



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



Aleksandra Ignjatović

**PRIMENA MULTIMARKER PRISTUPA U
PROCENI RIZIKA KOD PACIJENATA NA
DIJALIZI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:

Prof. dr Tatjana Cvetković

Niš, 2013. godine

Članovi komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije:

Prof. dr Zoran Milošević – predsednik

Prof. dr Tatjana Cvetković – mentor i član

Prof. dr Dušica Pavlović – član

Doc. dr Radmila Veličković-Radovanović – član

Doc. dr Dragan Bogdanović, član sa Državnog univerzitet u Novom Pazaru

Datum odbrane: _____

„Znanje je tek onda znanje kada je stečeno naporom vlastite misli, a ne pamćenjem.“

L.N. Tolstoj

Zahvalnost,

Izrada doktorske disertacije, bez obzira što je originalan i lični rad pojedinca, ipak zahteva veliku pomoć i podršku kolega i prijatelja. Zbog toga bih na ovom mestu želela da im se zahvalim.

Zahvaljujem svojoj mentorki **prof. dr Tatjani Cvetković**er mi je strpljivo posvetila svoje vreme i znanje. Svojim vrednim savetima i mišljenjima je usmervalala tok pisanja rada.

Zahvaljujem se svom profesoru **dr Zoranu Miloševiću** na pruženoj podršci u svemu što sam započela.

Međutim to ne bi bilo dovoljno da nije bilo ljudi koji su svojim položajem omogućili, u teškoj materijalnoj situaciji, nabavku dela reagenasa neophodnih za izradu doktorske disertacije. Zato najsrdačnije zahvaljujem **prof. dr Dušici Pavlović**, **prof. dr Vidosavi Đorđević** i **prof. dr Vidojku Đorđeviću**.

Posebno se zahvaljujem **prof. dr Miroslavu Ristiću** sa Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu koji mi je bezrezervno pomogao pri formiranju statističkog modela u programskom paketu R.

Veliku zahvalnost dugujem kolegicama i kolegama koji su mi pomogli u laboratorijskom radu **doc. dr Radmili Pavlović** i **Slavku Živanoviću**. Za nesebičnu pomoć pri selekciji pacijenata na dijalizi zahvaljujem se **dr Zorici Dimitrijević**. Zahvaljujem se kolegama sa predmeta Medicinska statistika i informatika koji su me podržali i motivisali da ovaj rad privedem što pre kraju.

Svojoj porodici, roditeljima, bratu i sestridugujem zahvalnost za ljubav, veru i podršku. Uvek ste imali snage, razumevanja i volje da me saslušate i pomognete.

Marko i Sofija, osećaj da imam vašu безусловnu ljubav, podršku i razumevanje bio je moj oslonac da nastavim u trenucima kada mi je bilo teško i kada sam nailazila na probleme.

I Autor

Ime i prezime	Aleksandra M. Ignjatović
Datum i mesto rođenja:	04.06.1980. godine, Niš
Sadašnje zaposlenje:	Asistent na UNO Medicinska statistika i informatika

II Doktorska disertacija

Naslov:	Primena multimarker pristupa u proceni rizika kod pacijenata na dijalizi
Broj stranica:	114
Broj šema/slika:	7
Broj tabela:	39
Broj grafikona:	21
Broj bibliografskih podataka:	203
Ustanova i mesto gde je rad izrađen:	Centar za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, Klinika za nefrologiju Kliničkog centra u Nišu
Naučna oblast:	Molekularna medicina, Medicinska statistika
Mentor:	Prof. dr Tatjana Cvetković

III Ocena i odbrana

Datum prijave teme:	07.03.2013.godine
Datum prihvatanja doktorske disertacije:	20.05.2013. godine
Komisija za ocenu podobnosti teme i kandidata:	1. Prof. dr Zoran Milošević, predsednik 2. Prof. dr Tatjana Cvetković, član 3. Prof. dr Dušica Pavlović, član
Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:	1. Prof. dr Zoran Milošević – predsednik 2. Prof. dr Tatjana Cvetković – mentor i član 3. Prof. dr Dušica Pavlović – član 4. Doc. dr Radmila Veličković-Radovanović – član 5. Doc. dr Dragan Bogdanović, član sa Državnog univerziteta u Novom Pazaru
Datum odbrane doktorske disertacije:	

IV Naučni doprinos doktorske disertacije:

Ignjatović AM, Cvetković TP, Pavlović RM, Đorđević VM, Milošević ZG, Đorđević VB, Pavlović DD, Stojanović IR, Bogdanović D. Endothelial dysfunction, inflammation and malnutrition markers as predictors of mortality in dialysis patients: multimarker approach. Int Urol Nephrol. 2013 DOI 10.1007/s11255-013-0439-6

Sadržaj

Lista skraćenica	viii
Lista tabela	ix
Lista grafikona.....	xi
1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Šta je biomarker? Definicija i tipovi	3
2.2. Multimarker pristup.....	5
2.3. Faktori rizika	8
2.4. Asimetrični dimetilarginin (ADMA) kao marker endotelne disfunkcije	11
2.4.1. Metabolizam asimetričnog dimetilarginina	12
2.4.1.1. Sinteza asimetričnog dimetilarginina	12
2.4.1.2. Razgradnja asimetričnog dimetilarginina.....	14
2.4.1.3. Metabolizam ADMA kod pacijenata na hemodijalizi	15
2.4.1.4. Patofiziološki značaj ADMA.....	17
2.5. Simetrični dimetilarginin (SDMA).....	18
2.6. Inflamacija i malnutricija kod pacijenata na hemodijalizi.....	19
2.6.1. C-reaktivni protein (CRP)	20
2.6.2. Serumski amiloid A (SAA)	22
2.6.3. Albumin.....	23
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE.....	25
3.1. Ciljevi istraživanja.....	25
3.2. Hipoteze istraživanja	25
4. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA	26
4.1. Ispitanici	26
4.2. Metode.....	27
4.2.1. Hematološko-biohemijska ispitivanja	27
4.2.1.1. Određivanje koncentracije CRP	27
4.2.1.2. Određivanje koncentracije serumskog amiloida.....	28
4.2.1.3. Određivanje koncentracije ADMA i SDMA	28
4.3. Statistička obrada podataka	28
5. REZULTATI.....	31
5.1. Demografske karakteristike ispitanika	31
5.2. Rezultati pacijenata na dijalizi u odnosu na kontrolnu grupu	32
5.3. Rezultati u odnosu na prisustvo hipertenzije kod pacijenata na dijalizi	40
5.4. Analiza preživljavanja.....	41
5.4.1. Rezultati u odnosu na ishod praćenja	41

5.4.2.	Rezultati Kaplan-Meier-ove analize.....	47
5.4.3.	Rezultati Coxove regresione analize	56
5.5.	Analiza rezultata u odnosu na broj faktora rizika.....	59
5.5.1.	Rezultati Kaplan-Majerove analize u odnosu na broj faktora rizika	61
5.5.2.	Rezultati Coxove regresione analize u odnosu na broj faktora rizika	63
5.6.	Rezultati Hosmer-Lemeshow testa.....	63
5.7.	Rezultati C-statistike i ROC kriva.....	63
5.8.	Rezultati tabela reklasifikacije	66
5.8.1.	Rezultati tabela reklasifikacije u odnosu na ukupnu smrtnost.....	66
5.8.2.	Rezultati tabela reklasifikacije u odnosu na smrtnost od kardiovaskularnih bolesti	70
6.	DISKUSIJA.....	75
6.1.	Koncentracija ADMA kod pacijenata na dijalizi	75
6.1.1.	Koncentracija ADMA kod hipertenzivnih pacijenata na dijalizi	78
6.1.2.	Međusobna povezanost ispitivanih markera.....	80
6.2.	ADMA kao prediktor opšte i kardiovaskularne smrtnosti.....	80
6.3.	Markeri inflamacije i malnutricije kao prediktori smrtnosti kod bolesnika na hemodijalizi... 84	
6.3.1.	C-reaktivni protein i serumski amiloid.....	84
6.3.2.	Albumin.....	86
6.4.	Multimarker pristup.....	88
7.	ZAKLJUČAK	94
8.	LITERATURA.....	96

Lista skraćenica

AF	- alkalna fosfataza
AGE	- završni produkt glikozilacije proteina
ADMA	- asimetrični dimetilarginin
ANOVA	- analiza varijanse
ALT	- alanin aminotransferaza
AST	- aspartat aminotransferaza
BNP	- B-tip natriuretskog peptida
BMI	- body mass index, indeks telesne mase
CRP	- C reaktivni protein
CPK	- keratin fosfokinaza
DDAH	- dimetilarginin dimetil aminohidrolaza
GGT	- gama glutamil transpeptidaza
HbA _{1c}	- glikolizirani hemoglobin
HBI	- hronična bubrežna insuficijencija
H-L test	- Hosmer-Lemeshow test
HPLC	- tečna hromatografija visokih performansi
HR	- hazard ratio, rizik količnik
hsCRP	- "high sensitivity" C reaktivni protein
IL-1	- interleukin 1
IL-6	- interleukin 6
KV bolesti	- kardiovaskularne bolesti
LDH	- laktat dehidrogenaza
L-NMMA	- asimetrični isomer monometil L-arginina
NO	- azot-oksidi
NOS	- azot-oksidi sintaza
NRI	- net reclassification index, indeks reklasifikacije mreže
OPA	- ortho-ftaldialdehid
p	- prag značajnosti
PRMT1	- protein-arginin metiltransferaza tip 1
PRMT2	- protein-arginin metiltransferaza tip 2
ROC	- receiver operating characteristics
SAA	- serumski amiloid
SDMA	- simetrični dimetilarginin
SAT	- saturacija transferina
TIBC	- ukupni kapacitet vezivanja gvožđa
TNF- α	- faktor nekroze tumora alfa
UIBC	- slobodni kapacitet vezivanja gvožđa
vs	- u odnosu, prema
95% CI	- 95% interval poverenja

Lista tabela

Tabela 1. Izoforme PRMT enzima i lokalizacija njihovih gena na hromozomima.....	13
Tabela 2. Bolesti i stanja koje su praćene promenjenom koncentracijom ADMA.....	15
Tabela 3. Potencijalni uzroci inflamacije kod pacijenata na hemodijalizi	20
Tabela 4. Osnovni klinički i biohemijski parametri kod pacijenata na dijalizi i u kontrolnoj.....	32
Tabela 5. Ispitivani parametri kod pacijenata na dijalizi u odnosu na prisustvo inflamcije.....	37
Tabela 6. Korelacioni matriks ispitivanih parametara.....	37
Tabela 7. Opšte kliničke i biohemijske karakteristike u odnosu na prisustvo hipertenzije	40
Tabela 8. Vrednosti ispitivanih markera kod ispitanika sa hipertenzijom.....	41
Tabela 9. Uzroci smrti kod pacijenata na dijalizi u periodu praćenja od tri godine	41
Tabela 10. Osnovne kliničke i biohemijske karakteristike ispitanika prema ishodu praćenja	42
Tabela 11. Osnovne kliničke i biohemijske karakteristike kod pacijenata sa različitim uzrokom smrti	46
Tabela 12. Vrednosti ispitivanih markera kod preminulih sa različitim uzrokom smrti	47
Tabela 13. Preživljavanje pacijenata tokom ispitivanog perioda	47
Tabela 14. Ukupno preživljavanje pacijenata tokom ispitivanog perioda u odnosu na vrednosti ADMA, SDMA, CRP, SAA i albumina.....	49
Tabela 15. Preživljavanje u odnosu na kardiovaskularne uzroke smrti tokom ispitivanog perioda u odnosu na vrednosti ADMA, SDMA, CRP, SAA i albumina.....	53
Tabela 16. Coxova regresiona analiza za ukupnu smrtnost – univarijantna logistička regresiona analiza.....	56
Tabela 17. Coxova regresiona analiza za ukupnu smrtnost – multivarijanta logistička regresiona analiza.....	57
Tabela 18. Coxova regresiona analiza u odnosu na kardiovaskularnu smrtnost – univarijantna logistička regresiona analiza	57
Tabela 19. Coxova regresiona analiza za kardiovaskularnu smrtnost – multivarijantna logistička regresiona analiza.....	58
Tabela 20. Osnovne kliničke i biohemijske karakteristike ispitanika u odnosu na broj faktora rizika ..	59
Tabela 21. Ispitivani markeri u odnosu na broj faktora rizika.....	60
Tabela 22. Ukupno preživljavanje u odnosu na broj faktora rizika.....	61
Tabela 23. Coxova regeresiona analiza u odnosu na broj faktora rizika – ukupna smrtnost i smrtnost od kardiovaskularnih bolesti.....	63
Tabela 24. Hosmer-Lemeshow test za ispitivane markere	63
Tabela 25. C-indeks za sve ispitivane parametre i kombinacije parametara u odnosu na ukupnu i kardiovaskularnu smrtnost	64
Tabela 26. Tabela reklasifikacije dodavanjem ADMA u odnosu na ukupnu smrtnost.....	67
Tabela 27. Tabela reklasifikacije dodavanjem CRP u odnosu na ukupnu smrtnost.....	67
Tabela 28. Tabela reklasifikacije dodavanjem SAA u odnosu na ukupnu smrtnost	68
Tabela 29. Tabela reklasifikacije dodavanjem albumina u odnosu na ukupnu smrtnost	68
Tabela 30. Tabela reklasifikacije dodavanjem ADMA i albumina u odnosu na ukupnu smrtnost	69
Tabela 31. Tabela reklasifikacije dodavanjem ADMA, CRP i albumina odnosu na ukupnu smrtnost..	69

Tabela 32. Tabela reklasifikacije dodavanjem ADMA, CRP, SAA i albumina u odnosu na ukupnu smrtnost	69
Tabela 33. Tabela reklasifikacije dodavanjem ADMA u odnosu na kardiovaskularnu smrtnost	70
Tabela 34. Tabela reklasifikacije dodavanjem CRP u odnosu na kardiovaskularnu smrtnost	71
Tabela 35. Tabela reklasifikacije dodavanjem SAA u odnosu na kardiovaskularnu smrtnost.....	71
Tabela 36. Tabela reklasifikacije dodavanjem albumina u odnosu na kardiovaskularnu smrtnost.....	72
Tabela 37. Tabela reklasifikacije dodavanjem ADMA, albumina odnosu na kardiovaskularnu smrtnost	72
Tabela 38. Tabela reklasifikacije dodavanjem ADMA, CRP i albumina u odnosu na kardiovaskularnu smrtnost	73
Tabela 39. Tabela reklasifikacije dodavanjem ADMA, CRP, SAA i albumina u odnosu na kardiovaskularnu smrtnost	73

Lista grafikona

Grafikon 1. Struktura ispitanika prema polu.....	31
Grafikon 2. Osnovna bolest kod ispitivanih pacijenata na dijalizi.....	32
Grafikon 3. Koncentracija ADMA kod pacijenata na dijalizi u odnosu na kontrolnu grupu.....	34
Grafikon 4. Koncentracija SDMA kod pacijenata na dijalizi u odnosu na kontrolnu grupu	35
Grafikon 5. Koncentracija CRP kod pacijenata na dijalizi u odnosu na kontrolnu grupu	35
Grafikon 6. Koncentracija SAA kod pacijenata na dijalizi u odnosu na zdrave ispitanike.....	36
Grafikon 7. Koncentracija albumina kod pacijenata na dijalizi u odnosu na zdrave ispitanike.....	36
Grafikon 8. Korelaciona analiza ADMA i SDMA.....	38
Grafikon 9. Korelaciona analiza SDMA i kreatinina.....	39
Grafikon 10. Koncentracija ADMA u odnosu na ishod praćenja pacijenata	43
Grafikon 11. Koncentracija CRP i SAA u odnosu na ishod praćenja pacijenata.....	44
Grafikon 12. Koncentracija albumina u odnosu na ishod praćenja.....	45
Grafikon 13. Kaplan Meier-ova kriva ukupnog preživljavanja i preživljavanja u odnosu na	48
Grafikon 14. Kaplan-Meirove krive u odnosu na vrednosti ADMA i CRP.....	51
Grafikon 15. Kaplan-Meirove krive u odnosu na vrednosti SAA i albumina.....	52
Grafikon 16. Kaplan-Meirove krive u odnosu na vrednosti ADMA i SDMA ($\mu\text{mol/L}$) – kardiovaskularna smrtnost.....	54
Grafikon 17. Kaplan-Meirova kriva u odnosu na prednosti CRP i SAA – kardiovaskularna smrtnost.	55
Grafikon 18. Kaplan-Meirova kriva u odnosu na vrednosti albumina – kardiovaskularna smrtnost.....	56
Grafikon 19. Kaplan Majerova kriva ukupnog i kardiovaskularnog preživljavanja u odnosu na broj faktora rizika.....	62
Grafikon 20. ROC krive za različite kombinacije markera u odnosu ukupnu smrtnost.....	65
Grafikon 21. ROC krive za različite kombinacije markera u odnosu na smrtnost od KV bolesti	66

1. UVOD

Smrtnost bolesnikana hemodijalizi je izuzetno visoka, 10-20 puta veća nego u ostaloj populaciji iste starosti. Danas se smatra da je smrtnost bolesnika na hemodijalizi koji su neuhranjeni, imaju ubrzani proces ateroskleroze i hroničnu inflamaciju, jednaka smrtnosti bolesnika sa karcinomom koji je metastazirao(1).Kardiovaskularne bolesti čine čak 50% svih uzroka smrti ovih bolesnika (2). Stoga je procena rizika smrtnosti kod ovih bolesnika izuzetno važna. Povećan rizik za nastanak oboljenja srca i ateroskleroze kod bolesnika sa uremijom je rezultat složenih uzajamnih dejstava bubrežnih i nebubrežnih činilaca, kao i komorbiditeta (3).

Kod ovih bolesnika, tradicionalni faktori rizika za razvitak kardiovaskularnih bolesti su pridodati specifičnim faktorima rizika vezanim za uremiju i dijalizu. Tri grupe faktora su vrlo važne za vaskularna oštećenja u hroničnoj bubrežnoj insuficijenciji (HBI): klasični (Framingamovi) faktori (hipertenzija, dislipidemija, pušenje i diajbetes), faktori isključivo vezani za HBI (anemija, sekundarni hiperparatiroidizam, direktna izloženost bioinkompatibilnim membranama i kontaminiranim dijaliznim tečnostima) i novootkriveni i promovisani faktori (hiperhomocistinemija, povećana simpatička aktivnost i akumulacija asimetričnog dimetilarginina - ADMA).

ADMA je kompetitivni inhibitor azot-oksida sinteze (NOS) i modulator bioloških efekata azot-oksida (NO). ADMA nije samo uremijski toksin, već i značajan marker endotelne disfunkcije i ateroskleroze, kao i nezavisni prediktor mortaliteta od kardiovaskularnih bolesti kod bolesnika sa HBI. Simetrični dimetilarginin (SDMA), koji takođe pripada grupi metilarginina, primenjuje se u proceni glomerularne filtracije(4). Rutinska primena ADMA kao markera endotelne disfunkcije još uvek nije postignuta. Poteškoće su vezane za određivanje referentnih vrednosti zbog velikog preklapanja vrednosti kod bolesnika na dijalizi i zdravih ispitanika. Osim toga, još uvek nije data preporuka kojom metodom bi trebalo rutinski određivati ovaj marker.

Inflamacija je još jedan od najvažnijih uzroka morbiditeta i mortalitetakod ovih bolesnika. Najčešći uzroci koji dovode do razvoja inflamacije su smanjenje bubrežne funkcije, povećana osetljivost na infekcije i poremećaj imunog sistema. Pri stalnom izlaganju dijaliznim tretmanima dolazi do aktivacije leukocita, produkcije inflamatornih citokina koji dovode do produkcije proteina akutne faze kao što su C-reaktivni protein (CRP) i serumski amiloid (SAA)(5). O prisustvu inflamacije zaključuje se na osnovu porasta nivoa reaktanata akutne faze, ili jednog ili više citokina, ili njihovih receptoragonista u serumu. Ovi inflamatorni

parametri predstavljaju indirektno odnosno direktne markere aktivacije monocita, koji se međusobno razlikuju po prediktivnoj vrednosti, senzitivnosti i ceni primene.

C-reaktivni protein je najvažniji pozitivni protein akutne faze i nespecifični marker sistemske inflamacije niskog stepena. U ovom trenutku, on je značajan, mada grub istraživački alat za razumevanje zanimljive povezanosti između inflamacije, malnutricije, anemije i kardiovaskularnog morbiditeta kod bolesnika na dijalizi(6).

Hipoalbuminemija je marker malnutricije koja se kod bolesnika na hemodijalizi javlja zbog nedovoljnog energetskog i proteinskog unosa, kataboličkih procesa usled acidoze, gubitka proteina tokom dijalize, infekcije/inflamacije, fizičke neaktivnosti.

Pri validaciji i evaluaciji novog markera ili kombinacije markera potrebno je sprovesti više različitih statističkih testova. Na osnovu informacija dobijenih iz ovih statističkih testova utvrđuje se da li neki novi marker ili kombinacija markera doprinosi boljoj stratifikaciji bolesnika u odnosu na model tradicionalnih faktora rizika. Preporuka je da se u okviru validacije i evaluacije koriste Cox-ova regresiona analiza, ROC (Receiver Operating Characteristics) analiza, Hosmer-Lemeshow test i tabele reklasifikacije(7, 8).

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Šta je biomarker? Definicija i tipovi

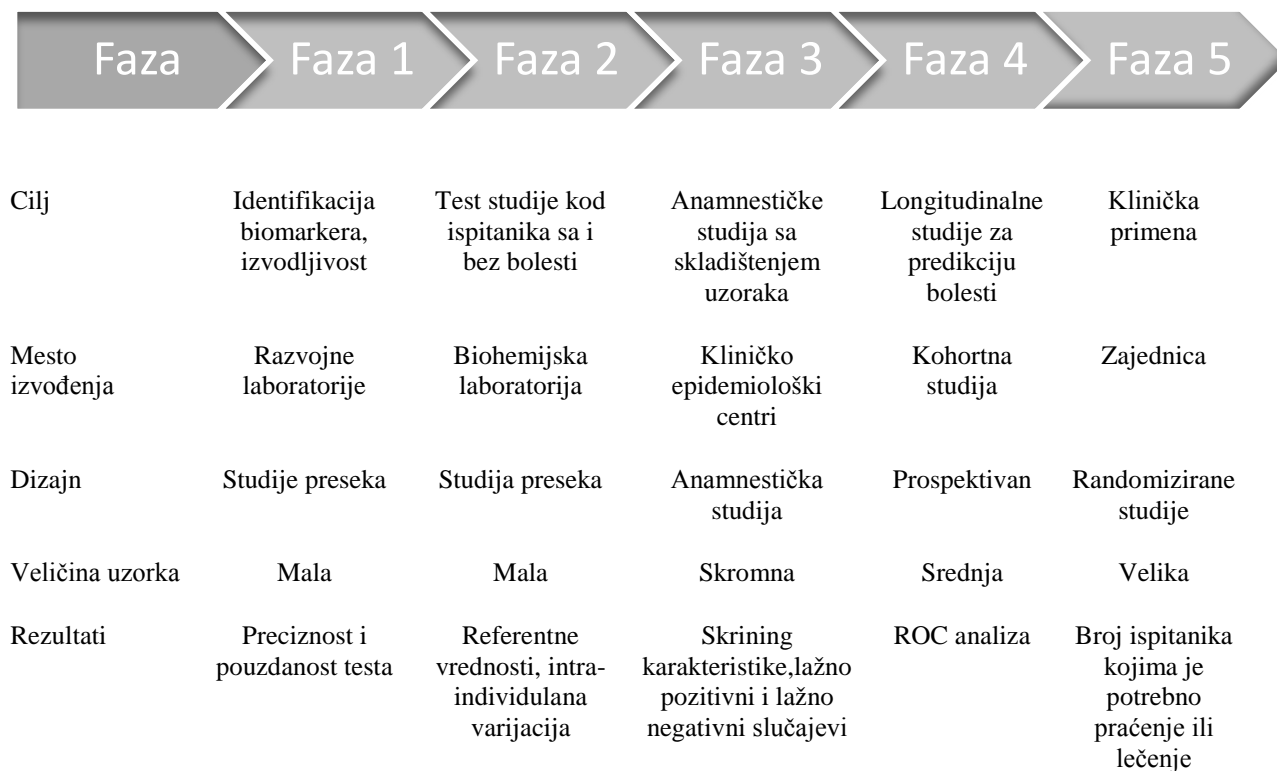
Termin biomarker je upotrebljen 1989. godine kao Medical Subject Heading (MeSH) termin koji označava biološki parametar koji se može meriti i kvantifikovati (npr. koncentracija enzima, koncentracija hormona, fenotipska distribucija određenog gena, prisustvo neke biološke supstance) i koji služi u proceni bolesti ili stanja. Američki Nacionalni zdravstveni institut je definisao biomarker kao karakteristiku koja se objektivno može meriti i koja predstavlja indikator fiziološkog, patofiziološkog stanja ili farmakološkog odgovora na neku terapijsku intervenciju(9). Biomarker bi trebalo da se idealno i stalno menja sa nivoom aktivnosti bolesti ili stepenom progresije bolesti (10). Biomarker bi trebalo da je neinvazivan, više puta merljiv, jednostavan (11).

Postoje različiti tipovi biomarkera u odnosu na primenu: 1) antecedentni biomarkeri, koji ukazuju na rizik nastanka bolesti, 2) “screening” biomarkeri, kojima se utvrđuje subklinička forma bolesti, 3) dijagnostički biomarkeri, koji otkrivaju postojeću bolest, 4) “staging” biomarkeri, koji definišu stadijum i težinu bolesti, 5) prognostički biomarkeri, koji potvrđuju tok bolesti, uključujući i odgovor na terapiju (12). Faktor rizika je definisan kao biomarker koji je povezan sa bolesti, jer je njegova promena uzročno povezana sa progresijom bolesti. Rizik marker može biti statistički značajno povezan sa bolesti, ali ne mora postojati uzročno-posledično povezan.

Bez obzira na primenu, biomarker će biti klinički značajan jedino ako u više merenja pokaže tačnost, ako je prihvatljiv za bolesnika, lekarima jednostavan za tumačenje, ima visoku specifičnost i senzitivnost za ishod koji se prati, u brojnim studijama pokaže da značajno utiče na ishod, i postoje podaci da popravlja način lečenja. Osim toga, zavisno od primene, biomarker bi trebalo da ima određene karakteristike. Za skrining markere je potrebno da imaju visoku specifičnost i senzitivnost i da ne zahtevaju visoke finansijske troškove. Za dijagnostičke markere pored gore navedenog je bitno da ih karakteriše brzo povećanje, visoka tkivna specifičnost, da nivo biomarkera reflektuje stadijum bolesti. Za biomarkere koji se koriste za praćenje progresije bolesti ili odgovara na terapijski pristup specifičnost i senzitivnost su manje bitne, jer oboleli služe kao sopstvena kontrolna grupa sa početnim vrednostima biomarkera. Za ovaj tip biomarkera je važna uska intraindividulana varijacija u odnosu na ishod ili terapiju. Finansijski aspekt je manje bitan, jer se ovakvi biomarkeri koriste samo kod onih pacijenata kod kojih je postavljena dijagnoza određene bolesti. Za prognostičke

markere je potrebna velika populacija i prospektivni dizajn kako bi se testirala njihova primena.

Postoji pet faza u procesu od otkrića do kliničke i rutinske primene određenog biomarkera (from discovery to delivery) koje su prikazane na Slici 1.



Slika 1. Faze od otkrića do primene biomarkera¹

U prvoj fazi pretkliničkih ispitivanja vrši se identifikacija i sprovode se studije izvodljivosti, uglavnom na manjim uzorcima. Najčešće se radi o studijama preseka sa ciljem određivanja preciznosti metode, pouzdanosti i senzitivnosti. U drugoj fazi kliničke karakterizacije cilj je da se ispituju vrednosti biomarkera kod osoba sa i bez bolesti. I u ovoj fazi se radi o studijama na manjim uzorcima. Studije preseka u ovoj fazi sprovode se radi određivanja referentnih vrednosti i intraindividualne varijacije vrednosti biomarkera koji se ispituje. Sledeća faza je utvrđivanje kliničke povezanosti biomarkera u anamnestičkim studijama, koje moraju da obuhvate veću populaciju u odnosu na studije koje su sprovedene u prethodnim fazama ovog procesa. Određuje se prediktivna validnost, a rezultat su skrining karakteristike i odnos lažno pozitivnih i lažno negativnih slučajeva. U četvrtoj fazi kliničke povezanosti sprovode se longitudinalne studije sa ciljem da se utvrdi kako biomarker predviđa bolest ili neki događaj. U ovoj fazi se dizajniraju kohortne studije sa većim brojem ispitanika u odnosu na prethodnu fazu. U cilju ispitivanja efikasnosti sprovodi se ROC analiza. U poslednjoj fazi, u

¹ Slika preuzeta iz Vasan RS (9)

randomiziranim kontrolisanim studijama ispituje se efikasnost i određuje broj ispitanika koji treba da se prati ili leči. Radi se o kliničkoj fazi koja zahteva veliki broj ispitanika.

Termin faktor rizika je prvi put uveden u kardiologiji pre 50 godina(13). U periodu od 20 godina je pronađeno oko 200 varijabli koje su povezane sa koronarnom bolesti, a taj broj raste do danas(14). Slična situacija je i u ostalim oblastima medicine. Faktori rizika su markeri koji su statistički, ali i nužno uzročno povezani sa pojavom bolesti. Identifikacija faktora rizika koji su uzročno povezani jako je važna, jer dozvoljava delovanje u smislu uklanjanja faktora rizika (npr. prestanak pušenja). S druge strane, postoje i faktori rizika koji nisu uzročno-posledično povezani sa bolešću i njihov značaj je u praćenju progresije i prognozi bolesti (npr. kreatinin)(15). Vreme praćenja je osnovno za pravilno tumačenje povezanosti faktora rizika i nastanka bolesti ili nekog događaja. Zato su prospektivne (kohortne) studije pouzdanije u odnosu na studije preseka.

2.2. Multimarker pristup

Cilj svih dijagnostičkih i terapijskih procedura je sprečavanje i modifikovanje progresije bolesti. Zato su istraživanja koja se bave prognozom bolesti vrlo važno područje u biomedicinskim istraživanjima. Prognoza bolesti se obično zasniva na karakteristikama pacijenta, njegovim navikama, ponašanjima ili na osnovu vrednosti biomarkera (npr. koncentracija kreatinina, vrednosti arterijskog pritiska), koji odslikavaju patološke procese. Biomarkeri se mogu svrstati u različite kategorije. Idealan marker bi trebalo da se rano identifikuje, tj. u što ranijim fazama bolesti, da je lako merljiv i da nije skup za primenu. Pre nego što bude primenjivan u kliničkoj praksi biomarker bi trebalo da bude pravilno procenjen. Multivarijanti modeli predstavljaju kombinacije biomarkera i/ili različitih indikatora koji omogućavaju procenu rizika za razvoj nekog neželjenog događaja. Iako se čini da je ovakav pristup relativno nov u medicinskim istraživanjima, najpoznatiji multimarker skor je Framingamov skor rizika, koji obuhvata demografske podatke (starost, pol), navike (pušenje) i tri biomarkera (sistolni pritisak, ukupni holesterol i HDL holesterol)(7). Framingamov skor procenjuje rizik pojedinca za razvoj infarkta miokarda u toku 10 godina.

Multimarker pristup predstavlja statistički model u kome se dobija zajednička prediktivna vrednost više različitih markera. To je niz matematičkih jednačina koje dovodi u vezu više prognostičkih biomarkera i određeni događaj. Obično se radi o nekom neželjenom događaju (infarkt miokarda) ili ishodu (smrtni ishod). Bitne osobine svakog multimarker modela su tačnost i mogućnost primene kod svih ispitanika (generalizacija). Tačnost se ogleda u slaganju prediktivne vrednosti biomarkera i stvarnog broja događaja. A primenjivost kod svih ispitanika

se ogleda u mogućnosti što tačnijeg predviđanja i u populacijama u kojima biomarker nije procenjivan.

Najčešće statističke metode koje se koriste u ovom pristupu su Cox-ova logistička regresija i izračunavanje C-indeksa uz pomoć ROC krive. Rizik količnik koji se dobija uz pomoć Cox-ove regresione analize određuje značajne efekte u istraživanjima etiologije neke bolesti, dakle, služi da se proceni i objasni jačina povezanosti biomarkera sa određenim ishodom. Ipak, o primeni nekog biomarkera ne može se suditi na osnovu relativnog rizika. Iako se kroz Cox-ovu regresionu analizu može utvrditi postojanje statistički značajne i visoke povezanosti između markera i ishoda, to nije garancija da je taj marker dobar prediktor smrtnosti u populaciji. Model za procenu rizika je statistički model koji kombinuje informacije dobijene na osnovu više statističkih testova.

Procena njegove primene mora više da se bazira na činjenicama koje se dobijaju dodavanjem novog biomarkera ili više biomarkera u model već postojećih faktora rizika. U te svrhe je razvijen čitav set statističkih testova. Jedan od njih je ROC analiza, odnosno C-indeks.

C-indeks se primenjuje u prognostičkim istraživanjima, odnosno koristi se za određivanje prediktivne sposobnosti određenog markera ili više markera bez razmatranja etiologije (16). Često se dešava da neki faktor rizika ima veliki relativni rizik, ali da se ne može pokazati kao dobar skrining marker, jer postoji izrazito preklapanje vrednosti između populacija sa i bez bolesti (17).

Validacija karakteristika novog biomarkera predstavlja najproblematičniji deo u procesu otkrivanja i primene novih biomarkera. U tom smislu se javljaju dva fundamentalna problema prilikom uključivanja biomarkera u statistički model: greška diskriminacije i greška u kalibraciji (7). Diskriminacija predstavlja sposobnost da se razdvoje ispitanici koji imaju bolest od onih koji nemaju bolest, ili da se razdvoje različiti stadijumi bolesti. Osnovni cilj dijagnostičkih modela je da klasifikuju ispitanike u određene kategorije.

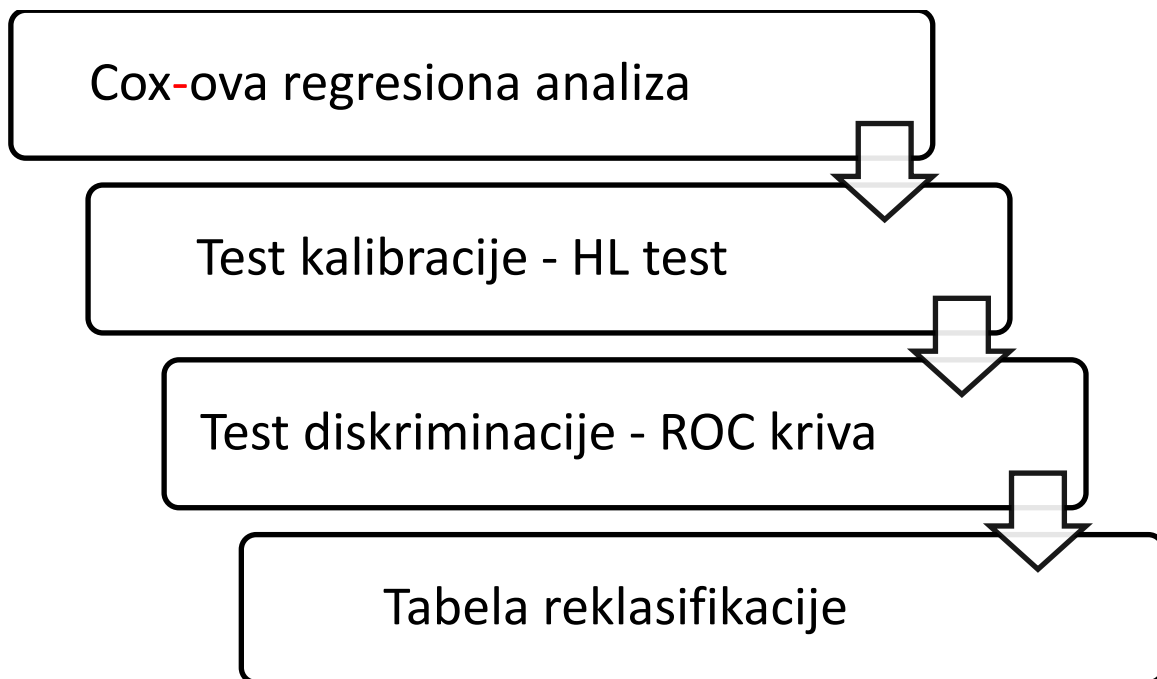
Kako bi se procenila diskriminacija nekog modela potrebno je odraditi ROC (Receiver Operating Characteristics) analizu, tj. izračunati C-indeks. Nedostaci ROC analize, zbog kojih nije moguće njeno samostalno korišćenje, su sledeći: ne daje informacije o realnom riziku u modelu, ne daje informacije o proporciji bolesnika sa visokim i niskim rizikom. Prilikom upoređivanja ROC kriva dva različita modela krive se poravnavaju prema broju lažno-negativnih ispitanika, što nije pravilno, jer se koriste različite granične vrednosti (cut-off) za te modele.

Kalibracija je, sa druge strane, mogućnost da se precizno proceni rizik ili da se odredi verovatnoća događaja u budućnosti (18). Za ovu vrstu statističke analize koristi se Hosmer-Lemeshow test (HL test)(8). Hosmer-Lemeshow test sumira kvadrate razlika dobijenih i

očekivanih frekvencija po kolonama i redovima i računa srednji rizik u svakoj kategoriji. Pri tumačenju rezultata ovog testa - manja verovatnoća testa, tj. manja p -vrednost ukazuje na slabiju kalibraciju modela.

Iako se postigne dobra diskriminacija i kalibracija, to još uvek ne znači da je model koristan u donošenju odluke prilikom postavljanja dijagnoze. Može se dogoditi da je model dobro kalibrisan, ali da biomarker ili više biomarkera imaju slabu prediktivnu snagu. U tom slučaju model nije klinički značajan, jer procenjuje rizik negde oko proseka. Za to je potrebno izvršiti pravilnu stratifikaciju rizika, odnosno odrediti njegov kapacitet. Upoređujući različite modele, bolji je onaj model koji veći broj ispitanika smešta u ekstremne kategorije rizika. Ako se dobije veći broj ispitanika za koje se zna da li imaju visok ili nizak rizik, dobija se i jasna slika koji su naredni koraci u lečenju. Savršen model deli ispitaniku populaciju na dve kategorije - sa visokim i sa niskim rizikom, bez takozvane kategorije srednjeg rizika. Na ovaj način je potpuno jasno kako će biti lečeni ispitanici sa visokim, a kako ispitanici sa niskim rizikom za razvoj bolesti ili nekog događaja (19). Statistička metodologija kojom se postiže reklasifikacija ispitanika, a time i pravilna procena rizika u nekoj populaciji, je indeks reklasifikacije mreže (engl. Net Reclassification Index – NRI). Ovaj indeks je jedinstvena mera tabela reklasifikacije. U prvom koraku ispitanici se dele u odnosu na ishod praćenja (npr. preminuli/preživeli). Zatim se određuje proporcija ispitanika koji su promenili kategoriju rizika u odnosu na ishod, tj. da li su reklasifikovani u viši ili niži rizik u obe grupe (sa ishodom i bez ishoda). Na osnovu dobijenih proporcija se računa vrednost NRI (20).

Kako pacijenti sa HBI imaju veliku smrtnost primena multimarker pristupa je dobila na značaju. Osim toga pokazano je da Framingamov skor rizika nema primenu u ovoj populaciji. Danas se intenzivno traga za panelom biomarkera koji najbolje predviđaju nove događaje. Većina sprovedenih studija na ovom polju bila je fokusirana samo na utvrđivanje povezanosti nekog markera i određenog događaja (ishoda). Dosadašnja istraživanja su evaluirala multimarker modele sa ciljem procene incidence HBI (21), zatim u klasifikaciji HBI i proceni rizika za smrtni ishod, zainsuficijenciju srca, kardiovaskularne bolesti i razvoj terminalne bubrežne insuficijencije (22). Kod bolesnika na peritonealnoj dijalizi vršena je dugoročna procena rizika smrtnosti i rizika za razvoj kardiovaskularnog događaja na osnovu markera inflamacije i kalcifikacije (23). Kod bolesnika na dijalizi određivana je vrednost markera inflamacije, endotelne disfunkcije i miokardiopatije primenom ovog pristupa (24). Smatra se da je prednost primene multimarker pristupa u proceni rizika u tome što se panelom biomarkera obuhvata više patofizioloških procesa koji se odvijaju paralelno kod bolesnika na dijalizi. Šematski su prikazani koraci pri realizaciji multimarker pristupa (Slika 2).



Slika 2. Koraci u multimarker pristupu

2.3. Faktori rizika

Hemodijaliza je najčešći oblik aktivnog lečenja terminalne bubrežne insuficijencije u celom svetu. Ona predstavlja tehnološko-tehničku imitaciju rada zdravih bubrega. Savremena tehnologija nije u mogućnosti da u celosti zameni funkcije živog organa. Stoga je dijaliznim postupkom moguće manje ili više zameniti ekskretornu (eliminacija krajnjih produkata metabolizma belančevina, lekova) i delimično regulatornu funkciju bubrega (sastav i zapreminu ekstraćelijske tečnosti), dok se endokrina i metabolička funkcija moduliraju i zamenjuju medikamentima (eritropoetin, supstitucija vitamina D3).

U svetu je prema procenama u 2011. godini bilo skoro 3 miliona bolesnika sa terminalnom bubrežnom insuficijencijom. Preko dva miliona bolesnika lečeno je hemodijalizom, ostatak je lečen peritonealnom dijalizom ili transplantacijom bubrega. Godišnji porast bolesnika koji se dijaliziraju je oko 6-7% (25). Ukupni godišnji troškovi lečenja na dijalizi u Sjedinjenim Američkim Državama u 2009. godini iznosili su oko 40 milijardi dolara. Troškovi lečenja po jednom bolesniku na hemodijalizi godišnje iznose oko 80.000 dolara (26).

Uprkos sofisticiranim tehnikama koje se primenjuju tokom terapije zamene bubrežne funkcije, očekivani životni vek kod ovih bolesnika je neprihvatljivo kratak, a petogodišnje preživljavanje je oko 34%. Većina smrtnih ishoda posledica je kardiovaskularnih događaja. Stopa kardiovaskularne smrtnosti je 10-20 puta veća u ovoj u odnosu na opštu populaciju (27, 28). Lindner (29) je još davne 1974. uvideo da hemodijaliza može biti uspešna jedino ako se kontrolišu etiološki faktori koji dovode do procesa ubrzane ateroskleroze.

“... there is every indication that hemodialysis can support life for an indefinite number of years if the etiologic factors involved in accelerated vascular disease can be properly controlled as a result of future investigation.”

Zaključak rada “ Accelerated Atherosclerosis in Prolonged Maintenance Hemodialysis” [Lindner, et al. 1974] (29).

