0,423
LDL III, %	0,032	-0,076	0,069	0,042	-0,268	0,240	0,104	0,508
LDL IV, %	0,145	-0,099	-0,032	-0,480 *	0,239	-0,385	-0,280	0,096
Male, guste LDL, %	-0,453	-0,320	-0,535	-0,219	-0,256	0,133	0,084	-0,024
HDL dijamet ar, nm	-0,353	0,124	-0,007	-0,309	-0,078	0,165	-0,119	-0,285
HDL 2b, %	-0,433	0,048	-0,185	0,073	0,063	0,426	-0,002	-0,334
HDL 2a, %	-0,693 **	0,260	-0,226	0,271	-0,002	0,547 *	-0,041	-0,282
HDL 3a, %	-0,082	-0,134	-0,312	0,101	-0,059	0,157	0,199	-0,028
HDL 3b, %	-0,303	0,058	-0,191	-0,198	0,131	0,071	0,043	0,563 *
HDL 3c, %	0,712 **	-0,096	0,380	-0,120	-0,071	-0,611 **	-0,064	0,197

Prema Pearson-ovoj korelacionoj analizi.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Tabela 33. Korelacije parametara oksidativnog stresa sa karakteristikama LDL i HDL subfrakcija u grupi pacijenata sa transplantiranim bubregom

Parametar, jedinice	PON1 (POase) IU/L	PON1 (Doase) IU/L	SH grupe g/L	SOD kIU/L	O ₂ ⁻ μmol/min /L	TBKRS μmol/L	AOPP μmol/L	MPO μg/L
LDL dijametar, nm	0,275	-0,253	0,262	-0,409	-0,106	0,204	-0,185	0,073
LDL I, %	0,247	-0,126	0,104	-0,213	-0,152	0,002	-0,018	-0,178
LDL II, %	0,037	0,026	-0,040	-0,181	0,237	0,387	-0,137	-0,214
LDL III, %	-0,059	0,072	0,319	0,173	-0,086	-0,075	0,218	0,282
LDL IV, %	-0,183	0,034	-0,298	0,157	0,045	-0,182	-0,064	0,070
Male, guste LDL, %	-0,202	0,078	-0,053	0,255	-0,017	-0,212	0,089	0,249
HDL dijametar, nm	-0,132	0,223	-0,599 **	-0,023	-0,128	-0,278	-0,085	-0,340
HDL 2b, %	-0,250	0,115	-0,597 **	0,109	-0,347	-0,175	-0,097	-0,330
HDL 2a, %	0,432 *	0,192	0,305	-0,037	0,057	0,150	0,099	0,170
HDL 3a, %	-0,041	-0,259	0,589 **	-0,075	0,215	0,259	0,146	0,529 *
HDL 3b, %	0,092	-0,269	0,521 *	-0,166	0,339	0,173	0,386	0,183
HDL 3c, %	0,125	-0,041	0,193	-0,015	0,421	-0,205	-0,398	-0,118

Prema Pearson-ovoj korelacionoj analizi.

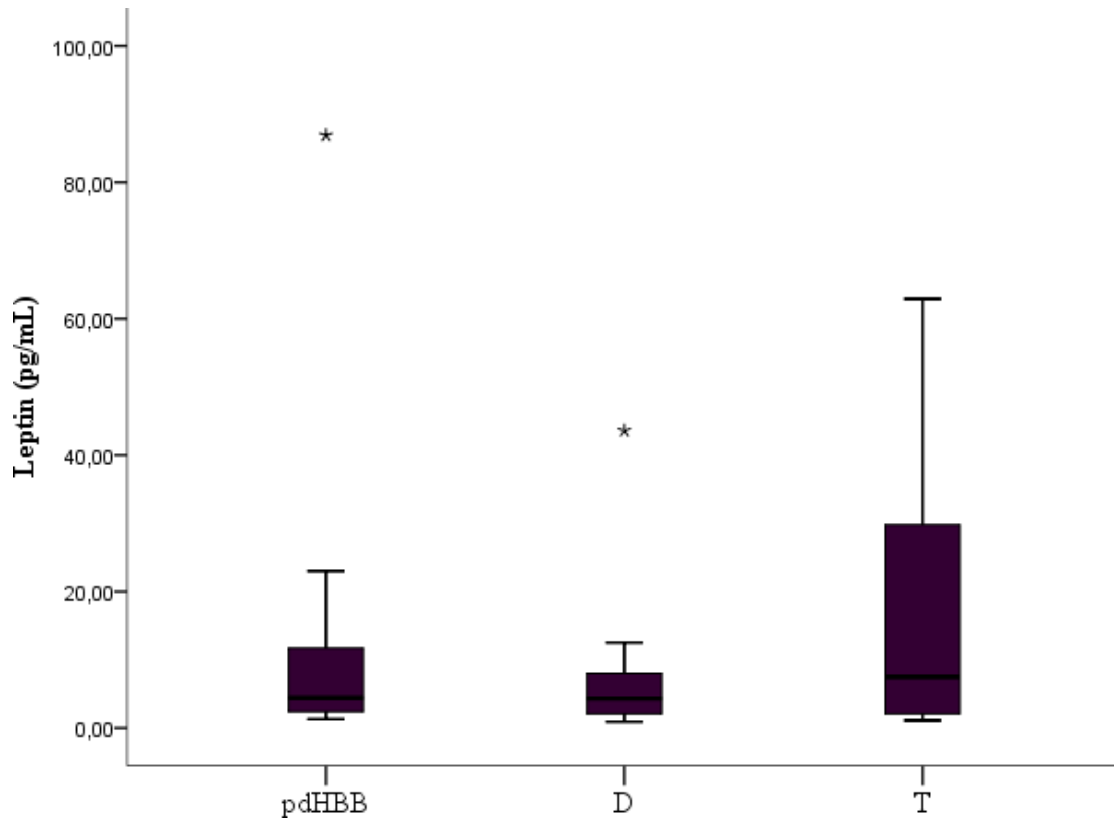
* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

4.6. Povezanost Lp(a) sa karakteristikama lipoproteinskih subfrakcija u ispitivanim grupama

Da bismo ispitali povezanost koncentracije Lp(a) sa karakteristikama lipoproteinskih subfrakcija primenili smo ponovo korelacionu analizu u tri grupe: prva grupa bila je sastavljena od zdravih ispitanika, drugu su činili pacijenti sa HBB u predijaliznom i dijaliznom stadijumu, a treću grupu činili su pacijenti sa transplantiranim bubregom. Međutim, ni u jednoj od grupa nisu nađene značajne korelacije između Lp(a) i bilo kojeg od ispitivanih markera strukture LDL i HDL čestica (podaci nisu prikazani).

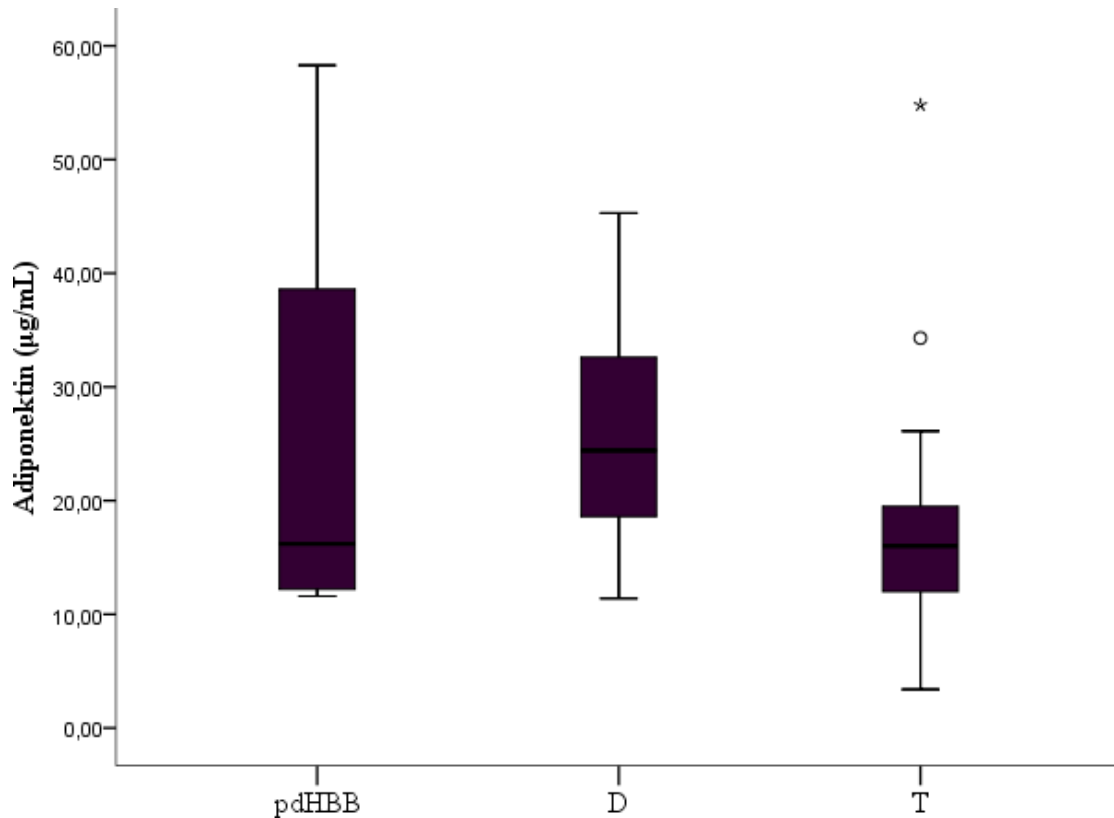
4.7. Leptin i adiponektin kod pacijenata sa HBB

U grupi pacijenata sa HBB i nakon transplantacije određene su koncentracije leptina i adiponektina. Statistička analiza je pokazala da nema značajnih razlika u koncentraciji leptina između pacijenata sa HBB u predijaliznom stadijumu, pacijenata na dijalizi i pacijenata nakon transplantacije bubrega ($p=0,534$, prema Kruskal-Wallis testu), iako smo uočili trend ka višim vrednostima kod dece sa transplantiranim bubregom (slika 24).



Slika 24. Koncentracije leptina kod pacijenata sa HBB u predijaliznom i dijaliznom stadijumu i nakon transplantacije bubrega

Slična analiza je izvršena i kada su u pitanju koncentracije adiponektina kod naših ispitanika. Slično kao i kada je leptin u pitanju, nisu nađene statistički značajne razlike između ispitivanih grupa ($p = 0,158$, prema Kruskal-Wallis testu), sa trendom ka nižim vrednostima kod dece nakon transplantacije. Podaci su prikazani na slici 25.



Slika 25. Koncentracije adiponektina kod pacijenata sa HBB u predijaliznom i dijaliznom stadijumu i nakon transplantacije bubrega

U nastavku smo ispitivali korelacije leptina i adiponektina sa analiziranim karakteristikama lipoproteinskih subfrakcija. Podaci su prikazani u tabelama 34. i 35. Od svih ispitivanih parametara, koncentracija leptina je jedino bila u pozitivnoj korelaciji sa dominantnim LDL dijametrom i to u PT grupi. S druge strane, uočena je negativna korelacija adiponektina sa relativnim udelom LDL II čestica i pozitivna korelacija istog parametrsa sa procentualnom zastupljenošću malih gustih LDL čestica, ali samo kod pacijenata sa HBB u predijaliznom i dijaliznom stadijumu.

Tabela 34. Korelacije nivoa leptina sa ispitivanim karakteristikama LDL i HDL subfrakcija kod pacijenata sa HBB i nakon transplantacije

	Leptin (pg/mL)	
	pdHBB+D	PT
LDL dijametar, nm	-0,309	0,583**
LDL I, %	-0,329	0,310
LDL II, %	0,333	0,116
LDL III, %	0,042	-0,271
LDL IV, %	0,117	-0,286
Male, guste LDL, %	0,115	-0,328
HDL dijametar, nm	0,059	-0,063
HDL 2b, %	0,129	-0,018
HDL 2a, %	-0,105	0,317
HDL 3a, %	-0,184	-0,101
HDL 3b, %	-0,115	-0,315
HDL 3c, %	-0,157	-0,141

Prema Spearman-ovoj korelacionoj analizi.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Tabela 35. Korelacije nivoa adiponektina sa ispitivanim karakteristikama LDL i HDL subfrakcija kod pacijenata sa HBB i nakon transplantacije

	Adiponektin (µg/mL)	
	pdHBB+D	PT
LDL dijametar, nm	0,183	0,150
LDL I, %	0,166	0,299
LDL II, %	-0,783*	0,106
LDL III, %	-0,167	-0,348
LDL IV, %	0,261	0,160
Male, guste LDL, %	0,517*	-0,240
HDL dijametar, nm	0,273	0,359
HDL 2b, %	0,162	0,031
HDL 2a, %	0,096	-0,262
HDL 3a, %	0,193	0,103
HDL 3b, %	-0,036	0,138
HDL 3c, %	-0,133	0,036

Prema Spearman-ovoj korelacionoj analizi.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

4.8. Debljina intime-medije karotidne arterije (cIMT) kod pacijenata sa HBB i nakon transplantacije

U grupi pacijenata je određena cIMT u nivou zajedničke karotidne arterije (ACC) i unutrašnje karotidne arterije (ACI). Dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 36. Pacijenti na dijaliznom tretmanu imali su značajno veće cITM u nivou ACC u odnosu na ostale ispitivane grupe, dok nije bilo razlika u dobijenim vrednostima za cIMT u nivou ACI.

Tabela 36. cIMT kod pacijenata sa HBB u predijaliznom i dijaliznom stadijumu i nakon transplantacije bubrega

Parametar, jedinice	pdHBB n= 9	D n= 10	T n= 19	P ¹
cIMT (ACC), mm	0,30 (0,25-0,35)	0,50 (0,40-0,55) ^{a*}	0,40 (0,30-0,50)	< 0,05
cIMT (ACI), mm	0,30 (0,20-0,40)	0,40 (0,30-0,50)	0,40 (0,30-0,50)	0,116

Rezultati su prikazani kao medijane (interkvartilni rasponi).

¹ Na osnovu rezultata Kruskal-Wallis testa

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Mann-Whitney' s *post hoc* test).

^a statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu grupu (Mann-Whitney' s *post hoc* test).

^b statistički značajno različito u odnosu na pdHBB grupu (Mann-Whitney' s *post hoc* test).

^c statistički značajno različito u odnosu na D grupu (Mann-Whitney' s *post hoc* test).

U nastavku su ispitane korelacije cIMT na nivou ACC sa karakteristikama LDL i HDL subfrakcija u prethodno formiranim HBB i PT grupama. Dobijeni rezultati se nalaze u tabeli 37. Uočena je pozitivna korelacija relativnog udela LDL I subfrakcija sa cIMT (ACC) u grupi pacijenata sa predijaliznim i dijaliznim statusom HBB, dok je u grupi pacijenata sa transplantiranim bubregom uočena negativna korelacija između cIMT (ACC) i dominantnog HDL dijametra, kao i pozitivna korelacija cIMT (ACC) sa relativnim udelom HDL 3b subfrakcija.

