

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Marko B. Baralić

Strukturne i funkcionalne promene fibrinogena kod
bolesnika na peritoneumskoj dijalizi

doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Marko B. Baralić

Structural and functional changes of fibrinogen in
patients on peritoneal dialysis

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

Mentor: Dr sci. med. Mirjana Laušević, docent, Klinika za nefrologiju Univerzitetskog Kliničkog centra Srbije (UKCS), Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Komentor: Dr Dragana Robajac, viši naučni saradnik, Institut za primenu nuklearne energije, Univerzitet u Beogradu

Komisija:

1. Dr sci. med. Milan Radović, redovni profesor, Klinika za nefrologiju UKCS, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
2. Dr sci. med. Dijana Jovanović, redovni profesor, Klinika za nefrologiju UKCS, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
3. Dr Nikola Gligorijević, naučni saradnik, Institut za primenu nuklearne energije, Univerzitet u Beogradu
4. Dr Milan Nikolić, vanredni profesor, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu
5. Dr sci. med. Igor Mitić, redovni profesor, Klinika za nefrologiju i kliničku imunologiju Kliničkog centra Vojvodine, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Eksperimentalni deo disertacije je urađen na Klinici za nefrologiju Univerzitetskog Kliničkog centra Srbije, Odeljenju za metabolizam, Instituta za primenu nuklearne energije i Odeljenju za glikobiologiju, Instituta za hemiju Slovačke Akademije nauka.

Iskrenu zahvalnost iskazujem mentorki doc. dr Mirjani Laušević, i komentorki dr Dragani Robajac, višem naučnom saradniku, na velikoj pomoći pri izradi ove disertacije, kao pravim prijateljima i saradnicima.

Ne mogu, a da ne izrazim veliku zahvalnost dr Voinu Brković i dr Milanu Stošović na nesebičnoj pomoći u izradi statističkih analiza, ali i svim sestrama sa Odeljenja peritoneumske dijalize i Dnevne bolnice Klinike za nefrologiju – UKCS-a.

Zahvalnost svim mojim prijateljima i porodici, kao i saradnicima iz INEP-a, koji su svojim angažovanjem pomogli u realizaciji ove disertacije.

Veliku zahvalnost iskazujem i svim članovima komisije na ukazanim sugestijama i predlozima za završnu odbranu disertacije.

Izrada disertacije je bila izazov u pravom smislu te reči!

Marko Baralić

Strukturne i funkcionalne promene fibrinogena kod bolesnika na peritoneumskoj dijalizi

SAŽETAK

Cilj disertacije je da se kod bolesnika u završnom stadijumu bubrežne slabosti lečenih peritoneumskom dijalizom (PD-om) analiziraju strukturne i funkcionalne promene fibrinogena i fibrina, i da se ispita povezanost uočenih promena sa nastankom neželjenih događaja kardiovaskularnog sistema (KVS-a), nakon perioda praćenja od 18 meseci. U ispitivanju je učestvovala grupa od 52 bolesnika i grupa od 32 zdrave kontrole, uporediva prema polu i starosti. Fibrinogen je izolovan iz plazme izolovanjem amonijum-sulfatom, i analiziran spektroskopskim, imuno- i lektin-afinitetnim metodama.

Fibrinogeni bolesnika na PD-u imaju značajno viši sadržaj karbonila od fibrinogena zdravih kontrola, a $A\alpha$ i $B\beta$ lanci su podložniji oksidaciji od γ lanaca. Vreme i brzina koagulacije su slični u obe ispitivane grupe, kao i vrednosti za maksimalnu apsorbancu (UV VIS spektri, na 350 nm) i emisioni maksimum ispitivanih fibrinogena (fluorescentni spektri, na 344 nm). Od 16 korišćenih lektina, kod 10 je odnos signal/šum >10 , dok je za dva lektina <3 . Fibrinogeni ispitanika iz obe grupe su reagovali sa istim lektinima, i sadrže: a) biantenarne N-glikane sa $\alpha 2,6$ -Sia; b) umetnuti GlcNAc i/ ili $\alpha 1,6$ -Fuc, i c) $\alpha 1,3$ -Fuc. Primećena je mala zastupljenost multiantenarnih i paucimanoznih i/ili visokomanoznih N-glikana, i O-glikana tipa T i Tn antigena sa ili bez Sia. Kao prediktor ultrafiltracione slabosti se izdvojio sadržaj fukozilovanih glikana koje vezuje AAL (sa vrednošću AUC od 72,4%). Povišen sadržaj (pauci)manoznih struktura (koje vezuje GNL) nađen je kod bolesnika koji su preminuli nakon 18 meseci od početka studije.

Fibrinogen izolovan iz plazme bolesnika lečenih PD-om ima značajno višu koncentraciju karbonila, izmenjenu sekundarnu i tercijarnu strukturu i izmenjen sadržaj glikana. Stepem fukozilacije ima visok potencijal da bude prediktivni faktor malfunkcije peritoneumske membrane, dok sadržaj paucimanoznih/visokomanoznih struktura korelira sa neželjenim kardiovaskularnim događajima i letalnim ishodom.

Ključne reči: fibrinogen; lektini; glikozilacija; GNL; AAL; koagulacija; terminalna bubrežna slabost; peritoneumska dijaliza; kardiovaskularni događaji

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Molekularna medicina

UDK broj: _____

Structural and functional changes of fibrinogen in patients on peritoneal dialysis

SUMMARY

The aim of the thesis is to analyze the structural and functional changes of fibrinogen and fibrin in patients with end - stage renal disease treated with peritoneal dialysis (PD), and to examine the relationship between the observed changes and the occurrence of adverse cardiovascular (CVD) events after a follow - up period of 18 months. The study involved 52 patients and 32 healthy volunteers, comparable by gender and age. Fibrinogen was isolated from plasma by ammonium sulfate isolation, and analyzed by spectroscopic, immuno- and lectin-affinity methods.

The fibrinogens of patients on PD have a significantly higher carbonyl content than the fibrinogens of healthy volunteers, and the A α and B β chains are more susceptible to oxidation than the γ chains. The time and rate of coagulation are similar in both study groups, as well as the values for maximum absorbance (UV VIS spectra, at 350 nm) and emission maximum of analyzed fibrinogens (fluorescent spectra, at 344 nm). Of the 16 lectins used, 10 had a signal-to-noise ratio of > 10, while two lectins had <3. Fibrinogens of both groups reacted with the same lectins, and contain: a) biantennary N-glycans with α 2,6-Sia; b) insert GlcNAc and / or α 1,6-Fuc, and c) α 1,3-Fuc. A small presence of multiantennar and paucimannosidic and/or high-mannose N-glycans, and O-glycans of type T and Tn antigens with or without Sia was observed. The content of fucosylated N-glycans (AAL binding) emerged as a predictor of ultrafiltration strength, (with an AUC value of 72.4%), while an elevated content of (pauci)mannosidic glycans (GNL signal) was found in patients died 18 months after the start of the study.

Fibrinogen isolated from the plasma of patients treated with PD has a significantly higher carbonyl concentration, altered secondary and tertiary structure, and altered glycan content. The degree of fucosylation has a high potential to be a predictive factor of peritoneal membrane dysfunction, while the content of paucimannosidic/highly mannose structures correlates with adverse cardiovascular events and lethal outcome.

Key words: fibrinogen; lectins; glycosylation; GNL; AAL; coagulation; terminal renal failure; peritoneal dialysis; cardiovascular events

Scientific field: Medicine

Narrow scientific field: Molecular medicine

UDC number:

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Hronična bubrežna slabost- insuficijencija.....	1
1.2. Uremija.....	1
1.3. Peritoneumska dijaliza.....	2
1.3.1. Peritoneumska membrana.....	2
1.3.2. Difuzija.....	3
1.3.3. Osmoza, transport vode i značaj akvaporina	3
1.3.4. Epidemiološki podaci	4
1.3.5. Modaliteti lečenja peritoneumskom dijalizom	4
1.3.6. Dijalizni rastvori.....	5
1.3.7. Elektrolitni i puferski sastav dijalizne tečnosti.....	5
1.3.8. Glukozni degradacioni proizvodi (GDPs)	6
1.3.9. Formiranje krajnjih produkata napredne glikacije (AGEs)	7
1.3.10. Strukturne i funkcionalne promene peritoneumske membrane	7
1.3.11. Kardiovaskularne komplikacije bolesnika na peritoneumskoj dijalizi	8
1.3.12. Hipertenzija kod bolesnika na peritoneumskoj dijalizi.....	8
1.3.13. Gojaznost kod bolesnika na peritoneumskoj dijalizi	9
1.3.14. Dislipidemija kod bolesnika na peritoneumskoj dijalizi.....	9
1.3.15. Oksidativni stres i inflamacija kod bolesnika na peritoneumskoj dijalizi	10
1.4. Koagulacija (hemostaza)	10
1.4.1. Unutrašnji put	11
1.4.2. Spoljašnji put.....	12
1.5. Fibrinogen.....	13
1.5.1. Struktura i sinteza fibrinogena.....	13
1.5.2. Posttranslacione modifikacije fibrinogena	15
1.5.3. Fibrinogen i bolesti bubrega	16
1.6. Detekcija i analiza ugljenohidratnih komponenti	16
2. Ciljevi istraživanja.....	18
3. Materijal i metode.....	19
3.1. Tip studije i mesto istraživanja.....	19
3.2. Bolesnici u istraživanju	19
3.3. Procedura uzimanja uzoraka krvi	19
3.4. Testovi za procenu kvaliteta peritoneumske dijalize (transportni status).....	20

3.5. Procena kvaliteta dijalize (klirensi ureje i kreatinina)	20
3.6. Izolovanje fibrinogena.....	20
3.7. Analiza koagulacije izolovanog fibrinogena	20
3.8. Skenirajuća elektronska mikroskopija.....	21
3.9. CD spektroskopska analiza fibrinogena	21
3.10. Spektrofluorimetrijska analiza fibrinogena	21
3.11. Ispitivanje oksidativnih modifikacija fibrinogena	21
3.12. Mikroerej baziran na lektinima.....	22
3.13. Lektinski blot.....	22
3.14. Statistička analiza	22
4. Rezultati.....	23
4.1. Deskriptivna statistika bolesnika na peritoneumskoj dijalizi	23
4.2. Analiza strukturnih karakteristika fibrinogena kod bolesnika na peritoneumskoj dijalizi	25
4.2.1. Analiza karbonilacije lanaca fibrinogena	25
4.2.2. Spektrofluorometrijska i CD spektrometrijska analiza uzoraka fibrinogena.....	26
4.2.3. Koagulaciona svojstva izolovanih fibrinogena.....	27
4.3. Ispitivanje glikozilacije fibrinogena metodom lektinskog mikroereja	28
4.3.1. Uticaj broja dijaliznih izmena na glikozilaciju fibrinogena.....	32
4.3.2. Uticaj sastava dijalizne tečnosti na glikozilaciju fibrinogena.....	32
4.3.3. Glikozilacija fibrinogena kao dijagnostičko-prognostičkog markera.....	34
4.4. Lektinski blot.....	37
4.5. Uticaj pojedinačnih varijabli na ukupan mortalitet	38
5. Diskusija.....	41
6. Zaključci	50
7. Literatura	51
Biografija.....	70

1. Uvod

1.1. Hronična bubrežna slabost- insuficijencija

Hronična bubrežna slabost (HBS) predstavlja oštećenje strukture i/ili funkcije bubrega koje traje duže od 3 meseca (NIDDK, 2017). Oboljenje je progresivnog i ireverzibilnog karaktera, a tokom vremena dolazi do postepenog, najčešće sporog i trajnog gubitka bubrežne funkcije (GBD, 2015). Pojava specifičnih simptoma i znakova bolesti vezuje se za terminalnu bubrežnu slabost, *eng. End Stage Renal Disease* (ESRD) (National Kidney Foundation, 2002).

Prema smernicama organizacije *eng. Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO) iz 2012. godine, HBS je podeljena u 5 stadijuma bolesti prema jačini glomerulske filtracije (JGF ml/min/1,73 m²) ili 3 stadijuma na osnovu odnosa albumin/kreatinin (A/K mg/g) iz urina, Tabela 1. (CKD Evaluation and Management, 2012). Peti stadijum predstavlja ESRD, kada je JGF < 15 ml/min/1,73 m², i kada je neophodno započeti aktivnim lečenjem jednom od metoda zamene bubrežne funkcije, *eng. Renal Replacment Therapy* (RRT), a koje podrazumevaju: hemodijalizu (HD), peritoneumsku dijalizu (PD), ili transplantaciju bubrega (Stevens i Levin, 2013).

1.2. Uremija

Uremija nastaje kao posledica trajnog gubitka bubrežne funkcije, pri kojoj se ne mogu eliminisati uremijski toksini iz krvi, što može dovesti do teških komplikacija na različitim organskim sistemima, a ukoliko se ne sprovede pravovremeno aktivno lečenje nekom od metoda RRT-a dolazi do smrtnog ishoda (Vanholder i sar., 2003). Pod potencijalno štetnim uremijskim toksinima se najčešće podrazumevaju: ureja, kreatinin, fosfati, paratiroidni hormon, β₂-mikroglobulin, homocistein, leptin, proteini vezani za soli i drugo (Glorieux i sar., 2007). Prevalencija razvoja ESRD-a varira, kako između država u svetu tako i u neposrednom okruženju (NIDDK, 2017; NKF F/DOQI, 2002). Jager i saradnici su prikazali da je globalna prevalencija bolesnika sa HBS-om u svetu 843 miliona, a globalna incidencija 19 miliona bolesnika (Jager i sar., 2019; GBD, 2017). Meta analiza Hill-a i saradnika je pokazala da je prevalencija bolesnika sa odmaklim stadijumima HBS-a varira među zemljama na različitim kontinentima. Tako u Severnoj Americi i Kanadi iznosi 14,44%, u Južnoj Americi 12,10%, u Evropi 11,86%, u zemljama na jugu Afrike 7,60%, na bliskom istoku 11,68%, dok u zemljama dalekog istoka varira od 6,76% u Indiji, do 11,73% u Japanu, a na Australijskom kontinentu 8,14% (Hill i sar., 2016).

Uzroci za nastanak HBS-a su multifaktorijalni, a najznačajniji su: pol, rasa, navike u ishrani, pušenje, fizička aktivnost, socijalno-ekonomski status (Bruck i sar., 2016). U nerazvijenim i slabije razvijenim zemljama najčešći uzrok ESRD-a je izloženost različitim štetnim činiocima (toksinima i lekovima) i recidivantne infekcije urinarnog trakta (Levey i sar., 2012; Jha i sar., 2013). Nasuprot tome, u razvijenim zemljama se kao vodeći uzroci ESRD-a izdvajaju: starost, neregulisan diabetes mellitus, povišen neregulisani arterijski krvni pritisak i gojaznost (Hill i sar., 2016). Pomenuta stanja su ujedno i glavni faktori rizika za nastanak neželjenih kardiovaskularnih komplikacija ili događaja (KVS) kod bolesnika lečenih nekom od metoda RRT-a, koje su ujedno i vodeći uzrok smrtnosti (NICE, 2008; Karkar, 2012). Osnovno bubrežno oboljenje koje dovodi do nastanka ESRD-a, se prema učestalosti javljanja svrstava u: komplikacije diabetes mellitus-a (između 30-50%), komplikacije hipertenzije (27,2%), primarne (8,2%) i sekundarne glomerulske bolesti (2,1%) (glomerulopatije), tubulo-intersticijske bolesti bubrega (3,6%), autozomno-dominantnu policističnu bolest bubrega (3,1%) (Libetta i sar., 2011; Pahl i sar., 2010; Satyanarazana i Narothama, 2021).

Uprkos značajnom tehnološkom i farmakološkom napredovanju u lečenju bolesnika sa ESRD-om, stopa preživljavanja je i dalje izuzetno niska, posebno tokom prve godine nakon započinjanja lečenja HD-om. Primera radi, prema dostupnim informacijama u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) stopa preživljavanja iznosi 76%, dok je u zemljama Evropske unije ta

brojka nešto viša i iznosi 84% (Hsu i sar., 2009; Hedgeman i sar., 2015). Prema godišnjem izveštaju Udruženja nefrologa Srbije za 2015. godinu, stopa mortaliteta dijalizne populacije u Republici Srbiji je iznosila 11,1%, što je znatno niže u odnosu na podatke iz 2011. godine, kada je ova vrednost iznosila 18,5% (Annual Report ERA-EDTA za 2015. godinu).

Klinička slika uremije je nespecifična i obično je karakteriše odsustvo specifičnih simptoma i znakova bolesti (Vanholder i sar., 2003). Najčešći simptomi su otoci na nogama, osećaj umora, gubitak apetita, muka, nagon na povraćanje, svrab po koži, konfuznost i druge nespecifične tegobe (Mak i sar., 2011), dok su najčešći klinički znaci neregulisana hipertenzija (HTA), acidoza sa hiperkalijemijom, anemija u hroničnim bolestima, poremećaj metabolizma kalcijuma i fosfata sa oštećenjem koštano-zglobnog sistema i seksualna disfunkcija (Vecchio i sar., 2010; NIDDK, 2015-2017; Xie i sar., 2016; Wile, 2012; James i sar., 2014).

Tabela 1. Stadijumi hronične bubrežne slabosti prema KDIGO vodiču iz 2012, godine gde se HBS prikazuje prema jačini glomerulske filtracije (JGF) izraženim u ml/min/1,73 m² i prema odnosu albumin/kreatinin u urinu (A/K) izraženim u mg/g. Brojevi od 1-4 predstavljaju rizik od napredovanja HBS-a.

				<i>Odnos A/K (mg/g)</i>		
				<i>A1</i>	<i>A2</i>	<i>A3</i>
				<i>Normalno do blaže povećanje</i>	<i>Umereno povećanje</i>	<i>Značajno povećanje</i>
				<30	30–300	>300
<i>JGF ml/min/1,73 m²</i>	1	<i>Normalno</i>	>90	<i>1 sa HBS-om</i>	1	2
	2	<i>Blago oštećenje</i>	60–89	<i>1 sa HBS-om</i>	1	2
	3a	<i>Blago do umereno oštećenje</i>	45–59	1	2	3
	3b	<i>Umereno do značajno oštećenje</i>	30–44	2	3	3
	4	<i>Značajno oštećenje</i>	15–29	3	4	4
	5	<i>Završni stadijum (ESRD)</i>	<15	4	4	4

1.3. Peritoneumska dijaliza

Peritoneumska dijaliza (PD) je metoda zamene bubrežne funkcije kojom se aktivno leči skoro 300,000 ljudi sa ESRD-om širom sveta, što predstavlja 11% ukupne dijalizne populacije (Crabtree i sar., 2015; Kaneko i sar., 2007). Zasniva se na principima difuzije i osmoze, gde se transport vode obavlja preko peritoneumske mebrane (Jain i sar., 2012).

1.3.1. Peritoneumska membrana

Peritoneumska membrana je semipermeabilna, mezotelijalna barijera koja oblaže većinu unutrašnjih organa i zid stomaka, koju sačinjavaju:

- a) mezotelijalne ćelije (prost ljustasti epitel),

- b) vezivno tkivo koga sačinjava mreža kolagenih vlakana i hidrokso-ostaci mukopolisaharida i
- c) mreža kapilara (endotelijalna barijera) (Tan i sar., 2016; Perl i sar., 2011).

Endotelijum koji oblaže zidove kapilara peritoneuma (arteriola i venula) predstavlja glavnu barijeru preko koje se obavlja transport vode i rastvorenih supstanci u postupku lečenja PD-om, ograničavajući razmenu rastvorenih supstanci na manje od 0,1% njene količine u odnosu na ukupnu efektivnu površinu membrane (Davies i sar., 2017). Endotelijalne ćelije se ponašaju prema principu Troel-ovog modela, podržavajući “teoriju tri pore”, preko kojih se i odvija transport, a čine ih:

- male pore, poluprečnika 40-50 Å, smeštene između endotelijalnih ćelija, sačinjavaju skoro 99,5% ukupne površine pora preko kojih se obavlja transport rastvorenih supstanci procesom olakšane difuzije i preko kojih se ostvaruje eliminacija viška tečnosti procesom osmoze (Brimble i sar., 2006),
- velike pore, prečnika 250 Å imaju ulogu u transkapilarnom transportu makromolekula (proteina i imunoglobulina) procesom aktivnog transporta, i predstavljaju svega 0,01% ukupne zastupljenosti svih pora, i
- akvaporini (AQP-1) su veoma male pore prečnika <3 Å, koje procesom osmoze olakšavaju transport vode, ali ne i rastvorenih supstanci (Churchill i sar., 1998; Nolph, 2017).

1.3.2. Difuzija

Difuzija predstavlja transport rastvorenih molekula kroz polupropusnu membranu na osnovu gradijenta koncentracije materije, iz smeru višeg ka smeru niže koncentracije (Daugirdas i sar., 2006). Koristi se kao osnovni fizički model za lečenje bolesnika sa uremijom upotrebom bilo veštačke (kod HD-a) ili prirodne membrane, kakva je peritoneumska membrana (kod PD-a) (Tomino, 2012; Davies, 2004).

1.3.3. Osmoza, transport vode i značaj akvaporina

Adekvatan transport vode i malih rastvorljivih supstanci je najvažnija funkcija peritoneumske dijalize (Restrepo i sar., 2014). Endokapilarna membrana koja ulazi u sastav peritoneumske membrane je polupropustljiva, a zahvaljujući postojanju AQP-1 se ostvaruje osmotski transport (osmoza). Isti se odvija primenom hiperosmolarnih rastvora glukoze kao osnovnog osmotskog sredstva i u manjoj meri “prosejavanjem soli” (Lambie i sar., 2010). Pod ovim fenomenom se podrazumeva brzi pad natrijuma iz dijalizata nakon primene smeše sa hiperosmolarnim rastvorom glukoze, a pretpostavlja se da se nakon toga odvija transport vode preko AQP-1 (Rippe i sar., 2004). Transport rastvorenih supstanci male molekulske težine, kao što su ureja i kreatinin, se kroz peritoneum odvija procesom olakšane difuzije preko malih pora smeštenih između bazolateralnih strana endotelijalnih ćelija, u vidu međućelijskih pukotina, dok se transport makromolekula odvija preko velikih pora procesom aktivnog transporta (Yu i sar., 2014).

Najčešće komplikacije dugogodišnjeg lečenja peritoneumskom dijalizom su potencijalne infekcije izlaznog mesta peritoneumskog katetera i upala trbušne maramice (peritonitisi). Nakon peritonitisa, javljaju se promene na peritoneumskoj membrani, a koje mogu nastati i delovanjem samog dijaliznog rastvora, što rezultira smanjenjem jačine ultrafiltracije (UF) i ubrzanim transportom malih rastvorljivih supstanci (Qayyum i sar., 2015).

1.3.4. Epidemiološki podaci

Prema trenutno dostupnim podacima, procenjuje se da se oko 272,000 bolesnika nalazi na programu aktivnog lečenja PD-om, što predstavlja približno 11% ukupne dijalizne populacije (FMC Annual Report, 2015). Procentualno prema zastupljenosti svih bolesnika na lečenju RRT-om, udeo onih koji se leči PD-om je najveći u Kanadi, Australiji, Meksiku i Velikoj Britaniji. U zemljama gde je velika udaljenost satelitskih HD-e centara, kakve su Kanada i Australija, PD-a predstavlja vodeći oblik lečenja dijalizne populacije (Nesrallah, i sar., 2018; Mudge i sar., 2016). Zastupljenost bolesnika lečenih PD-om u SAD je velika zbog sve ukupnog broja bolesnika lečenih RRT-om, ali je značajno zastupljeniji model lečenja HD-om (de Lima i sar., 2013; FMC Annual Report 2015).

Trenutna procena je da se na azijskom kontinentu leči oko 900,000 ljudi RRT-om (Liyanage i sar., 2015). Zastupljenost lečenja PD-om varira između 3% u Japanu, do 73% u Hong Kongu, a u značajnoj meri je zastupljena na Tajvanu i Singapuru (NIH, 2008; Jain i sar., 2012). Na afričkom kontinentu se oko 2,050 bolesnika leči PD-om i to najviše u Južnoafričkoj Republici 32% (Bamgboye, 2016). Tokom 2010. godine broj bolesnika na RRT-u u Severnoj Americi je iznosio oko 441,000 (Liyanage i sar., 2015). Zastupljenost bolesnika na PD-u se progresivno smanjuje, zbog otvaranja sve većeg broja malih satelitskih HD-e centara, a sinonim za lečenje PD-om je APD-e (Mehrotra, 2012; NIH, 2008). U Kanadi se trećina svih lečenih RRT-om nalazi na programu PD-a. Najveća zastupljenost je APD-a, čak 65% u 2013. godini (CORR, 2015). U oblastima Latinske Amerike prevalencija bolesnika na lečenju PD-om je oko 70,000, što čini oko 25% ukupne svetske PD-e populacije. Najzastupljenija je u Meksiku, Kolumbiji i Gvatemali sa više od 30% bolesnika lečenih RRT-om (Casumano i sar., 2016; Elamin i sar., 2010; Bargman i sar., 2001). U Evropi je tokom 2015. godine lečeno oko 442,000 bolesnika RRT-om, a zastupljenost lečenja PD-om u većini zemalja opada (Thomas i sar., 2015; Nolph i sar., 2017). Najviše je zastupljenija u Norveškoj, a najmanje u Finskoj (van de Luijngaarden i sar., 2016). Studiju koju je sprovedla ERA-EDTA (*Evropska organizacija za bolesti bubrega, dijalizu i transplantaciju*) na uzorcima između 1993. i 2012. godine, došlo se do informacija o smanjenju zastupljenosti PD-a u Evropi. Ujedno, ova se pojava ne može objasniti ishodom terapije, jer je od ranije poznato da je preživljavanje bolesnika na PD-u povoljnije u poređenju sa preživljavanjem bolesnika koji lečenje ESRD-a inicijalno započinju HD-om (ERA-EDTA registry, 2016).

Na programu lečenja PD-om u Republici Srbiji, na kraju 2015. godine, prema godišnjem izveštaju Udruženja nefrologa Srbije se nalazilo 519 bolesnika ili 9,1% ukupne dijalizne populacije, tj. 73,1 PD-i bolesnik na milion stanovnika. Na teritoriji grada Beograda se ukupno nalazilo 224 bolesnika, a na programu lečenja PD-om u UKCS-e je bilo 92 bolesnika, od čega je 19 incipijentnih za 2015. godinu. Ukupan broj incipijentnih bolesnika koji je započeo sa lečenjem PD-om tokom 2015. godine, nakon 91 dana od započinjanja, je iznosio 87, što predstavlja 11,7% svih bolesnika lečenih nekim modalitetom RRT-a. Najzastupljeniji model lečenja PD-om je CAPD-e (oko 80%), dok se na APD-u nalazi oko 10% svih bolesnika lečenih PD-om. Preostali bolesnici se nalaze na režimima CCPD-e (ciklične) i IPD-e (intermitentne PD-e) (<http://www.udruzenjenefrologa.com/>).

1.3.5. Modaliteti lečenja peritoneumskom dijalizom

Pod pojmom peritoneumske dijalize se podrazumeva izvođenje dijalizne izmene preko peritoneumske membrane kao dijalizne membrane i Y-sistema. U peritoneumsku duplju se uliva sterilna dijalizna tečnost, čija je zapremina prethodno definisana, a dužina zadržavanja zavisi od transportnih karakteritika membrane. Ukratko, postupak se izvodi tako što se dijalizni rastvor zagreje na 37 °C, a potom se ulije u trbušnu duplju, gde se ostavi određeni vremenski period koji je definisan dijaliznom preskripcijom. Za to vreme će se procesima olakšane difuzije i osmoze eliminisati degradacioni proizvodi metabolizma, a višak tečnosti će iz cirkulacije preko membrane kapilara preći u peritoneumsku duplju. Nakon toga, rastvor se izliva iz trbušne duplje u drenažnu kesu, a potom se

postupak ponavlja ulivanjem nove količine dijaliznog rastvora, što zavisi od dijalizne preskripcije (Johnson i sar., 2012; Kim i sar., 2009; Lee i sar., 2005).

Kontinuirana ambulatorna (CAPD), ciklična (CCPD) i automatska peritoneumska dijaliza (APD)

Najčešće primenjivani oblik dijaliznog lečenja PD-om u Republici Srbiji je CAPD-e program, koji podrazumeva 3-4 dnevne, i jednu noćnu izmenu. Može se primenjivati i CCPD-e sa 3-4 dnevne izmene i APD-e koji po pravilu podrazumeva veći broj kraćih ciklusa koji se uglavnom odvijaju tokom noći (Mehrotra i sar., 2007; Jo i sar., 2007; Van Biesen i sar., 2011; Wan i sar., 2018; Gouveia i sar., 2017). Dijalizna doza i modalitet lečenja se u praksi najčešće baziraju na transportnim karakteristikama peritoneuma. Određuju se peritoneumskim ekvilibrijumskim testom, *eng. Peritoneal Equilibration Test (PET)*, za različite molekule (glukozu, ureju, kreatinin, fosfat i dr.). Prema vrednostima PET-a, najčešće za glukozu i kreatinin, bolesnici na PD-u se svrstavaju u četiri grupe transportera: brzi, srednje brzi, srednje spori i spori transporteri (Brain i sar., 2017, Cnossen i sar., 2011; Mandolfo i sar., 1996).

1.3.6. Dijalizni rastvori

Dijalizni rastvori (DR), sadrže elektrolite, puffer i osmotsko sredstvo. Kao osnovno osmotsko sredstvo u dijaliznom rastvoru se koristi glukozu u različitim koncentracijama (1,36-4,25%), koja mora zadovoljiti odgovarajući osmotski potencijal, čime se omogućava uklanjanje viška tečnosti. Glukozni dijalizni rastvori imaju niži pH (kiselija sredina), da bi se sprečila karamelizacija tokom sterilizacije rastvora toplotom i upotrebe rastvora (Suzuki i sar., 2004; Perl i sar., 2012).

Najčešće korišćeno neglukozno osmotsko sredstvo je 7,5% rastvor ikodekstrina. Ovaj polimer glukoze dobijen je iz skroba, ima molekulsku masu 13-19 kDa i bele je boje, dok je njegov rastvor bistar i bezbojan (Frampton i Plosker, 2003). Glukozne jedinice ikodekstrina su uglavnom povezane α -1,4 glikozidnim vezama, dok se manje od 10% nalazi povezano α -1,6 glikozidnom vezom, što ovaj polimer čini vrstom dekstrina (Nolph, 2017; ACP, 2005).

1.3.7. Elektrolitni i puferski sastav dijalizne tečnosti

Glukozni rastvori

Elektrolitni sastav dijaliznih rastvora je nezavisan od koncentracije glukoze, i njihov sadržaj dat je u narednoj tabeli. U zavisnosti od proizvođača na tržištu Republike Srbije, svi rastvori su hiperosmolarni, a sadržaj glukoze može biti niži (1,36% ili 1,5%), srednje (2,27% ili 2,3%) ili visoke koncentracije (3,86% ili 4,25%).

Tabela 2. Elektrolitni sastav standardnih glukoznih dijaliznih rastvora (www.alims.gov.rs).

	Koncentracija	Osmolarnost (mOsm/L)
Natrijum (mmol/L)	132	
Kalcijum (mmol/L)	1,75	347 (1,36% glukoza)
Magnezijum (mmol/L)	0,75	398 (2,27% glukoza)
Laktat (g/L)	7,85	486 (3,86% glukoza)
Hloridi (mmol/L)	102	
pH 5,5 (na 25 °C)		

Neglukozni rastvori

U upotrebi je nekoliko vrsta neglukoznih rastvora, koji se na osnovu sadržaja mogu kategorisati na sledeći način:

- a) Ikodekstrin– neglukozni rastvor koji se sastoji od glukoznog polimera. Nalazi se na tržištu Republike Srbije u pakovanju zapremine 2000 mL. Koncentracija ikodekstrina iznosi 75 g/L, dok je sadržaj elektrolita sledeći:

Tabela 3. Elektrolitni sastav dijaliznih rastvora na bazi ikodekstrina (www.alims.gov.rs).

	Koncentracija (g/L)	Osmolarnost (mOsm/L)
Natrijum-hlorid	5,4	284
Natrijum-laktat	4,5	
Kalcijum-hlorid dihidrat	0,257	
Magnezijum-hlorid heksahidrat	0,051	
pH 5-6		

- b) Nutrinil–predstavlja aminokiselinski rastvor. Nalazi se na tržištu Republike Srbije u pakovanju zapremine 2000 mL. Sastav nutrinil-a je sledeći:

Tabela 4. Sastav Nutrinil-a (www.alims.gov.rs).

Aminokiselinski sastav (g/L)				
Tirozin	Triptofan	Fenilalanin	Serin	Glicin
0,300	0,270	0,570	0,510	0,510
Treonin	Alanin	Prolin	Valin	Arginin
0,646	0,951	0,595	1,393	1,071
Metionin	Izoleucin	Leucin	Lizin-hidrohlrorid	Histidin
0,850	0,850	1,020	0,955	0,714
Elektrolitni sastav				
Kalcijum-hlorid dihidrat (g/L)	0,184	Magnezijum-hlorid heksahidrat (g/L)	0,051	
Natrijum-laktat (g/L)	4,48	Natrijum (mmol/L)	132	
Kalcijum (mmol/L)	1,25	Magnezijum (mmol/L)	0,25	
Laktat (mmol/L)	40	Hloridi (mmol/L)	105	
Natrijum-hlorid (g/L)	5,38			
Osmolarnost (mOsm/L) 365; pH 6,7				

1.3.8. Glukozni degradacioni proizvodi (GDPs)

Dugotrajni program lečenja peritoneumskom dijalizom pre ili kasnije dovodi do strukturnih i funkcionalnih promena na peritoneumskoj membrani. Posledica je smanjenje ultrafiltracije tj. ultrafiltraciona slabost, zbog smanjenja transportnih procesa i pojave subdijaliziranosti, zbog čega je neophodna zamena modaliteta RRT-a. Promene na peritoneumu se javljaju delovanjem različitih toksina, ali su najčešće uslovljene dugotrajnom uremijom i akumulacijom krajnjih produkata napredne glikacije, eng. *Advanced Glycation End Products* (AGEs), koji nastaju kao posledica izloženosti visokoj koncentraciji glukoze ili glukoznim degradacionim proizvodima (GDP). Konvencionalni rastvori za PD-e sadrže hipertoničnu glukozu, koja se usled toplotnog zagrevanja razlaže i doprinosi nastajanju GDP-a.

Patohistološka analiza promena na peritoneumskoj membrani, nastalih tokom lečenja PD-om, ukazala je na značajan uticaj GDP-a na integritet ćelija peritoneuma (Schwenger i sar., 2006; Yung i Chan, 2006). Ove promene nastaju usled delovanja različitih proizvoda razgradnje ugljenih hidrata,

koji se klasifikuju kao visokoreaktivna karbonilna jedinjenja, a u koje spadaju: formaldehid, acetaldehid, metilglioksal, 3-deoksiglukazon, 3,4-di-deoksiglukazon-3-en i 5-hidroksi-metilfurfural (Williams i Daviter, 2013; Wieslander i sar., 2001). Prvobitno je smatrano da visoka koncentracija glukoze predstavlja glavni faktor koji doprinosi oštećenju peritoneuma, ali je kasnije ustanovljeno da se peritoneumska membrana oštećuje direktnim, lokalnim toksičnim delovanjem GDP-a, koje predstavljaju visokoreaktivne supstance i uslovljavaju nastanak AGEs (Zeier i sar., 2003). Izlaganjem ćelija peritoneuma krajnjim proizvodima napredne glikacije dolazi do zaustavljanja njihovog rasta i značajnog skraćivanja njihovog životnog veka. Mezotelijalne ćelije peritoneuma podležu mezenhimalnoj transformaciji, čime se uslovljava prelazak iz epitelnog u vezivno tkivo (mezenhimalno tkivo). Ovaj progresivni gubitak morfoloških karakteristika epitela i poprimanje karakteristika veziva rezultira poremećajem intracelularnih spojeva i gubitkom apikalno-bazolateralnog polariteta. Smatra se da E-kadherin, intracelularni adhezivni molekul, ima centralnu ulogu u kontroli transformacije epitela u mezenhim. Nakon izlaganja mezenhimalnih ćelija dijaliznoj tečnosti, smanjuje se ekspresija citokeratina-18 i E-kadherina, a povećava se ekspresija α -glatko mišićnog aktina (α -SMA) i vimentina, koji su ujedno i znakovi mezenhimalne transformacije (Yanez-Mo i sar., 2003).