Buduća istraživanja, kako se Lindner nadao 1974.godine, nisu bila potpuno uspešna. Prognoza kod bolesnika na dijalizi je i dalje loša. Očekivana dužina života na početku dijalize može se uporediti sa očekivanom dužinom života kod nekih kancera (30),jer se profil faktora rizika značajno razlikuje u odnosu na opštu populaciju.

Kardiovaskularne komplikacije su glavni uzrok smrti kod pacijenata sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom. Ove komplikacije su uzrok više od polovine smrtnih ishoda kod pacijenata sa HBI i smatra se da je rizik za razvoj kardiovaskularnih komplikacija skoro 100 puta veći u ovoj u odnosu na opštu populaciju iste starosne dobi (31). Osim toga, povećan kardiovaskularni rizik kod ovih pacijenata se javlja veoma rano u razvoju hronične bubrežne bolesti (kad je klirens kreatinina manji od 75 ml/min) i konstantno raste sa progresijom bolesti (32). Takođe, utvrđeno je da proces ateroskleroze počinje pre nego što ovi bolesnici dostignu terminalnu bubrežnu insuficijenciju. Arterijske lezije kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom insuficijencijom se razlikuju od lezija kod ostalih bolesnika koji imaju formirane aterosklerotske plakove. Tipičan aterosklerotksi plak ima izgled ateromatoznog ili fibroateromatoznog plaka sa prominentnom lipidnom akumulacijom. Nasuprot tome, bolesnici sa terminalnom bubrežnom insuficijencijom imaju kalcifikovan plak. U sastavu ovog plaka dominira fibrozno tkivo i kalcijumski depoziti. Zadebljanje intime i medije zida krvnog suda je mnogo izraženije kod dijaliznih bolesnika(33). Kod ovih bolesnika se često razvija srčana insuficijencija i sklonost ka fatalnim poremećajima ritma. Ova stanja se razvijaju kao posledica povećane sklonosti ka razvoju hipertrofije leve komore zbog hipertenzije i anemije. S druge strane, tkivna kalcifikacija i hipertrofija leve komore dovode do fibroze miokarda, dijastolne disfunkcije i poremećaja sprovodljivosti. Ipak, mali broj bolesnika sa terminalnom bubrežnom insuficijencijom umire od tipičnih posledica ubrzanog procesa ateroskleroze (infarkt miokardaili cerebrovaskularni inzult). Većina ovih bolesnika umire od iznenadne srčane smrti. Prema Američkom registru za bubrežne bolesti iz 2005.godine, 7,2% pacijenata na dijalizi umrlo je od iznenadne srčane smrti ili aritmija, a svega 2,9% od infarkta miokarda. Iako je kardiovaskularni rizik kod ovih pacijenata prepoznat kao jedan od najvećih zadataka u nefrologiji, ovi pacijenti jos uvek nisu dobili pravilan tretman(34).

Mnogi faktori rizika i brojni metabolički poremećaji učestvuju u porastu rizika za razvoj nekog kardiovaskularnog događaja u stanju uremije, koji formiraju komplikovanu slagalicu koju čine brojni delovi različitih patofizioloških procesa (Slika 3). Tri grupe faktora su se izdvojile kao vrlo važne za vaskularna oštećenja u hroničnoj bubrežnoj insuficijenciji (HBI): klasični (Framingham) faktori (hipertenzija, dislipidemija, pušenje i dijabetes); faktori isključivo vezani za HBI (anemija, sekundarni hiperparatireoidizam, direktna izloženost bioinkompatibilnim membranama i kontaminiranim dijaliznim tečnostima) i novootkriveni i promovisani faktori (hiperhomocistinemija, povećana simpatička aktivnost i akumulacija asimetričnog dimetilarginina-ADMA). Ove različite grupe faktora rizika ne deluju u potpuno rigidnim uslovima, već postoji preklapanje u okolnostima u kojima deluju ovi faktori.

Hipertenzija je nezavisni faktor rizika za razvoj ishemijske bolesti srca, a povećanje sistolnog arterijskog krvnog pritiska za 10 mmHg povećava rizik za 20-25% (35). Kod bolesnika koji se leče hemodijalizom hipertenzija nastaje zbog preopterećenja volumenom i povećanja krutosti arterija. Lečenje hipertenzije kod ovih bolesnika treba da uključi određivanje odgovarajuće "suve telesne težine" bolesnika, adekvatno trajanje dijalize, kontrolu unosa soli i vode, kao i primenu blokatora konvertaze angiotenzina I (ACE I) i/ili blokatora za angiotenzin II (ARA), β blokatora (36). Hiperlipidemija je, takođe, nezavisni faktor rizika za razvoj ateroskleroze kod pacijenata na hemodijalizi, a 30-50% dijaliziranih pacijenata ima povišene vrednosti LDL, snižene vrednosti HDL i povišene vrednosti triglicerida (37).

Dijabetes melitus je jedan od najčešćih uzročnika bubrežnog oštećenja. Ova bolest nezavisno povećava rizik od nastanka kardiovaskularnih bolesti. Dijabetes melitus je značajan faktor rizika zaporemećaje funkcije endotela, razvoja ateroskleroze i ishemijske bolesti srca u populaciji bolesnika sa terminalnim stadijumom hronične slabosti bubrega. Kontrola glikemije (glikolizirani hemoglobin – HbA_{1c} <8%) značajno doprinosi smanjenju oštećenja srčanih struktura i poboljšanju funkcije miokarda bolesnika koji se leče hemodijalizom. Nivo HbA_{1c} kod bolesnika sa HBI treba da bude $\leq 7\%$, a kod bolesnika koji boluju od dijabetes melitusa i leče se redovnim hemodijalizama HbA_{1c} $\leq 8\%$ (38, 39).

Anemiju ima više od 90% bolesnika na dijalizi. Ova bolest pokreće nekoliko mehanizama koji povećavaju kardiovaskularni rizik: zbog smanjene oksigenacije povećava se aktivnost simpatikusa, čime se povećava rad miokarda, a zbog smanjene viskoznosti dolazi do povećanog venskog priliva krvi u srce i posledične hipertrofije leve komore. Anemija zajedno sa arterijskom hipertenzijom dovodi do hipertrofije leve komore (40).

Framingamovi faktori (starost, životni stil, hipertrofija leve komore, dislipidemija, hipertenzija i dijabetes melitus) su faktori rizika kod pacijenata sa srednjom, do srednje teškom hroničnom

bubrežnom insuficijencijom (41). Tradicionalni faktori su dominantni kod pacijenata u ranoj fazi bubrežne insuficijencije, jer su obično ovi pacijenti sa dugom istorijom hipertenzije, dijabetesa, dislipidemije i pušenja ili imaju kombinaciju ovih faktora rizika. Međutim, zapaženo je da kod pacijenata sa poremećajem bubrežne funkcije, a posebno kod pacijenata na dijalizi dobro poznati tradicionalni faktori rizika nisu i faktori rizika u ovoj populaciji. Ovo paradoksalno zapažanje je nazvano „inverzna epidemiologija“ (engl. reverse epidemiology) ili „paradoks faktora rizika“(42). Prema ovoj teoriji pacijenti na dijalizi imaju veći rizik za razvoj kardiovaskularnog događaja ili smrtni ishod ako su smanjene vrednosti holesterola, kreatinina, BMI i arterijske tenzije. U svetlu tih saznanja sve veći akcenat se daje proučavanju novootkrivenih faktora rizika.

Novootkriveni faktori rizika kod pacijenata na dijalizi su markeri inflamacije, endotelne disfunkcije, prekomerne aktivacije simpatikusa, oksidativnog stresa, kalcifikacije endotela. Nabrojani faktori rizika imaju veći značaj kod uremijskih pacijenata nego u opštoj populaciji. Kao značajni delovi ove složene slagalice izdvajaju se markeri endotelne disfunkcije, inflamacije i malnutricije.

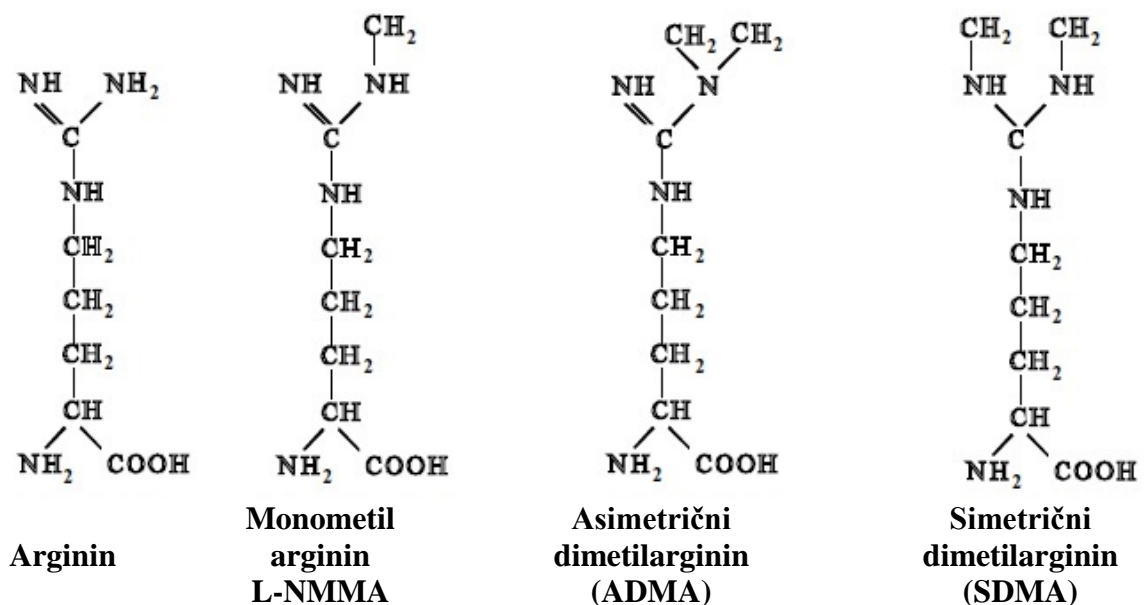
2.4. Asimetrični dimetilarginin (ADMA) kao marker endotelne disfunkcije

Vaskularni endotel je dinamičan ćelijski medijum koji je interponiran između zida i lumena krvnog suda, a njegove osnovne funkcije su održavanje vaskularnog tonusa i protoka krvi, onemogućavanje vaskularne inflamacije i proliferacije glatkomišićnih ćelija, delujući fibrinolitički, antiaterogeno, antiinflamatorno, antikoagulantno i antitrombocitno. Međutim, izmenjeni hemodinamski uslovi, nastali arteriovenskom anastomozom, mehanizmom vaskularnog remodeliranja, doprinose nastanku endotelne disfunkcije koja je, sa povećanim oksidativnim stresom, važan promoter inflamacijskih procesa. Endotelna aktivnost vazodilatatora (azot-oksidi, prostaciklin, bradikinin) značajno se redukuje, a sinteza moćnih vazokonstriktora (endotelin, angiotenzin II, slobodni kiseonični radikali) značajno povećava. Disfunkcija endotela koja se manifestuje pogoršanom endotel-zavisnom vazodilatacijom i povećanom adhezijom trombocita i leukocita, predstavlja centralni događaj u patogenezi rane faze ateroskleroze (43). Smanjena endotelna funkcija je posledica smanjene bioraspodivnosti NO. Pogoršana endotel-zavisna vazodilatacija je zabeležena kod pacijenata sa umerenim stepenom HBI, a takođe i kod pacijenata u terminalnoj fazi HBI i na dijaliznom tretmanu. Kako se endotelna disfunkcija kod pacijenata sa HBI nije mogla objasniti samo redukovanom renalnom funkcijom i prisustvom tradicionalnih faktora rizika, pažnja je usmerena na istraživanje uloge netradicionalnih faktora rizika (asimetričnog dimetilarginina, homocisteina, oksidativnog stresa, inflamacije)(44).

2.4.1. Metabolizam asimetričnog dimetilarginina

2.4.1.1. Sinteza asimetričnog dimetilarginina

Asimetrični dimetilarginin (ADMA) je jedan od najznačajnijih markera endotelne disfunkcije i novootkriveni faktor rizika. Metilacija proteina, kao mehanizam posttranslacione modifikacije proteina otkriven je prvo na reziduama arginina. Familija enzima koja vrši ovu metilaciju nazvana je protein-arginin-metiltransferaze (PRMT). Kao rezultat metilacije L-arginina sintetišu se tri različita derivata ove aminokiseline: asimetrični izomer monometil L-arginina (L-NMMA), asimetrični dimetilarginin (ADMA) i simetrični dimetilarginin (SDMA) (Slika 3). Sva tri derivata arginina su prisutna u cirkulaciji. Kako se L-NMMA nalazi u veoma niskim koncentracijama u cirkulaciji pretpostavlja se da ne deluje na regulaciju sinteze azot-oksida(45).

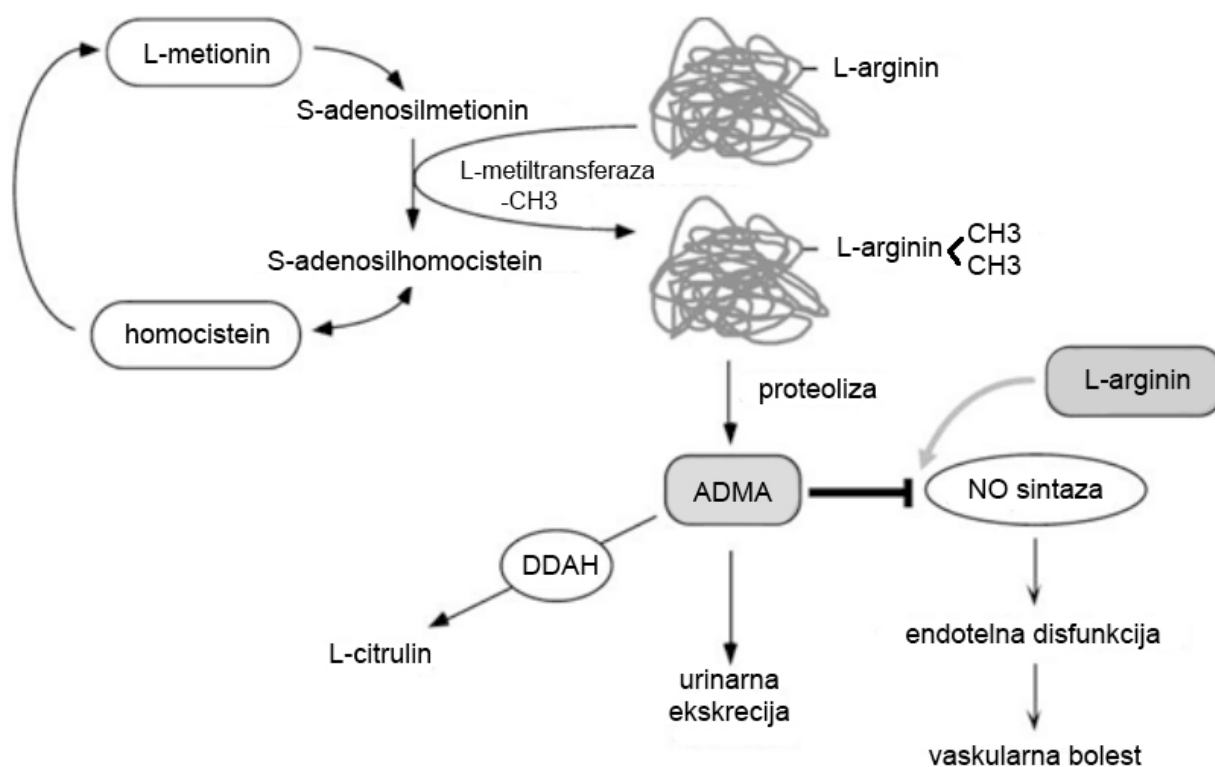


Slika 3. Struktura endogenih metilarginina

Enzim koji sintetiše ADMA je protein-arginin metiltransferaza tip 1 (PRMT1), a enzim koji vrši sintezu SDMA je protein-arginin metiltransferaza tip 2 (PRMT2). U Tabeli 1 su prikazane izoforme ovog enzima i lokalizacija njihovih gena na hromozomima.

Tabela 1. Izoforme PRMT enzima i lokalizacija njihovih gena na hromozomima²

Tip PRMT	Klasa	Hromozom	Metilacija arginina	Lokalizacija
Tip 1	PRMT1	19q13	MMA, ADMA	Jedro
	PRMT3	11q15.1	MMA, ADMA	Citoplazma
	CARM1/PRMT4	12p13,32	MMA, ADMA	Jedro
	PRMT6	1p13.3	MMA, ADMA	Jedro
	PRMT8	12p13.3	MMA, ADMA	Vežan za membranu
Tip 2	PRMT2	21q22.3	nije utvrđeno	Jedro
	PRMT5	14q11.2	MMA, SDMA	Citoplazma
	PRMT7	16q22.1	MMA, SDMA, ADMA	neki Jedro i citosol
	PRMT9/FBOX11	2p21	MMA, SDMA, ADMA	neki Jedro i citosol

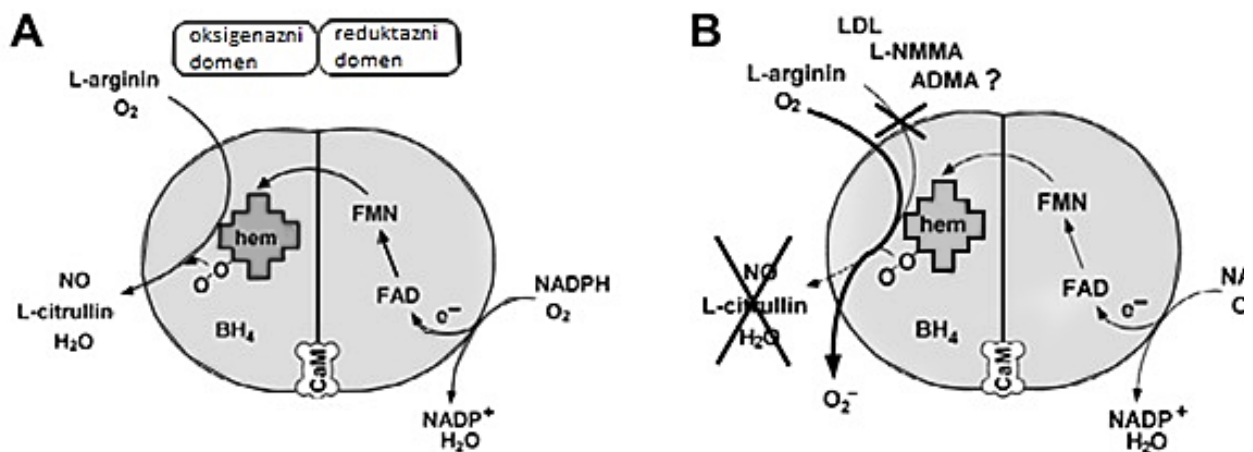
**Slika4.** Sinteza ADMA

Na slici 4 šematski je prikazana sinteza asimetričnog dimetilarginina. Metilacija rezidua arginina u proteinima i polipeptidima vrši se uz pomoć N-metiltransferaze, koja koristi S-adenosilmetionin kao donora metil grupe. Nakon proteolitičke razgradnje proteina, ADMA je oslobođen u citoplazmu. Do sada su sprovedene brojne studije koje su pokazale da postoji povećana serumska koncentracija ADMA usled povećane metilacije argininskih rezidua.

² Tabela preuzeta iz Smith CL (46)

Metilacija argininskih rezidua na proteinima je visoko regulisan proces i metilisani proteini imaju brojne funkcije.

ADMA je inhibitor NO sintaze tako što se kompetitivno vezuje na mesto supstrata, tj. arginina (47). NO sintaza je dimer koji ima svoj oksigenazni i reduktazni domen. U idealnim katalitičkim uslovima (optimalna koncentracija substrata L-arginina i kofaktora, kao što su tetrahydrobiopterin (BH_4), kalmodulin, NADPH, FMN i FAD) dolazi to transfera elektrona sa molekularnog kiseonika preko kaskade kofaktora do arginina pri čemu nastaju NO i citrulin. U suboptimalnim uslovima (npr. relativna deficijencija arginina, prisustvo LDL holesterola ili L-NMMA) ovaj katabolički put je zatvoren. Transfer elektrona je okrenut, te sada molekularni kiseonik postaje primalac elektrona i nastaje superoksidni anjon (O_2^-) (Slika 5). Relativna deficijencija arginina može biti posledica povećane koncentracije ADMA.



Slika5. Struktura i mehanizam aktivacije NOS

Za sada nije poznato da li je sinteza ADMA konstantna ili aktivnost ovih enzima raste sa povećanjem unosa proteina. U trenutku kada se došlo do ovih saznanja još uvek nije bilo poznato da arginin učestvuje u jednom jako značajnom enzimskom putu sinteze azot-oksida. Kasnije je utvrđeno da arginin predstavlja prekursor sinteze azot-oksida, a 1992. godine je otkriveno da je ADMA kompetitivni inhibitor azot-oxid sintaze (48).

2.4.1.2. Razgradnja asimetričnog dimetilarginina

Prisustvo ADMA je utvrđeno u plazmi i urinu. Povećana koncentracija ADMA dokazana je kod bolesnika sa HBI. Prvobitno se smatralo da je glavni put ekskrecije i eliminacije ADMA putem bubrega. Međutim, utvrđeno je da bubrezi imaju dvojaku funkciju. Manji deo, svega 50 μ mol dnevno izlučuju se putem bubrega, a 250 μ mol dnevno razgrađuje se uz pomoć enzima dimetilarginin dimetilhidrolaze (DDAH), koji je eksprimiran u bubrežima. Ovaj enzim, koji je prvi put izolovan iz bubrega pacova, razlaže ADMA do citrulina i dimetilamina (49).

Poznate su dve izoforme ovog enzima: DDAH I, koji se nalazi u tkivima koja ispoljavaju nNOS, ali i u bubrezima i DDAH II, koji se nalazi u tkivima koja ispoljavaju eNOS (u miokardu, placenti i bubrezima). Generalno, ovaj tip enzima je navise zastupljen u vaskularizovanim i tkivima imunog sistema. Gen za sintezu DDAH I se nalazi na hromozomu 1 (1p22), a gen za sintezu DDAH II se nalazi na hromozomu 6 (6p21.3)(50). U bubrezima, distribucija ove dve izoforme enzima je sledeća: kod DDAH I je ispoljena u endotelu i proksimalnim tubulima, dok je kod DDAH II ispoljena u macula densa i distalnim nefronima (51). Primena inhibitora DDAH je pokazala da ovaj enzim ima glavnu ulogu u uklanjanju ADMA. Na smanjenje aktivnosti ovog enzima uticu oxLDL, hiperholesterolemija, citokini, hiperglikemija, infektivni agensi i visoke doze eritropoetina, što dovodi do povećanja koncentracije ADMA i smanjene sinteze NO (52).

2.4.1.3. Metabolizam ADMA kod pacijenata na hemodijalizi

Sinteza ADMA se odvija intracelularno. Njegova koncentracija unutar ćelija nije precizno određena. U poslednje dve decenije sprovedene su brojne studije sa ciljem da se utvrdi u kojim stanjima je koncentracija ADMA povećana. U tabeli 2 su prikazane bolesti i stanja koja su praćena povećanjem ADMA.

Tabela 2. Bolesti i stanja koje su praćene promenjenom koncentracijom ADMA³

Kardiovaskularna bolest	Promene koncentracije ADMA	Referenca
Hronična bubrežna bolest udružena sa hipertenzijom	↑	(48, 53-55)
Infarkt miokarda	↑	(56, 57)
Plućna hipertenzija	↑	(58-60)
Hipertrofija leve komore	↑	(61, 62)
Dijabetes tipa II	↑	(63-65)
Preeklampsija	↑	(66, 67)
Srčana insuficijencija	↑	(68)
Ishemija	↑	(69, 70)
Hiperholesterolemija	↑	(71, 72)
Ateroskleroza	↑	(73, 74)

Intenzivna istraživanja su sprovedena sa ciljem utvrđivanja uloge ADMA kod pacijenata sa različitim stepenom oštećenja bubrega, kod pacijenata na hemodijalizi, peritonealnoj dijalizi ili pacijenata sa urađenom transplantacijom bubreg. Sve studije su pokazale povećane koncentracije ADMA kod pacijenata sa oštećenjem funkcije bubrega. Vrednosti ADMA su varirale i do 10 puta. Ipak, vrednosti ADMA kod pacijenata sa oštećenjem bubrega i zdravih ispitanika su se međusobno preklapale iako su korišćene slične metode za određivanje ovog markera. Takođe je i SDMA/ADMA odnos pokazao značajne varijacije. Varijabilnost uloge hemodijalize u smanjenju ADMA se pokazala značajnom, klirens se kretao od 0-80% (75).

³Tabela preuzeta iz Smith CL, (46)

Nekoliko studija je pokazalo da vrsta dijalize utiče na koncentraciju ADMA. Kielstein i sar. (76) su pokazali da je koncentracija ADMA statistički značajno veća kod pacijenata na hemodijalizi u odnosu na pacijente na peritonealnoj dijalizi. Ova razlika u koncentraciji ADMA u odnosu na metod dijalize je verovatno posledica načina na koji se vrši klirens materija zavisno od primenjivane metode. Studija u kojoj je merena koncentracija ADMA kod 20 pacijenata na hemodijalizi i 19 pacijenata na peritonealnoj dijalizi je pokazala da je koncentracija ADMA nešto viša kod pacijenata na dijalizi, ali da ne postoji statistički značajna razlika (77). Nedavno je pokazano da su peritonealna dijaliza i hemodijafiltracija efikasnije u smanjenju koncentracije ovog markera. Ovi tretmani su efikasniji jer bolje uklanjaju uremijske toksine srednje veličine kojima ADMA pripada. Efikasnije uklanjanje ovog molekula putem dijalize ometa dobro vezivanje ADMA za protein plazme (78).

Efekti hemodijalize na koncentraciju ADMA još uvek nisu jasno definisani. Koncentracija ADMA i SDMA neznatno raste u prvih sat vremena nakon dijalize. Ukoliko se taj porast koncentracije ovih dimetilarginina gleda u odnosu na koncentraciju kreatinina, može se reći da se radi o statistički značajnom povećanju koncentracije neposredno nakon hemodijalize. Osim toga, kroz odnos kreatinina i ADMA i SDMA može se zaključiti da je klirens kreatinina bolji od klirensa ovih materija tokom hemodijalize. Deo porasta koncentracije dimetilarginina verovatno je posledica njihove tkivne redistribucije. Smanjenje koncentracije ADMA se kreće od 20-65% nakon 4-5 sati dijalize (76, 79, 80). Stoga je za određivanje koncentracije ADMA kod pacijenata na dijalizi vrlo važno vreme uzimanja krvi.

Zoccali i sar. (81) su prepostavili da postoje 4 glavna mehanizma koja dovode do povećane koncentracije ADMA kod pacijenata na dijalizi: povećana metilacija i metabolizam proteina, smanjena aktivnost DDAH i oštećena bubrežna ekskrecija. Kasnijim istraživanjima je utvrđeno da koncentracija ADMA ne zavisi od bubrežne funkcije, jer je pokazano da je u početnom stadijumu renalne bolesti, kada je bubrežna funkcija još uvek očuvana, koncentracija ovog dimetilarginina povećana. Kod subtotalne nefrektomije kod pacova pokazano je da dolazi do smanjenja ekspresije proteina za enzime DDAH I i DDAH II, što sugerise da je povećana koncentracija ADMA posledica smanjenje sinteze i aktivnosti DDAH (82, 83). Kod pacova sa subtotalnom nefrektomijom takođe je pokazano da postoji povećana ekspresija proteina PRMT (83), što ukazuje da povećana sinteza ADMA dovodi do povećanja koncentracije ovog dimetilarginina kod pacijenata sa HBI. Iako molekularni mehanizam ushodne i nishodne regulacije PRMT i DDAH još uvek nije potpuno razjašnjen smatra se da oksidativni stres značajno utiče na aktivnost ova dva enzima. Za oksidativni stres smatra se da utiče na sledeći način: (i) oksidisane LDL partikule dovode do povećane ekspresije gena za PRMT1 u kulturi

endotelnih ćelija (84, 85); (ii) u uslovima povećane glikemije u vaskularnim ćelijama dolazi do smanjenja aktivnosti DDAH, što je prevenirano dodavanjem glikol-konjugovane superoksid-dismutaze kao antioksidansa(85); (iii) dobro je poznato da je izražen oksidativni stres prisutan kod pacijenata sa HBI (86, 87). Oksidativni stres u uremiji, kao i uremijski toksini, kao što su homocistein izavršni produkt glikozilacije proteina (AGE), smanjujući aktivnost DDAH dovode do disregulacije ovih enzima (88).

2.4.1.4. Patofiziološki značaj ADMA

Endotelna disfunkcija je multifaktorska bolest i zavisi od prirode vaskularnog oštećenja. Nastaje kao posledica povećane aktivnosti vazokonstiktora i/ili smanjene aktivnosti vazodilatatora. Smanjeni vazodilatatorni odgovor najviše je proučavan sa aspekta poremećaja sinteze azot-oksida. Najčešće promene koje se javljaju u sintezi azot-oksida sistematizovane su u sledeće: 1) smanjeni poluživot azot-oksida (NO), 2) smanjena osetljivost NO, 3) smanjena ekspresija NO sintaze i 4) smanjena aktivnost NO sintaze.

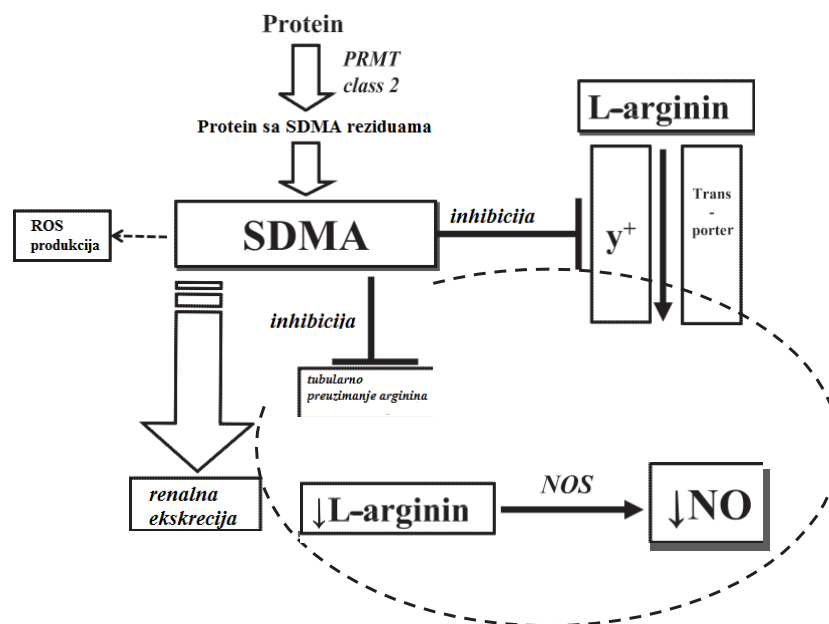
U fiziološkim uslovima endotel krvnih sudova konstantno sintetise NO koji održava cirkulatorni sistem u stanju aktivne vazodilatacije. Protektivna uloga NO u kardiovaskularnom sistemu ogleda se ne samo u održavanju arterijske komplijanse, periferne vaskularne rezistencije, već i u inhibiciji proliferacije vaskularnih mišićnih ćelija, agregacije trombocita i sprečavanju adhezije monocita za endotel krvnih sudova. Ukoliko je smanjena koncentracija NO, dolazi do razvoja ateroskleroze.

Među brojnim faktorima, nagomilavanje asimetričnog dimetilarginina se smatra primarnim za nastanak endotelne disfunkcije, jer je ADMA kompetitivni inhibitor NO sintaze. Prisustvo endotelne disfunkcije je pokazano kod pacijenata sa HBI kada je dobijen neadekvatan vaskularni odgovor na acetilholin kod pacijenata sa HBI koji su imali esencijalnu hipertenziju. Endotelna disfunkcija perzistira u hroničnoj bubrežnoj insuficijenciji. Zbog brojnih studija kod pacijenata sa HBI, koje su pružile uverljive dokaze, ADMA se više smatra uremijskim toksinom nego markerom koji ima značaja sa kardiološkog aspekta u opštoj populaciji (89). Prema najnovijem preglednom članku ADMA i SDMA su uvrštene u grupu malih hidrosolubilnih molekula (<500D) (90).

Obzirom da je oksidativni stres jedan od glavnih razloga smanjenja aktivnosti DDAH, enzima odgovornog za razgradnju ADMA, spekuliše se da je visoka koncentracija ADMA samo intermedijarni mehanizam u kome oksidativni stres dovodi do endotelne disfunkcije (91). Različita stanja kao što su hipertenzija, hiperhomocistinemija, pušenje, dijabetes, anemija i infekcija izazivaju oksidativni stres. U tom smislu ADMA se može posmatrati kao prenosilac efekta različitih agensa na endotelijum.

2.5. Simetrični dimetilarginin (SDMA)

Simetrični dimetilarginin je strukturalni izomer ADMA. SDMA pripada uremijskim toksinima grupa malih hidrosolubilnih molekula (90). Oba derivata arginina nastaju intracelularnom metilacijom argininskih rezidua, nakon čega se ovi derivati oslobađaju u citoplazmu. Sinteza derivata arginina se odvija pod dejstvom različitih enzima. Sinteza SDMA se odvija preko enzima protein-arginin metiltransferaze 5 i 7 (Slika 6). Oba enzima pripadaju metiltransferazama tipa II. Za razliku od ADMA, SDMA se kompletno izlučuje putem bubrega (92). Nedavno je pokazano da postoji veoma dobra korelacija između vrednosti kreatinina, glomerularne filtracije i SDMA (93). Spekulisalo se da SDMA može da se koristi kao kreatinin u proceni bubrežne funkcije, ali se danas smatra da je SDMA više nego jednostavan indikator ove funkcije. Kod životinja kojeseu na ishrani bogatoj mastima i holesterolom pokazano je da dolazi do povećanja koncentracije SDMA bez promene bubrežne funkcije. Ovo nam ukazuje na činjenicu da faktori rizika za kardiovaskularne bolesti imaju neki novi put kojim povećavaju koncentraciju SDMA, bez efekta na bubrežnu funkciju(94).



Slika6. Poreklo i metabolizam SDMA

Koncentracija ovog derivata arginina je povećana kod obolelih od hronične bubrežne insuficijencije. Porast nivoa SDMA kod obolelih od HBI u odnosu na zdravu populaciju je statistički značajno veći u odnosu na porast ADMA (4). Zato se SDMA smatra senzitivnijim markerom redukovane renalne funkcije. SDMA nema direktan uticaj na aktivnost NOS kao ADMA. SDMA utiče na transport arginina, tj. inhibira y^+ transportere koji vrše intracelularno preuzimanje arginina. Osim toga, remeti regularno preuzimanje arginina na nivou Henleove petlje. Na ovaj način vrši se indirektan uticaj na aktivnost NOS, jer smanjuje dostupnost arginina ovom enzimu(95). Koncentracija SDMA je za 80% veća kod obolelih od koronarne

bolesti u odnosu na obolele od bubrežnih bolesti koji nemaju kardiovaskularne bolesti. Jedno od mogućih objašnjenja je smanjenji vaskularni tonus krvnih sudova i povećano snabdevanje krvlju miokarda (96). S druge strane, metaboliizam SDMA je povezan i sa inflamatornim procesom, jer je pokazano da PRMT5 reguliše ekspresiju gena za interleukin 2 i aktivira NF- κ B koji dovodi do produkcije citokina. Takođe je utvrđeno da koncentracija SDMA korelira sa TNF- α i IL-6. Nedavno je dokumentovano da SDMA stumuliše produkciju slobodnih radikala u monocitima preko Ca⁺⁺kanala(97, 98). Smatra se da proinflamatorni efekat i indirektni uticaj na NOS i povezanost sa bubrežnom funkcijom predstavlja potencijalni mehanizam kojim su SDMA i kardiovaskularne bolesti povezane.

2.6. Inflamacija i malnutricija kod pacijenata na hemodijalizi

Pacijente na dijalizi karakteriše hronični inflamatorni proces. Kako se radi o aktiviranoj akutnoj fazi imunog odgovora koji je određen trajanjem, intenzitetom i odsustvom specifičnog stimulusa, kao sinonimi za ovo stanje koriste se “mikroinflamatorno stanje” ili “hronična upala niskog stepena”. Postoje različiti izvori infekcije i inflamacije (Tabela 3). Promenjen imuni odgovor u uremiji kao i poremećena funkcija neutrofila i T limfocita stvara pogodnu sredinu za razvoj infekcije. Pored oštećenog imunog odgovora, imuni sistem je kod pacijenata na dijalizi usled ponovljenih dijaliznih tretmana konstantno stimulisan. Jedan od prvih izvora infekcije i inflamacije je vaskularni pristup (AV fistule, AV graft, privremeni ili stalni kateteri). Drugi potencijalni izvor infekcije jedinstven za pacijente na dijalizi je kontakt cirkulišućih monocita sa bioinkompatibilnom dijaliznom membranom, bakterijskim produktima lipopolisaharidima i bakterijskom DNK koja može biti prisutna u nesterilnom dijalizatu. Interakcija krvi i dijalizatora u toku hemodijalize ima potencijal da aktivira mononuklearne ćelije, što je praćeno produkcijom proinflamatornih citokina. Stepem aktivacije zavisi od materijala koji je upotrebljen u dijalizatoru i smatra se indeksom biokompatibilnosti. Polisaharidna struktura celulozne membrane je, zahvaljujući prisustvu hidroksilnih grupa, slična lipopolisaharidnoj strukturi bakterijskog zida i uzrok je snažne aktivacije komplementa alternativnim putem(44).

Mikrobiološka kontaminacija dijalizne tečnosti je jedan od glavnih stimulatora produkcije inflamatornih medijatora tokom hemodijalize. Rutinska bikarbonatna dijaliza je kontaminirana predominantno gram-negativnim mikroorganizmima. Ove bakterije oslobađaju pirogene supstance kao što su endotoksini, peptidoglikani, egzotoksini i njihovi fragmenti. Ovi molekuli sami ili u kostimulaciji sa aktiviranim komponentama komplementa su najvažniji aktivatori cirkulišućih mononuklearnih ćelija. Zbog široko rasprostranjene kontaminacije i zbog velikih volumena tečnosti koji se koriste kod pacijenata na hemodijalizi, ove citokin-indukujuće supstance su potencijalni izvor perzistentne monocitne aktivacije (99).

Tabela 3. Potencijalni uzroci inflamacije kod pacijenata na hemodijalizi⁴

Uzroci
Interkurentni događaji(101-104)
Infekcije (<i>Chamydia pneumonia</i> , dentalne/gingivalne infekcije)
Hiruške intervencije
Maligniteti
Vaskularne bolesti
Srčana insuficijencija
Artritis
Komorbiditeti(105-107)
Ateroskleroza
Diabetes mellitus II
Gojaznost
Vezani za dijalizu(108, 109)
Bioinkompatibilne membrane
High flux dijaliza
Ponovljenje dijalize
Nesterilna dijalizna tečnost
Vrsta venskog pristupa (centralni venski kateter, AV-fistula ili graft)
Vezani za bubrežnu funkciju
Niska rezidualna funkcija bubrega
Neuspela transplantacija
Ostali
Depresija
Genetsko nasleđe

Sva ova stanja dovode do povećanja koncentracije reaktanata akutne faze kao što su C-reaktivni protein (CRP) i serumski amiloid (SAA), kao i brojnih citokina. Proteini akutne faze su indirektni marker biološke aktivnosti monocita, jer se njihova sinteza i serumska koncentracija menjaju kao odgovor na produkciju proinflamatornih citokina.

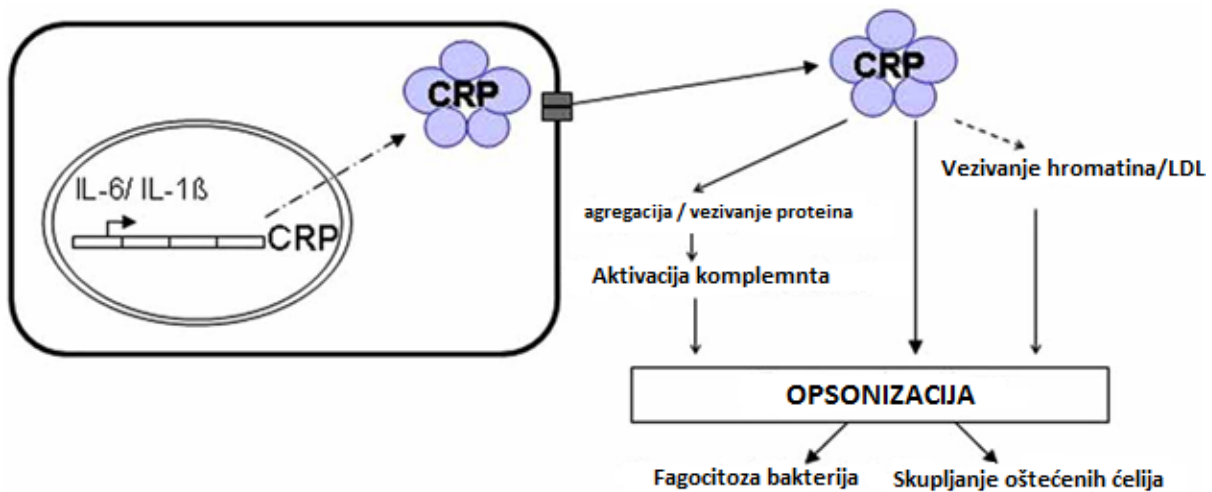
2.6.1. C-reaktivni protein (CRP)

C-reaktivni protein je najčešće korišćen marker u stanjima inflamacije. U epidemiološkim studijama na ispitanicima koji nemaju hroničnu bubrežnu insuficijenciju je pokazano da su vrednosti CRP>3mg/L povezane sa povećanim kardiovaskularnim rizikom.

CRP je neglikozilisani protein koji proizvode hepatociti kao odgovor na infekciju, inflamaciju ili oštećenje tkiva. Po strukturi sastoji se od pet identičnih nekovalentno vezanih subjedinica koje formiraju simetričnu pentagonalnu strukturu molekularne težine 105kDa. Dobio je ime zbog svoje sposobnosti da precipitira somatske C-polisaharide pneumokoka. Prisutan je u veoma niskim koncentracijama u fiziološkim uslovima. Tokom akutnog imunog odgovora tumor nekrosis faktor α (TNF- α) ili interleukin 1 (IL-1) stimulišu ekspresiju interleukina 6 (IL-6), koji povećava ekspresiju gena za CRP u jetri. Nakon toga dolazi do brze sinteze CRP u hepatocitima i oslobađanja CRP iz endoplazmatskog retikuluma. Obim i prisustvo inflamacije

⁴Tabela preuzeta iz Kaysen GA (100)

se može pratiti na osnovu vrednosti CRP. Poluživot ovog markera je kratak, tako da njegove vrednosti dobro prate promene vezane za inflamaciju.