Tabela 37. Korelacije vrednosti cIMT (ACC) sa ispitivanim karakteristikama LDL i HDL subfrakcija kod pacijenata sa HBB i nakon transplantacije

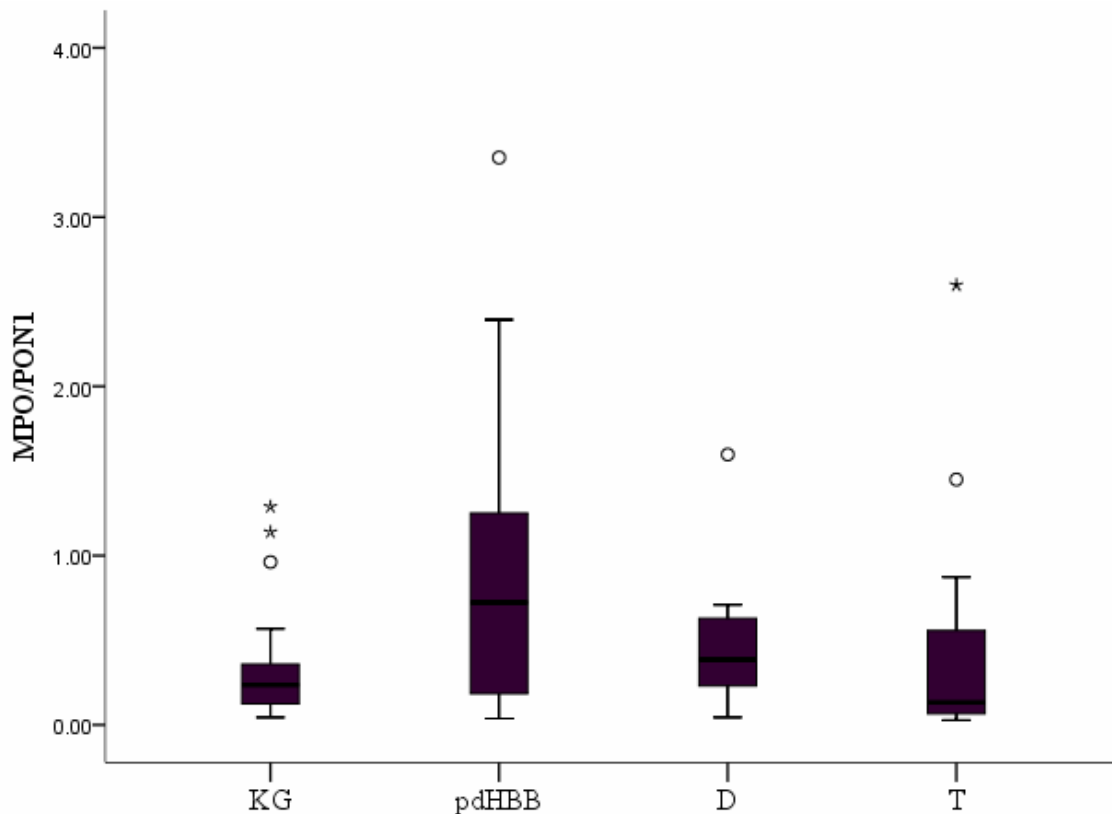
	cIMT (ACC), mm	
	HBB	PT
LDL dijametar, nm	0,413	-0,027
LDL I, %	0,586*	-0,219
LDL II, %	-0,401	0,061
LDL III, %	-0,267	-0,006
LDL IV, %	-0,389	0,009
Male, guste LDL, %	-0,134	-0,017
HDL dijametar, nm	-0,384	-0,557*
HDL 2b, %	0,309	-0,291
HDL 2a, %	-0,134	-0,216
HDL 3a, %	0,218	0,395
HDL 3b, %	-0,110	0,531*
HDL 3c, %	-0,234	0,144

Prema Spearman-ovoj korelacionoj analizi.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

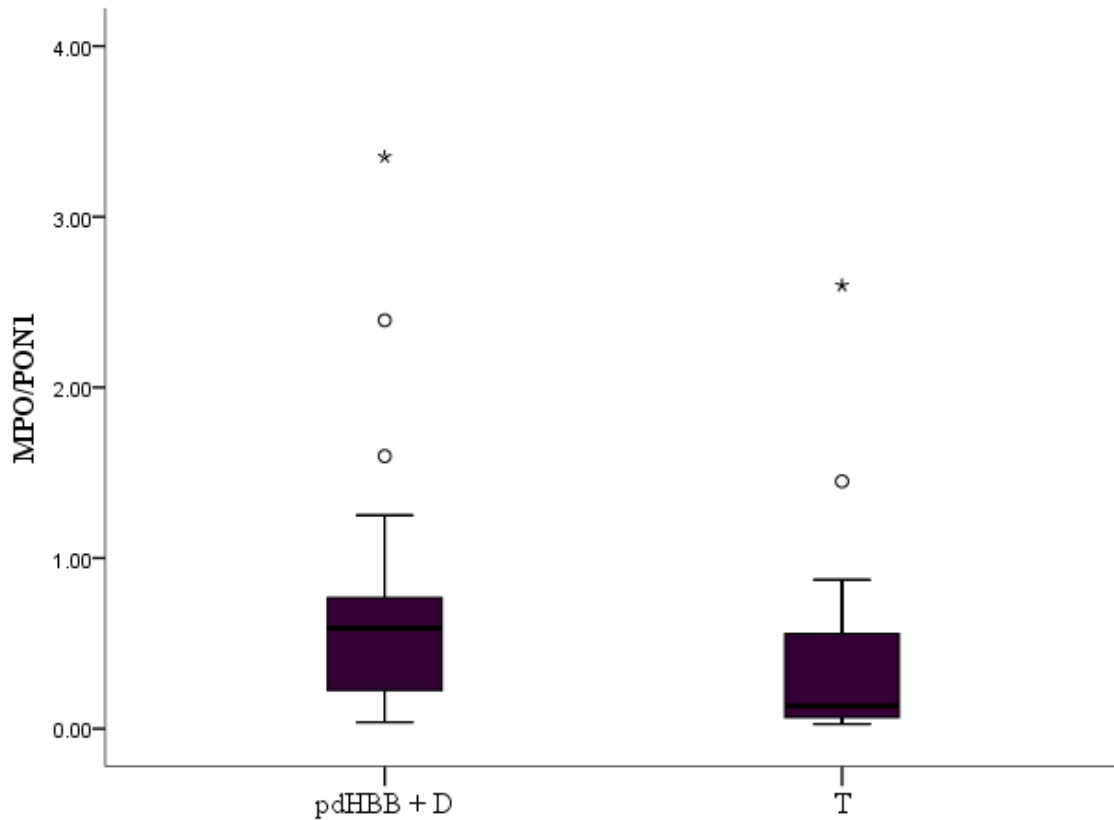
4.9. Odnos MPO/PON1 u ispitivanim grupama

S obzirom na ulogu MPO i PON1 u nastanku i progresiji HBB u nastavku smo analizirali razlike u odnosu MPO/PON1 kod učesnika u studiji. Imajući u vidu karakteristike raspodele ovog parametra, analiza je vršena upotrebom Kruskal-Wallis testa. Dobijeni rezultati prikazani su na slici 26. Iako rezultati testa nisu pokazali postojanje statistički značajnih razlika, ipak se uočava trend ka višim vrednostima MPO/PON1 odnosa u grupama pacijenata sa HBB, bilo u predijaliznom ili dijaliznom stadijumu u odnosu na zdravu decu ili decu nakon transplantacije bubrega, uz postizanje granične statističke značajnosti ($p = 0,067$).



Slika 26. Odnos MPO/PON1 u svim ispitivanim grupama

S obzirom da smo u ovom istraživanju primarno zainteresovani za razlike između pedijatrijskih pacijenata sa HBB i nakon transplantacije bubrega, u nastavku smo grupisali pacijente u pdHBB i D grupi u jednu celinu i uporedili MPO/PON1 odnos sa pacijentima nakon transplantacije (slika 27). Statistički značajna razlika postojala je između ove dve grupe u smislu da je vrednost odnosa MPO/PON1 bila značajno veća kod pacijenata sa HBB u predijaliznom i dijaliznom stadijumu ($p=0,019$, prema Mann-Whitney U-testu).



Slika 27. Razlike u odnosu MPO/PON1 između pacijenata sa HBB u predijaliznom i dijaliznom stadijumu i pacijenata sa transplantiranim bubregom

Nastavljajući ovo istraživanje, ispitali smo i korelacije između MPO/PON1 odnosa i karakteristika LDL i HDL subfrakcija (tabela 38). Analiza je odvojeno izvedena za grupu pdHBB + D i grupu T. Odnos MPO/PON1 nije bio u značajnoj korelaciji ni sa jednim od ispitivanih parametara vezanih za LDL subfrakcije. Međutim, ovaj odnos je

bio u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa relativnim udelom HDL 3b u HBB grupi, te sa relativnim udelom HDL 3a u T grupi.

Tabela 38. Korelacije odnosa MPO/PON1 sa ispitivanim karakteristikama LDL i HDL subfrakcija kod pacijenata sa HBB i nakon transplantacije

	MPO/PON1	
	HBB	PT
LDL dijametar, nm	-0,386	-0,086
LDL I, %	-0,293	-0,059
LDL II, %	0,119	-0,023
LDL III, %	0,356	0,140
LDL IV, %	0,000	0,056
Male, guste LDL, %	0,258	0,081
HDL dijametar, nm	0,009	-0,247
HDL 2b, %	-0,068	-0,208
HDL 2a, %	-0,037	-0,024
HDL 3a, %	-0,112	0,475*
HDL 3b, %	0,486*	0,220
HDL 3c, %	-0,018	0,000

Prema Spearman-ovoj korelacionoj analizi.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Konačno, s obzirom na utvrđenu povezanost odnosa MPO/PON1 sa malim HDL subfrakcijama, ispitali smo nezavisne faktore uticaja na pojavu povećanih relativnih udela malih HDL 3 subfrakcija. Radi povećanja veličine uzorka, u ovoj analizi koristili smo objedinjenu grupu svih pacijenata sa HBB i nakon transplantacije. Povećanim udelom malih HDL 3 subfrakcija smatrali smo udeo veći od gornjeg kvartila raspodele ukupnog udela HDL 3a, 3b i 3c subfrakcija. Dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 39. Kao kovarijate u ovoj analizi korišćeni su parametri koji su u prethodnoj korelacionoj analizi sprovedenoj u objedinjenoj grupi ispitanika dovedeni u vezu sa relativnim udelima HDL 3 subfrakcija. Dobijeni rezultati su pokazali da povišen odnos MPO/PON1 predstavlja značajan nezavisan faktor rizika za pojavu malih HDL subfrakcija.

Tabela 39. Predviđanje udela malih HDL subfrakcija u ispitivanim grupama

Faktori rizika	Odds ratio (OR)	CI (OR)	p¹
MPO/PON1	5,033	(1,179-21,486)	0,029
TG (mmol/L)	0,463	(0,091-2,360)	0,354
Odnos struk/kuk	0,000	(0,000-54,891)	0,120
Adiponektin (µg/mL)	0,971	(0,864-1,091)	0,620
HDL-h (mmol/L)	0,457	(0,091-2,360)	0,690

¹Na osnovu rezultata multivarijantne logističke regresione analize

5. DISKUSIJA

HBB su složena patofiziološka stanja koja sa sobom nose visok rizik za razvoj kardiovaskularnih bolesti i kao takva predstavljaju jedan od vodećih zdravstvenih izazova u savremenom svetu. Brojne studije su pokazale da su HBB u pedijatrijskoj populaciji jedinstveni nozološki entitet, drugačijeg toka i progresije u odnosu na odrasle pacijente (35).

Kao što je već rečeno, etiološki uzročnici HBB u pedijatrijskoj populaciji su različiti, a bolest je kao i kod odraslih u početnim stadijumima asimptomatskog toka (6). Svi stadijumi HBB su povezani ne samo sa gubitkom bubrežne funkcije, već i sa povećanim rizikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti, skraćenim životnim vekom i smanjenim kvalitetom života. Faktori rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti kod dece i adolescenta sa HBB se poklapaju sa faktorima rizika kod odraslih pacijenata sa HBB, ali prilikom procene rizika uvek treba uzeti u obzir specifičnosti vezane za pedijatrijsku populaciju. Poslednjih decenija, osim tradicionalnih faktora rizika (gojaznost, dislipidemija, hipertenzija, sedentarni način života, pušenje) čiji se efekat meri rutinskim laboratorijskim testovima i pregledima radi prevencije kardiovaskularnih bolesti, javlja se potreba za ispitivanjem novih markera koji bi se uključivali u već postojeće algoritme za procenu rizika, i to pre svega markera koji predstavljaju molekularne medijatore procesa koji vode ka razvoju kardiovaskularnih bolesti (oštećenje endotela, insulinska rezistencija, oksidacija lipoproteinskih čestica). Cilj je identifikacija parametara koji bi na najbolji način kategorisali osobe sa rizikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti i usmerili ih ka preventivnim merama za sprečavanje nastanka bolesti. Rezultati većeg broja istraživanja su ukazali da upravo kombinacija hronične inflamacije i oksidativnog stresa može imati ključnu ulogu u razvoju kardiovaskularnih komplikacija kod pacijenta sa HBB, tako da su markeri inflamacije i oksidativno-stresnog statusa postali predmet intenzivnog proučavanja kod ovih pacijenata (35,40-42). Dosadašnje preporuke o evaluaciji rizika od kardiovaskularnih bolesti kod dece i adolescenata u različitim stadijumima HBB su bazirane uglavnom na kliničkom iskustvu i podacima koji su dobijeni u populaciji odraslih pacijenata. Iz tog razloga, glavni ciljevi ovog istraživanja su bili usmereni na

ispitivanje povezanosti parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod dece i adolescenata u različitim stadijumima HBB sa parametrima lipidnog profila čiji se izmenjen status, tradicionalno povezuje sa rizikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti.

HBB se karakterišu asimptomatskim početkom bolesti i postepenom progresijom bolesti do krajnjeg stadijuma, ESRD (6). Terapija koja se primenjuje kod ovih pacijenata u terminalnoj fazi bolesti je dijaliza ili transplantacija bubrega. Naučni i tehnološki razvoj doveo je do proizvodnje biokompatibilnih sintetičkih membrana i specifičnih dijalizatora malih dimenzija koji su namenjeni pedijatrijskim pacijentima. Međutim, uprkos tehnološkom napredovanju i smanjivanju broja sati koje deca provedu na dijalizi, rezultati studija pokazuju da je pojava komorbiditeta, kao i mortalitet dece koja su na višegodišnjoj terapiji dijalizom veći u odnosu na decu kojima je transplantiran bubreg (124). Ti rezultati ukazuju na činjenicu da dijalizu treba posmatrati samo kao privremenu terapijsku metodu kod dece u ESRD i da je krajnji terapijski cilj transplantacija bubrega koja daje najbolje mogućnosti ovoj deci, u smislu poboljšanja kako kvaliteta, tako i dužine života (124).

Rast je značajan indikator zdravstvenog stanja u toku detinjstva i HBB u detinjstvu se mogu povezati sa usporavanjem normalnog rasta i razvoja dece. Smatra se da, iako dijaliza i transplantacija bubrega omogućavaju kvalitetniji život u kasnijem, odraslom dobu, smanjen rast u detinjstvu koji nastaje kao posledica HBB ne može biti nadoknađen. Brojne studije su pokazale da na rast dece sa HBB utiču: etiologija bolesti, uzrast u trenutku dijagnostifikovanja bolesti, neadekvatan kalorijski i proteinski unos, metabolička acidoza, prisustvo uremije, kao i primena kortikosteroidnih lekova u terapiji nakon transplantacije bubrega (31-38). Značajno smanjenje ITM kod dece sa HBB se može povezati sa sindromom malnutricije, inflamacije i kaheksije i označava se kao proteinsko-energetski gubitak i uglavnom se vezuje za ESRD. Međutim, mišljenja vezana za procenu telesne uhranjenosti kod pacijenata sa HBB, kao i uticaju telesne uhranjenosti na razvijanje kardiovaskularnih bolesti kod ovih pacijenata, nisu u potpunosti konzistentna (125, 126). Iako se mera uhranjenosti najčešće izražava preko ITM, a pokazano je da se gojaznost nedvosmisleno dovodi u vezu sa kardiovaskularnim bolestima u opštoj populaciji, rezultati studija kod pacijenata sa HBB su pokazali da je OS/OK bolji prediktor kardiovaskularnih promena u odnosu na ITM. Osim toga, kod

dece na hemodijalizi, normalan ili čak snižen ITM za dati uzrast udružen sa povišenim OS/OK, ukazuju na povećani kardiovaskularni rizik (125,126). Objašnjenje ovakvih rezultata leži u činjenici da ITM ne ukazuje na razliku između mase masnog tkiva i mišićne mase, odnosno ne daje puno informacija o telesnoj distribuciji masti (126). Kod dece sa HBB, PEG može dovesti do toga da je ITM smanjen, ili u granicama za normalnu uhranjenost za dati uzrast deteta upravo kao posledica smanjenja mišićne mase zbog ograničenog unosa proteina, ali viši OS/OK ukazuje na postojanje visceralnog tipa gojaznosti koji se dovodi u vezu sa razvojem kardiovaskularnih bolesti. Savremena stanovišta potenciraju značaj parametara centralne gojaznosti, kao što su OS i OK u cilju bolje predikcije rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti kod pacijenata sa HBB (126). Rezultati naše studije podržavaju ovo stanovište (Tabela 2.) Naime, iako vrednosti ITM nisu bile statistički značajno različite između KG i grupa pacijenata sa HBB, odnos OS/OK je bio statistički značajno viši kod pacijenata na dijalizi i pacijenata nakon transplantacije bubrega u odnosu na kontrolnu grupu. Ovakav rezultat upravo ukazuje na različitu raspodelu masnog tkiva kod dece, odnosno na veći udeo visceralnog masnog tkiva kod dece u ESRD u odnosu na zdravu decu i decu iz pdHBB grupe pacijenata, koji se može dovesti u vezu sa većim rizikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti. Kod pacijenata sa transplantiranim bubregom povećani OS/OK može biti i posledica upotrebe imuno supresivne terapije (126).