1.3.9. Formiranje krajnjih produkata napredne glikacije (AGEs)

U procesu glikacije dolazi do neenzimske modifikacije proteina ugljenim hidratima (glukoza, fruktoza, galaktoza) (Rondeau i Bourdon, 2011). Aldehidna grupa ugljenih hidrata, ili reaktivna karbonilna grupa, reaguje sa amino-grupama proteina, pri čemu nastaje Šifova baza koja premeštanjem po Amadoriju prelazi u stabilan ketoamin (Brownlee i sar., 1984). Ovo su rani proizvodi glikacije. Amadorijev proizvod serijom sporih reakcija (oksidacije, ciklizacije i polimerizacije) prelazi u krajnji proizvod napredne glikacije - AGEs. AGEs proizvodi su reaktivni i daljom reakcijom sa amino- i tiolnim grupama dovode do umrežavanja i agregacije proteina. Ovi proizvodi mogu direktno usloviti strukturne promene peritoneumske membrane prekomernim umrežavanjem vezivnog tkiva (kolagenih vlakana), čime narušavaju integritet međućelijskih veza i dovode do gubitka mezotelijalne mase. Prvobitno se smatralo da vezivanje AGEs za njihove receptore (RAGE) omogućava samoprečišćavanje tj. zaštitu ćelija od delovanja samih krajnjih proizvoda glikacije. U međuvremenu je pokazano da pored RAGE, postoje i drugi receptori za AGEs kao što su: AGE-R-1 (p60), AGE-R-2 (p90) i AGE-R-3 (galektin-3), koji su eksprimirani na površini membrana fibroblasta i mezotelijalnih ćelija, međutim, njihov funkcionalni značaj još uvek nije u potpunosti razjašnjen (Schwenger i sar., 2006).

1.3.10. Strukturne i funkcionalne promene peritoneumske membrane

Efikasnost dijaliznog lečenja zavisi od strukturnih i funkcionalnih karakteristika peritoneumske membrane (de Lima i sar., 2013; Williams i sar., 2001). Kontinuirano izlaganje peritoneumske membrane dijaliznim rastvorima doprinosi nastanku funkcionalnih i strukturnih promena, uglavnom kao posledica visoke koncentracije glukoze i krajnjih proizvoda njene degradacije, nižeg pH, visoke osmolalnosti, dejstva uremijskih toksina i prethodnih peritonitisa (Pletinck i sar., 2012; Saxena, 2007; Rose-John i sar., 2007).

Strukturne promene peritoneumske membrane se karakterišu gubitkom mezotelijalnih ćelija (mezotelijalne mase), uz nekontrolisanu neoangiogenezu i proliferaciju fibroblastnih ćelija, što uslovljava progresivnu fibrozu i zadebljavanje submezotelijalne okoline sa nakupljanjem i umrežavanjem kolagenih vlakana (Kaneko i sar., 2007). Usled ireverzibilnih promena na peritoneumskoj membrani se kao najteža strukturna komplikacija razvija peritoneumska skleroza, zbog čega je neophodna trajna obustava daljeg lečenja PD-om, i prelazak bolesnika na drugi modalitet lečenja RRT-a (Selgas i sar., 2006; Kihm i sar., 2015).

Istovremeno se sa strukturnim, dešavaju i **funkcionalne promene**, koje podrazumevaju povećanu brzinu transporta malih molekula preko AQP-1-a, što dovodi do ultrafiltracione slabosti i potrebe za prekidom ovim modalitetom lečenja (Davies, 2004). Efektivna površina peritoneumske membrane (EPPM), dostupna za odvijanje transporta makromolekula i vode, zavisi od razvijenosti kapilarne mreže koja je ili inicijalno regrutovana u postupku ili se naknadno razvila usled samog dijaliznog postupka, ili uslovljenosti patološkim procesima. Ni i saradnici su pokazali da se i do 50% ukupne transkapilarne UF odvija preko AQP-1 kod “nokaut” miševa (Ni i sar., 2006). Tokom lečenja PD-om, dolazi i do rearsorpcije tečnosti preko peritoneumskog limfotoka što se suprotstavlja transkapilarnoj UF, čineći neto UF kao rezultat ova dva naspramna procesa. Na osnovu navedenog, glavno svojstvo peritoneumske membrane u ostvarivanju EP se može definisati kao transport rastvorenih čestica i vode svojstveno peritonealnom permeabilitetu i funkciji AQP-1 (Carlsson i sar., 1996). Promene koje se mogu otkriti na peritoneumskoj membrani su izražene kod oko 50% svih bolesnika koji se dugotrajno leče metodom PD-a. Na histološkom preparatu može se videti angiogeneza kapilara sa degeneracijom krvnih sudova i progresivna fibroza, što uslovljava ubrzani transport malih molekula i UF-u slabost (Lee i sar., 2005).

Porast stope oboljevanja (morbidity) i potrebe za neophodnim bolničkim lečenjem ove grupe bolesnika predstavlja značajno finansijsko opterećenje zdravstvenog sistema. Procenjuje se da za sve bolesnike širom sveta, koji se leči nekom od metoda RRT-a, se izdvaja oko 5% ukupnog budžeta usmerenog na celokupni zdravstveni sistem, što predstavlja veliko finansijsko opterećenje čak i za razvijene zemlje (Liyanage i sar., 2015; Chang i sar., 2015). Neke studije ukazuju da su posledice peritonitisa vodeći uzrok smrtnosti PD-i bolesnika (Boudville i sar., 2012), dok druge upućuju da broj peritonitisa ne utiče na dužinu dijaliznog staža, a da preživljavanje uglavnom zavisi od posledičnih neželjenih događaja KVS-a (Klarić i Knotek, 2013).

1.3.11. Kardiovaskularne komplikacije bolesnika na peritoneumskoj dijalizi

Najčešći uzrok smrtnosti kod bolesnika na dijaliznom lečenju su neželjene kardiovaskularne komplikacije, koje su skoro 30 puta učestalije u poređenju sa opštom populacijom (Stenvinkel i sar., 2008). Delimični uzrok leži i u činjenici da su faktori rizika zajednički za nastanak kardiovaskularnih oboljenja i ESRD-a (Muntner i sar., 2004). Dodatni faktori rizika koji se javljaju u sklopu ESRD-a su: sistemska inflamacija, oksidativni stres, anemija u hroničnim bolestima, sekundarni hiperparatiroidizam, hiper- ili homocisteinemija, hipertrofija leve komore miokarda, endotelijalna disfunkcija i drugo (Shlipak i sar., 2005; Zoccali, 2000).

1.3.12. Hipertenzija kod bolesnika na peritoneumskoj dijalizi

Veliki značaj na preživljavanje bolesnika na PD-u ima kontrolisanje “volemije” i posledične hipertenzije. Hsieh i sar. (2014) su pokazali da je smrtnost kod bolesnika koji nisu imali peritonitis bila veća nego kod bolesnika koji su imali peritonitise, što su pokazali rezultati kohortne studije koja je obuhvatila 1,321 bolesnika, a kao vodeći uzrok smrtnosti bolesnika na PD-u je naveden neželjeni kardiovaskularni komorbiditet (Xiping i sar., 2017).

Prednost lečenja bolesnika PD-om u poređenju sa HD-om u pogledu regulacije “volumnog” statusa su postepenija i kontinuirana ultrafiltracija i duže očuvana rezidualna diureza (Kim i van Biesen, 2017). To govori u prilog lečenju PD-om, u poređenju sa HD-om, kod koje bolesnici imaju veća kolebanja u telesnoj težini zbog interdijaliznog prinosa i najčešće tri HD-e seanse tokom nedelje. Zbog toga bolesnici lečeni HD-om imaju bržu eliminaciju viška tečnosti iz organizma u kratkom vremenskom periodu, dok se kod bolesnika na PD-u može lakše uspostaviti “stabilno zapreminsko stanje” (Luik i sar., 1994). Kao i kod bolesnika na HD-u, i bolesnici na PD-u često imaju nekontrolisanu HTA koja je glavni razlog mortaliteta kod ove grupe bolesnika (Udayaraj i sar., 2009; Zhang i sar., 2014). Medikamentozni pristup u lečenju ove dve grupe bolesnika je isti, kao i kontrola

“volumnog statusa”, ali je u PD-e grupi važnija, s obzirom na značaj očuvanja rezidualne bubrežne funkcije koja je prediktivni faktor u preživljavanju PD-i bolesnika i dužini očuvanja funkcije peritoneumske membrane (Wang i sar., 2015). Prema podacima Svetske Zdravstvene organizacije, prevalencija HTA kod bolesnika na PD-u iznosi 88% (Ortega i Materson, 2011). Retrospektivnim studijama praćenja kontrole HTA kod bolesnika na PD-u ispostavilo se da čak 79% svih bolesnika koristi lekove za HTA (Menon i sar., 2001; Varios i sar., 2019). Kontrola TA kod bolesnika na programu CAPD-a u poređenju sa bolesnicima na APD-u je nešto bolja, obzirom na dugu noćnu izmenu i veći broj dnevnih izmena, čime se omogućava veća eliminacija natrijuma (Kim i van Biesen, 2017). U velikoj kohortnoj studiji koju je sačinjavalo 2,770 incidentnih bolesnika na PD-u, je pokazano da porast od 10 mmHg TA povećava rizik od smrtnosti za 16% tokom prve godine praćenja (Udayaraj i sar., 2009). Naglo snižavanje vrednosti TA nije smanjilo incidenciju razvoja neželjenih događaja KVS-a, kao ni broj hospitalizacija i posledičnih sistemskih trombogenih događaja (Miskulin i sar., 2018). Prema preporukama međunarodnog udruženja za PD-u, ciljne vrednosti TA ostaju na ranijim generalnim preporukama za lečenje HTA, koje podrazumevaju maksimalne vrednosti do 140/90 mmHg (Wang i sar., 2015; Agarwal i sar., 2009; Agarwal i sar., 2014; McLoughlin i sar., 2011; Krediet i sar., 2008).

Na osnovu studije Van Bisen a i saradnika, klinička procena suve telesne težine, koja se bazira na količini rezidualnog urina, ultrafiltraciji i vrednostima TA, pokazala je da je svega 40% od ukupnog broja posmatranih bolesnika u stanju euvolemije, a procena je vršena korišćenjem ultrasonografije pluća, klinički verifikovanim pretibijalnim edemima i dispnejom, kao i korišćenjem bioimpedance (van Biesen i sar., 2011).

Smanjena upotreba natrijuma u ishrani, kao i korišćenje diuretika za različite delove Henle-ove petlje, ali i prilagođavanje dijaliznog režima na osnovu transportnih karakteristika peritoneuma i primena bezglukočnih rastvora tokom duge izmene kod bolesnika na APD-u, ili duge noćne izmene kod bolesnika na CAPD-u, predstavljaju prvu liniju u kontroli “volemije”, a samim tim i kontrole TA (Rutkowski i sar., 2016; Flessner i sar., 2009). Antihipertenzivna terapija se primenjuje kada, i pored primenjenih mera, TA nije u referentnom opsegu (Titze, 2015; Tan i sar., 2016). Izbor antihipertenzivne terapije je individualan i zavisi i od komorbidnih stanja. Neke studije ukazuju na primenu inhibitora angiotenzin-konvertujućeg enzima i blokatora angiotenzinskog receptora kod srednje teških HTA, radi povoljnog efekta na očuvanje rezidualne bubrežne funkcije (Yung i sar., 2006).

1.3.13. Gojaznost kod bolesnika na peritoneumskoj dijalizi

Mnogobrojni su faktori koji doprinose gubitku mišićne mase (sarkopeniji) kod bolesnika sa HBS-om, uključujući sistemsku inflamaciju, acidozu, mitohondrijalnu disfunkciju, hipovitaminozu vitamina D i drugo (Isoyama i sar., 2014). Bolesnici lečeni PD-om mogu imati i veći rizik za nastanak sarkopenije u poređenju sa bolesnicima lečenim HD-om. Razlog je, prvenstveno, velika opterećenost hipertoničnim glukoznim rastvorima i hipoproteinemijom, prevashodno usled hipoalbuminemije kao posledice gubitka albumina izlivenim dijalizatom. Zbog gubitka proteina dijalizatom, a istovremeno sa resorpcijom glukoze iz dijalizata obezbeđuje se dodatni kalorijski unos, što ima za posledicu povećanje procenta masti u organizmu (Rajakaruna i sar., 2015). Široko je prihvaćena teza da sarkopenija značajno pogoršava preživljavanje bolesnika na PD-u (Kang i sar., 2013). Specifični oblik sarkopenije, kod ove grupe bolesnika je tzv. sarkopenična gojaznost, koju karakteriše porast telesne visceralne masti i masna infiltracija skeletnih mišićnih vlakana. Lečenje PD-om takođe u značajnoj meri pogoršava kontrolu glikemije kod bolesnika sa dijabetesom i povećava rizik od razvoja dijabetesa *de novo* kod bolesnika sa insulinskom rezistencijom (Dong i sar., 2016; Liao i sar., 2011; Huang i Zhu, 2017).

1.3.14. Dislipidemija kod bolesnika na peritoneumskoj dijalizi

U poređenju sa predijaliznom populacijom i bolesnicima na HD-u, bolesnici lečeni PD-om

imaju više koncentracije lipida, što udruženo sa hipoalbuminemijom dovodi do hronične inflamacije i ubrzane ateroskleroze (Mikolasevic i sar., 2017; Omran i sar., 2013). Hiperlipidemija i medijatori inflamacije, poput faktora nekroze tumora α (TNF α) i monocitnog hemotoksičnog proteina 1, imaju potencijalno dejstvo i na gubitak funkcije peritoneumske membrane preko lokalnog oštećenja endotelijalnih ćelija kapilara (Tsimihodimos i sar., 2011; Wakabayashi i sar., 2014; Stepanova i sar., 2019).

1.3.15. Oksidativni stres i inflamacija kod bolesnika na peritoneumskoj dijalizi

Bolesnici sa ESRD-om, lečeni bilo HD-om ili PD-om se karakterišu pojačanim inflamatornim odgovorom i oksidativnim stresom, što predstavlja dodatni faktor rizika za nastanak neželjenih događaja KVS-a (Silverstein, 2009). Pojačan oksidativni stres bolesnika na PD-u posledica je delom izlaganja hipertoničnim rastvorima glukoze čiji krajnji proizvodi napredne glikacije imaju izražen oksidativni potencijal (Xu i sar., 2015). Pokazano je da kod bolesnika na HD-u dolazi do povećanog nastanka slobodnih kiseoničnih vrsta, eng. *Reactive Oxygen Species* (ROS), dok je antioksidativni kapacitet snižen (Liakopoulos i sar., 2017).

Oksidativni stres nastaje kao rezultat poremećene ravnoteže između proizvodnje ROS-a i unutrašnjeg antioksidativnog kapaciteta (Morena i sar., 2005). Prekomerna produkcija ROS-a dovodi do aktiviranja ćelija nespecifične (adaptivne) imunosti: neutrofila (Ne) i makrofaga (M ϕ) i pokretanja niza reakcija, koje indukuju oksidativne modifikacije nekoliko komponenata ćelija hematopoeze i oksidativno oštećenje nukleinskih kiselina, membranskih lipida i proteina, što doprinosi i nastanku anemije u hroničnim bolestima (Rocha-Pereira i sar., 2004; Sung i sar., 2013). Slobodni kiseonični radikali takođe mogu stimulisati inflamaciju aktiviranjem transkripcionog nuklearnog faktora β (TNF- β), koji stimuliše dalju transkripciju proinflamatornih citokina: TNF- α , ali i različitih interleukina (IL-1b, IL-2, IL-6, IL-12), C-reaktivnog proteina i leukocitarnog adhezionog molekula. Sami proinflamatorni citokini mogu dovesti do prevelike produkcije ROS-a, aktiviranjem specifične tj. ćelijske imunosti, preko različitih limfocita (CD4⁺, CD8⁺ i Nk Ly), pri čemu se uspostavlja začarani krug između komponenti oksidativnog stresa i proinflamatornih citokina (Pedruzzi i sar., 2012, Paludan i Mogensen, 2022). Od ranije je poznato da neki od pomenutih molekula utiču na pojačanu sintezu lipidnih molekula, čime ostvaruju svoj aterogeni potencijal i mogu učestvovati u nastanku strukturnog oštećenja peritoneumske membrane (Himmelfarb, 2004).

Kod bolesnika lečenih PD-om oksidativni stres nastaje i kao rezultat povećanog uticaja inflamatornih događaja, najčešće usled infekcija izlaznog mesta peritoneumskog katetera i/ili peritonitisa, ali i usled bioinkompatibilnosti dijaliznih rastvora (Sanz i sar., 2010).

1.4. Koagulacija (hemostaza)

Koagulacija, hemostaza ili zgrušavanje krvi, predstavlja put kojim se omogućava brzo stvaranje krvnog ugruška i zaustavljanje izlaska krvi preko zida povređenog krvnog suda u okolno tkivo, ili izvan tela ukoliko postoji narušen integritet kože (Habib i sar., 2019; Nogami i Shima, 2019). Mnogi faktori koagulacije doprinose razvoju ateroskleroze i povišeni su kod bolesnika sa ESRD-om, uključujući i fibronogen (faktor I), ali i protrombin (faktor II), tromboplastin (faktor III) i prokonvertin (faktor VII) (Huang i sar., 2017). Dok neki bolesnici imaju povećanu sklonost ka krvarenju, kod drugih se javlja povećani rizik od razvoja neželjenih trombotskih komplikacija (Grover i Mackman, 2019), a mehanizmi koji vode ka jednom ili drugom ishodu su i dalje nepotpuno razjašnjeni (Lutz i sar., 2014).

Postoje dva puta zgrušavanja krvi, spoljašnji i unutrašnji, čiji se početak razlikuje, ali imaju zajedničku tačku u putu, gde se ukrštaju i odakle se nastavljaju kao jedan zajednički put. Zajedničko za oba puta je stvaranje fibrina pod uticajem trombina i jona kalcijuma, u cilju stabilizacije trombocitnog čepa fibrinskom mrežom (Chaturvedi i sar., 2019; Franchi i sar., 2019).

Primarna koagulacija predstavlja agregaciju trombocita, koji formiraju trombocitni čep na mestu izloženih endotelijalnih ćelija, dok se **sekundarna koagulacija** nadovezuje uključivanjem dva glavna puta koagulacije. Mehanizam koji se uspostavlja predstavlja kompleksan proces, koji se odvija nizom aktiviranih faktora zgrušavanja preko spoljašnjeg ili unutrašnjeg puta (Panova-Noeva i sar., 2019; Phasha i sar., 2019). Svi faktori zgrušavanja (Tabela 5) se nalaze slobodni u krvotoku u svom neaktivnom (zimogenom) obliku i aktiviraju se pomoću serin-proteaza, koje deluju kao katalizatori. Unutrašnji put se aktivira preko izloženog endotelijalnog kolagena, a spoljašnji put se aktivira preko tkivnog faktora koga oslobađaju oštećene endotelijalne ćelije (Levi i Sivapalaratman, 2018; Winter i sar., 2017).

Tabela 5. Faktori koagulacije i molekuli neophodni u procesu zgrušavanja. Modifikovano prema Yamashita i sar., (2020).

Faktor (oznaka i naziv)	Funkcija
I - Fibrinogen	Formiranje krvnog ugruška
II - Protrombin	Aktivira faktore I, V, VII, VIII, XI, XIII, protein C i trombocite
III - Tkivni faktor ili tromboplastin	Kofaktor sa fVIIa
IV - kalcijum (Ca²⁺)	Omogućava vezivanje različitih faktora za fosfolipide
VI - Proakcelerin	Kofaktor sa fX sa kojim formira protrombinski kompleks
VII - Faktor stabilizacije, prokonvertin	Aktivira fIX i fX
VIII - Antihemofilni faktor A	Kofaktor sa fIX sa kojim formira tenazni kompleks
IX - Antihemofilni faktor B, Kristmas-ov faktor	Aktivira fX; formira tenazni kompleks sa fV
X - Stuar – Prower-ov faktor	Aktivira fII, formira protrombinski kompleks sa fV
XI - Plazma tromboplastinski prekursor	Aktivator fIX
XII - Hageman-ov faktor	Aktivator fXI, fVII, prekalikreina i plazminogena
XIII - faktor stabilizacije fibrina	Kovalentno povezivanje fibrinskih monomera
Von Willebrand-ov faktor	Vezuje fVIII, posreduje adheziji trombocita
Prekalikrein – Fletcher-ov faktor	Aktivira fXII i prekalikrein i omogućava cepanje kininogena
Kininogen Fitzgerald-ov faktor	Recipročna podrška u aktiviranju sa fXII, fXI i prekalikreinom
Fibronektin	Omogućava ćelijsku adheziju
Antitrombin III	Inhibira fIIa, fXIa, i ostale proteaze
Heparinski kofaktor II	Inhibira fIIa, kofaktor sa heparin i dermatan-sulfatom (manji antitrombin)
Protein C	Inaktivira fVa i fVIIIa
Protein S	Kofaktor za aktivirani protein C
Protein Z	Posreduje adheziju trombina za fosfolipide i podstiče razgradnju fX uz ZPI
ZPI - inhibitor oslobađajuće proteaze Z	Aktivator fXI, fVII, prekalikreina i plazminogena
Plazminogen	Pretvara se u plazmin, omogućava lizu fibrina
Alfa 2-antiplazmin	Inhibitor plazmina
Tkivni aktivator plazminogena (tPA)	Aktivator plazminogena
Urokinaza	Aktivator plazminogena
Plazminogen imhibitorni aktivator 1 i 2	Inaktiviraju tPA i urokinazu

1.4.1. Unutrašnji put

Unutrašnji put čine faktori I, II, IX, X, XI i XII, i predstavlja duži put sekundarne hemostaze koji započinje aktivacijom faktora XII. Nakon oštećenja endotelijalnih ćelija, faktor XII biva izložen endotelijalnom kolagenu, usled čega se aktivira. Aktivirani faktor XII označava se kao XIIa. Faktor XIIa deluje kao katalizator za aktiviranje faktora XI do njegove aktivne forme XIa. Faktor XIa zatim aktivira faktor IX u IXa, koji potom aktivira faktor X (Grover i Mackman, 2019).

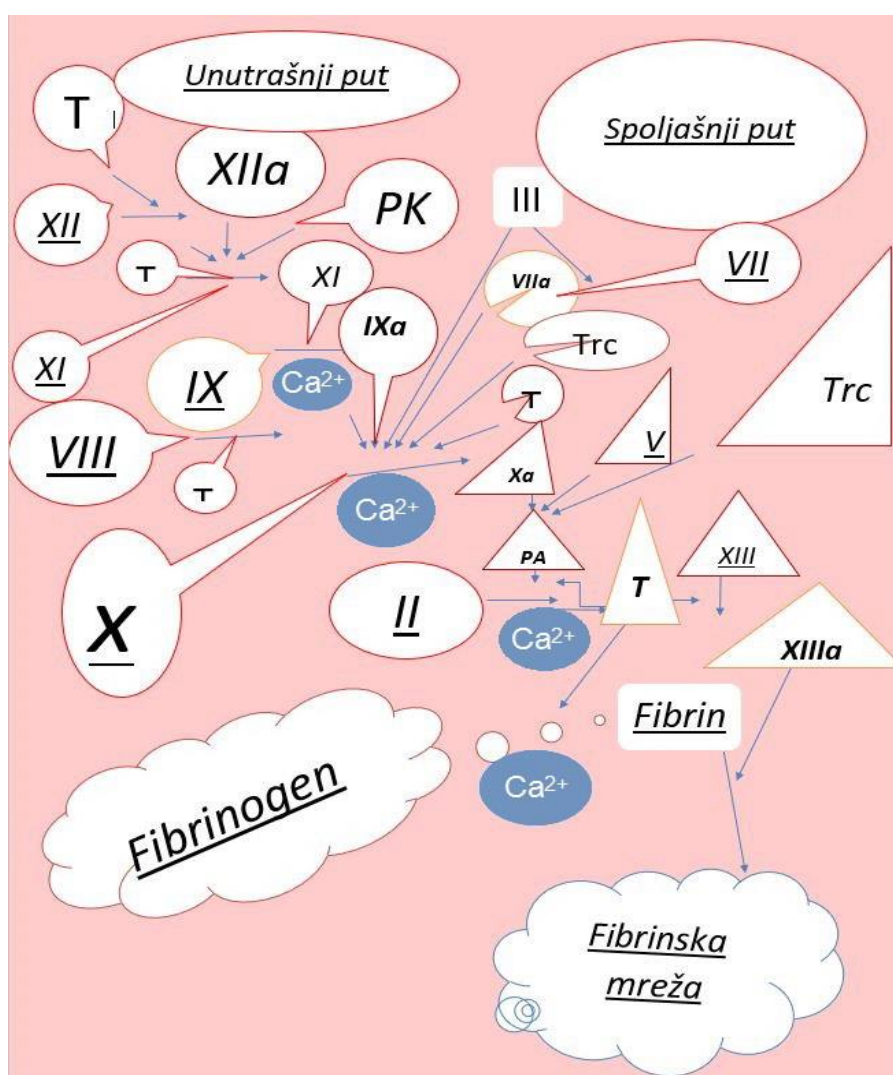
1.4.2. Spoljašnji put

Spoljašnji put hemostaze uključuje faktore I, II, VII i X. Faktor VII se naziva i faktor stabilizacije (Panova-Noeva i sar., 2019). On predstavlja kraći put sekundarne hemostaze, a aktivira se oslobađanjem tkivnog faktora iz oštećenih endotelijalnih ćelija, nakon čega se aktivira faktor VII, koji potom aktivira faktor X u Xa, što je tačka u kojoj se ukrštaju spoljašnji i unutrašnji put.

Tenaza je kompleksna struktura koja aktivira faktor X u faktor Xa, i postoji u dva oblika: spoljašnja (koja se sastoji od faktora VII, faktora III i jona kalcijuma) i unutrašnja (koja se sastoji od kofaktorskog faktora VIII, faktora IXa, fosfolipida i jona kalcijuma) (Shrestha, 2017).

Zajednički put čine faktori I, II, V, VIII i X. Nastavlja se nakon aktiviranja faktora X, nakon čega se aktivira faktor II. Faktor Xa zahteva prisustvo faktora V kao kofaktora za aktivaciju protrombina (II) u trombin (aktivnu formu IIa), koji potom deluje na fibrinogen, prevodeći ga u fibrin (Slika 1).

Trombin aktivira i faktor XI, kao i kofaktore V i VIII i faktor XIII. Nastali fibrin se udružuje i grupiše u fibrinska vlakna, a faktor XIII deluje na vlakna fibrina pri formiranju fibrinske mreže. Ova mreža pomaže u stabilizaciji trombocita pri formiranju trombocitnog čepa, tj. koaguluma, tako da u situacijama u kojima nema odgovarajuće inhibicije faktora V i VIII može doći do nastanka hiperkoagulabilnih stanja, tj. tromboze (Luyendyk i sar., 2019; Shahzad i sar., 2019; Habib i sar. 2019; Nogami i Shima, 2019).



Slika 1. Koagulaciona kaskada: unutrašnji i spoljašnji put.

1.5. Fibrinogen

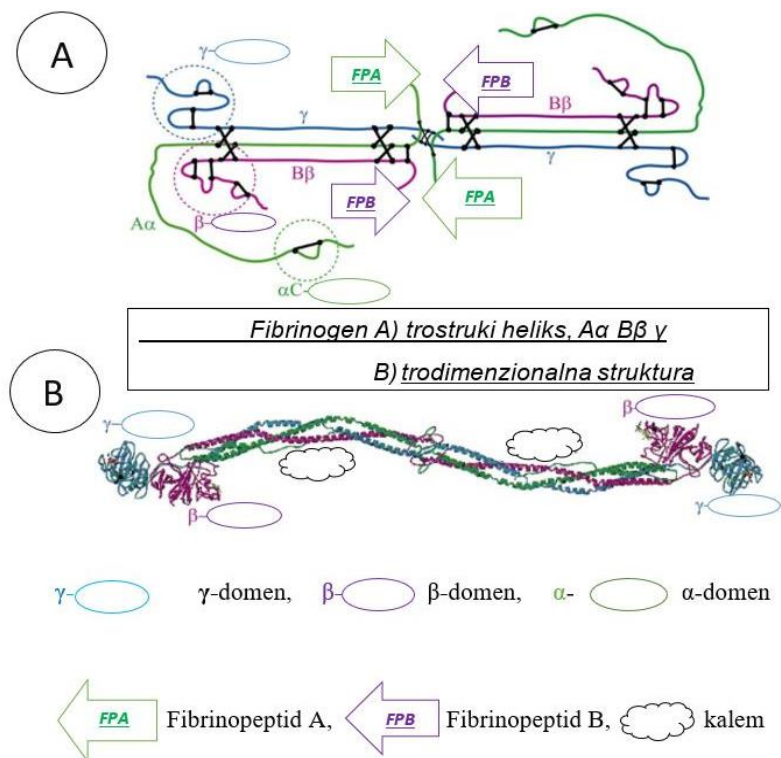
Fibrinogen je prvi faktor koagulacije, glikoprotein, homodimer molekulske mase 340 kDa, koji se sastoji od tri polipeptidna lanca međusobno povezana sa 29 disulfidnih mostova u formi $(A\alpha B\beta\gamma)_2$, i koji se sintetise u jetri (Mosesson, 2005). U cirkulaciji se nalazi u koncentraciji između 2 i 4 g/L (de Moerloose i sar., 2013), a kako je reaktant akutne faze inflamacije, njegova koncentracija se u inflamatornim stanjima može povećati i na preko 7 g/L (Casini i sar., 2016). Pored inflamacije, porast koncentracije fibrinogena se javlja i u nekim drugim oboljenjima i stanjima, kao što su različiti karcinomi i hronične bolesti jetre i bubrega (Davalos i Akassoglou, 2012). Kod urođenih ili stečenih disfibrinogenemija ili afibrinogenemije, njegova koncentracija može biti manja od 1 g/L (Repetto i De Re, 2017).

1.5.1. Struktura i sinteza fibrinogena

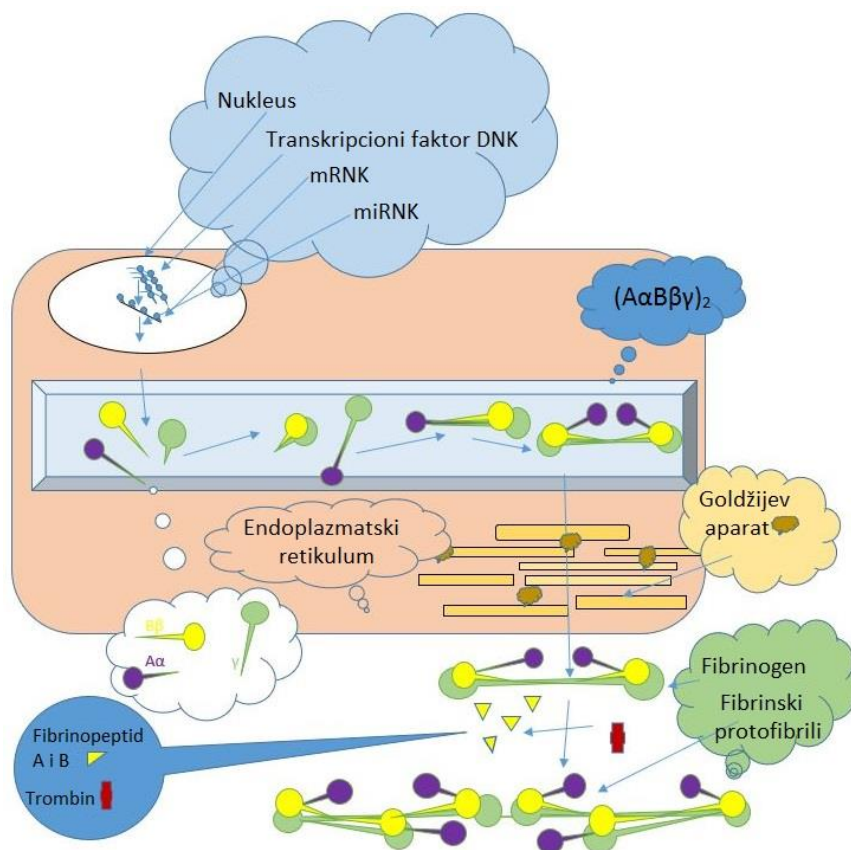
Sinteza fibrinogena se prvenstveno odvija u hepatocitima, dok se značajno manja količina sintetise u epitelnim ćelijama (Repetto i De Re, 2017). Iako se mislilo da i megakariociti sintetisu fibrinogen, danas se smatra da oni imaju samo sposobnost akumulacije fibrinogena, bez mogućnosti sinteze (Mosesson, 2005). Pored funkcije u nastanku fibrinske mreže i zaustavljanja krvarenja, fibrinogen ima i druge značajne funkcije, kao što je održavanje viskoznosti krvi (Tennent i sar., 2007; Yakoslev i Medved, 2009). Lanci fibrinogena su spojeni preko N-terminalnih krajeva u centralnom, E čvoru, od koga se pružaju uvijeni delovi. Globularni C-terminalni domeni lanaca β i γ čine D čvor. Za razliku od C-terminalnih domena lanaca $B\beta$ i γ , C-terminalni kraj lanaca $A\alpha$ (αC) je dug, fleksibilan i vezan u blizini E domena. Regioni E i D su povezani preko C konektora uvijenim α -zavojnica za sva tri lanca (Tennent i sar., 2007; Slika 2).

Geni koji kodiraju lance $A\alpha$ (*FGA*), $B\beta$ (*FGB*) i γ (*FGG*) su grupisani u području od 50 kb na hromozomu 4 (Stone i Thorp, 1985). Svaki lanac je kodiran i sintetisan u prekursorskom obliku i to u vidu polipeptida od 633 aminokiseline ($A\alpha$), 491 aminokiseline ($B\beta$) i 437 aminokiseline (γ). Alternativno splajsovanje dva γ lanca u formu *FGG* stvara γ' izoformu (de Maat i Verschuur, 2005). Pojedinačni prekursorski lanci se translociraju u lumen endoplazmatičnog retikuluma, nakon čega se signalni peptid kotranslaciono odvaja od svakog lanca zasebno (Slika 3). Ovako nastaju prekursori $A\alpha$ - γ i $B\beta$ - γ , koji se potom udružuju u formu $A\alpha B\beta\gamma$, nakon čega se formira molekul fibrinogena $(A\alpha B\beta\gamma)_2$, koji prelazi u Goldžijev aparat gde podleže glikozilaciji (Henschen-Edman, 1999; Slika 3).