Slika7. Sinteza C-reaktivnog proteina i mehanizam delovanja

Referentne vrednosti ovog markera su $<5\text{mg/dl}$, a vrednosti od $5\text{-}10\text{ mg/dl}$ smatraju se umereno povećanim. Vrednosti preko 10 mg/dl smatraju se značajno povećanim. Najčešće kvantitativne metode za određivanje CRP su: imunonefelometrijska i imunoturbidimetrijska metoda(110, 111).

Oko 35% do 65% hemodijaliznih pacijenata ima povišene vrednosti CRP: distribucija vrednosti CRP kod ovih pacijenata je izrazito zakrivljena, jer postoji izuzetno velika individualna varijabilnost između pacijenata. Osim toga i kod samih pacijenata postoji velika individualna varijabilnost u vrednostima. Neki pacijenti usled akutne infekcije imaju povremeno povišene vrednosti CRP, a kod drugih je usled hronične sistemske bolesti prisutno perzistentno povećanje koncentracije CRP. Većina studija je pokazala da pacijenti na dijalizi imaju često povećane vrednosti CRP i da je koncentracija ovog markera u korelaciji sa težinom bolesti(112). Bikarbonatna hemodijaliza sa polisulfonskom biokompatibilnom membranom uz primenu ultračistog rastvora za hemodijalizu značajno doprinose smanjenju koncentracije CRP.

CRP je dugo smatran samo markerom inflamacije. Ali njegova uloga kao medijatora kardiovaskularnih bolesti postaje značajnija sa saznanjem da je ateroskleroza inflamatorna bolest(113, 114). Pojednostavljeno, proces ateroskleroze počinje sa 1) razvojem endotelne disfunkcije koja je praćena 2) aktiviranjem imunih ćelija, što dovodi do 3) oksidacije lipida i formiranja penaste strukture, 4) proliferacije glatko-mišićnih ćelija i konačnog 5) formiranja fibroznog plaka sa nekrozom i potencijalnom rupturom i trombozom krvnog suda. U cilju utvrđivanja uloge CRP u ovom procesu, istraživanje je pokazalo da je ovaj marker prisutan u većini aterosklerotskih plakova, vezuje se za LDL partikule i pokreće klasični put aktivacije komplemna. Takođe, CRP smanjuje aktivnost enzima endotelne NO sintaze(115).Ovaj

marker je prvi put prepoznat kao faktor rizika za razvoj kardiovaskulrnih bolesti kada je utvrđeno da koncentracija CRP raste nakon infarkta miokarda. CRP je indirektno povezan sa mnogim faktorima rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti, kao što su rezistencija na insulin, oksidativni stres, endotelna disfunkcija i vaskularna kalcifikacija (116).

Inflamacija potencira nastanak ateroskleroze i u interakciji sa mnogim patofiziološkim mehanizmima dovodi do oštećenja krvnih sudova. Inflatatorne ćelije (monociti-makrofagi) *in vitro* uslovima potenciraju aktivnost alkalne fosfataze ćelija sličnihosteoklastima koje se fiziološki nalaze u krvnim sudovima. Na taj način inflamacija može uticati na stvaranje kalcifikacija. U skladu sa ovom hipotezom pokazano je da su kalcifikacije srčanih valvula češće kod bolesnika na dijalizi sa povećanom koncentracijom CRP. Ovo je jako značajno jer kalcifikacije šest puta povećavaju rizik od kardiovaskularne smrti kod pacijenata na peritonealnoj dijalizi (117). Inflamacija deluje preko nekoliko patoaterogenih mehanizama. Interleukin 6, kao glavni inflamatorni molekul, stimuliše sintezu fibrinogena preko specifičnih sekvenci osetljivih na IL-6 u genu fibrinogena, što dovodi do tromboze. Utvrđena je povezanost koncentracije fibrinogena i svih uzroka smrti i incidentalnih kardiovaskularnih događaja (hipertrofija leve komeore, ukupne smrtnosti i kardiovaskularne smrtnosti) kod pacijenata na hemodijalizi (118). U stanjima hipervolemije je povećana sinteza fibrinogena što se uočava kod pacijenata koji su dugo na dijalizi i nemaju rezidualnu diurezu (119).

2.6.2. Serumski amiloid A (SAA)

Serumski amiloid A je familija homolognih proteina koju čine SAA1 i SAA 2, kao glavni reaktanti akutne faze i SAA4, koji je konstitutivna forma iskprimirana u humanoj populaciji. Molekulska težina SAA je 11,4-12,5kDA i ovaj protein ima od 104 do 112 aminokiselina. U humanoj populaciji i kod miševa nivo SAA1 i SAA2 u plazmi se povećava nekoliko stotina puta kao odgovor na akutni inflamatorni stimulus. Veći deo SAA u plazmi je povezan sa lipoproteinima, pre svega sa HDL, ali i sa VLDL.

SAA koji je povezan sa HDL premešta apo A-I i ponaša se kao signal koji usmerava HDL iz jetre u makrofage kako bi se koristio u reparaciji oštećenog tkiva. Serumski amiloid premeštanjem apo A-I može konvertovati HDL u nefunkcionalnu ili proinflamatornu partikulu, tako da povećana koncentracija ovog molekula može biti značajan faktor u ubrzanom procesu ateroskleroze kod pacijenata na dijalizi (120). Interleukin-1, interleukin-6 i TNF- α stimulišu sintezu SAA u hepatocitima. SAA se koristi u dijagnozi i praćenju različitih bolesti, kao što su infarkt miokarda, bakterijske i virusne infekcije, artritis i maligne bolesti.

SAA i CRP pripadaju grupi 3 proteina akutne faze, što znači da se njihova koncentracija dramatično povećava kao odgovor na akutnu inflamaciju. U brojnim studijama je pokazano da

koncentracija ova dva markera paralelno raste, mada se SAA smatra senzitivnijim markerom (121). U nefrološkim studijama mnogo manje je ispitivan SAA kao marker inflamacije u odnosu na CRP, verovatno usled slabijeg korišćenja metoda kojima se ovaj marker meri. Nedavno je objavljena studija koja je upoređivala ova dva markera kao prediktore smrtnosti kod pacijenata na hemodijalizi i pokazala da je SAA bolji marker od CRP (122). Pacijenti sa povećanom koncentracijom SAA imaju povećanu koncentraciju fibrinogena, što delimično objašnjava hipotezu da uslovi inflamacije delom utiču i na koncentraciju fibrinogena kod pacijenata na hemodijalizi (123). Još uvek nije potpuno jasno šta aktivira akutni imuni odgovor. Pretpostavlja se da su to endotoksini poreklom iz dijalizne tečnosti, venski graft ili bioinkompatibilnost dijaliznih membrana.

2.6.3. Albumin

Albumin je protein, negativni reaktant akutne faze. Albumin je negativno naelektrisan hidrosolubilni molekul koji se sintetise u jetri. Njegova osnovna funkcija je održavanje osmotskog pritiska i transport velikog broja cirkulišućih molekula. Koncentracija albumina zavisi od sinteze i sekrecije u jetri, od nivoa razmene između intra- i ekstravaskularnog prostora, promene u volumenu tečnosti, degradacije proteina i gubitka telesne težine. Dugo godina je smatran jednim od osnovnih indikatora malnutricije kod pacijenata na dijalizi. Radi se o markeru koji se najviše koristi u kliničkoj praksi u proceni nutritivnog statusa. Malnutricija kod bolesnika na dijalizi predstavlja jedan od vrlo važnih faktora rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti. Malnutricija je definisana kao nepravilna ishrana usled nedovoljnog unosa ili neuravnoteženog unosa hranljivih materija ili lošeg varenja i iskorišćavanja hranljivih materija. Osnovni indikatori malnutricije su smanjena koncentracija albumina, prealbumina, retinol vezujućeg proteina i gubitak mišićne mase.

Na osnovu bliske povezanosti malnutricije i inflamacije, postavljena je hipoteza da kod bolesnika na hemodijalizi postoje najmanje dva tipa malnutricije. Prvi tip je udružen sa uremičnim sindromom ili faktorima koji su povezani sa uremijom (fizička neaktivnost, subdijaliziranost, restriktivna dijeta i psihosocijalni faktori). Karakteriše ga umerena redukcija nivoa serumskih albumina izazvana smanjenim proteinskim i energetske unosom usled uremijske toksičnosti. Drugi tip malnutricije je udružen sa inflamatornim odgovorom (koji se dokazuje povišenim nivoima CRP i proinflamatornih citokina), a često i sa pridruženim bolestima, kao što je hronična srčana insuficijencija. Karakteriše ga izražena hipoalbuminemija usled povećane potrošnje energije u mirovanju, značajno povećanog oksidativnog stresa i povećanog katabolizma proteina. Većina pacijenata na dijalizi ima kombinovani tip malnutricije, koji je rezultat preklapanja ova dva tipa (124).

Smanjeni proteinski ili energetska unos smanjuje sintezu i tako na direktan način utiče na serumski nivo albumina. Mada je nutritivni status važan regulator sinteze albumina, treba imati na umu da i drugi faktori mogu uticati na sintezu albumina, naročito kod pacijenata na dijalizi. Kao važni nenutritivni faktori navode se inflamacija, akutni i hronični stres, anemija i starost. Koncentracija albumina je povezana sa stepenom inflamacije, odnosno sa vrednostima CRP(125) i sa nivoom proinflamatornih citokina (126). Sinteza ovog proteina se smanjuje u inflamaciji potpuno nezavisno od proteinskog i kalorijskog unosa. IL-6inhibira sekreciju albumina u kulturi hepatocita. Inflamacija dovodi i do transfera albumina iz vaskularnog u ekstravaskularni prostor.

Hipoalbuminemija se smatra nezavisnim prediktorim nepovoljnog ishoda kod pacijenata na dijalizi. Kako je albumin jedan od glavnih antioksidanasa u plazmi, nizak nivo albumina u serumu povezan sa ostalim parametrima malnutricije ili inflamacije ubrzava aterogenezu preko povećanog oksidativnog stresa (127). Ipak, rezultati jedne studije su pokazali da su markeri inflamacije (IL-6, hsCRP) bolji markeri malnutricije u odnosu na albumin (128). Jedno od mogućih objašnjenja je i dug poluživot albumina od 21 dana, što čini ovaj marker manje senzitivnim na akutne promene unosa proteina i kalorija. Pretpostavlja se da albumin dobija na značaju u proceni kliničkog stanja u kombinaciji sa nekim komorbiditetima. Bez obzira na svoje nedostatke i oprečna mišljenja o njegovom značaju u kliničkoj praksi, albumin se i dalje smatranaboljim prediktorom smrtnosti među markerima malnutricije, inflamacije i ateroskleroze (tzv. MIA sindrom)(129).

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE

3.1. Ciljevi istraživanja

Bolesnike na hemodijalizi karakteriše visoka ukupna i kardiovaskularna smrtnost. Kao dominantni patofiziološki mehanizmi koji se javljaju kod ovih bolesnika se izdvajaju endotelna disfunkcija, inflamacija i malnutricija. Pravilan izbor markera za procenu rizika kod ovih pacijenata predstavlja veliki izazov. Dosadašnja istraživanja su pokazala da su postojeći markeri nezavisni prediktori smrtnosti kod bolesnika na hemodijalizi, ali još uvek nisu upoređivane njihove prediktivne vrednosti i aditivno dejstvo u odnosu na tradicionalne faktore rizika.

Ciljevi ovog istraživanja su sledeći:

- Uporediti koncentracije ADMA, SDMA, CRP, serumskog amiloida i albumina kod pacijenata na dijalizi i zdrave populacije.
- Pratiti smrtnost i uzroke smrtnosti kod ispitanika u trogodišnjem periodu.
- Uporediti individualne prediktivne vrednosti ADMA, SDMA, CRP, serumskog amiloida i albumina kod pacijenata na dijalizi.
- Proceniti zajedničku prediktivnu vrednost svih markera u odnosu na prediktivnu vrednost tradicionalnih faktora rizika.
- Na osnovu seta statističkih testova utvrditi kombinaciju markera kojom se postiže najbolja procena rizika kod pacijenata na dijalizi.
- Upotrebom različitih statističkih modela redefinisati stepen rizika u odnosu na fatalni ishod.

3.2. Hipoteze istraživanja

- Bolesnici na hemodijalizi imaju povećane koncentracije ADMA, SDMA, CRP, SAA i smanjenju koncentraciju albumina.
- Bolesnike na hemodijalizi karakteriše visoka smrtnost.
- Glavni uzrok smrtnosti kod bolesnika na hemodijalizi su kardiovaskularne bolesti.
- ADMA, CRP, SAA i albumin su nezavisni prediktori ukupne i kardiovaskularne smrtnosti.
- SDMA nije prediktor smrtnosti kod bolesnika na hemodijalizi.
- ADMA ima najveću prediktivnu vrednost među ispitivanim markerima.
- Kombinacijom sva četiri markera dobija se najveća prediktivna vrednost.

4. ISPITANICII METODE ISTRAŽIVANJA

4.1. Ispitanici

Istraživanje je obavljeno na Klinici za nefrologiju Kliničkog centra u Nišu, Centru za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta u Nišu i Centru za medicinsku biohemiju Kliničkog centra u Nišu. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Nišu (broj 01-890-5). Studija je dizajnirana kao prospektivna studija preživljavanja. U studiju su uključena 153 stabilna bolesnika starija od 18 godina sa terminalnom bubrežnom insuficijencijom, koji se leče ponovljenim hemodijalizama na Klinici za nefrologiju u Nišu i 30 zdravih ispitanika, koji čine kontrolnu grupu. Isključujući kriterijumi su bili pacijenti sa karcinomom i dužinom dijalize kraćom od šest meseci. U kontrolnu grupu su uključeni zdravi ispitanici oba pola I istih godina kao ispitivani bolesnici na hemodijalizi.

Svi ispitanici su bili na programu bikarbonatne hemodijalize tri puta nedeljno, na aparatima sa kontrolisanom ultrafiltracijom Fresenius 4008S i 5008S. Minimalni K_t/V , kao merilo adekvatnosti hemodijalize kod ispitivanih bolesnika je bio iznad 1,2 - što odgovara standardima dijalize.

Korišćeni su polisulfonski *high* i *low-flux* dijalizatori različitih površina. Rastvor za dijalizu je bio standardan: Na^+ 138mmol/L, Ca^{++} 1,50mmol/L, Cl^- 109,5mmol/L, K^+ 2mmol/L, Mg^{++} 1mmol/L, CH_3COO^- 6mmol/L i glukoza 5,5mmol/L. Protok dijalizata je bio konstantno 500ml/min, a protok krvi 250-350 ml/min. Voda korišćena za pripremu dijalizne tečnosti prethodno je bila tretirana omekšavanjem Stilmasovim aparatom. Krvni pristupi su bili arteriovenska fistula kod 98% ispitanika i vaskularna proteza – graft (Goretex) kod 2% ispitanika. Adekvatnost dijalize je procenjivana na osnovu K_t/V_{sp} indeksa izračunatog prema sledećoj formuli:

$$\frac{K_t}{V_{sp}} = -\ln\left(\frac{C_2}{C_1} - 0,008 * T\right) + \left(4 - 3,5 * \frac{C_2}{C_1}\right) * \frac{UF}{W}$$

gde je:

C_1 – predijalizna vrednost uree [mmol/L],

C_2 – postdijalizna vrednost uree [mmol/L],

T – trajanje hemodijalize [h],

UF – interdijalizni prinos [L],

W – telesna masa nakon hemodijalize [kg].

Prema K/DPQI uputstvima, hemodijaliza je adekvatna ako je $K_t/V_{sp} \geq 1,2$ (izračunat po Daugridas formuli druge generacije).

Krvni pritisak je meren živinim manometrom čija je manžetna pokrivala 2/3 dužine nadlaktice i obuhvatala najmanje 80% njenog obima. Merenje je vršeno tri puta na obe ruke u sedećem, ležećem i stojećem položaju, sa pauzom od jednog minuta, a zatim je izračunavana srednja vrednost.

Antropometrijskim merenjem je određena telesna težina i telesna visina, a zatim je izračunat indeks telesne mase (engl. body mass index - BMI), kao količnik telesne težine (kg) i kvadrata telesne visine (m).

Ispitivanje je obuhvatilo sledeće parametre: polnu i starosnu strukturu, dužinu dijaliziranja, antropometrijske mere (telesna težina i telesna visina) i biohemijske analize.

4.2. Metode

Osnovni opšti podaci o ispitanicima su prikupljeni na osnovu anamneze. Rutinske laboratorijske analize su sprovedene u laboratoriji Klinike za nefrologiju Kliničkog Centra Niš. C-reaktivni protein i serumski amiloid su određivani u Centru za medicinsku biohemiju Kliničkog Centra Niš. Koncentracija ADMA i SDMA je određena u Centru za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta u Nišu.

4.2.1. Hematološko-biohemijska ispitivanja

Kod bolesnika na hemodijalizi uzorci krvi za laboratorijske analize su uzimani sredinom nedelje pre započinjanja dijalize i pre davanja heparina. U okviru hematoloških analiza svim ispitanicima je određivan broj leukocita, eritrocita, trombocita, koncentracija hemoglobina (hematološki analajzer Nihon Kodan).

Biohemijski paramteri koji su bili određivani u ovom istraživanju su: urea, kreatinin, ukupni proteini, albumini, gvožđe, TIBS, UIBS, saturacija transferina, ukupni holesterol, HDL, LDL, trigliceridi, glukoza na analajzeru Bio Systems A25 – rutinskim biohemijskim testovima.

4.2.1.1. Određivanje koncentracije CRP

CRP je određivan imunoturbidimetrijskim testom, gde CRP reaguje specifično sa antihumanim CRP-antitelima obeleženim lateks partikulama pri čemu nastaju nerastvoreni precipitati. Nastala apsorbancija od ovih precipitata proporcionalna je koncentraciji CRP u uzorku. Koncentracija CRP je određivana na Olimpusu AU400 (Beckman Coulter) i izražava se u mg/L. Referentne vrednosti su u granicama 0-5 mg/L.

4.2.1.2. Određivanje koncentracije serumskog amiloida

Serumski amiloid je određivan imunonefelometrijskom metodom gde su polistirenske partikule obeležene antitelima na SAA odreagovale sa proteinima i dale određenu apsorbancu koja je proporcionalna koncentraciji uzorka. Određivanje koncentracije SAA je vršeno na nefelometru BN II (Dade Behring) i koncentracija je izražena u mg/L. Referentne vrednosti su u granicama 0-6,8mg/L.

4.2.1.3. Određivanje koncentracije ADMA i SDMA

Asimetrični dimetilarginin i simetrični dimetilarginin su određivani hromatografski po metodi Paroni i sar. (130) uz izvesne modifikacije. Interni standard (monometilarginin, 50 μ L, 10 μ M) se dodaje uzorku plazme (0,2mL) koji se zatim podvrgava "solid phase" ekstrakciji koristeći katjono-izmenjivačke kolone(SPE cartridge, Supelco Discovery® DSC-MCAX, 100 mg/mL). Kolone se najpre aktiviraju metanolom (1 mL) i 2% trihlor-sirćetnom kiselinom (TCA, 2 mL). Nakon ispiranja (TCA 2%, 150mmol/L fosfatni pufer pH 8.0, metanol), aminokiseline su eluirane sa 1,2 mL 2% rastvora trietilamina (TEA) u metanolu i vodi (70:30, v:v). Eluat se uparava do suvog gasnim azotom, a suvi ostatak se zatim rastvara u 0,4 mL pufera (mobilna faza A) i na kraju se vrši derivatizacija *orto*-ftaldialdehidom (OPA) pre nego što je 20 μ L injektovano u tečni hromatograf.

Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC - High Performance Liquid Chromatography) je vršena na instrumentu "Agilent 1200 Series" koji je opremljen autosemplerom, binarnom pumpom i fluorescentnim detektorom. Hromatografsko odvajanje je postignuto uz upotrebu kolone Zorbax SB-C18 (150 x 4,6 mm, 3,5 μ m) i odgovarajućeg gradijenta dve mobilne faze: A – (fosfatni pufer, 40mmol/L, pH 6,2) i B - (acetonitril:methanol (50:50, v:v). Odvajanje metilarginina je postignuto gradijentom dve mobilne faze A i B pri protoku od 1,5mL/min. Analiza je počela pri gradijentu od 15% faze B, u narednih 10 min gradijent je porastao na 25% mobilne faze B. Zatim je rastao linearno do 80% tokom 3 minuta održavajući taj nivo naredna 3 minuta, nakon čega je vraćen na početni nivo, što ujedno predstavlja i kraj separacije. Sa vremenom uravnotežavanja od 2 minuta, ceo postupak traje 20 minuta. Retenciono vreme metalarginina bilo je: za interni standard 8,20 minuta, ADMA 9,25 minuta i SDMA 9,63 minuta.

4.3. Statistička obrada podataka

Dobijeni podaci su unešeni u bazu podataka, sređeni tabelarno i prikazani grafički. U sklopu deskriptivne statistike podaci su predstavljeni u vidu aritmetičke sredine i standardne devijacije, medijane i interkvartilne razlike, ili u vidu apsolutnih ili relativnih brojeva.

Testiranje normalnosti podataka je vrešeno Kolmogorov-Smirnov testom. Za upoređivanje dve grupe podataka, ukoliko je zadovoljena normalna distribucija korišćen je t-test, ukoliko distribucija podataka nije normalna korišćen je Mann-Whitney-jev U test. Za poređenje tri ili više grupa podataka, ukoliko je zadovoljena normalna distribucija korišćena je ANOVA, a kao post hoc analiza korišćen je Tukey-ev test. Ukoliko nije zadovoljena normalna distribucija pri poređenju tri i više grupa podataka korišćen je Kruskal-Wallis-ov test, u tom slučaju kao post hoc analiza korišćen je Mann-Whitney-jev U test. Radi utvrđivanja međupovezanosti između ispitivanih varijabli određivan je Pirsonov koeficijent proste linearne korelacije, odnosno Spirmanov koeficijent rang korelacije u zavisnosti od distribucije podataka.

Analiza preživljavanja (engl. survival analysis) je analiza određenog događaja (npr. smrti) tokom vremena uz evidenciju trenutka kada je došlo do određenog događaja, a da je pri tome dobro definisano početno vreme praćenja. Da bi se analiza preživljavanja mogla primeniti, podaci moraju sadržati vreme nekog događaja koji se prati. Svrha analize preživljavanja sastoji se u mogućnosti predviđanja, tj. uspostavljanja prediktivnog modela u kojem rizik posmatranog događaja zavisi od ispitivanih varijabli. Za ovu vrstu analiza je potrebno da se evidentira tačan datum kada su pojedinci ušli u studiju i tačan datum kada je došlo do određenog događaja. Za preminule ispitanike pored tačnog datuma smrti zabeležen je i tačan uzrok smrti na osnovu Desete (X) Međunarodne klasifikacije bolesti, povreda i uzroka smrti(131). Na osnovu uzroka smrti definisano je koji su ispitanici umrli od kardiovaskularnih bolesti.

U analizi preživljavanja primenjivane su životne tablice kako bi se izračunalo trogodišnje preživljavanje kako u odnosu na opštu smrtnost, tako i u odnosu na kardiovaskularnu smrtnost. Nakon toga je formirana Kaplan-Mejerova kriva preživljavanja u odnosu na ispitivane varijable. Log rank testom je upoređivano prosečno preživljavanje u odnosu na ispitivane parametre. Cox-ova regresiona analiza je korišćena radi određivanja rizik količnika (engl. Hazard Ratio – HR) za svaki od ispitivanih biohemijskih parametara. Zatim su ispitanici na osnovu povišenih vrednosti koncentracije ADMA, CRP, SAA i smanjene koncentracije albumina podeljeni u grupe sa jednim, dva, i tri i više faktora rizika. Grupa sa tri i četiri faktora rizika je spojena u jednu – tri i više zbog malog broja događaja. Na osnovu ove podele određivano je prosečno preživljavanje i rizik količnik.

Radi procene kalibracije modela korišćen je Hosmer-Lemeshow test. Radi procene diskriminacije modela korišćena je ROC analiza. Za konstruisanje ROC krive za više varijabli logističkom regresionom analizom je formirana jedinstvena varijabla na osnovu verovatnoća više pojedinačnih varijabli. Statistička obrada podataka koja obuhvata metode deskriptivne

statistike, Kaplan-Mejerove krive, Koksovu regresionu analizu i ROC analizu je sprovedena u programskom paketu SPSS 16.0 (SPSS Inc, Chicago Il, USA). Za tabele reklasifikacije napisan je programski kod u programskom paketu R. U okviru ovog programskog paketa korišćen je paket za tabele reklasifikacije PredictABEL (132). Statistička značajnost je utvrđena za p vrednost manju od 0,05.

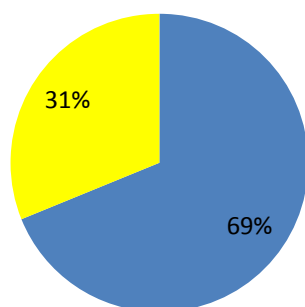
5. REZULTATI

5.1. Demografske karakteristike ispitanika

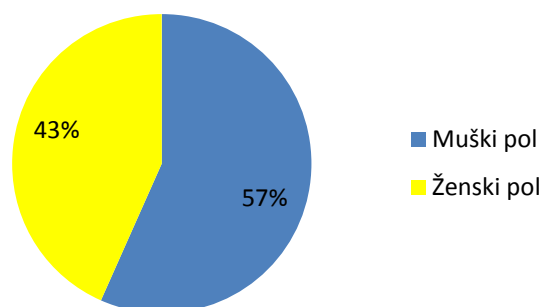
Istraživanje je obuhvatilo 153 pacijenta na dijalizi i 30 zdravih ispitanika koji su formirali kontrolnu grupu. Prosečna starost svih ispitanika bila je $58,43 \pm 11,13$ godina. Pacijenti na dijalizi bili su prosečne starosti $58,08 \pm 11,64$ godina, a zdravi ispitanici $59,71 \pm 9,19$ godina. Nije bilo statistički značajne razlike u starosti između pacijenata na dijalizi i kontrolne grupe ($t=0,681$, $p=0,500$).

Struktura ispitanika prema polu bila je sledeća: u grupi pacijenata na dijalizi bilo je 106 ispitanika muškog pola (68,8%) i 48 ispitanika ženskog pola (31,2%)(Grafikon 1). Postoji statistički značajna razlika u distribuciji ispitanika prema polu u grupi pacijenata na dijalizi ($\chi^2=10,92$, $p<0,001$). U kontrolnoj grupi bilo je 17 ispitanika muškog pola (56,7%) i 13 ispitanika ženskog pola (43,3%). Nije bilo statistički značajne razlike u kontrolnoj grupi u strukturi ispitanika prema polu ($\chi^2=0,360$, $p=0,549$). Upoređujući strukturu ispitanika prema polu u obe grupe utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika ($\chi^2=1,17$, $p=0,279$) (grafikon1).

Pacijenti na dijalizi

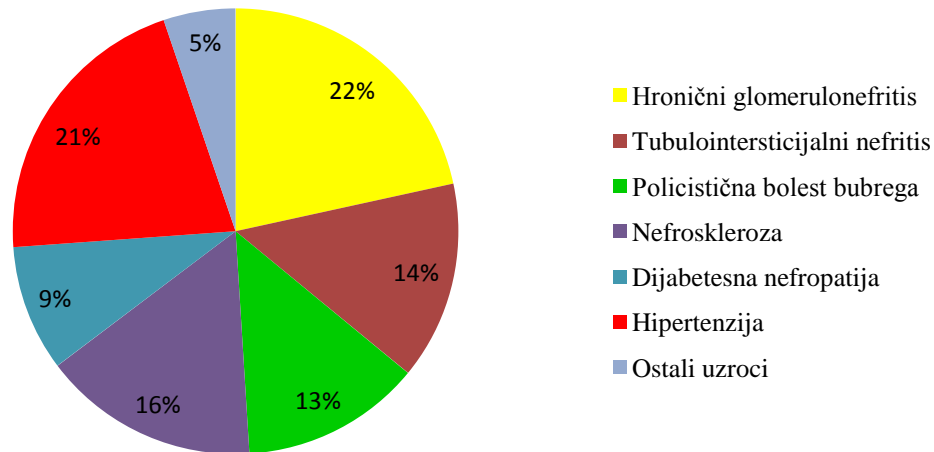


Kontrolna grupa



Grafikon 1. Struktura ispitanika prema polu

Uzroci nastanka hronične bubrežne insuficijencije bili su sledeći: hronični glomerulonefritis kod 33 ispitanika (21,6%), tubulointersticijalni nefritis kod 22 ispitanika (14,4%), policistična bolest bubrega kod 20 ispitanika (13,1%), nefroskleroza kod 24 ispitanika (15,7%), dijabetesna nefropatija kod 14 ispitanika (9,2%), hipertenzija kod 32 ispitanika (20,9%) i ostali uzroci kod 8 ispitanika (5,2%) (Grafikon 2). Od hepatitisa B obolelo je 18 pacijenata (11,7%), a od hepatitisa C obolelo je 84 pacijenata (54,5%).



Grafikon 2. Osnovna bolest kod ispitivanih pacijenata na dijalizi

5.2. Rezultati pacijenata na dijalizi u odnosu na kontrolnu grupu

Tabela 4. Osnovni klinički i biohemijski parametri kod pacijenata na dijalizi i u kontrolnoj grupi

	Pacijenti na dijalizi n=154	Kontrolna grupa n=30	p
Starost	58,08±11,64	57,19±9,71	0,278
Pol (muški/ženski)	106/48	17/13	0,279
Pušenje	30 (19,5%)	6 (20,0%)	0,852
Dijabetes mellitus	23 (14,9%)	4 (13,3%)	0,540
Hipertenzija	91 (59,1%)	12 (40,0%)	0,084
Urea(mmol/L)	32,75±26,23	5,14±0,80	<0,001
Kreatinin (µmol/L)	911,76±226,55	69,79±15,26	<0,001
Holesterol (mmol/L)	3,72±0,88	5,53±0,71	0,001
Trigliceridi (mmol/L)	2,34±1,51	1,87±0,87	0,101
BMI	24,62±3,41	23,49±3,92	0,105
Glukoza (mmol/L)	6,08±2,32	5,37±0,98	0,571
Proteini(g/l)	66,81±10,41	69,22±0,5	0,207
Broj leukocita	7,22±3,23	7,80±2,78	0,391
Broj eritrocita	4,03±4,34	4,66±0,43	0,220
Broj trombocita	178,05±60,82	235,40±62,57	<0,001
Hemoglobin (g/dl)	111,70±16,23	142,32±16,46	<0,001
Hematokrit	33,76±5,175	42,44±3,23	<0,001
Fe(µmol/L)	16,02±18,80	14,52±2,35	0,521
TIBC (µmol/L)	52,72±11,47	52,05±10,99	0,868
UIBC (µmol/L)	38,98±10,44	38,21±12,01	0,859

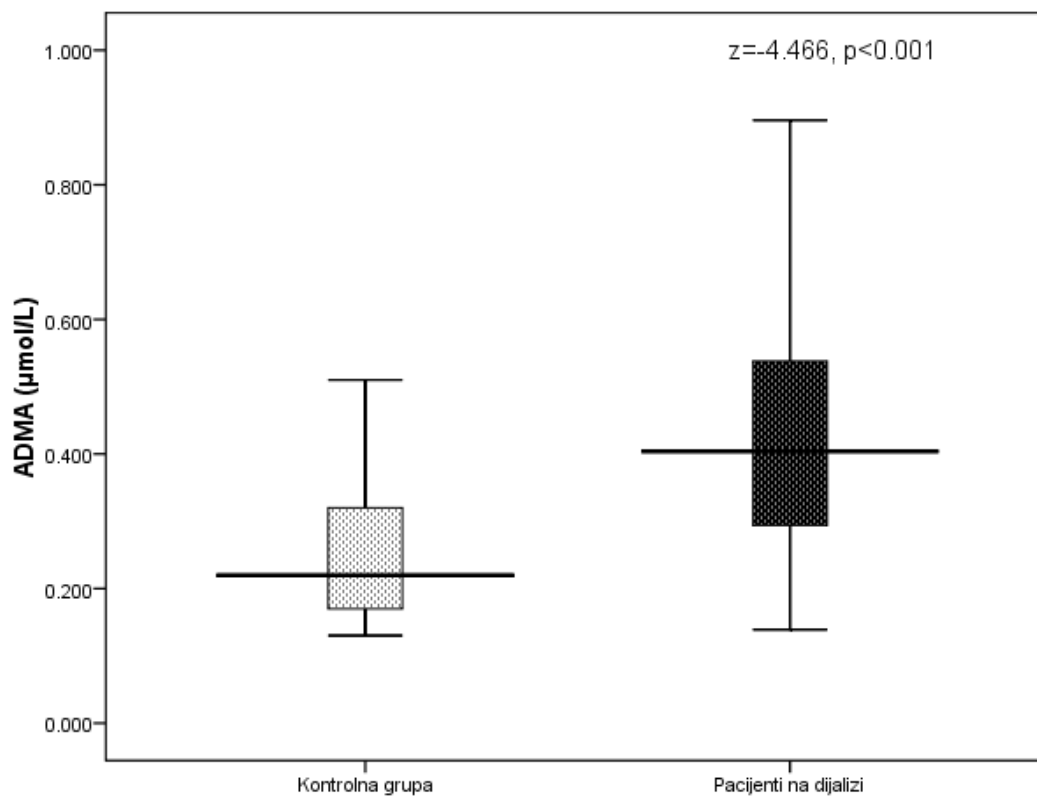
U tabeli 4 su prikazane vrednosti ispitivanih parametara kod pacijenata na dijalizi i u kontrolnoj grupi. Pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika u starosti između ispitivanih grupa ($p=0,278$). Takođe, ne postoji statistički značajna razlika u polu u ispitivanim grupama ($p=0,279$).

Upoređujući tradicionalne faktore rizika kod pacijenata na dijalizi i kod zdravih ispitanika dobijeni su sledeći rezultati. Nije bilo statistički značajne razlike u procentu pušača u ispitivanim grupama (19,6% vs 20,0%, $p=0,949$). Dijabetes je bio prisutan kod 15,1% pacijenata na dijalizi i kod 13,3% ispitanika u kontrolnoj grupi. Nije bilo statistički značajne razlike u prisustvu dijabetesa u ispitivanim grupama ($p=0,582$). Hipertenzija je procentualno bila zastupljenija kod pacijenata na dijalizi (59,5%) u odnosu na zdrave ispitanike (40,0%), ali nije bilo statistički značajne razlike u distribuciji hipertenzije u ispitivanim grupama ($p=0,077$). Urea je bila statistički značajno veća kod pacijenata na dijalizi u odnosu na kontrolnu grupu ($z=-7,019$, $p<0,001$). Kreatinin je bio statistički značajno veći kod pacijenata na dijalizi u odnosu na vrednosti kod ispitanika kontrolne grupe ($z=-7,297$, $p<0,001$). Koncentracija holesterola kod pacijenata na dijalizi je bila statistički značajno manja u odnosu na kontrolnu grupu ($t=7,680$, $p<0,001$). Koncentracija triglicerida je bila veća kod pacijenata na dijalizi, ali nije bilo statistički značajne razlike ($p=0,101$). Prosečan BMI je bio veći kod pacijenata na dijalizi u odnosu na zdrave ispitanike, ali nije bilo statistički značajne razlike ($p=0,105$). Koncentracija glukoze je bila veća kod pacijenata na dijalizi, ali nije bilo statistički značajne razlike ($p=0,571$). Ukupni proteini su bili veći kod zdravih ispitanika, ali nije bilo statistički značajne razlike ($p=0,207$).

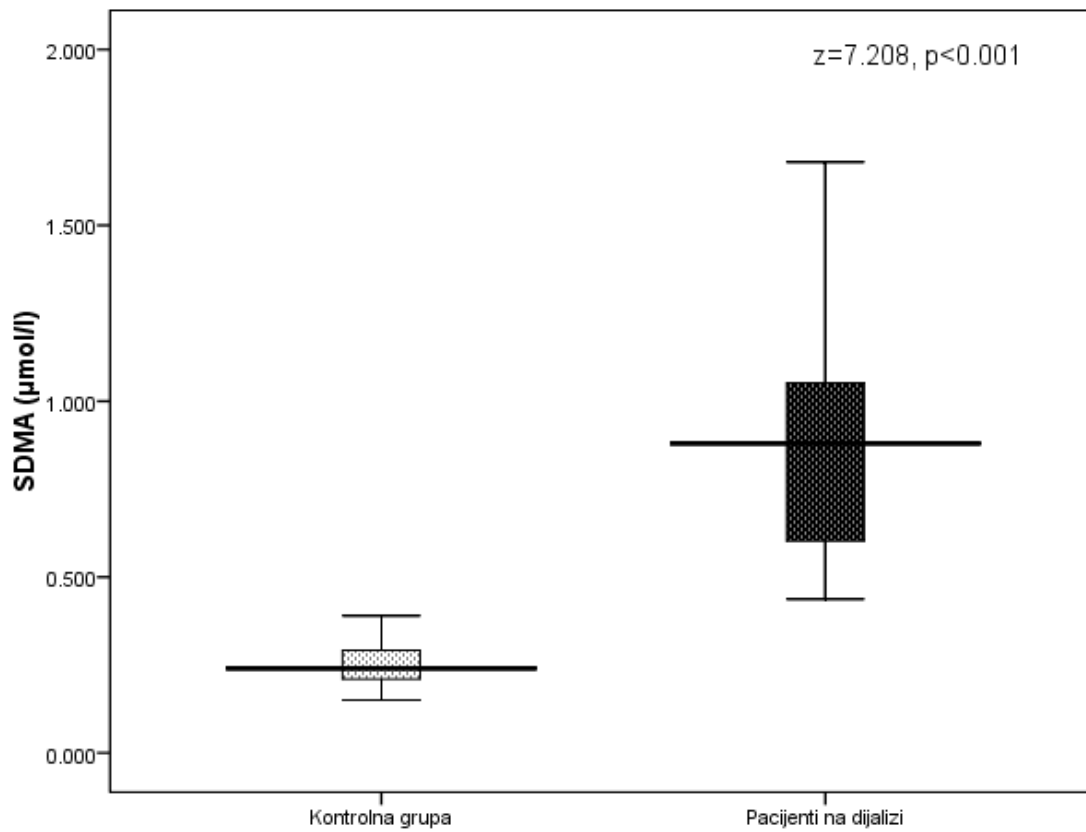
Broj leukocita je bio veći u kontrolnoj grupi u odnosu na pacijente na dijalizi, ali nije bilo statistički značajne razlike ($p=0,391$). Broj eritrocita je bio veći kod zdravih ispitanika u odnosu na pacijente na dijalizi, ali nije bilo statistički značajne razlike ($p=0,220$). Broj trombocita je bio statistički značajno manji kod pacijenata na dijalizi u odnosu na zdrave ispitanike ($z=-3,725$, $p<0,001$). Koncentracija hemoglobina je bila statistički značajno veća kod zdravih ispitanika u odnosu na pacijente na dijalizi ($t=9,801$, $p<0,001$). Takođe, vrednost hematokrita bila je statistički značajno veća kod zdravih ispitanika u odnosu na pacijente na dijalizi ($t=9,835$, $p<0,001$). U koncentraciji gvožđa između ispitivanih grupa nije bilo statistički značajne razlike ($p=0,521$). Vrednosti TIBC i UIBC su bile približno jednake u obe ispitivane grupe, tako da ne postoji statistički značajna razlika u ovim parametrima merenim u ispitivanim grupama ($p=0,868$, odnosno $p=0,859$).

Upoređujući novootkrivene faktore rizika kod pacijenata na dijalizi dobijeni su sledeći rezultati: koncentracija ADMA je statistički značajno veća kod pacijenata na dijalizi u odnosu na zdrave ispitanike ($0,44\pm 0,22$ vs $0,26\pm 0,11$, $z=-4,466$, $p<0,001$)(grafikon 3); koncentracija SDMA je bila statistički značajno veća kod pacijenata na dijalizi u odnosu na kontrolnu grupu ($0,941\pm 0,426$ vs $0,283\pm 0,138$, $z=-7,208$, $p<0,001$)(grafikon 4); koncentracija CRP je bila statistički značajno veća kod pacijenata na dijalizi u odnosu na kontrolnu grupu ($8,60\pm 11,31$ vs

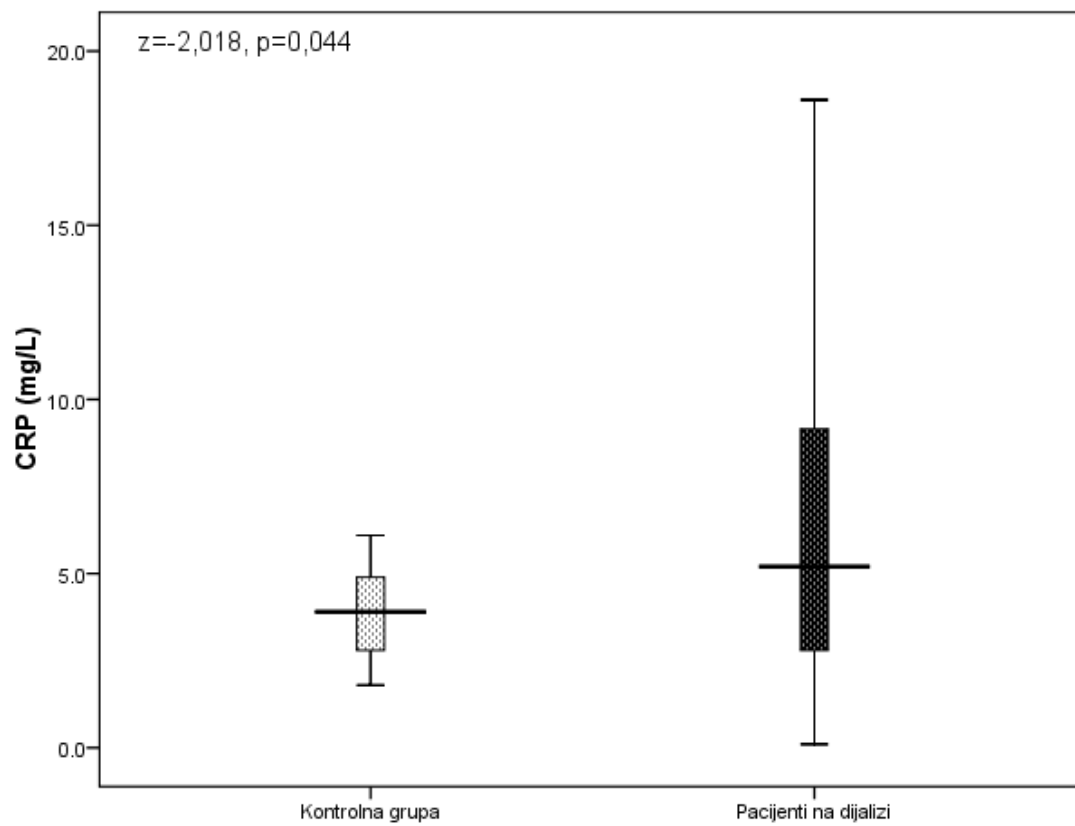
$3,92 \pm 1,29$, $z = -2,018$, $p = 0,044$) (grafikon 5); koncentracija SAA je bila statistički značajno veća kod pacijenata na dijalizi u odnosu na kontrolnu grupu ($9,89 \pm 15,13$ vs $1,43 \pm 0,71$, $z = -6,070$, $p < 0,001$) (grafikon 6), koncentracija albumina bila je statistički značajno manja kod pacijenata na dijalizi u odnosu na kontrolnu grupu ($31,95 \pm 3,13$ vs $39,86 \pm 2,12$, $t = 7,517$, $p < 0,001$) (grafikon 7).