Takođe, rezultati ove studije su pokazali da su vrednosti sistolnog pritiska statistički značajno više u grupi pacijenata na dijalizi u odnosu na kontrolnu grupu dece i pdHBB grupu (Tabela 2.). Ovaj rezultat je u skladu sa rezultatima prethodnih istraživanja koji su pokazali da hipertenzija kod dece na dijalizi može biti posledica upravo samog procesa dijalize (127, 128). Osim toga, kod ovih pacijenata bubrežna funkcija je jako smanjena i praćena retencijom natrijuma i hipervolemijom, kao i smanjenjem aktivnosti sistema renin-angiotenzim aldosteron (128).

Dislipidemija predstavlja jedan od najznačajnijih komorbiditeta HBB kod dece koji se povezuje sa povećanim rizikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti (129,130). Prevalenca dislipidemije kod dece sa HBB je visoka i iznosi od 39-65%, a zavisi od etiologije bolesti, ali i dužine trajanja i stadijuma HBB. Hipertrigliceridemija predstavlja najčešći tip dislipidemije kod ove grupe pacijenta i rezultati studija su ukazali na

postojanje negativne korelacije između jačine bubrežne funkcije i koncentracije TG, kao i koncentracije UH, odnosno pozitivne korelacije između koncentracije HDL-h i JGF (129). Koncentracije LDL-h kod dece sa HBB uglavnom su u granicama preporučenih vrednosti (130). Smatra se da hipertrigliceridemija kod dece sa HBB nastaje kao posledica smanjenje aktivnosti lipoproteinske lipaze (LPL) i hepatične lipaze (HL), kao i povećane sinteze VLDL lipoproteinskih čestica u jetri (130). Rezultati naše studije su u skladu sa ovim tvrdnjama. Naime, koncentracija TG bila je statistički značajno viša u sve tri grupe pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika (Tabela 3.). Koncentracije UH i LDL-h se nisu značajno razlikovale u ispitivanim grupama (Tabela 3.). Koncentracija HDL-h je bila niža u grupi pacijenata na dijalizi u odnosu na druge ispitivane grupe, ali rezultat nije pokazao statističku značajnost (Tabela 3.). Smanjenje koncentracije HDL-h u uznapredovaloj HBB može se objasniti sniženom aktivnošću LCAT, odnosno onemogućavanjem normalnog sazrevanja HDL čestica koje se manifestuje smanjenom koncentracijom HDL-h (130). Takođe, koncentracije apoB i Lp(a) nisu se značajno razlikovale između ispitivanih grupa (Tabela 3.). Rezultati prethodnih studija su uglavnom pokazali da vrednosti apoB kod pedijatrijskih pacijenata sa HBB mogu biti povišene ili u opsegu referentnih vrednosti ali su vrednosti Lp(a) uglavnom povišene (130). Rezultati ove studije nisu pokazali očekivanu razliku u koncentraciji Lp(a), iako su vrednosti bile više u grupi pacijenata na dijalizi, a rezultat se može objasniti manjim brojem pacijenata koji su učestvovali u studiji. Iako je dobro poznato da deca sa uznapredovalom HBB razvijaju aterosklerozu koja leži u osnovi kardiovaskularnih bolesti, kao i da značaj dislipidemije kao faktora rizika nikako nije doveden u pitanje, zbog malog broja studija i relativno kratkog vremena praćenja ne može se tačno utvrditi veza između dislipidemije i kardiovaskularnog rizika kod dece u prvom i drugom stadijumu HBB (130). Kod dece nakon transplantacije uglavnom dolazi do snižavanja koncentracije triglicerida i ukupnog holesterola u odnosu na period kada su bila na dijalizi (130). Međutim, kod ovih pacijenata je uočeno povećanje koncentracije LDL-h i Lp(a) u odnosu na period pre transplantacije. Ovakva promena lipidnog profila može se objasniti činjenicom da deca i nakon transplantacije i dalje imaju oslabljenu bubrežnu funkciju, a takođe uvek se treba uzeti u obzir i uticaj kortikosteroidne terapije na parametre lipidnog profila (130).

Osim tradicionalnih faktora rizika kao što su hipertenzija i dislipidemija, oksidativni stres može imati značajnu ulogu u patogenezi kardiovaskularnih bolesti. Kod pacijenata sa HBB prisustvo uremijskih toksina, kao i inflamacija, pa i sam proces dijalize u terminalnim fazama bolesti, dovode do pojačanja intenziteta oksidativnog stresa. Iako je dijaliza tretman izbora kod pacijenata sa ESRD, veruje se da on dovodi do hroničnog stanja inflamacije usled aktivacije fagocita. Upravo zato se smatra da proces dijalize može predstavljati humani model za proučavanje oksidativnog stresa.

Dejstvom slobodnih radikala dolazi do oksidativnog oštećenja proteina, a marker koji se pokazao dobrim pokazateljem intenziteta ovog oštećenja jeste koncentracija AOPP (131), dok se intenzitet lipidne peroksidacije i nagomilavanja produkata oksidovano modifikovanih lipida može pratiti merenjem koncentracije TBKRS (132). Poređenjem parametara oksidativnog stresa u našim ispitivanim grupama (Tabela 5.) dobijeno je da je koncentracija TBKRS statistički značajno veća u sve tri ispitivane grupe pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 5.). Koncentracija AOPP je bila veća kod svih ispitivanih grupa pacijenata u odnosu na KG, ali je statistička značajnost dobijena samo u grupi pacijenata na dijalizi i nakon transplantacije bubrega u odnosu na zdrave ispitanike (Tabela 5.). Na osnovu ovih rezultata možemo reći da su pacijenti u sve tri ispitivane grupe bili pod oksidativnim stresom, ali da je intenzitet oksidativnog stresa bio jači kod pacijenata na dijalizi, što je u skladu sa rezultatima drugih studija (131, 133). Produkti oksidacije lipida i proteina stimulišu dodatno oslobađanje inflamatornih citokina i stvara se „začarani krug“ multiplikacije signala koji dovode do aterosklerotskih promena (132). Smatra se da oksidativni stres dovodi do promena u strukturi proteina, pa nastaju AOPP čija je degradacija i eliminacija otežana (133). Rezultati naše studije su pokazali da je koncentracija AOPP i nakon transplantacije bubrega značajno veća u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika, ali ipak značajno niža u odnosu na pacijente na dijalizi (Tabela 5.), čime se potvrđuje teorija da proces dijalize iako je neophodan terapijski tretman pacijenata u terminalnoj fazi HBB, dovodi do intenzivnog oksidativnog stresa.

Daljim ispitivanjem parametara oksidativnog stresa našli smo pozitivnu korelaciju koncentracije TBKRS sa UH i ApoB u pHDHB i D grupama (Tabele 7. i 8.), dok je kod pacijenata sa transplantiranim bubregom uočena pozitivna korelacija koncentracije TBKRS sa TG (Tabela 9.). Ovi rezultati ukazuju na postojanje direktne veze između

intenziteta oksidativnog stresa i dislipidemije kod pacijenata sa HBB, i sinergističkom delovanju ovih komorbiditeta HBB u razvoju kardiovaskularnih bolesti.

Kod pacijenata sa HBB osim pojačanja intenziteta oksidativnog stresa, uočeno je i smanjenje nivoa antioksidativne zaštite (131). Jedan od parametara koji odražava nivo antioksidativne zaštite su ukupne SH-grupe koje učestvuju u neenzimskoj antioksidativnoj zaštiti, a uglavnom potiču od proteina plazme (134). U ovom istraživanju ukupne SH-grupe su bile statistički značajno niže kod dece u pdHBB grupi i dece na dijalizi u odnosu na KG i grupu dece kojima je transplantiran bubreg (Tabela 5.). Ovi rezultati nam ukazuju na povećanu potrošnju SH-grupa usled pojačanog oksidativnog stresa i dejstva uremijskih toksina u ranijim stadijumima HBB i na dijalizi, ali takođe se mora uzeti u obzir i činjenica da u ovim grupama pacijenata dolazi i do povećanog gubitka proteina zbog oštećenja bubrega. U dosadašnjim istraživanjima SH-grupe se navode kao pokazatelji boljeg preživljavanja pacijenata nakon transplantacije bubrega i smanjenja kardiovaskularnog rizika nakon transplantacije (133, 134). Naši rezultati su u skladu sa ovim zaključcima jer je u grupi dece kojima je transplantiran bubreg koncentracija ukupnih SH-grupa bila u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom HDL-h i Apo AI čije se više koncentracije povezuju sa manjim rizikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti.

SOD je enzim koji predstavlja prvu liniju odbrane od ROS posredovanog oksidativnog stresa (135). Istraživanja su pokazala značajno smanjenje aktivnosti SOD kod pacijenata u predijaliznom stadijumu HBB zbog povećanog prisustva uremijskih toksina. Da su pacijenti u ovoim istraživanju bili u stanju oksidativnog stresa dokumentovali smo takođe i iscrpljenošću sistema antioksidativne zaštite, koja se ogledala upravo kroz značajno snižene vrednosti SOD u pdHBB grupi i kod transplantiranih pacijenata (Tabela 5.), dok je u grupi pacijenata na dijalizi aktivnost ovog enzima bila statistički značajno viša u poređenju sa ostalim grupama pacijenata i sa kontrolnom grupom (Tabela 5.). Povećana aktivnost SOD u grupi pacijenata na dijalizi ide u prilog objašnjenju da se organizam prilagođava na povećanje produkcije slobodnih radikala koja se dešava posle svakog tretmana dijalizom, pa se smatra da je povećana aktivnost SOD kod ovih pacijenata posledica kompenzatornog mehanizma zaštite od slobodnih radikala.

Jedan od ciljeva ove studije bio je ispitivanje statusa antioksidativnog enzima PON1 kod dece sa HBB. Rezultati prethodnih studija su ukazali na smanjenu aktivnost PON1 u HBB, što se povezivalo i sa nižim nivoom HDL-h, kao i sa većim rizikom za razvoj kardiovaskularnih komplikacija (136). PON1 pokazuje antiaterogena svojstva tako što sprečava oksidativnu modifikaciju lipida LDL čestica i time prevenira stvaranje penastih ćelija. Rezultati studija koje su se bavile proučavanjem enzima PON1 u HBB nisu konzistentni (137,138), naročito vezano za uticaj procesa dijalize na koncentraciju i aktivnost ovog enzima. Generalno su rezultati prethodnih studija pokazali da pacijenti sa HBB koji su bili pod konzervativnim ili hemodijaliznim tretmanom imali snižen nivo aktivnosti PON1, što svakako može biti uzrok povećanog rizika od kardiovaskularnih događaja (136,139). Smanjenje aktivnost serumske PON1 je najočiglednije kod pacijenata na hemodijalizi i uglavnom se može objasniti inhibitornim efektima uremijskih toksina kako na aktivnost, tako i na sam proces sinteze ovog enzima u jetri (140). Studije kod dece su pokazale povećan oksidativni stres i smanjene antioksidantne sposobnosti serumske PON1 u HBB (135-139). Nivo serumske PON1 povezan je sa hiperlipidemijom kod pacijenata sa bubrežnom insuficijencijom (140). Takođe, neke studije ukazuju da bi transplantacija bubrega mogla smanjiti rizik od kardiovaskularnih bolesti kod ovih pacijenata upravo povećanjem aktivnosti enzima PON1 nakon transplantacije, a time i povećanjem anti-aterogenih svojstava HDL lipoproteinskih čestica (106,138,139). Nova saznanja u ovoj oblasti imaju za cilj smanjenje rizika od kardiovaskularnih događaja održavanjem ili poboljšanjem aktivnosti PON1 kod pacijenata sa HBB, a ovo je naročito važno za osetljive pedijatrijske pacijente.

Rezultati naše studije su pokazali smanjenje POazne aktivnosti kod dece na dijalizi u poređenju sa kontrolnom grupom (Tabela 10.), ali rezultat nije dostigao statističku značajnost. Istraživanja su pokazala da kod uremičnih pacijenata dolazi do promene i u sastavu HDL čestica, što se može povezati sa smanjenjem aktivnosti PON1 (141, 142). Mišljenja su da uzrok ovog smanjenja treba tražiti i u smanjenju koncentracije ApoAI koji direktno uslovljava poremećaj u stabilizaciji molekule PON1 na HDL čestici (142).

Takođe, DZOazna aktivnost je bila niža kod sve tri grupe pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika, ali razlika nije bila statistički značajna (Tabela 10.). Ove

rezultate možemo objasniti upravo specifičnošću dislipidemije koju smo uočili kod ispitivanih pacijenata, a koja se karakteriše hipertrigliceridemijom, dok su koncentracije HDL-h kao i ApoAI slične izmerenim koncentracijama kod zdrave dece. Na osnovu ovih rezultata možemo zaključiti da su kod ovih pacijenata još uvek očuvani osnovni pokazatelji anti-aterogenih karakteristika HDL-čestica. Takođe, ni raspodela fenotipova enzima PON1 na položaju 192 nije bila različita u grupama pacijenata u odnosu na grupu zdrave dece (Tabela 10.). Iako su neka ranija istraživanja (137) pokazala zavisnost između aktivnosti enzima PON1 i koncentracije parametara lipidnog profila (posebno HDL-h), rezultati naše studije nisu pokazali značajnu korelaciju ni POazne ni DZOazne aktivnosti sa parametrima rutinskog lipidnog profila (Tabela 11. i 12.). Prilikom tumačenja rezultata vezanih za aktivnost enzima PON1 svakako moramo uzeti u obzir i činjenicu da je u studiji učestvovao mali broj ispitanika zbog specifičnosti ispitivane populacije, te da bi se trend smanjenja aktivnosti ovog enzima kod dece sa HBB na većem uzorku pacijenata možda i pokazao značajnim.

Između inflamacije i oksidativnog stresa postoji dvosmerna veza, što znači da inflamacija kroz stimulaciju neutrofila izaziva oslobađanje ROS i pogoršava prooksidantno stanje i obrnuto, oksidativni stres aktivacijom monocita izaziva produkciju inflamatornih citokina i produbljuje stanje hronične inflamacije. Najvažniji mehanizam putem koga oksidativni stres učestvuje u razvoju ateroskleroze je modifikacija lipoproteina kao i izazivanje endotelne disfunkcije. Disfunkcija endotela se manifestuje neadekvatnom vazodilatacijom koja može da dovede i do oštećenja vaskularnog endotela, povećanom adhezijom trombocita i leukocita na oštećeni zid endotela, što predstavlja jedan od centralnih događaja u razvoju ateroskleroze (131). U stanju inflamacije, leukociti dolaze do subendotelnog prostora gde oslobađaju inflamatorne citokine koji podstiču nove leukocite da se gomilaju na mestu oštećenja endotela, čime se sinergističkim efektima intenzitet inflamacije povećava. Jedan od važnih induktora stvaranja slobodnih radikala kod nefroloških pacijenata je MPO. Prema dosadašnjim istraživanjima MPO je pouzdan marker inflamacije, ali i pouzdan marker stepena oksidativnog stresa kod odraslih pacijenata sa HBB (143, 144). Naime, brojni autori smatraju da HOCl indukuje disfunkciju endotela tako što smanjuje adheziju proteina ekstracelularnog matriksa za endotelne ćelije (145) i konvertuje matriks metaloproteinaze

u njihovu aktivnu formu, čime dodatno destabilizuje vaskularno i endotelno tkivo (146). MPO koja je oslobođena ekstracelularno može katalizovati peroksidaciju lipoproteina i smatra se i glavnim uzrokom lipidne peroksidacije *in vivo*. Upravo lipidna peroksidacija plazmatskih lipoproteina može doprineti razvoju ateroskleroze. Povišeni nivoi MPO su nađeni kod pacijenata sa kardiovaskularnim bolestima (147), a prospektivne studije su pokazale da se visoki nivoi MPO povezuju sa povećanim rizikom od kardiovaskularnih bolesti kod zdravih pojedinaca (148). Isto tako, kod bolesnika sa HBB izmenjena funkcionalnost MPO može ukazati na rizik od razvoja endotelnih promena i kardiovaskularnih komplikacija (149). Iako su rezultati većine studija ukazali na povećanje koncentracije MPO usled progresije renalne bolesti, bilo je i studija koje su pokazale progresivan pad koncentracije MPO u toku HBB (150).