Biosinteza fibrinogena se odvija u hepatocitima, nakon čega se oslobađa u plazmu, a vreme poluživota mu je 4 dana, zbog čega predstavlja reaktant akutne faze inflamacije. Takva frakcija predstavlja 25% ukupno sintetisanog fibrinogena. Pored fibrinogena plazme, postoji i depo frakcija fibrinogena u α granulama trombocita, koja se oslobađa nakon vezivanja fibrinogena plazme i glikoproteina IIb/IIIa inkorporiranih u membrani trombocita (Handagama i sar., 1993; Yun i sar., 2016).



Slika 2. Šematski prikaz trodimenzionalne strukture fibrinogena, prema Philippe de Moerloose i sar. (2013).



Slika 3. Šematski prikaz biosinteze fibrinogena.

1.5.2. Posttranslacione modifikacije fibrinogena

Posttranslacione modifikacije (PTM) proteina uključuju niz reakcija, od enzimskog raskidanja peptidnih veza, do kovalentnog vezivanja određenih hemijskih grupa. Do sada je zabeleženo oko 300 različitih tipova PTM-a, od kojih su najznačajnije: acetilacija, amidacija, biotilacija, cisteinilacija, deamidacija, formilacija, glikozilacija, glikacija, hidroksilacija, metilacija, oksidacija, sulfatacija, fosforilacija, itd. (Uversky i Dunker, 2010). Svi aminokiselinski ostaci su mete pomenutih modifikacija, ali najčešće su to oni ostaci koji su jaki (cistein, metionin, serin, treonin, tirozin, histidin, glutaminska kiselina) ili slabi (asparagin i glutamin) nukleofili (Uversky i Dunker, 2010).

Smatra se da je 60% svih tkivnih proteina N-glikozilovano (Apweiler, 2000). Kod **N-glikozilacije** dolazi do kovalentnog vezivanja ugljenih hidrata za asparagin (Asn) u sekvenci Asn-X-Ser/Thr, a gde X predstavlja bilo koju aminokiselinu izuzev prolina (Aebi, 2013). Pored prisustva ove sekvence, neophodno je da se protein nađe i u odgovarajućoj konformaciji. Proces N-glikozilacije se odigrava u endoplazmatičnom retikulumu i Goldžijevom aparatu, orkestriranim dejstvom različitih glikozil-transferaza i glikozidaza (Ohtsubo i Marth, 2006). Postoje tri tipa N-glikana: visokomanozni, hibridni i kompleksni (Nagae i Yamaguchi, 2012).

O-glikozilacija predstavlja stvaranje O-glikozidne veze između OH-grupe treonina (Thr) ili serina (Ser) i anomernog C atoma GalNAc. Može se primetiti na različitim tipovima proteina: od onih zastupljenih u unutrašnjosti ćelije (endoplazmatičnom retikulumu, Goldžijevom aparatu, citoplazmi), do eksprimiranih na površini ćelijske membrane, ali i onih koji se izlučuju iz ćelije, od kojih su neki i faktori koagulacije. Imaju više različitih uloga, od imunskog posredovanja u uklanjanju stranog tela, do različitih metaboličkih funkcija, zbog čega se povezuju sa nastankom nekih oboljenja: karcinomima, diabetes mellitus-om, Alchajmer-ovom bolesti (Alzheimer-s) (Litgow i sar., 2014). Do sada je najbolje opisan mucinski tip O-glikozilacije, kod koje se prvi ugljenohidratni ostatak α GalNAc nadovezuje na uvijeni protein, a ostatak koji će se potom nadovezati zavisi od strukture proteina (primarne, sekundarne, tercijarne). Takvi proteini se označavaju kao mucini koji se sekretuju izvan ćelije (Yang i Qian, 2017). Pored navedene, značajna je O-glikozilacija Glc- α -Ser, čija se modifikacija odvija u endoplazmatičnom retikulumu pod uticajem O-glikoziltransferaze, čime se omogućava sinteza faktora koagulacije VII i IX (Spiro, 2002; Kooman i van der Sande 2019).

Fibrinogen je posttranslaciono modifikovan na više načina, od kojih su najznačajnije proteolitička degradacija, fosforilacija i glikozilacija (de Vries i sar., 2020). Sva tri lanca fibrinogena su glikozilovana tako da nose O- i/ili N-glikane. A α lanac ima dva potencijalna mesta N-glikozilacije (Asn453 i Asn686) (Hoffmann i sar., 2018). Usled mutacija na pozicijama 453 i 139 javljaju se nova mesta N-glikozilacije, poznata kao Karakas II i Lima (Marchi i sar., 2004; Martinez i sar., 2013). N-glikozilovani Fib420, koji se nalazi u medijumu ćelija hepatoma, je varijanta fibrinogena sa dva proširena A α lanca poznata i pod nazivom α E (Fu i Grieneringer, 1994). B β -podjedinica je glikozilovana na Asn394, dok je γ -podjedinica N-glikozilovana na poziciji Asn78 (Clerc i sar., 2016), sa dodatnom glikozilacijom na Asn308 pronađenoj u mutant varijanti poznatoj kao Asahi (Yamazumi i sar., 1989). Fibrinogen sadrži brojna mesta O-glikozilacije u različitim regionima A α -podjedinice samo na jednom mestu B β -podjedinice, dok se smatra da γ -podjedinica nije O-glikozilovana (Hoffmann i sar., 2018; Zauner i sar., 2012). Glikozilacija fibrinogena nije često ispitivana, ali postoje podaci o promeni u O- i N-glikozilaciji podjedinica fibrinogena kod bolesnika sa cirozom i hepatocelularnim karcinomom (Nagel i sar., 2018; Gligorijević i sar., 2018), bolesti koje sa ESRD-om povezuju hronična inflamacija i fibroza (White i sar., 2016; Sjøland i sar., 2007).

Nitracija se dešava u uslovima oksidativnog stresa pri stvaranju ROS-a, kada superoksid anjon reaguje sa azotoksidom (\cdot NO), pri čemu nastaje visoko reaktivni peroksinitrit. U reakciji O₂ i \cdot NO sa peroksinitritom dolazi do stvaranja ostalih reaktivnih azotnih vrsta, u vidu nitrita i nitronijum jona. Proces se odvija na ostacima Tyr, što uslovljava nastanak 3-nitrotirozina, ili na ostacima Cys, uslovljavajući nastanak 3-nitrocisteina (Griendling i sar., 2016; Luo i sar., 2015).

Acetilacija je reakcija vezivanja acetil grupe na aminokiselinske ostatke. Može se odvijati na N-terminalnim krajevima polipeptidnih lanaca, uslovljena enzimskom aktivnošću Nt-acetiltransferaza, ili na ϵ -amino grupi Lys ostataka, aktivnošću lizin-acetiltransferaza (Dražić i sar., 2016). Acetilacija može biti uslovljena terapijskim okvirima primene acetilsalicilne kiseline u prevenciji neželjenih događaja KVS-a, gde se acetilacija odvija na Ser ostacima trombocitne ciklooksigenaze, dok se na fibrinogenu odvija na ostacima Lys (Bjornsson i sar., 1989; Gabay i Kushner, 1999).

Fosforilacija predstavlja dodavanje fosfatne grupe na aminokiselinske ostatke polipeptidnih lanaca, aktivnošću kinaza. Fosforilacija fibrinogena se najčešće odvija na ostacima Tre i Ser u sastavu $A\alpha$ lanca. U postoperativnim stanjima je dokazana značajno povišena fosforilacija fibrinogena, što ukazuje da fosforilisani fibrinogen ima protektivni značaj u prevenciji hemoragije (Martin i sar., 1992).

Kod bolesnika sa HBS-om je otkrivena **karbamilacija** fibrinogena, koja se ostvaruje u reakciji aminokiselinskih ostataka sa izocijanskom kiselinom. U ovoj reakciji se ureja razlaže na $^+NH_4$ jon i cijanat koji se prevodi u izocijansku kiselinu, zbog čega je njen sadržaj povećan u HBS-u, ali i u aterosklerozi i nastanku komplikovanih plakova (Jaisson i sar., 2011). Kod bolesnika sa ESRD-om, lečenih HD-om, je dokazana **guanidinilacija**, kod koje se amino grupa prevodi u guanidin (Schuett i sar., 2017). Uticaj pomenutih PTM-a kod bolesnika sa HBS-om i ESRD-om još uvek nije dovoljno rasvetljena (de Vries i sar., 2020).

1.5.3. Fibrinogen i bolesti bubrega

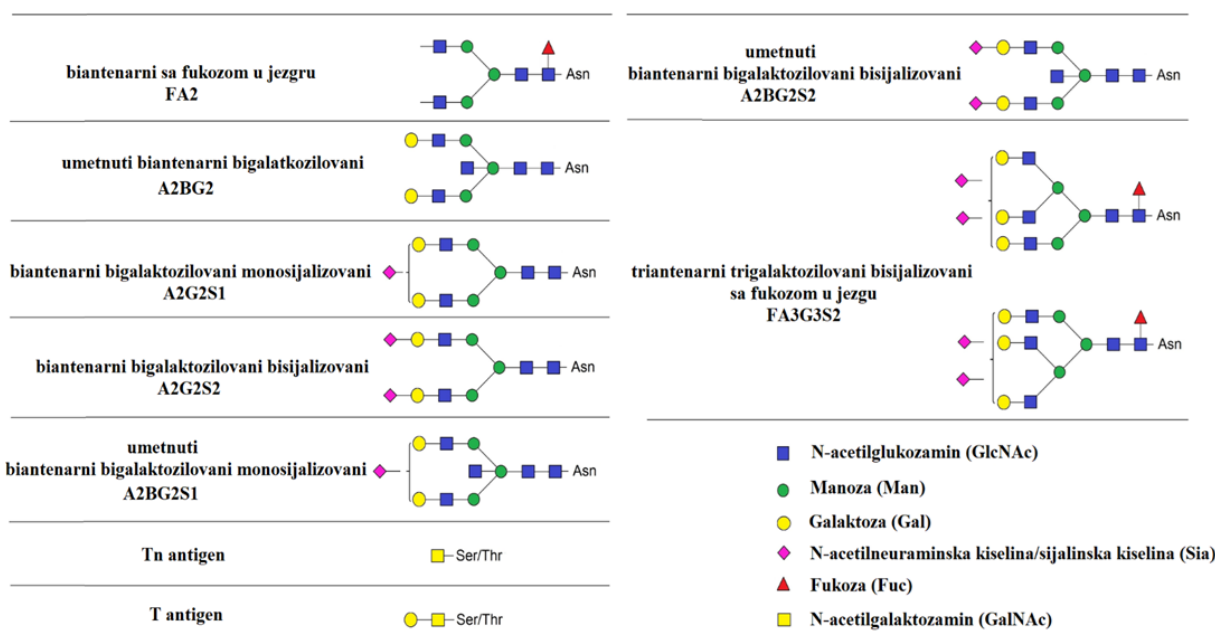
Glavna uloga fibrinogena je u hemostazi, a njegove koagulacione osobine mogu se menjati usled promene koncentracije proteina u serumu, i usled različitih modifikacija (Lados-Krupa i sar., 2015). Kod bolesnika sa ESRD-om, pored povišene koncentracije (hiperfibrinogenemije), detektovana je i oksidacija fibrinogena, što doprinosi promenama funkcije fibrinogena i nastanku neželjenih kardiovaskularnih komplikacija (Hugenholtz i sar., 2016; Utrera i Estevez, 2012).

Podaci o posledicama oksidacije fibrinogena na njegovu funkciju su kontroverzni. Dosadašnje studije, koje su se bavile stvaranjem i ispitivanjem osobina krvnog ugruška kod bolesnika sa HBS-om, su pokazale da kod ove grupe bolesnika dolazi do odloženog formiranja i stvaranja krvnog ugruška koji je otporniji na razgradnju (Becatti i sar., 2014; Undas i sar., 2007; Lisman i Ariens, 2016; Blomback i sar., 1989; Cao i sar., 2016). Kod bolesnika lečenih PD-om postoji značajno viša sklonost ka trombozama u poređenju sa bolesnicima lečenih HD-om (Brophy i sar., 2013). Prema Binderu i saradnicima, oksidativno modifikovani fibrinogen postaje trombogen, dok Li i saradnici smatraju da određena stanja koja su praćena povećanim oksidativnim stresom karakteriše prisustvo fibrinogena koji ima veću sklonost ka fibrinolizi, tako da postoji povećan rizik od sklonosti ka krvarenju (Binder i sar., 2017; Li i sar., 2016).

1.6. Detekcija i analiza ugljenohidratnih komponenti

Informacije o sadržaju kompleksnih ugljenohidratnih struktura (glikana) dobijaju se različitim tehnikama, ali se u tu svrhu najčešće koriste lektini. Na njima su zasnivaju lektinska afinitetna hromatografija, lektinski blot, lektinska histohemija i dr. (Jain i sar., 2012).

Lektini su (gliko)proteini neimunološkog porekla i vezuju ugljene hidrate, a koji mogu da aglutinišu eritrocite. To su molekuli koji prepoznaju i intereaguju sa pojedinačnim mono-/oligosaharidima ili složenijim ugljenohidratnim strukturama (Slika 4), gde ostaci ugljenih hidrata mogu diktirati prepoznavanje lektin-ugljeni hidrat. Ove interakcije zavise od različitih parametara, lektinske strukture, mesta vezivanja i organizacije, prisustva metalnih jona, multivalentnost lektina (Hendrickson i Zherdev, 2018).



Slika 4. Strukture N- i O- glikana sa anotacijama za ugljene hidrate, prema preporukama Konzorcijuma za funkcionalnu glikomiku (Baralić i sar., 2020).

Lektini su nezaobilazni i izuzetno korisni u istraživanjima ugljenih hidrata prisutnih na površini ćelije, posebno kod promena tokom maligne transformacije ćelije, kao i za izolovanje i karakterizaciju glikoproteina (Sharon i Lis, 2007). Veliki broj lektina izolovan je iz materijala biljnog porekla, kao i iz mikroorganizama, gljiva i životinjskih tkiva.

Glikozilacija je ko/post-translaciona modifikacija koja utiče na ćelijsku adheziju, migraciju, signalnu transdukciju, funkciju i interakcije biomolekula (Schilte i sar., 2009). Kod bolesnika u ranim stadijumima HBS-a nađena je korelacija između tipa glikozilacije serumskog IgG i oštećenja bubrežne funkcije, a kod bolesnika lečenih PD-om između peritonitisa i gubitka mezotelijalnih ćelija sa smanjenim nivoom glikana sličnim onima koje ima IgG, kao i nivoom galaktozilacije biantenarnih glikana (Barrios i sar., 2016; Ferrantelli i sar., 2018).

2. Ciljevi istraživanja

U ovoj doktorskoj disertaciji postavljeni su sledeći ciljevi:

- 1) Da se kod bolesnika lečenih peritoneumskom dijalizom izoluje fibrinogen i ispita:
 - a) formiranje, struktura i osobine fibrinske mreže i struktura izmene fibrinogena;
 - b) stepen oksidacije fibrinogena;
 - c) promene u glikanskom profilu fibrinogena;
 - d) raspodela glikana na pojedinačnim lancima fibrinogena.
- 2) Da se promene glikanske strukture fibrinogena koreliraju sa parametrima funkcije peritoneumske membrane, dijaliznom dozom, rezidualnom bubrežnom funkcijom, kao i pojavom peritonitisa;
- 3) Da se koreliraju podaci o glikozilaciji fibrinogena sa parametrima povezanim sa kardiovaskularnim događajima (cerebrovaskularnim insultom, akutnim infarktom miokarda, perifernom i sistemskom trombozom) i sveukupnim mortalitetom.

3. Materijal i metode

3.1. Tip studije i mesto istraživanja

Istraživanje je sprovedeno kao opservaciona studija preseka, koja je obuhvatila 52 bolesnika lečenih peritoneumskom dijalizom u decembru 2019. godine i koji su praćeni prospektivno narednih 18 meseci. Svi bolesnici se nalaze na lečenju u Klinici za nefrologiju Univerzitetskog Kliničkog centra Srbije (UKCS). Istovremeno, u studiju su uključena i 32 zdrava dobrovoljca, koji su prema biohemijskim parametrima i anamnestičkim podacima činili zdravu grupu ispitanika (kontrolnu grupu), uporedivu prema polu i starosti sa grupom PD-e bolesnika. Eksperimentalni deo je sproveden u saradnji sa Institutom za primenu nuklearne energije Univerziteta u Beogradu (INEP), i Institutom za hemiju Slovačke Akademije nauka u Bratislavi.

Istraživanje su odobrili Etički odbor MFUB-u, Etički odbor UKCS-a i INEP-a rešenjem pod brojem 890/8. Svi ispitanici su dali svoju pisanu saglasnost za učestvovanje u istraživanju, dok je samo istraživanje sprovedeno u skladu sa Helsinškom deklaracijom i Etičkim smernicama za medicinska i zdravstvena istraživanja koja uključuju ispitivanja na ljudima.

3.2. Bolesnici u istraživanju

Svim bolesnicima je krv izvađena ujutru u 7 h, nakon izlivanja noćne i najduže dijalizne izmene. Prvo je obavljen klinički pregled, koji je podrazumevao internistički pregled sa uzimanjem detaljnih anamnestičkih podataka, inspekcijom i auskultacijom, kojim su isključena akutna infektivna stanja. Pregledano je izlazno mesto peritoneumskog katetera kojim je isključena infekcija izlaznog mesta, a na osnovu biohemijskog pregleda sedimenta peritoneumskog dijalizata i kliničkog pregleda abdomena isključen je peritonitis. Svi bolesnici su lečeni standardnim rastvorima glukoze, dok je 6 bolesnika koristilo i glukozni polimer (ikodekstrin) tokom noćne izmene.

U ispitivanje su uključeni samo bolesnici koji u periodu od tri meseca pred sakupljanje uzoraka nisu imali peritonitise, niti kliničke i laboratorijske znake infekcije izlaznog mesta peritoneumskog katetera. Iz istraživanja su isključeni bolesnici koji su uzimali oralne antikoagulanse i antiagregacionu terapiju, kao i bolesnici koji su od ranije imali poznatu koagulopatiju ili hematološki malignitet. Takođe su iz istraživanja isključeni bolesnici sa akutnom ili hroničnom lezijom jetre, što je podrazumevalo da su svi ispitivani bolesnici imali negativan virusološki status za hepatotropne viruse (anti-HCV i HbsAg), a u biohemijskim analizama su imali aminotransferaze (AST i ALT), gamma-GT i bilirubin (direktni i indirektni) u granicama referentnih vrednosti.

Za određivanje Čarlsonovog indeksa komorbiditeta je korišćen CCI kalkulator (<https://www.mdcalc.com/charlson-comorbidity-index-cci>). Indeksi koegzistirajuće bolesti (IPI, IDS I ICED) su izračunati prema uputstvu Miskulin-a i saradnika (2001); za više informacija: [https://www.kidney-international.org/article/S0085-2538\(15\)48019-6/fulltext#t0010](https://www.kidney-international.org/article/S0085-2538(15)48019-6/fulltext#t0010).

3.3. Procedura uzimanja uzoraka krvi

Ispitanicima su istovremeno uzimani uzorci krvi za biohemijske analize, u epruvete bez antikoagulansa, i uzorci pune krvi u epruvete sa natrijum-citratom kao antikoagulansom, u cilju izolovanja plazme, a kasnije i fibrinogena. Biohemijski parametri određeni su u laboratoriji UKCS-e, dok je izolovanje plazme i fibrinogena urađeno u INEP-u.

Krvne slike su urađene na automatskom hematološkom analizatoru Beckman Coulter® HmX Hematology Analyzer (Beckman Coulter, Inc., Breja, Kalifornija, SAD). Ostale biohemijske analize su urađene na biohemijskom analizatoru Architect ci8200 (Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Nemačka), a podrazumevale su određivanje: glukoze, ureje, kreatinina, mokraćne kiseline, ukupnih proteina, albumina, gvožđa, feritina i parathormona (PTH).

3.4. Testovi za procenu kvaliteta peritoneumske dijalize (transportni status)

Peritoneumski ekvilibrijumski test, *eng. Peritoneal Equilibration Test (PET)* omogućava semikvantitativnu procenu transportnih karakteristika peritoneumske membrane kod bolesnika lečenih PD-om, gde se određuje brzina kojom se rastvorene materije prenose kroz peritoneumsku membranu, dok se ne uspostavi ravnoteža za datu materiju sa obe strane peritoneumske membrane, u serumu (cirkulaciji) i ulivenom dijaliznom rastvoru. Količnik između koncentracija rastvorenih materija u dijaliznom rastvoru i u serumu u određenim vremenskim intervalima (t) tokom dijalizne izmene ukazuje na brzinu uspostavljanja ravnoteže. PET se izvodi tokom 4-časovnog zadržavanja standardnog dijaliznog rastvora glukoze, pod standardizovanim uslovima, prema preporuci Smit-a i saradnika (2003). Samom testu je kod svih bolesnika prethodno učinjena lavaža dijaliznim rastvorom najniže koncentracije glukoze, kako bi se izbegao mogući uticaj preostale zapremine dijalizata koji bi uticao na rezultat transportnih karakteristika (Cnossen i sar., 2011). Uzorci krvi su tokom izvođenja PET-a uzorkovani u 0, 60, 120 i 240 minutu, dok su uzorci dijalizata uzorkovani u isto vreme kada i krv. PET za kreatinin određuje se iz količnika koncentracije kreatinina dijalizata u 240-om minutu i koncentracije kreatinina plazme u nultom minutu. PET za glukozu određuje se iz količnika koncentracije glukoze iz dijalizata u 240 minutu u odnosu na i početne koncentracije glukoze u dijalizatu. Svim bolesnicima je PET određivan u vremenskom intervalu kraćem od 6 meseci pre početka istraživanja.

3.5. Procena kvaliteta dijalize (klirensi ureje i kreatinina)

Kvalitet, tj. adekvatnost izdijaliziranosti procenjuje se preko ukupnog nedeljnog klirensa ureje (nedeljni Ku) i ukupnog nedeljnog klirensa kreatinina (nedeljni Ccr) (Watson i Thompson, 1980). Za procenu kvaliteta dijalize je korišćen softverski paket Baxter, Healthcare, Deerfield, IL, USA.

3.6. Izolovanje fibrinogena

Za izolovanje fibrinogena iskorišćeni su uzorci pune krvi sa antikoagulansom. Centrifugiranjem na 800g, u trajanju od 5 minuta, razdvojena je krvna plazma od krvnih ćelija. Iz 500 μ l plazme fibrinogen je istaložen metodom ispoljavanja, upotrebom zasićenog rastvora amonijum-sulfata, tako da je finalna koncentracija soli bila 20%. Nakon toga je smeša centrifugirana na 10,000g tokom 5 minuta, usled čega je fibrinogen pao u vidu taloga. Supernatant je odbačen, a talog fibrinogena ispran i rastvoren u 50 mM fosfatnom puferu sa 150 mM natrijum-hloridom (*eng. Phosphate Buffer Saline, PBS pH 7,4*) i ponovo istaložen pri istim uslovima. Talog je finalno rastvoren u čistom PBS-u i do upotrebe čuvan u zamrzivaču na -25°C . Koncentracija izolovanog fibrinogena određena je u testu sa bicinoninskom kiselinom po uputstvu proizvođača (Thermo Fisher Scientific, Valtam, SAD). Za potrebe svakog pojedinačnog eskperimenta, uzorci su razblaživani sa 50 mM PBS-om, do istih koncentracija proteina.

3.7. Analiza koagulacije izolovanog fibrinogena

U mikrotitar pločici od 96 mesta, na sobnoj temperaturi, u rastvor fibrinogena (2,9 μM finalna koncentracija u 50 mM PBS sa 2,2 mM CaCl_2) je dodat trombin (finalna koncentracija 1 IU/ml), pa je potom ploča odmah ubačena u Victor3V ELISA čitač (PerkinElmer, SAD), uz orbitalno mešanje. Proces koagulacije je praćen na talasnoj dužini od 350 nm tokom 8 minuta. Apsorbanca je očitana na svakih 10 sekundi. Dobijene vrednosti su korigovane oduzimanjem vrednosti dobijenih za slepu probu, koju je činila smeša bez fibrinogena. Iz dobijenih podataka su izračunati vreme i brzina koagulacije, kao i maksimalna apsorbanca na 350 nm iz koje se može doći do informacija o debljini fibrinskih vlakana. Analizirani su pojedinačni uzorci fibrinogena prema proceduri Scott-a i saradnika (2011).

3.8. Skenirajuća elektronska mikroskopija

Zbirni uzorci fibrinogena napravljeni su od uzoraka korišćenih za sprektrofluorimetrijsko očitavanje. Izolovani fibrinogen (11,8 μM u 50 mM PBS pH 7,4 sa 2,2 mM CaCl_2) je inkubiran sa trombinom (1 IU/ml) i ostavljen preko noći u vlažnoj komori. Potom je nastali fibrin ispran u 10 mM PBS-u i fiksiran 2% rastvorom glutaraldehida u puferu za koagulaciju na 4 °C preko noći. Nakon ponovnog ispiranja u 10 mM PBS-u, uzorak je bio postepeno dehidratiran rastvorima etanola različite koncentracije (30, 50, 70, 96 i 100% etanola), tako što je fibrin u svakom rastvoru zadržan po 1 h. Nakon dva ispiranja u 100% etanolu i liofilizacije, fibrinska vlakna su snimljena skenirajućim elektronskim mikroskopom JSM 6390LV (JEOL, Peabody, MA, SAD). Dobijene slike su analizirane u softveru ImageJ (NIH, Betezda, MD, USA), dok je debljina vlakana izmerena u različitim delovima dobijenih slika.

3.9. CD spektroskopska analiza fibrinogena

U cilju dobijanja informacija o sekundarnoj i tercijarnoj strukturi proteina korišćena je nedestruktivna metoda spektroskopije cirkularnog dihroizma (CD), zasnovane na osobini molekula da različito apsorbuju levo i desno cirkularno polarizovanu svetlost (Williams i Daviter, 2013). Po dva zbirna uzorka fibrinogena za obe ispitivane grupe (finalna koncentracija 3 μM) su analizirani na Jasco J-815 spektropolarimetru (Jasco, Tokio, Japan). CD spektroskopija daleke UV oblasti (za analizu sekundarne strukture proteina) je snimljena u opsegu 185-260 nm, pri brzini skeniranja od 50 nm/min, upotrebom kivete čija je dužina optičkog puta 0,1 mm. Bliska UV oblast (za analizu tercijarne strukture proteina) je snimljena u opsegu 250-350 nm, pri brzini od 50 nm/min, u kiveti čija je dužina optičkog puta 10 mm. Svaki put je snimanje urađeno tako da je prosečna slika bila skup tri skeniranja. Dobijeni spektri su uprosečeni i oduzet je spektar slepe probe, tj. pufera (50 mM PBS), i analizirani CDPro softverom.

3.10. Spektrofluorimetrijska analiza fibrinogena

Od svih sakupljenih uzoraka izolovanih fibrinogena napravljen je po jedan zbirni uzorak za obe ispitivane grupe, odnosno jedan uzorak fibrinogena bolesnika na peritoneumskoj dijalizi i jedan uzorak fibrinogena zdravih ispitanika, tj. kontrolne grupe. Uzorci (20 nM finalna koncentracija) su analizirani FluoroMax[®]-4 spektrofluorimetrom (HORIBA Scientific, Japan). Spektri su snimljeni u opsegu talasnih dužina 310-400 nm, dok je širina emisionog i ekscitacionog otvora podešena na 5 nm. Svaki spektar je snimljen dva puta i korigovan signalnom dobijenim za pufer (50 mM PBS).

3.11. Ispitivanje oksidativnih modifikacija fibrinogena

Uzorci fibrinogena (finalna koncentracija 14,7 μM) su inkubirani sa rastvorom dinitrofenilhidrazina (DNP) (Tilley i sar., 2011), pa je produkt ove kovalentne reakcije praćen elektroforetskim razdvajanjem na 10% poliakrilamidnom gelu sa natrijum-dodecil-sulfatom (*eng. Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE) u redukujućim uslovima. Proteini su nakon elektroforetskog razdvajanja prenešeni Western blotom na nitroceluloznu membranu. Nakon bojenja proteina rastvorom Ponceau S, slobodne grupe su blokirane u rastvoru 5% mleka u puferu 10 mM tris-hidroksimetil-aminometana sa 150 mM natrijum-hloridom (*eng. Tris Buffer Saline*, TBS) sa dodatkom 0,01% Tween[®]20 (TBST), dok je prisustvo DNP-derivata ispitano inkubacijom sa antitelima spram DNP-a (Sigma-Aldrich, Štajnhajm, Nemačka). Detekcija signala je praćena inkubacijom sa sekundarnim antitelima obeleženim peroksidazom iz rena (HRP) i interakcijom HRP-a sa reagensom za hemiluminiscenciju. Signal je detektovan autoradiografijom, na rendgenskom filmu, dok je intenzitet signala analiziran Image Master TotalLab softverom (Amersham BioSciences, Bakingemšir, UK). Intenziteti signala dobijeni imunoblotom normalizovani su spram intenziteta signala dobijenih nakon bojenja Ponceau S bojom.

3.12. Mikroerej baziran na lektinima

Uzorci fibrinogena su razblaženi do 100 µg/mL u 50 mM PBS pH 7,4, a potom naneti na pločice pokrivene epoksisilanom. Svi uzorci su naneti u triplikatu, u 8 identičnih polja, upotrebom bezkontaktnog piezoelektričnog štampača sciFLEXARRAYER S1 sa kapilarom PDC 90 (Scienion AG, Berlin, Nemačka), pri temperaturi od 14 °C i vlažnosti od 60%. Nakon inkubacije na 4 °C u trajanju od 2 h, slobodne epoksi grupe su blokirane 3% rastvorom serumskog albumina govečeta (SAG) u PBS-u, na 4 °C u trajanju od 1 h. Nakon ispiranja, fibrinogen je inkubiran sa odabranim biotinilovanim lektinima koncentracije 25 µg/mL u PBS-u sa 0,05% Tween 20 (PBST), 1 h na sobnoj temperaturi. Nakon dodatnog ispiranja i inkubacije sa 0,5 µg/mL CF647-streptavidinom u trajanju od 15 minuta na sobnoj temperaturi i odstranjivanja viška reagensa ispiranjem u PBST-u i destilovanoj vodi, pločice sa proteinima su osušene centrifugiranjem na 1000g, u trajanju od 1 minuta. Signali su potom očitani na fluorescentnom skeneru InnoScan[®]710 (Innopsys, Karbon, Francuska) i analizirani softverom Mapix[®]5.5.0 (Innopsys, Karbon, Francuska). Lektini su odabrani na osnovu dostupnih podataka o glikozilaciji fibrinogena.

3.13. Lektinski blot

Zbirni uzorci izolovanih fibrinogena napravljeni su za obe ispitivane grupe (16 obolelih i 9 kontrolnih), i analizirani na SDS-PAGE-u pod redukujućim uslovima, na 10% gelu. Nakon elektroforetskog razdvajanja, transfera proteina na nitroceluloznu membranu i bojenja rastvorom Ponceau S, membrana je inkubirana u 3% SAG u TBST, preko noći, da bi se blokirala nevezana mesta. Potom je usledila inkubacija u rastvoru biotinilovanih lektina (1:5000 u PBST), u trajanju od 1 h na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja u TBST, detekcija signala je urađena autoradiografijom, nakon jednočasovne inkubacije sa rastvorom avidina D konjugovanog sa HRP (1:50000 u TBST) i supstrata za hemiluminiscenciju. Detektovani signali su analizirani Image Master TotalLab softverom (Amersham BioSciences, Bakingemšir, UK). Lektini su, kao i kod lektinskog mikroereja, odabrani na osnovu dostupnih podataka o glikozilaciji serumskih proteina i fibrinogena i rezultata mikroereja.

3.14. Statistička analiza

Za prikazivanje osnovnih karakteristika ispitanika korišćene su metode deskriptivne statistike. Za poređenje kategoričkih varijabli korišćen je χ^2 test ili Fišerov test. U zavisnosti od normalnosti raspodele, rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija ili medijana \pm interkvartilni opseg. Poređenje između ispitivanih grupa urađeno je studentovim T testom ili Mann–Whitney U testom. Za ispitivanje korelacija dobijenih parametara korišćen je Pirsonov test. Multiparametrijska analiza za parametre sa normalnom distribucijom urađena je jednosmernom ANOVA-om, sa Tukey post-hoc testom, dok je za parametre čija je distribucija odstupala od normalnosti korišćen Kruskal–Wallis-ov test. Multivarijantna binarna logistička regresiona analiza korišćena je za procenu povezanosti glikozilacije i ultrafiltracije, dok je diskriminatorna snaga modela procenjena korišćenjem ROC krive. Cox-ovom univarijantnom i multivarijantnom logističkom regresionom analizom ispitan je uticaj pojedinačnih varijabli (demografske, komorbidne, biohemijske, kao i signali dobijeni lektinskim mikroerejom) na ukupan mortalitet, nakon perioda praćenja od 18 meseci. Statistička značajnost definisana je kao p vrednost manja od 0,05, osim kod rezultata Cox-ove regresione analize, gde je statistička značajnost definisana kao p vrednost manja od 0,10 (nivo α greške manji od 10%). Statistička analiza udrađena je u programu SPSS v.18 (Čikago, SAD).

4. Rezultati

4.1. Deskriptivna statistika bolesnika na peritoneumskoj dijalizi

Istraživanje je studijom preseka, obuhvatilo 52 bolesnika, koji su prospektivno praćeni narednih 18 meseci, a čije su epidemiološke, kliničke i laboratorijske karakteristike na početku studije prikazane u Tabeli 6.

Tabela 6. Demografske, kliničke i biohemijske karakteristike bolesnika lečenih peritoneumskom dijalizom i zdrave kontrole, izražene su kao medijana \pm interkvartilni opseg (MKO) ili srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD). Statistički značajne razlike označene su zvezdicom.

	Bolesnici na peritoneumskoj dijalizi (PD) n=52	Zdrave kontrole (Z) n=32	p
Muškarci (n)	26	16	
Starost (godine), medijana \pm MKO	65,5 \pm 15,8	61,0 \pm 29,3	0,048*
Dužina dijaliznog staža (meseci), medijana \pm MKO	30,0 \pm 49,5	/	
Diabetes mellitus	20 (38,5%)	/	
Eritropoetin (ESA)	22 (42,3%)	/	
Sistolni pritisak (mmHg), srednja vrednost \pm SD	135,29 \pm 16,99	/	
Dijastolni pritisak (mmHg), srednja vrednost \pm SD	79,42 \pm 8,78	/	
Biohemijski parametri			
Glukoza (mM), medijana \pm MKO	5,6 \pm 2,5	5,3 \pm 0,9	0,589
Ureja (mM), medijana \pm MKO	16,1 \pm 6,3	5,1 \pm 0,8	<0,00001*
Kreatinin (μ M), medijana \pm MKO	653,0 \pm 204,3	81,0 \pm 22,0	<0,00001*
Mokraćna kiselina (μ M), medijana \pm MKO	310,0 \pm 62,5	325,0 \pm 91,3	0,603
Ukupni proteini (g/L), medijana \pm MKO	65,0 \pm 9,3	72,3 \pm 2,7	0,0477*
Albumin (g/L), medijana \pm MKO	37,0 \pm 6,0	47,5 \pm 3,2	0,016*
Fibrinogen (g/L), medijana \pm MKO	4,4 \pm 0,9	2,7 \pm 0,8	0,00009*
Sedimentacija eritrocita (mm/h), medijana \pm MKO	85,0 \pm 44,0	13,0 \pm 9,5	<0,00001*
Hemoglobin (g/L), srednja vrednost \pm SD	103,8 \pm 16,2	144,8 \pm 15,8	0,0008*
Gvožđe (mM), medijana \pm MKO	11,5 \pm 3,9	17,7 \pm 3,8	<0,00001*
Feritin (μ g/L), medijana \pm MKO	244,0 \pm 295,7	/	/
Paratiroidnihormon (ng/L), srednja vrednosti \pm SD	492,63 \pm 386,72	/	/

Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da su ispitanici, u okviru datog istraživanja, bili jednako zastupljeni u pogledu pola, da pripadaju sličnoj starosnoj grupi i da su više godina lećeni ovim modalitom lećenja. Oko dve petine bolesnika lećenih PD-om (njih 20) je imalo dijabetes kao osnovnu bolest. Stimulatorima eritropoeze lećeno je oko 40% bolesnika. Ispitivanjem određenih biohemijskih parametara nađeno je da se grupa bolesnika na PD-u značajno razlikuje od zdrave kontrolne grupe (za koncentraciju ureje, kreatinina, ukupnih proteina, albumina, sedimentaciju eritrocita, nivo gvožđa i fibrinogena), osim u pogledu koncentracije glukoze i mokraćne kiseline. Vrednosti za sistolni i dijastolni pritisak su zadovoljavajuće i nalaze se u referentnom opsegu (do 140/90 mmHg), što upućuje da su bolesnici imali adekvatnu eliminaciju ili su bili komplijantni u pogledu unosa tečnosti, što se odrazilo i na dobro regulisanu hipertenziju. Vrednosti za parathormon ukazuju da je u grupi bolesnih zadovoljavajuće regulisan sekundarni hiperparatireoidizam. Bolesnici u grupi PD-a, kao metodi RRT-a, imaju izmenjenu koncentraciju većine biohemijskih parametara, ali

zadovoljavajući kvalitet izdijaliziranosti. Grupa bolesnika je imala niži, ali zadovoljavajući proteinski status.