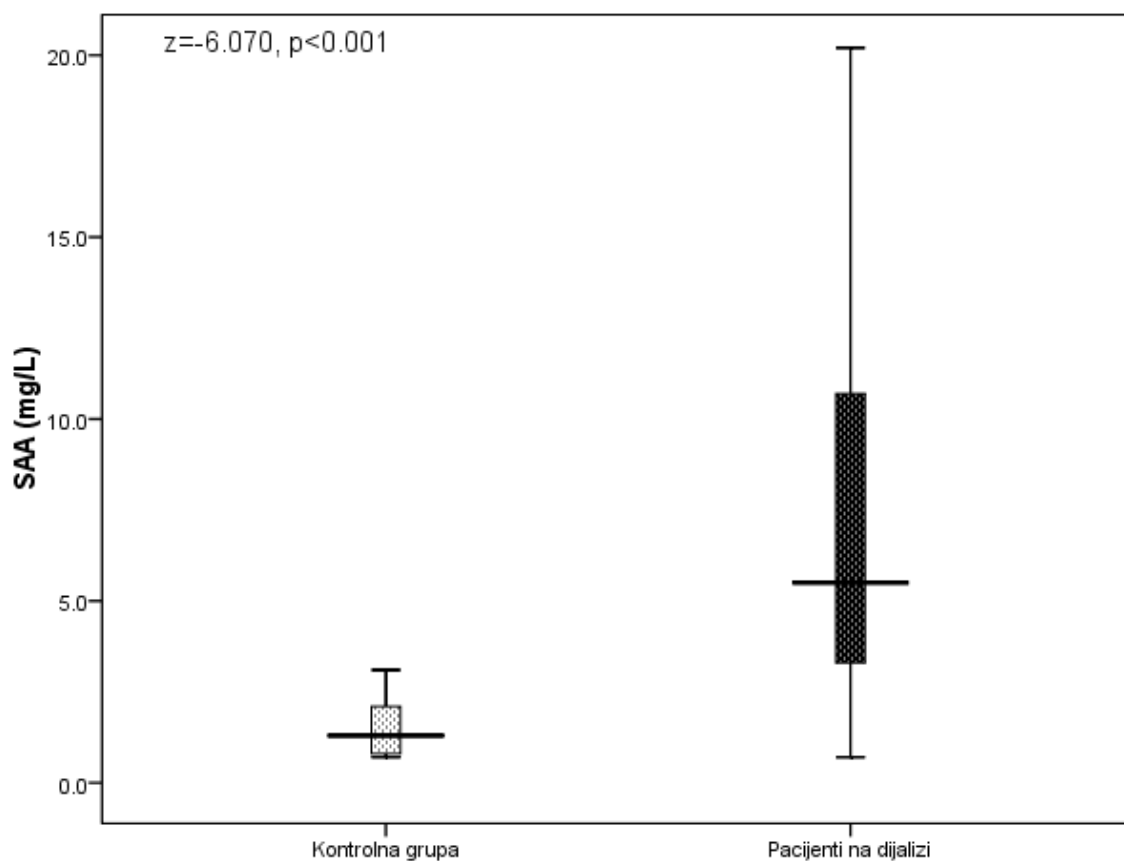
Grafikon 3. Koncentracija ADMA kod pacijenata na dijalizi u odnosu na kontrolnu grupu



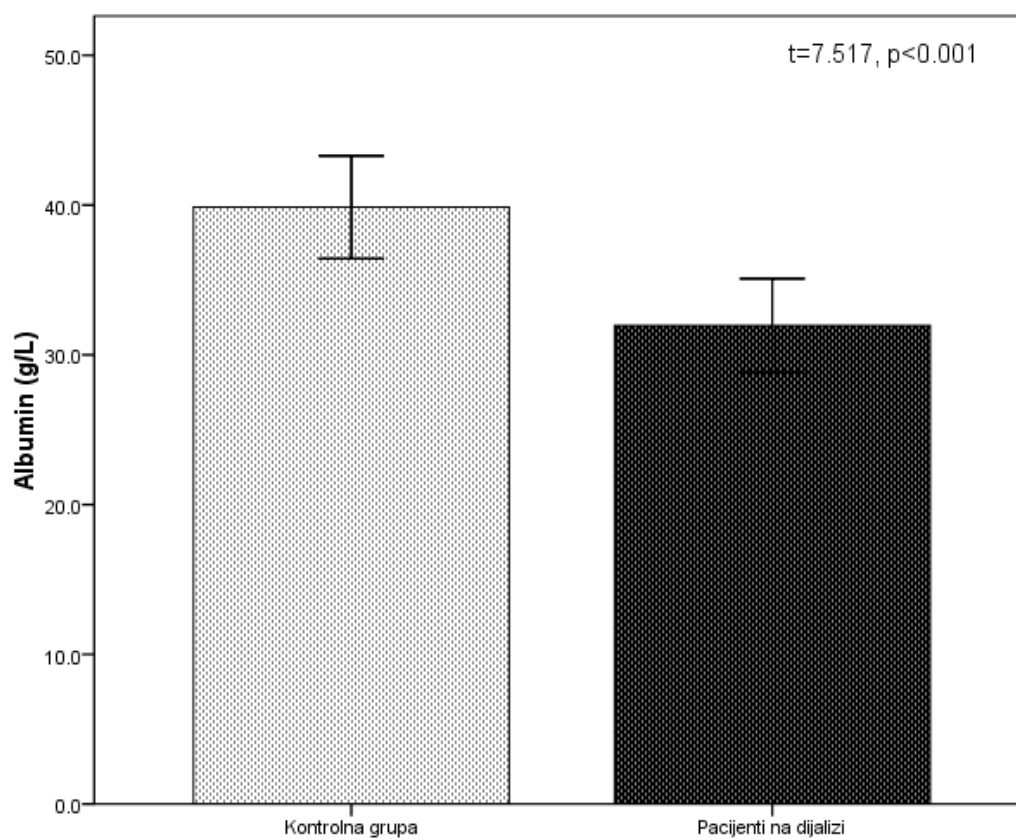
Grafikon 4. Koncentracija SDMA kod pacijenata na dijalizi u odnosu na kontrolnu grupu



Grafikon 5. Koncentracija CRP kod pacijenata na dijalizi u odnosu na kontrolnu grupu



Grafikon 6. Koncentracija SAA kod pacijenata na dijalizi u odnosu na zdrave ispitanike



Grafikon 7. Koncentracija albumina kod pacijenata na dijalizi u odnosu na zdrave ispitanike

Tabela 5. Ispitivani parametri kod pacijenata na dijalizi u odnosu na prisustvo inflamcije

	Sa inflamcijom n=57	Bez inflamcije n=96	Ukupno	p
ADMA($\mu\text{mol/L}$)	0,44 \pm 0,19 0,42(0,25-0,54)	0,41 \pm 0,14 0,35(0,24-0,46)	0,44 \pm 0,22* 0,36(0,24-0,52) [#]	0,088
SDMA($\mu\text{mol/L}$)	0,78 \pm 0,35 0,79(0,50-0,95)	0,91 \pm 0,52 0,87(0,31-1,03)	0,94 \pm 0,43 0,77(0,45-1,02)	0,900
CRP (mg/L)	16,01 \pm 20,79 8,10(5,97-15,72)	2,22 \pm 1,45 1,80(1,0-3,78)	8,60 \pm 11,31 5,20(2,80-9,20)	<0,001
SAA (mg/L)	14,68 \pm 20,36 7,30(4,70-15,50)	4,53 \pm 4,48 3,40(1,50-4,78)	9,89 \pm 15,13 4,20(1,60-7,38)	<0,001
Albumini (g/L)	32,60 \pm 4,65 32,00(28,95-34,55)	33,41 \pm 3,77 33,10(30,50-35,65)	31,95 \pm 3,13 32,60(30,00-35,15)	0,251

* - aritmetička sredina \pm standardna devijacija, [#] - medijana (interkvartilna razlika)

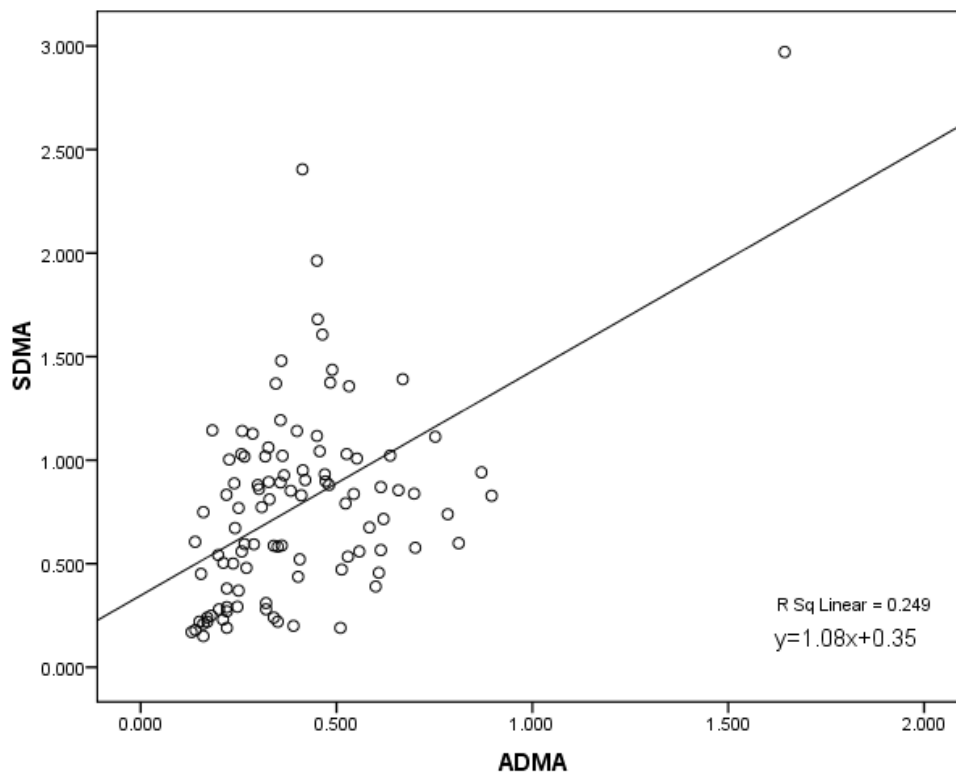
Pacijenti na dijalizi su podjeljeni u dve grupe na osnovu vrednosti CRP. Pacijenti sa vrednostima CRP većim od 5mg/L smatra se da imaju inflamciju. U tabeli 5 su prikazane vrednosti ispitivanih parametara u odnosu na prisustvo inflamcije. Pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji ADMA (p=0,088) i SDMA (p=0,900), kao i koncentraciji albumina (p=0,251) u odnosu na prisustvo inflamcije. Statistički značajna razlika postoji u koncentraciji SAA (z=-4,286, p<0,001), kao i CRP (z=-8,418, p<0,001) u odnosu na prisustvo inflamcije.

Tabela 6. Korelacioni matriks ispitivanih parametara

	SDMA	ADMA/SDMA	CRP	SAA	Albimin	Urea	Kreatinin	Holesterol
ADMA	0,499 <0,001	0,596 <0,001	0,134 0,181	0,246 0,013	-0,434 <0,001	0,095 0,362	0,266 0,009	-0,217* 0,045 [#]
SDMA	-	-0,425 <0,001	-0,042 0,679	0,089 0,378	-0,289 0,006	0,176 0,090	0,532 <0,001	-0,386 <0,001
ADMA/SDMA		-	0,302 0,008	0,275 0,016	-0,432 <0,001	0,024 0,840	-0,097 0,421	-0,042 0,741
CRP			-	0,559 <0,001	-0,248 0,019	0,012 0,912	0,149 0,149	-0,023 0,830
SAA				-	-0,255 0,016	0,097 0,353	0,300 0,003	-0,162 0,136
Albumin					-	-0,200 0,069	-0,523 <0,001	0,327 0,004
Urea						-	0,413 <0,001	-0,233 0,034
Kreatinin							-	-0,610 <0,001

*- vrednost koeficijenta proste linearne korelacije, [#] - p-vrednost.

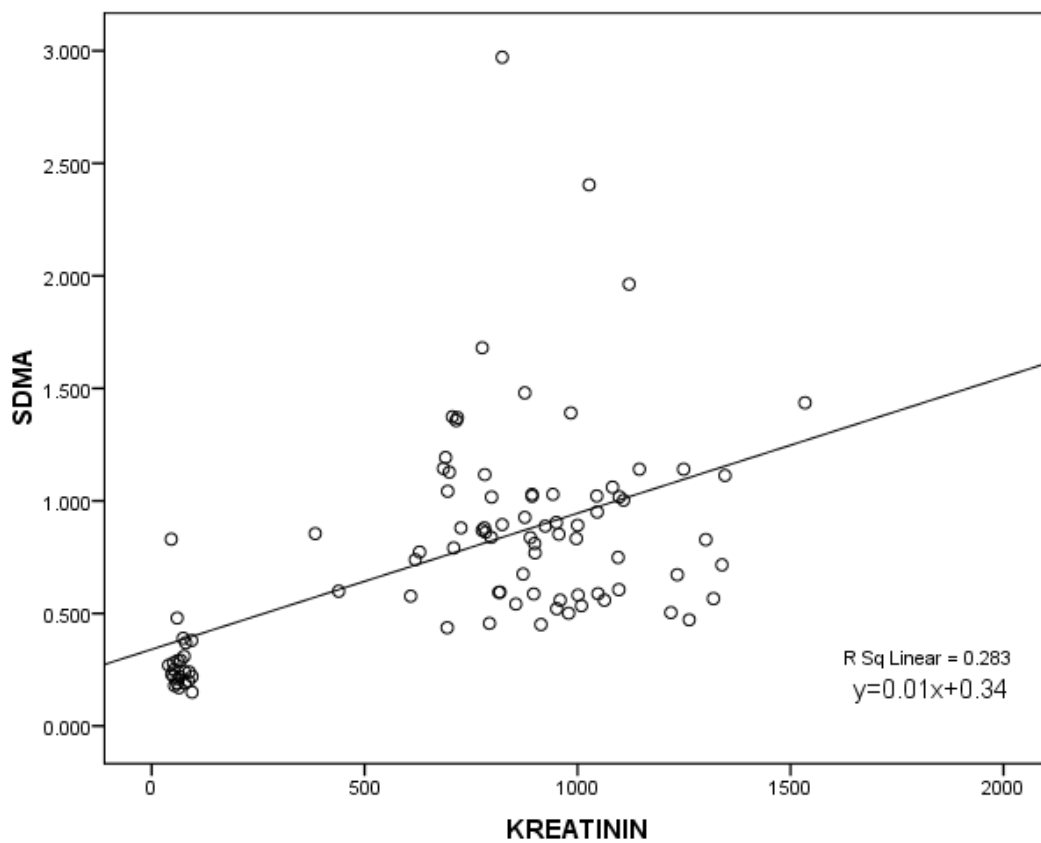
U tabeli 6 je prikazan korelacioni matriks ispitivanih parametara. Korelaciona analiza je pokazala da postoji statistički značajna pozitivna korelacija između ADMA i SDMA (r=0,499, p<0,001) (grafikon 8).



Grafikon 8. Korelaciona analiza ADMA i SDMA

Dobijena je statistički značajna pozitivna korelacija između sledećih parametara: ADMA i odnosa ADMA/SDMA ($r=0,596$, $p<0,001$), ADMA i SAA ($r=0,246$, $p=0,013$), ADMA i kreatinina ($r=0,266$, $p=0,009$), SDMA i kreatinina ($r=0,532$, $p<0,001$) (grafikon 9), odnosa ADMA/SDMA i CRP ($r=0,302$, $p=0,008$), odnosa ADMA/SDMA i SAA ($r=0,275$, $p=0,016$), CRP i SAA ($r=0,559$, $p<0,001$), SAA i kreatinina ($r=0,300$, $p=0,003$), albumina i holesterola ($r=0,327$, $p=0,004$), uree i kreatinina ($r=0,413$, $p<0,001$),

Statistički značajna negativna korelacija je utvrđena između sledećih parametara: ADMA i albumina ($r=-0,434$, $p<0,001$), ADMA i holesterola ($r=-0,217$, $p=0,045$), SDMA i odnosa ADMA/SDMA ($r=-0,425$, $p<0,001$), SDMA i albumina ($r=-0,289$, $p=0,006$), SDMA i holesterola ($r=-0,386$, $p<0,001$), odnosa ADMA/SDMA i albumina ($r=-0,432$, $p<0,001$), CRP i albumina ($r=-0,248$, $p=0,019$), SAA i albumina ($r=-0,255$, $p=0,016$), albumina i kreatinina ($r=-0,523$, $p<0,001$), uree i holesterola ($r=-0,233$, $p=0,034$), kreatinina i holesterola ($r=-0,610$, $p<0,001$).



Grafikon 9. Korelaciona analiza SDMA i kreatinina

5.3. Rezultati u odnosu na prisustvo hipertenzije kod pacijenata na dijalizi

Tabela 7. Opšte kliničke i biohemijske karakteristike u odnosu na prisustvo hipertenzije

	Bez hipertenzije n=63	Hipertenzija n=91	p
Starost	59,12±13,98	57,60±10,52	0,361
Pol (muški/ženski)	68/24	37/24	0,151
Pušenje	30 (32,6%)	16 (26,2%)	0,592
Hipertenzija	63 (68,5%)	35 (57,4%)	0,222
Urea(mmol/L)	40,87±56,90	29,48±7,58	0,738
Kreatinin (µmol/L)	942,67±145,38	913,60±240,80	0,431
Holesterol(mmol/L)	3,80±1,05	3,68±0,75	0,849
Trigliceridi (mmol/L)	2,36±1,30	2,23±1,27	0,591
BMI	24,69±3,51	24,65±4,28	0,783
Glukoza (mmol/L)	5,93±2,08	6,16±2,44	0,712
Proteini(g/l)	66,33±4,84	66,54±12,61	0,955
Broj leukocita	7,61±3,88	7,03±2,90	0,506
Broj eritrocita	4,94±7,62	3,59±0,51	0,210
Broj trombocita	202,21±63,59	166,46±56,48	0,039
Hemoglobin (g/dl)	110,04±18,07	112,74±15,46	0,595
Hematokrit	33,43±5,571	33,91±5,01	0,648
Fe (µmol/L)	15,55±6,451	16,24±22,52	0,125
TIBC (µmol/L)	53,12±10,42	52,52±12,04	0,636
UIBC (µmol/L)	38,81±10,76	39,06±10,39	0,840
AF (U/L)	148,14±71,488	231,19±214,23	0,078
ALT (IJ/L)	24,14±23,50	25,39±21,33	0,619
AST (IJ/L)	23,09±12,06	22,47±12,41	0,960
GGT (IJ/L)	50,54±58,16	47,30±63,72	0,761
SAT	18,92±8,89	20,47±5,91	0,639
LDH (U/L)	268,68±47,59	271,52±65,26	0,718
CPK (U/L)	48,27±18,07	77,32±63,59	0,042

Analizirajući vrednosti ispitivanih parametara u odnosu na prisustvo hipertenzije utvrđeno je da statistički značajna razlika postoji u broju trombocita (202,21±63,59 vs 166,46±56,48, $z=-2,067$, $p=0,039$) (Tabela 7). Statistički značajno veće vrednosti CPK su kod pacijenata koji su imali hipertenziju (77,32±63,59 vs 48,27±18,07, $z=-2,034$, $p=0,042$). Upoređivanjem ostalih ispitivanih parametara utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u odnosu na prisustvo hipertenzije.

Tabela 8. Vrednosti ispitivanih markera kod ispitanika sa hipertenzijom

	Bez hipertenzije n=63	Hipertenzija n=91	p
ADMA($\mu\text{mol/L}$)	0,44 \pm 0,32 0,37 (0,25-0,47)	0,44 \pm 0,17* 0,42 (0,30-0,58) [#]	0,307
SDMA($\mu\text{mol/L}$)	1,04 \pm 0,61 0,87 (0,63-1,10)	0,89 \pm 0,29 0,88 (0,60-1,06)	0,836
CRP (mg/L)	5,93 \pm 7,03 3,40 (1,00-8,28)	9,65 \pm 18,92 3,80 (1,60-8,10)	0,628
SAA (mg/L)	10,65 \pm 17,64 5,65 (4,02-11,00)	9,55 \pm 14,01 5,40 (2,70-10,65)	0,579
Albumini (g/L)	32,43 \pm 2,91 32,95 (30,00)	31,73 \pm 3,23 31,80 (28,95-34,05)	0,274

* - aritmetička sredina \pm standardna devijacija, [#] - medijana (interkvartilna razlika)

U tabeli 8 su prikazane vrednosti ispitivanih markera u odnosu na prisustvo hipertenzije. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u ispitivanim markerima kod ispitanika sa i bez arterijske hipertenzije.

5.4. Analiza preživljavanja

5.4.1. Rezultati u odnosu na ishod praćenja

Pacijenti na dijalizi su praćeni 3 godine (36 meseci). U tom periodu beleženi su tačan datum smrti i uzrok smrti na osnovu kojih je izvršena analiza preživljavanja. U ispitivanom periodu umro je 61 pacijent (39,8%) na dijalizi. Od kardiovaskularnih bolesti umrlo je 37 pacijenata, što predstavlja 24,2% od ukupnog broja pacijenata koji su uključeni u istraživanje i 60,6% od ukupnog broja umrlih pacijenata. U tabeli 9 su prikazani uzroci smrti kod pacijenata na dijalizi u trogodišnjem periodu.

Tabela 9. Uzroci smrti kod pacijenata na dijalizi u periodu praćenja od tri godine

	N (%)
Kardiovaskularni uzroci smrt	37 (60,6)
Ishemijska bolest srca	8 (13,1)
Cerebrovaskularna bolest	15 (24,6)
Srčana insuficijencija	5 (8,2)
Iznenadna srčana smrt	6 (9,8)
Aritmija	2 (3,3)
Periferna vaskularna bolest	1 (1,6)
Nekardiovaskularni uzroci	24 (39,3)
Infekcija	13 (21,3)
Ostali uzroci (pneumonija, gastrointestinalno krvarenje, akutni abdomen)	11 (18,0)
Ukupno umrlih	61

U tabeli 10. su prikazani ispitivani parametri kod preživelih i preminulih pacijenata u toku trogodišnjeg praćenja.

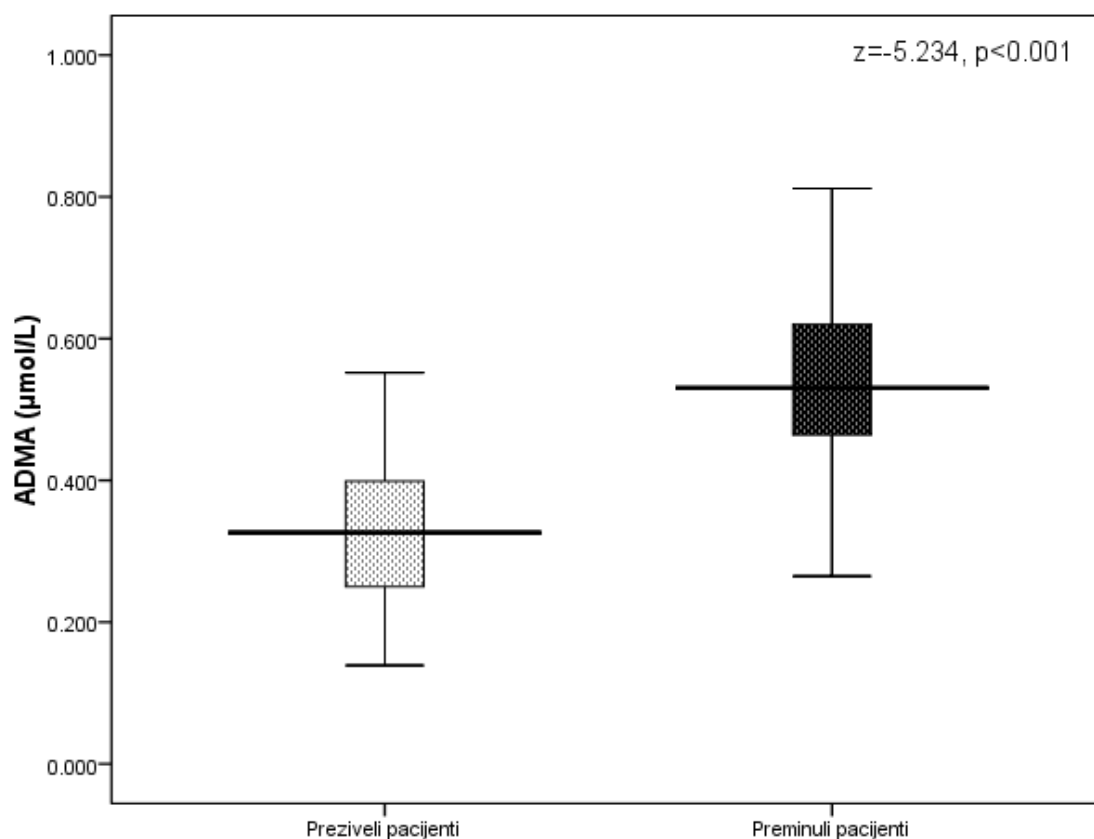
Tabela 10.Osnovne kliničke i biohemijske karakteristike ispitanika prema ishodu praćenja

	Preživeli n=92	Preminuli n=61	P
Starost	54,40±9,76	63,53±12,53	0,024
Pol (muški/ženski)	68/24	37/24	0,120
Pušenje	30 (32,6%)	16 (26,2%)	0,507
Dijabetes mellitus	23 (25,0%)	18 (29,5%)	0,667
Hipertenzija	63 (68,5%)	35 (57,4%)	0,219
Urea(mmol/L)	35,39±41,58	28,77±0,75	0,291
Kreatinin (μmol/L)	963,22±210,51	864,74±196,54	0,081
Holesterol(mmol/L)	3,76±0,91	3,49±0,73	0,354
Trigliceridi (mmol/L)	2,44±1,27	1,96±1,24	0,081
BMI	24,51±4,31	24,95±3,41	0,714
Glukoza (mmol/L)	5,67±1,82	6,72±2,85	0,182
Proteini(g/l)	66,16±11,95	66,02±8,07	0,412
Broj leukocita	6,87±2,85	7,73±3,73	0,306
Broj eritrocita	3,55±0,52	4,73±6,79	0,775
Broj trombocita	172,66±60,12	185,97±61,99	0,447
Hemoglobin (g/dl)	112,88±16,24	110,74±18,71	0,847
Hematokrit	34,02±5,10	33,37±5,33	0,712
Fe(μmol/L)	17,61±23,54	13,55±6,37	0,438
TIBC(μmol/L)	53,29±12,09	51,83±10,58	0,622
UIBC(μmol/L)	39,03±10,87	38,89±9,94	0,934
AF (U/L)	191,36±127,64	224,18±258,66	0,572
ALT (IJ/L)	26,29±21,35	22,77±22,98	0,367
AST (IJ/L)	23,11±12,87	21,88±11,20	0,770
GGT (IJ/L)	51,32±71,68	43,10±39,44	0,481
SAT	21,16±7,06	15,72±4,07	0,167
LDH (U/L)	265,14±58,21	280,86±61,66	0,703
CPK (U/L)	69,39±49,58	63,05±68,66	0,123

Na osnovu analize podataka utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u starosti pacijenata u odnosu na ishod. Pacijenti koji su preminuli bili su statistički značajno stariji u odnosu na pacijente koji su preživeli ($t=2,317$, $p=0,024$). Struktura ispitanika prema polu bila je sledeća: u grupi preživelih bilo je 68 ispitanika (73,9%) muškog pola i 24 ispitanika (26,1%), a u grupi preminulih pacijenata bilo je 37 ispitanika (60,6%) muškog pola i 24 ispitanika (39,7%) ženskog pola. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna povezanost između pola i ishoda praćenja ($p=0,120$). U grupi ispitanika koji su preživeli 32,6% su bili pušači, a u grupi pacijenata koji su preminuli 26,2% su bili pušači. Pokazano je da ne postoji statistički značajna povezanost između pušenja i ishoda praćenja pacijenata ($p=0,507$). Prisustvo dijabetesa je utvrđeno kod 25,0% preživelih pacijenata i kod 26,2% preminulih pacijenata. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna povezanost između prisustva dijabetesa i ishoda praćenja pacijenata ($p=0,667$). Hipertenzija je bila prisutna kod 68,5% preživelih i 57,4% preminulih pacijenata. Daljom analizom je pokazano da ne postoji statistički značajna povezanost između prisustva hipertenzije i ishoda praćenja pacijenata ($p=0,219$). Obe grupe pacijenata su imale

približno jednake vrednosti BMI, tj. ne postoji statistički značajna razlika u vrednosti BMI u odnosu na ishod praćenja pacijenata ($p=0,714$).

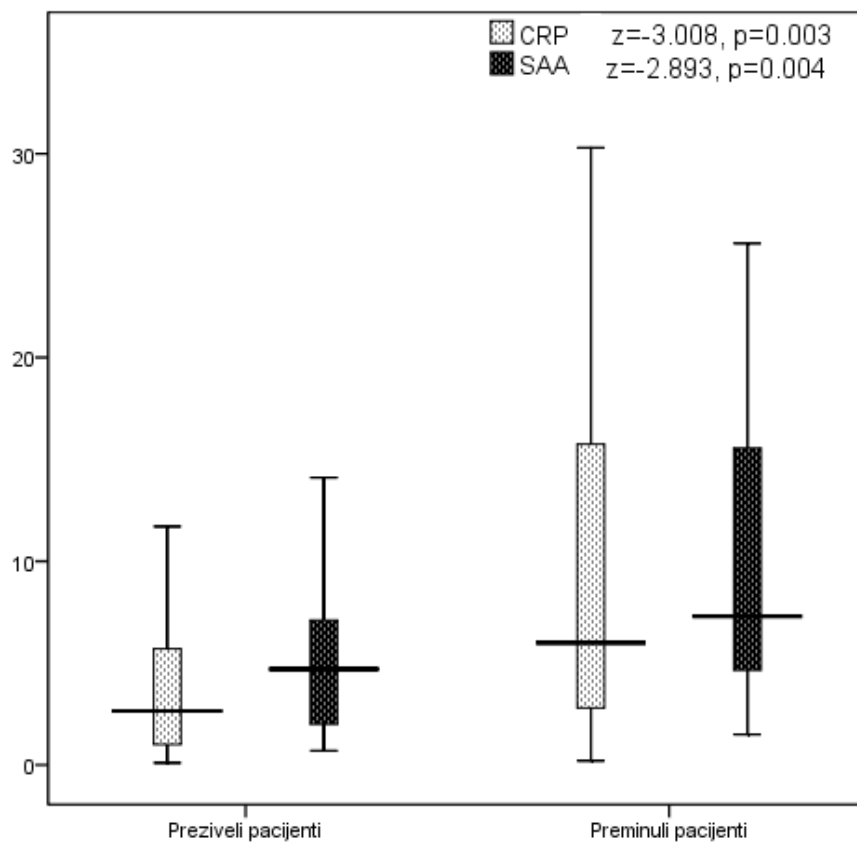
Upoređivanjem ostalih ispitivanih parametara pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika u vrednostima sledećih parametara u odnosu na ishod praćenja pacijenata: glukoze ($p=0,182$), holesterola ($p=0,354$), triglicerida ($p=0,081$), uree ($p=0,291$), kreatinina ($p=0,081$), ukupnih proteina ($p=0,412$), broja leukocita ($p=0,306$), broja eritrocita ($p=0,775$), broja trombocita ($p=0,447$), hemoglobina ($p=0,847$), hematokrita ($p=0,712$), gvožđa ($p=0,438$), TIBC ($p=0,622$), UIBC ($p=0,934$), AF ($p=0,572$), ALT ($p=0,367$), AST ($p=0,770$), GGT ($p=0,481$), SAT ($p=0,167$), LDH ($p=0,703$) i CPK ($p=0,123$).



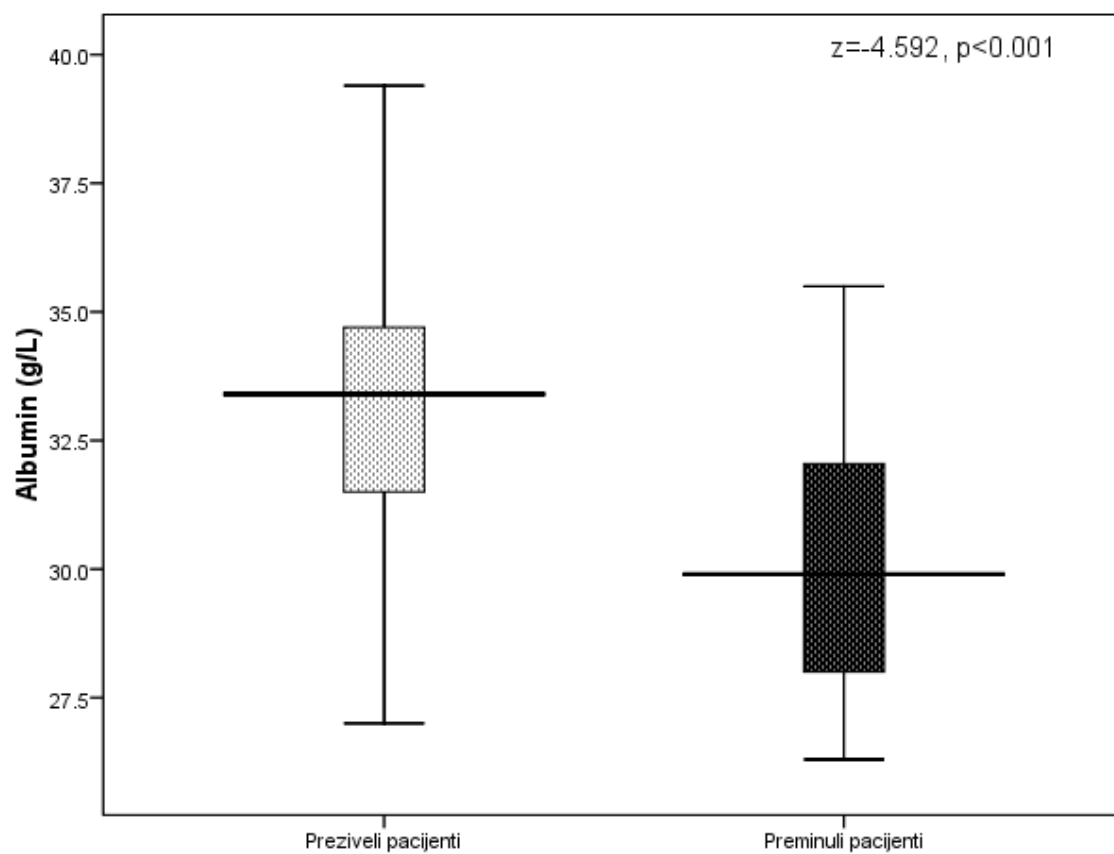
Grafikon 10. Koncentracija ADMA u odnosu na ishod praćenja pacijenata

Koncentracija ADMA je bila statistički značajno veća kod preminulih pacijenata u odnosu na preživjele pacijente ($0,58\pm 0,24$ vs $0,36\pm 0,16$, $z=-5,234$, $p<0,001$)(grafikon 10). Koncentracija SDMA je bila veća kod preminulih pacijenata u odnosu na preživjele, ali nije bilo statistički značajne razlike u vrednosti ovog parametra u odnosu na ishod praćenja ($0,95\pm 0,56$ vs $0,94\pm 0,33$, $p=0,358$). Koncentracija CRP je bila statistički značajno veća kod preminulih u odnosu na preživjele pacijente ($15,17\pm 23,78$ vs $3,99\pm 4,01$, $z=-3,008$, $p=0,003$)(grafikon 11). Koncentracija SAA je bila statistički značajno veća kod preminulih u odnosu na preživjele pacijente ($13,99\pm 17,18$ vs $7,13\pm 13,05$, $z=-2,893$, $p=0,004$)(grafikon 11). Koncentracija

albumina je bila statistički značajno manja kod preminulih u odnosu na preživjele pacijente ($29,99 \pm 2,41$ vs $33,27 \pm 2,88$, $z = -4,592$, $p < 0,001$) (grafikon 12).



Grafikon 11. Koncentracija CRP i SAA u odnosu na ishod praćenja pacijenata



Grafikon 12. Koncentracija albumina u odnosu na ishod praćenja

Tabela 11. Osnovne kliničke i biohemijske karakteristike kod pacijenata sa različitim uzrokom smrti

	Kardiovaskularni uzrok smrti n=37	Ostali uzroci n=24	p
Starost	62,33±12,38	61,23±13,77	0,984
Pol (muški/ženski)	68/24	37/24	0,151
Pušenje	30 (32,6%)	16 (26,2%)	0,592
Dijabetes mellitus	23 (25,0%)	18 (29,5%)	0,072
Hipertenzija	63 (68,5%)	35 (57,4%)	0,222
Urea(mmol/L)	29,33±7,95	27,84±6,32	0,659
Kreatinin (μmol/L)	884,87±241,50	819,91±189,13	0,659
Holesterol(mmol/L)	3,67±0,87	3,51±0,74	0,692
Trigliceridi (mmol/L)	1,74±0,93	2,22±1,55	0,531
BMI	26,51±3,23	23,39±3,13	0,117
Glukoza (mmol/L)	6,50±2,43	6,99±3,38	0,989
Proteini(g/l)	66,05±9,575	66,31±5,27	0,448
Broj leukocita	7,35±4,36	8,22±2,78	0,090
Broj eritrocita	5,58±9,04	3,61±0,48	0,544
Broj trombocita	176,59±55,43	198,23±70,01	0,305
Hemoglobin (g/dl)	108,24±18,73	113,92±15,90	0,476
Hematokrit	32,86±11,61	34,03±4,96	0,544
Fe (μmol/L)	14,09±6,37	12,88±6,65	0,569
TIBC	49,86±11,32	54,25±9,458	0,119
UIBC	36,92±11,61	41,23±7,09	0,136
AF (U/L)	201,58±223,64	251,30±305,75	0,291
ALT (IJ/L)	24,14±30,01	21,17±11,46	0,598
AST (IJ/L)	21,93±12,85	21,83±9,490	0,857
GGT (IJ/L)	35,36±35,34	52,13±43,51	0,316
SAT	20,00±5,06	14,30±3,56	0,180
LDH (U/L)	296,17±65,79	262,50±53,81	0,262
CPK (U/L)	73,25±74,31	50,80±62,83	0,262

U tabeli 11 su prikazani i analizirani pacijenti kod kojih je kardiovaskularna bolest bila uzrok smrti i ostali koji su imali neki drugi uzrok smrti. Analiza podataka predstavljenih u tabeli 11 nije pokazala statistički značajnu razliku u vrednostima ispitivanih parametara u odnosu na ispitivane grupe.

Tabela 12. Vrednosti ispitivanih markera kod preminulih sa različitim uzrokom smrti

	Kardiovaskularni uzrok smrti n=37	Ostali uzroci n=24	p
ADMA($\mu\text{mol/L}$)	0,53 \pm 0,11 0,53 (0,44-0,62)	0,64 \pm 0,33* 0,53 (0,44-0,76) [#]	0,572
SDMA($\mu\text{mol/L}$)	0,78 \pm 0,22 0,84 (0,58-0,88)	1,17 \pm 0,75 0,94 (0,59-1,49)	0,069
CRP (mg/L)	17,40 \pm 27,44 7,95 (3,25-16,75)	12,09 \pm 18,08 3,8 (0,75-18,50)	0,222
SAA (mg/L)	15,73 \pm 19,55 10,65 (4,32-16,35)	11,58 \pm 13,63 5,40 (4,65-15,75)	0,589
Albumini (g/L)	29,46 \pm 2,14 29,80 (27,48-31,12)	30,73 \pm 2,65 30,50 (28,30-32,90)	0,180

* - aritmetička sredina \pm standardna devijacija, [#] - medijana (interkvartilna razlika)

U tabeli 12 su prikazane vrednosti ispitivanih parametara kod pacijenata koji su umrli od kardiovaskularnih bolesti u odnosu na ostale preminule pacijente. Pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika u ispitivanim markerima u odnosu na uzrok smrti.

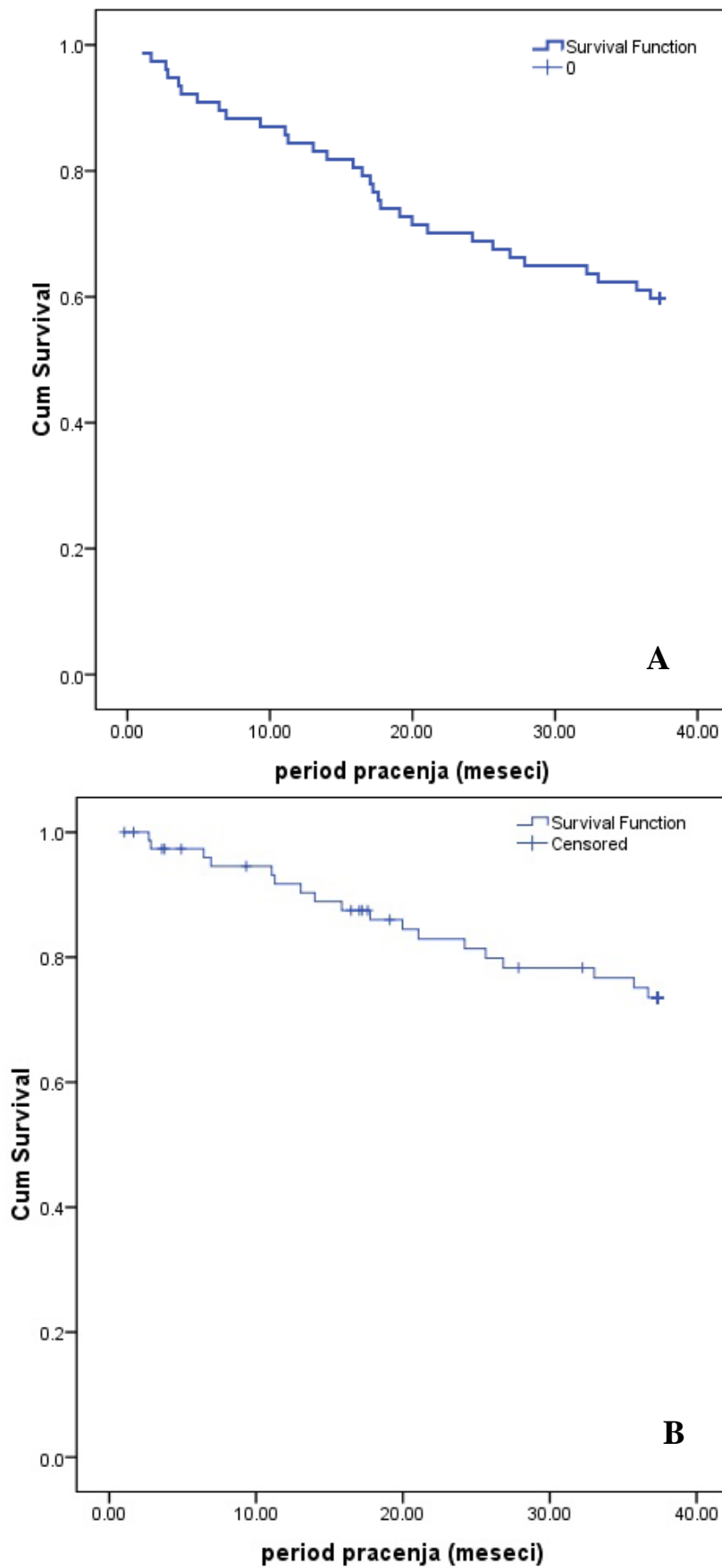
5.4.2. Rezultati Kaplan-Meier-ove analize

Jednogodišnje preživljavanje svih pacijenata je bilo 84,0%, dvogodišnje preživljavanje pacijenata je bilo 70,0%, a trogodišnje preživljavanje je 61,0%. Kad se posmatraju kardiovaskularni uzroci smrti jednogodišnje preživljavanje bilo je 83,0%, dvogodišnje preživljavanje bilo je 75,0% i trogodišnje preživljavanje 72,0%.