Rezultati naše studije su pokazali statistički značajno višu koncentraciju MPO u grupi pdHBB pacijenata u odnosu na KG, ali i u odnosu na ostale ispitivane grupe pacijenata (Slika 21.), što ide u prilog tezi da postojanje HBB dovodi do pojačane produkcije MPO usled hronične inflamacije, ali i oksidativnog stresa koji posledično prati pdHBB pacijente. Interesantno je da su pacijenti na dijalizi i nakon transplantacije imali koncentracije MPO koje se nisu značajno razlikovale KG ispitanika. Kod dijaliznih pacijenata ovakav rezultat se može objasniti preuzimanjem oslobođene MPO u subendotelno tkivo gde dovodi do oksidativne modifikacije lipida i proteina. U prilog ovoj pretpostavci idu istraživanja koja su pokazala da koncentracija MPO raste posle svakog tretmana dijalizom, ali bez obzira na stepen povećanja koncentracije, ona se uvek vraća na bazalne vrednosti pre sledećeg dijaliznog tretmana (151). Rezultati naše studije su pokazali značajnu pozitivnu korelaciju između koncentracije MPO i TBKRS u grupi pacijenata na dijalizi, što ukazuje na povećanje intenziteta oksidativnog stresa koji se može dovesti u vezi sa većim stepenom lipidne peroksidacije, bez obzira što se kod naših pacijenata koriste dijalizne membrane nove generacije (Tabela 14.). Kada su u pitanju pacijenti sa transplantiranim bubregom, nivo MPO nije bio statistički značajno različit u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika, ali je dao pozitivnu korelaciju sa AOPP i negativnu sa SH-grupama (Tabela 14.). Na osnovu ovog rezultata možemo da pretpostavimo da, iako su pacijenti na terapiji imunosupresivima i inflamacija je znatno smanjena čime je smanjeno i oslobađanje MPO, neosporno je postojanje veze oksidativnog stresa i

smanjenja antioksidativne zaštite.

Iako je većina studija pokazala da LDL čestice imaju izrazite proaterogene karakteristike, novija istraživanja su pokazala da najveći proaterogeni potencijal imaju male guste LDL čestice (97-99). Ove čestice imaju pojačan afinitet za scavenger receptore, a zahvaljujući svojoj veličini lakše prodiru u subendotelni prostor što ih čini podložnim oksidaciji u subendotelnom prostoru (97). Dosadašnja istraživanja su pokazala da je glavna meta HOCl koji je nastaje pod dejstvom MPO protein apoB (100, 101). Veza LDL čestica sa MPO se ostvaruje preko NH₂-β 1 domena apoB, zato što je ovaj domen izložen sa spoljne strane lipoproteina, a zahvaljujući baznim, katjonskim amino kiselinama vezuje se za negativno naelektrisane aminokiselinske ostatke MPO (asparaginske ili glutaminske kiseline). Istraživanja su pokazala da LDL čestica oksidovana pod uticajem MPO indukuje jači odgovor (aktivaciju) monocita/makrofaga nego LDL čestica koja je oksidovana drugim agensima (100, 102).

Rezultati većeg broja kliničkih studija su izdvojili AIP kao dobar prediktor rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti i ateroskleroze (152, 153). Smatra se da AIP delom reflektuje odnos između protektivnih i aterogenih lipoproteina. Posebno se smatra bitnim markerom za procenu lipidnog statusa kod pacijenata kod kojih se dislipidemija karakteriše hipertrigliceridemijom (154), kao što je slučaj i kod naše pedijatrijske grupe pacijenata. Iako je poslednjih godina AIP je počeo da dobija na značaju kao mogući marker rane detekcije ateroskleroze, po našim saznanjima do sada ovaj parametar nije ispitivan kod dece sa HBB. Rezultati prethodnih istraživanja kod odraslih pacijenata na dijalizi su pokazali povezanost najviših vrednosti AIP (najviši kvartil raspodele) sa povećanim mortalitetom od kardiovaskularnih bolesti (154). Smatra se da je AIP manje podložan varijacijama u toku dužeg vremenskog perioda i zbog toga je pogodniji marker predikcije kardiovaskularnog rizika nego pojedinačna koncentracija lipida (155). AIP je jednostavan i praktičan odnos koji se može lako izračunati i koristiti za procenu aterogenog rizika. Imajući u vidu jednostavnost određivanja AIP pokušali smo da dalje identifikujemo parametre koji utiču na AIP kod ispitivanih grupa dece.

Zanimljivo je da je u grupi zdrave dece AIP pokazao značajnu pozitivnu korelaciju jedino sa koncentracijom MPO (Tabela 15.). U pdHBB grupi, AIP je dao statistički značajnu pozitivnu korelaciju sa ITM, sistolnim pritiskom i koncentracijom

TBKRS (Tabela 16.), dok je u grupi pacijenata na dijalizi bio u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa dužinom trajanja dijalize, ITM, dijastolnim krvnim pritiskom, koncentracijom MPO i AOPP (Tabela 19.). Ove rezultate bismo mogli objasniti činjenicom da AIP pokazuje postepeno povećanje aterogenog rizika paralelno sa progresijom bolesti kod dece sa HBB. Naime smatra se da kako HBB napreduje dolazi do pojačane lipidne peroksidacije, u toku dijalize dolazi do ekscenog oslobađanja MPO, a time i do povećane oksidacije proteina, što produbljuje stanje oksidativnog stresa i inflamacije kod pedijatrijskih pacijenata. Rezultati naše studije su pokazali da u pdHBB i grupi pacijenata kojima je transplantiran bubreg, nije bilo parametara koji su imali nezavistan uticaj na vrednosti AIP (Tabela 18. i 23.), međutim u grupi pacijenata na dijalizi naši rezultati su pokazali da su i MPO i AOPP nezavisno povezani sa AIP (Tabela 21.). Na osnovu dokazanog nezavisnog uticaja parametara oksidativnog stresa na AIP kod pacijenata na dijalizi, možemo pretpostaviti da bi AIP trebalo rutinski analizirati od momenta početka dijalize, zato što ovaj parametar može indirektno da odražava stepen oksidativnog stresa koji je uzrokovalo oslobađanje MPO i rezultujuće povećanje AOPP.

Kao što je već rečeno, HBB dovodi do promena u homeostazi lipida, tako da je razvoj dislipidemije jedan od najčešćih komorbiditeta kod ovih pacijenata (158). Iako je pokazano da transplantacija može da smanji štetne efekte na lipidni profil (159), postoje i studije koje ukazuju na perzistiranje dislipidemije čak i nakon izvršene transplantacije, što je najverovatnije rezultat primene imunosupresivne terapije (160, 161).

Rutinski parametri za procenu lipidnog profila u kliničkoj praksi su koncentracija UH, TG, LDL-h i HDL-h. Međutim, određivanje raspodele lipoproteinskih subfrakcija kod pacijenata sa HBB, a naročito kod pedijatrijske populacije, može pružiti dodatne informacije o karakteristikama dislipidemije u ovim stanjima. Važno je napomenuti da su prethodne studije pokazale da su deca i adolescenti sa izmenjenom homeostazom lipida dugoročno ugrožena populacija, jer promene u lipidnom profilu u ranom životnom dobu mogu povećati rizik od kardiovaskularnih komplikacija u odrasloj dobi (162). U tom smislu bi određivanje detaljnog lipidnog profila, koje uključuje i distribuciju lipoproteinskih subfrakcija, bilo od značaja upravo kod dece sa HBB i nakon transplantacije. Naši rezultati su pokazali da, iako nije bilo značajnih razlika u koncentracijama rutinskih lipidnih parametara (sa izuzetkom koncentracije TG i apoAI)

(Tabela 3.), veličine i raspodela lipoproteinskih subfrakcija značajno variraju između ispitivanih grupa.

Kada su u pitanju LDL čestice (Slika 22., Tabela 25.), nismo mogli da uočimo jasan obrazac promena između grupa. Naime, iako smo utvrdili veći dominantni dijametar u KG, raspodela LDL subfrakcija ukazala je da upravo u grupi zdrave dece značajno dominiraju male, guste LDL čestice što je bio neuobičajen rezultat. Delom se odgovor na ovu nedoslednost u rezultatima može naći u činjenici da je studija izvedena na malom broju ispitanika, te da rezultati statističke analize nisu toliko pouzdani koliko bi bili na većem uzorku. Međutim, studija koju su sprovedi Taşçılar et al. (163) ukazala je na izostanak razlika u veličini LDL čestica između zdrave dece i gojazne dece sa insulinskom rezistencijom, sugerišući da određivanje LDL profila u pedijatrijskoj populaciji ne daje dovoljno pouzdane rezultate za eventualnu kliničku interpretaciju. Važno je napomenuti da je i ova studija, slično kao i naša, izvedena na manjem broju ispitanika, pa svakako ove zaključke treba proveriti na većem uzorku. Konzistentno sa prethodnim rezultatima, nismo uočili obrazac promena u distribuciji LDL subfrakcija između dece sa HBB (u predijaliznom i dijaliznom stadijumu) u odnosu na decu sa transplantiranim bubregom (Tabela 27.). Ipak, interesantno je da smo našli manji udeo najmanjih LDL IV subfrakcija u grupi T u odnosu na pdHBB i D grupu zajedno (Tabela 25.). Ovo se može objasniti povoljnijim efektom transplantacije na lipidni profil, usled smanjene izloženosti oksidujućim agensima i uremijskoj sredini.

Kada su u pitanju HDL subfrakcije, naši rezultati su daleko konzistentniji. Funkcionalnost HDL čestica je od posebnog značaja zbog njihovog kompleksnog sastava i sklonosti ka promenama usled dejstva različitih faktora neposrednog vaskularnog okruženja (90). Analiza razlika u dominantnom HDL dijimetru (Slika 23) pokazala je da zdrava deca u KG imaju statistički značajno veći dijametar HDL čestica u odnosu na pdHBB i D grupu. Konzistentno sa tim, procentualni udeli malih HDL subfrakcija bili su značajno niži kod zdrave dece, u odnosu na decu sa HBB (Tabela 26.). Sličan trend se uočavao i kada su upoređeni pacijenti sa HBB naspram dece sa transplantiranim bubregom.

Naime, naši rezultati (Tabela 26.) su pokazali da je HDL profil nakon transplantacije značajno povoljniji nego u toku trajanja HBB i približava se HDL profilu kod zdrave dece.

Danas je široko prihvaćeno stanovište da različite subfrakcije HDL imaju različite

protektivne sposobnosti, a smatra se da su kod zdravih osoba manje HDL čestice najefikasnije u antiaterogenoj zaštiti. S druge strane, dislipidemija, oksidativni stres i inflamacija uzrokuju velike promene u strukturi i funkciji HDL. Dosadašnja istraživanja pokazala su da su manje subfrakcije HDL posebno podložne ovim efektima, tako da brzo gube svoje ateroprotektivne osobine i čak mogu postati proaterogene (164). Imajući u vidu da su inflamacija, dislipidemija i oksidativni stres karakteristike HBB, opravdano je pretpostaviti da povećanje udela manjih HDL čestica u ovoj grupi ukazuje na nedostatak ateroprotektivnih mehanizama, što može olakšati pojavu i progresiju ateroskleroze. Nasuprot tome, smanjeno prisustvo manjih HDL čestica kod pacijenata nakon transplantacije daje potvrdu prethodnih nalaza (165) da transplantacija bubrega može dovesti do korekcije dislipidemije. Važno je napomenuti da su naši rezultati ipak pokazali manje povoljnu distribuciju HDL čestica nakon transplantacije, u odnosu na zdravu decu (Tabela 26.). Sveukupno uzevši, naši rezultati ukazuju na to da se poremećaji lipidnog profila u HBB ublažavaju nakon transplantacije, ali kardiovaskularni rizik povezan sa dislipidemijom ne treba zanemariti čak ni u periodu posle transplantacije, posebno zbog dugotrajne upotrebe imuno supresivnih lekova. Merenje koncentracije LDL i HDL holesterola je dokazano klinički korisno u populaciji odraslih pacijenata, dok određivanje LDL i HDL subfrakcija kod dece sa HBB može da pruži bolji uvid u subkliničke promene, a time i omogućiti efikasniju prevenciju ateroskleroze i bolji ishod kod pedijatrijskih pacijenata. Međutim, treba imati u vidu da karakterizacija LDL i HDL čestica zahteva ili posebnu opremu ili dugotrajno vreme izvođenja i stoga je još uvek neprikladna za opštu kliničku upotrebu. Međutim, naši rezultati sugerišu da ima opravdanja za analizu subfrakcija lipoproteina u rutinskoj praksi kada su u pitanju određene populacije, odnosno da se ova analiza može preporučiti kod visoko rizičnih pojedinaca, kakvi su pedijatrijski pacijenti sa HBB.

Naše istraživanje se dalje odnosilo na ispitivanje veze lipoproteinskih subfrakcija sa antropometrijskim karakteristikama, kao i sa markerima lipidnog statusa i oksidativnog stresa u ispitivanim grupama pacijenata. Očekivano, utvrđena je pozitivna korelacija ITM i obima struka sa relativnim udelom LDL IV u KG (Tabela 28.). LDL III čestice su pokazale negativnu korelaciju sa LDL-h. HDL-h je pozitivno korelirao sa malim HDL 3a i 3b česticama a negativno sa HDL 2b. Važno je napomenuti da se kod zdravih osoba

male HDL čestice smatraju nosiocima antiaterogenih svojstava, pa u tom smislu dobijena korelacija sa HDL-h nije iznenađujuća. Međutim, korelacije sa apoAI nisu išle u ovom pravcu, imajući u vidu uočenu negativnu korelaciju sa manjim HDL subfrakcijama. Mala grupa ispitanika može biti uzrok dobijenog odstupanja.

U odnosu na KG, kod pacijenata su dobijeni drugačiji rezultati, što ukazuje na promene u relativnoj distribuciji LDL i HDL čestica u ovim grupama, kao i na različitu prirodu odnosa sa antropometrijskim i lipidnim markerima. U grupama pdHBB i D uočena je pozitivna korelacija ITM sa LDL II česticama, kao i negativne korelacije udela LDL I čestica sa ITM i obimom struka (Tabela 29.), što je očekivan rezultat imajući u vidu uticaj gojaznosti na remodelovanje LDL subfrakcija. Uočena je i pozitivna korelacija TG sa udelima HDL 2a i negativna sa udelima HDL 3c čestica, dok je ApoB pozitivno korelirao sa HDL 3c. Dobijene rezultate u ovoj kategoriji pacijenata možemo objasniti uz osvrt na sve faktore rizika koji prate dislipidemiju u ovim fazama bubrežne bolesti. Kako je hipertrigliceridemija prisutna kod ovih pacijenata (Tabela 3.), uočena korelacija može odražavati pomeranje frakcija HDL ka manjim gustim HDL česticama. Naime, pozitivna korelacija TG sa zrelim HDL 2a česticama mogla bi ukazivati na njihovu pojačanu transformaciju u male disfunkcionalne HDL subfrakcije, prevashodno usled povišene aktivnosti CETP. U prilog ovoj činjenici govori i korelacija ApoB sa malim HDL subfrakcijama, što potencijalno ukazuje na formiranje „začaranog kruga“ proaterogenih promena usled povećanog udela vulnerabilnih malih HDL subfrakcija koje nemaju adekvatan antioksidativni i antiaterogeni kapacitet, te povećanog prisustva LDL čestica koje su podložnije oksidativnim promenama. Na osnovu ovih rezultata bismo mogli zaključiti da su pedijatrijski pacijenti sa HBB u predijaliznom stadijumu kao i u ESRD izuzetno ranjiva grupa u smislu narušavanja ravnoteže lipoproteina, čime se značajno povećava rizik od razvoja aterosklerotskih promena. Osim toga, interesantan rezultat dobijen je i kod zdravih i kod pacijenata sa HBB kada su u pitanju godine starosti. Naime, u kontrolnoj grupi uzrast ispitanika je negativno korelirao sa malim LDL i HDL subfrakcijama, dok je kod pacijenata sa HBB dobijena negativna korelacija godina starosti sa dominantnim LDL dijametrom. Ovakvi rezultati ukazuju na značaj starosne dobi i verovatno pubertalnog razvoja u definisanju karakteristika lipidnog profila kod dece, što bi trebalo dodatno istražiti.