Dijalizne karakteristike bolesnika i komorbidna stanja prikazani su u Tabeli 7 i Tabeli 8. Vrednosti klirensa ureje (Kt/V) je prosečno viša od 1,7, a nedeljni klirens kreatinina (Ccr) je iznad 60 L/nedeljno, što ukazuje na to da su bolesnici imali kompetentnu metodu RRT-a. Prema vrednostima za PET, bolesnici su u proseku bili srednje brzi transporteri za glukozu i srednje spori transporteri za kreatinin, a nalazili su se na programu lečenja CAPD-om.

Tabela 7. Dijalizne karakteristike i adekvatnost izdijaliziranosti bolesnika na peritoneumskoj dijalizi.

	Minimalna vrednost	Maksimalna vrednost	Srednja vrednost	SD
Broj peritonitisa	0	4,0	0,58	0,94
Rezidualni urin (L/dan)	0	3,7	0,935	0,8171
Ultrafiltracija (L/dan)	0,1	2,8	1,101	0,5182
Kt/V	1,38	4,07	3,47	0,53
Ccr (L/nedeljno)	49,14	118,70	78,65	19,77
PETgly	0,21	0,67	0,46	0,10
PETcr	0,31	0,87	0,63	0,11

Kt/V - klirens ureje, Ccr - nedeljni klirens kreatinina, PETgly - peritoneumski ekvilibrijumski test za glukozu, PETcr - peritoneumski ekvilibrijumski test za kreatinin.

Vrednosti medijane (sa međukvartalnim opsegom) za ultrafiltraciju i rezidualni urin iznosile su 1000 ± 650 odnosno 750 ± 97 , dok su ukupni prosečni gubici iznosili oko 2 L u toku 24 časa. Svega 6 bolesnika koristilo je bezglukozni dijalizni rastvor tokom noći. Oko dve petine bolesnika lečenih PD-om (njih 20) je u nekom periodu lečenja imalo bar jednu epizodu peritonitisa.

Tabela 8. Zastupljenost najčešćih pridruženih (komorbidnih) stanja u ispitivanoj grupi bolesnika pre uključivanja u studiju. **CVI**-cerebrovaskularni insult, **CMP**-hronična srčana slabost, **AIM**-akutni infarkt miokarda.

Pridružene bolesti	Zastupljenost(%)
CVI	11,53
CMP	46,15
AIM	17,31

Kod 50% bolesnika izražen je neki od navedenih neželjenih kardiovaskularnih događaja (cerebrovaskularni insult, hronična srčana slabost i akutni infarkt miokarda; Tabela 8). Dok je jedan od navedenih događaja KVS-a bio prisutan kod 14 bolesnika (26,92%), dva događaja su bila prisutna kod 10 bolesnika (19,23%), a dva bolesnika imala su sva tri događaja (3,85%). Svi bolesnici koji su imali AIM imali su i posledičnu ishemijsku CMP, dok je kod bolesnika koji su preležali CVI dve trećine (4 od 6 bolesnika) imalo i CMP, što ukazuje na značajne promene na krvnim sudovima kod ovih bolesnika.

Tabela 9. Indeksi komorbidnih stanja bolesnika na peritoneumskoj dijalizi.

	Minimalna vrednost	Maksimalna vrednost	Srednja vrednost	SD
IDS	1,0	3,0	2,25	0,79
IPI	0	2,0	0,71	0,72
ICED	1,0	3,0	2,27	0,79
Chin	3,0	15,0	7,63	2,19

IDS - indeks težine bolesti, IPI - indeks telesnog oštećenja, ICED - indeks koegzistirajuće bolesti, Chin-Čarlsonov indeks komorbiditeta.

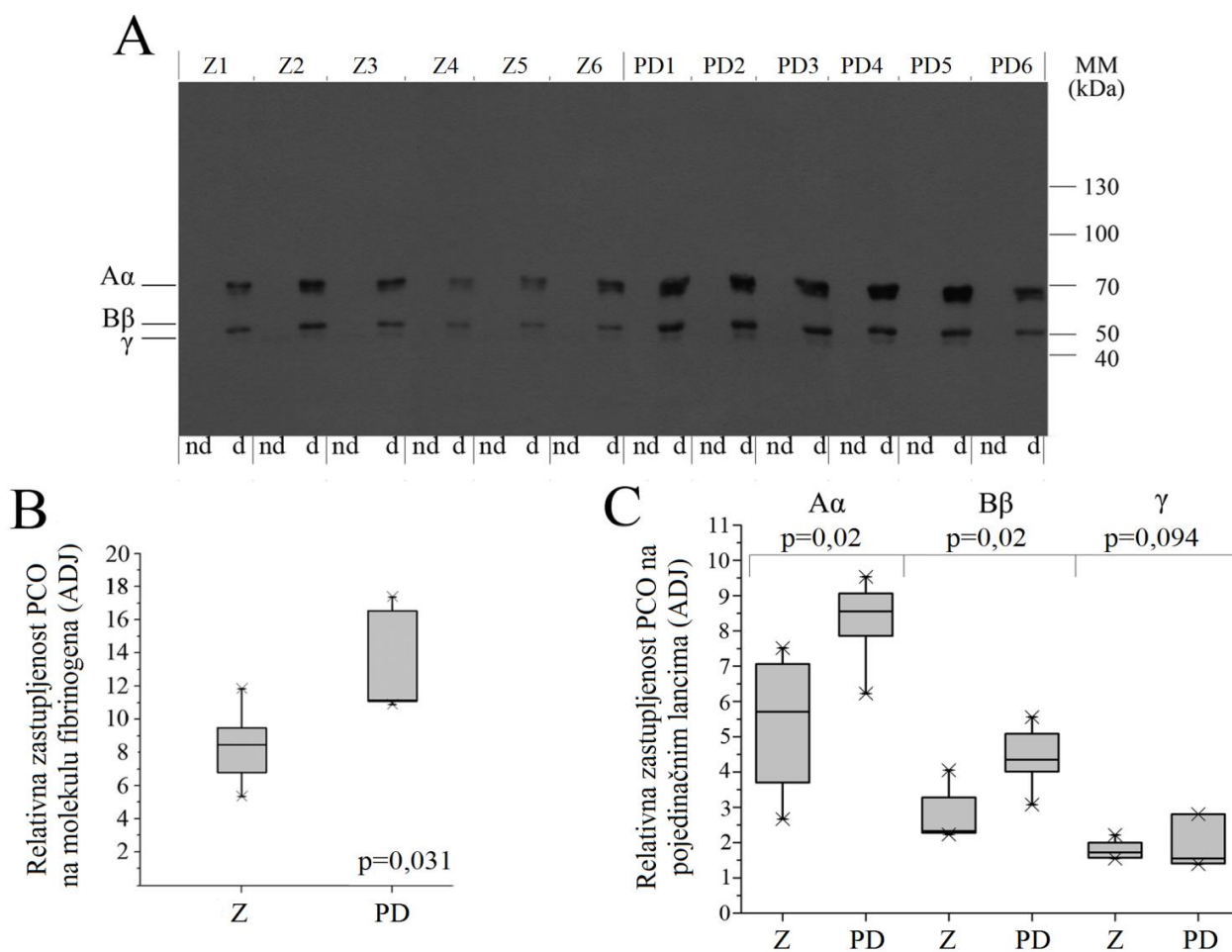
Procenjeni indeksi težine bolesti, telesnog oštećenja i koegzistirajuće bolesti (IDS, IPI i ICED) kod ispitivane grupe bolesnika prikazani su u Tabeli 9. Od ukupnog broja bolesnika (njih 52), njih 36 je imalo vrednost Chin-a jednaku ili veću od 7.

4.2. Analiza strukturnih karakteristika fibrinogena kod bolesnika na peritoneumskoj dijalizi

Ispitivanje izolovanog fibrinogena je podeljeno u dva dela. Za ispitivanje funkcionalnosti su urađeni testovi koagulacije i određena je debljina fibrinskih vlakana, dok je ispitivanje fizičko-hemijskih svojstava bilo bazirano na određivanju promena na nivou sekundarne i tercijarne (trodimenzionalne) strukture, kao i promena na nivou oksidacije i glikozilacije fibrinogena.

4.2.1. Analiza karbonilacije lanaca fibrinogena

Fibrinogen izolovan iz plazme bolesnika na PD-u i kontrolne grupe (Z) je derivatizovan sa DNP-om, i potom analiziran upotrebom redukujuće SDS-PAG elektroforeze praćene imunoblotom sa anti-DNP antitelima. Kao kontrole korišćeni su nederivatizovani uzorci. Rezultati su prikazani na Slici 5A. Densitometrijskom analizom utvrđeno je da fibrinogeni izolovani iz plazme bolesnika na PD-u imaju statistički značajno viši sadržaj karbonila od fibrinogena izolovanog iz plazme grupe Z, što je prikazano na grafiku Slike 5B. Svi signali normalizovani su prema ukupnom sadržaju proteina, koji je utvrđen bojenjem proteina Ponceau S bojom, pre imunoblota. Nađeno je da su A α i B β lanci fibrinogena podložniji oksidaciji, i da je sadržaj karbonila na pomenutim lancima veći kod bolesnika na PD-u u odnosu na grupu Z i to za čak 50% (za A α) i 60% (B β). Istovremeno, nije ustanovljena značajna razlika u nivou karbonilacije γ lanca između grupe PD-e i grupe Z (grafik Slike 5C).



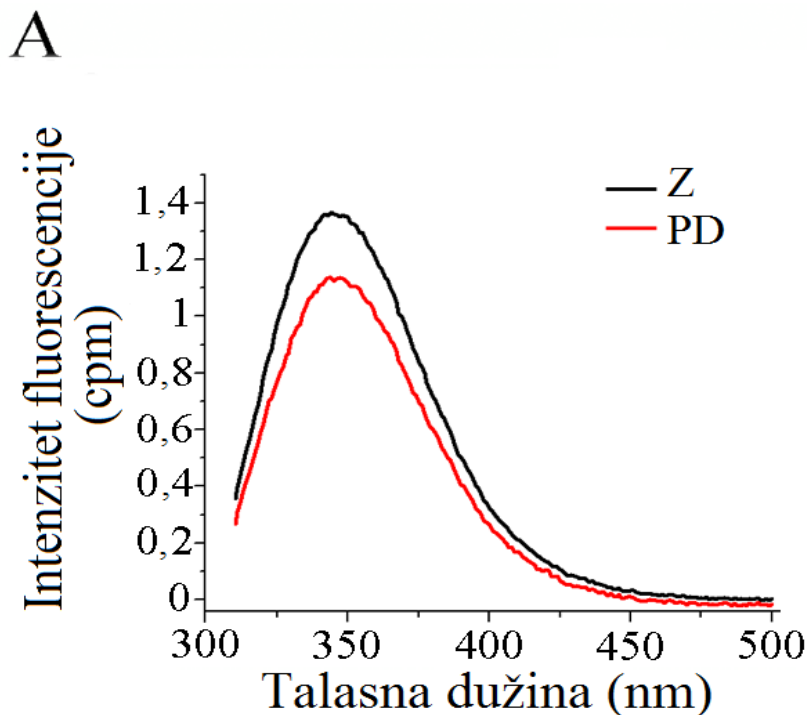
Slika 5. Analiza karbonilacije lanaca fibrinogena. A) Redukujuća SDS-PAGE na 10% gelu i detekcija reaktivnih vrsta anti-DNP antitelima. ND-nederivatizovani uzorci, D-uzorci derivatizovani

DNP-om. Markeri masa (MM) dati su sa desne strane, dok su levo obeleženi lanci fibrinogena. (B) Proračun relativne zastupljenosti karbonilovanih proteina (PCO) na ukupnom fibrinogenu i (C) na pojedinačnim lancima. Z - uzorci zdravih kontrola, PD - uzorci bolesnika na peritoneumskoj dijalizi. ADJ - arbitrarne denzitometrijske jedinice.

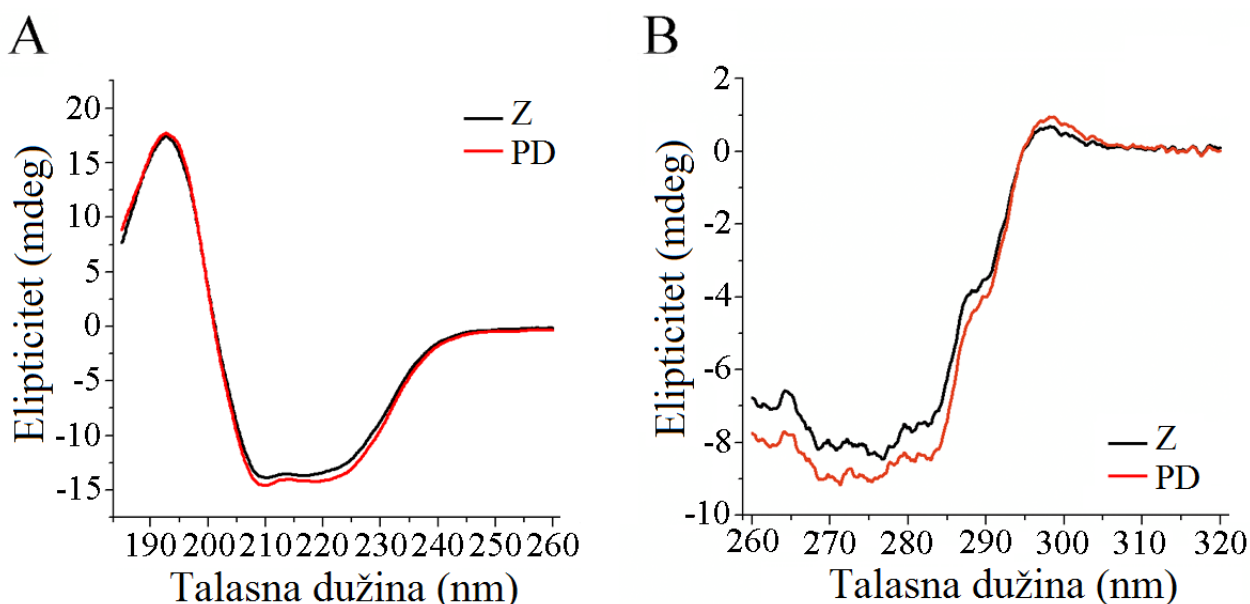
4.2.2. Spektrofluorometrijska i CD spektrometrijska analiza uzoraka fibrinogena

Rezultati snimanja emisionih fluorescentnih spektara zbirnih uzoraka fibrinogena izolovanih iz plazme grupe bolesnika lečenih PD-om i grupe zdravih kontrola prikazani su na Grafiku 1. Emisioni maksimum ispitivanih fibrinogena isti je kod obe posmatrane grupe i nalazi se na 344 nm. Ova talasna dužina potiče od ostataka triptofana (Trp). Poređenjem intenziteta fluorescentne emisije izračunato je da je ona manja za 17% u uzorku grupe bolesnika lečenih PD-om u odnosu na grupu Z.

Rezultati dobijeni upotrebom UV CD spektrometrije ukazali su na male razlike u sekundarnoj (Grafik 2A) i tercijarnoj (Grafik 2B) strukturi između dve grupe uzoraka. Može se takođe videti da je razlika izraženija u bliskoj UV oblasti CD spektra, tj. u tercijarnoj strukturi fibrinogena. Upotrebom CDPro programskog paketa analizirani su podaci dobijeni snimanjem u dalekoj oblasti UV CD spektra, i utvrđeno je da je dominantna sekundarna struktura fibrinogena α -heliks. Istovremeno, utvrđen je i sadržaj ove strukture u zbirnim uzorcima grupe bolesnika lečenih PD-om i grupe Z, koji iznosi 34% i 33%.



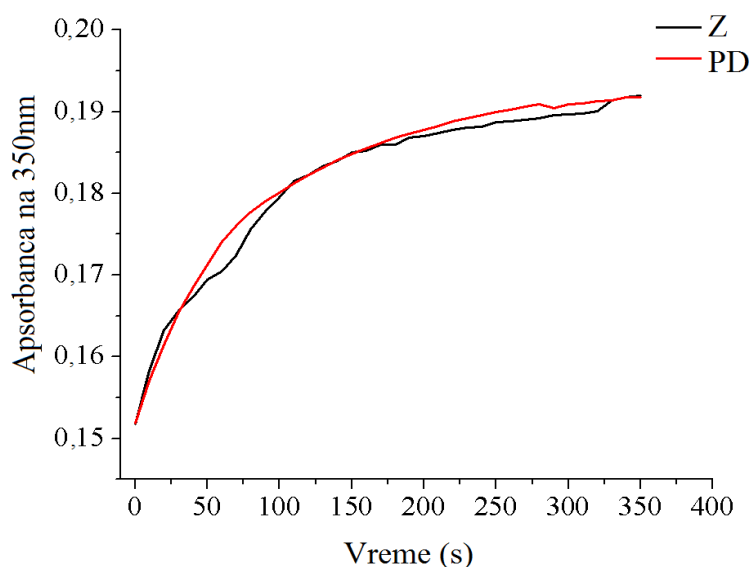
Grafik 1. Emisioni spektri fibrinogena dobijeni ekscitacijom na talasnoj dužini od 295 nm. Fibrinogeni kontrola (Z) i bolesnika lečenih peritoneumskom dijalizom (PD) analizirani su pod istim uslovima, u koncentraciji od 20 nM.



Grafik 2. Strukturna analiza fibrinogena izolovanog iz plazme kontrolne grupe (Z) i bolesnika lečenih peritoneumskom dijalizom (PD) upotrebom CD spektrometrije u dalekoj UV oblasti (A) i bliskoj UV oblasti (B), pri koncentraciji fibrinogena od 3 μ M.

4.2.3. Koagulaciona svojstva izolovanih fibrinogena

U cilju utvrđivanja koagulacionih osobina fibrinogena, tj. vremena i brzine koagulacije fibrinogena izolovanog iz plazme grupe bolesnika lečenih PD-om i grupe zdrave kontrole, upotrebljen je koagulacioni esej sa trombinom i to u silikonskoj cevčici (za određivanje poroznosti fibrinskih vlakana) i u ploči (za određivanje brzine koagulacije). Brzina koagulacije određena je nagibom početnog, linearnog dela koagulacione krive, dok je vreme koagulacije određeno kao vreme potrebno da se dostigne polovina maksimalne vrednosti apsorbance. Vreme i brzina koagulacije izolovanih fibrinogena bila je slična u obe ispitivane grupe, kao i vrednost za maksimalnu apsorbancu na 350 nm (Tabela 10). Promena na maksimalnoj apsorbanci (350 nm) utvrđena je na kraju koagulacionog esej (Grafik 3).



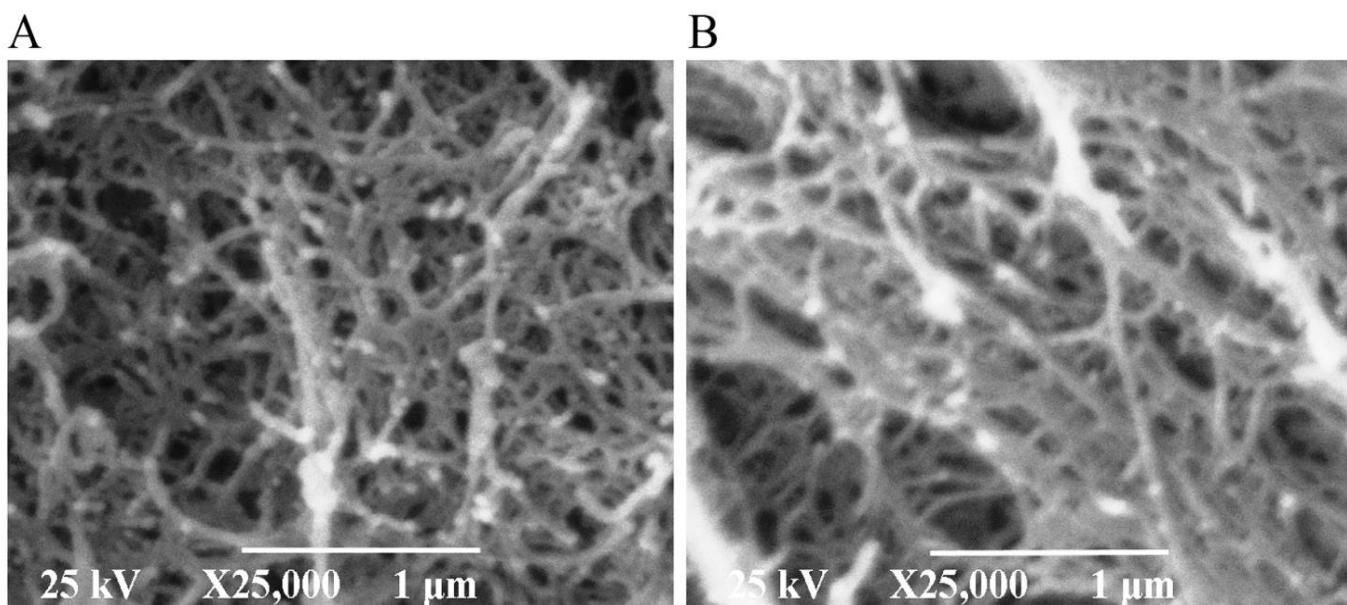
Grafik 3. Dijagram vremenskog toka koagulacije fibrinogena i formiranja fibrina. Prikazan je po jedan reprezentativni uzorak iz grupe kontrola (Z) i bolesnika lečenih peritoneumskom dijalizom (PD). Fibrinogeni su analizirani pri koncentraciji od 2,9 μ M.

Tabela 10. Koagulacione karakteristike fibrinogena izolovanog iz plazme grupe Z i grupe bolesnika lečenih PD-om. Prikazane su vrednosti medijane, dok su u zagradi date vrednosti percentila 2,5% i 97,5%. p - statistička značajnost.

	Z n=30	PD n=50	p
Vreme koagulacije (s)	51,0 (27,9-77,5)	53,0 (38,4-71,8)	0,857
Brzina koagulacije ($\Delta A/\text{min}$)	0,035 (0,018-0,054)	0,030 (0,010-0,045)	0,389
Maksimalna absorbanca na 350 nm	0,038 (0,026-0,053)	0,038 (0,032-0,057)	0,617

Analizom dobijenih rezultata utvrđeno je da ne postoji značajna razlika u koagulacionim osobinama fibrinogena izolovanog iz plazme grupe bolesnika lečenih PD-om i grupe Z.

Struktura fibrinskih vlakana formiranih koagulacijom izolovanog fibrinogena ispitana je tehnikom skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM). Na Slici 6 dati su primeri fibrinskih vlakana dobijenih iz uzoraka grupe zdrave kontrole (Slika 6A) i grupe bolesnika lečenih PD-om (Slika 6B). Densitometrijskom analizom pokazano je da su formirane fibrinske mreže slične između dve ispitivane grupe.



Slika 6. Reprezentativne slike fibrinskih vlakana dobijene tehnikom skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM). Fibrinogen iz plazme zdrave kontrole (A) i bolesnika lečenih PD-om (B).

4.3. Ispitivanje glikozilacije fibrinogena metodom lektinskog mikroereja

Za ispitivanje razlika u sadržaju ugljenohidratnih komponenti korišćeni su lektini čiji je odabir zasnovan na dostupnim podacima o glikozilaciji fibrinogena i drugih najzastupljenijih proteina plazme. Lektini korišćeni u ovom eksperimentalnom radu dati su zajedno sa svojim ugljenohidratnim specifičnostima u Tabeli 11, u kojoj je prikazan i nivo signala detektovanih metodom mikroereja zasnovanom na lektinima.

Tabela 11. Ugljenohidratna specifičnost lektina korišćenih u lektinskom mikroereju (i lektinskom blotu), prema proizvođaču. Prikazan je dobijeni odnos signala i šuma (S/N).

Lektin (izvor)	Ugljenohidratna specifičnost	S/N
PNA (<i>Arachis hypogaea</i>)	Gal β 1,3GalNAc	<3
MAL-I (<i>Maackia amurensis</i>)	NeuNAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc	<3
MAL-II (<i>Maackia amurensis</i>)	NeuNAc α 2,3Gal β 1,3(\pm NeuNAc2,6)GalNAc	<10
PHA-L (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	tri/tetraantenarni kompleksni N-glikani sa terminalnom Gal	<10
DSL (<i>Datura stramonium</i>)	GlcNAc β 1,4GlcNAc oligomeri; Gal β 1,4GlcNAc	<10
GNL (<i>Galanthus nivalis</i>)	visokomanozni N-glikani; Man α 1,3Man	<10
GSL-I (<i>Griffonia simplicifolia</i>)	Gal α 1,3Gal; Gal α 1,3GalNAc	<50
WGA (<i>Triticum vulgaris</i>)	GlcNAc β 1,4GlcNAc; hitinski oligomeri; NeuAc	<50
SNA (<i>Sambucus nigra</i>)	NeuNAc α 2,6Gal/GalNAc	<50
NPL (<i>Narcissus pseudonarcissus</i>)	visokomanozni N-glikani; Man α 1,6Man	<50
LCA (<i>Lens culinaris</i>)	α DGlc, α DMan u N-glikanimasa Fuc α 1,6GlcNAc	<50
PhoSL (<i>Pholiota squarrosa</i>)	Fuc α 1,6GlcNAc	<50
PHA-E (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Gal β 1,4GlcNAc β 1,2Man sa umetnutom GlcNAc	<50
AAL (<i>Aleuria aurantia</i>)	Fuc α 1,6GlcNAc; Fuc α 1,3(Gal β 1,4)GlcNAc	<50
ConA (<i>Canavalia ensiformis</i>)	Man α 1,6(Man α 1,3)Man	<50
RCA (<i>Ricinus communis</i>)	Gal β 1,4GlcNAc	<50

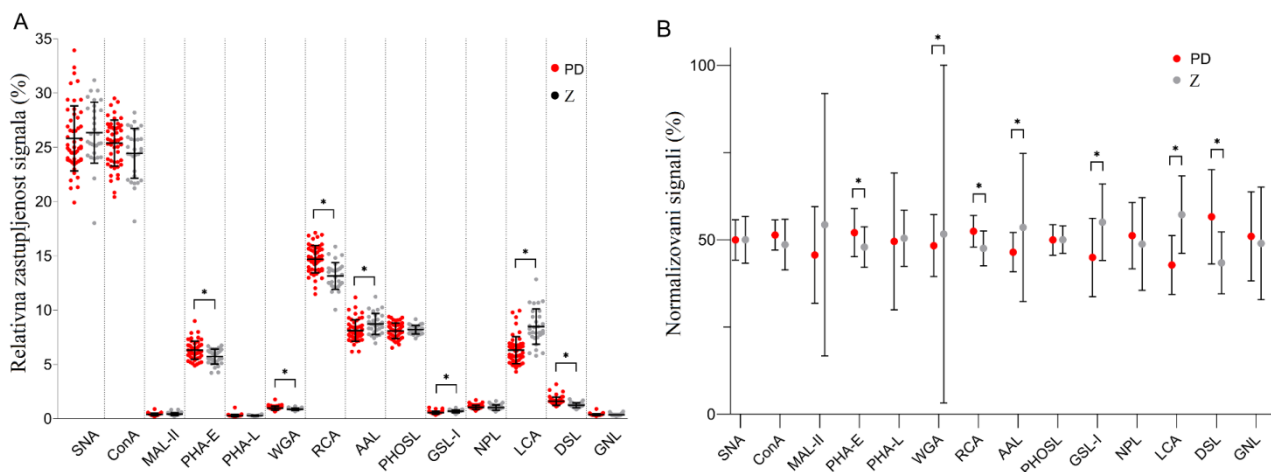
Od ukupno šesnaest lektina, šest je dalo signale sa odnosom signal/šum (S/N) manjim od 10, dok je kod deset lektina ovaj odnos bio veći od 10. Za interakciju PNA i MAL-I sa izolovanim fibrinogenima odnos detektovanog signala i šuma bio je manji od tri, zbog čega su ovi lektini izostavljeni iz daljih analiza.

Uzorci fibrinogena izolovani iz plazme grupe bolesnika lečenih PD-om interagovali su sa istim lektinima kao i uzorci fibrinogena izolovanih iz plazme grupe zdrave kontrole, što upućuje na prisustvo istog tipa glikanskih ostataka na fibrinogenu iz oba tipa uzoraka, i to:

- 1) biantenarnih N-glikana (**ConA** i **PHA-E**), koji se završavaju α 2,6-Sia vezanom za Gal/GalNAc ili GlcNAc (**SNA** i **WGA**) i/ili Gal (**RCA**);
- 2) glikana sa umetnutim GlcNAc (**PHA-E**) i/ili α 1,6-Fuc (Fuc u jezgru) (**LCA**, **AAL** i **PhoSL**), i
- 3) α 1,3-Fuc (antenarna Fuc) (**AAL**).

Primećena je i slaba zastupljenost multiantenarnih N-glikana koji se završavaju Gal (PHA-L). Signali dobijeni lektinima ConA, NPL i GNL ukazali su na moguće prisustvo visokomanoznih N-glikana. Signali sa SNA, RCA, GSL-I i WGA ukazali su na prisustvo O-glikana tipa T i Tn antigena (Gal β 1,3GalNAc α 1-O-Ser/Thr i GalNAc α 1-O-Ser/Thr), koji se uglavnom završavaju sijalinskom kiselinom ((Sia-T(n)) (SNA i MAL-II).

U cilju dobijanja informacija o povezanosti lečenja PD-om i distribucije glikana na fibrinogenu, signali dobijeni za sve lektine su sumirani za svaki pojedinačni uzorak, a potom je procenat svakog lektinskog signala predstavljen kao njegova relativna zastupljenost (Grafik 4A). Daljom obradom podataka, sumirani su signali koji potiču od pojedinih lektina za dve grupe uzoraka koja je definisana kao 100%, a doprinos svake grupe (PD ili Z) je izračunat kao udeo od ove sume (Grafik 4B).



Grafik 4. A) Relativna zastupljenost signala dobijenih u lektinskom mikroereju. B) doprinos svake ispitivane grupe (PD i Z) izračunat kao deo ukupne sume signala koji potiče od svakog pojedinačnog lektina. PD - bolesnici lečeni peritoneumskom dijalizom, Z - zdrave kontrole. Rezultati su prikazani sa odstupanjima za standardnu devijaciju. Statistička značajnost dobijena u Mann-Whitney U-testu; p - vrednost < 0,05 označena je zvezdicom.

Nađeno je da fibrinogen izolovan iz plazme bolesnika lečenih PD-om ima povišen sadržaj glikana koje prepoznaju lektini PHA-E, RCA i DSL, dok je sadržaj glikana koje prepoznaju WGA, AAL, GSL-I i LCA snižen.

Informacije o promenama glikozilacije fibrinogena kod bolesnika lečenih PD-om dobijene su i međusobnim upoređivanjem dobijenih signala za svaki od 14 lektina. Dodatno je izračunat njihov odnos i urađena je statistička analiza, a rezultati su prikazani u Tabeli 12.

Tabela 12. Odnosi signala lektin/lektin dobijenih upotrebom lektinskog mikroereja, nakon analize Mann-Whitney U-testom. Statistička značajnost za vrednosti $p < 0,05$ obeležena je tako da zelena boja predstavlja smanjenje kod bolesnika lečenih PD-om, dok narandžasta boja predstavlja porast kod bolesnika lečenih PD-om.

vs.	SNA	ConA	MAL-II	PHA-E	PHA-L	WGA	RCA	AAL	PhoSL	GSL-I	NPL	LCA	DSL	GNL
SNA	1	0,0220	0,5755	0,0102	0,6171	0,0096	0,0010	0,2627	0,7417	0,0008	0,1211	0,00001	0,00001	0,2983
ConA		1	0,0658	0,1113	0,0188	0,1362	0,0264	0,0098	0,0124	0,00001	0,9045	0,00001	0,0007	0,5619
MAL-II			1	0,050	0,8650	0,0029	0,0036	0,8887	0,3681	0,0658	0,3843	0,0033	0,00001	0,3077
PHA-E				1	0,00001	0,7795	0,3953	0,0002	0,0173	0,00001	0,2801	0,00001	0,0019	0,6745
PHA-L					1	0,0001	0,00001	0,3472	0,1260	0,0001	0,0989	0,00001	0,00001	0,0424
WGA						1	0,53526	0,00001	0,0033	0,00001	0,0285	0,00001	0,00006	0,1031
RCA							1	0,00001	0,00001	0,00001	0,0278	0,00001	0,0015	0,3030
AAL								1	0,0658	0,00001	0,0340	0,00001	0,00001	0,0155
PHOSL									1	0,0001	0,5029	0,00001	0,00001	0,2983
GSL-I										1	0,0002	0,0088	0,00001	0,0001
NPL											1	0,00001	0,00001	0,9203
LCA												1	0,00001	0,00001
DSL													1	0,00001
GNL														1
	SNA	ConA	MAL-II	PHA-E	PHA-L	WGA	RCA	AAL	PhoSL	GSL-I	NPL	LCA	DSL	GNL
0,05 > p > 0,001	0	4	1	2	0	4	4	0	0	1	1	0	2	2
p < 0,001	2	2	0	4	2	4	5	2	2	0	2	0	11	2
0,05 > p > 0,001	4	1	2	1	2	0	1	3	3	0	2	2	0	0
p < 0,001	1	1	1	0	4	1	0	4	2	11	1	11	0	1

Kada se uporede svi izračunati odnosi, uočava se da je dve trećine izmenjeno kod bolesnika lečenih PD-om (65%), dok smanjenja i povećanja imaju skoro jednaku distribuciju (30% i 35%). Iako je prag statističke značajnosti postavljen na $p < 0,05$, vidi se da je ova značajnost za više od dve trećine rezultata (42%) manja od 0,001. Ovde je važno napomenuti da se poređenjem reaktivnosti ostalih lektina sa LCA i DSL, kod bolesnika lečenih PD-om uočava povećano vezivanje u odnosu sa LCA i smanjeno vezivanje u odnosu sa DSL.

4.3.1. Uticaj broja dijaliznih izmena na glikozilaciju fibrinogena

Bolesnici su na osnovu broja dijaliznih izmena podeljeni u dve grupe, i to bolesnike koji su imali četiri ili pet dijaliznih izmena. Najveći broj bolesnika imao je 4 dijalizne izmene (njih 42), dok je 10 bolesnika imalo 5 dijaliznih izmena (Tabela 13).