U tabeli 13. je prikazano prosečno preživljavanje tokom ispitivanog perioda svih pacijenata i prema polu. Kaplan-Meierovom krivom je utvrđeno da je prosečno ukupno trogodišnje preživljavanje 28,77 \pm 1,41 meseci sa 95%CI (25,99-31,51)(grafikon 13A), a u odnosu na kardiovaskularne uzroke smrti bilo je 32,38 \pm 1,17 meseci sa 95%CI (30,10-34,68)(Grafikon 13B). Ukupno preživljavanje se statistički značajno ne razlikuje prema polu (log-rank: $\chi^2=1,613$, p=0,204). Preživljavanje u odnosu na kardiovaskularne uzroke smrti se takođe statistički značajno ne razlikuje prema polu (logrank: $\chi^2=2,411$, p=0,120).

Tabela 13. Preživljavanje pacijenata tokom ispitivanog perioda

		$\bar{X} \pm \text{SD}$ (meseci)	95%CI	p
Ukupno		28,77 \pm 1,41	25,99-31,51	
Pol	Muški	30,02 \pm 1,57	26,94-33,10	0,204
	Ženski	25,97 \pm 2,80	20,48-31,46	
Kardiovaskularna smrtnost		32,38 \pm 1,17	30,10-34,68	
Pol	Muški	33,89 \pm 1,13	31,67-36,10	0,120
	Ženski	29,16 \pm 2,64	23,98-34,34	



Grafikon 13. Kaplan Meier-ova kriva ukupnog preživljavanja i preživljavanja u odnosu na kardiovaskulane uzroke smrti(A – ukupna smrtnost, B – kardiovaskularna smrtnost)

U cilju ispitivanja povezanosti verovatnoće preživljavanja i vrednosti ADMA, SDMA, CRP, SAA i albumina kao faktora rizika prvo je sprovedena ROC analiza za svaki od ovih markera. Na taj način su dobijene optimalne granične vrednosti (cut off) markera koje imaju najbolju kombinaciju specifičnosti i senzitivnosti metode.

Pri koncentraciji ADMA od 0,38 $\mu\text{mol/L}$ dobijena je optimalna granična vrednost na osnovu kombinacije maksimalnespecifičnosti i senzitivnosti (C-indeks=0,857, $p<0,001$). Kako je početna vrednost poslednjeg tercila 0,45 $\mu\text{mol/L}$ približna optimalnoj graničnoj vrednosti, ispitanici su podeljeni u dve grupe: u prvoj grupi su pacijenti sa niskim vrednostima ADMA ($<0,45 \mu\text{mol/L}$) i drugu grupu čine pacijenti sa visokim vrednostima ADMA ($>0,45 \mu\text{mol/L}$). Po istom principu su podeljeni pacijenti u grupe na osnovu vrednosti SDMA, CRP, SAA i albumina.

Kako su svi pacijenti za ostale ispitivane markere podeljeni na osnovu početne vrednosti poslednjeg tercila, za analizu ovog markera pacijenti su podeljeni na one sa niskom vrednošću SDMA ($<0,90 \mu\text{mol/L}$) i sa visokom vrednosti SDMA ($>0,90 \mu\text{mol/L}$). Na osnovu početne vrednosti poslednjeg tercila za CRP pacijenti su podeljeni u dve grupe: sa niskim CRP ($<6,0 \text{ mg/L}$) i visokim CRP ($>6,0 \text{ mg/L}$).

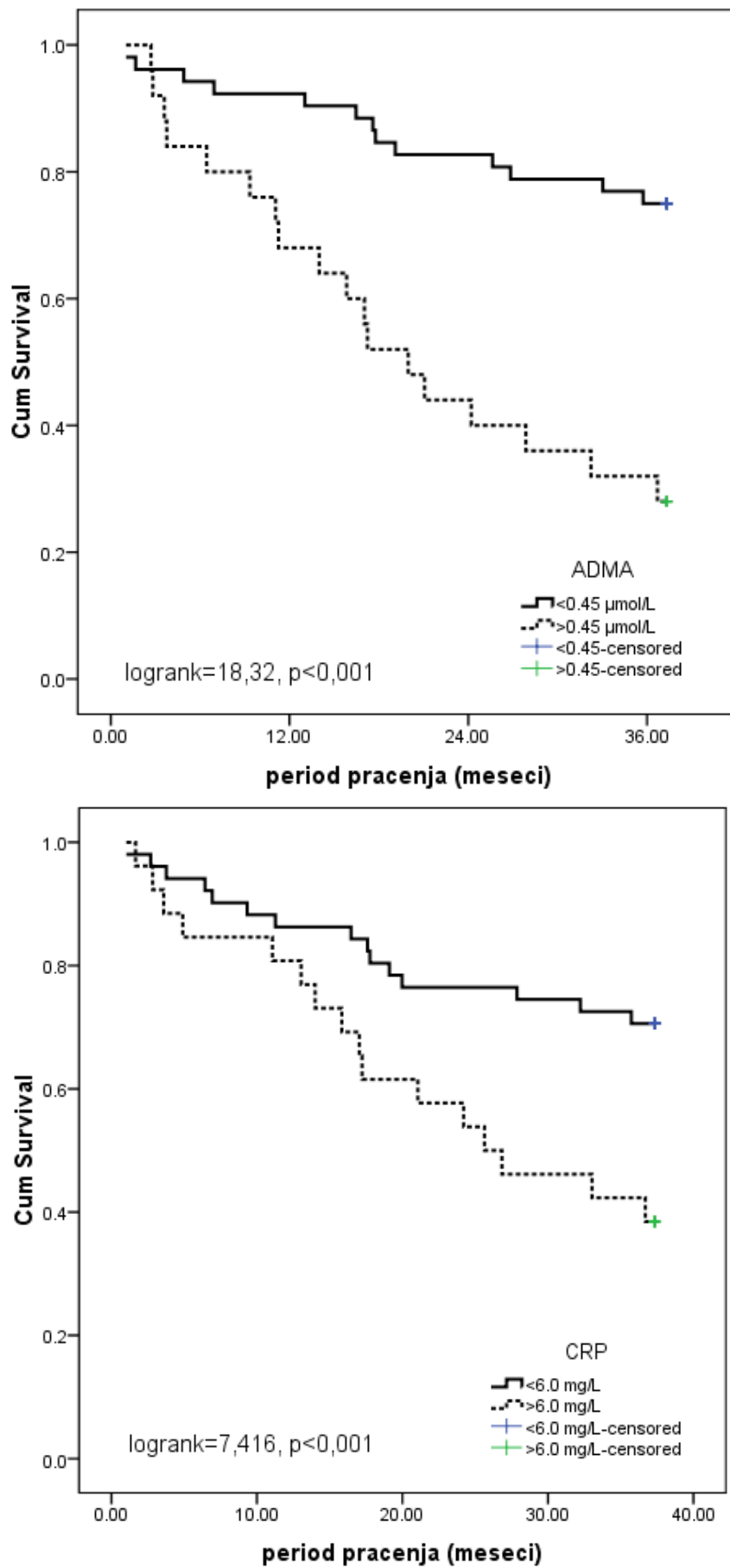
Maksimalna specifičnost i senzitivnost metode je pri vrednosti SAA od 7,15 mg/L (C-index=0,695, $p=0,004$). Početna vrednost poslednjeg tercila je 7,6mg/L, tako da su pacijenti podeljeni na one koji imaju niske vrednosti (SAA $<7,6\text{mg/L}$) i na pacijente sa visokim vrednostima (SAA $>7,6\text{mg/L}$).

Za vrednosti albumina optimalna granična vrednost bila je 31,05 g/L (C-indeks=0,810, $p<0,001$), a granična vrednost najnižeg tercila bila je 30,3 g/L, tako da su pacijenti podeljeni u dve grupe: nizak albumin - $<30,3 \text{ g/L}$ i visok albumin - $>30,3 \text{ g/L}$. Na osnovu ovako izvršene podele pacijenata urađene su Kaplan-Meirove krive.

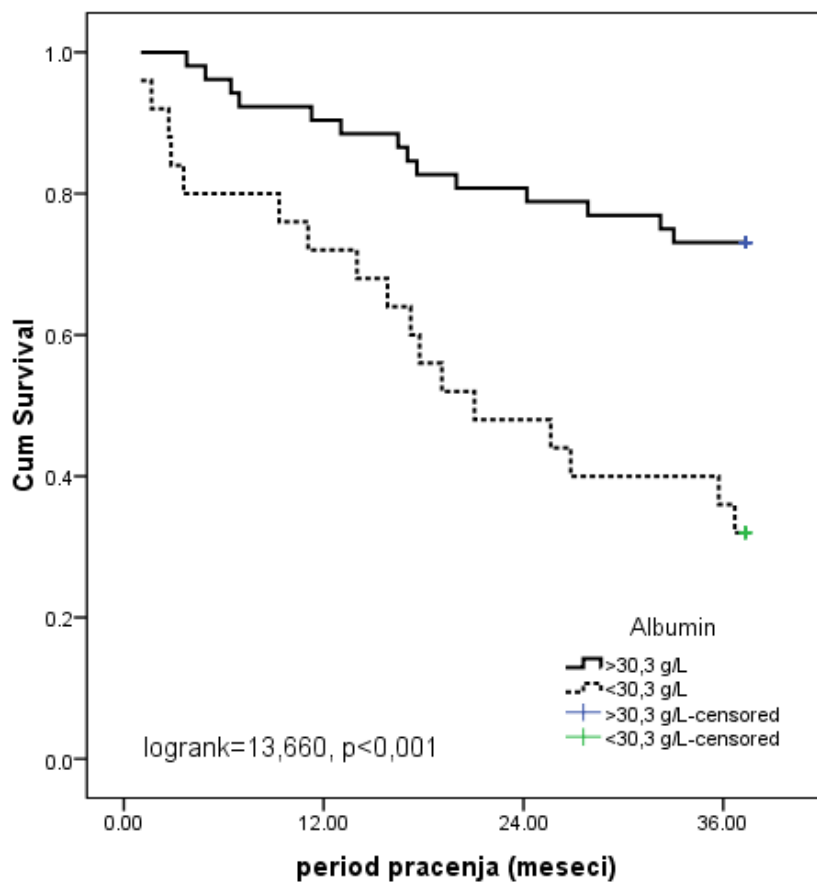
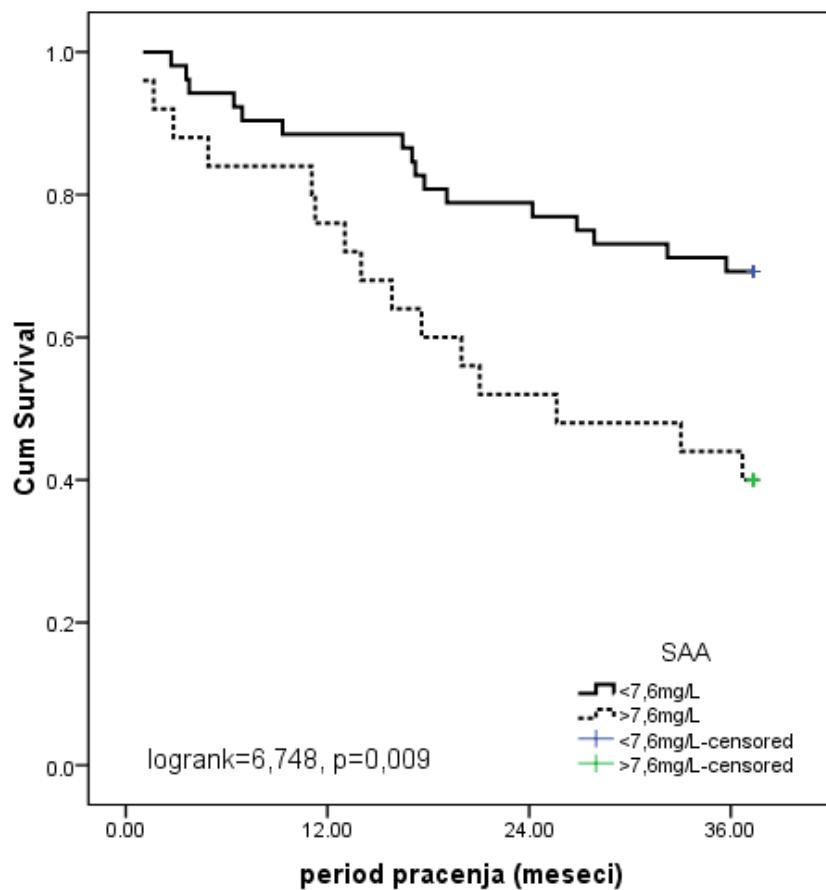
Tabela 14. Ukupno preživljavanje pacijenata tokom ispitivanog perioda u odnosu na vrednosti ADMA, SDMA, CRP, SAA i albumina

		$\bar{X} \pm \text{SG}$ (meseci)	95% CI	p
ADMA	$<0,45 \mu\text{mol/L}$	32,23 \pm 1,44	29,40-35,05	$<0,001$
	$>0,45 \mu\text{mol/L}$	21,54 \pm 2,59	16,45-26,62	
SDMA	$<0,90 \mu\text{mol/L}$	28,22 \pm 1,86	24,58-31,86	0,386
	$>0,90 \mu\text{mol/L}$	29,79 \pm 2,18	25,51-34,06	
CRP	$<6,0 \text{ mg/L}$	30,83 \pm 1,62	27,66-33,99	0,006
	$>6,0 \text{ mg/L}$	24,69 \pm 2,52	19,75-29,64	
SAA	$<7,6\text{mg/L}$	30,98 \pm 1,54	27,97-34,00	0,009
	$>7,6\text{mg/L}$	24,12 \pm 2,69	18,83-29,40	
Albumin	$<30,3 \text{ g/L}$	22,43 \pm 2,74	17,07-27,79	0,001
	$>30,3 \text{ g/L}$	31,79 \pm 1,44	28,98-34,61	

U tabeli 14 je prikazano prosečno ukupno preživljavanje u odnosu na vrednosti ispitivanih parametara. Prosečno ukupno preživljavanje pacijenata na dijalizi koji su imali ADMA<0,45 $\mu\text{mol/L}$ bilo je statistički značajno duže nego kod pacijenata koji su imali ADMA>0,45 $\mu\text{mol/L}$ (logrank test=18,32, $p<0,001$)(Grafikon 14). Analiza preživljavanja u odnosu na vrednosti SDMA je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika u ukupnom preživljavanju (logrank test=0,752, $p=0,386$). Prosečno ukupno preživljavanje pacijenata koji imaju CRP<6,0 mg/L je bilo statistički značajno duže nego kod pacijenata koji su imali vrednosti CRP>6,0 mg/L (logrank test=7,416, $p=0,006$) (Grafikon 14). Koncentracija SAA statistički značajno utiče na ukupno preživljavanje pacijenata. Pacijenti koji su imali SAA<7,6mg/L su živeli duže u odnosu na one koji su imali veće vrednosti ovog markera (logrank test=6,748, $p=0,009$)(Grafikon 15). Pacijenti koji su imali manje vrednosti albumina (<30,3 g/L) su imali statistički značajno kraće ukupno preživljavanje (logrank test=13,660, $p<0,001$)(Grafikon 15).



Grafikon 14. Kaplan-Meirove krive u odnosu na vrednosti ADMA i CRP

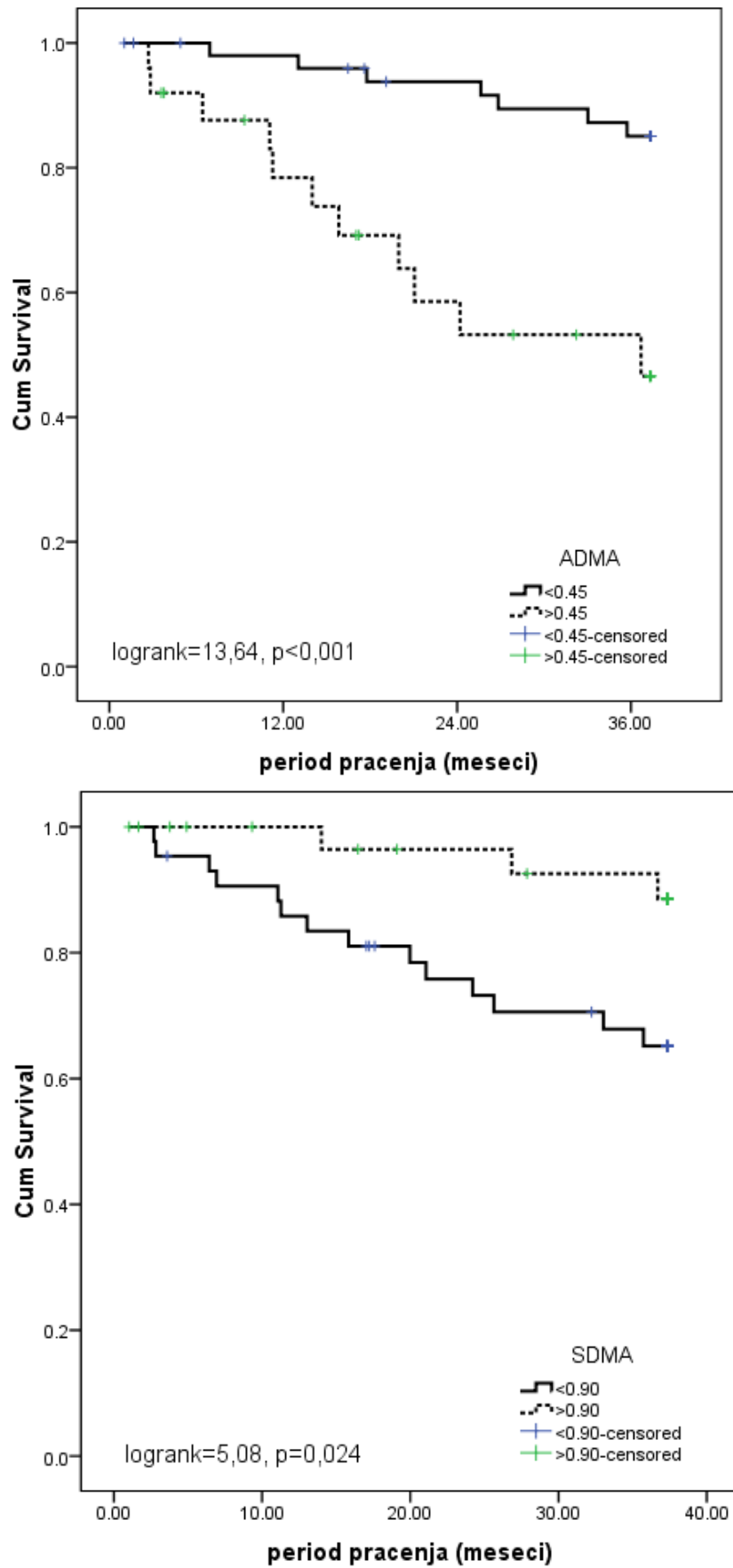


Grafikon 15. Kaplan-Meirove krive u odnosu na vrednosti SAA i albumina

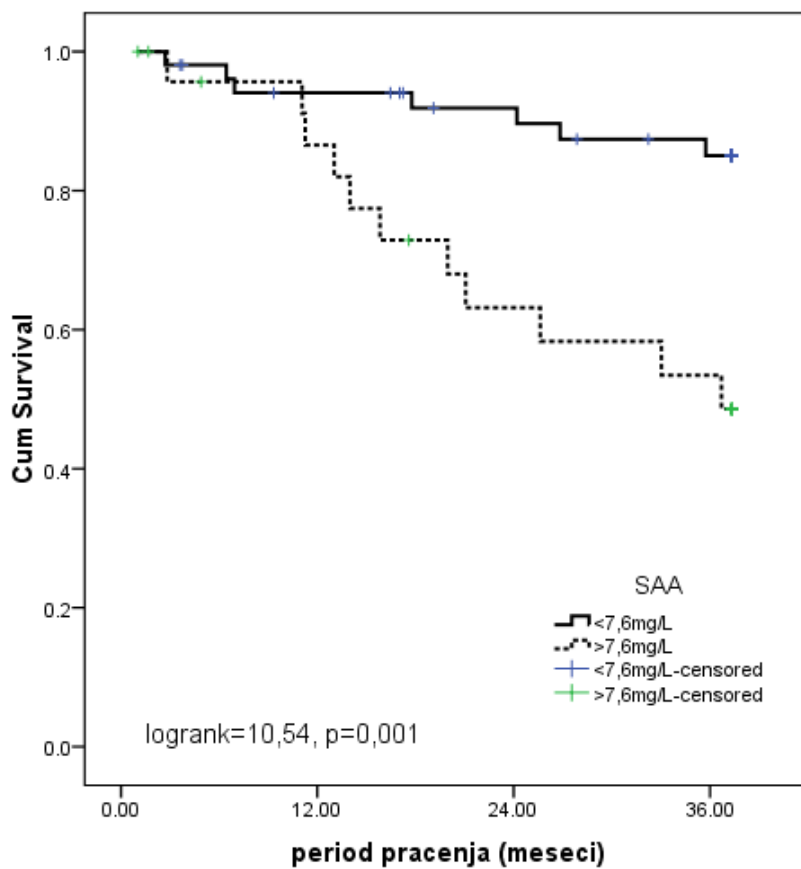
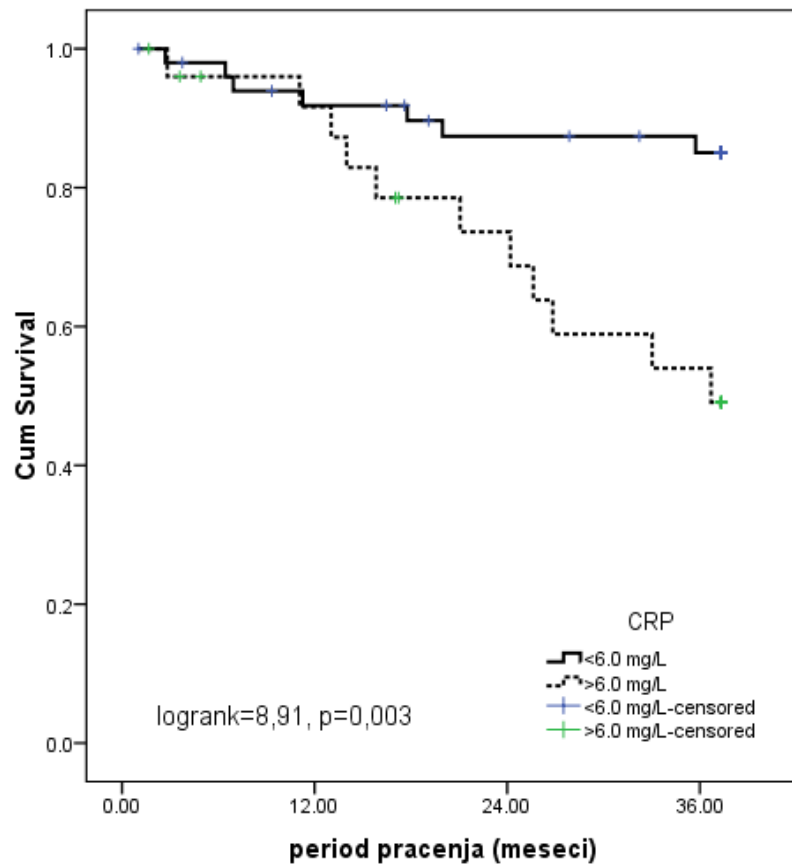
Tabela 15. Preživljavanje u odnosu na kardiovaskularne uzroke smrti tokom ispitivanog perioda u odnosu na vrednosti ADMA, SDMA, CRP, SAA i albumina

		$\bar{X} \pm SG$ (meseci)	95%CI	p
ADMA	<0,45 $\mu\text{mol/L}$	35,19 \pm 0,92	33,39-36,98	<0,001
	>0,45 $\mu\text{mol/L}$	26,20 \pm 2,71	20,88-31,52	
SDMA	<0,90 $\mu\text{mol/L}$	30,24 \pm 1,77	26,75-33,72	0,024
	>0,90 $\mu\text{mol/L}$	36,07 \pm 0,89	34,32-37,82	
CRP	<6,0 mg/L	33,99 \pm 1,29	31,46-36,52	0,003
	>6,0 mg/L	29,02 \pm 2,22	24,65-33,37	
SAA	<7,6mg/L	34,44 \pm 1,16	32,16-36,73	0,001
	>7,6mg/L	27,86 \pm 2,46	23,04-32,67	
Albumin	<30,3 g/L	27,66 \pm 2,58	22,61-32,72	<0,001
	>30,3 g/L	34,35 \pm 1,14	32,11-36,59	

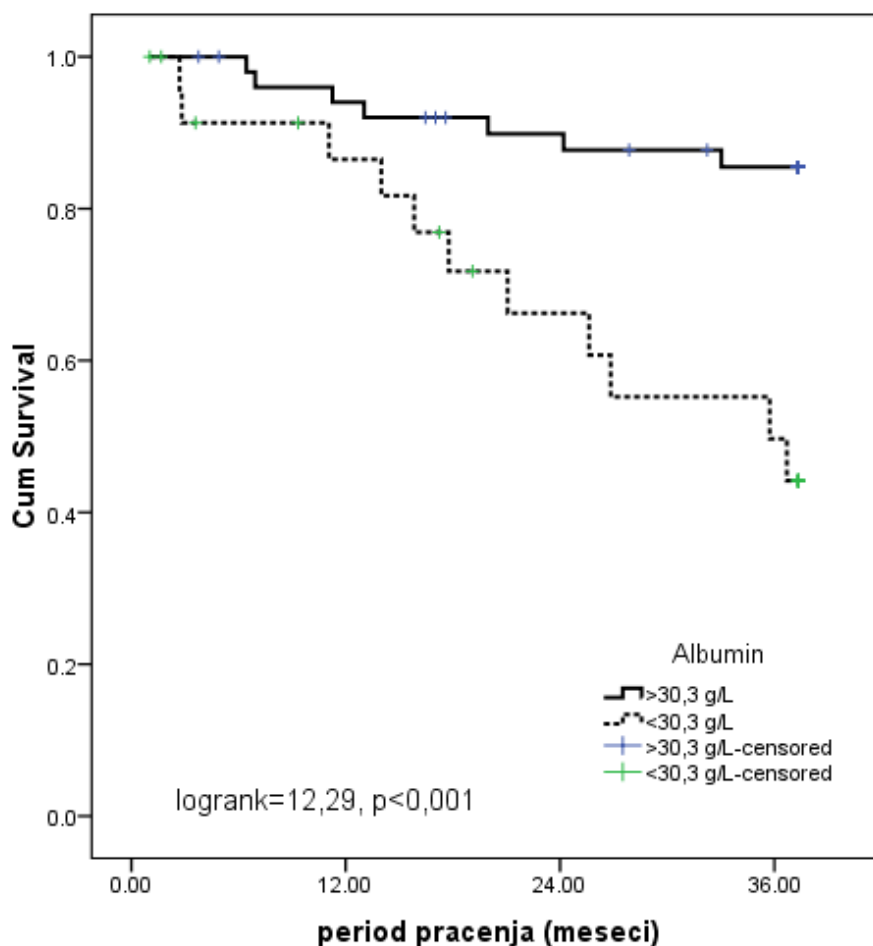
U tabeli 15. je prikazano prosečno preživljavanje u odnosu na kardiovaskularnu smrtnost u odnosu na granične vrednosti ispitivanih markera. Analiza preživljavanja u odnosu na kardiovaskularnu smrtnost je pokazala da postoji statistički značajna razlika u odnosu na vrednosti ADMA (logrank=13,64, $p<0,001$) (Grafikon16). Log rank testom je pokazano da postoji statistički značajna razlika u preživljavanju u odnosu na kardiovaskularnu smrtnost u odnosu na vrednosti SDMA (logrank=5,08, $p=0,024$)(Grafikon 16). Kaplan-Meirova kriva je pokazala da postoji statistički značajna razlike u preživljavanju u odnosu na vrednosti CRP u odnosu na kardiovaskularnu smrtnost (logrank=8,91, $p=0,003$)(Grafikon 17). Vrednost SAA statistički značajno utiče na preživljavanje u odnosu na kardiovaskularnu smrtnost (logrank=10,54, $p=0,001$)(Grafikon 17). U odnosu na kardiovaskularnu smrtnost pokazano je da vrednosti albumina statistički značajno utiču na preživljavanje. Pacijenti sa nižim vrednostima albumina imali su kraće preživljavanje (logrank=12,29, $p<0,001$)(Grafikon 18).



Grafikon 16. Kaplan-Meirove krive u odnosu na vrednosti ADMA i SDMA ($\mu\text{mol/L}$)— kardiovaskularna smrtnost



Grafikon 17. Kaplan-Meirova kriva u odnosu na prednosti CRP i SAA – kardiovaskularna smrtnost



Grafikon 18. Kaplan-Meirova kriva u odnosu na vrednosti albumina –kardiovaskularna smrtnost

5.4.3. Rezultati Coxove regresione analize

Tabela 16. Coxova regresiona analiza za ukupnu smrtnost– univarijantna logistička regresiona analiza

	HR	95%CI	p
Starost	1,040	1,005-1,075	0,023
Muški pol	1,591	0,772-3,208	0,208
Pušenje	1,192	0,398-3,568	0,753
Prisustvo dijabetes melitusa	2,424	1,081-5,436	0,032
Prisustvo hipertenzije	0,815	0,346-1,920	0,640
BMI	1,024	0,874-1,198	0,771
ADMA	1,770	1,397-2,242	<0,001
SDMA	1,252	0,506-3,098	0,626
CRP	1,026	1,013-1,040	<0,001
SAA	1,014	0,999-1,029	0,065
Albumin	0,737	0,645-0,842	<0,001

U tabeli 16 su prikazane prediktivne vrednosti u odnosu na ukupnu smrtnost pacijenata. Kao nezavisni prediktori smrtnosti su se izdvojili sledeći markeri: starost (HR 1,040, 95%CI (1,005-1,075)), prisustvo dijabetes melitusa (HR 2,424, 95%CI (1,081-5,436)), koncentracija ADMA (HR 1,770, 95%CI (1,397-2,242)), koncentracija CRP (HR 1,026, 95% (1,013-1,040)) i

koncentracija albumina (HR 0,737, 95%CI (0,645-0,842)). Pored ovih parametara, koji su se izdvojili kao nezavisni prediktori ukupne smrtnosti, u multivarijantnu logističku regresionu analizu ulazi i koncentracija SAA, jer je njegova prediktivna vrednost sa statističkom greškom manjom od 10% ($p=0,065$).

Tabela 17. Coxova regresiona analiza za ukupnu smrtnost– multivarijanta logistička regresiona analiza

	HR	95%CI	p
Starost	1,007	0,971-1,043	0,721
Prisustvo dijabetes melitusa	1,912	0,780-4,685	0,156
ADMA	1,482	1,104-1,988	0,009
CRP	1,021	1,004-1,039	0,015
SAA	0,996	0,975-1,017	0,702
Albumin	0,799	0,686-0,931	0,004

U multivarijantnoj Coxovoj regresionoj analizi kao nezavisni prediktori ukupne smrtnosti izdvojili su se ADMA (HR 1,482, 95%CI (1,104-1,988), CRP (HR 1,021, 95%CI (1,004-1,039) i koncentracija albumina (HR 0,799, 95%CI (0,986-0,931) (Tabela 17).

Tabela 18. Coxova regresiona analiza u odnosu na kardiovaskularnu smrtnost – univarijantna logistička regresiona analiza

	HR	95%CI	p
Starost	1,046	1,000-1,094	0,052
Muški pol	2,057	0,811-5,217	0,129
Pušenje	0,425	0,055-3,289	0,412
Prisustvo dijabetes melitusa	1,461	0,421-5,069	0,550
Prisustvo hipertenzije	0,752	0,243-2,335	0,623
BMI	1,128	0,910-1,397	0,272
ADMA	1,619	1,114-2,3549	0,011
SDMA	0,232	0,039-1,384	0,109
CRP	1,032	1,015-1,049	<0,001
SAA	1,017	0,999-1,035	0,059
Albumin	0,675	0,561-0,813	<0,001

U tabeli 18 su prikazane prediktivne vrednosti u odnosu na ukupnu smrtnost pacijenata. Kao nezavisni prediktori smrtnosti su se izdvojili sledeći markeri: koncentracija ADMA (HR11,591, 95%CI (2,344-57,309)), koncentracija CRP (HR 1,032, 95% (1,015-1,049)) i koncentracija albumina (HR 0,675, 95%CI (0,561-0,813)). Pored ovih parametara koji su se izdvojili kao nezavisni prediktori u odnosu na kardiovaskularne uzroke smrti, u multivarijantnu logističku regresionu analizu ulazi starost i koncentracija SAA, jer je njihova prediktivna vrednost sa statističkom greškom manjom od 10% ($p=0,052$, $p=0,059$).

Tabela 19. Coxova regresiona analiza za kardiovaskularnu smrtnost– multivarijantna logistička regresiona analiza

	HR	95%CI	p
Starost	1,009	0,961-1,060	0,722
ADMA	1,227	0,716-2,105	0,457
CRP	1,021	0,999-1,043	0,063
SAA	0,998	0,971-1,026	0,908
Albumin	0,713	0,582-0,873	0,001

Iz Tabele 19 se može zaključiti da se u multivarijantnoj Coxovoj regresionoj analizi kao nezavisni prediktorkardiovaskularne smrtnosti izdvojila koncentracija albumina (HR 0,713, 95%CI (0,582-0,873)).

5.5. Analiza rezultata u odnosu na broj faktora rizika

U tabeli 20 su prikazane vrednosti ispitivanih parametara u odnosu na broj faktora rizika. Ispitanici su na osnovu povišenih vrednosti koncentracije ADMA (>0,45 mmol/L), CRP (>6,0mg/L), SAA (>7,6 mg/L) i smanjene koncentracije albumina (<30,3g/L) podeljeni u grupe sa jednim, dva, i tri i više faktora rizika. Zbog malog broja ispitanika u grupama sa tri faktora rizika i sa četiri faktora rizika formirana je grupa sa tri i više faktora rizika.

Tabela 20. Osnovne kliničke i biohemijske karakteristike ispitanika u odnosu na broj faktora rizika

	Bez FR n=54	Sa 1 FR n=48	Sa 2 FR n=30	Sa 3 i više FR n=22	P
Starost	53,00±11,51	58,62±10,77	60,73±11,48	65,73±9,38	0,011
Pol (muški/ženski)	38/16	30/18	22/8	16/6	0,706
Pušenje (%)	15(27,8)	13(27,1)	4(13,3)	4(18,2)	0,395
Dijabetes mellitus (%)	10(18,5)	16(33,3)	7(23,3)	8(36,4)	0,300
Hipertenzija (%)	35(64,8)	30(62,5)	17(56,7)	16(72,7)	0,688
Urea(mmol/L)	39,48±50,96	28,07±6,62	28,34±9,37	31,63±8,61	0,472
Kreatinin (μmol/L)	899,46±147,89	918,38±222,86	984,00±180,93	910,18±357,57	0,684
Holesterol(mmol/L)	3,79±0,76	3,54±0,88	3,99±1,11	3,48±0,38	0,509
Trigliceridi (mmol/L)	2,33±1,26	2,15±1,31	2,59±1,50	1,83±0,54	0,654
BMI	22,81±3,63	24,94±3,34	27,22±4,28	27,07±5,17	0,159
Glukoza (mmol/L)	5,61±2,09	6,71±2,82	5,91±1,53	6,14±2,58	0,364
Proteini(g/l)	67,56±6,58	63,99±15,42	69,67±8,78	63,20±6,023	0,359
Broj leukocita	6,58±1,65	6,65±1,63	10,46±5,63	5,79±1,99	0,011
Broj eritrocita	3,66±0,40	3,46±0,58	6,21±9,91	3,36±0,61	0,459
Broj trombocita	164,35±48,91	166,00±59,37	227,50±66,41	172,73±57,06	0,022
Hemoglobin (g/dl)	117,31±12,89	107,91±16,48	114,07±16,63	104,45±19,51	0,203
Hematokrit	35,34±4,69	32,66±4,92	34,22±5,20	31,74±6,11	0,227
Fe (μmol/L)	14,42±6,04	13,96±6,61	23,26±40,18	14,07±6,20	0,977
TIBC (μmol/L)	52,50±11,99	52,39±11,06	53,21±12,06	53,30±11,89	0,994
UIBC (μmol/L)	38,15±11,14	38,36±10,48	42,01±10,39	38,01±9,17	0,681
AF (U/L)	215,52±126,15	209,39±239,82	183,54±219,83	168,00±58,230	0,057
ALT (IJ/L)	28,64±24,61	22,13±14,21	27,87±28,61	16,50±16,09	0,206
AST (IJ/L)	25,80±14,53	21,39±10,34	22,60±12,92	16,62±4,17	0,263
GGT (IJ/L)	53,60±53,81	43,58±57,50	29,57±20,38	80,49±121,46	0,418
LDH (U/L)	256,36±70,43	365,35±48,51	291,54±45,81	301,50±57,18	0,239
CPK (U/L)	46,34±9,27	54,05±47,03	88,92±76,71	82,67±69,92	0,332

FR - faktor rizika

Analazom podataka pokazano je da postoji statistički značajna razlika u starosti u odnosu na broj faktora rizika ($F=4,000$, $p=0,011$). Sa starošću se povećava i broj faktora rizika. Post hoc analizom je pokazano da statistički značajna razlika u starosti postoji između grupa bez faktora rizika i sa 3 ili više faktora rizika ($p=0,010$). Zatim je utvrđeno da ne postoji statistički značajna razlika po polu ($p=0,706$), pušenju ($p=0,395$), prisustvu dijabetesa ($p=0,300$), hipertenzije ($p=0,688$) i BMI ($p=0,159$) u odnosu na broj faktora rizika.

Broj leukocita se statistički značajno razlikuje u odnosu na broj faktora rizika ($\chi^2=11,063$, $p=0,011$). Post hoc analizom je pokazano da statistički značajna razlika postoji između sledećih grupa: bez faktora rizika i sa 2 faktora rizika ($z=-2,824$, $p=0,005$), sa 1 faktorom rizika i sa 2 faktora rizika ($z=-2,445$, $p=0,014$), sa 2 faktora rizika i sa 3 ili više faktora rizika ($z=-2,458$, $p=0,011$).

Broj trombocita se statistički značajno razlikuje u odnosu na broj faktora rizika ($\chi^2=9,624$, $p=0,022$). Daljom analizom je utvrđeno između kojih grupa postoji statistički značajna razlika: bez faktora rizika i sa 2 faktora rizika ($z=-2,666$, $p=0,008$), sa 1 faktorom rizika i sa 2 faktora rizika ($z=-2,647$, $p=0,008$). Analiza ostalih ispitivanih parametara je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika u odnosu na broj faktora rizika.

Tabela 21. Ispitivani markeri u odnosu na broj faktora rizika

	Bez FR n=54	Sa 1 FR n=48	Sa 2 FR n=30	Sa 3 i više FR n=22	p
ADMA($\mu\text{mol/L}$)	0,33 \pm 0,08 0,35 (0,26-0,37)	0,47 \pm 0,32 0,39 (0,26-0,60)	0,46 \pm 0,17 0,46 (0,38-0,56)	0,63 \pm 0,13* 0,61 (0,52-0,66) [#]	<0,001
SDMA($\mu\text{mol/L}$)	0,97 \pm 0,39 0,94 (0,72-0,12)	0,99 \pm 0,52 0,89 (0,62-1,03)	0,91 \pm 0,41 0,84 (0,56-1,11)	0,82 \pm 0,32 0,79 (0,57-1,02)	0,508
CRP (mg/L)	2,28 \pm 1,68 1,70 (0,90-3,70)	3,92 \pm 4,04 2,45 (0,85-5,70)	13,98 \pm 15,07 7,70 (4,80-17,60)	26,23 \pm 33,01 9,00 (8,20-36,60)	<0,001
SAA (mg/L)	3,74 \pm 1,71 3,90 (2,20-4,80)	5,31 \pm 3,84 4,85 (1,60-7,28)	19,47 \pm 21,57 11,1 (6,90-22,60)	21,93 \pm 24,42 15,50 (10,60-18,80)	<0,001
Albumini (g/L)	33,49 \pm 3,01 34,00 (31,50-35,50)	32,41 \pm 2,72 32,55 (30,08)	31,24 \pm 2,44 31,80 (30,00-32,50)	28,12 \pm 1,32 27,80 (27,00-29,00)	<0,001

FR-faktor rizika, * - aritmetička sredina \pm standardna devijacija, [#]- medijana (interkvartilna razlika)

Koncentracija ADMA se statistički značajno razlikuje u odnosu na broj faktora rizika ($\chi^2=22,032$, $p<0,001$)(Tabela 21). Sa brojem faktora rizika povećava se i koncentracija ADMA. Daljom analizom je pokazano da statistički značajna razlika postoji između sledećih grupa: bez faktora rizika i sa dva faktora rizika ($z=-3,018$, $p=0,003$), bez faktora rizika i sa 3 ili više faktora rizika ($z=4,572$, $p<0,001$), sa 1 faktorom rizika i sa 3 ili više faktora rizika ($z=-2,505$, $p=0,012$), sa 2 faktora rizika i sa 3 faktora rizika ($z=-2,569$, $p=0,010$).