Kada su u pitanju pacijenti sa transplantiranim bubregom (Tabela 30.), uočili smo negativnu korelaciju malih gustih LDL čestica sa ITM. Koncentracija HDL-h i ApoAI su bili u pozitivnoj korelaciji sa relativnim udelima LDL IV i HDL 2b čestica, dok je negativna korelacija zapažena sa relativnim udelima HDL 3a i 3b čestica. Rezultati koje smo dobili bi mogli ukazati na promene u metabolizmu lipoproteinskih čestica usled povoljnih efekata transplantacije, što je vidljivo i u rutinskom lipidnom profilu (Tabela 3.). Naime, naši rezultati sugerišu da nakon transplantacije dolazi do korekcije koncentracije TG, HDL-h i ApoAI u odnosu na pacijente na dijalizi, a uočili smo i pomeranje ka većim dijametrima HDL i LDL subfrakcija. Dobijene korelacije HDL-h i apoAI sa odgovarajućim subfrakcijama HDL mogu sugerisati da kod ovih pacijenata, a u sklopu sveukupne korekcije lipidnog profila, sadržaj holesterola i apoAI prvenstveno biva povezan sa velikim, zrelim HDL česticama, dok se disfunkcionalne male HDL subfrakcije odlikuju smanjenim udelom ovih komponenti.

Ispitivanjem korelacije lipoproteinskih frakcija sa parametrima oksidativnog stresa našli smo sledeće: u grupi zdravih ispitanika parametri antioksidativne zaštite su pozitivno korelirali sa malim gustim LDL česticama (Tabela 31.), što bismo mogli objasniti fiziološkom reakcijom, jer usled povećanja proaterogenih formi lipoproteina sklonih oksidaciji dolazi do kompenzatornog odgovora organizma, kako bi očuvao oksidativnu ravnotežu. S druge strane, pozitivna korelacija TBKRS sa relativnim udelima malih LDL i HDL čestica ukazuje na povećanu mogućnost oksidativnog oštećenja. Interesantno je da je koncentracija MPO negativno korelirala sa malim HDL česticama, što bismo mogli objasniti činjenicom da kod zdravih osoba ove čestice imaju najsnažniji antioksidativni kapacitet.

Kod pacijenata sa HBB aktivnost PON1 je bila u pozitivnoj korelaciji sa HDL 3c česticama, SOD u negativnoj sa LDL IV česticama, a koncentracija MPO je dala pozitivnu korelaciju sa LDL IV česticama (Tabela 32.). Ovakve rezultate možemo objasniti upravo povećanim oksidativnim stresom kod pacijenata sa HBB. Kako bolest napreduje iscrpljuje se antioksidativna zaštita, a usled prisutne dislipidemije LDL čestice se takođe pomeraju ka malim gustim frakcijama. MPO je u ovoj fazi enzim koji će verovatno dovesti do lipidne peroksidacije. Kako su male guste LDL čestice više podložne modifikaciji, dolazi do njihove transformacije u ox-LDL u subendotelnom tkivu

i počinje kaskada događaja koji dovode do aterosklerotskih promena. Uočena pozitivna korelacija PON1 sa malih HDL česticama je ili posledica činjenice da se PON1 normalno nalazi predominantno vezana za HDL 3 subfrakcije, ili, što je verovatnije, ilustracija kompenzatornog odgovora ovog enzima na razvoj disfunkcionalnih malih HDL. Što se tiče TBKRS, dobili smo pozitivnu korelaciju sa udelom velikih HDL subfrakcija, a negativnu sa udelom malih HDL 3c, što može da govori u prilog remodelovanju ovih čestica, ali bi ovaj nalaz svakako trebalo dalje proveriti na većem uzorku.

Kod pacijenata nakon transplantacije bubrega (Tabela 33.) aktivnost PON1 je pozitivno korelirala sa HDL 2a subfrakcijama, a SH grupe negativno sa HDL 3a i 3b česticama. Ovakvi rezultati su sasvim u skladu sa prethodno opisanim korelacijama između rutinskih lipidnih parametara i HDL subfrakcija, odnosno sa mogućnošću da korekcija lipidnog profila kod ovih pacijenata podrazumeva veći zaštitni kapacitet na velikim HDL česticama. Interesantno je da je MPO i u ovoj grupi dala pozitivnu korelaciju sa malim gustim HDL česticama. Ukoliko pretpostavimo da su ove frakcije nakon transplantacije i dalje smanjenog kapaciteta, onda je dobijena korelacija logična. Naime, iako je efekat transplantacije poboljšao oksidativni status pacijenata, i dalje postoji mogućnost oksidacije malih HDL subfrakcije. Ako uporedimo koncentraciju MPO kod T grupe u odnosu na KG, vidi se da nema statistički značajne razlike (Slika 21.), međutim obrazac ponašanja MPO i dalje sledi matricu sličnu kao kod pacijenata na dijalizi. Na osnovu ovih rezultata možemo izvesti pretpostavku da, iako transplantacija otklanja efekte uremije, stanje endotela i akumulacija oksidovanih lipida, kao i MPO koja je preuzeta u subendotelno tkivo može uticati na lipoproteinski profil i nakon transplantacije. Postojanje subkliničke ateroskleroze i njen stepen bi bilo korisno određivati i pre i posle transplantacije, kako bi se omogućilo praćenje stanja endotela i smanjila mogućnost razvijanja komplikacija u starijoj životnoj dobi.

U našem istraživanju određivali smo takođe i koncentraciju leptina i adiponektina kod pacijenata sa HBB i nakon transplantacije. Jedan od mehanizama koji indukuje anoreksiju u uslovima inflamacije može biti povišen nivo serumskog leptina. Leptin je peptidni hormon koji se smatra ključnim regulatorom unosa hrane i telesne težine. Koncentracija leptina je proporcionalna količini adipoznog tkiva i povezana je sa centralnom distribucijom masti (167, 170). Sekretiju leptina povećavaju prevelik unos

hrane, prolongirana hiperinsulinemija, kao i glukokortikoidi. Međutim, povišena koncentracija leptina može biti i „indikator rezistencije na leptin“ i, kao takva, faktor rizika za kardiovaskularne bolesti. Tačni uzroci povišenog nivoa leptina u uremiji nisu sa sigurnošću objašnjeni, iako dosadašnji podaci upućuju na mogućnost akumulacije usled sniženog renalnog klirensa, kao i na mogućnost povećane produkcije usled inflamacije (166-168,170). Prethodna istraživanja su pokazala povišene koncentracije leptina kod pacijenata sa HBB, što može doprineti razvoju inflamacije, neuhranjenosti i povećanju rizika od kardiovaskularnih bolesti (166). Rezultati brojnih studija su pokazali značajnu povezanost leptina sa ITM, starošću i polom. Studije su pokazale i pozitivan uticaj leptina na serumsku koncentraciju TG i rezistenciju na insulin, a negativan na lipoproteinski sastav u serumu (166, 167). Iako je primarna funkcija leptina smanjenje potrošnje hrane i telesnu težinu, povezanost leptina sa gojaznošću tumačena je kao stanje “rezistencije na leptin”, dislipidemije i insulinske rezistencije (167, 168). Međutim, u našem istraživanju koncentracija leptina nije se razlikovala između ispitivanih grupa, iako je primećen trend ka višim vrednostima kod dece sa transplantiranim bubregom (Slika 24.), što se može dovesti u vezu sa kontinuiranom imunosupresivnom terapijom i primenom glukokortikoida. Koncentracija leptina bila je u značajnoj negativnoj korelaciji sa dominantnim dijametrom LDL čestica u T grupi, što bi moglo ukazivati na to da, iako transplantacija ima nesumnjive pozitivne efekte na lipidni profil, kod ovih pacijenata ostaju patološki obrasci odnosa između ovog adipocitokina i LDL čestica. Ova hipoteza bi mogla biti naročito značajna ako se uzme u obzir uočeni trend ka povećanim koncentracijama leptina u T grupi, što bi svakako trebalo proveriti u budućim istraživanjima.

Čak i ako je dobro poznato da adiponektin ima kardioprotektivne i antiinflamatorne efekte, uloga ovog adipocitokina kod pacijenata sa HBB je još uvek nejasna. Rezultati prethodnih studija potvrdili su pozitivnu korelaciju između povišene koncentracije adiponektina i progresije HBB. Glavni razlozi za visoke koncentracije adiponektina kod uremičnih pacijenata su smanjenje klirensa adiponektina kod oštećenih bubrega i promene u vezivanju adiponektina za njihove receptore. Kod dece pacijenata sa HBB, povišene koncentracije adiponektina, obično tri puta veće u poređenju sa zdravim osobama, povezane su sa lošim ishodom i povećanim mortalitetom (169). Različite

studije su pokazale da je nizak serumski adiponektin povezan sa povišenom koncentracijom cirkulišućeg ox-LDL kod bolesnika sa dijabetesom tipa 2 i koronarnom arterijskom bolešću (171,172). U studiji Lautamaki et al. (171) adiponektin je bio nezavisan negativni prediktor nivoa ox-LDL, dok su Ribeiro et al. (172) pokazali nezavisnu povezanost ox-LDL sa lipidnim statusom, ali ne i sa adiponektinom kod pacijenata na hemodijalizi. Ipak, u ovoj studiji, i serumski lipidi i adiponektin su bili nezavisni prediktori nivoa ox-LDL. Nedavno je pokazano da su viši nivoi adiponektina povezani sa povoljnijim profilom oksidativnog stresa i nižim nivoima peroksidacije lipida (173). Jedan od ciljeva naše studije je bio da istražimo nivo adiponektina, markera oksidativnog stresa i antioksidativne odbrane u studijskim grupama, kao i da istražimo njegovu povezanost sa HDL i LDL profilom.

Rezultati naše studije nisu pokazali statistički značajnu razliku u koncentraciji adiponektina između ispitivanih grupa, međutim uočen je trend ka nižim nivoima ovog adipocitokina nakon transplantacije (Slika 25.). Osim toga, utvrđena je značajna negativna korelacija adiponektina sa udelom LDL II čestica i pozitivna korelacija sa malim gustim LDL česticama u HBB grupi (Tabela 34.). Iako je uloga adiponektina kod pacijenata na dijalizi još uvek nejasna, na osnovu dobijenih rezultata možemo pretpostaviti da bi uremijska sredina koja je posebno izražena kod pdHBB i D pacijenata mogla indukovati razvoj rezistencije na adiponektin (174).

Merenje cIMT je jednostavna procedura koja pruža dobar uvid u postojanje subkliničke ateroskleroze. Dosadašnjim istraživanjima je utvrđeno da je cIMT povećana kod uremičnih i pacijenata na hemodijalizi u odnosu na zdrave osobe, što ukazuje na postojanje aterosklerotskih promena kod ovih pacijenata. Takođe, primećena je pozitivna korelacija cIMT sa markerima oksidativnog stresa a negativna sa antioksidansima (49). U prethodnim studijama (175, 176) koje su ispitivale cIMT kod pedijatrijskih pacijenata sa transplantiranim bubregom, tradicionalni markeri lipidnog statusa nisu prepoznati kao nezavisni prediktori povećanog cIMT, za razliku od sličnih studije kod odraslih (177). Autori (175, 176) su objasnili takvu nedoslednost činjenicom da su ispitivani pacijenti bili mlađi, sa kraćim trajanjem bolesti bubrega i shodno tome, sa kraćom fazom hiperlipidemije. Rezultati naše studije (Tabela 36.) su pokazali znatno veće cITM na nivou ACC kod pacijenata na dijalizi u odnosu na KG. Takođe, nađena je značajna

pozitivna korelacija sa relativnim udelom LDL I subfrakcija u grupi pacijenata sa HBB u predijaliznom i dijaliznom statusu. U grupi pacijenata sa transplantiranim bubregom je uočena negativna korelacija cIMT sa dominantnim HDL dijametrom kao i pozitivna sa relativnim udelom HDL 3b subfrakcija (Tabela 37.). Možemo pretpostaviti da je kod pacijenata na dijalizi, shodno najvišim vrednostima cIMT, proces ateroskleroze više uznapredovao u odnosu na druge dve ispitivane grupe. Prema dosadašnjim istraživanjima još ne postoje tačne pretpostavke koliko je potrebno vremena nakon transplantacije da se endotel oporavi (178). Prethodni rezultati (179) ukazuju da je i posle transplantacije prisutno povećano stvaranje slobodnih radikala, što sugeriše da transplantacija ne uklanja u potpunosti rizik za razvoj kardiovaskularnih bolesti, već je taj rizik i dalje viši nego u zdravoj populaciji. Dobijene korelacije cIMT sa markerima strukture HDL govore u prilog ovoj pretpostavci.

Konačno, u našoj studiji smo se bavili odnosom MPO/PON1 koji je nedavno predložen kao kompetentni indikator funkcionalnosti HDL čestica (180). Pojedinačno, MPO kao prooksidativni i proinflamatorni agens i PON1 kao snažna komponenta antioksidativnog sistema odbrane, već su prepoznate kao važni posrednici metaboličkih poremećaja povezanih sa HBB (179, 181). Upravo iz ovog razloga značajno je analizirati njihov odnos kod dece sa HBB i nakon transplantacije bubrega, kao i njihovu povezanost s distribucijom HDL subfrakcija. Rezultati naše studije su pokazali da iako nije postojala statistički značajna razlika u MPO/PON1, ipak se uočio trend ka višim vrednostima MPO/PON1 kod pacijenata sa HBB, u odnosu na KG ili T grupu (Slika 26.). Poređenjem podataka između pacijenata sa HBB i pacijenata nakon transplantacije (Slika 27.) dobili smo statistički značajno veće vrednosti MPO/PON1 kod pacijenata u predijaliznom i dijaliznom stadijumu HBB. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da je dominacija prooksidanasa i mogućnosti oksidativnog oštećenja bila izraženija kod HBB nego kod pacijenata nakon transplantacije. Još važnije, izmenjeni nivoi MPO/PON1 impliciraju poremećaje u strukturi i funkciji HDL čestica, što je komplementarno sa uočenim promenama distribucije HDL čestica kod bolesnika sa HBB. Zbog toga, povećan nivo MPO/PON1 koji je uočen kod pacijenata sa HBB potpuno odgovara već utvrđenoj većoj zastupljenosti malih disfunkcionalnih HDL čestica u ovoj grupi. Ispitivanjem korelacije između MPO/PON1 odnosa sa HDL i LDL subfrakcijama (Tabela 38.) uočene su

značajne pozitivne korelacije sa relativnim udelom HDL 3b u HBB grupi i sa relativnim udelom HDL 3a u T grupi, što potvrđuje prethodne rezultate. Osim toga, logistička regresiona analiza utvrdila je da je odnos MPO/PON1 značajan i nezavisan prediktor povećane prisutnosti manjih HDL čestica (Tabela 39.).Haraguchi et al. (181) predložili su odnos MPO/PON1 kao koristan indeks oslabljene funkcionalnosti HDL čestica. U ovoj studiji smo potvrdili tu činjenicu. Iako nismo direktno istraživali funkcionalne osobine HDL, pokazali smo da povećan udeo manjih HDL čestica, koje su kod pacijenata sa HBB i nakon transplantacije najverovatnije disfunkcionalne, prati povećani odnos MPO/PON1. Pošto određivanje distribucije HDL čestica, kao analiza i funkcionalnih svojstava HDL zahtevaju složene procedure koje nisu rutinski dostupne, odnos MPO/PON1 može predstavljati lako dostupnu i korisnu alternativu sposobnu da pruži klinički značajne informacije. Takođe, svi dobijeni rezultati naglašavaju važnost detaljne analize lipidnog statusa koja prevazilazi rutinsko laboratorijsko određivanje, kako kod mladih pacijenata sa HBB, tako i kod dece i adolescenata nakon transplantacije bubrega.