Tabela 13. Rezultati studentovog t-testa primenjenog na dve grupe bolesnika podeljenih prema broju dijaliznih izmena. Grupa 1 – bolesnici sa 4 dijalizne izmene; Grupa 2 – bolesnici sa 5 dijaliznih izmena. Poređeni su intenziteti signala za korišćene lektine, dobijeni metodom lektinskog mikroejeja. p - statistička značajnost.

	Grupa 1 n=42	Grupa 2 n=10	p
SNA	1977,47±423,22	1935,35±293,93	0,768
ConA	1910,07±325,14	2007,35±205,81	0,373
MAL-I	6,34±1,59	6,49±1,82	0,793
MAL-II	29,97±11,77	30,11±8,93	0,972
PHA-E	477,27±114,15	510,13±52,84	0,382
PHA-L	20,83±5,67	29,18±20,14	0,022*
WGA	73,64±22,98	83,63±26,54	0,237
RCA	1116,33±269,64	1179,06±157,99	0,485
AAL	618,90±170,16	655,29±118,32	0,527
PhoSL	606,43±80,98	637,35±65,02	0,268
GSL	42,46±17,71	47,89±19,50	0,398
DFL	81,39±25,15	76,91±26,41	0,618
LCA	477,94±172,99	549,46±154,98	0,238
DSL	123,58±50,43	131,64±29,29	0,631
GNL	28,06±8,99	30,83±5,39	0,358
PNA	8,67±2,26	8,39±1,98	0,726

U ispitivanim grupama, statistička značajnost je nađena samo za PHA - L. Sadržaj multiantenarnih N-glikana veći je u grupi bolesnika sa 5 dijaliznih izmena.

4.3.2. Uticaj sastava dijalizne tečnosti na glikozilaciju fibrinogena

Da bi se ispitaio uticaj različite koncentracije glukoze i bezglukoznog rastvora na glikozilaciju fibrinogena, uzorci su razvrstani u tri grupe (Tabela 14), u zavisnosti od toga da li su bolesnici koristili dijalizne rastvore isključivo najniže koncentracije glukoze (grupa 1), kombinaciju najniže i srednje koncentracije (grupa 2), ili glukozne rastvore različite koncentracije tokom dana, uz primenu glukoznog polimera (ikodekstrina) tokom noći (grupa 3). U pogledu starosti, bolesnici su u sve tri ispitivane grupe bili sličnih godina, s tim što su nešto stariji bolesnici koristili kombinaciju rastvora manje i veće koncentracije glukoze. Oba pola su bila približno jednako zastupljena u grupama bolesnika koji su koristili samo glukozne rastvore, dok su žene bile zastupljenije u grupi bolesnika koji su koristili tokom noćne izmene i glukozni polimer. Zastupljenost bolesnika sa osnovnim oboljenjem diabetes mellitus-a je bila značajno niža u grupi onih koji su koristili ikodekstrin tokom

noćne izmene. U istoj grupi je značajan broj bolesnika imao prethodno najmanje jednu epizodu peritonitisa (njih 20), sa nižom UF.

Tabela 14. Demografske i kliničke karakteristike bolesnika lečenih PD-om i parametric adekvatnosti dijalize, podeljenih prema koncentraciji glukoze u dijaliznom rastvoru i primeni glukoznog polimera. Prikazana je zastupljenost pridruženih oboljenja i prethodnih peritonitisa. **Grupa 1** - bolesnici lečeni samo dijaliznim rastvorima glukoze koncentracije 1,36% ili 1,50% bez primene ikodekstrina, **Grupa 2** - bolesnici lečeni rastvorima glukoze različite koncentracije bez primene ikodekstrina, **Grupa 3** - bolesnici lečeni rastvorima glukoze različite koncentracije uz primenu ikodekstrina.

	Grupa 1 n=32	Grupa 2 n=14	Grupa 3 n=6
Starost (godine), srednja vrednost ± SD	63,5±14,9	63,7±12,1	58,5±9,9
Muškarci, n	16	8	1
HTA, n	30	14	5
DM, n	12	7	1
Sa peritonitisom, n	11	4	5
CMP, n	13	7	3
AIM, n	5	4	3
CVI, n	3	2	0
Chin, srednja vrednost ± SD	7,5±2,2	8,2±2,2	7,0±2,2
ICED, srednja vrednost ± SD	2,1±0,8	2,6±0,7	2,5±0,8
Kt/V, srednja vrednost ± SD	2,5±0,5	2,1±0,4	2,2±0,6
Ccr, srednja vrednost ± SD	83,5±19,9	73,8±15,3	62,4±18,9
PETcr, srednja vrednost ± SD	0,61±0,11	0,63±0,08	0,76±0,07
PETgly, srednja vrednost ± SD	0,47±0,11	0,46±0,09	0,38±0,07
RU	1,2±0,9	0,6±0,5	0,2±0,3
UF	1,0±0,5	1,1±0,4	1,5±0,4

HTA - hipertenzija, DM - diabetes mellitus, CMP - hronična srčana slabost, AIM - akutni infarkt miokarda, CVI - cerebrovaskularni insult, Chin-Čarlsonov indeks komorbiditeta, ICED - indeks koegzistirajuće bolesti, Kt/V - klirens ureje, Ccr - nedeljni klirens kreatinina, PETcr - peritoneumski ekvilibrijumski test za kreatinin, PETgly - peritoneumski ekvilibrijumski test za glukožu, RU - rezidualni urin, UF - ultrafiltracija.

Tabela 15. Podela bolesnika prema koncentraciji glukoze u dijaliznom rastvoru i primeni bezglukoznog polimera. * $p < 0,05$. **Grupa 1** - bolesnici lečeni samo dijaliznim rastvorima glukoze koncentracije 1,36% ili 1,50%; **Grupa 2** - bolesnici lečeni rastvorima glukoze koncentracije niže i srednje jačine; **Grupa 3** - bolesnici lečeni rastvorima glukoze različite koncentracije uz primenu ikodekstrina. Za parametre sa normalnom distribucijom korišćena je jednosmerna ANOVA, sa Tukey post-hoc testom; kod parametara čija je distribucija odstupala od normalnosti korišćen je Kruskal-Wallis-ov test. Zavisno od normalnosti raspodele, rezultati lektinskih signala su predstavljeni kao srednje vrednosti sa standardnom devijacijom ili kao medijane sa međukvartilnim ospegom koji je prikazan u zagradi.

	Grupa 1 n=32	Grupa 2 n=14	Grupa 3 n=6	p
SNA	1984,75±454,29	1951,40±328,31	1974,21±276,79	0,970
ConA	1920,68±342,38	1916,50±256,28	2002,92±262,19	0,830
MAL-I	6,19±1,44	6,39±1,92	7,20±1,92	0,391
MAL-II	31,40±12,59	25,75±6,59	31,66±11,51	0,301
PHA-E	476,22±123,84	483,04±72,71	502,70±65,17	0,857
PHA-L*	21,42± 6,13	19,37± 3,25	34,72± 25,23	0,007*
WGA	74,77±23,30	70,78±19,84	91,42±32,79	0,208
RCA	1124,02±284,40	1132,82±223,18	1149,67±164,42	0,974
AAL	627,87±165,65	600,96±164,09	688,58±145,19	0,557
PHoSL	610,00±85,24	606,89±64,51	636,42±84,94	0,734
GSL	36,31 (20,81)	38,49 (12,59)	47,07 (28,93)	0,479
DFL	82,90±24,04	75,97±25,69	79,76±34,40	0,716
LCA	430,11 (193,04)	453,88 (153,08)	540,84 (267,01)	0,200
DSL	122,63±41,12	128,04±63,94	139,30±36,81	0,725
GNL	28,39±9,71	28,05±6,04	32,01±5,75	0,607
PNA	8,78±2,28	7,85±1,97	9,20±2,20	0,349

Iako je reč o malom broju ispitivanih uzoraka, sa velikom standardnom devijacijom, statistička značajnost je nađena u slučaju PHA-L.

4.3.3. Glikozilacija fibrinogena kao dijagnostičko-prognostičkog markera

U cilju određivanja povezanosti dijalizne preskripcije, rezidualne bubrežne funkcije, prethodnih peritonitisa i promena funkcije peritoneumske membrane, sa promenama u glikanskoj strukturi fibrinogena, bolesnici lečeni PD-om podeljeni su prema rezidualnoj diurezi (pri čemu je vrednost medijane od 700 mL uzeta kao cut-off, tj. granična vrednost) i koncentraciji glukoze u dijaliznom rastvoru (Tabela 16).

U obe posmatrane grupe bolesnici su bili približno jednake životne starosti, i u obe grupe bila je približno jednako zastupljenost bolesnika sa hipertenzijom i dijabetesom. U grupi I bolesnika je bila veća učestalost peritonitisa (njih 11). Statistički značajne razlike nađene su samo u pogledu zastupljenosti polova i dužini dijaliznog staža. Naime, procenat osoba muškog pola koji je imao očuvaniju diurezu, je bio značajno viši u odnosu na osobe ženskog pola, dok je kod bolesnika sa dužim dijaliznim stažom došlo i do smanjenja količine izlučenog urina.

Tabela 16. Podela bolesnika lečenih PD-om, prema rezidualnom urinu (RU). Demografske, kliničke i laboratorijske karakteristike bolesnika na peritoneumskoj dijalizi; pridružena oboljenja i prethodni peritonitisi. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost sa standardnom devijacijom (SD), ili kao

medijana sa međukvartalnim opsegom (MKO). Statistički značajna razlika na nivou $p < 0,05$ označena je zvezdicom.

	RU<700 mL n=26	RU>700 mL n=26	p
Starost, godine \pm SD	62 \pm 14,2	64	0,521
Muškarci, n (%)	11 (26,8%)	20 (58,8%)	0,005*
Dijalizni staž, meseci (medijana \pm MKO)	51 (58)	22 (23)	0,012*
HTA, n (%)	25 (96,2%)	24 (92,3%)	0,999
DM, n (%)	10 (38,5%)	10 (38,5%)	1,000
Peritonitisi, n (%)			
1	8 (30,8%)	6 (23,1%)	
2	3 (11,5%)	1 (3,8%)	0,618
3	0 (0%)	0 (0%)	
4	1 (3,8%)	1 (3,8%)	
CMP, n (%)	10 (38,5 %)	13 (50,0 %)	0,402
AIM, n(%)	7 (26,9%)	5 (19,2%)	0,510
CVI, n (%)	4 (15,4%)	2 (7,7%)	0,668
PTH, ng/L (medijana \pm MKO)	505 (599)	311 (534)	0,276
Koncentracija glukoze u dijaliznom rastvoru	n	n	
4* 1,36%	6	17	
4* 1,50%	6	3	
3* 1,36% + 1* 2,27%	2	3	
3* 1,50% + 1* 2,30%	2	1	
2* 1,36% + 2* 2,27%	/	2	
3* 1,36% + 2* 2,27%	4	/	
2* 1,36% + 2* 2,27% + 1* ikodekstrin	6	/	

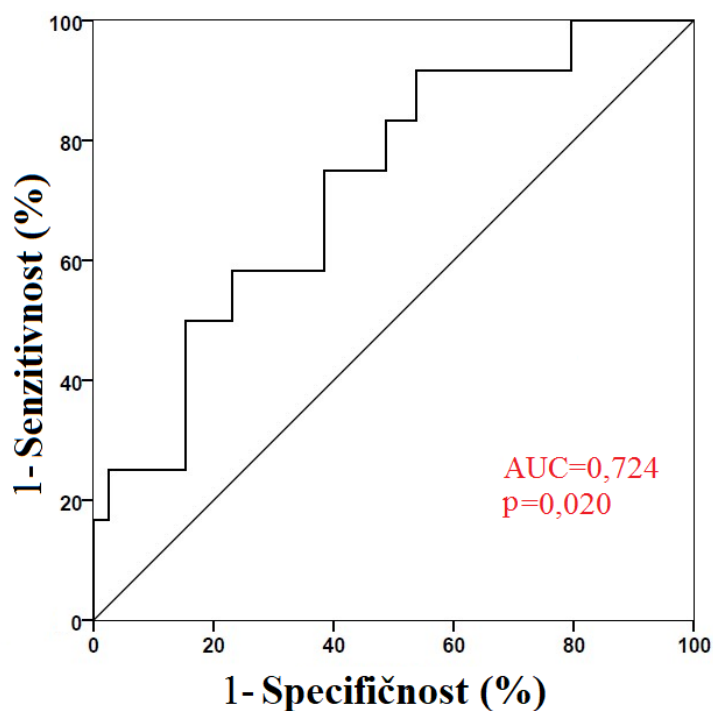
RU - rezidualni urin, HTA - hipertenzija, DM - diabetes mellitus, CMP - hronična srčana slabost, AIM - akutni infarkt miokarda, CVI - cerebrovaskularni insult, PTH - paratiroidni hormon. n - broj pacijenata.

Podaci o glikozilaciji fibrinogena dalje su korelirani sa parametrima dijalizne adekvatnosti i funkcije peritoneumske membrane. Anurični bolesnici, sa rezidualnim urinom manjim od 100 mL po danu (n=8), nisu se razlikovali od ostalih bolesnika (n=44). Bolesnici su potom podeljeni u dve grupe, na osnovu jačine ultrafiltracije, pri čemu je zapremina od 700 mL određena kao granična vrednost, pošto je to bila vrednost medijane. Primenom Cox-ove multivarijantne binarne logističke regresione analize ispitana je povezanost intenziteta lektinskih signala i jačina ultrafiltracije, prilagođena za vrednosti rezidualne diureze (Tabela 17).

Tabela 17. Rezultati Cox-ove multivarijantne binarne logističke regresione analize za procenu povezanosti jačine ultrafiltracije i lektinskog signala fibrinogena, korigovano za vrednost rezidualnog urina (RU). Statistička značajnost <0,05 označena je zvezdicom.

	p-vrednost	Odnos kvota	95% interval poverenja		p-vrednost	Odnos kvota	95% interval poverenja
SNA	0,621	-	-	ConA	0,228	-	-
RU	0,002	0,168	0,055-0,509	RU	0,002	0,168	0,055-0,509
MAL-II	0,045*	0,929	0,864-0,998	PHA-E	0,323	-	-
RU	0,001	0,134	0,040-0,451	RU	0,002	0,168	0,055-0,509
PHA-L	0,536	-	-	WGA	0,068	-	-
RU	0,002	0,168	0,055-0,509	RU	0,002	0,168	0,055-0,509
RCA	0,213	-	-	AAL	0,029*	0,994	0,989-0,999
RU	0,002	0,168	0,055-0,509	RU	0,002	0,168	0,055-0,509
PhoSL	0,172	-	-	GSL-I	0,037*	0,957	0,918-0,997
RU	0,002	0,168	0,055-0,509	RU	0,001	0,142	0,043-0,471
NPL	0,013*	0,958	0,926-0,991	LCA	0,039*	0,995	0,991-0,999
RU	0,002	0,124	0,034-0,456	RU	0,001	0,141	0,043-0,466
DSL	0,037*	0,978	0,958-0,999	GNL	0,072	-	-
RU	0,001	0,978	0,036-0,447	RU	0,002	0,168	0,055-0,509

Iz dobijenih rezultata uočeno je da se lektini MAL-II, NPL, DSL, AAL, GSL-I, i LCA izdvajaju kao nezavisni prediktori jačine ultrafiltracije. Više vrednosti signala dobijene za ove lektine povezane su sa smanjenjem tj. padom jačine ultrafiltracije, što dalje ukazuje na veća oštećenja peritoneumske membrane. Diskriminišuća moć ovog statističkog modela procenjena je upotrebom ROC krive. Iako su ispitani signali koji potiču od svih šest lektina, značajnost je nađena samo za AAL, kod koga je površina ispod krive iznosila 72,4% (Slika 7), što je ukazalo na značaj fukožilacije fibrinogena kao potencijalnog prediktor/markera oštećenja peritoneumske membrane.

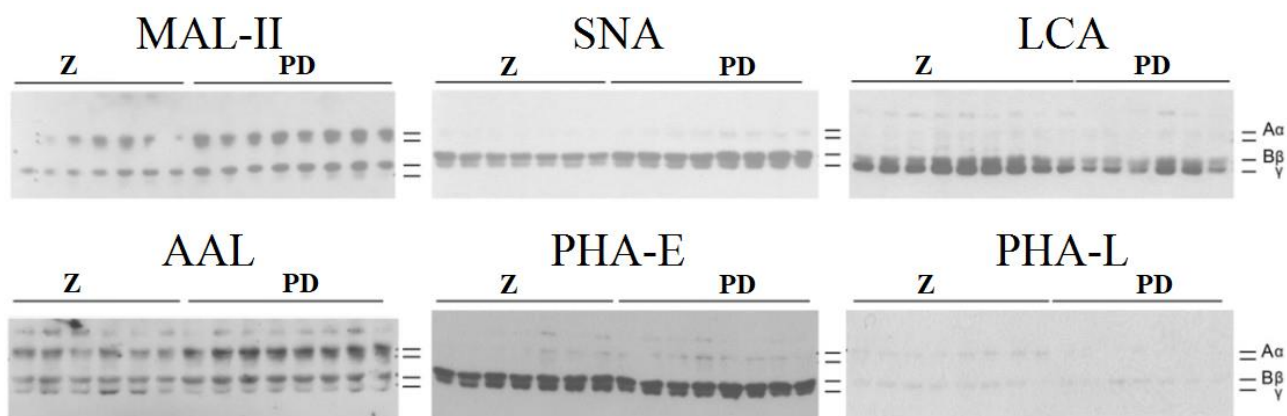


Slika 7. ROC kriva za signal AAL kao prediktora jačine ultrafiltracije. AUC-površina ispod krive (eng. Area under Curve).

U cilju određivanja povezanosti prethodnih peritonitisa i promena u glikozilaciji fibrinogena je korišćena jednosmerna ANOVA, sa Tukey post-hoc testom, kojim nije detektovana statistička značajnost. U cilju određivanja promena funkcije peritoneumske membrane ispitana je korelacija između PET za glukozu i glikozilacije fibrinogena za ispitivane lektine primenom Pearson-ovog testa, kojim nije detektovana statistička značajnost.

4.4. Lektinski blot

U ispitivanim grupama, potencijalni uticaj lečenja PD-om na distribuciju glikana na pojedinačnim lancima fibrinogena urađen je primenom redukujuće SDS-PAGE i inkubacijom sa biotinizovanim lektinima (Slika 8). Korišćeni lektini su odabrani prema rezultatima lektinskog mikroereja, sa fokusom na prisustvo multiantenarnih, fukoizilovanih i sijalinizovanih N-glikana.



Slika 8. Lektinski blot uzoraka fibrinogena analiziranih primenom SDS-PAGE u redukujućim uslovima na 10% gelu, nakon inkubacije sa biotinizovanim lektinima. PD - bolesnici lečeni peritoneumskom dijalizom, Z - zdrave kontrole (dobrovoljci). Pozicije pojedinačnih lanaca fibrinogena označene su sa desne strane.

Prisustvo istog tipa glikana u grupama PD-e i Z je potvrđen i ovom metodom. Interakcija sa PHA-L lektinom bila je veoma slaba, što upućuje na relativno nizak sadržaj multiantenarnih N-glikana. Nakon sumiranja signala koji potiču od pojedinačnih fibrinogenskih lanaca i analize dobijenih podataka, statistička značajnost između ispitivanih grupa nađena je samo kod lektina LCA ($p=0,003$), dok je izostala za preostale lektina i to za MAL-II ($p=0,271$), SNA ($p=0,327$), AAL ($p=0,183$), PHA-E ($p=0,142$), što ukazuje na značajno smanjenje sadržaja FA2 glikana u grupi lečenih PD-om. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim primenom lektinskog mikroereja.

I statističkom analizom glikozilacije pojedinačnih fibrinogenskih lanaca u dve grupe ispitanika nađena je značajna razlika, a rezultati su prikazani u Tabeli 18.

Tabela 18. Statistička analiza signala lektinskog blota, primenom Mann-Whitney U testa. Izračunate p - vrednosti sa statističkom značajnošću $p < 0,05$ označene su zvezdicom i obeležene zelenom bojom za statistički značajno manje vrednosti u grupi bolesnika lečenih PD-om, ili roze bojom za statistički značajno veće vrednosti u grupi bolesnika lečenih PD-om.

	MAL-II	SNA	LCA	AAL	PHA-E	PHA-L
Aα	0,271	0,952	-	0,222	0,183	0,073
Bβ	0,012*	0,002*	0,067	0,006*	0,384	0,682
γ	-	0,009*	0,003*	0,013*	0,032*	-
Aα/Bβ	0,653	0,056	-	0,865	0,147	0,183
Aα/γ	-	0,271	-	0,013*	0,032*	-
Bβ/γ	-	0,073	0,008*	0,003*	0,522	-

Za razliku od A α lanca, sadržaj glikana B β i γ lanaca promenjen je kod bolesnika lečenih PD-om. Sadržaj α 2,3/6-sijalil-T/Tn tipa O-glikana (koje prepoznaje MAL-II) na B β lancu i FA2 N-glikana na γ lancu (koje prepoznaje LCA) smanjen je kod fibrinogena izolovanog iz plazme bolesnika lečenih PD-om. Sa druge strane, sadržaj ukupne α 2,6-Sia vezane za Gal na N-glikanima (koje prepoznaje SNA lektin) i antenarne fukoze i/ili fukoze vezane za jezgro (AAL reaktivna) na β i γ lancima smanjen je u odnosu na iste lance kod fibrinogena zdravih kontrola. Sadržaj A2BG2 smanjen je samo na γ lancu (koje prepoznaje PHA-E lektin). Odnosi A α / γ i B β / γ povećani su kod bolesnika lečenih PD-om u pogledu sadržaja fukozilovanih glikana (AAL reaktivni), kao i A α / γ odnos u pogledu sadržaja A2BG2 (koji prepoznaje PHA-E lektin), dok je odnos B β / γ smanjen kod bolesnika lečenih PD-om kada je reč o FA2 N-glikanima (koje prepoznaje LCA lektin).

4.5. Uticaj pojedinačnih varijabli na ukupan mortalitet

Nakon 18 meseci od početka studije, došlo je do 13 smrtnih ishoda (25%) koji su bili posledica kardiovaskularnih događaja, i to 12 kao posledica ishemijske bolesti srca i 1 kao posledica ishemijskog cerebrovaskularnog insulta. Sve posledice neželjenih događaja KVS-a su se završile smrtnim ishodom. Nije bilo bolesnika koji su imali druge KVS događaje. Ukupno su četiri bolesnika prešla na drugi modalitet lečenja RRT-om, i to: dva bolesnika su imala kadaveričnu transplantaciju bubrega (3,85%), a dva bolesnika su prešla na HD-u usled peritonitisa (3,85%). Iz navedenog sledi da je period praćenja od 18 meseci na PD-u završilo 35 bolesnika (67,31%). Prosečna starosna dob preminulih iznosila je 65,7 \pm 14,3, i prevladavale su osobe ženskog pola (njih 8, tj. 61,5% preminulih), dok je prosečna starost osoba koje su prešle na druge metode RRT-a bila 61,7 \pm 23,2, i u pitanju su bile samo osobe muškog pola. Da bi se sagledao ukupni mortalitet i morbiditet povezan sa neželjenim događajima KVS-a, nakon perioda praćenja od 18 meseci, i ispitala njihova korelacija sa rezultatima lektinskog mikroereja, urađena je Cox-ova univarijantna analiza, čiji su rezultati prikazani u Tabeli 19. Posmatrane su grupe bolesnika koji su preminuli i koji su preživeli. Imajući u vidu da je ovo tzv. „time to event“ događaj, kao i da je reč o malom broju ispitanika, značajnim su uzete sve vrednosti za koje je p<0,10. Testirane su sve varijable koje uključuju osnovnu bolest, kao i demografski, klinički i biohemijski parametri.

Tabela 19. Univarijantna Cox-ova regresiona analiza proporcionalnog hazarda, za vrednosti kod kojih je nivo α greške manji od 10%, za grupu preživelih (n=39) i preminulih (n=13).

	Odnos rizika	95% interval poverenja		p-vrednost
		Donja	Gornja	
PETcr	0,042	0,001	3,045	0,147
PETgly	0,480	0,003	72,866	0,774
iPTH	1,000	0,999	1,001	0,830
Kt/V	0,289	0,083	1,007	0,051*
Ccr	0,979	0,951	1,007	0,146
Glukoza	1,098	0,985	1,224	0,093*
Feritin	1,001	1,000	1,002	0,001*
Sistolni pritisak	0,970	0,936	1,006	0,097*
Dijastolni pritisak	0,940	0,881	1,002	0,058*
Broj peritonitisa	1,729	1,218	2,454	0,002*
Dijalizni staž	1,007	0,995	1,018	0,255
Trajanje osnovne bolesti	0,791	0,665	0,942	0,008*
IPI	2,853	1,427	5,705	0,003*
ICED	2,488	1,064	5,820	0,035*
Rezidualni urin	0,457	0,183	1,140	0,093*
Ultrafiltracija	1,121	0,426	2,949	0,817
GNL lektin	1,050	0,993	1,111	0,087*

PETcr - peritoneumski ekvilibrijumski test za kreatinin, PETgly - peritoneumski ekvilibrijumski test za glukozu, PTH - parathormon, Kt/V - klirens ureje, Ccr - nedeljni klirens kreatinina, ICED - indeks koegzistirajuće bolesti, IPI - indeks telesnog oštećenja.

Kao najznačajni potencijalni prediktori smrtnosti bolesnika izdvojili su se feritin, broj prethodnih peritonitisa i komorbidna stanja koja su prikazana u formi komorbidnih indeksa (IPI i ICED). Niži dijastolni pritisak i viši sistolni takođe su potencijalni prediktori smrtnosti ovih bolesnika ($p=0,058$ i $p=0,097$), kao i rezidualna diureza ($p=0,093$) i koncentracija glukoze ($p=0,093$). Od svih ispitivanih lektina, jedino se povećan signal za GNL izdvojio kao potencijalni prediktor smrtnosti ovih bolesnika, iako značajnost ovog parametra nije visoka ($p=0,087$).

Bolesnici uključeni u ovo istraživanje su se razlikovali prema osnovnoj bolesti koja je dovela do ESRD-a. Bolesnici su, prema osnovnoj bolesti, razvrstani u šest grupa koje su potom korelirane sa rezultatima lektinskog mikroereja.

Tabela 20. Rezultati statističke obrade podataka Cox-ovom regresionom analizom univarijantnim modelom, nakon raspodele bolesnika prema osnovnoj bolesti u korelaciji sa rezultatima lektinskog mikroereja dobijenim za GNL, između preminulih ($n=13$) i bolesnika koji su završili studiju ($n=39$).

	Broj bolesnika	Preminuli	Odnos rizika	95% interval poverenja		p - vrednost
				Donja	Gornja	
DM	16	4	0,805	0,256	2,529	0,710
HTA	13	3	1,592	0,542	4,672	0,397
GN	11	3	0,884	0,249	3,133	0,848
ADPBB	4	1	0,731	0,096	5,568	0,763
TIN	6	2	1,158	0,261	5,135	0,847
Ostalo	2	-	0,048	0,000	184480,792	0,695

DM - diabetes mellitus, HTA - hipertenzija, GN - glomerulonefritis, ADPBB - autozomno-dominantna policistična bolest bubrega, TIN - tubulointersticijski nefritis.

Najzastupljenije osnovno oboljenje bila je dijabetesna nefropatija (31%), a nešto manje angioskleroza (25%). Zastupljenost ostalih bolesti odgovara pomenutim literaturnim podacima. Nije nađena razlika između zastupljenosti osnovnih bolesti u odnosu na glikozilaciju fibrinogena. Rezultati statističke analize prikazani su samo za GNL lektin (Tabela 20), jer se on pokazao kao potencijalni prediktivni marker na ukupni mortalitet bolesnika uključenih u ovu studiju.

Tabela 21. Cox-ova multivarijantna analiza preživljavanja bolesnika nakon 18 meseci praćenja. Preminuli ($n=13$), preživeli ($n=39$).

	Odnos rizika	95% interval poverenja		p - vrednost
		Donji	Gornji	
Trajanje osnovne bolesti	0,011	0,000	44,582	0,289
Broj peritonitisa	0,825	0,462	1,475	0,517
ICED	1,784	0,338	9,410	0,495
Kt/V	0,750	0,180	3,116	0,692
Glukoza	1,144	1,008	1,297	0,037*
Feritin	1,001	1,000	1,002	0,119
Sistolni pritisak	0,992	0,940	1,047	0,781
Rezidualni urin	3,971	0,626	25,192	0,144
Lektin GNL	1,100	1,023	1,183	0,010*

ICED - indeks koegzistirajuće bolesti, Kt/V - klirens ureje.

Parametri koji su Cox-ovom regresionom analizom univarijantnim testom pokazali nivo α greške manji od 10% dalje su obrađeni multivarijantnom Cox-ovom regresionom analizom. Rezultati

su dati u Tabeli 21. Kako nije nađena značajnost u trajanju osnovne bolesti, broju peritonitisa, izdijaliziranosti, krvnom pritisku i koncentraciji feritina, može se zaključiti da ovi parametri nisu dobri prediktivni faktori ukupnog mortaliteta. Nasuprot tome, kod preminulih bolesnika detektovan je viši nivo glukoze ($p=0,037$) i signala za GNL ($p=0,010$), čime je potvrđena značajnost ovih parametra kao prediktivnih faktora ukupnog mortaliteta.

5. Diskusija

U okviru ove doktorske disertacije ispitane strukturne i funkcionalne karakteristike fibrinogena kod bolesnika lečenih peritonumskom dijalizom, kao i korelacija uočenih promena sa biohemijskim i kliničkim karakteristikama ispitanika, kardiovaskularnim događajima i mortalitetom. Bolesnici sa ESRD-om pokazuju povećanu sklonost ka hemoragiji, dok se kod drugih javlja sklonost ka neželjenim trombogenim događajima (Lu i Liao, 2018), zbog čega je neophodno rasvetliti mehanizme koji preovlađuju i vrše prevagu ka jednom ili drugom neželjenom događaju. Značaj istraživanja u ovoj disertaciji povezan je sa činjenicom da je PD, kao modalitet RRT-a omogućava bolju kardiovaskularnu stabilnost, ima povoljniji uticaj na anemiju u hroničnim bolestima, očuvanje rezidualne bubrežne funkcije i radnu rehabilitaciju. S obzirom na razvoj novih tehnologija u smislu praćenja na daljinu, tendenciju poboljšanja biokompatibilnosti rastvora za dijalizu i manji epidemiološki rizik, očekuje se povećanje procenta bolesnika lečenih ovim modalitetom.

Rezultati ove disertacije pokazali su da fibrinogen izolovan iz plazme bolesnika lečenih PD-om ima značajno višu koncentraciju karbonila, izmenjenu sekundarnu i tercijarnu strukturu proteina i izmenjen sadržaj glikana u odnosu na zdrave ispitanike. A α i B β lanci fibrinogena u grupi bolesnika lečenih PD-om su podložniji oksidaciji od γ lanaca. Vreme i brzina koagulacije, kao i maksimalna apsorbancija su slični u obe grupe. Od 16 korišćenih lektina, kod 10 je odnos signal/šum >10, dok je za dva lektina <3. Ugljenohidratni ostaci fibrinogena obe grupe su prepoznati od strane istih lektina, što znači da sadrže: a) biantenarne N-glikane sa α 2,6-Sia; b) umetnuti GlcNAc i/ili α 1,6-Fuc, i c) α 1,3-Fuc. Primećena je mala zastupljenost multiantenarnih i paucimanoznih i/ili visokomanoznih N-glikana, kao i O-glikana tipa T i Tn antigena sa ili bez Sia. Kao prediktor jačine ultrafiltracije izdvojio se AAL, sa vrednošću AUC od 72,4%, ukazujući na potencijal sadržaja fukozilovanih N-glikana kao prediktivnog faktora malfunkcije peritoneumske membrane. Povišen signal za GNL, nađen kod bolesnika koji su preminuli 18 meseci nakon početka studije, ukazao je značaj paucimanoznih/visokomanoznih N-glikanskih struktura za predikciju neželjenih kardiovaskularnih događaja i letalnog ishoda.

Dosadašnja istraživanja su pokazala da u prvih 24 meseca od početka lečenja nekim od modaliteta RRT-a, PD ima povoljniji ishod na preživljavanje bolesnika u poređenju sa preživljavanjem bolesnika lečenih HD-om (Lee i sar., 2021). Razlog je značajno bolja regulacija arterijske hipertenzije i bolja kontrola volemije, zbog sporijih, ali kontinuiranih procesa difuzije i ultrafiltracije, što donekle simulira prirodnu situaciju. Zbog svega navednog, lečenje PD-om, bi trebalo da bude modalitet izbora u lečenju bolesnika sa diabetes mellitus-om, ali i bolesnika koji imaju već prisutni kardiovaskularni morbiditet. Značaj započinjanja dijaliznog lečenja PD-om je u dužem očuvanju rezidualne diureze, koja je prediktivni faktor u preživljavanju dijaliznih bolesnika (Aguirre i Abensur, 2011).

Veliki neželjeni kardiovaskularni događaji predstavljaju vodeći uzrok smrtnosti kod bolesnika lečenih dijalizom (Preciado i sar., 2019). Većem kardiovaskularnom riziku doprinosi i endotelijalna disfunkcija, koja podstiče agregaciju trombocita, a potom i pokretanje koagulacione kaskade. S obzirom da fibrinogen predstavlja centralni protein procesa koagulacije, osnovna ideja ovog istraživanja bila je da se ispita da li postoje razlike u strukturnim i funkcionalnim karakteristikama fibrinogena bolesnika lečenih PD-om, u odnosu na zdravu populaciju i da se ispita njihova povezanost sa velikim neželjenim događajima KVS-a.

U ispitivanju je učestvovalo 52 bolesnika lečenih PD-om i 32 zdrave kontrole, koji su bile slične starosne dobi i polova. Pokazano je da bolesnici lečeni PD-om imaju izmenjenu koncentraciju većine biohemijskih parametara, osim vrednosti koncentracije glukoze i mokraćne kiseline, što odgovara podacima iz literature (Sjøland i sar., 2007), dok je zadovoljavajući kvalitet izdijaliziranosti ukazao na kompetentnost metode RRT-a (Lee i sar., 2021). Uočena ubrzana sedimentacija eritrocita i hipoferemija, kao znaci hronične inflamacije, su takođe svojstveni bolesnicima lečenim PD-om (Hirai

i sar., 2021). Od ranije je poznato da usled dijaliznog lečenja dolazi do gubitka proteina preko peritoneumske membrane i moguće malnutricije, uslovljavajući nastanak sarkopenije (Jerónimo i sar., 2018). I u ovom istraživanju je potvrđena statistički značajna hipoproteinemija i hipoalbuminemija kod bolesnika lečenih PD-om. Rezultati biohemijskih analiza su bili adekvatni za metodu lečenja, što ukazuje na kompetentnost ove metode kao modaliteta RRT-a.

Procenjeni indeksi težine bolesti, telesnog oštećenja i koegzistirajuće bolesti (IDS, IPI i ICED) u ispitivanoj grupi PD-e bolesnika, su u saglasnosti sa podacima iz literature (Miskulin i sar., 2018). Izračunata srednja vrednost Čarlsonovog indeksa komorbiditeta u ispitivanoj PD-i grupi je iznosila 7,62, dok je 32 bolesnika imalo indeks veći ili jednako 7, što ukazuje na procenjeni rizik mortaliteta od oko 60% (Charlson i sar., 2008; Ternavasio-de la Vega i sar., 2018).