Koncentracija CRP se statistički značajno razlikuje u odnosu na broj faktora rizika ($\chi^2=36,836$, $p<0,001$). Sa brojem faktora rizika povećava se i koncentracija CRP. Post hoc analizom pokazano je da postoji statistički značajna razlika između sledećih grupa: bez faktora rizika i sa 2 faktora rizika ($z=-4,490$, $p<0,001$), bez faktora rizika i sa 3 ili više faktora rizika ($z=-4,782$, $p<0,001$), sa 1 faktorom rizika i sa 2 faktora rizika ($z=-3,234$, $p=0,001$), sa 1 faktorom rizika i sa 3 ili više faktora rizika ($z=-4,071$, $p<0,001$).

Koncentracija SAA se statistički značajno razlikuje u odnosu na broj faktora rizika ($\chi^2=34,217$, $p<0,001$). Sa povećanjem broja faktora rizika povećava se i koncentracija SAA. Post hoc analiza je pokazala da statistički značajna razlika postoji između sledećih grupa: bez faktora rizika i sa 2 faktora rizika ($z=-4,555$, $p<0,001$), bez faktora rizika i sa 3 ili više faktora rizika ($z=-4,395$, $p<0,001$), sa 1 faktorom rizika i sa 2 faktora rizika ($z=-3,407$, $p=0,001$), sa 1 faktorom rizika i sa 3 ili više faktora rizika ($z=-3,643$, $p<0,001$).

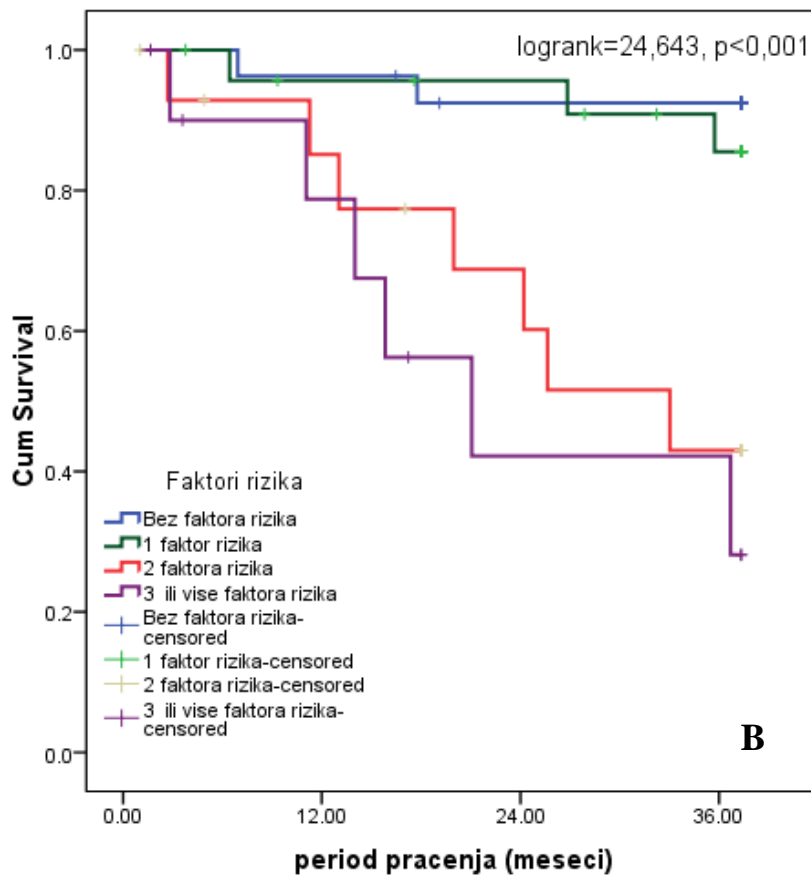
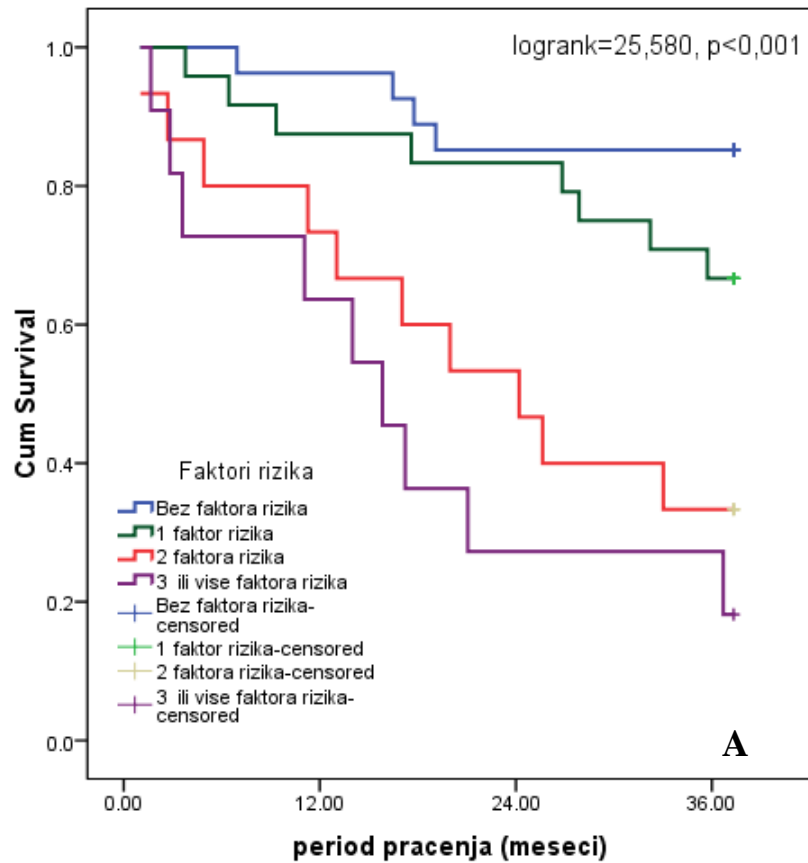
Analiza varijanse je pokazala da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji albumina u odnosu na broj faktora rizika ($F=11,439$, $p<0,001$). Sa povećanjem broja faktora rizika smanjuje se i koncentracija albumina. Post hoc analiza je utvrdila da postoji statistički značajna razlika između sledećih grupa: bez faktora rizika i sa 3 ili više faktora rizika ($p<0,001$), sa 1 faktorom rizika i sa 3 ili više faktora rizika ($p<0,001$), sa 2 faktora rizika i sa 3 ili više faktora rizika ($p=0,002$).

5.5.1. Rezultati Kaplan-Majerove analize u odnosu na broj faktora rizika

Tabela 22. Ukupno preživljavanje u odnosu na broj faktora rizika

		$\bar{X} \pm SG$ (meseci)	95% CI	p
Ukupno preživljavanje	Bez faktora rizika	34,04±1,56	30,97-37,10	<0,001
	Sa 1 faktorom rizika	31,55±2,16	27,32-35,78	
	Sa 2 faktora rizika	22,63±3,42	15,92-29,34	
	Sa 3 faktora rizika	18,06±3,94	10,34-25,79	
Preživljavanje u odnosu na kardiovaskularne uzroke smrti	Bez faktora rizika	35,45±1,31	32,89-38,01	<0,001
	Sa 1 faktorom rizika	35,40±1,38	32,70-38,10	
	Sa 2 faktora rizika	26,96±3,18	20,73-33,19	
	Sa 3 faktora rizika	23,51±4,21	15,26-31,76	

U tabeli 22 je prikazano prosečno preživljavanje u odnosu na ukupnu smrtnost u odnosu na broj faktora rizika. Analiza Kaplan-Meirove krive je pokazala da postoji statistički značajna povezanost između broja faktora rizika i dužine preživljavanja ($\logrank=25,580$, $p<0,001$) (Grafikon 19). Na osnovu analize Kaplan-Meriove krive i vrednosti log rank testa utvrđeno je da postoji statistički značajna povezanost između broja faktora rizika i dužine preživljavanja u odnosu na kardiovaskularne uzroke smrti ($\logrank=24,643$, $p<0,001$) (Grafikon 19).



Grafikon 19. Kaplan Majerova kriva ukupnog i kardiovaskularnog preživljavanja u odnosu na broj faktora rizika (A – ukupna smrtnost, B – kardiovaskularna smrtnost)

5.5.2. Rezultati Coxove regresione analize u odnosu na broj faktora rizika

Tabela 23. Coxova regresiona analiza u odnosu na broj faktora rizika – ukupna smrtnost i smrtnost od kardiovaskularnih bolesti

	Ukupna smrtnost		Smrtnost od KV bolesti	
	HR*(95%CI)	p	HR (95%CI)	p
1 FR vs bez FR	2,419 (0,728-8,034)	0,149	1,838 (0,307-11,006)	0,505
2 FR vs bez FR	6,720 (2,100-21,503)	0,001	9,924 (2,052-28,003)	0,004
3 ili više FR vs bez FR	10,455(3,193-24,227)	<0,001	14,823 (2,962-34,189)	0,001

Model je korigovan za starost, pol, pušenje, prisustvo dijabetesa i hipertenzije.

U tabeli 23 su prikazane prediktivne vrednosti za ukupnu smrtnost i smrtnost od kardiovaskularnih bolesti u odnosu na broj faktora rizika. Analiza je pokazala da pacijenti sa više faktora rizika imaju veću prediktivnu vrednost. Pacijenti sa 2 faktora rizika u odnosu na pacijente bez faktora rizika za ukupnu smrtnost imaju prediktivnu vrednost 6,720 (2,100-21,503), pacijenti sa 3 ili više faktora rizika u odnosu na pacijente bez faktora rizika imaju prediktivnu vrednost 10,445 (3,193-24,227).

U odnosu na KV smrtnost pokazano je da pacijenti sa dva faktora rizika imaju prediktivnu vrednost 9,924 (2,052-28,003) u odnosu na pacijente bez faktora rizika. Pacijenti sa tri ili više faktora rizika imaju prediktivnu vrednost 14,823 (2,962-34,189) u odnosu na pacijente bez faktora rizika.

5.6. Rezultati Hosmer-Lemeshow testa

Tabela 24. Hosmer-Lemeshow test za ispitivane markere

	Ukupna smrtnost		Kardiovaskularna smrtnost	
	X ² vrednost	P	X ² vrednost	p
ADMA	13,160	0,106	13,085	0,070
SDMA	11,277	0,186	6,320	0,611
CRP	9,502	0,219	14,026	0,055
SAA	8,297	0,258	8,131	0,321
Albumin	5,556	0,592	3,906	0,791

U tabeli 24 su prikazane vrednosti Hosmer-Lemeshow testa u odnosu na ispitivane markere. Kako su p-vrednosti veće od 0,05 može se zaključiti da je model dobro kalibrisan. Što znači da procenjena verovatnoća neželjenih događaja ne odstupa od stvarnog broja događaja.

5.7. Rezultati C-statistike i ROC kriva

Upoređivanje prediktivnih vrednosti pojedinačnih parametara i zbirno vršeno je ROC analizom. U tabeli 25 su prikazane prediktivne vrednosti (C-indeks) u odnosu na ukupnu i smrtnost od KV bolesti.

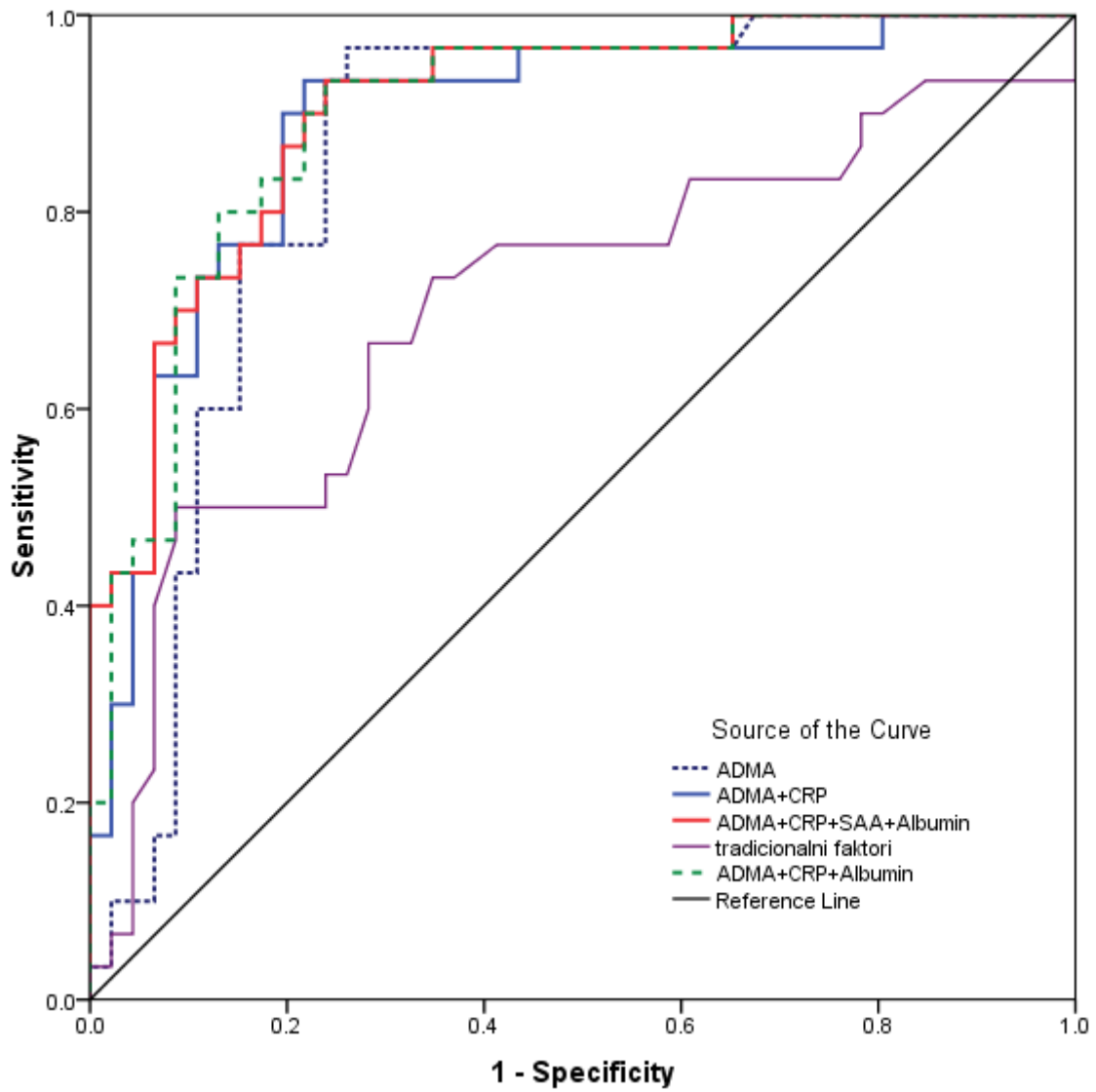
Tabela 25. C-indeks za sve ispitivane parametre i kombinacije parametara u odnosu na ukupnu i kardiovaskularnu smrtnost

	Ukupna smrtnost			Smrtnost od KV bolesti		
	C-indeks	95%CI	p	C-indeks	95%CI	p
Tradicionalni FR+	0,696	0,570-0,823	0,004	0,674	0,516-0,832	0,026
ADMA	0,857	0,769-0,945	<0,001	0,751	0,637-0,865	0,002
CRP	0,709	0,586-0,833	0,002	0,771	0,659-0,884	0,001
SAA	0,712	0,595-0,829	0,002	0,719	0,582-0,856	0,006
Albumin	0,810	0,714-0,906	<0,001	0,815	0,718-0,911	<0,001
ADMA+CRP	0,888	0,811-0,966	<0,001	0,802	0,688-0,915	<0,001
ADMA+SAA	0,875	0,790-0,959	<0,001	0,773	0,658-0,887	0,001
ADMA+Albumin	0,868	0,789-0,947	<0,001	0,800	0,702-0,897	<0,001
CRP+SAA	0,700	0,576-0,823	0,003	0,756	0,641-0,871	0,001
CRP+Albumin	0,840	0,749-0,932	<0,001	0,845	0,750-0,940	<0,001
SAA+Albumin	0,822	0,728-0,916	<0,001	0,822	0,726-0,918	<0,001
ADMA+CRP+Albumin	0,900	0,830-0,970	<0,001	0,843	0,754-0,933	<0,001
ADMA+CRP+SAA	0,885	0,808-0,962	<0,001	0,802	0,705-0,924	<0,001
CRP+SAA+Albumin	0,839	0,747-0,932	<0,001	0,851	0,757-0,946	<0,001
ADMA+CRP+SAA+Albumin	0,905	0,838-0,972	<0,001	0,844	0,753-0,953	<0,001

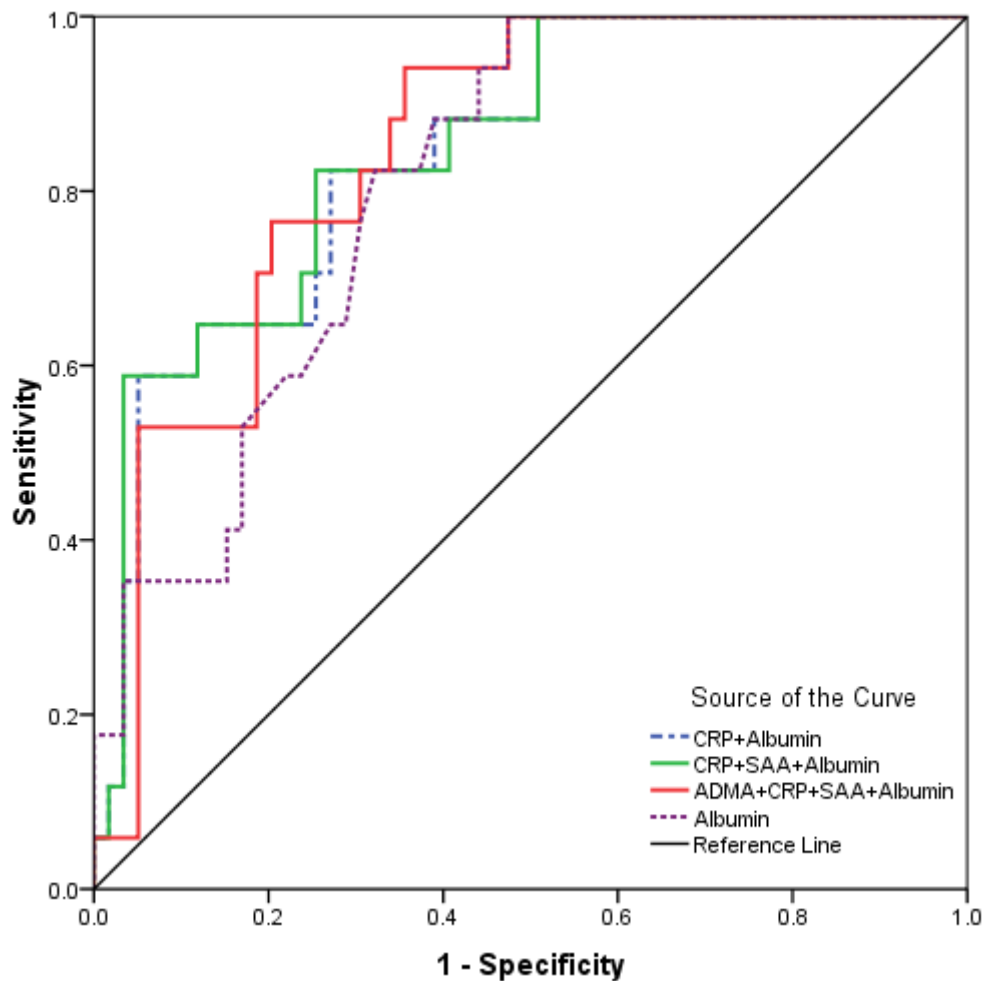
Tradicionalni faktori rizika su: starost, pol, pušenje, dijabetes i hipertenzija

ROC analiza je pokazala da su svi markeri nezavisni prediktori ukupne smrtnosti i smrtnosti od KV bolesti. Analiza je sprovedena tako što su na postojeće tradicionalne faktore rizika uključivani i novi markeri (ADMA, CRP, SAA i albumin). Najbolji marker za ukupnu smrtnost kod ispitanika je ADMA (C-indeks=0,857, $p<0,001$), a najslabiji marker je CRP (C-indeks=0,709, $p=0,002$). Najbolji marker za KV smrtnost je albumin (C-indeks=0,815, $p<0,001$), a najslabiji marker je SAA (C-indeks=0,709, $p=0,002$).

Analizirajući kombinacije dva markera za ukupnu smrtnost utvrđeno je da je najbolja kombinacija markera ADMA i CRP (C-indeks=0,888, $p<0,001$), a za smrtnost od KV bolesti najbolja kombinacija bila je CRP i albumin (C-indeks=0,845, $p<0,001$). Najbolja kombinacija tri markera za ukupnu smrtnost bila je ADMA, CRP i albumin (C-indeks=0,900, $p<0,001$), a za smrtnost od KV bolesti najbolja kombinacija bila je CRP, SAA i albumin (C-indeks=0,851, $p<0,001$). Najveći C-indeks je imala kombinacija sva 4 markera kod ukupne smrtnosti (C-indeks=0,905, $p<0,001$), a kod smrtnosti od KV bolesti najveći C-indeks bio je za kombinaciju tri markera CRP, SAA i albumin. Na grafikonu 20. su prikazane ROC krive markera ili kombinacije markera koje su imale najveći C-indeks u odnosu na ukupnu smrtnost, a na grafikonu 21 su prikazane najveće vrednosti C-indeksa u odnosu na kardiovaskularnu smrtnost.



Grafikon 20. ROC krive za različite kombinacije markera u odnosu ukupnu smrtnost



Grafikon 21. ROC krive za različite kombinacije markera u odnosu na smrtnost od KV bolesti

5.8. Rezultati tabela reklasifikacije

Za sve potencijalne prediktore ukupne i kardiovaskularne smrtnosti formirane su tabele reklasifikacije dodavanjem na tradicionalne faktore rizika. Na osnovu tabela reklasifikacije izračunat je indeks reklasifikacije mreža NRI (engl. Net Reclassification Index), 95% interval poverenja (95% CI) i p-vrednost.

5.8.1. Rezultati tabela reklasifikacije u odnosu na ukupnu smrtnost

U tabelama su prikazani reklasifikovani pacijenti, NRI, kao i p-vrednost. Pacijenti koji su prikazani po dijagonali tabele reklasifikacije su klasifikovani u grupu sa istim rizikom i na osnovu tradicionalnih faktora rizika, kao i na osnovu novih faktora rizika. Boldirani pacijenti u tabelama su reklasifikovani.

Tabela 26. Tabela reklasifikacije dodavanjem ADMA u odnosu na ukupnu smrtnost

Tradicionalni faktori rizika	Preminuli ispitanici		
	Model: tradicionalni faktori rizika + ADMA		
	<0,6%	6-20%	>20%
<0,6%	0	1	2
6-20%	0	4	6
>20%	0	1	47
Tradicionalni faktori rizika	Preživeli ispitanici		
	Model: tradicionalni faktori rizika + ADMA		
	<0,6%	6-20%	>20%
<0,6%	0	0	0
6-20%	10	15	2
>20%	0	5	60

Dodavanjem ADMA kao prediktora na model tradicionalnih faktora rizika 10 preminulih pacijenata (16,4%) i 17 preživelih (25,8%) je reklasifikovano (NRI=1,01 (95%CI 0,680-1,343) $p<0,001$). U grupi preminulih pacijenata njih 9 (90,0%) je reklasifikovano u grupu sa višim rizikom, a 1 pacijent (10,0%) je reklasifikovan u grupu sa nižim rizikom. U grupi preživelih, 15 pacijenata (88,2%) je reklasifikovano u niži rizik, a 2 pacijenata (11,8%) je reklasifikovano u viši rizik. U kategoriji srednjeg rizika kod preživelih je ostalo 15 pacijenata (16,3%)(Tabela 26).

Tabela 27. Tabela reklasifikacije dodavanjem CRP u odnosu na ukupnu smrtnost

Tradicionalni faktori rizika	Preminuli ispitanici		
	Model: tradicionalni faktori rizika + CRP		
	<0,6%	6-20%	>20%
<0,6%	0	0	0
6-20%	0	8	5
>20%	0	2	46
Tradicionalni faktori rizika	Preživeli ispitanici		
	Model: tradicionalni faktori rizika + CRP		
	<0,6%	6-20%	>20%
<0,6%	0	0	0
6-20%	0	14	4
>20%	0	14	60

Dodavanjem CRP kao prediktora na model tradicionalnih faktora rizika 7 preminulih pacijenata (11,5%) i 18 preživelih pacijenata (19,5%) je reklasifikovano (NRI=0,57 (95%CI 0,239-0,901) $p<0,001$). Od ukupnog broja reklasifikovanih pacijenata 5 preminulih pacijenata (71,4%) je reklasifikovano u viši rizik, a 2 pacijenata (28,6%) je reklasifikovano u niži rizik. U grupi preživelih pacijenata 14 (77,8 %) je reklasifikovano u niži rizik, a 4 pacijenata (22,2%) su reklasifikovani u viši rizik. Među preživelim pacijentima 14 pacijenata (15,2%) je i dalje u kategoriji srednjeg rizika (Tabela 27).

Tabela 28. Tabela reklasifikacije dodavanjem SAA u odnosu na ukupnu smrtnost

Tradicionalni faktori rizika	Preminuli ispitanici Model: tradicionalni faktori rizika + SAA		
	<0,6%	6-20%	>20%
<0,6%	0	0	0
6-20%	0	8	4
>20%	0	1	48
Tradicionalni faktori rizika	Preživeli ispitanici Model: tradicionalni faktori rizika + SAA		
	<0,6%	6-20%	>20%
<0,6%	0	0	0
6-20%	0	18	4
>20%	0	7	63

Dodavanjem SAA kao prediktora na model tradicionalnih faktora rizika 5 preminulih pacijenata (8,2%) i 11 preživelih pacijenata (12,0%) je reklasifikovano (NRI=0,37 (95%CI 0,041-0,705) p=0,027). Od 5 pacijenata u grupi preminulih 4 (80,0%) su reklasifikovana u viši rizik, a 1 pacijent (20,0%) je reklasifikovan u niži rizik. Većina preživelih pacijenata (63,6%) je reklasifikovana u niži rizik, a 36,4% je reklasifikovano u viši rizik. U kategoriji srednjeg rizika nakon procene na osnovu tradicionalnih faktora rizika i SAA ostalo je 18 pacijenata (19,6%)(Tabela 28).

Tabela 29. Tabela reklasifikacije dodavanjem albumina u odnosu na ukupnu smrtnost

Tradicionalni faktori rizika	Preminuli ispitanici Model: tradicionalni faktori rizika + Albumin		
	<0,6%	6-20%	>20%
<0,6%	0	0	0
6-20%	5	0	7
>20%	0	0	49
Tradicionalni faktori rizika	Preživeli ispitanici Model: tradicionalni faktori rizika + Albumin		
	<0,6%	6-20%	>20%
<0,6%	0	0	0
6-20%	2	13	3
>20%	6	29	39

Dodavanjem albumina kao prediktora na model tradicionalnih faktora rizika reklasifikovano je 12 preminulih pacijenata (19,7%) i 40 preživelih (43,5%) (NRI=0,67 (95%CI 0,341-1,011) p<0,001). U grupi preminulih pacijenata, 7 (58,3%) je reklasifikovano u viši rizik, a 5 (41,7%) u niži rizik. Među preživelim, 37 pacijenata (92,5%) je reklasifikovano u niži rizik, a 3 pacijenta (7,5%) u viši rizik. U kategoriji srednjeg rizika je ostalo 13 preživelih pacijenata (14,1%)(Tabela 29).

Tabela30. Tabela reklasifikacije dodavanjem ADMA i albumina u odnosu na ukupnu smrtnost

Tradicionalni faktori rizika	Preminuli ispitanici		
	Model: tradicionalni faktori rizika + ADMA + Albumin		
	<0,6%	6-20%	>20%
<0,6%	0	0	1
6-20%	0	3	9
>20%	0	0	49
Tradicionalni faktori rizika	Preživeli ispitanici		
	Model: tradicionalni faktori rizika + ADMA+Albumin		
	<0,6%	6-20%	>20%
<0,6%	0	0	0
6-20%	7	8	3
>20%	17	29	28

Dodavanjem ADMA i albumina kao prediktora na model tradicionalnih faktora rizika 10 preminulih pacijenata (16,4%) i 56 preživelih pacijenata (60,8%) je reklasifikovano u veći rizik (NRI=0,83 (95%CI 0,491-1,161) $p<0,001$). Dodavanjem ova dva markera svi preminuli pacijenti su reklasifikovani u viši rizik. U grupi preživelih pacijenata 94,6% je reklasifikovano u niži rizik, a 5,4% pacijenata je reklasifikovano u viši rizik. U kategoriji srednjeg rizika je ostalo 8 pacijenata (8,7%)(Tabela 30).

Tabela31. Tabela reklasifikacije dodavanjem ADMA, CRP i albumina odnosu na ukupnu smrtnost

Tradicionalni faktori rizika	Preminuli ispitanici		
	Model: tradicionalni faktori rizika + ADMA + CRP + Albumin		
	<0,6%	6-20%	>20%
<0,6%	0	0	1
6-20%	3	0	8
>20%	0	3	47
Tradicionalni faktori rizika	Preživeli ispitanici		
	Model: tradicionalni faktori rizika+ ADMA + CRP + Albumin		
	<0,6%	6-20%	>20%
<0,6%	0	0	0
6-20%	9	8	5
>20%	19	18	33

Dodavanjem ADMA, CRP i albumina kao prediktora na model tradicionalnih faktora rizika 15 preminulih pacijenata (24,6%) i 51 preživeli pacijent (55,4%) su reklasifikovani u veći rizik (NRI=1,00 (95%CI 0,769-1,432) $p<0,001$). Dodavanjem ova tri markera na model tradicionalnih faktora rizika 9 preminulih pacijenata (60,0%) je reklasifikovano u viši rizik, a 6 preminulih (40,0%) u niži rizik. U grupi preživelih, 46 pacijenata (90,2%) je reklasifikovano u niži rizik, a 5 pacijenata (9,8%) u viši rizik. U kategoriji srednjeg rizika ostalo je 8 preživelih pacijenata (8,7%)(Tabela 31).

Tabela 32. Tabela reklasifikacije dodavanjem ADMA, CRP, SAA i albumina u odnosu na ukupnu smrtnost

Tradicionalni faktori rizika	Preminuli ispitanici		
	Model: tradicionalni faktori rizika + ADMA + CRP + SAA + Albumin		
	<0,6%	6-20%	>20%
<0,6%	0	0	1
6-20%	3	0	8
>20%	0	3	47
Tradicionalni faktori rizika	Preživeli ispitanici		
	Model: tradicionalni faktori rizika + ADMA + CRP + SAA + Albumin		
	<0,6%	6-20%	>20%
<0,6%	0	0	0
6-20%	9	8	5
>20%	24	14	32

Dodavanjem ADMA, CRP, SAA i albumina kao prediktora na model tradicionalnih faktora rizika 15 preminulih pacijenata (24,6%) i 52 preživela pacijenta (56,5%) su reklasifikovani u veći rizik (NRI=1,17 (95%CI 0,842-1,504), $p<0,001$). Dodavanjem svih ispitivanih markera na model tradicionalnih faktora rizika u grupi preminulih, 9 pacijenata (60,0%) je reklasifikovano u viši rizik, a 40,0% preminulih pacijenata (njih 6) je reklasifikovano u niži rizik. U grupi preživelih, 47 pacijenata (90,4%) je reklasifikovano u niži rizik, a 5 pacijenata (9,6%) je reklasifikovano u viši rizik. U kategoriji srednjeg rizika je ostalo 8 preživelih pacijenata (8,8%)(Tabela 32).

Na osnovu tabela reklasifikacije može se zaključiti da je najveći NRI kada su u model uključena sva četiri markera (NRI=1,17), zatim kada je u model uključen ADMA (NRI=1,01), a gotovo istu vrednosti indeksa dobijen je kada su u model uključeni ADMA, CRP i albumin (NRI=1,00).

5.8.2. Rezultati tabela reklasifikacije u odnosu na smrtnost od kardiovaskularnih bolesti

Tabela 33. Tabela reklasifikacije dodavanjem ADMA u odnosu na kardiovaskularnu smrtnost

Tradicionalni faktori rizika	Preminuli ispitanici		
	Model: tradicionalni faktori rizika + ADMA		
	<0,6%	6-20%	>20%
<0,6%	5	0	0
6-20%	0	10	0
>20%	0	0	22
Tradicionalni faktori rizika	Preživeli ispitanici		
	Model: tradicionalni faktori rizika + ADMA		
	<0,6%	6-20%	>20%
<0,6%	6	1	0
6-20%	6	45	5
>20%	0	5	24

Dodavanjem ADMA kao prediktora na model tradicionalnih faktora rizika u odnosu na kardiovaskularnu smrtnost nijedan od preminulih pacijenata nije reklasifikovan, a 16 preživelih pacijenata (17,4%) je reklasifikovano (NRI=0,64 (95%CI 0,239-1,039) $p=0,002$). U grupi

preživelih, 11 pacijenata (68,8%) je reklasifikovano u niži rizik, a 5 pacijenata (31,2%) je reklasifikovano u viši rizik. U kategoriji srednjeg rizika je ostalo 45 preživelih pacijenata (48,9%)(Tabela 33).

Tabela 34. Tabela reklasifikacije dodavanjem CRP u odnosu na kardiovaskularnu smrtnost

Tradicionalni faktori rizika	Preminuli ispitanici Model: tradicionalni faktori rizika + CRP		
	<0,6%	6-20%	>20%
<0,6%	2	0	0
6-20%	2	4	5
>20%	0	2	22
Tradicionalni faktori rizika	Preživeli ispitanici Model: tradicionalni faktori rizika + CRP		
	<0,6%	6-20%	>20%
<0,6%	6	4	0
6-20%	7	39	7
>20%	0	8	21

Dodavanjem CRP kao prediktora na model tradicionalnih faktora rizika 9 preminulih pacijenata (24,3%) i 26 preživelih pacijenata (28,3%) je reklasifikovano (NRI=0,40 (95%CI 0,002-0,802) p=0,048). Dodavanjem ovog markera u grupi preminulih, 5 pacijenata (55,6%) je reklasifikovano u viši rizik, a 4 pacijenta (44,4%) u niži rizik. Među preživelim, 15 pacijenata (57,7%) je reklasifikovano u niži rizik, a 11 pacijenata (42,3%) u viši rizik. U kategoriji srednjeg rizika ostalo je 39 preživelih pacijenata (42,4%)(Tabela 34).

Tabela 35. Tabela reklasifikacije dodavanjem SAA u odnosu na kardiovaskularnu smrtnost

Tradicionalni faktori rizika	Preminuli ispitanici Model: tradicionalni faktori rizika + SAA		
	<0,6%	6-20%	>20%
<0,6%	3	0	0
6-20%	0	10	0
>20%	0	0	24
Tradicionalni faktori rizika	Preživeli ispitanici Model: tradicionalni faktori rizika + SAA		
	<0,6%	6-20%	>20%
<0,6%	13	1	0
6-20%	5	40	2
>20%	0	3	28

Dodavanjem SAA kao prediktora na model tradicionalnih faktora rizika nijedan od preminulih pacijenata nije reklasifikovan, a 10 preživelih pacijenata (10,9%) je reklasifikovano (NRI=0,52 (95%CI 0,119-0,918) p=0,011). Od ukupnog broja reklasifikovanih, 8 preživelih pacijenata (80,0%) je pomeren u kategoriju nižeg rizika, a 2 pacijenta (20,0%) je pomeren u kategoriju višeg rizika dodavanjem SAA na model tradicionalnih faktora rizika. U kategoriji srednjeg rizika ostalo je 40 pacijenata (43,5%) (Tabela 35).

Tabela 36. Tabela reklasifikacije dodavanjem albumina u odnosu na kardiovaskularnu smrtnost

Tradicionalni faktori rizika	Preminuli ispitanici Model: tradicionalni faktori rizika + Albumin		
	<0,6%	6-20%	>20%
<0,6%	0	3	0
6-20%	0	6	3
>20%	0	5	20
Tradicionalni faktori rizika	Preživeli ispitanici Model: tradicionalni faktori rizika + Albumin		
	<0,6%	6-20%	>20%
<0,6%	5	0	1
6-20%	35	16	8
>20%	7	8	19

Dodavanjem albumina kao prediktora na model tradicionalnih faktora rizika 11 preminulih pacijenata (29,7%) i 59 preživelih pacijenata (50,8%) je reklasifikovano (NRI=1,01 (95%CI 0,704-1,504) $p<0,001$). Od ukupnog broja reklasifikovanih preminulih pacijenata 6 pacijenata (54,5%) je pomeren u kategoriju višeg rizika, a 5 pacijenata (45,5%) je pomeren u kategoriju nižeg rizika. U grupi preminulih, od ukupnog broja reklasifikovanih pacijenata 50 pacijenata (84,7%) je reklasifikovano u niži rizik, a 9 pacijenata (15,3%) je reklasifikovano u viši rizik. U kategoriji srednjeg rizika je ostalo 16 preživelih pacijenata (17,4%)(Tabela 36).

Tabela 37. Tabela reklasifikacije dodavanjem ADMA, albumina odnosu na kardiovaskularnu smrtnost

Tradicionalni faktori rizika	Preminuli ispitanici Model: tradicionalni faktori rizika + ADMA + Albumin		
	<0,6%	6-20%	>20%
<0,6%	0	4	1
6-20%	0	4	2
>20%	0	4	22
Tradicionalni faktori rizika	Preživeli ispitanici Model: tradicionalni faktori rizika + Albumin		
	<0,6%	6-20%	>20%
<0,6%	5	0	1
6-20%	35	10	10
>20%	7	8	16

Dodavanjem ADMA i albumina kao prediktora na model tradicionalnih faktora rizika 11 preminulih pacijenata (29,7%) i 61 preživeli pacijenat (66,3%) su reklasifikovani (NRI=1,01 (95%CI 0,709-1,499) $p<0,001$). Dodavanjem ova dva markera od ukupnog broja reklasifikovanih pacijenata u grupi preminulih, 7 pacijenata (63,6%) je pomeren u kategoriju višeg rizika, a 4 pacijenta (36,4%) je pomeren u kategoriju nižeg rizika. U grupi preživelih, od ukupnog broja reklasifikovanih pacijenata njih 50 (81,9%) je pomeren u kategoriju nižeg rizika, a 11 je reklasifikovano u kategoriju višeg rizika (18,1%). U kategoriji srednjeg rizika

dodavanjem ova dva merker na model tradicionalnih faktora rizika je ostalo 10 preživelih pacijenata (10,9%)(Tabela 37).

Tabela 38. Tabela reklasifikacije dodavanjem ADMA, CRP i albumina u odnosu na kardiovaskularnu smrtnost

Tradicionalni faktori rizika	Preminuli ispitanici		
	Model: tradicionalni faktori rizika + ADMA + CRP + Albumin		
	<0,6%	6-20%	>20%
<0,6%	0	4	1
6-20%	0	4	2
>20%	0	5	21
Tradicionalni faktori rizika	Preživeli ispitanici		
	Model: tradicionalni faktori rizika + ADMA + CRP + Albumin		
	<0,6%	6-20%	>20%
<0,6%	6	2	1
6-20%	38	8	12
>20%	7	14	4

Dodavanjem ADMA, CRP i albumina kao prediktora na model tradicionalnih faktora rizika 12 preminulih pacijenata (32,4%) i 74 preživela pacijenta (63,8%) su reklasifikovani (NRI=1,12 (95%CI 0,721-1,520) $p<0,001$). Dodavanjem ova tri markera od ukupnog broja reklasifikovanih pacijenata u grupi preminulih, 7 pacijenata (58,3%) je pomeren u kategoriju višeg rizika, a 5 pacijenata (41,7%) u kategoriju nižeg rizika. U grupi preživelih, od ukupnog broja reklasifikovanih 60 pacijenata (81,1%) u kategoriju nižeg rizika, a 14 pacijenata reklasifikovano u kategoriju višeg rizika (18,9%). U kategoriji srednjeg rizika dodavanjem ova dva merker na model tradicionalnih faktora rizika je ostalo 8 preživelih pacijenata (8,7%)(Tabela 38).

Tabela 39. Tabela reklasifikacije dodavanjem ADMA, CRP, SAA i albumina u odnosu na kardiovaskularnu smrtnost

Tradicionalni faktori rizika	Preminuli ispitanici		
	Model: tradicionalni faktori rizika + ADMA + CRP + SAA + Albumin		
	<0,6%	6-20%	>20%
<0,6%	0	4	1
6-20%	0	4	2
>20%	0	5	21
Tradicionalni faktori rizika	Preživeli ispitanici		
	Model: tradicionalni faktori rizika + ADMA + CRP + SAA + Albumin		
	<0,6%	6-20%	>20%
<0,6%	4	0	1
6-20%	40	4	10
>20%	7	16	10

Dodavanjem ADMA, CRP, SAA i albumina kao prediktora na model tradicionalnih faktora rizika 12 preminulih pacijenata (32,4%) i 74 preživela pacijenta (63,8%) su reklasifikovani (NRI=1,13 (95%CI 0,720-1,529) $p<0,001$). Dodavanjem sva 4 markera od ukupnog broja reklasifikovanih pacijenata u grupi preminulih, 7 pacijenata (58,3%) je pomeren u kategoriju višeg rizika, a 5 pacijenata (41,7%) je pomeren u kategoriju nižeg rizika. U grupi preživelih,

od ukupnog broja reklasifikovanih pacijenata 63 (85,1%) su pomereni u kategoriju nižeg rizika, a 11 pacijenata je reklasifikovano u kategoriju višeg rizika (14,9%). U kategoriji srednjeg rizika dodavanjem ova dva markera na model tradicionalnih faktora rizika su ostala 4 preživela pacijenta (4,3%)(Tabela 39).

Na osnovu tabela reklasifikacije može se zaključiti da je najveći NRI za procenu kardiovaskularne smrtnosti dobijen kada su u model uključeni ADMA, CRP i albumin (NRI=1,13), a gotovo istu vrednost indeksa dobili smo kada su u model uključena sva četiri markera (NRI=1,12). Posmatrajući pojedinačne karakteristike markera najveći NRI je imao albumin.