6. ZAKLJUČCI

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

1. Odnos OS/OK je bio statistički značajno viši kod pacijenata na dijalizi i pacijenata nakon transplantacije bubrega u odnosu na kontrolnu grupu što ukazuje na različitu distribuciju masnog tkiva, odnosno na veći udeo visceralnog masnog tkiva kod dece u terminalnim stadijuma HBB u odnosu na zdravu decu i decu iz predijalizne grupe pacijenata što se može dovesti u vezu sa većim rizikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti. Kod dece sa transplantiranim bubregom ovaj povišen odnos može biti i posledica upotrebe imuno supresivne terapije.
2. Dislipidemija je bila prisutna u sve tri grupe pacijenata. Koncentracije triglicerida bile su statistički značajno više u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika.
3. Ispitivanjem parametara oksidativnog stresa utvrđene su značajno veće koncentracije TBKRS i AOPP u sve tri ispitivane grupe pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu. Na osnovu ovih rezultata možemo reći da su pacijenti u sve tri ispitivane grupe bili pod oksidativnim stresom, ali da je intenzitet oksidativnog stresa bio veći kod pacijenata na dijalizi. Značajno niža koncentracija AOPP u grupi transplantiranih pacijenata u odnosu na pacijente na dijalizi ukazuje da proces dijalize može dovesti do intenziviranja oksidativnog stresa, iako je dijaliza neophodan tretman u terapiji terminalne faze HBB.
4. Pozitivne korelacije koncentracije TBKRS sa UH i ApoB u predijaliznoj i dijaliznoj grupi pacijenata, kao i pozitivna korelacija koncentracije TBKRS sa TG kod pacijenata kojima je transplantiran bubreg ukazuju na postojanje direktne veze između intenziteta oksidativnog stresa i dislipidemije kod pacijenata sa HBB, i sinergističkom delovanju ovih komorbiditeta HBB u razvoju kardiovaskularnih bolesti.
5. Ispitivanjem parametara antioksidativne zaštite naši rezultati su dali statistički značajno niže koncentracije ukupnih SH-grupe kod dece u predijaliznoj grupi i dece na dijalizi u odnosu na kontrolnu grupu i grupu dece kojima je transplantiran bubreg.

Na osnovu ovih rezultata smo zaključili, da postoji povećana potrošnja SH-grupa usled pojačanog oksidativnog stresa i dejstva uremijskih toksina u ranijim stadijumima HBB i na kod pacijenata na dijalizi. Značajno snižene vrednosti SOD u predijaliznoj grupi i kod transplantiranih pacijenata su takođe mogla da upute na iscrpljenost sistema antioksidativne zaštite, dok je kod pacijenata na dijalizi aktivnost SOD značajno viša u poređenju sa ostalim grupama čime bi mogli zaključiti da se organizam prilagođava na povećanje produkcije slobodnih radikala koja se dešava posle svakog tretmana dijalizom.

6. Ispitivanjem statusa antioksidativnog enzima PON1 kod dece sa HBB, naši rezultati su pokazali smanjenje POazne aktivnosti kod dece na dijalizi u poređenju sa kontrolnom grupom, ali rezultat nije dostigao statističku značajnost. Pošto su naši rezultati merenja koncentracije HDL-h kao i ApoAI u grupi pacijenata sa HBB slične izmerenim koncentracijama kod zdrave dece možemo zaključiti da su kod ovih pacijenata još uvek očuvani osnovni pokazatelji anti-aterogenih karakteristika HDL-čestica.
7. Utvrđena je značajno viša koncentracija MPO u grupi predijaliznih pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu, ali i u odnosu na ostale ispitivane grupe pacijenata što je najverovatnije posledica hronične inflamacije i oksidativnog stresa kod pacijenata sa HBB.
8. Utvrđena je značajna pozitivna korelacija između koncentracije MPO i TBKRS u grupi pacijenata na dijalizi, što ukazuje na povećanje intenziteta oksidativnog stresa koji se može dovesti u vezu sa većim stepenom lipidne peroksidacije.
9. Iako nije utvrđena značajna razlika u koncentraciji MPO kod dece nakon transplantacije u odnosu na kontrolnu grupu, pokazana je pozitivna korelacija sa AOPP i negativnu sa SH-grupama što ukazuje na postojanje veze oksidativnog stresa i smanjenja antioksidativne zaštite iako su pacijenti na terapiji imunosupresivima.
10. Utvrđena je pozitivna korelacija AIP sa MPO u grupi zdrave dece. U predijaliznoj grupi pacijenata, AIP je dao statistički značajnu pozitivnu korelaciju sa ITM, sistolnim pritiskom i koncentracijom TBKRS a u dijaliznoj grupi je bio u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa dužinom trajanja dijalize, ITM, dijastolnim krvnim pritiskom, koncentracijom MPO i AOPP, čime možemo zaključiti da AIP pokazuje raste i

ukazuje na povećanje aterogenog rizika paralelno sa progresijom bolesti kod dece sa HBB.

11. U grupi pacijenata na dijalizi utvrđena je nezavisna povezanost MPO i AOPP sa AIP, čime možemo pretpostaviti da bi AIP trebalo rutinski analizirati od momenta početka dijalize, zato što ovaj parametar može indirektno da odražava stepen oksidativnog stresa koji je uzrokovalo oslobađanje MPO i rezultujuće povećanje AOPP.
12. U kontrolnoj grupi je utvrđen povišen dijametar LDL čestica, ali je raspodela LDL subfrakcija ukazala na dominaciju malih, gustih LDL čestica. Kod pacijenata je utvrđen manji udeo LDL IV subfrakcija u grupi pacijenata sa transplantiranim bubregom u odnosu na grupe dece u predijaliznom i dijaliznom stadijumu bolesti, zajedno što može ukazati na povoljan efekat transplantacije na lipidni profil.
13. Ispitivanjem karakteristika HDL čestica utvrđen je značajno viši dijametar HDL kod zdrave dece čestica u odnosu na decu u predijaliznom i dijaliznom stadijumu HBB, dok su procentualni udeli malih HDL subfrakcija bili značajno niži kod zdrave dece, u odnosu na pacijente sa HBB. Takođe, utvrđeno je da je raspodela HDL subfrakcija nakon transplantacije značajno povoljnija nego u toku trajanja HBB i približava se raspodeli koja postoji kod zdrave dece, mada i dalje postoje razlike u odnosu na kontrolnu grupu. Iako dobijeni rezultati upućuju na zaključak da se poremećaji homeostaze lipoproteina delimično koriguju nakon transplantacije, kardiovaskularni rizik povezan sa dislipidemijom ne bi trebalo zanemariti čak ni u periodu posle transplantacije, posebno zbog dugotrajne upotrebe imuno supresivnih lekova.
14. Rezultati korelacione analize ukazuju na odstupanja od uobičajenih obrazaca odnosa između antropometrijskih parametara i ispitivanih karakteristika lipoproteinskih subfrakcija u mlađoj populaciji, posebno kod dece u predijaliznom i dijaliznom stadijumu HBB, što upućuje na potrebu za dodatnim oprezom prilikom interpretacije dobijenih rezultata rutinskog i proširenog lipidnog profila u ovoj osetljivoj populaciji.
15. Utvrđena je pozitivna korelacija parametara antioksidativne zaštite sa malim LDL i HDL subfrakcijama u kontrolnoj grupi, što nas upućuje na zaključak da je usled povećanja udela čestica osetljivijih na oksidativnu modifikaciju došlo kompenzatornog odgovora organizma. Kod ispitanika u predijaliznom i dijaliznom

stadijumu HBB, kao i kod pacijenata sa transplantiranim bubregom koncentracija MPO je pozitivno korelirala sa malim LDL i HDL česticama, sugerišući oksidativnu modifikaciju ovih subfrakcija čime se potencira aterogeneza.

16. Ispitivanjem koncentracije leptina nismo utvrdili značajnu razliku između ispitivanih grupa, ali je primećen trend ka višim nivoima kod dece sa transplantiranim bubregom.
17. Nije utvrđena značajna razlika u koncentraciji adiponektina između ispitivanih grupa, ali je uočen trend ka nižim koncentracijama ovog adipocitokina kod dece nakon transplantacije.
18. Utvrđene su više vrednosti zadebljanja intime medije karotidnih arterija kod pacijenata na dijalizi u odnosu na zdravu decu. Osim toga, kod dece sa transplantiranim bubregom zadebljanje intime medije karotidnih arterija bilo je veće nego u kontrolnoj grupi, iako statistička značajnost nije postignuta. Na osnovu dobijenih rezultata možemo zaključiti da je kod pacijenata na dijalizi proces ateroskleroze više napredovao, kao i da transplantacija ne uklanja u potpunosti rizik za razvoj kardiovaskularnih bolesti.
19. Dobijene značajno veće vrednosti MPO/PON1 kod pacijenata u predijaliznom i dijaliznom stadijumu HBB u odnosu na decu sa transplantiranim bubregom. Logistička regresiona analiza pokazala je da je odnos MPO/PON1 značajan i nezavisan prediktor povećanja udela manjih HDL čestica u ukupnom HDL profilu. U tom smislu, odnos MPO/PON1 bi mogao biti koristan pokazatelj oslabljene funkcionalnosti HDL čestica i može predstavljati lako dostupnu i korisnu alternativu sposobnu da pruži klinički značajne informacije vezane za lipidni status pedijatrijskih pacijenata.

7. LITERATURA

1. Matovinović MS. Pathophysiology and Classification of Kidney Diseases. *EJIFCC*. 2009;20(1):2-11.
2. Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, et al. Definition and classification of chronic kidney disease: A position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* 2005;67:2089-2100.
3. US Renal Data System (USRDS). 2010 Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States. Bethesda, Md: National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2010.
4. Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet*. 2013;382:260-272
5. Radhakrishnan J, Remuzzi G, Saran R, et al. Taming the chronic kidney disease epidemic: a global view of surveillance efforts. *Kidney Int*. 2014;86(2):246–250
6. Feehally J. Health burden of kidney disease recognized by UN. *Nat Rev Nephrol*. 2012;8:12-13.
7. NKF.K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002;39: S1-266.
8. Ardissino G, Dacco V, Testa S, Bonaudo R, Claris-Appiani A, Taidi E, Marra G, Edefanti A, Sereni F. Epidemiology of chronic renal failure in children: data from the italKid project. *Pediatrics* 2003;111:e382-e387.
9. Guyton AC, Hall JE. Urine formation by the kidneys: I. Glomerular filtration, renal blood flow, and their control. In: Guyton AC, Hall JE. *Textbook of medical physiology*, 11th edn. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006;307-318.
10. Koraćević D, Bjelaković G, Đorđević VB, Nikolić J, Pavlović DD, Kocić G. *Biohemija tkiva i telesnih tečnosti*, Biohemija. Beograd: Savremena administracija, 1996;970.
11. Gwinnutt M, Gwinnutt J. Renal physiology-part 2. Anaesthesia tutorial of the week 274. [Accessed on April 22, 2014]
Available from: <http://www.wfsahq.org/anaesthesia-tutorial-of-the-week>.

12. Steemit.com/health/@emilyberrett/2mc7wi-kidney-failure-treatment-healthysi-com/9, February 2017 [Accessed 05,May 2018] Available from:
<http://www.healthysi.com/chronic-kidney-disease-healthysi-com>
13. The Editors of Encyclopaedia BritannicaNephronEncyclopedia Britannica/July 03, 2015[**Accessed on April 03,2018**] Available from:<https://www.britannica.com/science/nephron>
14. Silverthorn, D.U.: Human Physiology, 3rd edition. 2004.
15. Morgan et al. Renal physiology & anesthesia, Chapter 31. In: Morgan GE, Mikhail MS, Murray MJ. Clinical anesthesiology, 4th edn. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2006;727.
16. Sedlak Vadok V. Funkcijosko ispitivanje uropoetskog Sistema, Poglavlje 11. Babić Lj, Borota R, Lučić A.,8. Izdanje. Priručnik praktičnih i seminarskih vežbi patološke fiziologije . Novi Sad: Medicinski fakultet,2004;529.
17. Dagher L, Moore K.The hepatorenal syndrome Gut 2001;49:729-737.
18. Laterza OF,Price CP,Scott MG. Cistatin C an improved estimator of glomerular filtration rate?Clin Chem 2002;48:699-707.
19. Hoek FJ,Kemperman FAW,Krediet RT.A comparison between cystatin C,plasma creatinin and the Cockcroft –Gault formula for estimation ef glomerular filtration rate.Nephrol Dial Transplant.2003;18_2024-2031.
20. Harmonen A,Lehtimaki T,Korpela M,Turjanmaa V,Saha H,Diagnostic occuracies of plasma creatinin, cystatin C and glomerular filtration rate calculated by Cockcroft-Gault and Levey (MDRD) formulas. Clin Chem 2003;49:1223-1225.
21. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse, Ministarstvo zdravlja Republike Srbije. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za prevenciju, dijagnostifikovanje i lečenje hronične bolesti bubrega. Beograd 2013.
22. Peco-Antić A, Bogdanović R, Golubović E, Đapić M. Hronična bubrežna insuficijencija kod dece u Jugoslaviji. Srpski arhiv za celokupno lekarstvo 2003;131(1-2):5-9.

23. Peco-Antić A, Bogdanović R, Paripović D, Paripović A, Kocev N, Golubović E, Milošević B. Epidemiology of chronic kidney disease in children in Serbia. *Nephrol Dial Transpl.* 2012;27: 1978–1984
24. Becherucci F, Roperto RM, Materassi M, Romagnani P. Chronic kidney disease in children. *Clin Kidney J.* 2016;9(4):583–591.
25. Schlondorff DO. Overview of factors contributing to the pathophysiology of progressive renal disease. *Kidney Int* 2008;74:860-6.
26. Segerer S, Kretzler M, Strutz F, et al. Mechanisms of tissue injury and repair in renal diseases. In: Schrier R (ed). *Diseases of the Kidney and Urinary Tract.* Lippincott, Philadelphia 2007;Chapter 57.
27. Brenner BM, Garcia D, Anderson S. Glomeruli and blood pressure: Less of one, more the other? *Am J Hypertens.* 1998:335-347
28. Fuster V, Fallon JT, Badimon JJ, Nemerson Y. The unstable atherosclerotic plaque: clinical significance and therapeutic intervention. *Thromb Haemost* 1999;78:247–255, Review
29. Roy-Chaudhury P, Wu B, King G, et al. Adhesion molecule interaction in human glomerulonephritis: importance of the tubulointerstitium. *Kidney Int* 1996;49:127-34.
30. Fioretto P, Sutherland DE, Najafian B, et al. Remodeling of renal interstitial and tubular lesions in pancreas transplant recipients. *Kidney Int* 2006;69:907-12.
31. Veteriankey/diseasesoftheglomerulus/10 July,2016/[Accessed on April 02,2018] Available from: <https://veteriankey.com/diseases-of-the-glomerulus>
32. Gamulin S, Marušić M, Kovač Z. *Patofiziologija.* Medicinska naklada, Zagreb 2005;
33. Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson J, Loscalzo J. eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine, 18e.* New York, NY: McGraw-Hill; 2012
34. thegolfclub.info/related/kidney-glomerular-sclerosis.html[Accessed on 22,May 2018] Available from: <https://www.hindawi.com/journals/crp/2011/963517/fig2/>
35. Becherucci F, Roperto RM, Materassi M, Romagnani P. Chronic kidney disease in children. *Clinical Kidney Journal.* 2016;9(4):583-591.

36. James C. M. Chan, Debra M. Williams, Karl S. Roth. Kidney failure in infants and children. *Pediatr Rev.* 2002 Feb; 23(2): 47–60.
37. Kuizon BD, Salusky IB. Growth retardation in children with chronic renal failure. *J Bone Miner Res.* 1999 Oct; 14(10):1680-90.
38. Peco-Antić A . Niski rast djece s kroničnom bolesti bubrega. *Paediatr Croat.* 2015; 59 (Supl 1): 31-36.
39. Cannata-Andia JB, Carrera F. The pathophysiology of secondary hyperparathyroidism and the consequences of uncontrolled mineral metabolism in chronic kidney disease. *NTD Plus* 2008; 1:i2-i6
40. Kaspar AG, Bholah R, Bunchman TE. A Review of Pediatric Chronic Kidney Disease. *Blood Purif.* 2016; 41(1-3):211-7.
41. National kidney Foundation Task force on Cardiovascular disease (1998) Controlling the epidemic of cardiovascular disease in chronic renal disease: what do we know? What do we need to learn? Where do we go from here? National Kidney Foundation Task Force on Cardiovascular Disease. *Am J Kidney Dis.* 1998 Nov; 32(5):853-906.
42. National Kidney Foundation. Clinical Practice Guidelines for Managing Dyslipidemias in Chronic Kidney Disease. K/DOQI guidelines. *Am J Kidney Dis* 2003; 41(Suppl 3):S22–S38 .
43. Querfeld U, Salusky IB, Nelson P, Fine RN. Hyperlipidemia in pediatric patients undergoing peritoneal dialysis. *Pediatr Nephrol* 1988; 2:447–452.
44. Querfeld U . Disturbances of lipid metabolism in children with chronic renal failure. *Pediatr Nephrol* 1998; 7:749–757.
45. Peco-Antić, A. and Paripović, D. Renal Hypertension and Cardiovascular Disorder in Children with Chronic Kidney Disease Faculty of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia. *Srpski arhiv za celokupno lekarstvo* 2014; 142, 113-117.
46. Ganau A, Devereux RB, Roman MJ, de Simone G, Pickering TG, Saba PS, Vargiu P, Simongini I, Laragh JH . Patterns of left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol* 1992; 19:1550–1558 .