Da bi se ispitale strukturne i funkcionalne promene fibrinogena, iz plazme je izolovan protein visokog stepena čistoće, metodom izolovanja zasićenim rastvorom amonijum-sulfata. Za ispitivanje oksidativnih modifikacija fibrinogena, derivatizacija karbonilnih grupa izolovanog fibrinogena inkubacijom sa rastvorom DNP-a praćena je SDS-PAG elektroforezom i imuno-detekcijom anti-DNP antitelima. Pokazano je da fibrinogen izolovan iz plazme bolesnika lečenih PD-om ima značajno više karbonila u odnosu na fibrinogen iz gupe zdravih kontrola, odnosno da je prisutan veći stepen oksidativnih modifikacija. Selmeći i saradnici su u prethodnim studijama pokazali da je kod bolesnika sa ESRD-om povišena koncentracija krajnjih proizvoda oksidacije, kao i da je fibrinogen ključni protein plazme koji podleže ovoj modifikaciji (Selmeći, 2011; Selmeći i sar., 2006), što je potvrđeno i rezultatima ove doktorske disertacije. Nađeno je da je α lanac fibrinogena najpodložniji oksidaciji, potom β lanac, dok γ lanac najmanje ili uopšte ne podleže oksidativnim promenama. Uočena razlika u podložnosti različitih lanaca fibrinogena oksidaciji može se objasniti razlikom u njihovoj primarnoj strukturi, kao i različitoj dostupnosti specifičnih grupa reaktivnim kiseoničnim vrstama. Analiza karbonilacije pojedinačnih lanaca pokazala je povećano prisustvo karbonila kod bolesnika lečenih PD-om u odnosu na odgovarajuće lance fibrinogena zdravih kontrola, sa doprinosom od 50% i 60% kada se posmatraju α odnosno β lanci. Značajne razlike u karbonilaciji γ lanca fibrinogena između grupe bolesnika na PD-u i grupe Z nisu primećene. Oksidacija proteina može narušiti njegovu sekundarnu i tercijarnu strukturu, a time indirektno uticati i na svojstva i funkciju proteina. Tako je pokazano da oksidacija fibrinogena ima uticaja na njegovu funkciju kod bolesnika sa diabetes mellitus-om (Lados Krupa i sar., 2015), cirozom (Hugenholtz i sar., 2016) i akutnim infarktom miokarda (Becatti i sar., 2014), a nađeno je i da oksidativna modifikacija fibrinogena igra važnu ulogu u razvoju komplikacija KVS-a kod bolesnika sa ESRD-om lečenih hemodijalizom (Undas i sar., 2014). Oksidovani fibrinogen ima trombogene osobine koje se karakterišu smanjenom debljinom vlakana, kao i smanjenom poroznosti krvnog ugruška, zbog čega on postaje manje propusan za fibrinolitičke agense (Lisman i sar., 2016).

Povišen stepen oksidacije fibrinogena kod bolesnika grupe PD-e u odnosu na grupu zdravih kontrola nije bio praćen razlikama u strukturi fibrinskih vlakana ispitivanih metodom SEM, ali treba uzeti u obzir nedostatak ove metode u pripremi uzorka, koja se mora raditi u prisustvu superkritičnog CO_2 , jer je priroda formiranog ugruška takva da lako dolazi do kolabiranja uzorka, kao i do narušavanja njegove strukture iako postoje dokazi da su takve fibrinske mreže manje porozne (Hugenholtz i sar., 2016). Rezultate SEM-a prikazane u ovoj tezi treba uzeti pažljivo i sa rezervom zbog ograničenog kvaliteta slike.

Rezultati snimanja emisionih fluorescentnih spektara zbirnih uzoraka fibrinogena ukazali su da je emisioni maksimum ispitivanih fibrinogena isti kod obe posmatrane grupe i nalazi se na 344 nm. Poređenjem intenziteta fluorescentne emisije izračunato je da je ovaj maksimum manji za 17% u uzorku bolesnika lečenih PD-om u odnosu na grupu Z. Ova talasna dužina potiče od ostataka Trp, koji je izuzetno podložan oksidativnim modifikacijama što značajno doprinosi smanjenoj fluorescenciji (Utrera i sar., 2012; Cao i sar., 2016). Uočeno smanjenje intenziteta fluorescentne emisije u grupi PD-e može biti posledica:

- a) promena u hemijskoj okolini ostataka Trp, odnosno povećanja izloženosti ovih ostataka rastvaraču kao posledice konformacionih promena proteina,
- b) gašenja fluorescence koja potiče od ostataka Trp, usled nastajanja novih fluorofora kao posledice karbonilacije fibrinogena, ili
- c) oksidacije Trp ostataka koja dovodi do gašenja njihove fluorescence.

Rezultati dobijeni CD spektrometrijom ukazuju na blage promene u sekundarnoj, ali značajne promene u terciarnoj strukturi zbirnih uzoraka izolovanih fibrinogena iz krvi grupe bolesnika lečenih PD-om u odnosu na grupu Z. Analiza daleke UV oblasti pokazala je da ne postoji značajna razlika u sadržaju α -heliksa, dominantne sekundarne strukture fibrinogena, između ispitivanih grupa (33% u grupi Z, naspram 34% u grupi PD-e). Rezultati snimanja CD spektara u bliskoj UV oblasti ukazali su na izmene u terciarnoj strukturi fibrinogena izolovanog iz krvi grupe PD-e, u odnosu na grupu Z. Promene u spektrima dobijenim snimanjem u bliskoj UV oblasti ukazuju na strukturne modifikacije u regionima gde se nalaze aromatične aminokiseline (poput Trp, Phe, Tyr), tako da su rezultati dobijeni CD spektrometrijom bliske UV oblasti u saglasnosti sa rezultatima spektrofluorimetrije, i ukazuju na promenu okoline aromatičnih aminokiselina fibrinogena iz grupe PD-e. Ove promene terciarne strukture mogu se objasniti podložnošću $A\alpha$ i $B\beta$ lanaca fibrinogena oksidaciji. Aminokiselinski ostaci za koje je pokazano da se oksiduju, pozicionirani su unutar svih strukturnih elemenata ova dva lanca. Imajući u vidu da je $A\alpha$ lanac izrazito podložan oksidativnim promenama (od posebnog značaja je terminalni, αC domen), može se pretpostaviti da uočene promene u terciarnoj strukturi fibrinogena u grupi bolesnika lečenih PD-om potiču upravo od modifikacije $A\alpha$ lanca. Oksidacija aminokiselinskih ostataka αC domena slabi αC - αC interakcije i dovodi do strukturnih promena u proteinu (Rosenfeld i sar., 2018).

Koagulacioni test, kojim je određeno vreme i brzina koagulacije fibrinogena u prisustvu trombina, nije pokazao razlike između fibrinogena ispitivanih grupa. U prethodnim studijama koje su ispitivale koagulaciju kod bolesnika sa ESRD-om kao uzorci su korišćeni ili puna krv ili plazma (Sjøland i sar., 2007; Holloway i sar., 1987); utvrđeno je da su ovi bolesnici izloženi većem riziku od nastanka tromboze. Takav zaključak opravdan je povišenom koncentracijom fibrinogena u cirkulaciji kod bolesnika sa ESRD-om (Blombäck i sar., 1989). U eksperimentima prikazanim u ovoj disertaciji, prilikom ispitivanja koagulacionih osobina fibrinogena kod grupe bolesnika lečenih PD-om, korišćena je identična koncentracija izolovanog fibrinogena iz svih ispitivanih uzoraka i nije pronađena značajna razlika u odnosu na grupu zdrave kontrole. Ovakva postavka eksperimenta eliminiše razlike koje bi mogle biti uzrokovane različitom koncentracijom fibrinogena u uzorcima, kao i uticaj drugih faktora koji se nalaze u cirkulaciji (ostale komponentne koagulacije, različiti lekovi i dr.). Ideja je bila da se ispita efekat koji ima isključivo fibrinogen i, prema dobijenim rezultatima, oksidacija fibrinogena nije povezana sa kinetikom formiranja fibrinskih vlakana kod grupe bolesnika lečenih PD-om. Bolesnici lečeni PD-om imaju i druga pridružena oboljenja koja potencijalno mogu doprineti modifikacijama i drugih komponentata koagulacije koje, u sadejstvu sa strukturno izmenjenim fibrinogenom, mogu doprineti nastanku neželjenih KVS događaja.

Eksperimenti u kojima je korišćena plazma, ili fibrinogen izolovan iz krvi bolesnika sa hepatičnom lezijom, pokazali su da karbonilovani fibrin pravi hidrofobnije okruženje, čime se smanjuje poroznost ugruška i onda kada struktura samog ugruška nije izmenjena (Gackler i sar., 2019). Moguće je da se ova pojava javlja i na fibrinu kod bolesnika sa ESRD-om kod kojih je fibrinogen karbonilovan, ali gde nisu uočene značajne promene u fibrinskoj strukturi. Iz ranijih studija poznato je da kod bolesnika sa HBS-om karbamilacija fibrinogena dovodi do njegove povećane otpornosti prema degradaciji plazminom i da smanjuje njegovu mehaničku stabilnost (Binder i sar., 2017). Nepoznato je u kojoj meri svaka od navedenih hemijskih modifikacija doprinosi nastanku uočenih strukturnih promena fibrinogena. Imajući u vidu da je fibrinogen podložan oksidaciji (Shacter i sar., 1994), kao i da su bolesnici sa ESRD-om pod povećanim oksidativnim stresom, može se pretpostaviti da je upravo

oksidacija glavna hemijska modifikacija odgovorna za uočene strukturne promene. Očigledno je da kompleksna dejstva različitih faktora, od kojih neki utiču i na promene u koncentraciji i strukturi fibrinogena, leže u osnovi nastanka komplikacija u koagulaciji kod bolesnika lečenih PD-om.

Rezultati dobijeni metodom skenirajuće elektronske mikroskopije pokazali su da fibrinske mreže koje formiraju fibrinogeni u grupi bolesnika lečenih PD-om i grupi zdravih kontrola imaju sličnu strukturu, što je u skladu sa podacima dobijenim koagulacionim testom. Ovakav nalaz ukazuje na potrebu za ispitivanjem i drugih faktora koji utiču na formiranje fibrinske mreže. Iako je poznato da debljina fibrinskih vlakana utiče na veću poroznost i brzinu razgradnje ugruška (Hugenholtz i sar., 2016; Li i sar., 2016), u prikazanoj eksperimentalnoj postavci nađeno je da je maksimalna apsorbanca na talasnoj dužini od 350 nm, koja zavisi od debljine vlakana, ista kod obe ispitivane grupe uzoraka, što je potvrđeno metodom skenirajuće elektronske mikroskopije. Fibrinogeni α A i β B lanci su prvi učesnici u formiranju fibrinske mreže, vodeći do lateralne asocijacije fibrinskih monomera, kao i do interakcije kraja jednog monomera sa sredinom drugog, nakon čega se uključuju i ostali lanci. Dodatnoj lateralnoj agregaciji fibrinskih monomera doprinose i terminalni, α C domeni (Mosesson, 2005). Prema jednoj od hipoteza, povišen nivo oksidacije α A i β B lanaca fibrinogena, praćen promenama u sekundarnoj i tercijarnoj strukturi proteina, može biti od uticaja na svojstva fibrinske mreže. Ova hipoteza nije potvrđena u eksperimentima prikazanim u ovoj doktorskoj disertaciji, što ukazuje da su modifikacije fibrinogena i njihovi efekti na ovaj molekul pre povezani sa samom prirodom bolesti i za nju su specifični. Ovaj zaključak upućuje na dalja istraživanja na molekulskom nivou, sa ciljem da se utvrde konkretni mehanizmi odgovorni za koagulopatije uočene u ispitivanom, ali i drugim različitim patološkim stanjima kod kojih se javljaju slične komplikacije.

Kako je navedeno, bolesnici sa ESRD-om su značajno podložniji neželjenim komplikacijama KVS-a u poređenju sa opštom populacijom (i do 33 puta češće), a uočeno je da je jedan od faktora koji doprinosi njihovom razvoju i formiranje debljeg krvnog ugruška otpornijeg na fibrinolizu (Schlieper i sar., 2016; Nunns i sar., 2017). Fokus ove disertacije bio je usmeren na promene koje su vezane za strukturu fibrinogena kod grupe bolesnika lečenih PD-om, u čijem kontekstu je ispitana i glikozilacija fibrinogena. Fibrinogen je bogat A2G2S1 i A2G2S2 glikanima, dok su umetnuti GlcNAc ili Fuc, kao i triantenarne strukture manje zastupljene (Hoffmann i sar., 2018; Adamczyk i sar., 2013; Nagel i Meyer, 2014). Pored ovih struktura, α A i β B lanci fibrinogena su značajno O-glikozilovani, pri čemu su zastupljeniji (sijalil)T od (sijalil)Tn tipova glikana (Zauner i sar., 2012; Nagel i sar., 2018; Pacchiarotta i sar., 2012; Hoffmann i sar., 2016). Poznato je da su nivoi α 2,6-Sia viši kod bolesnika u početnim (ranim) fazama HBS-a, kao i kod bolesnika sa diabetes mellitus-om kod kojih su se već razvile mikroangiopatske komplikacije (Mise i sar., 2018), dok je ispitivanje relativne zastupljenosti Gal β 1,3GalNAc predloženo u cilju diferencijalne dijagnostike dijabetesne nefropatije kao osnovnog oboljenja bubrega, od prisustva dijabetesa kao pridružene bolesti (Liu i sar., 2018), što bi moglo da pomogne u razlikovanju primarnih od sekundarnih glomerulopatija. Povišeni nivoi A2BG1S1, FA2G2S1 i FA2G2S2 glikana u plazmi povezuju se sa HBS-om, dok je kod grupe bolesnika u ovom istraživanju povišen sadržaj F0A2G2S1 vezanog za IgG, koji može ukazati na postojanje ESRD-a (Adua i sar., 2018; Barrios i sar., 2016). Takođe je pokazano da je rizik od razvoja HBS-a smanjen kod pojedinaca sa galaktozilovanim IgG i IgG-om sa sijalinizovanim i glikanima fukoziilovanim u jezgru; ujedno je primećeno i da su pod većim rizikom od razvoja HBS-a bolesnici kod kojih je viši nivo agalaktozilovanog IgG-a i IgG-a sa umetnutim GlcNAc (Barrios i sar., 2016). Veća stopa preživljanja bolesnika lečenih HD-om povezana je sa nižim sveukupnim sadržajem serumskog triantenarnog glikana, FA3G3S2 (Hatakeyama i sar., 2013), dok je smanjena debljina fibrinskih vlakana, primećena kod ove grupe bolesnika, makar delom posledica guanidilacije i glikozilacije fibrinogena (Schuett i sar., 2017). Kod bolesnika lečenih PD-om, porast sijalinizacije multiantenarnih N-glikana proteina prisutnih u peritoneumskom izlivenom dijalizatu je povezana sa neželjenim ishodom bolesti, dok je pojava peritonitisa i gubitak mezotelijalne ćelijske mase vezana za smanjenje galaktozilacije biantenarnih glikana i porast nivoa glikana sličnih onima prisutnim na IgG molekulima (Ferrantelli i sar., 2018).

Rezultati istraživanja ove disertacije pokazuju da kod grupe bolesnika lečenih PD-om, postoji povišen sadržaj A2BG2 na fibrinogenu (iako je sadržaj ovog glikana smanjen na γ lancu), a da je sadržaj FA2 smanjen, što je uočeno i na nivou glikana molekula IgG u ranim stadijumima HBS-a (Barrios i sar., 2016). DSL prepoznaje β 1,4-Gal prisutnu na N-glikanima, za razliku od GSL-I koji vezuje β 1,3-Gal O-glikana T tipa, a čiji je sadržaj u ovom patološkom stanju takođe snižen, zajedno sa sadržajem T tipa O-glikana, na šta ukazuju vrednosti signala dobijenih sa WGA lektinom.

Dodatno je nađeno da postoji porast u sadržaju multiantenarnih N-glikana, što su pokazali Bermingham i sar. (2018) na nivou N-glikoma seruma, na osnovu čega se pretpostavlja da ovi glikani imaju važnu ulogu u pojavi i brzini progresije bubrežne slabosti. Imajući u vidu da dužina trajanja lečenja PD-om nije imala uticaja na dobijene rezultate ($p=0,337$), važno je naglasiti da postoji značajna razlika u sadržaju multiantenarnih N-glikana na izolovanim fibrinogenima u odnosu na koncentraciju glukoze u rastvorima koji su korišćeni tokom samog dijaliznog postupka. U poređenju grupa koje su se razlikovale prema broju dijaliznih izmena, grupa sa pet izmena imala je viši sadržaj multiantenarnih glikana sa terminalnom Gal u odnosu na grupu sa četiri ($p=0,022$). Grupa bolesnika koja je pored glukoznih rastvora različite koncentracije koristila i ikodekstrin, imala je viši sadržaj multiantenarnih glikana sa terminalnom Gal u odnosu na bolesnike koji su lečeni samo glukoznim rastvorima najniže koncentracije ($p=0,010$), ili niže i srednje kombinovano 2,25% ($p=0,007$). Jedno od potencijalnih objašnjenja može biti povezanost primene hipertoničnih glukoznih rastvora sa promenama na peritoneumskoj membrani, što vodi ka bržem transportnom statusu i bržoj apsorpciji glukoze. Navedeni podaci odgovaraju grupi bolesnika sa prethodnom epizodom peritonitisa, koji su imali UF slabost, a koristili su ikodekstrin tokom noćne izmene (Olszowska i sar., 2019). Iako ove podatke treba uzeti sa dozom opreza, imajući u vidu mali broj bolesnika na ovom režimu lečenja, dobijeni rezultati su svakako interesantni i upućuju na nastavak istraživanja glikozilacije fibrinogena (ali i drugih proteina plazme) kod bolesnika lečenih PD-om, sa osvrtom na primenu kako dijaliznih rastvora sa različitim koncentracijama glukoze, tako i na razlike sa primenom bezglukoznih rastvora. Kompleksne N-glikanske strukture nađene su kod bolesnika sa višim vrednostima glikemije i bržim padom jačine glomerulske filtracije (Bermingham i sar., 2018). Kod bolesnika sa dijabetesom, zbog hiperglikemije, a time i dostupnosti glukoze kao supstrata za sintezu drugih ugljenih hidrata, očekivan je porast u sadržaju kompleksnih N-glikana (Bermingham i sar., 2018). Može se pretpostaviti da se slični mehanizmi mogu odvijati i kod bolesnika lečenih PD-om (Burkart, 2004), kod kojih je povećana apsorpcija glukoze iz dijaliznog rastvora, što u ovom istraživanju nije urađeno. Koncentracije glukoze kod bolesnika uključenih u studiju su bile u referentnom opsegu, dok vrednost HbA_{1c} nije merena.

Kao što je i očekivano, glikozilacija fibrinogena do izvesnog stepena prati opšti trend N-glikozilacije serumskih proteina. Gama lanac je odgovoran za interakciju fibrinogena sa receptorima eksprimiranim na površini ćelija, ali i za vezivanje faktora rasta i koagulacije, omogućavajući formiranje ugruška, agregaciju trombocita i zarastanje rana (Farrell, 2004). Distribucija glikanskih struktura na pojedinačnim lancima fibrinogena je promenjena, pri čemu je utvrđeno da je γ lanac najpodložniji promenama, što bi moglo da delimično objasni promene uočene u grupi bolesnika lečenih PD-om. Pokazano je da se kod bolesnika sa cirozom smanjuje sadržaj O-glikana prisutnih na A α lancu, dok se sadržaj Sia i Fuc N-glikana prisutnih na B β i γ lancima smanjuje kod obolelih sa cirozom i hepatocelularnim karcinomom (Nagel i sar., 2018; Gligorijević i sar., 2018), što se razlikuje od rezultata dobijenih u ovoj disertaciji. Naime, u ovom radu nisu uočene značajne promene u sadržaju glikana A α lanca, dok je smanjen sadržaj glikana koji u svojoj strukturi sadrže Sia i Fuc, a vezani su za B β i γ lanac. Ujedno je nađen povišen sadržaj fukozilovanog biantenarnog glikana (FA2) na γ lancu. Iz ovih podataka se zaključuje da, iako i cirozu i ESRD u osnovi karakteriše fibroza ciljanog organa, modifikacija glikanskih struktura molekula fibrinogena je verovatno uslovljena prirodom same bolesti i pridruženim stanjima, tj. komorbiditetima, a ne završnim stadijumima bolesti.

Rezultati dobijeni denzitometrijskom analizom glikoformi pojedinačnih lanaca fibrinogena ukazali su na razlike između grupe PD i Z, pa bi bilo interesantno izolovati pojedinačne fibrinogenske

lance i analizirati nekom od metoda masene spektroskopije (npr. MALDI-MS), ne bi li se sa sigurnošću utvrdilo koje su ugljenohidratne strukture izmenjene.

Prema najnovijim vodičima za bolesnike na PD-u, ne postoji jasno preporučena granična numerička vrednost za UF u pogledu preživljavanja bolesnika. Navodi se da UF niža od 750 mL na dan kod anuričnih bolesnika je povezana sa izraženijim mortalitetom (Brown i sar., 2020; Boudville i sar., 2012). Poznato je da Kt/V niži od 1,7 govori u prilog opšteg mortaliteta, a da porast na 1,8 ne umanjuje procenat smrtnosti (Davies i Finkelstein, 2020). U grupi bolesnika prikazanih u ovoj disertaciji, srednja vrednost za Kt/V je 3,47, što upućuje na značajnu adekvatnost izdijaliziranosti. Preporuke su da se PET i Kt/V određuju jednom u šest meseci (Hung i sar., 2017). Prosečnu UF treba optimizovati, individualizacijom prema samom bolesniku, kako bi se prevashodno postiglo euvolemično stanje (Brown i sar., 2020). Ranije studije su za zbirnu vrednost udruženog UF i RU uzele za minimalnu vrednost 1 L za 24 h (Woodrow i sar., 2017). U cilju postizanja euvolemijskog statusa, kod bolesnika na PD-u, neophodno je postići dobru kontrolu TA (Shi i sar., 2018), koja je u ispitivanoj grupi PD-e bolesnika bila u granicama preporučenih vrednosti.

Procenat osoba muškog pola koji je imao očuvaniju diurezu je bio značajno viši u odnosu na osobe ženskog pola, dok je kod bolesnika sa dužim dijaliznim stažom došlo do smanjenja količine RU, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (Perez-Flores i sar., 2007). Iako smanjena rezidualna bubrežna funkcija ukazuje na povećani mortalitet uzrokovan nekim neželjenim događajem KVS-a, kod ispitivanih grupa nije bilo statističke značajnosti u pogledu ovih parametara, kada je poređena sa grupom bolesnika koja je imala veći volumen RU. Ovakav nalaz tumačimo činjenicom da je u centru Klinike za nefrologiju, posebna pažnja posvećena anuričnim bolesnicima, kao i onima koji imaju manji volumen RU, obezbeđivanjem adekvatne UF, edukacijom bolesnika u pogledu unosa soli i tečnosti, higijensko-dijetetskim režimom života, optimizovanjem lečenja anemije, adekvatnoj antihipertenzivnoj terapiji i redovnim kardiološkim kontrolama.

Fukozilacija je uključena u različite biološke i patološke procese, poput ćelijske adhezije, proliferacije, razvoja tkiva, angiogeneze, implantacije, razvoja tumora i metastatskih promena, a takođe promene u fukozilaciji uočene su i u brojnim inflamatornim procesima (Li i sar., 2018). Porast antenarne fukozilacije α_1 -kiselog glikoproteina povezana je sa mikro- i makroangiopatskim komplikacijama kod bolesnika sa dijabetesom tipa-I (Poland i sar., 2001), a nađeno je da, zahvaljujući svom antiinflamatornom svojstvu α_1 -kiselog glikoprotein može delovati protektivno na bubrežnu funkciju u sprečavanju progresije akutnog u hronično oštećenje (Watanabe i sar., 2021). Kod bolesnika sa dijabetesom tipa-II ubrzana progresija bubrežne slabosti se dovodi u vezu sa IgG glikanima, i to povišenim sadržajem umetnutog GlcNAc i povišenim sadržajem fukozilovanih glikana sa umetnutim GlcNAc, dok je fukozilacija bez prisustva umetnutog GlcNAc povezana sa sporijom progresijom bubrežne slabosti (Singh i sar., 2020). Ekperimenti na miševima sa dijabetesom pokazali su da se inhibicijom fukozilacije jezgra glikana smanjuje stepen bubrežnog oštećenja, a patohistološkom analizom je primećena manje izražena fibroza bubrežnog parenhima (Fang i sar., 2019). Rezultati prikazani u ovoj disertaciji pokazuju da je stepen fukozilacije fibrinogena značajno povezan sa gubitkom funkcije peritoneumske membrane, pri čemu dobijena AUC iznosi 72%. Ovi rezultati ukazuju na značaj fukoze kao potencijalnog dijagnostičkog/prognostičkog markera funkcije peritoneumske membrane (posmatrano u odnosu na vrednosti ultrafiltracije i rezidualne diureze), što bi trebalo potvrditi na većem broju uzoraka.

U periodu praćenja od 18 meseci, na drugi modalitet lečenja RRT-om prevedena su 4 bolesnika i u pitanju su bile samo osobe muškog pola. U istom periodu došlo je do 13 smrtnih ishoda, i preovladavale su osobe ženskog pola, što nije u saglasnosti sa literaturnim podacima koji govore u prilog značajno veće stope preživljavanja žena lečenih PD-om (Kitterer i sar., 2017). Najzastupljenije osnovno oboljenje bila je dijabetesna nefropatija (31%), nešto manje nefroangioskleroza (25%), što se donekle razlikuje od vodećih uzroka ESRD-a u okruženju gde je najzastupljenija nefroangioskleroza sa učestalošću od 30% u odnosu na dijabetesnu nefropatiju koja je zastupljena sa 18% (Kramer i sar., 2021). Kao potencijalni prediktori smrtnosti bolesnika, metodom univarijantne

regresione analize, izdvojili su se sledeći biohemijski i klinički parametri: feritin, adekvatnost izdijaliziranosti, rezidualna diureza, hiperglikemija i povišen intenzitet signala sa GNL. Navedeni rezultati su u saglasnosti sa literaturnim podacima (Fu i sar., 2020; Vario i sar., 2019; Qayyum i sar., 2015; Singh i sar., 2020; Barone-Gibbs i Davis 2018), osim vrednosti za intenzitet signala sa GNL, obzirom da do sada nije ispitana glikozilacija fibrinogena kod bolesnika lečenih PD-om.

Ovakav rezultat ukazuje na potrebu brižljivijeg praćenja parametara adekvatnosti dijalize, posebno u određenim podgrupama bolesnika, poput onih kod kojih se smanjuje rezidualna diureza, kao i kod bolesnika sa slabijom glikoregulacijom i inflamacijom (Mahmood i sar., 2016). Sa druge strane, ispitivanje glikozilacije fibrinogena kao potencijalnog prediktora mortaliteta može imati značaj u identifikaciji bolesnika kojima je neophodan detaljniji kardiološki monitoring, čak i ukoliko nemaju specifične kardiološke smetnje.

Dodatnom multivarijantnom regresionom analizom pokazano je da, od navedenih parametara, uslove za potencijalne prediktivne markere sveukupnog mortaliteta u grupi bolesnika lečenih PD-om ispunjavaju samo glukoza i povećan signal GNL lektina ($p=0,037$ i $p=0,010$, redom). Iako GNL sa visokim afinitetom vezuje $\alpha 1,3$ -vezanu manozu, postoji afinitet i prema terminalnoj galaktozi (Fernandez-Poza i sar., 2021). Sudeći po izostanku reaktivnosti RCA, ovde bi se najpre moglo govoriti o povećanom sadržaju visokomanoznih (Man5-9GlcNAc2, tj. M5-M9) ili paucimanoznih struktura (Man1-4GlcNAc2, tj. M1-M4). Visokomanozni N-glikani su prekursori hibridnih i kompleksnih N-glikana, koji se procesuiraju delovanjem različitih glikozidaza (poput manozidaze) i glikozil-transferaza (poput N-acetilglukozaminil-, galaktozil-, sijalil-, fukozil-transferaze). Prvo deluje α -manozidaza (koji kodira *MAN1A1*), koja uklanja manozu, da bi potom delovanjem N-acetilglukozaminil-transferaze I (koju kodira *MGAT1*) na $\alpha 1,3$ -manozni krak trimanoznog jezgra bio dodat GlcNAc u položaju $\beta 1,2$ (Nagae i sar., 2020; Stanley, 2014). Smanjena ekspresija pomenutih enzima za posledicu može imati povećanje sadržaja visokomanoznih ili paucimanoznih struktura, tj. inkompletnu sintezu N-glikana. Povećan sadržaj visokomanoznih N-glikana doveden je u vezu sa dediferencijacijom visoko-diferenciranog tkiva humanog hepatocelularnog karcinoma, dok je smanjena ekspresija *MGAT1* u slabo diferenciranim komponentama tumora povezana sa intrahepatičnim metastazama i nepovoljnijim ishodom (Takayama i sar., 2020). Visokomanozni N-glikani promovišu metastaziranje u holangiokarcinomu miševa, smanjenjem ekspresije *MAN1A1* (Park i sar., 2020), dok strukture M6, M9 i A3F koreliraju sa progresijom holangiokarcinoma u humanoju populaciji (Talabnin i sar., 2017). Kod nekih tipova karcinoma dojke dolazi do promena u sadržaju malo zastupljenih visokomanoznih N-glikana seruma, pri čemu kod miševa zastupljenost visokomanoznih N-glikana (naročito M9) korelira sa prognozom karcinoma dojke (de Leoz i sar., 2011). Nivo paucimanoznih glikana (Man1-3Fuc0-1GlcNAc2) povećan je u tkivu kolorektalnog karcinoma (Balog i sar., 2012) i takođe korelira sa lošom prognozom (Kaprio i sar., 2015).

Povećan sadržaj visokomanoznih glikana može da bude posledica delovanja i nekih lekova. Pokazano je da IL-6 i progesterone utiču na ekspresiju oligosaharil-transferaze, koji katalizuje transfer glikana sa lipidnog nosača na asparagin unutar sekvence Asn-X-Ser/Thr. Kao posledica, raste do 30% sadržaj visokomanoznih glikana na Fab regionu IgG (van de Bovenkamp i sar., 2016). Zanimljivo je i da IgG1 i IgG2, koji se koriste u terapijske svrhe, imaju veći sadržaj M5 glikana u Fc regionu, kao i da se eliminišu brže od ostalih glikanskih formi (Goetze i sar., 2011). U okviru koagulacionog sistema, visokomanozni glikani doprinose vezivanju faktora VIII koagulacije i transmembranskog proteina koji se nalazi između endoplazmatičnog retikuluma i Goldžijevog aparata, a koji je sličan lektinima koji prepoznaju i vezuje manozu (LMAN1) i učestvuje u sekreciji nekih glikoproteina (Cunningham i sar., 2003). Iz navedenog se može zaključiti da je značaj visokomanoznih N-glikana možda i veći nego što se pretpostavlja.

U humanom serumu/plazmi može se naći šest različitih proteina sa lektinskom aktivnošću, koji su na osnovu strukturnih i biohemijskih karakteristika podeljeni u četiri familije: pentraksine (C-reaktivni protein i serumski amiloid), kolektine (lektin koji vezuje manozu-MBL), fikoline (H- i L-fikolin) i tetranektine (Beulaja Manikandan i sar., 2020). Njihova uloga je uglavnom u imunski

posredovanim reakcijama i inflamaciji. Serumski amiloid može vezati glikane poput onih koji se nalaze na desijalinizovanom humanom α_1 -kiselom glikoproteinu, koji nosi fukozilovane bi-, tri- ili tetraantenarne N-glikane (Baerenfaenger i Meyer, 2018). Ispitivanja bubrežne slabosti se najčešće dovode u vezu sa MBL-om, proteinom plazme koji, u sklopu odbrambenih mehanizama, prepoznaje visokomanozne strukture prisutne u ćelijskom zidu mikroorganizama. Potom se, preko serinskih proteaza, aktivira sistem komplementa, koji pokreće imunski odgovor (Yongqing i sar., 2012; Thompson i sar., 2020).

Uticao je komponenti alternativnog i lektinskog (manoznog) puta je dobro ispitan u ishemijsko-reperfusionim oštećenjima, i doveden u vezu sa imunski posredovanim odbacivanjem alokalema bubrega i jetre. Na sličan način se dovodi u vezu priroda ishemijskog cerebrovaskularnog inzulta (Troelsen i sar., 2010) i neka inflamatorna oboljenja gastrointestinalnog sistema (Pağowska-Klimek i Cedzyński, 2014). Povišeni nivoi komponenti komplemenata, u plazmi i urinu, nađeni su kod bolesnika sa dijabetesnom nefropatijom, gde se aktivacija komplementa lektinskim putem povezuje sa nastankom i brzinom progresije bubrežne slabosti (Li i sar., 2019; Bus i sar., 2018). Brzina progresije dijabetesne nefropatije zavisi od doprinosa MBL-a (Cai i sar., 2020; Li i sar., 2019; Bus i sar., 2018). Iako nivo MBL-a korelira sa povećanim rizikom za nastanak kardiovaskularnih događaja kod bolesnika lečenih HD-om (Poppelaars i sar., 2016), nije pronađena povezanost *MBL2* genotipa sa posledičnim neželjenim kliničkim posledicama i kardiovaskularnim ishodom kod bolesnika bilo lečenih PD-om ili HD-om, ali ni kod transplantiranih bolesnika (Adrian i sar., 2018).

Pokazano je da kod bolesnika sa sekundarnom glomerulopatijom tj. IgA vaskulitisom (u sklopu Henoch-Schönlein-ove purpore) dolazi do taloženja MBL-a duž endotelijalne membrane, dok se kod nekih bolesnika sa IgA nefropatijom bolest razvija kao posledica taloženja MBL-IgA agregata u mezangijumu, usled interakcije MBL-a sa ugljenohidratnim komponentama IgA (detaljnije u Roos i sar., 2001; Jensen i sar., 2007). Matthijsen i saradnici (2009) su pokazali da taloženje MBL-a doprinosi razvoju hronične koronarne bolesti, dok je nađeno i da postoji značajna veza između polimorfizma gena *MBL2* i nastanka Kawasaki-jeve bolesti, tj. vaskulitisa srednje velikih krvnih sudova (Biezeveld i sar., 2006).

Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da uočene strukturne promene fibrinogena izolovanih iz plazme bolesnika lečenih peritoneumskom dijalizom ne utiču u većoj meri na formiranje i karakteristike fibrinske mreže, ali mogu doprineti u sadejstvu sa drugim poremećenim faktorima. Ako se u obzir uzme činjenica da se kod ove grupe bolesnika najčešće razvijaju kardiovaskularne komplikacije, koje nastaju kao posledica formiranja nerastvornih agregata u vidu komplikovanih aterosklerotskih plakova, može se spekulirati o drugim mehanizmima koji su okidači formiranja ovih agregata. Ovo istraživanje nije odgovorilo na mnoga pitanja, poput:

- Da li će usled izmena u oksidaciji, terciarnoj i glikanskoj strukturi (a naročito na γ lancu), fibrinogen lakše interagovati sa receptorima/proteinima/ligandima eksprimiranim na površini ćelija?
- Da li izmenjeni glikom i struktura fibrinogena doprinosi njegovoj lakšoj interakciji sa trombocitima, koji usled endotelijalne disfunkcije svakako agregiraju na zid narušenog krvnog suda, gde pokreću koagulacionu kaskadu?
- Da li male količine potencijalno prisutnog mikrobnog agensa aktiviraju lektinski sistem komplementa i dovode do formiranja plakova u kojima se, usled izmenjene glikanske strukture, nalazi i fibrinogen?