6. DISKUSIJA

Bolesnici na hemodijalizi predstavljaju veliki medicinski i socio-ekonomski problem. Prema proceni, 2010. godine u svetu je bilo oko 2,5 miliona bolesnika na hemodijalizi (133). U razvijenim zemljama se procenjuje da je godišnji porast bolesnika sa HBI oko 5-8%. Iako se radi o relativno maloj populaciji, troškovi dijalize, posebno takozvani skriveni troškovi dijalize, koji se odnose pre svega na kardiovaskularne komplikacije, su ogromni. U Evropi je procenjeno da za manje od 0,1% bolesnika koji su na dijalizi odlazi 2% zdravstvenog budžeta(134). Istraživanja koja se bave procenom rizika su trenutno u fokusu jer se radi o populaciji koju karakteriše rastuća prevalenca i incidenca, veliki troškovi zamene bubrežne funkcije, značajno smanjenje kvaliteta života i prevremena smrt.

Ova studija je dizajnirana sa ciljem procene rizika kod bolesnika na dijalizi. Posmatrajući opšte karakteristike ispitanika koji su uključeni u ovu studiju pokazano je da postoji statistički značajna razlika u strukturi prema polu. Od ukupnog broja ispitanika bilo je 106 muškaraca i 48 žena. Ovakve rezultate su dobile još neke studije(135, 136). Smatra se da je veća zastupljenost muškaraca među bolesnicima na hemodijalizi. Gledano sa epidemiološke strane, prevalenca HBV kod naših bolesnika od 11,7% je visoka u odnosu na vrednosti prevalencije u Evropi koji se kreću oko 6% (137). Prevalenca HCV u ispitivanoj populaciji je bila vrlo visoka – 54,5%. Prema literaturnim podacima prevalenca hepatitisa C kod ovih ispitanika se kreće od 3-60% (138).

6.1. Koncentracija ADMA kod pacijenata na dijalizi

Naše istraživanje je pokazalo da pacijenti na dijalizi imaju povećanu koncentraciju ADMA u odnosu na zdravu populaciju. Rezultati našeg istraživanja su u skladu sa brojnim studijama koje su dokazale povišene vrednosti ADMA kod pacijenata na dijalizi. Vallance i sar.(48) su prvi pokazali da se kod pacijenata sa terminalnom bubrežnom insuficijencijom akumulira ADMA. U ovoj studiji bilo uključeno 9 pacijenata na dijalizi i 6 zdravih dobrovoljaca; analitički metod nije dozvoljavao razdvajanje ADMA i SDMA, ali rezultati ove studije su potvrđeni u kasnijim istraživanjima.

Brojne studije su pokazale da je koncentracija ADMA povećana kod pacijenata na dijalizi u odnosu na ispitanike u kontrolnoj grupi. su pokazali da. U studiji Zoccali-ja i saradnika(53) vrednosti praćenih markera su takođe bile povišene kod pacijenata na dijalizi (uključeno 225 pacijenata) i one su iznosile - ADMA 2,52 $\mu\text{mol/L}$ i SDMA 3,01 $\mu\text{mol/L}$. Uzun

i sar. (139) su, takođe, pokazali da je kod pacijenata na dijalizi povećana koncentracija ADMA (1,26 $\mu\text{mol/L}$). Slične rezultate su dobili i u studiji koja je nedavno objavljena sa 250 pacijenata na dijalizi (78). Shi i sar. (140) su pokazali da je koncentracija ADMA povećana kod pacijenata sa HBI. Koncentracija ADMA se u ispitivanim studijama kretala u opsegu 0,70-2,52 $\mu\text{mol/L}$ (53, 76, 79, 80, 141-143). Pokazanje statistički značajan porast ADMA sa progresijom hronične bubrežne slabosti.

Koncentracija ADMA kod pacijenata na dijalizi u našem istraživanju je dva puta veća u odnosu na zdrave ispitanike, što je u skladu sa dosadašnjim istraživanjima. Odnos ADMA kod pacijenata sa HBI u odnosu na zdrave dobrovoljce se kreće u opsegu od 2-12 puta (47).

Smatra se da DDAH ima centralnu ulogu u povećanju koncentracije ADMA kod pacijenata na dijalizi. Prvi dokazi da je DDAH ključni regulator puta sinteze NO je istraživanje u kome je korišćen inhibitor ovog enzima, 4124W. Primena 4124W u izolovanom vaskularnom segmentu dovela je do vazokonstrikcije. Zatim je dodavanjem arginina došlo do gubitka vazokonstiktornog efekta (144). Ovo je jedna od prvih studija na osnovu kojih se moglo zaključiti da je sinteza ADMA stalan proces koji se odvija paralelno i u skladu sa metabolizmom proteina. Kod transgenih DDAH miševa je pokazano da povećanje aktivnosti ovog enzima dovodi do smanjenja koncentracije ADMA za 50%. Smanjenje ADMA je praćeno povećanom aktivnošću NOS (145).

Promena aktivnosti ovog enzima je deo vrlo složenog regulatornog sistema koji do sada nije potpuno razjašnjen. Oksidativni stres je jedan od faktora koji utiču na smanjenje aktivnosti enzima DDAH, dovodeći do akumulacije ADMA (146). Brojni su patološki stimulusi koji dovode do oksidativnog stresa u endotelu: oksidisane LDL partikule, inflamatorni citokini, hiperhomocistinemija, hiperglikemija i različiti infektivni agensi. Ovi stimulusi dovode do promene aktivnosti DDAH, kako *in vitro*, tako i *in vivo* uslovima. Smatra se da smanjenja aktivnost ovog enzima predstavlja mehanizam kojim kardiovaskularni faktori rizika utiču na put sinteze NO.

Najvećim delom ADMA se metaboliše uz pomoć enzima DDAH (oko 85%), samo manjim delom se izlučuje putem bubrega (oko 15%). Pri početnom smanjenju funkcije bubrega dolazi do neznatnog povećanja koncentracije ADMA, jer se ADMA metaboliše preko svog enzima. Sa progresijom bolesti, patološke promene na bubrezima verovatno ne samo da utiču na ekskreciju ADMA, već utiču i na nivo metabolizma ADMA, odnosno na aktivnost DDAH, koji je visoko eksprimiran u ovim tkivima. Varijabilnost u porastu koncentracije ADMA zavisi od varijabilnosti u aktivnosti enzima DDAH. Različita ekspresija ovog enzima na nivou bubrega može biti posledica različite renalne patologije.

Izmerena je povećana koncentracija ADMA kod pacijenata od 2-5. stadijuma HBI (147). Kod ovih pacijenata koncentracija ADMA obrnuto korelira sa nivoom glomerularne filtracije. Moguće je da akumulacija ove supstance potencira mikrovaskularna oštećenja i gubitak nefrona. Kod mlađih ispitanika, sa srednjom do umereno teškom bubrežnom insuficijencijom koji nisu imali dijabetes, takođe je utvrđeno da je ADMA povišen (93). Povećana koncentracija ADMA koja hronično perzistira dovodi do progresije renovaskularne bolesti pre svega oštećenjem endotela koje nastaje kao posledica inhibicije sinteze NO.

Nedavne eksperimentalne studije su ukazale na mogućnost da NO direktno reguliše DDAH aktivnost S-nitrozilacijom njenog aktivnog mesta. Postoji mogućnost da se na ovaj način formira regulatorna feed-back petlja između NO, DDAH, ADMA i NOS (148). U uslovima inflamacije inducibilna NOS povećava sintezu NO, a S-nitrozilacija dovodi do smanjenja aktivnosti DDAH i akumulacije ADMA koja inhibira NOS. Na ovakvoj pretpostavci se bazira mehanizam negativne povratne sprege koji bi mogao delom da objasni povezanost infekcije, inflamacije i ateroskleroze (149). Ova pretpostavka je dodatno potkrepljena činjenicom da ADMA značajno doprinosi povećanju renovaskularne rezistencije tokom starenja i smanjenju renalne perfuzije (150). Na osnovu ovih studija može se zaključiti da i minorno smanjenje renalne funkcije vodi ka povećanju koncentracije ADMA. Najjači dokaz da ADMA značajno utiče na vaskulaturu je dobijen kod DDAH1 knock-out miševa. Kod homozigota se nisu razvili, a kod heterozigota je bila povećana koncentracija ADMA, koja je bila praćena hipertenzijom (151).

Na osnovu dosadašnjih istraživanja nedvosmisleno je pokazano da je koncentracija ADMA povećana kod pacijenata na dijalizi, ali je primećena velika varijabilnost u njenoj koncentraciji. Kao glavni razlozi za veliku varijabilnost u vrednostima ADMA navode se razlike u interindividualnim i intraindividualnim vrednostima, kao i u izboru metode kojom se vrši merenje. Vrednosti ADMA rastu tokom starenja. Teerlink i sar. (152) su pokazali varijacije u vrednostima ADMA od 12% kod ispitanika starosti 50-75 godina. Biološka aktivnost NO se smatra važnim funkcionalnim i strukturalnim faktorom koji doprinosi promenama u bubregu tokom starenja. Endotelna disfunkcija, bilo merena hemodinamski kroz odgovor na acetilholin ili uz pomoć biomarkera, progresivno se razvija tokom starenja i zahvata sve više i bubrežni endotel. ADMA verovatno predstavlja uzročni faktor u funkcionalnim i strukturalnim promenama bubrega. Kod starih pacova je pokazano da je povećana koncentracija ADMA povezana ne samo sa smanjenjem sinteze NO (153), već i sa smanjenjem renalnog protoka krvi (154) i sa pojavom proteinurije (155).

Genetske studije su potvrdile da je NO nefroprotektivan faktor. Polimorfizam NOS3 koji karakteriše smanjena aktivnost NOS je češći kod pacijenata sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom. Smanjena biološka raspoloživost NO je bitan faktor u progresiji nefropatija (81). S druge strane, otkrivanje polimorfizma za promoter DDAH II može biti interesanto, jer individualne razlike u metabolizmu ADMA teoretski vode ka različitoj individualnoj sklonosti ka razvoju ateroskleroze i kardiovaskularnih bolesti (156).

Takođe je utvrđena razlika u vrednostima kod istih ispitanika merena tokom određenog vremenskog perioda. Smatra se da vrednosti ADMA, SDMA i arginina zavise od metabolizma proteina (157). Osim toga, značajnu ulogu u varijaciji vrednosti ADMA ima izbor metode. Kao najčešće dve metode koje se koriste navode se HPLC i ELISA. Pregledom literature može se reći da je određivanje ADMA HPLC metodom zastupljenije. Radi se o vrlo senzitivnoj metodi koja je skuplja i duža za izvođenje u odnosu na ELISA, zahteva rad u specijalizovanim laboratorijama, ali se dobijaju manje vrednosti. Nedostatak ove metode je što i pored brojnih modifikacija, nije automatizovana, već dosta zavisi od ljudskog faktora. Prednost ELISA tehnike je što je jeftinija, automatizovana, ali je pokazano da se dobijaju veće vrednosti. Ipak, bez obzira koja se metoda primenjuje glavni nedostatak za standardizaciju je veliko preklapanje vrednosti u zdravoj populaciji u odnosu na pacijente sa HBI (157, 158).

Ovim istraživanjem je potvrđena hipoteza da je koncentracija SDMA povećana kod bolesnika na hemodijalizi u odnosu na zdrave dobrovoljce. Koncentracija SDMA je nešto više od dva puta veća u odnosu na koncentraciju ADMA. Ovakav odnos je zabeležen u još nekoliko studija sprovedenih kod bolesnika na hemodijalizi (79, 159, 160). Veća akumulacija SDMA ukazuje na jaku povezanost renalne ekskrecije sa ovim jedinjenjem, što je pokazano i kroz korelacionu analizu. Zbog veće koncentracije SDMA u plazmi i biološkim tečnostima ovaj dimetilarginin je vrlo jak kompetitor argininu za ulazak u ćeliju. Na ovaj način SDMA predstavlja snažan faktor koji ometa dostupnost ove aminokiseline za sintezu NO.

6.1.1. Koncentracija ADMA kod hipertenzivnih pacijenata na dijalizi

NO je glavni regulator bubrežne funkcije i primarni faktor u dugoročnoj regulaciji arterijske tenzije. Ovaj koncept je dokazan eksperimentalnim modelom gde je intrarenalna supresija sinteze NO dovela do sistemske hipertenzije kod miševa. Efekti NO na nivou bubrega su sledeći: vazodilatacija i aferentnih i eferentnih arteriola, povećani nivo glomerularne filtracije. NO utiče i na reapsorpciju natrijuma na nivou distalnih i sabirnih tubula. Renalni efekti NO su povezani i sa efektima renin-angiotenzin sistema jer NO utiče na sekreciju renina (161). Tri izoforme NO sintaze su različito eksprimirane na nivou proksimalnih i distalnih tubula.

Aktivnost NO sintaze tip 1 i 2 direktno zavisi od intracelularne vrednosti pH. Acidoza dovodi do inhibicije ovih tipova NO sinteze. Ovaj efekat zavisi od direktnog delovanja protona na enzim i od sposobnosti NADPH oksidaze, da tokom sinteze NO preuzme elektrone sa NO sintaze u uslovima acidoze, što vodi ka sintezi superoksidnih radikala, tako da je superoksidni radikal glavni kontrolni faktor biorasploživosti NO. Ovaj način regulacije otežava činjenica da je optimalna pH vrednost za DDAH koji razgrađuje ADMA oko 7,4. Dakle, acidoza dovodi do povećanja koncentracije ADMA *in vivo*, što inhibira produkciju NO (81).

Acidoza, produkcija superoksidnih radikala i inhibicija sinteze NO su najznačajnije karakteristike koje dovode do natrijum-zavisne hipertenzije kod eksperimentalnih životinja i u humanoj populaciji(162). Studija na eksperimentalnim životinjama je pokazala da postoji povezanost između koncentracije ADMA i vrednosti krvnog pritiska (82). Davanje infuzije ADMA kod zdravih ispitanika uzrokuje dozno-zavisno smanjenje renalnog protoka i povećanje renalne vaskularne rezistencije bez promene u nivou glomerularne filtracije(163). Veći broj studija je pokazao povezanost između koncentracije ADMA i hipertenzije. Dva su osnovna mehanizma kojima ADMA učestvuje u patogenezi hipertenzije: ADMA potencira vazokonstriktorni efekat inhibicijom sinteze NO i inhibicijom ekskrecije natrijuma na nivou bubrega, posredno smanjenjem sinteze NO. S druge strane, krvni pritisak može da dovede do dodatnog povećanja koncentracije ADMA preko "up-regulation" aktivnosti PRMT enzima. U kulturi ćelija je pokazano da stres dovodi do povećanja sinteze mRNK za PRMT enzim aktivacijom NF- κ B (88). Slobodni radikali koji su nastali kao posledica delovanja angiotenzina II učestvuju u povećanju koncentracije ADMA. Zbog smanjene aktivnosti DDAH, stvaranje slobodnih radikala pod uticajem angiotenzina II dovodi do aktivacije NF- κ B, što je dokazano smanjenjem koncentracije ADMA kod hipertenzivnih pacijenata nakon terapije inhibitorima angiotenzinskih receptora (164).

U našoj studiji prevalenca hipertenzije je bila 60,0%. Na osnovu vrednosti ADMA utvrđeno je da ona nije povišena kod hipertenzivnih pacijenata na dijalizi. Slični rezultati su dobijeni u studiji koja je proučavala vrednosti ADMA kod pacijenata sa umerenom do srednje teškom HBI (93). Kod 500 zdravih dobrovoljaca je pokazano da ne postoji međusobna povezanost između koncentracije ADMA i vrednosti sistolnog i dijastolnog pritiska (165). Starost pacijenata, insulinska rezistencija i dislipidemija, kao i antihipertenzivna terapija su mogući razlozi koji su uticali na koncentraciju ADMA kod naših pacijenata i zamaskirali pozitivnu korelaciju između ADMA i vrednosti krvnog pritiska kod pacijenata na dijalizi, kako je prethodno pretpostavljeno.

6.1.2. Međusobna povezanost ispitivanih markera

Naše istraživanje je pokazalo da postoji direktna povezanost između ADMA i SDMA. Razlika u stepenu povezanosti verovatno je posledica izražene varijabilnosti u koncentracijama oba derivata i njihovom međusobnom odnosu. Utvrđena je direktna povezanost ADMA i SAA, kao i obrnuta povezanost sa nivoom albumina.

ADMA je, prema rezultatima naše studije, direktno povezana i sa nivoom kreatinina, a obrnuto povezana sa koncentracijom holesterola. Kod bolesnika sa metaboličkim sindromom je pokazano da je koncentracija ADMA povišena, ali nije uspostavljena korelacija između holesterola i ADMA (166). U jednoj studiji je utvrđena korelacija između ADMA i holesterola kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom insuficijencijom (167). Koncentracija SDMA direktno korelira sa nivoom kreatinina, a obrnuto korelira sa koncentracijom holesterola. Povezanost SDMA sa holesterolom je jača u odnosu na povezanost ADMA sa holesterolom.

Koncentracija ADMA je povezana sa markerima inflamacije u brojnim hroničnim stanjima, uključujući i neleženu esencijalnu hipertenziju i intoleranciju na glukozu. U *in vitro* uslovima, ADMA indukuje sintezu TNF- α preko slobodnih radikala koji aktiviraju NF- κ B. S druge strane, akumulacija slobodnih radikala, kao inicijalni događaj u inflamaciji, inhibira sintezu DDAH i olakšava lokalnu i sistemsku akumulaciju ADMA.

Brojne studije koje su procenjivale vrednosti ADMA merile su i CRP, ali nisu dokazale međusobnu povezanost između ovih kardiovaskularnih faktora rizika. Naša studija je, u skladu sa prethodnim istraživanjima, pokazala da ne postoji povezanost između ADMA i CRP. Takođe je pokazano da ne postoji statistički značajna povezanost između koncentracije ADMA i SDMA i prisustva inflamacije, ali je zato utvrdila povezanost između odnosa ADMA/SDMA i CRP. Odnos ADMA/SDMA predstavlja grubu indikator DDAH aktivnosti (168). Na aktivnost DDAH utiče inflamatorni proces, te je očekivano da ovaj odnos korelira sa koncentracijom CRP. Pretpostavka o povezanosti između ova dva markera postoji na osnovu preklapanja patofizioloških delovanja. Stoga su potrebne veće kliničke studije kako bi se utvrdilo postojanje međupovezanosti između koncentracije ADMA i CRP.

6.2. ADMA kao prediktor opšte i kardiovaskularne smrtnosti

Za sada nema ubedljivog i ključnog dokaza kako ADMA utiče na kardiovaskularni sistem, ali većina hemodinamskih studija je pokazala da inhibicija NOS dovodi do endotelne disfunkcije kod pacijenata sa terminalnom bubrežnom insuficijencijom. Indirektni dokaz patofiziološke uloge ADMA u razvoju različitih kardioloških stanja proizilazi iz opservacije da je koncentracija ADMA povećana kod pacijenata na dijalizi koji imaju kardiovaskularne

komplikacije u odnosu na pacijente koji nemaju manifestne znake ubrzanog procesa ateroskleroze (76). Ipak, naše istraživanje nije pokazalo da se koncentracija ADMA statistički značajno razlikuje između preminulih od nekog kardiovaskularnog događaja i preminulih koji nisu imali kardiovaskularni uzrok smrti.

U našoj studiji je u trogodišnjem periodu praćenja umrlo skoro 40,0% ispitanika. Od ukupnog broja umrlih 60,0% je umrlo od nekog kardiovaskularnog uzroka. U prvoj studiji (53) koja je pokazala da je ADMA prediktor smrtnosti kod pacijenata na dijalizi ukupna smrtnost je bila 37,0%. Smrtnost od kardiovaskularnih bolesti iznosila je 63,8%. Radi se o studiji koja je trajala par meseci kraće od naše i obuhvatila je 225 pacijenata na dijalizi koji su bili iste starosti kao pacijenti uključeni u našu studiju. Ista grupa autora je par godina kasnije objavila istraživanje na 246 pacijenata na dijalizi u kome je vršena procena zajedničke prediktivne vrednosti B-tipa natriuretskog peptida (BNP), ADMA i CRP (24). Ukupna smrtnost bila je 39,4%, a od tog broja 61,0% smrtnosti je bilo kardiovaskularne prirode. Kod pacijenata na dijalizi u četvorogodišnjoj studiji praćenja ukupna smrtnost je bila 37,7%, a 63,2% smrtnosti je bilo kardiovaskularne prirode (23). S druge strane, slična studija rađena u našoj zemlji u drugom centru je imala manju smrtnost (18,5%); period praćenja u ovoj studiji je bio isti i pacijenti su bili neznatno mlađi (122). Studija koja je pratila dugoročno smrtnost pacijenata koji su krenuli na dijalizu u odnosu na vrednosti CRP, albumina i BMI je imala manju smrtnost - 25,2%, a 47,7% smrtnosti je bilo kardiovaskularne prirode (169). Manja smrtnost u ovoj studiji u odnosu na našu može se objasniti manjom dužinom dijalize. Pacijenti u našoj studiji su bili prosečno na dijalizi skoro 8 godina. Dakle, naše istraživanje potvrđuje hipotezu da ovu populaciju karakteriše visoka smrtnost i da su glavni uzroci smrtnosti kod pacijenata na dijalizi kardiovaskularne prirode.

Zoccali i sar. (53) su sa 225 pacijenata na dijalizi prvi pokazali da je ADMA prediktor smrtnosti kod pacijenata na dijalizi. Oni su pokazali da povećanje ADMA za $1\mu\text{mol/L}$ povećava rizik od smrtnog ishoda za 26%. U ovoj studiji se SDMA, CRP i albumin nisu pokazali kao nezavisni prediktori smrtnosti. Delimično u suprotnosti sa našim rezultatima, studija (147) koja je objavljena 2005. godine je pokazala da je ADMA nezavisni prediktor smrtnosti, ali CRP u ovoj studiji nije pokazao da ima prediktivnu vrednost. Prema rezultatima ove studije povećanje ADMA za $0,1\mu\text{mol/L}$ dovodi do povećanja rizika za smrtni ishod za 23%. Godinu dana kasnije objavljena je studija koja je pokazala da je ADMA bolji prediktor kardiovaskularne smrtnosti u odnosu na homocistein kod pacijenata na dijalizi (170). Veza između efekata ADMA i homocisteina je vrlo zanimljiva zbog potencijalnih interakcija. Homocistein ima sposobnost da inhibira aktivnost DDAH interakcijom sa cisteinskim reziduama na aktivnom mestu ovog

enzima. Osim toga, homocistein je ključni molekul u procesu metilacije. S-adenozilmetionin je metil-donor koji omogućava metilaciju arginina i stvaranje S-adenozilhomocisteina koji se može konvertovati u homocistein. Dakle, metilacija dovodi do povećanja koncentracije homocisteina, ali i koncentracije ADMA, što dovodi do endotelne disfunkcije (171). Ipak, mnoge studije nisu pokazale povećanje ADMA nakon metilacije. Iako su rezultati kontradiktorni, ovi rezultati ukazuju da je povezanost homocisteina i kardiovaskularnog rizika u stvari samo odraz povezanosti ADMA i kardiovaskularnog rizika (172).

Aucella i sar. (159) su pokazali da je ADMA nezavisni prediktor i da se povećanjem za $1\mu\text{mol/L}$ rizik za razvoj smrtnog ishoda povećava za dva puta (HR 2,07). Rezultati naše studije su, takođe, pokazali da je ADMA nezavisni prediktor ukupne i kardiovaskularne smrtnosti. Povećanjem ADMA za $1\mu\text{mol/L}$ 71% se povećava rizik od ukupne, a 62% od kardiovaskularne smrtnosti. Jedina studija koja je spekulisala o mogućnosti da sa povećanjem koncentracije ADMA smanjuje rizik od kardiovaskularnog mortaliteta je pokazala da se povećanjem ADMA od $1\mu\text{mol/L}$ rizik smanjuje za 73%. (160). Ovo je jedina studija koja je do sada spekulisala o ADMA kao faktoru koji deluje po tipu inverzne epidemiologije (engl. reverse epidemiology).

Varijabilnost koja postoji u prediktivnim vrednostima verovatno je posledica nekoliko faktora. Pre svega prediktivna vrednost reflektuje varijabilnost u koncentraciji ADMA. Zatim, korišćeni su različiti statistički modeli koji nisu obuhvatali iste faktore. Određivanje rizik količnika je vršeno za različite jedinice (na $1\mu\text{mol/L}$, $0,1\mu\text{mol/L}$ ili na vrednost standardne devijacije), što dodatno otežava komparaciju rezultata. Upoređivanje preživljavanja je vršeno u odnosu na različite granične vrednosti ADMA, što je posledica nestandardizovane metode određivanja ADMA, odnosno referentnih vrednosti ADMA. Bez obzira na sve nedostatke, većina studija je dokumentovala da je ADMA nezavisni prediktor smrtnosti. Ipak, ostaje ključno pitanje da li je ADMA samo marker ili predstavlja medijator kardiovaskularnih bolesti kod pacijenata na dijalizi?

Obzirom da ovu populaciju karakteriše velika smrtnost od kardiovaskularnih bolesti, nekoliko studija je utvrdilo da pacijenti sa srednjom do umerenom bubrežnom insuficijencijom imaju povećanu prevalenciju hipertrofije leve komore. Patogeneza hipertrofije leve komore je jedan multifaktorski problem. Nedavno je pokazano da ADMA predstavlja faktor rizika za razvoj hipertrofije leve komore i prediktor za razvoj budućih KVS događaja kod pacijenata u predijaliznoj fazi (140). Utvrđeno je da ADMA utiče na remodelovanje leve komore, odnosno da postoji jaka povezanost između vrednosti ADMA i geometrije leve komore (61). Dugoročna inhibicija NOS je povezana sa razvojem koncentrične hipertrofije leve komore (173). Kod obolelih sa koronarnom bolešću je ustanovljeno da oni koji imaju povećane koncentracije

ADMA (treći tercil) imaju 2,62 puta veći rizik za razvoj nekog KVS događaja u odnosu na one koji imaju niske vrednosti ADMA (prvi tercil). Osim toga ova studija je pokazala da je ADMA bolji prediktor novih KVS događaja kako u odnosu na tradicionalne faktore rizika, tako i u odnosu na CRP i BNP (174).

Najnovija meta-analiza je pokazala da je ADMA pozitivno povezana sa debljinom intime medije. Ovi rezultati nam ukazuju da je ADMA novi marker subkliničkih formi ateroskleroze i da može biti prediktor uznapredovalog procesa ateroskleroze. Smatra se da povećana koncentracija ADMA može imati ključnu ulogu u razvoju ateroskleroze. Rezultati ove meta-analize koja je uključila 6168 ispitanika je pokazala da postoji bolja povezanost između ADMA i debljine intime medije kod pacijenata sa HBI u odnosu na ispitanike koji nisu imali poremećaj bubrežne funkcije. To ukazuje da je ADMA dobar indikator ateroskleroze i prediktor aterosklerotske bolesti kod ovih pacijenata, kao i da je verovatno medijator hroničnog kardiorrenalnog sindroma, tj. glavna veza između bubrežnih bolesti koje vode ka razvoju kardiovaskularnih poremećaja (175). Prednost primene ADMA u odnosu na druge markere i faktore rizika je što ona objedinjuje patofiziološke puteve, kako tradicionalnih, tako i novootkrivenih faktora rizika.

Prošlo je dvadeset godina otkada je ADMA otkrivena i definisana kao inhibitor sinteze azotoksida. U međuvremenu je potpuno definisan biološki put i metabolizam ovog jedinjenja. Delimično je razjašnjenja njegova patofiziološka uloga. Ovo istraživanje je deo kojim se proučava njegova uloga kao faktora rizika. Dalja istraživanja bi trebalo usmeriti ka farmakoterapijskim istraživanjima koja bi trebalo da nađu način da se smanji njegova koncentracija, a samim tim i efekat na endotel. Na osnovu ovih studija može se zaključiti da je ADMA prediktor opšte i kardiovaskularne smrtnosti nezavisan od drugih biomarkera, bez obzira na relativno mali broj neželjenih događaja i ishoda, malu veličinu uzorka i moguću pristrasnost prilikom objavljivanja rezultata. Meta analiza dosadašnjih studija bila bi korisna radi bolje procene rizika, ali otežavajuća okolnost je nedostatak standardizacije tehnika merenja ADMA. Kielstein i sar. (176) su najbolje sumirali dilemu vezanu za implementaciju novog markera u kliničkoj praksi, zaključivši da ne postoji garancija o uspešnosti primene markera, što se najbolje pokazuje usponom i padom homocisteina kao faktora rizika za razvoj nekih kardiovaskularnih stanja.

Statističkom analizom je pokazano da SDMA, iako je povećan kod bolesnika na dijalizi, nije povezan sa opštom i kardiovaskularnom smrtnošću. Većina studija koja je procenjivala prediktivnu vrednost oba derivata arginina je pokazala da je ADMA povezana sa smrtnošću pacijenata na hemodijalizi, a SDMA se nije izdvojio kao nezavisni prediktor. Dokumentovano

je da je SDMA kombinovani marker renalne funkcije i obima koronarne bolesti (95). Jedna studija je pokazala da je SDMA prediktor smrtnosti kod pacijenata koji su imali akutni infarkt miokarda (177). Rizik količnik za poslednji kvartil vrednosti SDMA u odnosu na prvi je bio 2,40. Dakle pacijenti sa visokim vrednostima SDMA su imali skoro 2,5 puta veći rizik za razvoj fatalnih ishoda u odnosu na one koji su imali niske vrednosti SDMA. SDMA se više proučavala u smislu procene renalne funkcije. Klirens inulina koji je zlatni standard zahteva glomaznu i skupu proceduru. Klirens kreatinina je pogodan za rutinsku primenu, ali postoji velika inter-individualna varijabilnost u vrednostima koja je povezana sa mišićnom masom, količinom proteina u ishrani, starošću i polom. S druge strane, SDMA je mali molekul koji se potpuno filtrira na nivou bubrega, ne sekretuje se i ne apsorbuje u distalnim tubulima. Zbog svega navedenog SDMA dobija sve veći značaj u proceni renalne funkcije. Meta-analiza koja je obuhvatila 2136 ispitanika je pokazala da postoji statistički značajna korelacija između SDMA i inulina (178). Jedna od glavnih prednosti primene SDMA kao markera renalne funkcije u odnosu na nove potencijalne markere je ta što se određuje paralelno sa ADMA u HPLC metodi.

6.3. Markeri inflamacije i malnutricije kao prediktori smrtnosti kod bolesnika na hemodijalizi

6.3.1. C-reaktivni protein i serumski amiloid

Za C-reaktivni protein se već dugo zna da je dobar prediktor kardiovaskularne smrtnosti u opštoj populaciji. Smatra se da zdravi ispitanici koji imaju vrednosti CRP preko 3,6mg/L imaju dva puta veći rizik za razvoj kardiovaskularnog događaja, kao što je infarkt miokarda ili iznenadna srčana smrt (46). Desetogodišnja studija praćenja koja je procenjivala verovatnoću smrtnog ishoda i nekog kardiovaskularnog događaja kod sredovečnih zdravih muškaraca je pokazala da dodavanjem CRP, kao prediktivnog markera, na Framingamov skor u modelu se povećava njegova prediktivna vrednost (179). Par godina kasnije pokazano je da se dodavanjem CRP vrednosti i podataka iz porodične anamneze na model tradicionalnih faktora rizika 20% muških ispitanika reklasifikuje u viši ili niži rizik (180). U sklopu ove studije razvijen je vrlo zanimljiv internet kalkulator za procenu rizika za razvoj kardiovaskularnog događaja u odnosu na pol, starost, pušenje, vrednosti sistolnog pritiska, ukupnog holesterola, HDL, CRP i porodične anamneze (www.reynoldsriskscore.org).

Uzevši u obzir činjenicu da medijana koncentracije CRP u opštoj populaciji iznosi 1,5mg/L, većina bolesnika na dijalizi imala bi znake hronične inflamacije, međutim, istraživanja na populaciji sa terminalnom HBI su pokazala da vrednosti iznad referentnih ne moraju biti znak upalnog procesa (181). Stoga je jako značajno odrediti granične ("cut-off") vrednosti iznad

koje bi povišene vrednosti CRP bile prediktor nepovoljnog ishoda. Menon i sar. (182) su pokazali da kardiovaskularni bolesnici sa vrednošću CRP > 3 mg/L imaju veću smrtnost. Iseki i sar. (183) su odredili graničnu vrednost CRP – 10 mg/L. Studija sprovedena u Hrvatskoj je pokazala da je granična vrednost CRP 6,2 mg/L (184). Istraživanje u našoj zemlji je pokazalo da je granična vrednost CRP kod pacijenata na dijalizi 8,4 mg/L (122). Granična vrednost CRP od 6 mg/L u našem istraživanju je bila najbliža vrednosti dobijenoj kod hrvatskih pacijenata na dijalizi. U svim navedenim istraživanjima koncentracije CRP iznad graničnih vrednosti su bile u vezi sa povišenom smrtnošću bolesnika. Pored određivanja granične vrednosti jako je značajno da se CRP određuje u ponovljenim merenjima, jer je pokazano da konstatno povećan nivo ovog proteina akutne faze značajno povećava stopu smrtnosti.

Na osnovu graničnih vrednosti CRP može se reći da je prevalenca inflamacije u našoj studiji 33,8%. Ovim radom je potvrđena hipoteza da je koncentracija CRP povećana kod bolesnika na hemodijalizi i da je kod ovih bolesnika prisutan hronični inflamatorni proces. Prevalencija inflamacije kod pacijenata na dijalizi prema literaturnim podacima kreće se od 30-75%. U studiji koja je sprovedena u našoj zemlji dobijena je nešto niža vrednost prevalencije u odnosu na naše podatke – 35,4% (122). Prevalencija inflamacije u ovoj populaciji zavisi od brojnih faktora, kao što su: rezidualna renalna funkcija, geografske i genetske razlike ispitanika, vrste dijalizne terapije i komorbiditeta (185). Razlozi inflamatornog procesa kod pacijenata na dijalizi su multifaktorijalni i uglavnom vezani za uremiju, proces dijalize, oksidativni stres, ali i za narušeni imuni odgovor (116). Inflamacija i oksidativni stres su usko povezani. Slobodni radikali nastaju u procesu aktivacije fagocita kao odgovor na inflamatorni stimulus. Oksidativni stres u uremiji je povezan sa metaboličkim abnormalnostima, prisustvom komorbiditeta, imunom disregulacijom i inflamatornim procesima (186). Stanje hronične bubrežne insuficijencije se smatra hroničnim inflamatornim stanjem niskog stepena, zbog ponovljene interakcije krvi i dijalizatora, a hemodijaliza se može smatrati humanim modelom oksidativnog stresa (44). Najvažniji mehanizmi kojima povećani oksidativni stres učestvuje u razvoju ateroskleroze su modifikacija lipoproteina i endotelna disfunkcija (187). Može se reći da inflamacija i oksidativni stres u sadejstvu utiču na disfunkciju endotela, obzirom da je on i izvor i target oksidanata i da učestvuje u inflamatornom odgovoru.

Naše istraživanje je pokazalo da je CRP nezavisni prediktor smrtnosti kod pacijenata na dijalizi. Od prve studije sprovedene 1995. godine kada je utvrđena povezanost CRP sa smrtnošću pacijenata u terminalnom stadijumu HBI i na dijalizi, mnoge studije su kasnije potvrdile ove rezultate (122, 123, 182, 183, 188). Na osnovu vrednosti rizik količnika zaključuje se da su ADMA i albumin bolji prediktori, a da je SAA slabiji prediktor. Slična studija po dužini

praćenja sprovedena na pacijentima na dijalizi u našoj zemlji je pokazala da je SAA bolji prediktor smrtnosti u odnosu na hsCRP (122). Vrednosti rizik količnika u ovoj studiji su nekoliko puta veće u odnosu na vrednosti u našoj studiji (za hsCRP HR 4,943, a za SAA HR 6,240).

Bez obzira na brojne studije koje su pokazale da je CRP nezavisni prediktor kardiovaskularne smrtnosti, kako u opštoj populaciji, tako i kod pacijenata na dijalizi, o njegovoj primeni u proceni rizika treba razmišljati obazrivo. Dugo godina se polemise o mogućem uključivanju CRP u tzv. Framingmanov skor. Međutim, za sada je preporuka da se skrining hsCRP radi jedino kod ispitanika sa intermedijarnim rizikom od 10-20% za razvoj kardiovaskularnog događaja. U tom slučaju, preporuka je da se radi evaluacija i korekcija primenjivane terapije (189).

6.3.2. Albumin

Hipoalbuminemija je veoma prisutna i povezana je sa povećanom kardiovaskularnom smrtnošću kod pacijenata sa HBI. Ovo istraživanje je potvrdilo literaturne podatke da je hipoalbuminemija prisutna kod pacijenata na hemodijalizi (190, 191). Koncentracija albumina zavisi od njihove sinteze, katabolizma i distribucije između vaskularnog i ekstravaskularnog prostora. Nutricija je najvažnija za nivo albumina, ali kako je ovaj marker i reaktant akutne faze, na njegovu koncentraciju utiče i nivo inflamacije. Neki autori smatraju da je albumin bolji marker inflamacije nego malnutricije (192). Dokumentovano je da hipoalbuminemija reflektuje prisustvo mikroinflamacija i predstavlja prediktor dugoročnog mortaliteta kod bolesnika na hemodijalizi (193). Naše istraživanje je pokazalo da je kod pacijenata na dijalizi prisutna hipoalbuminemija. Niže vrednosti serumskog albumina kod naših pacijenata verovatno nisu posledica samo lošeg nutritivnog statusa. Istovremeni nalaz povećanih vrednosti inflamatornih parametara upućuje na ulogu albumina kao negativnog reaktanta akutne faze u toku inflamatorne reakcije. Ne treba zaboraviti ni hiperhidrataciju koja je često prisutna kod pacijenata na hemodijalizi i uzrokuje diluciju koncentracija albumina u serumu, ali zajedno sa anemijom utiče na nastanak i/ili dalji razvoj srčane insuficijencije, koja može biti udružena sa malnutricijom (194).

Međusobna povezanost inflamacije, nutritivnog statusa i neželjenog ishoda kod pacijenata sa HBI navela je neke autore na spekulaciju o postojanju neuhranjenosti, inflamacije i ateroskleroze sindroma (tzv. MIA sindrom). Njihova pretpostavka je da proinflamatorni citokini dovode do supresije apetita i do povećanog katabolizma proteina ina taj način dovode do hipoalbuminemije u ovoj populaciji. Uprkos uvođenju biokompatibilnih dijalizatora i

povećanju adekvatnosti i doze dijalize nije se smanjio broj pacijenata sa hipoalbuminemijom(195).

Druge studije su pretpostavile da hipoalbuminemija predstavlja negativni odgovor protein akutne faze i da je vrednost albumina bolji pokazatelj inflamatornog procesa nego nutritivnog statusa, posebno kod pacijenata sa HBI. Studija koja je nedavno sprovedena pokazala je da je albumin bolji prediktor novog kardiovaskularnog događaja od nivoa malnutricije proteina koja je merena preko azotnog indeksa (182). Zatim je utvrđeno da kada se CRP uključi u prediktivni model, albumin gubi svoju asocijaciju sa neželjenim ishodom, odnosno gubi svoju prediktivnu vrednost (123, 125, 196). Ipak, studija koja je objavljena pre par godina i koja je procenjivala povezanost koncentracije albumina, CRP i debljinu intime medije u odnosu na desetogodišnji mortalitet kod bolesnika na hemodijalizi dokazalaje da se albumin izdvojio kao jedini nezavisni prediktor smrtnosti(129). Zapaženo je da većina pothranjenih pacijenata na dijalizi ima biohemijske znake aktiviranog odgovora akutne faze i/ili kliničke znake aterosklerotične bolesti, što sugerise njihovu blisku povezanost sa malnutricijom. Osim toga, pothranjeni pacijenti na hemodijalizi su prezentovali inekle kliničke karakteristike za koje se smatra da mogu ubrzati proces ateroskleroze, kao što je pušenje i dijabetes mellitus. Ovo je najverovatnije pojednostavljeni patofiziološki mehanizam kojim inflamacija preko malnutricije i uz učešće drugih faktora rizika (tradicionalnih i ne-tradicionalnih) doprinosi bržem razvoju ateroskleroze kod pacijenata sa HBI u odnosu na opštu populaciju (196). Granična vrednost albumina u ovoj studiji u kojoj je procenjivana povezanost sa smrtnošću bila je 38 g/l.

Granična vrednost za procenu smrtnosti u ovom istraživanju je bila nešto niža i iznosila je 30,3 g/L. U našem modelu uključivanjem CRP albumin nije izgubio prediktivnu sposobnost. Studija koja je nedavno objavljena u Japanu kod bolesnika koji su krenuli na hemodijalizu u desetogodišnjem periodu pokazala je da je CRP bolji prediktor smrtnosti u odnosu na albumin (169). Osim toga, ovim istraživanjem je utvrđeno da se dodavanjem albumina, CRP i BMI dobija najveća prediktivna vrednost. Iako se danas sve više razmišlja u pravcu da albumin nije marker inflamacije, ova studija je pokazala da su ovi markeri prediktori smrtnosti, a istovremeno delimično povezani i sa nutritivnim statusom bolesnika (192, 197, 198).

Upoređujući prediktivne vrednosti ispitivanih markera u univarijantnom modelu je potvrđena hipoteza da je ADMA najbolji prediktor smrtnosti kod bolesnika na hemodijalizi. Sa povećanjem ADMA za 1 μ mol/L rizik za razvoj opšte smrtnosti se povećava za 77%. Sa povećanjem CRP za 1 mg/L rizik se povećava za 2,5%, sa povećanjem SAA za 1 mg/L rizik se povećava za 1,5%. Sa smanjenjem albumina za 1g/L povećava se rizik za 36%. U multivarijantnom modelu za opštu smrtnost kao najbolji prediktor se izdvojio ADMA. Za

1 μ mol/L ADMA povećava se rizik za 48%. Po prediktivnoj snazi u multivarijantnom modelu kao sledeći se izdvojio albumin. Sa smanjenjem koncentracije albumina za 1 g/L povećava se rizik za 25%. Povećanjem CRP za 1 mg/L povećava se rizik za 2%. SAA u multivarijantnom modelu se nije izdvojio kao statistički značajan i nezavisan prediktor opšte smrtnosti.

U univarijantnom modelu za kardiovaskularnu smrtnost kao najbolji prediktor se pokazao ADMA (povećava rizik za 61%), zatim albumin koji povećava rizik za 48%. i CRP koji povećava rizik za 3%. U multivarijantnom modelu kao jedini prediktor kardiovaskularne smrtnosti izdvojila se koncentracija albumina, koja povećava rizik za 40%.

Upoređujući vrednosti ispitivanih markera kod bolesnika na osnovu broja faktora rizika utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji sva četiri parametra. Sa porastom broja faktora rizika raste i prediktivna vrednost u modelu. Ovakvo stanje je verovatno posledica činjenice da se sa porastom broja faktora rizika produbljuje i težina patofizioloških stanja. Kako su koncentracije ADMA, CRP, SAA i albumina veće sa porastom broja faktora rizika može se zaključiti da su težina i stepen endotelne disfunkcije i inflamacija veći.