47. Swynghedauw B . Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev* 1999; 79:215–262.
48. Paulino EC, Stil A, Jancar S. Effect of endothelins on human neutrophil activation by immune complexes. *Int Immunopharmacol* 2006; 6:1119- 1125
49. Dursun B, Dursun E, Suleymanlar G et al. Carotid artery intima-media thickness correlates with accelerated atherosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:1697-1703.
50. McCullough PA, Verrill TA. Cardiorenal interaction: appropriate treatment of cardiovascular risk factors to improve outcomes in chronic kidney disease. *Postgraduate Medicine* 2010; 122: 25–34.
51. Sen CK. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Med Sci Sports Exerc* 2001; 33 (3): 368-70.
52. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49 (3): 481-93.
53. Kurutas EB, Ciragil P, Gul M, Kilinc M. The effects of oxidative stress in urinary tract infection. *Mediators of inflammation* 2005; 4:242-244.
54. Krotz F, Sohn H, Pohl U. Reactive oxygen species: players in the platelet game. *Artheroscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1988-1996.
55. Kellz F J. Oxidative stress – its role in air pollution and adverse health effects. *Occup Environ Med* 2008; 60: 612-613.
56. CombinatorialChemistry/HighThroughputScreening/Combinatorial Antioxidants/6, July 2006[Accessed on 15, May 2018] Available from: <http://kisisel.ankara.edu.tr/pharmacy.ankara.edu.tr/sibel/antiox.htm>
57. Nohl H, Kozlov AV, Gille L, et al. Cell respiration and formation of reactive oxygen species: facts and artifacts. *Biochem Soc Trans* 2003; 31 (6): 1308-11.
58. Lloyd RV, Hanna PM, Mason RP. The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. *Free Radic Biol Med* 1997;22:885–8.
59. Jenkins RR. Free radical chemistry: relationship to exercise. *Sports Med* 1988; 5: 156- 70.

60. Mimica-Dukić N, Simin N, Svirčev E, Orčić D, Beara I, Lesjak M, Božin B. The Effect of Plant Secondary Metabolites on Lipid Peroxidation and Eicosanoid Pathway, Lipid Peroxidation. InTech 2012:1-5.
61. lookfeelbettertoday.com/free-radicals-enemies-within-formed/20,October2016 [Accessed 18,May 2018] Available from: <http://www.lookfeelbettertoday.com/free-radicals-enemies-within-formed/>
62. Martinovic J, Dopsaj V, Dopsaj M, Kotur-Stevuljevic J, Vujovic A, Stefanovic A, Nesic G. Long-term effects of oxidative stress in volleyball players. Int J Sports Med 2009 ; 30 : 851 – 856.
63. 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.
64. Marklund S. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. Proc Natl Acad Sci U S A 1982;79:7634–8.
65. Weisiger RA, Fridovich I. Mitochondrial superoxide dismutase: site of synthesis and intramitochondrial location. J Biol Chem 1973;248:4793–6.
66. Holben DH, Smith AM. The diverse role of selenium within selenoproteins: a review. J Am Diet Assoc 1999;99:836–43.
67. Kirkman HN, Galiano S, Gaetani GF. The function of catalase-bound NADPH. J Biol Chem 1987;262:660–5.
68. Kotur-Stevuljevic J, Memon L, Stefanovic A, Spasic S, Spasojevic-Kalimanovska V, Bogavac-Stanojevic N et al. Correlation of oxidative stress parameters and inflammatory markers in coronary artery disease patients. Clin Biochem 2007;40:181-7 65.
69. Kotur-Stevuljevic J, Spasic S, Stefanovic A, Zeljkovic A, Bogavac-Stanojevic N, Kalimanovska-Ostric D, et al. Paraoxonase-1 (PON1) activity, but not PON1Q192R phenotype, is a predictor of coronary artery disease in a middle-aged Serbian population. Clin Chem Lab Med 2006;44:1206–13.
70. Meneghini R. Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. Free Radic Biol Med 1997; 23 (5): 783-92.

71. .Groussard C, Rannou-Bekono F, Machefer G, et al. Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. *Eur J Appl Physiol* 2003; 89: 14-20.
72. <http://www.graphicsbuzz.com/graphics/superoxide-graphics-2edb03.html>
73. Stocker JF. Role of oxidative modification in atherosclerosis. *Physiol rev* 2004;107:435-447
74. Winterbourn C, Vissers M, Kettle A. Myeloperoxidase. *Curr Opin Hematol* 2000;7:53-58
75. Krauss R. Lipids and Lipoproteins in Patients With Type 2. *Diabetes Diabetes Care* 2004; 27:1496–1504
76. Peskin AV, Winterbourn CC. *Free radical biology medicine* 2004; 37(10):1622-1630
77. Kontush A, Chapman MJ. Functionally Defective High-Density Lipoprotein: A New Therapeutic Target at the Crossroads of Dyslipidemia, Inflammation, and Atherosclerosis. *Pharmacol Rev* 2006, 58 (3) 342-374
78. Tietge U. Hyperlipidemia and cardiovascular disease – inflammation, dyslipidemia and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2014; 25: 94-5.
79. Ginsberg HN. Lipoprotein physiology. *Endocrinol Metab Clin North Am* .1998.27:503–519
80. Havel RJ, Kane JP. Introduction: structure and metabolism of plasma lipoproteins. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th edn. McGraw-Hill, 2001: 2705–2716
81. Srinivasan SR, Myers L, Berenson GS. Distribution and correlates of non-high-density lipoprotein cholesterol in children: the Bogalusa Heart Study. *Pediatrics* 2002;110:e29
82. Strong JP, Malcom GT, McMahan CA, Tracy RE, Newman WP 3rd, Herderick EE, Cornhill JF. Prevalence and extent of atherosclerosis in adolescents and young adults: implications for prevention from the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth Study. *JAMA* 1999;281:727–735
83. Jarvisalo MJ, Jartti L, Nanto-Salonen K, Irjala K, Rönnemaa T, Hartiala JJ, Celermajer DS, Raitakari OT. Increased aortic intima-media thickness: a marker

- of preclinical atherosclerosis in high-risk children. *Circulation* 2001;104:2943–2947
84. Kavey RE, Allada V, Daniels SR, Hayman LL, McCrindle BW, Newburger JW, Parekh RS, Steinberger J. Cardiovascular risk reduction in high-risk pediatric patients: a scientific statement from the American Heart Association Expert Panel on Population and Prevention Science; the Councils on Cardiovascular Disease in the Young, Epidemiology and Prevention, Nutrition, Physical Activity and Metabolism, High Blood Pressure Research, Cardiovascular Nursing, and the Kidney in Heart Disease; and the Interdisciplinary Working Group on Quality of Care and Outcomes Research: endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circulation* 2006;114:2710–2738
 85. Hevonoja T, Pentakainen MO, Hyvonen MT, Kovanen PT, Ala-Korpela M. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochem Biophys Acta* 2000;1488:189-210
 86. Krauss RM, Burke DJ. Identification of multiple subclasses of plasma low lipoproteins in normal humans. *J Lipid Res* 1982;23:97-104
 87. Gardner CD, Fortmann SP, Krauss RM. Association of small low-density lipoprotein particles with the incidence of coronary artery disease in men and women. *J Am Med Assoc* 1996; 276:875–881.
 88. Gaut JP, Heinecke JW. Mechanisms for oxidizing low-density lipoprotein: insights from patterns of oxidation products in the artery wall and from mouse models of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 2001;11:103–112.
 89. Feretti G, Bacchetti T, Negre-Salvayre A, Salvayre R, Dousset N, Curatola G. Structural modifications of HDL and functional consequences. *Atherosclerosis* 2006; 184:1-7.
 90. Kontush A, Chapman J. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation and atherosclerosis. *Pharmacol Rev* 2006; 58:342–374.
 91. Nanjee MN, Cooke CJ, Won JS, Hamilton RL, Olszewski WL, Miller NE. Composition and ultrastructure of size subclasses of normal human peripheral

- lymph lipoproteins: quantification of cholesterol uptake by HDL in tissue fluids. *J Lipid Res* 2001;42:639-648
92. Le Goff W, Guerin M, Chapman MJ. Pharmacological modulation of cholesteryl ester transfer protein, a new therapeutic target in atherogenic dyslipidemia. *Pharmacol Ther* 2004;101:17-38
 93. Cheung AK, Wu LL, Kablitz C, Leyboldt JK . Atherogenic lipids and lipoproteins in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1993;22:271–276
 94. Chen GC,Liu W,Duchateau P,Allaart J,Hamilton RL,Mendel CH,Lau K,Hardmann DA,Frost PH,Malloy MJ,Kane JP.Conformational differences in human apolipoprotein B-100 among subspecies of low density lipoproteins (LDL). Association of altered proteolytic accessibility with decreased receptor binding of LDL subspecies from hypertriglyceridemic subjects.*J Biol Chem* 1994;269:29121-29128
 95. Tribble DL,Holl LG,Wood PD,Krauss RM. Variations in oxidative susceptibility among six low density lipoprotein subfractions of differing density and particle size. *Atherosclerosis* 1992;93:89-99
 96. Tribble DL,Rizzo M,Chair A,Lewis DM,Blanche PJ,Krauss RM.Enhanced oxidative susceptibility and reduced antioxidant content of metabolic precursors of small dense low density lipoproteins.*Am J Med* 2001;110:103-110
 97. Tso,panidi EN,Brinkmeier MS,Fotidou EH,Giakoumi SM,Kypreos KE.HDL biogenesis and functions:role of HDL quality and quantity in atherosclerosis.*Atherosclerosis* 2010;208:3-9
 98. Delpotre C, Van Antwerpen P,Wanhamme L,Roumequere T,Boudgeltia KZ. Low –density lipoprotein modified by myeloperoxidase in inflammatory pathways and clinical studies.*Mediat Inflamm* 2013; 1-12
 99. Huang Y et al.Myeloperoxidase, paraoxonase-1, and HDL form a functional ternary complex. *J Clin Invest.* 2013; 123(9): 3815–3828.
 100. Mekki K, Bouchenak M, LamriM, Remaoun M, Belleville J. Changes in plasma lecithin: cholesterol acyltransferase activity HDL(2), HDL(3) amounts and compositions in patients with chronic renal failure after different times of hemodialysis. *Atherosclerosis.* 2002;162:409–417

101. Yoshida H, Kisugi R. Mechanisms of LDL oxidation. *Clin Chim Acta* 2010;320:915-924
102. Florens W, Calzada C, Lyasko E, Juillard L, Soulage C. Modified lipids and lipoproteins in chronic kidney disease: a new class of uremic toxins. *Toxins* 2016;8:376-401
103. Libetta C, Sepe V, Esposito P, Gall F, Canton D. Oxidative stress and inflammation: implications in uremia and hemodialysis. *Clin Biochem* 2011;44:1189-1198
104. Batista MC, Welty FK, Diffenderfer MR, Sarnak MJ, Schaefer EJ, Lamon-Fava S, Asztalos BF, Dolnikowski GG, Brousseau ME, Marsh JB. 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
105. 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
106. Dantoine TF, Debord J, Charmes JP, Merle L, Marquet P, Lachatre G, Leroux-Robert C. Decrease of serum paraoxonase activity in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:2082–2088
107. Kocak H, Coken K, Yavuy A, Yacel S, Gurkan A, Erdogan O, Ersoy F, Yakupoglu G, Demirbas A, Tuncer M. Effect of renal transplantation on endothelial function in hemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:203-207
108. Kaspar CD, Bholah R, Bunchman T. A review of pediatric chronic kidney disease. *Blood Purif* 2016;41:211-217
109. Nuttall FQ. Body Mass Index: Obesity, BMI and health. *Nutr Today*. 2015;50(3): 117-128
110. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse, Ministarstvo zdravlja Republike Srbije. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za arterijsku hipertenziju. Beograd 2011.
111. Fukuyama N, Naoto K et al. Validation of the Friedewald equation for evaluation of plasma LDL cholesterol. *J Clin Biochem Nutr*. 2007;43(1):1-5

112. Girotti MJ, Khan N, Mc Lellan BA. Early measurement of systemic lipid peroxidation products in plasma of major blunt trauma patients. *J Trauma* 1991; 31: 32-5
113. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction, *Handbook of methods for oxygen radical research*. Press 1985;1:123-132
114. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeille re –Blandin C. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996;49:1304.
115. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972;247:3170-3175.
116. Ellman G. Tissue sulfhydryl groups, *Arch Biochem Biophys* 1955;82:70-77.
117. Richter R, Furlong CE. Determination of paraoxonase (PON1) status requires more than genotyping. *Pharmacogenetics* 1999;9:745-753.
118. Demirdogen BC, Turkangolu A, Bek S, Sansigolu Y, Demirkaja S, Vural O, Arinc E, Adali O. Paraoxonase arylesterase ratio, PON1 192Q R polymorphism and PON1 status are associated with increased risk of ischemic stroke. *Clin Biochem* 2008;41:1-9. 93.
119. Androutsopoulos VP, Kanavouras K, Tsatsakis AM. Role of paraoxonase 1 (PON1) in organophosphate metabolism: Implications in neurodegenerative diseases. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011; 256:418-424.
120. Kotur-Stevuljević J. Polimorfizam paraoksonaze 1 kod pacijenata sa angiografski dokazanom koronarnom bolešću. Doktorska disertacija, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2007.
121. Rainwater DL. Electrophoretic separation of LDL and HDL subclasses. *Methods Mol Biol* 1998;110:137-151
122. Rainwater DL, Moore PH, Shelledy WR, Dyer TD. Characterisation of a composite gradient gel for the electrophoretic separation of lipoproteins. *J Lipid Res* 1997; 38:1261-1266
123. Zeljkovic A, Spasojevic-Kalimanovska V, Vekic J, Jelic-Ivanovic Z, Topic A, Bogavac-Stanojevic N, Spasic S, Vujovic A, Kalimanovska-Ostic D. Does

- simultaneous determination of LDL and HDL particle size improve prediction of coronary artery disease risk? *Clin Exp Med.* 2008;8:109-116
124. Rees L, Schaefer F, Schmitt CP, Shroff R, Warady B. Chronic dialysis in children and adolescents: challenges and outcomes. *Lancet.* 2017; 1:68.
 125. Janssen I, Katzmarzyk PT, Ross R. Body mass index, waist circumference and health risk: evidence in support of current National Institutes of Health guidelines. *Arch Intern Med.* 2002;162:2074–9.
 126. Burton J, Gray LJ, Webb DR, Davies MJ, Khunti K, Crasto W, Carr SJ, Brunskill NJ. Association of anthropometric obesity measures with chronic kidney disease risk in a non diabetic patient population. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;0:1–7.
 127. Avner ED, Harmon WE, Niaudet P. *Pediatric Nephrology* 5^{ed}. Lippincott Williams and Wilkins. 2004
 128. Stern A, Sachdeva S, Kapoor R, Singh J, Sachdeva S. High blood pressure in dialysis patients: cause, pathophysiology, influence on morbidity, mortality and management. *J Clin Diagn Res.* 2014;8(6):ME01-4.
 129. Wong CJ, Moxey-Mims M, Jerry-Fluker J, Warady BA, Furth SL. CKD in children Prospective Cohort Study: a review of current findings. *Am J Kidney Dis* 2012; 60: 1002-1011.
 130. Khurana M, Silverstein DM. Etiology and management of dyslipidemia in children with chronic kidney disease and end-stage renal disease. *Pediatr Nephrol.* 2015; 30: 2073-2084.
 131. Daenen K, Andries A, Mekahli D, Van Schepdael A, Jouret F, Bammens B. Oxidative stress in chronic kidney disease. *Pediatric Nephrology.* 2019; 34: 975-991.
 132. 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;15:538-48
 133. Nguyen-Khoa T, Massy ZA, De Bandt JP, Kebede M, Salama L, Lambrey G, Witko-Sarsat V, Drüeke TB, Lacour B, Thévenin M. Oxidative stress and

- haemodialysis: role of inflammation and duration of dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant*. 2001; 16: 335–340.
134. Balcerzyk A, Grzelak A, Janaszewska A, Jakubowski W, Koziol S, Marszalek M, Rychlik B, Soszynski M, Bilinski T, Bartosz G. Thiols as major determinants of the total antioxidant capacity. *Bio Factors* 2003; 17:75-82
 135. Mates J.M, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*. 1999; 32: 595-603
 136. Solati M, Mahboobi HR. Paraoxonase enzyme activity and dyslipidemia in chronic kidney disease patients. *J Nephropathol*. 2012;1(3):123–125.
 137. Prakash M, Phani N, Kavva R, Supriya M. Paraoxonase: Its anti-atherogenic role in chronic renal failure. *Indian J Nephrol*. 2010;20:9–14. 25.
 138. Dirican M, Akca R, Sarandol E, Dilek K. Serum paraoxonase activity in uremic predialysis and hemodialysis patients. *J Nephrol*. 2004;17:813–8.
 139. Saeed SA, Elsharkawy M, Elsaheed K, Fouda O. Paraoxonase-1 (PON1) activity as a risk factor for atherosclerosis in chronic renal failure patients. *Hemodial Int* .2008;12(4):471–9.
 140. Ece A, Atamer Y, Gurkan F, Davutoglu M, Bilici M, Tutanc M. Paraoxonase, anti-oxidant response and oxidative stress in children with chronic renal failure. *Pediatr Nephrol*.2006;21(2):239–45.
 141. Holzer M, Schilcher G, Curcic S. Dialysis modalities and HDL composition and function. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26:2267-76
 142. Soran H, Schofield JD, Durrington PN. Antioxidant properties of HDL. *Front Pharmacol*. 2015;6:222.
 143. Waradz B, Hebert D, Sullivan E. Renal transplantation, chronic dialysis and chronic renal insufficiency in children and adolescents. *Pediatric Nephrol*. 1997;11:49-64
 144. Wu CC, Chen JS. Myeloperoxidase serves as a marker of oxidative stress during single haemodialysis session using two different biocompatible dialysis membranes. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:1134–1139.