- Da li, usled nekih modifikacija, i sopstveni lektini (poput MBL-a) u autoimunskoj reakciji prepoznaju izmenjene glikanske strukture fibrinogena kao strane molekule, što bi uslovalo njegovu aktivaciju i nastanak krvnog ugruška?

6. Zaključci

Na osnovu rezultata istraživanja prikazanih u ovoj disertaciji, mogu se izvući sledeći zaključci:

- 1) Fibrinogen izolovan iz plazme bolesnika lečenih peritoneumskom dijalizom ima značajno višu koncentraciju karbonila, posebno na lancima A α i B β ;
- 2) Fibrinogen izolovan iz plazme bolesnika lečenih peritoneumskom dijalizom ima blago izmenjenu sekundarnu i značajno izmenjenu tercijarnu strukturu;
- 3) Vreme i brzina koagulacije, kao i debljina vlakana se ne razlikuje između grupe bolesnika lečenih peritoneumskom dijalizom i zdravih dobrovoljaca;
- 4) Oksidativno i strukturno modifikovani fibrinogen, kao čist izolovani protein ne utiče na kinetiku stvaranja fibrina;
- 5) Postoje statistički značajne promene u glikozilaciji fibrinogena kod bolesnika lečenih peritoneumskom dijalizom u odnosu na zdravu kontrolu; najosetljiviji je γ lanac;
- 6) Step en fukozilacije fibrinogena povezan je sa gubitkom funkcije peritoneumske membrane; lektin AAL ima visok potencijal da bude prediktivni marker funkcije peritoneumske membrane, imajući u vidu da dobijena AUC iznosi 72%;
- 7) Na glikozilaciju fibrinogena kod bolesnika lečenih peritoneumskom dijalizom utiče broj dijaliznih izmena;
- 8) Bolesnici lečeni i ikodekstrinom, imaju viši sadržaj multiantenarnih N-glikana na terminalnom Gal kraju u odnosu na bolesnike koji se leče primenom samo glukoznih rastvora;
- 9) Nakon 18 meseci praćenja, pokazano je da na ukupan mortalitet ne utiče priroda osnovnog bubrežnog oboljenja;
- 10) Parametri koji su uticali na nepovoljni kardiovaskularni mortalitet su: hiperferemija, broj prethodnih peritonitisa, indeksi komorbidnih stanja (IPI i ICED), kao i subdijaliziranost, neregulisan krvni pritisak, snižena rezidualna bubrežna funkcija, kao i hiperglikemija i sadržaj visokomanoznih (i/ili paucimanoznih) struktura na fibrinogenu.

7. Literatura

- Adamczyk B, Struwe WB, Ercan A, Nigrovic PA & Rudd PM (2013). Characterization of fibrinogen glycosylation and its importance for serum/plasma N-glycome analysis. *J Proteome Res.* 12, 444-454. doi: 10.1021/pr300813h.
- Adrian T, Hornum M, Eriksson F, et al. (2018). Mannose-binding lectin genotypes and outcome in end-stage renal disease: a prospective cohort study. *Nephrol Dial Transplant.* 33(11):1991-1997. doi: 10.1093/ndt/gfy034.
- Adua E, Anto O, Roberts P, Kantanka S, Aboagye E & Wang W (2018). The potential of N-glycosylation profiles as biomarkers for monitoring the progression of type II diabetes mellitus towards diabetic kidney disease. *J Diabetes Metab Disord.* 17, 233-246. doi: 10.1007/s40200-018-0365.3.
- Aeibi M (2013). N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochim Biophys Acta.* 1833(11):2430-7203. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.04.001.
- Agarwal R, Alborzi P, Satyan S & Light RP (2009). Dry-weight reduction in hypertensive hemodialysis patients (DRIP): A randomized, controlled trial. *Hypertension.* 53: 500–507. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.125674.
- Agarwal R, Flynn J, Pogue V, Rahman M, Reisin E & Weir MR (2014). Assessment and management of hypertension in patients on dialysis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 25: 1630–1646. doi: 10.1681/ASN.2013060601.
- Aguirre RA & Abensur H (2011). Protective measures against ultrafiltration failure in peritoneal dialysis patients. *Clinics (Sao Paulo).* 66(12):2151-7. doi: 10.1590/s1807-59322011001200023.
- American College of Physicians-American Society of Internal Medicine (2005). Clinical evidence Issue 14. *BMJ Pub. Group.* p. 1046. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK218500/>.
- Apweiler R (2000). Protein sequence databases. *Adv Protein Chem.* 54:31-71. doi: 10.1016/s0065-3233(00)54002-9.
- Baerenfaenger & Meyer (2018). Intact Human Alpha-Acid Glycoprotein Analyzed by ESI-qTOF-MS: Simultaneous Determination of the Glycan Composition of Multiple Glycosylation Site. *J Proteome Res.* 17(11):3693-3703. doi: 10.1021/acs.jproteome.8b00309.
- Balog CI, Stavenhagen K, Fung WL, et al. (2012). N-glycosylation of colorectal cancer tissues: a liquid chromatography and mass spectrometry-based investigation. *Mol Cell Proteomics.* 11:571-85. doi: 10.1074/mcp.M111.011601.
- Bamgboye EL (2016). Challenges of ESRD care in developing economies: sub-Saharan African opportunities for significant improvement. *Clin Nephrol.* 86 (Suppl. 1), 18–22. doi: 10.5414/CNP86S128.
- Baralić M, Gligorijević N, Brković V, et al. (2020). Fibrinogen Fucosylation as a Prognostic Marker of End-Stage Renal Disease in Patients on Peritoneal Dialysis. *Biomolecules.* 10(8):1165. doi: 10.3390/biom10081165.

- Bargman JM, Thorpe KE & Churchill DN (2001). CANUSA Peritoneal Dialysis Study Group. Relative contribution of residual renal function and peritoneal clearance to adequacy of dialysis: A reanalysis of the CANUSA study. *J Am Soc Nephrol.* 12: 2158–2162. doi: 10.1681/ASN.V12102158.
- Barone-Gibbs B & Davis KK (2018). In Pursuit of the “Something” that Is Better than Nothing for Measuring Energy Intake. *The Journal of Nutrition.* 148(3):309–310. doi: 10.1093/jn/nxy006.
- Barrios C, Zierer J, Gudelj I, et al. (2016) Glycosylation profile of IgG in moderate kidney dysfunction. *J Am Soc Nephro.* 27, 933-941. doi: 10.1681/ASn.2015010109.
- Becatti M, Marcucci R, Bruschi G, et al. (2014). Oxidative modification of fibrinogen is associated with altered function and structure in the subacute phase of myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 34:1355-1361. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.303785.
- Birmingham L, Colombo M, McGurnaghan J, et al. (2018). SDRN Type 1 Bioresource Investigators. N-glycan profile and kidney disease in type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 41, 79-87. doi: 10.2337/dc17-1042.
- Beulaja Manikandan S, Manikandan R, Arumugam M & Mullainadhan P (2020). An overview on human serum lectins. *Heliyon.* 6(8):e04623. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e04623.
- Biezeveld M, Geissler J, Weverling JG, et al. (2006). Polymorphisms in the mannose-binding lectin gene as determinants of age-defined risk of coronary artery lesions in Kawasaki disease. *Arthritis Rheum.* 54(1):369-76. doi: 10.1002/art.21529.
- Binder V, Bergum B, Jaisson S, et al. (2017). Impact of fibrinogen carbamylation on fibrin clot formation and stability. *Thromb. Haemost.* 117:899-910. doi: 10.1160/TH16-09-0704.
- Bjornsson D, Schneider E & Berger H (1989). Aspirin acetylates fibrinogen and enhances fibrinolysis. Fibrinolytic effect is independent of changes in plasminogen activator levels. *J Pharmacol Exp Ther.* 250:154–161.
- Blombäck B, Carlsson K, Hessel B, et al. (1989). Native fibrin gel networks observed by 3D microscopy, permeation and turbidity. *Biochim Biophys Acta.* 997:96-110. doi: 10.1016/0167-4838(89)90140-4.
- Boudville N, Kemp A, Clayton P, et al. (2012). Recent Peritonitis Associates with Mortality among Patients Treated with Peritoneal Dialysis. *JASN.* 23 (8) 1398-1405. doi: 10.1681/ASN.2011121135.
- Brain M, Winson E, Roodenburg O & McNeil J (2017). Non anti-coagulant factors associated with filter life in continuous renal replacement therapy (CRRT): a systematic review and meta-analysis. *BMC Nephrol.* 18(1):69. doi: 10.1186/s12882-017-0445-5.
- Brimble KS, Walker M, Margetts PJ, et al. (2006). Meta-analysis: peritoneal membrane transport, mortality, and technique failure in peritoneal dialysis. *J Am Soc Nephrol.* 17:2591–2598. doi: 10.1681/ASN.2006030194.
- Brophy DF, Carl DE, Mohammed BM, et al. (2013). Differences in coagulation between hemodialysis and peritoneal dialysis. *Perit Dial Int.* 34:33-40. doi: 10.3747/pdi.2013.00036.
- Brown AE, Blake GP, Boudville N, et al. (2020). International Society for Peritoneal Dialysis practice recommendations: Prescribing high-quality goal-directed peritoneal dialysis. *Perit Dial Int.* 40(3):244-253. doi: 10.1177/0896860819895364.

- Brownlee M, Vlassara H & Cerami A (1984). Nonenzymatic Glycosylation and the Pathogenesis of Diabetic Complications. *Annals of Internal Medicine*. 101(4):527-537. doi:10.7326/0003-4819-101-4-527.
- Bruck K, Stel VS, Gambaro G, et al. (2016). CKD prevalence varies across the European general population. *J Am Soc Nephrol*. 27:2135–47. doi: 10.1681/ASN.2015050542.
- Burkart J (2004). Metabolic consequences of peritoneal dialysis. *Semin Dial*. 17, 498-504. doi: 10.1111/j.0894-0959.2004.17610.x.
- Bus P, Chua SJ, Klessens CQF, et al. (2018). Complement Activation in Patients with Diabetic Nephropathy. *Kidney Int Rep*. 3(2): 302–313. doi: 10.1016/j.ekir.2017.10.005.
- Cai K, Ma Y, Wang J, et al. (2020). Mannose-binding lectin activation is associated with the progression of diabetic nephropathy in type 2 diabetes mellitus patients. *Ann Trans Med*. 8(21):1399. doi: 10.21037/atm-20-1073.
- Canadian Organ Replacement Register (2015). Canadian Organ Replacement Register Annual Report: Treatment of End-Stage Organ Failure in Canada, 2004 to 2013 [online], https://secure.cihi.ca/free_products/2015_CORR_AnnualReport_ENweb.pdf.
- Cao Y, True AD, Chen J & Xiong Y L (2016). Dual role (antiand prooxidant) of gallic acid in mediating myofibrillar protein gelation and gel in vitro digestion. *J Agric Food Chem*. 64, 30543061. doi: 10.1021/acs.jafc.6b00314.
- Carlsson O, Nielsen S, Zakaria R & Rippe B. (1996). In vivo inhibition of transcellular water channels (aquaporin-1) during acute peritoneal dialysis in rats. *Am J Physiol*. 271(6-2):H2254–H2262. doi: 10.1152/ajpheart.1996.271.6.H2254.
- Casini A, de Moerloose P & Neerman-Arbez M (2016). Clinical Features and Management of Congenital Fibrinogen Deficiencies. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 42 (4): 366–74. doi: 10.1055/s-0036-1571339.
- Casumano MA, Rosa-Diez JG & Bedat-Gonzalez CM (2016). Latin American Dialysis and Transplant Registry: Experience and contributions to end-stage renal disease epidemiology. *World J Nephrol*. 5(5): 389–397. doi: 10.5527/wjn.v5.i5.389
- Charlson EM, Charlson ER, Peterson CJ, et al. (2008). The Charlson comorbidity index is adapted to predict costs of chronic disease in primary care patients. *J Clin Epidemiol*. 61(12):1234-1240. doi: 10.1016/j.jclinepi.2008.01.006.
- Chaturvedi S, Brodsky RA & McCrae KR (2019). Complement in the Pathophysiology of the Antiphospholipid Syndrome. *Front Immunol*. 10:449. doi: 10.3389/fimmu.2019.00449.
- Churchill DN, Thorpe KE, Nolph KD et al. (1998). Increased peritoneal membrane transport is associated with decreased patient and technique survival for continuous peritoneal dialysis patients. The Canada-USA (CANUSA) Peritoneal Dialysis Study Group. *J Am Soc Nephrol*. 9:1285–1292. doi: 10.1681/ASN.V971285.
- CKD Evaluation and Management (2012). Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO). Retrieved 2019-07-06. https://kdigo.org/wp-content/uploads/2017/02/KDIGO_2012_CKD_GL.pdf
- Clerc FC, K Reiding RK, Jansen CB, et al. (2016). Human plasma protein N-glycosylation. *Glycoconj J*. 33(3):309-43. doi: 10.1007/s10719-015-9626-2.

- Crossen TT, Usvyat L, Kotanko P, et al. (2011). Comparison of outcomes on continuous ambulatory peritoneal dialysis versus automated peritoneal dialysis: results from a USA database. *Perit Dial Int.* 31:679-684. doi: 10.3747/pdi.2010.00004.
- Crabtree JH & Jain A (2015). Peritoneal dialysis catheters, placement, and care. In: Handbook of dialysis, 5th ed Philadelphia: *Wolters Kluwer Health.* p.425-50. doi: 10.1016/j.semnephrol.2016.10.004.
- Cunningham AM, Pipe WS, Zhang B, et al. (2003). LMAN1 is a molecular chaperone for the secretion of coagulation factor VIII. *J Thromb Haemost.* 1(11):2360-7. doi: 10.1046/j.1538-7836.2003.00415.x.
- Daugirdas, JT, Blake PG & Ing TS (2006). "Physiology of Peritoneal Dialysis". Handbook of dialysis. Lippincott Williams & Wilkins. p. 323. Archived from the original on 2013-06-18. https://books.google.rs/books?id=IGV4boOFjZYC&pg=PA323&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- Davalos D & Akassoglou K (2012). Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease. *Seminars in Immunopathology.* 34 (1): 43–62. doi: 10.1007/s00281-011-0290-8.
- Davies JS & Finkelstein OF (2020). Accuracy of the estimation of V and the implications this has when applying Kt/Vurea for measuring dialysis dose in peritoneal dialysis. *Perit Dial Int.* 40(3):261-269. doi: 10.1177/0896860819893817.
- Davies SJ (2004). Longitudinal relationship between solute transport and ultrafiltration capacity in peritoneal dialysis patients. *Kidney Int.* 66: 2437-2445. doi: 10.1111/j.1523-1755.2004.66021.x.
- Davies SJ, Caskey FJ, Coyle D, et al. (2017). Rationale and design of BISTRO: a randomized controlled trial to determine whether bioimpedance spectroscopy-guided fluid management maintains residual kidney function in incident haemodialysis patients. *BMC Nephrol.* 18(1):13. doi: 10.1186/s12882-017-0554-1.
- de Leoz ML, Young LJ, An HJ, et al. (2011). High-mannose glycans are elevated during breast cancer progression. *Mol Cell Proteomics.* 10:M110.0027172011. doi: 10.1074/mcp.M110.002717.
- de Lima SM, Otoni A, Sabino Ade P, et al. (2013). Inflammation, neoangiogenesis and fibrosis in peritoneal dialysis. *Clin Chim Acta.* 421: 46-50. doi: 10.1016/j.cca.2013.02.027.
- de Maat PM & Verschuur M (2005). Fibrinogen heterogeneity: inherited and noninherited. *Curr Opin Hematol.* 12(5):377-83. doi: 10.1097/01.moh.0000169287.51594.3b.
- de Moerloose P, Casini A & Neerman-Arbez M (2013). Congenital Fibrinogen disorders: An Update. *Semin Thromb Hemost.* 39:585-595. doi: 10.1055/s-0033-1349222
- de Vries JJ, Snoek MC, Rijken CD & de Maat PM (2020). Effects of Post-Translational Modifications of Fibrinogen on Clot Formation, Clot Structure, and Fibrinolysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 40:554–569. doi: 10.1161/ATVBAHA.119.313626.
- Dražić A, Myklebust LM, Ree R & Arnesen T (2016). The world of protein acetylation. *Biochim Biophys Acta.* 1864:1372–1401. doi: 10.1016/j.bbapap.2016.06.007.
- Dong J, Yang ZK & Chen Y (2016). Older age, higher body mass index and inflammation increase the risk for new-onset diabetes and impaired glucose tolerance in patients on peritoneal dialysis. *Perit Dial Int.* 36(3):277e83. doi: 10.3747/pdi.2015.00182.

- Elamin S, Obeid W & Abu-Aisha H (2010). Replacement therapy in Sudan, 2009. *Arab J Nephrol Transplant*. 3, 31–36. doi: 10.4314/ajnt.v3i2.58903
- ERA–EDTA Registry (2016). ERA–EDTA Registry [online], <https://www.era-edta-reg.org>.
- Fahal IH (2014). Uraemic sarcopenia: aetiology and implications. *Nephrol Dial Transplant*. 29:1655e65. doi: 10.1093/ndt/gft070.
- Fang M, Kang L, Wang X, et al. (2019). Inhibition of core fucosylation limits progression of diabetic kidney disease. *Biochem Biophys Res Commun* 520, 612–618. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.10.037.
- Farrell H (2004). Pathophysiologic roles of the fibrinogen gamma chain. *Curr Opin Hematol*. 11, 151-155. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.10.037.
- Fernandez-Poza S, Padros A, Thompson R, et al. (2021) Tailor-made recombinant prokaryotic lectins for characterisation of glycoproteins. *Anal Chim Acta*. 1155:338352. doi: 10.1016/j.aca.2021.338352.
- Ferrantelli E, Farhat K, Ederveen LH, et al. (2018). Effluent and serum protein N-glycosylation is associated with inflammation and peritoneal membrane transport characteristics in peritoneal dialysis patients. *Sci Rep*. 8, 979. doi:10.1038/s41598-018-19147-x.
- Flessner MF, Ronco C, Crepaldi C & Cruz DN (2009). Peritoneal ultrafiltration: physiology and failure. In: Peritoneal dialysis – from basic concepts to clinical excellence. Dialysis – From Basic Concepts to Clinical Excellence. *Contrib Nephrol Basel, Karger*. 163, pp 7–14(2009). doi:10.1159/000223773
- Frampton JE & Plosker GL (2003). Icodextrin: a review of its use in peritoneal dialysis. *Drugs* 63 (19): 2079–105. doi: 10.2165/00003495-200363190-00011.
- Franchi T, Eaton S, De Coppi P & Giuliani S (2019). The emerging role of immunothrombosis in paediatric conditions. *Pediatr Res*. 86(1):19-27. doi: 10.1038/s41390-019-0343-6.
- Fresenius Medical Care. Fresenius Medical Care (2015). Annual Report: ESRD patients in 2015: A global perspective (FMC 2015).*
- *https://www.freseniusmedicalcare.com/fileadmin/data/com/pdf/investors/News_Publications/Annual_Reports/2015/FMC_AnnualReport_2015_en.pdf.
- Fu S, Chen J, Liu B & Liang B (2020). Systemic inflammation modulates the ability of serum ferritin to predict all-cause and cardiovascular mortality in peritoneal dialysis patients. *BMC Nephrol* 21: 237. doi: 10.1186/s12882-020-01892-9.
- Fu Y & Grienninger G (1994). Fib420: a normal human variant of fibrinogen with two extended alpha chains. *Proc Natl Acad Sci* 91(7):2625-8. doi: 10.1073/pnas.91.7.2625.
- Gabay C & Kushner I (1999). Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. *N Engl J Med* 340:448-454 doi: 10.1056/NEJM199902113400607.
- Gackler A, Rohn H, Lisman T, et al. (2019). Evaluation of hemostasis in patients with end-stage renal disease. *PLoS One*. 14(2):e0212237. doi:10.1371/journal.pone.0212237.
- GBD 2013 Mortality Causes of Death Collaborators (January 2015). Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 385 (9963): 117–71. doi:10.1016/S0140-6736(14)61682-2.

- GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. (2017). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 2018; 392: 1789–858. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32279-7.
- Gligorijević N, Minić S, Križáková M, Katrlík J & Nedić O (2018). Structural changes of fibrinogen as a consequence of cirrhosis. *Thromb Res.* 166, 43-49. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.124.
- Gligorijevic N, Zamorova-Krizakova M, Penezic A, Katrlík J & Nedic O (2018). Structural and functional changes of fibrinogen due to aging. *Inter J of Biol Macromol* 108:1028-1034.
- Glorieux G, Schepers E & Vanholder RC (2007). Uremic toxins in chronic renal failure. *PubMed.* 28:173–204. PMID: 17932467
- Goetze AM, Liu YD, Zhang Z, et al. (2011). High-mannose glycans on the Fc region of therapeutic IgG antibodies increase serum clearance in humans. *Glycobiology.* 21(7):949-59. doi: 10.1093/glycob/cwr027.
- Gouveia D, Bignelli AT, Hokazono SR et al. (2017). Analysis of economic impact between the modality of renal replacement therapy. *J Bras Nefrol.* 39(2):162–171. doi: 10.5935/0101-2800.20170019.
- Griendling K, Touyz M, Zweier L, et al. (2016). American Heart Association Council on Basic Cardiovascular Sciences. Measurement of reactive oxygen species, reactive nitrogen species, and redox-dependent signaling in the cardiovascular system: a scientific statement from the American Heart Association. *Circ Res.* 119:e39–e75. doi: 10.1161/RES.000000000000110.
- Grover PS & Mackam N (2019). Intrinsic Pathway of Coagulation and Thrombosis. *Arterioscle Thromb Vasc Biol.* 39:331–338. doi:10.1161/atvbaha.118.312130.
- Habib A, Petrucci G & Rocca B (2019). Pathophysiology of Thrombosis in Peripheral Artery Disease. *Curr Vasc Pharmacol.* 18(3):204-214. doi: 10.2174/1570161117666190206234046.
- Handgama P, Bainton FD, Jacques Y, et al. (1993). Kistrin, an integrin antagonist, blocks endocytosis of fibrinogen into guinea pig megakaryocyte and platelet alpha-granules. *J Clin Invest.* 91(1):193-200. doi: 10.1172/JCI116170.
- Hatakeyama S, Amano M, Tobisawa Y, et al. (2013) Serum N-glycan profiling predicts prognosis in patients undergoing hemodialysis. *Sci World J.* Vol 2013, Article ID 268407, Pg 10. doi:10.1155/2013/268407.
- Hedgeman E, Lipworth L, Lowe K, Saran R, Do T & Fryzek J (2015). International burden of chronic kidney disease and secondary hyperparathyroidism: a systematic review of the literature and available data. *Int J Nephrol.* 2015:184321. doi: 10.1155/2015/184321.
- Hendrickson OD & Zherdev AV (2018). Analytical application of lectins. *Crit Rev Anal Chem.* 48:279-292. doi: 10.1080/10408347.2017.1422965.
- Henschen-Edman AH (1999). On the identification of beneficial and detrimental molecular forms of fibrinogen. *Haemostasis.* 29(2-3):179-86. doi: 10.1159/000022498.
- Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, et al. (2016). Global prevalence of chronic kidney disease—a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 11:e0158765. doi: 10.1371/journal.pone.0158765.
- Himmelfarb J (2004). Linking oxidative stress and inflammation in kidney disease: which is the chicken and which is the egg? *Semin Dial.* 17:449–54. doi: 10.1111/j.0894-0959.2004.17605.x.

- Hirai K, Nonaka H, Ueda M, et al. (2021). Effects of Roxadustat on the Anemia and Iron Metabolism of Patients Undergoing Peritoneal Dialysis. *Front Med.* doi: 10.3389/fmed.2021.667117.
- Hoffman T, Theusch E, Haldar T, et al. (2018). A large electronic-health-record-based genome-wide study of serum lipids. *Nat Genet.* 50(3):401-413. doi: 10.1038/s41588-018-0064-5.
- Hoffmann M, Marx K, Reichl U, Wuhrer M & Rapp E (2016). Site-specific O-glycosylation analysis of human blood plasma proteins. *Mol Cell Proteomics* 15:624-641. doi: 10.1074/mcp.M115.053546.
- Hoffmann M, Pioch M, Pralow A, et al. (2018). The fine art of destruction: a guide to in-depth glycoproteomic analyses-exploiting the diagnostic potential of fragment ions. *Proteomic.* 18, e1800282. doi: 10.1002/pmic.201800282.
- Holloway S, Vagher JP, Caprini JA, Simon NM & Mockros LF (1987). Thromboelastography of blood from subjects with chronic renal failure. *Thromb Res.* 45, 817825. doi: 10.1016/0049-3848(87)90091-0.
- Hsieh YP, Chang CC, Wen YK, Chiu PF & Yang Y (2014). Predictors of peritonitis and the impact of peritonitis on clinical outcomes of continuous ambulatory peritoneal dialysis patients in Taiwan—10 years' experience in a single center. *Perit Dial Int.* 34(1):85–94. doi: 10.3747%2Fpdi.2012.00075.
- Hsu CY, Iribarren C, McCulloch CE, Darbinian J & Go AS (2009). Risk factors for end-stage renal disease: 25-year follow-up. *Arch Intern Med.* 169:342–50. doi: 10.1001/archinternmed.2008.605.
- Huang MJ, Wei RB, Wang Y, et al. (2017). Blood coagulation system in patients with chronic kidney disease: a prospective observational study. *BMJ Open.* 7:e014294. doi: 10.1136/bmjopen-2016-014294.
- Huang Y & Zhu H (2017). Protein array-based approaches for biomarker discovery in cancer. *Genom Proteom Bioinf.* 15, 73-81. doi: 10.1016/j.gpb.2017-03.001.
- Hugenholtz CG, Macrae F, Adelmeijer J, et al. (2016). Procoagulant changes in fibrin clot structure in patients with cirrhosis are associated with oxidative modifications of fibrinogen. *J Thromb Haemost.* 14:1054-1066. doi: 10.1111/jth.13278.
- Hung R, Wong B, Goldet G & Davenport A (2017). Differences in prevalence of muscle wasting in patients receiving peritoneal dialysis per dual-energy X-ray absorptiometry due to variation in guideline definitions of sarcopenia. *Nutr Clin Pract.* 32:539e44. doi: 10.1177/0884533617696331.
- Isoyama N, Qureshi RA, Avesani MC, et al. (2014). Comparative associations of muscle mass and muscle strength with mortality in dialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 9:1720e8. doi: 10.2215/CJN.10261013.
- Jain AK, Blake P, Cordy P & Garg AX (2012). Global Trends in Rates of Peritoneal Dialysis. *J Am Soc Nephrol.* 23, 533–544. doi: 10.1681/ASN.2011060607.
- Jaisson S, Pietrement C & Gillery P (2011). Carbamylation-derived products: bioactive compounds and potential biomarkers in chronic renal failure and atherosclerosis. *Clin Chem.* 57:1499–1505. doi: 10.1373/clinchem.2011.163188.
- Jager KJ, Kovesdy C, Langham R et al. (2019). A single number for advocacy and communication—worldwide more than 850 million individuals have kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant.* 1;34(11):1803-1805. doi: 10.1093/ndt/gfz174.

- James PA, Oparil S, Carter BL, et al. (2014). 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA*. 311 (5): 507–20. doi: 10.1001/jama.2013.284427.
- Jensen PH, Laursen I, Matthiesen F & Højrup P (2007). Posttranslational modifications in human plasma MBL and human recombinant MBL. *Biochim Biophys Acta*. 1774(3):335-44. doi: 10.1016/j.bbapap.2006.12.008.
- Jerónimo T, Malho Guedes A, del Peso G, et al. (2018). Paricalcitol and Peritoneal Protein Loss in Peritoneal Dialysis: A Double-Center Study. *Blood Purif*. 46:103–110. doi: 10.1159/000488637.
- Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, et al. (2013). Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet*. 382:260–72. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60687-X.
- Jo YI, Shin KS, Lee HJ, Song OJ & Park HJ (2007). Immediate initiation of CAPD following percutaneous catheter placement without break-in procedure. *Perit Dial Int*. 27(2):179–183. PMID: 17299155.
- Johnson D, Brown F, Clarke M, et al. (2012). On behalf of the balANZ Trial Investigators: Effects of biocompatible versus standard fluid on peritoneal dialysis outcomes. *JASN*. 23(6):1097–1107. doi: 10.1681%2FASN.2011121201.
- Kaneko K, Hamada C & Tomino Y (2007). Peritoneal fibrosis intervention. *Perit Dial Int*. 27 Suppl 2: S82-86. PMID: 17556336.
- Kang SH, Park JW, Yoon KW & Do JY (2013). Limb/trunk lean mass ratio as a risk factor for mortality in peritoneal dialysis patients. *J Ren Nutr*. 23:315e23. doi: 10.1053/j.jrn.2012.09.004.
- Kaprio T, Satomaa T, Heiskanen A, et al. (2015). N-glycomic profiling as a tool to separate rectal adenomas from carcinomas. *Mol Cell Proteomics*. 14:277-88. doi: 10.1074%2Fmcp.M114.041632.
- Kidney F (2002). K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis*. 39:1–266. PMID: 11904577
- Kihm LP, Müller-Krebs S, Holoch S, et al. (2015). Increased peritoneal damage in glyoxalase 1 knock-down mice treated with peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant*. 30: 401-409. doi: 10.1093/ndt/gfu346.
- Kim LY & Biesen WV (2017). Fluid overload in peritoneal dialysis Patients. *Semin Nephrol*. 37: 43–53. doi: 10.1016/j.semnephrol.2016.10.006.
- Kim S, Oh J, Kim S, et al. (2009). Benefits of biocompatible PD fluid for preservation of residual renal function in incident CAPD patients: a 1-year study. *Nephrol Dial Transplant*. 24:2899–2908. doi: 10.1093/ndt/gfp054.
- Kitterer D, Segerer S, Braun N, Alscher DM & Latus J (2017). Gender-Specific Differences in Peritoneal Dialysis. *Kidney Blood Press Res*. 42(2):276-283. doi: 10.1159/000477449.
- Klarić D & Knotek M (2013). Long-term effects of peritonitis on peritoneal dialysis outcomes. *Int Urol Nephrol*. 45(2):519–25. doi: 10.1007/s11255-012-0257-2.
- Kooman JP & van der Sande FM (2019). Body fluids in end-stage renal disease: statics and dynamics. *Blood Purif*. 47:223-229. doi: 10.1159/000494583.

- Kramer A, Boenink R, Stel SV, et al. (2021). The ERA-EDTA Registry Annual Report 2018: a summary. *Clinical Kidney Journal*. 14(1):107–123. doi: 10.1093/ckj/sfaa271.
- Krediet RT, Zweers MM, van Westrhenen R, Zegward A & Stuijk DG (2008). Effects of reducing the lactate and glucose content in PD solutions on the peritoneum: is the future GLAD? *Nephrol Dial Transplant Plus*. 1 (4): iv56-62. doi: 10.1093/ndtplus/sfn126.
- Lados Krupa A, Konieczynska M, Chmiel A, & Undas A (2015). Increased oxidation as an additional mechanism underlying reduced clot permeability and impaired fibrinolysis in type 2 diabetes. *J Diabetes Res*. 2015:456189. doi: 10.1155/2015/456189.
- Lambie ML, John B, Mushahar L, Huckvale C & Davies SJ (2010). The peritoneal osmotic conductance is low well before the diagnosis of encapsulating peritoneal sclerosis is made. *Kidney Int*. 78: 611–618. doi: 10.1038/ki.2010.186.
- Lee YH, Park CH, Seo JB, et al. (2005). Superior patient survival for continuous ambulatory peritoneal dialysis patients treated with a peritoneal dialysis fluid with neutral pH and low glucose degradation product concentration (Balance). *Perit Dial Int*. 25(3):248–255. PMID: 15981773.
- Lee MS, Min SY, Son KY, Kim ES & An SW (2021). Comparison of clinical outcome between incremental peritoneal dialysis and conventional peritoneal dialysis: a propensity score matching study. *Renal Failure*. 43(1):1222-1228. doi: 10.1080/0886022X.2021.1960564.
- Levey AS & Coresh J (2012). Chronic kidney disease. *Lancet*. 379:165–80. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60178-5.
- Levi M & Sivapalaratnam S (2018). Disseminated intravascular coagulation: an update on pathogenesis and diagnosis. *Expert Rev Hematol*. 11(8):663-672. doi: 10.1080/17474086.2018.1500173.
- Li J, Hsu HC, Mountz DJ & Allen GJ (2018). Unmasking fucosylation: From cell adhesion to immune system regulation and diseases. *Cell Chem Biol*. 25, 499–512. doi: 10.1016/j.chembiol.2018.02.005.
- Li QX, Chang DY, Chen M & Zhao MH (2019). Complement activation in patients with diabetic nephropathy. *Diabetes Metab*. 45(3):248-253. doi: 10.1016/j.diabet.2018.04.001.
- Li W, Sigley J, Pieters M, et al. (2016). Fibrin fiber stiffness is strongly affected by fiber diameter, but not by fibrinogen glycation. *Biophys J*. 110,1400-1410. doi: 10.1016%2Fj.bpj.2016.02.021.
- Liakopoulos V, Roumeliotis S, Gorny X, Dounousi E & Mertens PR (2017). Oxidative stress in hemodialysis patients: a review of the literature. *Oxid Med Cell Longev*. 2017:3081856. doi: 10.1155/2017/3081856.
- Liao TC, Kao WT, Chou YH, et al. (2011). Associations of metabolic syndrome and its components with cardiovascular outcomes among non-diabetic patients undergoing maintenance peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant*. 26: 4047e54. doi: 10.1093/ndt/gfr175.
- Libetta C, Sepe V, Esposito P, Galli F & Dal Canton A (2011). Oxidativestress and inflammation: implications in uremia and hemodialy-sis. *Clin Biochem*. 44:1189–98. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2011.06.988.
- Lisman T & Ariëns AS (2016). Alterations in fibrin structure in patients with liver diseases. *Semin Thromb Hemost* 42:389-396. doi: 10.1055/s-0036-1572327.