145. Zhang R, Brennan ML, Fu X, Aviles RJ, Pearce GL, Penn MS, Topol EJ, Sprecher DL, Hazen SL. Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *JAMA* .20012;86:2136–2142
146. Rees M, Dang L , Thai T, Owen DM, Malle E, Thomas SR. Targeted subendothelial matrix oxidation by myeloperoxidase triggers myosin II-dependent de-adhesion and alters signaling in endothelial cells. *Free Radic Biol and Med*.2012;53:.2344–2356,.
147. Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW. Hypochlorous acid generated by myeloperoxidase modifies adjacent tryptophan and glycine residues in the catalytic domain of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin). An oxidative mechanism for restraining proteolytic activity during inflammation, *Journ of Biol Chem*.2003;31:28403–28409.
148. Meuwese MC¹, Stroes ES, Hazen SL, van Miert JN, Kuivenhoven JA, Schaub RG, Wareham NJ, Luben R, Kastelein JJ, Khaw KT, Boekholdt SM. Serum myeloperoxidase levels are associated with the future risk of coronary artery disease in apparently healthy individuals: the EPIC-Norfolk prospective population study. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50:159–165.
149. Kusic B, Miric D, Dragojevic I, Rasic J, Popovic Lj . Role of myeloperoxidase in patients with chronic kidney disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2016:1069743.
150. Rao M A, Anand U, Anand CV. Myeloperoxidase in chronic kidney disease. In *Jour of Clin Biochem*.2011; 26:28–31.
151. Gozdzikiewicz J, Borawski J, Koc-Zorawska E, Mysliwiec M. Effects of enoxaparin on myeloperoxidase release during hemodialysis. *Hemodial Internat*.2014; 18:819–824.
152. Dobiášová M, Frohlich J. The plasma parameter log (TG/HDL-C) as an atherogenic index: correlation with lipoprotein particle size and esterification rate in apoB-lipoprotein-depleted plasma (FER(HDL)). *Clin Biochem*.2001;34:583-8.
153. Dobiasova M. AIP—atherogenic index of plasma as a significant predictor of cardiovascular risk: from research to practice. *VnitrLek* 2006; 52(1):64–71.

154. Lee MJ, Park JT, Han SH, Kim Y, Kim Y, Yang CW, Kim N, Kang S, Kim HJ, Yoo T. The atherogenic index of plasma and the risk of mortality in incident dialysis patients: Results from a nationwide prospective cohort in Korea. *PLoS ONE*.2017; 12:e0177499.
155. Yildiz G, Duman A, Aydin H, Yilmaz A, Hr E, Magden K, Cetin G, Candan F Evaluation of association between atherogenic index of plasma and intima-media thickness of the carotid artery for subclinic atherosclerosis in patients on maintenance hemodialysis.*Hemodial Int*. 2013;17(3):397-405.
156. Dvořáková HM, Szitányi P, Dvořák P, Janda J, Seeman T, Zieg J, Lánská V, Kotaška K, Piřha *JPhysiol Res*. Characteristics of low-density and high-density lipoprotein subclasses in pediatric renal transplant recipients.2012; 61(1):53-61.
157. Sanches FM, Avesani CM, Kamimura MA, et al. Waist circumference and visceral fat in CKD: a cross-sectional study. *Am J Kidney Dis* 2008; 52:66–73.
158. Vaziri ND. Role of dyslipidemia in impairment of energy metabolism, oxidative stress, inflammation and cardiovascular disease in chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol*. 2014;18:265–8.
159. Thompson M, Ray U, Yu R, Hudspeth A, Smillie M, Jordan N. Kidney Function as a Determinant of HDL and Triglyceride Concentrations in the Australian Population. *J Clin Med*. 2016;5:E35.
160. Spinelli GA, Felipe CR, Park SI, Mandia-Sampaio EL, Tedesco-Silva H, Medina-Pestana JO. Lipid profile changes during the first year after kidney transplantation: risk factors and influence of the immunosuppressive drug regimen. *Transplant Proc*. 2011;43:3730–7.
161. Gill JS. Cardiovascular disease in transplant recipients: current and future treatment strategies. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3:S29–37.
162. Halfon N, Verhoef PA, Kuo AA. Childhood antecedents to adult cardiovascular disease. *Pediatr Rev*. 2012;33:51–60.
163. Taşçılar ME, Özgen T, Cihan M, Abacı A, Yeşilkaya E, Eker I, Serdar M. The effect of insulin resistance and obesity on low-density lipoprotein particle size in children. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2010;2:63-66.

164. Tsompanidi EM, Brinkmeier MS, Fotiadou EH, Giakoumi SM, Kypreos KE.HDL biogenesis and functions: role of HDL quality and quantity in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2010 ; 208(1):3-9.
165. Zeljkovic A, Vekic J, Spasojevic-Kalimanovska V, Jelic- Ivanovic Z, Peco-Antic A, Kostic M.Vasic D.Spasic S.Characteristics of low-density and high-density lipoprotein subclasses in pediatric renal transplant recipients. *Transpl Int*. 2011;24:1094–102.
166. Nehus E, Furth S, Warady B, Mitsnefes M. Correlates of leptin in children with chronic kidney disease. *J Pediatr*. 2014;165:825-9.
167. Chu NF, Spiegelman D, Hotamisligil GS, Rifai N, Stampfer M, Rimm EB.Plasma insulin, leptin, and soluble TNF receptors levels in relation to obesity-related atherogenic and thrombogenic cardiovascular disease risk factors among men.*Atherosclerosis*. 2001; 157:495-503
168. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL.Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans.*N Engl J Med*. 1996; 334:292-5
169. Matsumoto M, Ishikawa S, Kajii E. Adiponectin and noncardiovascular death: a nested case-control study. *Metabolism* 2008; 57: 811–8. Br 170
170. Wannamethee SG, Tchernova J, Whincup P, Lowe GD, Kelly A, Rumley A, Wallace AM, Sattar N.Plasma leptin: associations with metabolic, inflammatory and haemostatic risk factors for cardiovascular disease.*Atherosclerosis*. 2007;191(2):418-26.
171. Lautamäki R, Rönnemaa T,Huupponen R et al.Low serum adiponectin is associated with high circulating oxidized low-density lipoprotein in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *Metab Clin Exp*.2007; 56:881–886.
172. Ribeiro S, Faria MDS,Silva G et al.Oxidized low-density lipoprotein and lipoprotein(a) levels in chronic kidney disease patients under hemodialysis: influence of adiponectin and of a polymorphism in the apolipoprotein(a) gene.*Hemodial Inter*.2012;16: 481–490.

173. Gustafsson S, Lind L, Söderberg S, Zilmer M, Hulthe J, Ingelsson E. Oxidative stress and inflammatory markers in relation to circulating levels of adiponectin. *Obes.* 2013;21: 1467–1473.
174. Cantarin M.C, Waldman S, Doria C, Frank A, Maley W.R, Ramirez C.B, Keith S, Falkner B. The adipose tissue production of adiponectin is increased in end-stage renal disease. *Kidney Int.* 2013;83:487–494. Br 174
175. Mitsnefes MM, Kimball TR, Witt SA, Glascock BJ, Khoury PR, Daniels SR. Abnormal carotid artery structure and function in children and adolescents with successful renal transplantation. *Circulation* 2004; 110: 97.
176. Basiratnia, M, Fazel, M, Lotfi, M, et al. Subclinical atherosclerosis and related risk factors in renal transplant recipients. *Pediatr Nephrol* 2010; 25: 343.
177. Jogestrand, T, Fehrman – Ekholm, I, Angelin, B, Berglund, L, Gäbel, H. Increased prevalence of atherosclerotic wall changes in patients with hyperlipidaemia after renal transplantation. *J Intern Med* 1996; 239: 177.
178. Waradz B, Hebert D, Sulliva E, Renal transplantation, chronic dialysis and chronic renal insufficiency in children and adolescents, 1995, *Pediatric Nephrol*, 1997; 11:49-64.
179. Kotur-Stevuljević J, Peco-Antić A, Spasić S, Stefanović A, Paripović D, Kostić M, Vasić D, Vujović A, Jelić-Ivanović Z, Spasojević-Kalimanovska V, Kornic-Ristovski D. Hyperlipidemia, oxidative stress, and intima media thickness in children with chronic kidney disease. *D Pediatr Nephrol.* 2013 Feb; 28(2):295-303.
180. Haraguchi Y, Toh R, Hasokawa M, Nakajima H, Honjo T, Otsui K, Mori K, Miyamoto-Sasaki M, Shinohara M, Nishimura K, Ishida T, Hirata K. Serum myeloperoxidase/paraoxonase 1 ratio as potential indicator of dysfunctional high-density lipoprotein and risk stratification in coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2014 Jun; 234(2):288-94.
181. Tsai MS, Shaw HM, Li YJ, Lin MT, Lee WT, Chan KS. Myeloperoxidase in chronic kidney disease: role of visceral fat. *Nephrol.* 2014; 19(3):136-42.

BIOGRAFIJA AUTORA

Danijela Kornic je rođena 19.10.1979. godine u Pančevu. Osnovnu i srednju medicinsku školu u Pančevu završila je kao nosilac Vukove diplome. Farmaceutski fakultet u Beogradu, smer diplomirani farmaceut – medicinski biohemičar upisala je 1998. godine, a završila novembra 2003. godine.

Obavezan staž za diplomirane farmaceute-medicinske biohemičare obavila je u kliničko-biohemijskoj laboratoriji Opšte bolnice u Pančevu.

Od 2003. do 2005. godine bila je zaposlena u srednjoj Medicinskoj školi „ Stevica Jovanović“ u Pančevu kao nastavnik na predmetima Medicinska biohemija i Farmakologija.

U oktobru 2004 godine upisala je magistarske postdiplomske studije, a oktobra 2006. godine prešla na doktorske akademske studije iz Medicinske biohemije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu

Od 2005. godine zaposlena je u službi laboratorijske dijagnostike Doma Zdravlja Pančevo. Zdravstvenu specijalizaciju iz Medicinske biohemije na Institutu za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu upisala je školske 2007/2008 a specijalističke studije je završila 2012 godine, odbranom specijalističkog rada sa temom „Značaj određivanja mijeloperoksidaze kod dece sa hroničnom insuficijencijom bubrega“. Od marta 2012. godine imenovana je za načelnika službe laboratorijske dijagnostike Doma Zdravlja Pančevo. Od aprila 2012. godine je član komisije za stručne ispite za smer laboratorijski tehničar u Zavodu za Javno Zdravlja Pančevo. Od 2017. godine imenovana je za spoljašnjeg ocenjivača Agencije za akreditaciju zdravstvenih ustanova Srbije.

Objavljeni naučni radovi

- Vujović A, Kotur-Stevuljević J, **Kornic D**, Spasić S, Spasojević-Kalimanovska V, Bogavac - Stanojević N, Stefanović A, Deanović M, Babka S, Aleksić B, Jelić-Ivanović Z. Oxidative stress and anti-oxidative defense in schoolchildren in a petrochemical industry environment. *Indian Pediatr* 2010;47(3);233-239.
- Kotur-Stevuljević J, Peco-Antić A, Spasić S, Stefanović A, Paripović D, Kostić M, Vasić D, Vujović A, Jelić-Ivanović Z, Spasojević-Kalimanovska V, **Kornic-Ristovski D**. Hyperlipidemia, oxidative stress, and intima media thickness in children with chronic kidney disease. *J Pediatr Nephro* 2013; 28(2);295-303.
- Ninić A, Spasojević-Kalimanovska V, Bogavac-Stanojević N, Kotur-Stevuljević J, **Kornic-Ristovski D**, Stefanović et al. Associations between anthropometric parameters and serum lipids in preadolescent and adolescent girls and boys. *Clinical Lipidology* 2015; 10: 119-28

Objavljeni naučni radovi koji su tema doktorske disertacije:

- **Ristovski-Kornic D**, Stefanović A, Kotur J, Zeljković A, Spasojević-Kalimanovska V, Vekić J, Miljković M, Paripović D, Peco-Antić A, Ivanović Z. Association of Myeloperoxidase and the Atherogenic Index of Plasma in Children with End-Stage Renal Disease. *J Med Biochem.* 2016;36:23-31
- Stefanović A, **Ristovski-Kornic D**, Kotur-Stevuljević J, Spasojević-Kalimanovska, V, Vekić J, Miljković M, Paripović D, Peco-Antić A, Jelić-Ivanović Z, Zeljković A. Alterations of HDL Particles in Children with End-Stage Renal Disease. *J Med Biochem.* 2017;36(4):358-365.

Štampani apstrakti radova sa Kongresa:

- Uticaj sportske aktivnosti na antropometrijske karakteristike, lipidni profil i oksidativni status kod školske dece. **Ristovski-Kornic D**, Stefanović A, Kotur – Stevuljević J, Jelić-Ivanović Z. Međunarodna naučna konferencija- Teorijski, metodološki i metodički aspekti takmičenja i pripreme sportista 2009.
- Uticaj fizičke aktivnosti na profil lipida seruma i glikemije kod dece uzrasta 13 godina na teritoriji opštine Pančevo. **Ristovski-Kornic D**, Nikolić B. *J Med Biochem* 2012;31(4):387
- Prevencija danas za zdravije sutra. **Ristovski-Kornic D**, Mitrić A. *J Med Biochem* 2015;34(1):67.
- **Ristovski-Kornic D**, Stefanović A, Kotur-Stevuljević J, Spasojević-Kalimanovska V, Vekić J, Miljković M, Paripović D, Peco-Antić A, Jelić-Ivanović Z, Zeljković A. Kvalitativne karakteristike lipoproteina visoke gustine kod dece sa hroničnim bubrežnim bolestima. *J Med Biochem.* 2018;37:187

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 Данијела Корниц

Број индекса 60/06

Студијски програм Медицинска биохемија

Наслов рада Значај одређивања мијелопероксидазе и расподеле субфракција липопротеинских честица ниске и високе густине код деце и адолесцената са хроничним болестима бубрега

Ментор проф. др Александра Стефановић, проф. др Александра Зељковић

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, 10.05.2019

Корниц Данијела

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Корниц Данијела

Број индекса 60/06

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Значај одређивања мијелопероксидазе и расподеле субфракција
липопротеинских честица ниске и високе густине код деце и адолесцената са
хроничним болестима бубрега

- 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, 10.05.2019

Корниц Данијела

Изјава о коришћењу

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

Значај одређивања мијелопероксидазе и расподеле субфракција липопротеинских честица ниске и високе густине код деце и адолесцената са хроничним болестима 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, 10.05.2019

Корнел Дамјела