- Liu M, Yu H, Zhang D, et al. (2018). Alteration of glycosylation in serum proteins: a new potential indicator to distinguish non-diabetic renal diseases from diabetic nephropathy. *RSC Adv.* 8, 38872. doi: 10.1039/c8ra06832a.
- Lithgow V, Scott E, Iwashkiw A, et al. (2014). A general protein O-glycosylation system within the Burkholderia cepacia complex is involved in motility and virulence. *Molecular Microbiology.* 92 (1): 116–37. doi: 10.1111/mmi.12540.
- Liyanage T, Ninomiya T, Jha V, et al. (2015). Worldwide access to treatment for end-stage kidney disease: a systematic review. *Lancet.* 385:1975–82. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61601-9.
- Lu YY & Liao MK (2018). Increased risk of deep vein thrombosis in end-stage renal disease patients. *BMC Nephrol.* 19:204. doi: 10.1186/s12882-018-0989-z.
- Luik AJ, Struijk DG, Gladziwa U, et al. (1994). Diurnal blood-pressure variations in haemodialysis and CAPD patients. *Nephrol Dial Transplant.* 9: 1616–1621. PMID: 7870351.
- Luo Y, Shi J & Li J (2015). Peroxynitrite induced fibrinogen site identification. *Biomed Mater Eng.* 26(1):S2241–S2248. doi: 10.3233/BME-151530
- Lutz J, Menke J, Sollinger D, Schinzel H & Thürmel K (2014). Haemostasis in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 29:29-40. doi: 10.1093/ndt/gft209.
- Luyendeyk JP, Schoenecker JG & Flick MJ (2019). The multifaceted role of fibrinogen in tissue injury and inflammation. *Blood.* 133(6):511-520. doi: 10.1182/blood-2018-07-818211.
- Mahmood U, Cho Y & Johnson WD (2016). Peritoneal Dialysis Solutions, Chapter 2. doi: 10.5772/63504.
- Mak HR, Ikizler TA, Kovesdy PC, et al. (2011). Wasting in chronic kidney disease. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle.* 2(1): 9–25. doi: 10.1007%2Fs13539-011-0019-5.
- Mandolfo S, Zucchi A, Cavalieri D Oro L, Corradi B & Imbasciati E (1996). Protein nitrogen appearance in CAPD patients: what is the best formula. *Nephrol Dial Transplant.* 11: 1592-6. PMID: 8856217.
- Marchi R, Arocha-Piñango LC, Nagy H, Matsuda M & Weisel WJ (2004). The effects of additional carbohydrate in the coiled-coil region of fibrinogen on polymerization and clot structure and properties: characterization of the homozygous and heterozygous forms of fibrinogen Lima (Aalpha Arg141-->Ser with extra glycosylation). *J Thromb Haemost.* 2(6):940-8. doi: 10.1111/j.1538-7836.2004.00730.x.
- Martin C, Ekman P, Forsberg O & Ersmark H (1992). Increased phosphate content of fibrinogen in vivo correlates with alteration in fibrinogen behaviour. *Thromb Res.* 68:467–473. doi: 10.1016/0049-3848(92)90059-j.
- Martinez M, Weisel WJ & Ischiropoulos H (2013). Functional impact of oxidative posttranslational modifications on fibrinogen and fibrin clots. *Free Radical Biol Med.* 65:411-418. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.039.
- Matthijsen RA, de Winther MP, Kuipers D, et al. (2009). Macrophage-specific expression of mannose-binding lectin controls atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation.* 119(16):2188–2195.

- McLoughlin MR & Topley N (2011). Switching on EMT in the peritoneal membrane: considering the evidence. *Nephrol Dial Transplant*. 26: 12-5. doi: 10.1093/ndt/gfq699.
- Mehrotra R (2012). Expanding access to peritoneal dialysis for incident dialysis patients. *Am J Kidney Dis*. 59:330-332. doi: 10.1681/ASN.2016010112.
- Mehrotra R, Kermah D, Fried L, et al. (2007). Chronic peritoneal dialysis in the United States: declining utilization despite improving outcomes. *J Am Soc Nephrol*. 18, 2781–2788. doi: 10.1681/asn.2006101130.
- Menon KM, Naimark MD, Bargman MJ, Vas IS & Oreopoulos GD (2001). Long-term blood pressure control in a cohort of peritoneal dialysis patients and its association with residual renal function. *Nephrol Dial Transplant*. 16: 2207–2213. doi: 10.1093/ndt/16.11.2207.
- Mikolasevic I, Žutelija M, Mavrinac V & Orlic L (2017). Dyslipidemia in patients with chronic kidney disease: etiology and management. *Int J Nephrol Renovasc Dis*. 10:35–45. doi: 10.2147/IJNRD.S101808.
- Mise K, Imamura M, Yamaguchi S, et al. (2018). Identification of novel urinary biomarkers for predicting renal prognosis in patients with type 2 diabetes by glycan profiling in a multicenter prospective cohort study: U-CARE study 1 *Diabetes Care* 41, 1765-1775. doi: 10.2337/dc18-0030.
- Miskulin DC, Gassman J, Schrader R, et al. (2018). Blood Pressure in dialysis: Results of a pilot study. *J Am Soc Nephrol*. 29: 307–316, 2018. doi: 10.1681/ASN.2017020135.
- Morena M, Delbosc S, Dupuy AM, Canaud B & Cristol JP (2005). Overproduction of reactive oxygen species in end-stage renal disease patients: a potential component of hemodialysis-associated inflammation. *Hemodial Int*. 9:37–46. doi: 10.1111/j.1492-7535.2005.01116.x.
- Mosesson WM (2005). Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost*. 3(8):1894–1904. doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01365.x.
- Mudge WD, Boudville N, Brown F, et al. (2016). Peritoneal dialysis practice in Australia and New Zealand: A call to sustain the action. *Nephrology*. 21(7):535-546. doi: 10.1111/nep.1231.
- Muntner P, Hamm LL, Kusek JW, Chen J, Whelton PK & He J (2004). The prevalence of nontraditional risk factors for coronary heart disease in patients with chronic kidney disease. *Ann Intern Med*. 40:9–17. doi: 10.2215/CJN.00070109.
- Nagae M & Yamaguchi Y (2012). Function and 3D structure of the N-glycans on glycoproteins. *Int J Mol Sci*. 13(7):8398-429. doi: 10.3390/ijms13078398.
- Nagae M, Yamaguchi Y, Taniguchi N & Kizuka Y (2020). 3D Structure and Function of Glycosyltransferases Involved in N-glycan Maturation. *Int J Mol Sci*. 21(2): 437. doi: 10.3390/ijms21020437.
- Nagel M, Jansen RP, Stringer S, et al. (2018). Meta-analysis of genome-wide association studies for neuroticism in 449,484 individuals identifies novel genetic loci and pathways. *Nat Genet*. 50(7):920-927. doi: 10.1038/s41588-018-0151-7.
- Nagel T & Meyer B (2014). Simultaneous characterization of sequence polymorphisms, glycosylation and phosphorylation of fibrinogen in a direct analysis by LC-MS. *Biochim Biophys Acta*. 1844, 2284-2289. doi: 10.1016/j.bbapap.2014.09.021.

- Nagel T, Klaus F, Ibanez G, et al. (2018) Fast and facile analysis of glycosylation and phosphorylation of fibrinogen from human plasma-correlation with liver cancer and liver cirrhosis. *Anal Bioanal Chem.* 410, 7965-7977. doi: 10.1007/s00216-018-1418-7.
- National Institute for Health and Clinical Excellence (2008). Clinical guideline 73: Chronic kidney disease. London, 2008. PMID:21413194 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/nbk51773/>.
- National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (2017). <https://www.niddk.nih.gov>.
- National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (November 2015). Mineral & Bone Disorder in Chronic Kidney Disease. <https://www.niddk.nih.gov/health-information/kidney-disease/mineral-bone-disorder>.
- National Kidney Foundation (2002). K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease. *Archived from the original on 2005-04-15*. 39(2 Suppl 1): S1-266. PMID: 11904577.
- Nesrallah EG, Dixon NS & MacKinnon M (2018). Home Palliative Service Utilization and Care Trajectory Among Ontario Residents Dying on Chronic Dialysis. *Can J Kidney Dis.* 5:2054358118783761. doi: 10.1177/2054358118783761.
- Ni J, Verbavatz M, Rippe A, et al. (2006). Aquaporin-1 plays an essential role in water permeability and ultrafiltration during peritoneal dialysis. *Kidney Int.* 69(9):1518–1525. doi: 10.1038/sj.ki.5000285.
- Nogami K & Shima M (2019). New therapies using nonfactor products for patients with hemophilia and inhibitors. *Blood.* 133(5):399-406. doi: 10.1182/blood-2018-07-820712.
- Nolph KD (2017). History of peritoneal dialysis. Peritoneal dialysis. Springer Science & Business Media. p. 1.0 and 2.0. ISBN 9789401725606. *Archived from the original on 2017-01-13*. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-94-017-2560-6>.
- Nunns RG, Moore EE, Chapman PM, et al. (2017). The hypercoagulability paradox of chronic kidney disease: The role of fibrinogen. *Am J Surg.* 2017, 214, 1215-1218. doi: 10.1016/j.amjsurg.2017.08.039.
- Ohtsubo K & Marth DJ (2006). Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell.* 126(5):855-67. doi: 10.1016/j.cell.2006.08.019.
- Olszowska A, Waniewski J, Stachowska-Pietka J, et al. (2019). Long Peritoneal Dialysis Dwells With Icodextrin: Kinetics of Transperitoneal Fluid and Polyglucose Transport. *Front Physiol.* 10:1326. doi: 10.3389/fphys.2019.01326.
- Omran J, Al-Dadah A & Dellsperger CK (2013). Dyslipidemia in patients with chronic and endstage kidney disease. *Cardiorenal Med.* 3(3):165–77. doi: 10.1159/000351985.
- Ortega ML & Materson JB (2011). Hypertension in peritoneal dialysis patients: epidemiology, pathogenesis, and treatment. *J Am Soc Hypertens.* 5(3):128-36. doi: 10.1016/j.jash.2011.02.004.
- Pacchiarotta T, Hensbergen JP, Wuhler M, et al. (2012). Fibrinogen alpha chain O-glycopeptides as possible markers of urinary tract infection. *J Proteomics.* 75, 1067-1073. doi: 10.1016/j.jprot.2011.10.021.
- Pałowska-Klimek & Maciej Cedzyński (2014). Mannan-Binding Lectin in Cardiovascular Disease. *Biomed Research International.* doi: 10.1155/2014/616817.

- Pahl VM, Gollapudi S, Sepassi L, et al. (2010). Effect of end-stage renal disease on B-lymphocyte subpopulations, IL-7, BAFF and BAFF receptor expression. *Nephrol Dial Transplant* 25:205–12. doi: 10.1093/ndt/gfp397.
- Paludan RS and Mogensen HT (2022). Innate immunological pathways in COVID-19 pathogenesis. *Science Immunology*. 7 Jan 2022 • Vol 7, Issue 67 doi: 10.1126/sciimmunol.abm5505.
- Panova-Noeva M, Eggebrecht L, Prochaska HJ & Wild SP (2019). Potential of Multidimensional, Large-scale Biodatabases to Elucidate Coagulation and Platelet Pathways as an Approach towards Precision Medicine in Thrombotic Disease. *Hamostaseologie*. 39(2):152-163. doi: 10.1055/s-0038-1677520.
- Park DD, Phoomak C, Xu G, et al. (2020). Metastasis of cholangiocarcinoma is promoted by extended high-mannose glycans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117(14):7633-7644. doi: 10.1093/ndt/gfs116.
- Pedruzzi LM, Stockler-Pinto MB, Leite M Jr & Mafra D (2012). Nrf2-keap1 system versus NF-kappaB: the good and the evil in chronic kidney disease? *Biochimie*. 94:2461–6. doi: 10.1016/j.biochi.2012.07.015.
- Pérez-Flores I, Coronel F, Cigarrán S, Herrero AH & Calvo N (2007). Relationship between residual renal function, inflammation, and anemia in peritoneal dialysis. *Adv Perit Dial*. 23:140-3. PMID: 17886621.
- Perl J, Nessim SJ & Bargman JM (2011). The biocompatibility of neutral pH, low-GDP peritoneal dialysis solutions: Benefit at bench, bedside, or both? *Kidney International*. 79 (8): 814–824. doi: 10.1038/ki.2010.515.
- Perl J, Wald R, Bargman MJ, et al. (2012). Changes in patient and technique survival over time among incident peritoneal dialysis patients in Canada. *Clin J Am Soc Nephrol*. 7, 1145–1154. doi: 10.2215/CJN.01480212.
- Phasha NM, Soma P, Pretorius E & Phulukdaree A (2019). Coagulopathy in Type 2 Diabetes Mellitus: Pathological Mechanisms and the Role of Factor XIII-A Single Nucleotide Polymorphisms. *Curr Diabetes Rev*. 15(6):446-455. doi: 10.2174/1573399815666190130113328.
- Pletinck A, Vanholder R, Veys N & Van Biesen W (2012). Protecting the peritoneal membrane: factors beyond peritoneal dialysis solutions. *Nat Rev Nephrol*. 8: 542-550. doi: 10.1038/nrneph.2012.144.
- Poland CD, Schalkwijk GC, Stehouwer DC, et al. (2001). Increased α 3-fucosylation of α 1 -acid glycoprotein in Type I diabetic patients related to vascular function. *Glycoconj J*. 18, 261–268. doi: 10.1023/a:1012412908983.
- Poppelaars F, Gaya da Costa M, Berger PS, et al. (2016). Strong predictive value of mannose-binding lectin levels for cardiovascular risk of hemodialysis patients. *J Transl Med*. 14(1):236. doi: 10.1186/s12967-016-0995-5.
- Preciado P, Zhang H, Thijssen S, et al. (2019). All-cause mortality in relation to changes in relative blood volume during hemodialysis. *Nephrol Dial Transplant*. 34(8):1401-1408. doi: 10.1093/ndt/gfy286.
- Qayyum A, Ley-Oei E, Paudel K & Fan LS (2015). Increasing the use of biocompatible, glucose-free peritoneal dialysis solutions. *World J Nephrol*. 4(1):92-7. doi: 10.5527/wjn.v4.i1.92.

- Qayyum A, Yang L & Fan LS (2015). Optimizing peritoneal dialysis catheter placement by lateral abdomen X-ray. *Perit Dial Int.* 35:760-2. doi: 10.3747/pdi.2014.00263.
- Rajakaruna G, Caplin B & Davenport A (2015). Peritoneal protein clearance rather than faster transport status determines outcomes in peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int.* 35:216e21. doi: 10.3747/pdi.2013.00217.
- Repetto O & De Re V (2017). Coagulation and fibrinolysis in gastric cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1404 (1): 27–48. doi: 10.1111/nyas.13454.
- Restrepo CA, Buitrago AC & Holguin C (2014). Implantation of peritoneal catheters by laparotomy: nephrologists obtained similar results to general surgeons. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 7:383-90. doi: 10.2147/ijnrd.s68888.
- Rippe B, Venturoli D, Simonsen O & de Arteaga J (2004). Fluid and electrolyte transport across the peritoneal membrane during CAPD according to the three-pore model. *Perit Dial Int.* 24 (1): 10–27. PMID: 15104333.
- Rocha-Pereira P, Santos-Silva A, Rebelo I, Figueiredo A, Quintanilha A & Teixeira F (2004). Erythrocyte damage in mild and severe psoriasis. *Br J Dermatol.* 150:232–44. doi: 10.1111/j.1365-2133.2004.05801.x.
- Rondeau P & Bourdon E (2011). The glycation of albumin: Structural and functional impacts. *Biochimie.* 93(4):645-658. doi: 10.1016/j.biochi.2010.12.003.
- Roos R, Lee Bouwman HL, van Gijlswijk-Janssen JD, et al. (2001). Human IgA Activates the Complement System Via the Mannan-Binding Lectin Pathway. *J Immunol.* 167(5):2861-2868. doi: 10.4049/jimmunol.167.5.2861.
- Rose-John S, Waetzig HG, Scheller J, Grötzinger J & Seeger D (2007). The IL-6/sIL-6R complex as a novel target for therapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets.* 11: 613-624. doi: 10.1517/14728222.11.5.613.
- Rosenfeld AM, Vasilyeva DA, Yurina VLy & Bychkova VA (2018). Oxidation of proteins: is it a programmed process. *Free Radic Res.* 52, 1438. doi: 10.1080/10715762.2017.1402305.
- Rutkowski B, Tam P, van der Sande MF, et al. (2016). Low Sodium Balance Study Group: Lowsodium versus standard-sodium peritoneal dialysis solution in hypertensive patients: A randomized controlled trial. *Am J Kidney Dis.* 67: 753–761. doi: 10.1053/j.ajkd.2015.07.031.
- Sanz AB, Sanchez-Niño DM, Ramos MA, et al. (2010). NF-kappaB in renal inflammation. *J Am Soc Nephrol.* 21:1254–62. doi: 10.1681/ASN.2010020218.
- Satyanarayana RV & Narothama RA (2021). *Chronic Renal Failure.* Stat Pearls Publishing. Jan 2021
- Saxena R (2007). Pathogenesis and treatment of peritoneal membrane failure. *Pediatr Nephrol.* 23(5):695-703. doi: 10.1007/s00467-007-0580-5.
- Schilte NM, Celie MAW J, ter Wee MP, Beelen RH & van den Born J (2009). Factors contributing to peritoneal tissue remodelling in peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 29:605-617. PMID: 19910560.
- Schuett K, Savvaidis A, Maxeiner S, et al. (2017). Clot structure: A potent mortality risk factor in patients on hemodialysis. *J Am Soc Nephrol.* 28, 1622-1630. doi: 10.1681/ASN.2016030336.

- Schwenger V, Morath C, Salava A, et al. (2006). Damage to the peritoneal membrane by glucose degradation products is mediated by the receptor for advanced glycation end-products. *J Am Soc Nephrol.* 17:199–207. doi: 10.1681/ASN.2005020155.
- Scott DJA, Prasad P, Philippou H, et al. (2011). Architecture is altered in abdominal aortic aneurysms and correlates with aneurysm size. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31:3004–3010. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.236786.
- Selgas R, Bajo A, Jimenez-Heffernan JA, et al. (2006). Epithelial-to-mesenchymal transition of the mesothelial cell--its role in the response of the peritoneum to dialysis. *Nephrol Dial Transplant.* 21 Suppl 2: ii2-7. doi: 10.1093/ndt/gfl183.
- Selmeci L (2011). Advanced oxidation protein products (AOPP): novel uremic toxins, or components of the nonenzymatic antioxidant system of the plasma proteome? *Free Radic Res.* 45, 11151123. doi: 10.3109/10715762.2011.602074.
- Selmeci L, Székely M, Soós P, et al. (2006). Human blood plasma advanced oxidation protein products (AOPP) correlates with fibrinogen levels. *Free Rad Res.* 40:952-958. doi: 10.1080/10715760600818789.
- Shacter E, Williams AJ, Lim M & Levine LR (1994). Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by western blot immunoassay. *Free Radic Biol Med.* 17(5):429-37. doi: 10.1016/0891-5849(94)90169-4.
- Shahzad K, Kohli S, Al-Dabet MM & Isermann B (2019). Cell biology of activated protein C. *Curr Opin Hematol* 26(1):41-50. doi: 10.1097/MOH.0000000000000473.
- Sharon N & Lis H (2007). *Lectins* doi: 10.1007/978-1-4020-6953-6_2.
- Shlipak GM, Fried FL, Cushman M, et al. (2005). Cardiovascular mortality risk in chronic kidney disease: comparison of traditional and novel risk factors. *JAMA.* 293:1737–45. doi: 10.1001/jama.293.14.1737.
- Shrestha SK (2017). Simple Coagulation Cascade with Mnemonics. *Epomedicine.* 2017 Jan 17. <https://epomedicine.com/medical-students/simple-coagulation-cascade-mnemonics/>
- Silverstein DM (2009). Inflammation in chronic kidney disease: role in the progression of renal and cardiovascular disease. *Pediatr Nephrol.* 24:1445-1452. doi: 10.1007/s00467-008-1046-0.
- Singh PR, Bhaiyya R, Khandare K & Tingirikari MJ (2020). Macroalgal dietary glycans: potential source for human gut bacteria and enhancing immune system for better health. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 16;1-22. doi: 10.1080/10408398.2020.1845605.
- Singh S, Heijmans R, Meulen E, et al. (2020). Association of the IgG N-glycome with the course of kidney function in type 2 diabetes. *BMJ Open Diabetes Res Care.* 8, e001026. doi: 10.1136/bmjdr-2019-001026.
- Sjøland JA, Sidelmann JJ, Brabrand M, et al. (2007). Fibrin clot structure in patients with end-stage renal disease. *Thromb Haemost* 339-345. PMID: 17721616.
- Smit W, van Dijk P, Langedijk MJ, et al. (2003). Peritoneal function and assessment of reference values using a 3.86% glucose solution. *Perit Dial Int.* 23(5):440-9. PMID: 14604195.
- Spiro GR (2002). Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology.* 12(4):43R–56R. doi: 10.1093/glycob/12.4.43R.

- Stanley P (2014) Mannosyl(Alpha-1,3-)-Glycoprotein Beta-1,2-N Acetylglucosaminyltransferase (MGAT1). In Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes; *Springer*: Tokyo, Japan, 2014; pp. 183–194. https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-4-431-54240-7_129.pdf
- Stenvinkel P, Carrero JJ, Axelsson J, et al. (2008). Emerging biomarkers for evaluating cardiovascular risk in the chronic kidney disease patient: how do new pieces fit into the uremic puzzle? *Clin J Am Soc Nephrol.* 3:505–21. doi: 10.2215/CJN.03670807.
- Stepanova N, Korol L & Burdeyna O (2019). Oxidative stress in peritoneal dialysis patients: Association with the dialysis adequacy and technique survival. *Indian Journal of Nephrology.* 29(5):309-316. doi: 10.4103/ijn.IJN_242_18.
- Stevens EP & Levin A (2013). Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline. *Ann Intern Med.* 158:825–30. doi: 10.7326/0003-4819-158-11-201306040-00007.
- Stone CM & Thorp MJ (1985). Plasma fibrinogen--a major coronary risk factor. *JR. Coll. Gen. Pract.* 35(281):565-9. PMID: PMC1961456.
- Sung CC, Hsu CY, Chen CC, Lin YF & Wu CC (2013). Oxidative stress and nucleic acid oxidation in patients with chronic kidney disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013:301982. doi: 10.1155/2013/301982.
- Suzuki H, Kanno Y, Sugahara S, Okada H & Nakamoto H (2004). Effects of an angiotensin II receptor blocker, valsartan, on residual renal function in patients on CAPD. *Am J Kidney Dis.* 43: 1056-1064. doi: 10.1053/j.ajkd.2004.01.019.
- Takayama H, Ohta M, Iwashita Y, et al. (2020). Altered glycosylation associated with dedifferentiation of hepatocellular carcinoma: a lectin microarray-based study. *BMC Cancer.* 20(1):192. doi: 10.1186/s12885-020-6699-5.
- Talabnin K, Talabnin C, Ishihara M & Azadi P (2018). Increased expression of the high-mannose M6N2 and NeuAc3H3N3M3N2F tri-antennary N-glycans in cholangiocarcinoma. *Oncol Lett.* 15(1):1030-1036. doi: 10.3892/ol.2017.7384.
- Tan KB, Yu Z, Fang W, et al. (2016). Longitudinal bioimpedance vector plots add little value to fluid management of peritoneal dialysis patients. *Kidney Int.* 89: 487–497. doi: 10.1038/ki.2015.294.
- Tennent AG, Brennan OS, Stangou JA, et al. (2007). Human plasma fibrinogen is synthesized in the liver. *Blood.* 109(5):1971–1974. doi: 10.1182/blood-2006-08-040956.
- Ternavasio-de la Vega GH, Romero-Castano F, Ragozzino S, et al. (2018). The updated Charlson comorbidity index is a useful predictor of mortality in patients with Staphylococcus aureus bacteraemia. *Epidemiol. Infect.* 146(16):2122-2130. doi: 10.1017/S0950268818002480.
- Thomas B, Wulf S, Bikbov B, et al. (2015). Maintenance dialysis throughout the world in years 1990 and 2010. *J. Am. Soc. Nephrol.* 26, 2621–2633. doi: 10.1681/ASN.2014101017.
- Thompson J, Cao L, Ma Y, et al. (2020). Human Influenza Virus Hemagglutinins Contain Conserved Oligomannose N-Linked Glycans Allowing Potent Neutralization by Lectin. *Cell Host Microbe.* 27(5): 725–735.e5. doi: 10.1016/j.chom.2020.03.009.
- Tilley D, Levit I & Samis JA (2011). Development of a microplate coagulation assay for factor V in human plasma. *Thromb J.* 9:11. doi: 10.1186/1477-9560-9-11.

- Titze J (2015). A different view on sodium balance. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 24:14–20. doi: 10.1097/MNH.0000000000000085.
- Tomino Y (2012). Mechanisms and interventions in peritoneal fibrosis. *Clin Exp Nephrol*. 16: 109-114. doi: 10.1007/s10157-011-0533-y.
- Troelsen N, Garred P, Christiansen B, et al. (2010). Double role of mannose-binding lectin in relation to carotid intima–media thickness in patients with rheumatoid arthritis. *Molecular Immunology*. 47 (4): 713-718. doi: 10.1016/j.molimm.2009.10.21.
- Tsimihodimos V, Mitrogianni Z & Elisaf M (2011). Dyslipidemia associated with chronic kidney disease. *Open Cardiovasc Med J*. 5(1): 41–8. doi: 10.2174/1874192401105010041.
- Udayaraj PU, Steenkamp R, Caskey JF, et al. (2009). Blood pressure and mortality risk on peritoneal dialysis. *Am J Kidney Dis*. 53: 70–78. doi: 10.1053/j.ajkd.2008.08.030.
- Undas A, Kolarz M, Kopeć G & Tracz W (2007). Altered fibrin clot properties in patients on longterm haemodialysis: relation to cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant*. 23, 0:1-6. doi: 10.1093/ndt/gfm884.
- Undas A, Pasierski T, Windyga J & Crowther M (2014). Practical aspects of new oral anticoagulant use in atrial fibrillation. *Pol Arch Med Wewn*. 2014;124(3):124-35. doi: 10.20452/pamw.2138.
- Utrera M & Estévez M (2012) Analysis of tryptophan oxidation by fluorescence spectroscopy: effect of metal-catalyzed oxidation and selected phenolic compounds. *Food Chem*. 135:88-93. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.04.101.
- Uversky V & Keith-Dunker A (2010). Understanding Protein Non-Folding. *Biochim Biophys Acta*. 1804(6):1231-1264. doi: 10.1016/j.bbapap.2010.01.017.
- Vaios V, Georgianos IP, Liakopoulos V & Agarwal R (2019). Assessment and Management of Hypertension among Patients on Peritoneal Dialysis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 14(2):297-305. doi: 10.2215/CJN.07480618.
- van Biesen W, Williams JD, Covic AC, et al. (2011). EuroBCM Study Group: Fluid status in peritoneal dialysis patients: The European Body Composition Monitoring (EuroBCM) study cohort. *PLoS One*. 6: e17148. doi: 10.1371/journal.pone.0017148.
- van de Bovenkamp FS, Hafkenscheid L, Rispens T & Rombouts Y (2016). The Emerging Importance of IgG Fab Glycosylation in Immunity. *J Immunol*. 196(4):1435-41. doi: 10.4049/jimmunol.1502136.
- van de Luitgaarden MW, Jager JK, Segelmar M, et al. (2016). In dialysis modality choice and related patient survival in the ERA-EDTA Registry over a 20-year period. *Nephrol Dial Transplant*. 31, 120–128. doi: 10.1093/ndt/gfv295.
- Vanholder R, De Smet R, Glorieux G, et al. (2003). Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int*. 63:1934–43.
- Vecchio M, Navaneethan SD, Johnson DW, et al. (2010). Interventions for treating sexual dysfunction in patients with chronic kidney disease. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. (12): CD007747. doi: 10.1046/j.1523-1755.2003.00924.x.

- Wakabayashi K, Hamada C, Kanda R, et al. (2014). Adipose-derived mesenchymal stem cells transplantation facilitate experimental peritoneal fibrosis repair by suppressing epithelial-mesenchymal transition. *J Nephrol.* 27(5):507–14. doi: 10.1007/s40620-014-0133-5.
- Wan J, Li W & Zhong Y (2018). Parathyroidectomy decreases serum intact parathyroid hormone and calcium levels and prolongs overall survival in elderly hemodialysis patients with severe secondary hyperparathyroidism. *J Clin Lab Anal.* 33(3):e22696. doi: 10.1002/jcla.22696.
- Wang YA, Brimble SK, Brunier G, et al. (2015). ISPD cardiovascular and metabolic guidelines in adult peritoneal dialysis patients part II - management of various cardiovascular complications. *Perit Dial Int.* 35: 388–396. doi: 10.3747/pdi.2014.00278.
- Watanabe H, Fujimura R, Hiramoto Y, et al. (2021). An acute phase protein α_1 -acid glycoprotein mitigates AKI and its progression to CKD through its anti-inflammatory action. *Sci Rep.* 2021 11(1):7953. doi: 10.1038/s41598-021-87217-8.
- Watson CL, Thompson CJ (1980). Erosion of the Colon by a Long-Dwelling Peritoneal Dialysis Catheter. *JAMA.* 243(21):2156-2157. doi:10.1001/jama.1980.03300470018011.
- White JN, Wang Y, Fu X, et al. (2016). Posttranslational oxidative modification of fibrinogen is associated with coagulopathy after traumatic injury. *Free Radic Biol Med.* 96:181-189. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.023.
- Wieslander A, Linden T, Musi B, et al. (2001). Exogenous uptake of carbonyl stress compounds promoting AGE formation from peritoneal dialysis fluids. *Contrib Nephrol.* 82–89. doi: 10.1159/000060065.
- Wile D (2012). Diuretics: a review. *Annals of Clinical Biochemistry.* 49 (Pt 5): 419–31. doi: 10.1258/acb.2011.011281.
- Williams AM & Daviter T (2013). Protein-Ligand Interactions Methods and Applications. *New York: Springer.* doi: 10.1007/978-1-62703-398-5.
- Williams DJ, Craig JK, von Ruhland C, Topley N & Williams TG (2001). The natural course of peritoneal membrane biology during peritoneal dialysis. *Kidney Int.* 2003;S43–S49. doi: 10.1046/j.1523-1755.2003.08805.x.
- Winter EW, Flax DS & Harris SN (2017). Coagulation Testing in the Core Laboratory. *Lab Med.* 48(4):295-313. doi: 10.1093/labmed/lmx050.
- Woodrow G, Fan LS, Reid C, Denning J & Neil Pyrah A (2017). Renal Association Clinical Practice Guideline on peritoneal dialysis in adults and children. *BMC Nephrol.* 18:333. doi: 10.1186/s12882-017-0687-2.
- Xie X, Liu Y, Perkovic V, et al. (2016). Renin-Angiotensin System Inhibitors and Kidney and Cardiovascular Outcomes in Patients with CKD: A Bayesian Network Meta-analysis of Randomized Clinical Trials. *Am J Kidney Dis.* 67 (5): 728–41. doi: 10.1053/j.ajkd.2015.10.011.
- Xiping Z, Bo C, Shifeng Y, et al. (2017). Roles of MALAT1 in development and migration of triple negative and Her-2 positive breast cancer. *Oncotarget.* 9(2):2255-2267. doi: 10.18632/oncotarget.23370.
- Xu H, Cabezas-Rodriguez I, Qureshi RA, et al. (2015). Increased levels of modified advanced oxidation protein products are associated with central and peripheral blood pressure in peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int.* 35:460-470. doi: 10.3747/pdi.2013.00064.

- Yakovlev S & Medved L (2009). Interaction of fibrin(ogen) with the endothelial cell receptor VE-cadherin: localization of the fibrin-binding site within the third extracellular VE-cadherin domain. *Biochemistry*. 48(23):5171-9. doi: 10.1021/bi900487d.
- Yang X & Qian K (2017). Protein O-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 18(7):452-465. doi: 10.1038/nrm.2017.22.
- Yamashita K, Shibata T, Takahashi T, Koboyashi Y & Kawabata SI (2020). Roles of the clip domains of two protease zymogens in the coagulation cascade in horseshoe crabs. *JBC Article*. doi: 10.1074/jbc.RA119.012452.
- Yamazumi K, Shimura K, Maekawa H, et al. (1989). Delayed intermolecular gamma-chain cross-linking by factor XIIIa in fibrinogen Asahi characterized by a gamma-Met-310 to Thr substitution with an N-glycosylated gamma-Asn-308. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1(4-5):557-9. doi: 10.1172/JCII14056.
- Yáñez-Mó M, Lara-Pezzi E, Selgas R, et al. (2003). Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med*. 348:403–413. doi: 10.1056/NEJMoa020809.
- Yongqing T, Drentin N, Duncan R, Wijeyewickrema L & Pike R (2012). Mannose-binding lectin serine proteases and associated proteins of the lectin pathway of complement: two genes, five proteins and many functions? *Biochim Biophys Acta*. 1824(1):253-62. doi: 10.1016/j.bbapap.2011.05.021.
- Yu Z, Lambie M & Davies JS (2014). Longitudinal study of small solute transport and peritoneal protein clearance in peritoneal dialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 9:326–334. doi: 10.2215/CJN.04420413.
- Yun HS, Sim HE, Goh Y-R, Parko IJ & Han YJ (2016). Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers. *Biomed Res Int* Vol 2016, Article ID 9060143, 5 page. doi: 10.1155/2016/9060143.
- Yung S, L FK & Chan TM (2006). Peritoneal mesothelial cell culture and biology. *Perit Dial Int*. 26: 162-73. PMID: 16623418.
- Zauner C, Funk CG & Birnbacher R (2001). Platelet aggregation inhibition with ticlopidine in the treatment of stroke. *Intensive Care Med*. 27(3):620-1. doi: 10.1007/s001340100851.
- Zauner G, Hoffmann M, Rapp E, et al. (2012). Glycoproteomic analysis of human fibrinogen reveals novel regions of O-glycosylation. *J Proteome Res*. 11, 5804-5814. doi: 10.1021/pr3005937.
- Zeier M, Schwenger V, Deppisch R, et al. (2003). Glucose degradation products in PD fluids: do they disappear from the peritoneal cavity and enter the systemic circulation? *Kidney Int*. 63:298–305. doi: 10.1046/j.1523-1755.2003.00705.x.
- Zhang L, Zeng X, Fu P & Wu Mei H (2014). Angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers for preserving residual kidney function in peritoneal dialysis patients. *Cochrane Database Syst Rev*. 23;(6):CD009120. doi: 10.1002/14651858.CD009120.pub2.
- Zoccali C (2000). Cardiovascular risk in uraemic patients—is it fully explained by classical risk factors? *Nephrol Dial Transplant*. 15:454–7. doi: 10.1093/ndt/15.4.454.

Biografija

Marko (Blažen) Baralić, rođen je u Čačku 20.06.1980. godine, gde je završio srednju medicinsku školu, i stekao zvanje medicinski tehničar.

Na Medicinskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu (MFUB), je završio osnovne studije i specijalizaciju iz interne medicine, gde je stekao zvanje doktora medicine i specijaliste interne medicine.

Zaposlen je u Klinici za nefrologiju, Univerzitetskog Kliničkog centra Srbije.

Doktorske studije iz molekularne medicine je upisao na MFUB-u. Na Univerzitetkom veću 22. septembra 2020. godine mu je odobrena tema doktorske disertacije pod naslovom “Strukturne i funkcionalne promene fibrinogena kod bolesnika na peritoneumskoj dijalizi”.

Užu specijalizaciju iz nefrologije je upisao na MFUB-u, a u postupku je završetak užeg specijalističkog rada, pod naslovom “Povezanost prirodnog i stečenog imuniteta kod bolesnika lečenih peritoneumskom dijalizom na SARS - CoV-2 infekciju”.

U maju 2021. godine je izabran u zvanje Kliničkog asistenta na Katedri interne medicine na MFUB-u, za užu naučnu oblast - nefrologija.

Autor je i koautor u 23 publikacije u celosti u domaćim i međunarodnim časopisima. Učestvovao je u više domaćih i međunarodnim naučnih projekata i više puta je nagrađivan za svoj istraživački rad.

Recenzent je u više međunarodnih naučnih časopisa, a održao je veći broj usmenih predavanja iz oblasti kojima se bavi.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Марко Б. Баралић

Број индекса ММ 15/14

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

“Структурне и функционалне промене фибриногена код болесника на перитонеумској дијализи “

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

Потпис аутора

У Београду, 27.01.2022. године



Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Марко Б. Баралић

Број индекса ММ 15/14

Студијски програм Молекуларна медицина

Наслов рада “Структурне и функционалне промене фибриногена код болесника на перитонеумској дијализи “

Ментор Доц. др. сци. мед. Мирјана Лаушевић


Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања 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, 27.01.2022. године



Изјава о коришћењу

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

“Структурне и функционалне промене фибриногена код болесника на перитонеумској дијализи”, 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.
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, 27.01.2022. године