Naše istraživanje je na osnovu graničnih vrednosti testiranih markera pokazalo da u ispitivanoj populaciji ima 34,6% pacijenata bez faktora rizika, 31,4% pacijenata sa jednim faktorom rizika, 19,6% pacijenata sa dva faktora rizika i 14,4% pacijenata sa tri i više faktora rizika. Sa povećanjem broja faktora rizika pokazano je da postoji veća ukupna i kardiovaskularna smrtnost kod bolesnika na hemodijalizi. Ovim je utvrđeno da ne postoji povezanost između mortaliteta kod bolesnika koji imaju jedan u odnosu na one koji nemaju nijedan faktor rizika. Bolesnici koji imaju dva faktora rizika imaju 6,7 puta veći rizik za opštu smrtnost, odnosno 9,9 puta veći rizik za kardiovaskularnu smrtnost. Bolesnici koji imaju tri i više faktora rizika imaju 10,5 puta veći rizik za opštu smrtnost, odnosno 15 puta veći rizik za kardiovaskularnu smrtnost. Nešto manje vrednosti rizik količnika u odnosu na broj faktora rizika su dobijene u nedavnoj studiji kod bolesnika na peritonealnoj dijalizi(23). U ovoj studiji ne postoji statistički značajna povezanost između mortalita kod bolesnika sa dva faktora rizika u odnosu na ispitanike bez faktora rizika. Rezultati naše analize u odnosu na broj faktora rizika treba tumačiti obazrivo zbog malog broja ispitanika po grupama i malog broja smrtnih ishoda.

6.4. Multimarker pristup

Klinički značaj biomarkera, bez obzira na svrhu, zavisi od njihove osetljivosti, specifičnosti, prediktivne vrednosti, zatim preciznosti, pouzdanosti, reproducibilnosti, kao i mogućnosti jednostavne i široke primene. Da bi biomarker bio uspešan mora proći kroz put validacije, zavisno od nivoa upotrebe. Veoma je značajno da svaki predloženi biomarker zavisno od

namene ili njegove prirode ima odgovarajuće karakteristike i da ispunjava stroge zahteve koji se odnose na osetljivost, tačnost i preciznost, kako bi se postigao odgovarajući ishod za procenu stanja za koji je namenjen.

Multimarker pristup je vrsta statističke metodologije koja uključuje procenu zavisne varijable, odnosno ishoda na osnovu više nezavisnih varijabli. O prediktivnoj snazi jednog ili više markera ne treba suditi na osnovu vrednosti relativnog rizika, unakrsnog odnosa ili rizik količnika, već na osnovu karakteristika već pomenutih statističkih testova(189). Do 2008. godine većina istraživanja je procenjivala prediktivnu snagu na osnovu Cox-ove regresione analize i ROC krive, kada je Pencina sa saradnicima(20) publikovao rad u kome se razmatra novi statistički metod za validaciju novog markera – tabela reklasifikacije (NRI).

Dakle, pri validaciji nekog biomarkera ili više markera preporuka je da se primenjuju četiri statističke metode ili četiri koraka kako bi se procenila njihova prediktivna snaga dodavanjem na model tradicionalnih faktora rizika. Na osnovu dosadašnjeg proučavanja dostupne literature može se zaključiti da se većina sprovedenih studija fokusirala samo na utvrđivanje povezanosti nekog markera sa određenim ishodom kod pacijenata na dijalizi. Svega nekoliko studija sa različitim markerima u odnosu na procenjivane u našoj studiji je sprovelo sve preporučene statističke testove.

U ovoj studiji u multimarker pristupu, za razliku od prethodnih, korišćena je kombinacije ADMA, CRP, SAA i albumina za procenu ukupne i kardiovaskularne smrtnosti. Izbor markera je izvršen na osnovu značaja patofizioloških mehanizama koje predstavljaju. Kaplan-Majerovom krivom je pokazano da postoji statistički značajna razlika u preživljavanju u odnosu na broj faktora rizika, odnosno na povišene koncentracije ADMA, CRP, SAA i smanjenju koncentracije albumina. U našem istraživanju multimarker pristupom je formiran model koji je pokazao da najveću prediktivnu vrednost imaju tri i više markera, kako za ukupnu, tako i za kardiovaskularnu smrtnost. Ovakav zaključak je donet na osnovu Cox-ove regresione analize. Rizik količnik pokazuje da pacijenti koji imaju tri i više faktora rizika imaju 10 puta (HR 10,455) veći rizik od ukupne smrtnosti i 15 puta veći rizik (HR 14,823) od kardiovaskularne smrtnosti.

Na osnovu ROC analize može se reći da je postignuta dobra diskriminacija modela, jer je najveći C-indeks bio kada su bila uključena sva 4 biomarkera, kako u proceni opšte, tako i kardiovaskularne smrtnosti. Interpretacija C-indeksa se vrši na osnovu skale koje se kreće u opsegu od 0,5 (nema diskriminacije) do 1 (savršena diskriminacija). C-indeks između 0,7-0,8 pokazuje prihvatljivu diskriminaciju, a između 0,8-0,90 ukazuje na odličnu diskriminaciju(189). Dodavanjem ADMA na model tradicionalnih faktora rizika postignuta je

odlična diskriminacija (C-indeks 0,857); takođe, dodavanjem albumina (C-indeks 0,810), zatim ADMA, albumina i CRP (C-indeks 0,900) dobijena je odlična diskriminacija u modelu. A dodavanjem sva 4 markera vrednost C-indeksa je veća od 0,9 (0,905) u modelu koji procenjuje rizik u odnosu na ukupnu smrtnost.

U modelu koji procenjuje rizik u odnosu na smrtnost od nekog kardiovaskularnog događaja dodavanjem albumina na model tradicionalnih faktora rizika (C-indeks 0,815), zatim dodavanjem albumina, ADMA i CRP (C-indeks 0,843), kao i dodavanjem sva 4 markera je postignuta odlična diskriminacija u modelu (C-indeks 0,844). Interesantno je da je gotovo identični C-indeks pri proceni kardiovaskularnog rizika dobijen i za sva 4 biomarkera, kao i za ADMA, CRP i albumin. Dakle, serumski amiloid nema prediktivnu snagu, odnosno njegovim uključivanjem pri proceni rizika ne bi se dobile dodatne informacije.

Kalibracija modela koje je procenjena na osnovu H-L testa bila je dobra za sve kombinacije biomarkera u odnosu na ukupnu kardiovaskularnu smrtnost. Ključna razlika između kalibracije i diskriminacije je u tome što diskriminacija predstavlja sposobnost nekog markera ili grupe markera da razdvoje različite statuse (preminuli/preživeli, sa događajem/bez događaja). Sa druge strane, kalibracija meri koliko se procena prognostičkog modela poklapa sa stvarnom verovatnoćom nekog ishoda.

Zadatak daljih istraživanja podrazumava pronalaženje panela renalnih markera koji će biti bolji i efikasniji od kreatinina u proceni bubrežne funkcije i progresiji bolesti (199). Iako prema nekim vodičima kliničke prakse postoji preporuka da su kreatinin i odnos albumina i kreatinina dobri markeri progresije bubrežne bolesti i prediktori smrtnosti kod pacijenata sa HBI (200), ipak se teži ka validaciji novih markera i primeni multimarker pristupa. Zaključak ove najnovije studije je da je primena multimarker pristupa pokazala značajno povećanje prediktivne vrednosti u odnosu na primenu tradicionalnih nefroloških markera. Međutim, panel renalnih markera se razlikuje u zavisnosti od primene, odnosno da li se koristi za procenu progresije bolesti, za određivanje rizika od razvoja HBI ili za procenu opšte i kardiovaskularne smrtnosti.

Kod ispitanika sa HBI, rađene su studije koje su uključivale različite setove biomarkera u multivarijantnu analizu. Ovaj rad je potvrdio hipotezu da ADMA ima najveću prediktivnu vrednost u odnosu na ostale ispitivane markere. Slične rezultate je pokazala studija koje je upoređivala prediktivnu vrednost ADMA i CRP. Rizik količnik za ADMA je u našoj studiji bio veći, a vrednosti rizik količnika za CRP su bile gotovo jednake (201). Kod 231 pacijenta na peritonealnoj dijalizi u četvorogodišnjoj studiji pokazano je da kombinacija CRP, IL-6, fetuina A i valvularne kalcifikacije ima najveći rizik, odnosno najveću prediktivnu vrednost za

kardiovaskularnu smrtnost u odnosu na ispitanike koji nisu imali povišene vrednosti ovih markera (23). U analizi ove kombinacije biomarkera rađena je Cox-ova regresiona analiza i ROC analiza kao test diskriminacije. Vrednost C-indeksa za CRP je bila nešto niža u odnosu na naše istraživanje (0,679 odnosno 0,709).

Jedan od mogućih razloga zašto se dodavanjem novih biomarkera dobija bolja predikcija u modelu je to što se ovim biomarkerima verovatno bolje identifikuju strukturalne i funkcionalne promene koje još uvek nisu dovele do značajnih oštećenja pre svega kardiovaskularnog sistema, a koja vode ka smrtnom ishodu. Osim toga, prednost procene rizika multimarker pristupom je verovatno posledica slabe povezanosti jednog faktora rizika sa kardiovaskularnim rizikom zbog složenosti patofiziološkog stanja, kakva je kardiovaskularna smrt.

Studije koje su procenjvale multimarker pristup na sličan način uglavnom su uključivale ispitanike koji boluju od kardiovaskularnih bolesti. Istraživanje koje je nedavno sprovedeno kod starijih muškaraca je pokazalo da kombinacija troponina I, BNP, CRP i cistatina C ima najveću prediktivnu vrednost, najbolju diskriminaciju i kalibraciju i najveći indeks reklasifikacije (202). Za sada nema literaturnih podataka da je korišćenjem izabranih statističkih testova sprovedena studija kod pacijenata na dijalizi ili kod pacijenata sa HBI. Ovo se pre svega odnosi na tabele reklasifikacije. Zato su u ovom istraživanju pri reklasifikaciji ispitanika formirane tri grupe ispitanika: sa rizikom <6%, 6-20% i >20%. Granične vrednosti rizika su preuzete iz studija koje se odnose na kardiovaskularne bolesnike, jer je najčešći uzrok smrti kardiovaskularne prirode (202). Nedavno je rađena studija koja procenjivala dodatnu prediktivnu vrednost homocisteina uz tradicionalne faktore rizika u kojoj su prilikom reklasifikacije kardiovaskularni bolesnici podeljeni u četiri grupe rizika: veoma nizak <5%, nizak 5-10%, srednji 10-20% i visok >20% (203). Ova studija je obuhvatila ispitanike sa niskim rizikom za razvoj kardiovaskularne smrti i utvrđeno je da dodavanjem homocisteina u model značajan broj ispitanika prelazi u grupu sa srednjim rizikom. Međutim, zbog malog broja ispitanika u našoj studiji ispitanici su podeljeni tri grupe.

Tabele reklasifikacije su pokazale da značajan broj ispitanika prelazi u grupu sa većim rizikom dodavanjem različitih kombinacija biomarkera. Iz tabele reklasifikacije se dobijaju dva značajna parametra za tumačenje rezultata: vrednost NRI (pokazuje uspešnost reklasifikacije dodavanjem markera ili više markera na model tradicionalnih faktora rizika) i procenat pacijenata koji ostaju u kategoriji srednjeg rizika (za koje se ne dobija preporuka za adekvatan tretman). Naši rezultati pokazuju da, ukoliko se procenjuje opšta smrtnost, dodavanjem sva četiri markera dobija se najbolja reklasifikacija pacijenata. Zatim, kada je u model uključen ADMA. Skoro jednaka vrednost NRI dobija se kada se u model uključe ADMA, CRP i

albumin. U grupi preživelih pacijenata dodavanjem sva 4 markera je reklasifikovano preko 50% populacije. Visoke vrednosti indeksa reklasifikacije se dobijaju kada se na model tradicionalnih faktora rizika dodaju ADMA, CRP i albumin.

Gledajući procenat reklasifikovanih pacijenata u odnosu na pojedinačne vrednosti može se reći da je najveći broj pacijenata reklasifikovano dodavanjem albumina (40%), dok je dodavanjem ADMA reklasifikovano (17,6%). Dodavanjem ADMA i albumina ukupno je reklasifikovano 43% pacijenata. Mnogo značajnije od ukupnog broja reklasifikovanih pacijenata je da se utvrdi koliko je pacijenata sa ishodom reklasifikovanih u kategoriju višeg rizika, a koliko pacijenata bez ishoda (u ovom slučaju preživelih) je reklasifikovano u kategoriju nižeg rizika. Preporuka Pencine i sar. (20) je da se procena uspešnosti klasifikacije pacijenata gleda na sledeći način: ukoliko je u grupi sa ishodom većina ispitanika reklasifikovana u kategoriju većeg rizika, a u grupi ispitanika bez ishoda veći broj klasifikovan u kategoriju nižeg rizika, radi se o poboljšanoj klasifikaciji ispitanika. Dodavanjem bilo kog od ispitivanih markera ili kombinacije markera na model tradicionalnih faktora rizika dobijena je poboljšana reklasifikacija kod naših pacijenata. Dakle, svi primenjeni markeri dodatno vrše procenu rizika u odnosu na model tradicionalnih faktora rizika.

Ukoliko bi se posmatrale individualne karakteristike, rezultati naše studije sugerišu da je ADMA najbolji prediktor ukupne smrtnosti kod pacijenata na dijalizi, a da se veliki broj pacijenata reklasifikuje dodavanjem na model tradicionalnih faktora rizika. Ovaj zaključak je donet na osnovu vrednosti rizik količnika, C-indeksa i NRI. Ali slične rezultate dobijamo i korišćenjem albumina kao prediktora ukupne i kardiovaskularne smrtnosti. Međutim, ako bi u modelu posmatrali broj pacijenata koji ostaju u tzv. kategoriji srednjeg rizika, a to su pacijenti za koje nemamo adekvatnu preporuku za dalji tretman, onda se kao najbolji prediktor nameće albumin, kako za ukupnu smrtnost, tako i za smrtnost od kardiovaskularnog događaja. Procenat pacijenata koji ostaju u kategoriji srednjeg rizika za opštu smrtnost kreće se od 14,1% za albumin, do 19,6% za SAA. Prema ovim podacima, ADMA je po vrednosti pacijenata koji ostaju u srednjoj kategoriji rizika na trećem mestu. U odnosu na kardiovaskularnu smrtnost razlika u broju pacijenata je još izraženija. Najveći broj pacijenata koji ostaje u srednjem riziku se dobija dodavanjem ADMA na model tradicionalnih faktora rizika (48,9%), a najmanji dodavanjem albumina (17,4%). Ove rezultate treba ipak tumačiti sa oprezom, jer se radi o malom broju pacijenata. Pretpostavka je da bi razlika u tim vrednostima na većem broju smrtnih ishoda bila manja.

Ukoliko se posmatraju rezultati u odnosu na kombinacije markera, može se zaključiti da je najbolja kombinacija za procenu rizika kod pacijenata na dijalizi ADMA i albumin, jer se

skoro jednake vrednosti dobijaju i kada se uključi ADMA, CRP i albumin, kao i kada se uključe sva četiri markera. Ovaj zaključak se može doneti na osnovu vrednosti C-indeksa i NRI. U odnosu na kardiovaskularnu smrtnost može se doneti sličan zaključak. Pacijenti sa dva faktora rizika imali su skoro 10 puta veći rizik od kardiovaskularne smrti. Vrednosti C-indeksa i NRI indeksa su visoke. U ovom slučaju najmanje pacijenata ostaje u srednjem riziku kada se dodaju sva 4 markera (4,3%), sa tri markera ostaje 8,7% preživelih pacijenata, a dodavanjem ADMA i albumina ostaje 10,9% preživelih pacijenata. Na osnovu toga se može reći da je procenjivanje bez CRP i serumskog amiloida jednako efikasno kao i sa njima. Dakle, uzimajući u obzir informacije dobijene na osnovu četiri statistička testa, preporuka je da se za procenu rizika kod pacijenata na dijalizi koriste ADMA i albumin.

Nove multicentrične studije sa većim brojem ispitanika i većim brojem neželjenih ishoda bi trebalo da uporede pojedinačnu prediktivnu snagu, kao i različite kombinacije ovih markera. Bez obzira na to koji je marker dodat u prediktivni model, naši rezultati pokazuju da nije bilo bolesnika koji su svrstani u grupu sa niskim rizikom za ukupnu i kardiovaskularnu smrtnost.

Ovim radom je pokazano da bolesnici koji imaju više faktora rizika imaju veći rizik za razvoj smrtnog ishoda. Korišćenjem multimarker pristupa, odnosno čitavog statističkog seta, osim prediktivne vrednosti i komparacije različitih prediktivnih vrednosti dobija se informacija o tačnom broju bolesnika koji se reklasifikuju na osnovu rizika. Pravovremeni početak preventivnih mera kod pacijenata sa visokim rizikom zavisi od njihove rane detekcije i što preciznije definisanog profila rizika. Na osnovu ovog profila rizika praćenje, tretman i lečenje se prilagođavaju svakom pacijentu, čime se postiže prevencija kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta i poboljšava kvalitet života. Zato je jako značajno naći markere koji mogu na najbolji način da klasifikuju pacijente u različite kategorije rizika.

Iako je naše istraživanje pokazalo da su ispitivani markeri efikasniji u proceni rizika kod ovih pacijenata, na putu validacije i uvođenja markera u rutinsku kliničku praksu potrebno je odgovoriti na još neka pitanja: da li mogu da se odrede uniformne vrednosti koncentracije ovih markera u različitim subpopulacijama, da li smanjenje koncentracije ovih markera samo za sebe dovodi do smanjenja broja neželjenih događaja i na koji način dovesti do smanjenja koncentracije ADMA, CRP, SAA i povećanja koncentracije albumina. Kako istraživanja na ovom polju budu napredovala, kao naredni korak nametnuće se potreba za procenom efikasnosti različitih kombinacija biomarkera i njihove isplativosti.

7. ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata u trogodišnjoj studiji praćenja 153 pacijenta na hemodijalizi i 30 ispitanika koji su činili kontrolnu grupu izvedeni su sledeći zaključci:

1. Kod bolesnika na hemodijalizi su povećane koncentracije ADMA, SDMA, CRP, SAA i smanjena koncentracija albumina, što ukazuje na izraženi proces endotelne disfunkcije, inflamcije i malnutricije.
2. Bolesnike na hemodijalizi karakteriše visoka smrtnost. U trogodišnjem periodu praćenja ukupno je umrlo 40% pacijenata, od čega je kod 60% pacijenata kao neposredni uzrok smrti bio kardiovaskularni događaj.
3. U analizi preživljavanja nezavisni prediktori su ADMA, CRP, SAA i albumin.
4. ADMA je najznačajniji prediktor opšte smrtnosti u univarijantnom i multivarijantnom modelu. Ona je najznačajniji prediktor kardiovaskularne smrtnosti u univarijantnom, a albumin u multivarijantnom modelu.
5. Multimarker pristupom formiran je statistički model za procenu ukupne i kardiovaskularne smrtnosti koji ukazuje na povećanje svih ispitivanih markera dobija najznačajniju prediktivnu vrednost.
6. ROC analizom je pokazano da ispitivani markeri imaju dobru prediktivnu snagu za ukupnu i kardiovaskularnu smrtnost, osim SDMA.
7. Primena novih markera u proceni ukupne i kardiovaskularne smrtnosti je efikasnija u odnosu na tradicionalne faktore rizika. Najbolja reklasifikacija u odnosu na opštu kardiovaskularnu smrtnost je postignuta uključivanjem sva četiri ispitivana markera.
8. Tabele reklasifikacije su pokazale da uključivanjem albumina u statistički model najmanji broj pacijenata ostaje u kategoriji srednjeg rizika. Kombinacija ADMA i albumina se izdvojila kao najbolja pri reklasifikaciji pacijenata u odnosu na ukupnu smrtnost.
9. Reklasifikacija u odnosu na kardiovaskularnu smrtnost je pokazala da se najbolja reklasifikacija postiže korišćenjem ADMA, CRP, SAA i albumina kao parametara procene.
10. Multimarker pristup se pokazao kao efikasan metod u proceni rizika kod dijaliznih bolesnika. Kako se ovi statistički testovi mogu posmatrati kao metod validacije i evaluacije markera, na osnovu rizik količnika, C-indeksa i parametara koji se dobijaju iz tabela reklasifikacije, može se zaključiti da je u proceni rizika kod pacijenata na dijalizi opravdano koristiti kombinaciju ADMA i albumina.

Za procenu rizika kod dijaliznih bolesnika veoma je bitan adekvatan izbor markera. Naše istraživanje je pokazalo da su markeri endotelne disfunkcije, inflamcije i malnutricije efikasniji u proceni rizika u odnosu na tradicionalne faktore rizika. Na osnovu pojedinačnih

i zajedničke prediktivne vrednosti može se zaključiti da su procesi endotelne disfunkcije i malnutricije dominantni patofiziološki mehanizmi. Primenjena statistička metodologija omogućava da se pacijenti na osnovu vrednosti ispitivanih markera svrstaju u određenu kategoriju rizika. Doprinos ovog istraživanja se ogleda u mogućnosti personalizovane procene profila rizika na osnovu ispitivanih biomarkera. Na osnovu ovog profila, praćenje, tretman i lečenje bi bili prilagođeni riziku sa ciljem prevencije kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta i poboljšanja kvaliteta života dijaliznih bolesnika.

8. LITERATURA

1. Pecoits-Filho R, Lindholm B, Stenvinkel P. The malnutrition, inflammation, and atherosclerosis (MIA) syndrome -- the heart of the matter. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17 Suppl 11:28-31.
2. V. Patient mortality and survival in ESRD. *Am J Kidney Dis*. 1999;34(2 Suppl 1):S74-86.
3. Jovanovic D. Faktori rizika od kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta kod bolesnika na peritonealnoj dijalizi. *Srp Arh Celok Lek*. 2008;136(5-6):313-8.
4. Fleck C, Janz A, Schweitzer F, Karge E, Schwertfeger M, Stein G. Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in renal failure patients. *Kidney Int Suppl*. 2001;78:S14-8.
5. Meuwese CL, Stenvinkel P, Dekker FW, Carrero JJ. Monitoring of inflammation in patients on dialysis: forewarned is forearmed. *Nat Rev Nephrol*. 2011;7(3):166-76.
6. Rao M, Jaber BL, Balakrishnan VS. Inflammatory biomarkers and cardiovascular risk: association or cause and effect? *Semin Dial*. 2006;19(2):129-35.
7. Tripepi G, Jager KJ, Dekker FW, Zoccali C. Statistical methods for the assessment of prognostic biomarkers (Part I): discrimination. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25(5):1399-401.
8. Tripepi G, Jager KJ, Dekker FW, Zoccali C. Statistical methods for the assessment of prognostic biomarkers(part II): calibration and re-classification. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25(5):1402-5.
9. Vasan RS. Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations. *Circulation*. 2006;113(19):2335-62.
10. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2001;69(3):89-95.
11. Lemley KV. An introduction to biomarkers: applications to chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*. 2007;22(11):1849-59.
12. Biomarkers Definitions Working G. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2001;69(3):89-95.
13. Kannel WB, Dawber TR, Kagan A, Revotskie N, Stokes J, 3rd. Factors of risk in the development of coronary heart disease--six year follow-up experience. The Framingham Study. *Ann Intern Med*. 1961;55:33-50.
14. Hopkins PN, Williams RR. A survey of 246 suggested coronary risk factors. *Atherosclerosis*. 1981;40(1):1-52.
15. Zoccali C. Traditional and emerging cardiovascular and renal risk factors: an epidemiologic perspective. *Kidney Int*. 2006;70(1):26-33.

16. Ware JH. The limitations of risk factors as prognostic tools. *N Engl J Med.* 2006;355(25):2615-7.
17. Wald NJ, Hackshaw AK, Frost CD. When can a risk factor be used as a worthwhile screening test? *BMJ.* 1999;319(7224):1562-5.
18. Cook NR. Statistical evaluation of prognostic versus diagnostic models: beyond the ROC curve. *Clin Chem.* 2008;54(1):17-23.
19. Janes H, Pepe MS, Gu W. Assessing the value of risk predictions by using risk stratification tables. *Ann Intern Med.* 2008;149(10):751-60.
20. Pencina MJ, D'Agostino RB, Sr., D'Agostino RB, Jr., Vasan RS. Evaluating the added predictive ability of a new marker: from area under the ROC curve to reclassification and beyond. *Statistics in medicine.* 2008;27(2):157-72; discussion 207-12.
21. Fox CS, Gona P, Larson MG, Selhub J, Tofler G, Hwang SJ, et al. A multi-marker approach to predict incident CKD and microalbuminuria. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(12):2143-9.
22. Peralta CA, Shlipak MG, Judd S, Cushman M, McClellan W, Zakai NA, et al. Detection of chronic kidney disease with creatinine, cystatin C, and urine albumin-to-creatinine ratio and association with progression to end-stage renal disease and mortality. *JAMA.* 2011;305(15):1545-52.
23. Wang AY, Lam CW, Chan IH, Wang M, Lui SF, Sanderson JE. Long-term mortality and cardiovascular risk stratification of peritoneal dialysis patients using a combination of inflammation and calcification markers. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24(12):3826-33.
24. Mallamaci F, Tripepi G, Cutrupi S, Malatino LS, Zoccali C. Prognostic value of combined use of biomarkers of inflammation, endothelial dysfunction, and myocardial pathology in patients with ESRD. *Kidney Int.* 2005;67(6):2330-7.
25. Care FM. ESRD Patients in 2011 a Global Prospective. Bad Homburg: Fresenius Medical Care, 2011.
26. Diseases NKaU, Clearinghouse I. Kidney Disease Statistics for the United States 2009. Available from: <http://kidney.niddk.nih.gov/kudiseases/pubs/kustats/#17>.
27. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis.* 1998;32(5 Suppl 3):S112-9.
28. Cheung AK, Sarnak MJ, Yan G, Berkoben M, Heyka R, Kaufman A, et al. Cardiac diseases in maintenance hemodialysis patients: results of the HEMO Study. *Kidney Int.* 2004;65(6):2380-9.
29. Lindner A, Charra B, Sherrard DJ, Scribner BH. Accelerated atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis. *N Engl J Med.* 1974;290(13):697-701.
30. Dhingra H, Laski ME. Outcomes research in dialysis. *Seminars in nephrology.* 2003;23(3):295-305.
31. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 1998;9(12 Suppl):S16-23.

32. Vanholder R, Massy Z, Argiles A, Spasovski G, Verbeke F, Lameire N. Chronic kidney disease as cause of cardiovascular morbidity and mortality. *Nephrol Dial Transplant.* 2005;20(6):1048-56.
33. Schwarz U, Buzello M, Ritz E, Stein G, Raabe G, Wiest G, et al. Morphology of coronary atherosclerotic lesions in patients with end-stage renal failure. *Nephrol Dial Transplant.* 2000;15(2):218-23.
34. Agarwal R, Nissenson AR, Battle D, Coyne DW, Trout JR, Warnock DG. Prevalence, treatment, and control of hypertension in chronic hemodialysis patients in the United States. *The American journal of medicine.* 2003;115(4):291-7.
35. Locatelli F, Covic A, Chazot C, Leunissen K, Luno J, Yaqoob M, et al. Hypertension and cardiovascular risk assessment in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2004;19(5):1058-68.
36. Petrovic D, Miloradovic V, Poskurica M, Stojimirovic B. [Diagnostics and treatment of ischemic heart disease in hemodialysis patients]. *Vojnosanit Pregl.* 2009;66(11):897-903.
37. Liu Y, Coresh J, Eustace JA, Longenecker JC, Jaar B, Fink NE, et al. Association between cholesterol level and mortality in dialysis patients: role of inflammation and malnutrition. *JAMA.* 2004;291(4):451-9.
38. Levey AS, Eknoyan G. Cardiovascular disease in chronic renal disease. *Nephrol Dial Transplant.* 1999;14(4):828-33.
39. Marwick TH. Diabetic heart disease. *Heart.* 2006;92(3):296-300.
40. Hayashi T, Suzuki A, Shoji T, Togawa M, Okada N, Tsubakihara Y, et al. Cardiovascular effect of normalizing the hematocrit level during erythropoietin therapy in predialysis patients with chronic renal failure. *Am J Kidney Dis.* 2000;35(2):250-6.
41. Muntner P, He J, Astor BC, Folsom AR, Coresh J. Traditional and nontraditional risk factors predict coronary heart disease in chronic kidney disease: results from the atherosclerosis risk in communities study. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(2):529-38.
42. Kalantar-Zadeh K, Block G, Humphreys MH, Kopple JD. Reverse epidemiology of cardiovascular risk factors in maintenance dialysis patients. *Kidney Int.* 2003;63(3):793-808.
43. Stenvinkel P. Endothelial dysfunction and inflammation-is there a link? *Nephrol Dial Transplant.* 2001;16(10):1968-71.
44. Tirmenstajn-Jankovic B. Hronično inflamatorno stanje u uremiji: uzroci i posledice. *Timocki Medicinski Glasnik.* 2004;29(1):25-34.
45. Boger RH. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk marker in cardiovascular medicine and beyond. *Annals of medicine.* 2006;38(2):126-36.
46. Smith CL. C-reactive protein and asymmetric dimethylarginine: markers or mediators in cardiovascular disorders? *Current pharmaceutical design.* 2007;13(16):1619-29.
47. Boger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Res.* 2003;59(4):824-33.

48. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet*. 1992;339(8793):572-5.
49. Kielstein JT, Zoccali C. Asymmetric dimethylarginine: a cardiovascular risk factor and a uremic toxin coming of age? *Am J Kidney Dis*. 2005;46(2):186-202.
50. Tran CT, Fox MF, Vallance P, Leiper JM. Chromosomal localization, gene structure, and expression pattern of DDAH1: comparison with DDAH2 and implications for evolutionary origins. *Genomics*. 2000;68(1):101-5.
51. Tran CT, Leiper JM, Vallance P. The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscler Suppl*. 2003;4(4):33-40.
52. Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP. Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation*. 1999;99(24):3092-5.
53. Zoccali C, Bode-Boger S, Mallamaci F, Benedetto F, Tripepi G, Malatino L, et al. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet*. 2001;358(9299):2113-7.
54. Matsuoka H, Itoh S, Kimoto M, Kohno K, Tamai O, Wada Y, et al. Asymmetrical dimethylarginine, an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, in experimental hypertension. *Hypertension*. 1997;29(1 Pt 2):242-7.
55. Surdacki A, Nowicki M, Sandmann J, Tsikas D, Boeger RH, Bode-Boeger SM, et al. Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1999;33(4):652-8.
56. Wanby P, Teerlink T, Brudin L, Brattstrom L, Nilsson I, Palmqvist P, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a risk marker for stroke and TIA in a Swedish population. *Atherosclerosis*. 2006;185(2):271-7.
57. Yoo JH, Lee SC. Elevated levels of plasma homocyst(e)ine and asymmetric dimethylarginine in elderly patients with stroke. *Atherosclerosis*. 2001;158(2):425-30.
58. Kielstein JT, Bode-Boger SM, Hesse G, Martens-Lobenhoffer J, Takacs A, Fliser D, et al. Asymmetrical dimethylarginine in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(7):1414-8.
59. Pullamsetti S, Kiss L, Ghofrani HA, Voswinckel R, Haredza P, Klepetko W, et al. Increased levels and reduced catabolism of asymmetric and symmetric dimethylarginines in pulmonary hypertension. *FASEB J*. 2005;19(9):1175-7.
60. Gorenflo M, Zheng C, Werle E, Fiehn W, Ulmer HE. Plasma levels of asymmetrical dimethyl-L-arginine in patients with congenital heart disease and pulmonary hypertension. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2001;37(4):489-92.
61. Zoccali C, Mallamaci F, Maas R, Benedetto FA, Tripepi G, Malatino LS, et al. Left ventricular hypertrophy, cardiac remodeling and asymmetric dimethylarginine (ADMA) in hemodialysis patients. *Kidney Int*. 2002;62(1):339-45.

62. Achan V, Broadhead M, Malaki M, Whitley G, Leiper J, MacAllister R, et al. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(8):1455-9.
63. Chan NN, Chan JC. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a potential link between endothelial dysfunction and cardiovascular diseases in insulin resistance syndrome? *Diabetologia.* 2002;45(12):1609-16.
64. Mittermayer F, Mayer BX, Meyer A, Winzer C, Pacini G, Wagner OF, et al. Circulating concentrations of asymmetrical dimethyl-L-arginine are increased in women with previous gestational diabetes. *Diabetologia.* 2002;45(10):1372-8.
65. Fard A, Tuck CH, Donis JA, Sciacca R, Di Tullio MR, Wu HD, et al. Acute elevations of plasma asymmetric dimethylarginine and impaired endothelial function in response to a high-fat meal in patients with type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(9):2039-44.
66. Maas R, Boger RH, Schwedhelm E, Casas JP, Lopez-Jaramillo P, Serrano N, et al. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in Colombian women with pre-eclampsia. *JAMA.* 2004;291(7):823-4.
67. Savvidou MD, Hingorani AD, Tsikas D, Frolich JC, Vallance P, Nicolaidis KH. Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia. *Lancet.* 2003;361(9368):1511-7.
68. Usui M, Matsuoka H, Miyazaki H, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T. Increased endogenous nitric oxide synthase inhibitor in patients with congestive heart failure. *Life sciences.* 1998;62(26):2425-30.
69. Duan J, Murohara T, Ikeda H, Katoh A, Shintani S, Sasaki K, et al. Hypercholesterolemia inhibits angiogenesis in response to hindlimb ischemia: nitric oxide-dependent mechanism. *Circulation.* 2000;102(19 Suppl 3):III370-6.
70. Masuda H, Tsujii T, Okuno T, Kihara K, Goto M, Azuma H. Accumulated endogenous NOS inhibitors, decreased NOS activity, and impaired cavernosal relaxation with ischemia. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology.* 2002;282(6):R1730-8.
71. Boger RH, Bode-Boger SM, Brandes RP, Phivthong-ngam L, Bohme M, Nafe R, et al. Dietary L-arginine reduces the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits: comparison with lovastatin. *Circulation.* 1997;96(4):1282-90.
72. Boger RH, Bode-Boger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation.* 1998;98(18):1842-7.
73. Zoccali C, Benedetto FA, Maas R, Mallamaci F, Tripepi G, Malatino LS, et al. Asymmetric dimethylarginine, C-reactive protein, and carotid intima-media thickness in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(2):490-6.
74. Loyaga-Rendon RY, Sakamoto S, Beppu M, Aso T, Ishizaka M, Takahashi R, et al. Accumulated endogenous nitric oxide synthase inhibitors, enhanced arginase activity,

- attenuated dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity and intimal hyperplasia in premenopausal human uterine arteries. *Atherosclerosis*. 2005;178(2):231-9.
75. Jacobi J, Tsao PS. Asymmetrical dimethylarginine in renal disease: limits of variation or variation limits? A systematic review. *Am J Nephrol*. 2008;28(2):224-37.
76. Kielstein JT, Boger RH, Bode-Boger SM, Schaffer J, Barbey M, Koch KM, et al. Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations differ in patients with end-stage renal disease: relationship to treatment method and atherosclerotic disease. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10(3):594-600.
77. Eiselt J, Rajdl D, Racek J, Siroka R, Trefil L, Opatrna S. Asymmetric dimethylarginine in hemodialysis, hemodiafiltration, and peritoneal dialysis. *Artif Organs*. 2010;34(5):420-5.
78. Zhang DL, Liu J, Liu S, Zhang Y, Liu WH. The differences of asymmetric dimethylarginine removal by different dialysis treatments. *Ren Fail*. 2010;32(8):935-40.
79. MacAllister RJ, Rambašek MH, Vallance P, Williams D, Hoffmann KH, Ritz E. Concentration of dimethyl-L-arginine in the plasma of patients with end-stage renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 1996;11(12):2449-52.
80. Anderstam B, Katzarski K, Bergstrom J. Serum levels of NG, NG-dimethyl-L-arginine, a potential endogenous nitric oxide inhibitor in dialysis patients. *J Am Soc Nephrol*. 1997;8(9):1437-42.
81. Zoccali C, Kielstein JT. Asymmetric dimethylarginine: a new player in the pathogenesis of renal disease? *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2006;15(3):314-20.
82. Matsuguma K, Ueda S, Yamagishi S, Matsumoto Y, Kaneyuki U, Shibata R, et al. Molecular mechanism for elevation of asymmetric dimethylarginine and its role for hypertension in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(8):2176-83.
83. Tain YL, Freshour G, Dikalova A, Griendling K, Baylis C. Vitamin E reduces glomerulosclerosis, restores renal neuronal NOS, and suppresses oxidative stress in the 5/6 nephrectomized rat. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;292(5):F1404-10.
84. Boger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, Schubert B, et al. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ Res*. 2000;87(2):99-105.
85. Lin KY, Ito A, Asagami T, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, et al. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation*. 2002;106(8):987-92.
86. Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, Hakim RM. The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int*. 2002;62(5):1524-38.
87. Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G. Novel cardiovascular risk factors in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15 Suppl 1:S77-80.

88. Ueda S, Yamagishi S, Kaida Y, Okuda S. Asymmetric dimethylarginine may be a missing link between cardiovascular disease and chronic kidney disease. *Nephrology (Carlton)*. 2007;12(6):582-90.
89. Fliser D. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): the silent transition from an 'uraemic toxin' to a global cardiovascular risk molecule. *Eur J Clin Invest*. 2005;35(2):71-9.
90. Neiryneck N, Vanholder R, Schepers E, Eloot S, Pletinck A, Glorieux G. An update on uremic toxins. *Int Urol Nephrol*. 2013;45(1):139-50.
91. Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G. Inflammation and atherosclerosis in end-stage renal disease. *Blood Purif*. 2003;21(1):29-36.
92. Leiper JM, Santa Maria J, Chubb A, MacAllister RJ, Charles IG, Whitley GS, et al. Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. *Biochem J*. 1999;343 Pt 1:209-14.
93. Fliser D, Kronenberg F, Kielstein JT, Morath C, Bode-Boger SM, Haller H, et al. Asymmetric dimethylarginine and progression of chronic kidney disease: the mild to moderate kidney disease study. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(8):2456-61.
94. Yu XJ, Li YJ, Xiong Y. Increase of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in serum of high cholesterol fed rabbits. *Life sciences*. 1994;54(12):753-8.
95. Bode-Boger SM, Scalera F, Kielstein JT, Martens-Lobenhoffer J, Breithardt G, Fobker M, et al. Symmetrical dimethylarginine: a new combined parameter for renal function and extent of coronary artery disease. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(4):1128-34.
96. Tsao PS, Theilmeyer G, Singer AH, Leung LL, Cooke JP. L-arginine attenuates platelet reactivity in hypercholesterolemic rabbits. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association*. 1994;14(10):1529-33.
97. Richard S, Morel M, Cleroux P. Arginine methylation regulates IL-2 gene expression: a role for protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5). *Biochem J*. 2005;388(Pt 1):379-86.
98. Schepers E, Barreto DV, Liabeuf S, Glorieux G, Eloot S, Barreto FC, et al. Symmetric dimethylarginine as a proinflammatory agent in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6(10):2374-83.
99. Cappelli G, DiFelice A, Perrone S, Ballestri M, Bonucchi D, Savazzi AM, et al. Which level of cytokine production is critical in haemodialysis? *Nephrol Dial Transplant*. 1998;13 Suppl 7:55-60.
100. Kaysen GA. Biochemistry and biomarkers of inflamed patients: why look, what to assess. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4 Suppl 1:S56-63.
101. Bellomo G, Lippi G, Saronio P, Reboldi G, Verdura C, Timio F, et al. Inflammation, infection and cardiovascular events in chronic hemodialysis patients: a prospective study. *J Nephrol*. 2003;16(2):245-51.
102. Franek E, Blaschkyk R, Kolonko A, Mazur-Psonka L, Langowska-Adamczyk H, Kokot F, et al. Chronic periodontitis in hemodialysis patients with chronic kidney disease is

associated with elevated serum C-reactive protein concentration and greater intima-media thickness of the carotid artery. *J Nephrol*. 2006;19(3):346-51.

103. Gattone M, Iacoviello L, Colombo M, Castelnuovo AD, Soffiantino F, Gramoni A, et al. Chlamydia pneumoniae and cytomegalovirus seropositivity, inflammatory markers, and the risk of myocardial infarction at a young age. *Am Heart J*. 2001;142(4):633-40.

104. Haubitz M, Brunkhorst R. C-reactive protein and chronic Chlamydia pneumoniae infection--long-term predictors for cardiovascular disease and survival in patients on peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16(4):809-15.

105. Feldman AM, Combes A, Wagner D, Kadakomi T, Kubota T, Li YY, et al. The role of tumor necrosis factor in the pathophysiology of heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 2000;35(3):537-44.

106. Niebauer J, Volk HD, Kemp M, Dominguez M, Schumann RR, Rauchhaus M, et al. Endotoxin and immune activation in chronic heart failure: a prospective cohort study. *Lancet*. 1999;353(9167):1838-42.

107. Heinrich J, Schulte H, Schonfeld R, Kohler E, Assmann G. Association of variables of coagulation, fibrinolysis and acute-phase with atherosclerosis in coronary and peripheral arteries and those arteries supplying the brain. *Thromb Haemost*. 1995;73(3):374-9.

108. Pecoits-Filho R, Heimbürger O, Barany P, Suliman M, Fehrman-Ekholm I, Lindholm B, et al. Associations between circulating inflammatory markers and residual renal function in CRF patients. *Am J Kidney Dis*. 2003;41(6):1212-8.

109. Gesualdo L, Pertosa G, Grandaliano G, Schena FP. Cytokines and bioincompatibility. *Nephrol Dial Transplant*. 1998;13(7):1622-6.

110. van der Sande FM, Kooman JP, Leunissen KM. The predictive value of C-reactive protein in end-stage renal disease: is it clinically significant? *Blood Purif*. 2006;24(4):335-41.

111. Lopez Santamaria M, Gamez M, Murcia J, Migliazza L, Clavijo J, Tovar J, et al. [Children with intestinal failure as candidates for intestinal transplantation]. *Cirugia pediatrica : organo oficial de la Sociedad Espanola de Cirugia Pediatrica*. 2000;13(3):116-20.

112. Chawla LS, Krishnan M. Causes and consequences of inflammation on anemia management in hemodialysis patients. *Hemodial Int*. 2009;13(2):222-34.

113. Yeh ET. CRP as a mediator of disease. *Circulation*. 2004;109(21 Suppl 1):II11-4.

114. Li JJ, Fang CH. C-reactive protein is not only an inflammatory marker but also a direct cause of cardiovascular diseases. *Med Hypotheses*. 2004;62(4):499-506.

115. Venugopal SK, Devaraj S, Yuhanna I, Shaul P, Jialal I. Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. *Circulation*. 2002;106(12):1439-41.

116. Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ, Lindholm B, Pecoits-Filho R, Riella M, et al. IL-10, IL-6, and TNF-alpha: central factors in the altered cytokine network of uremia--the good, the bad, and the ugly. *Kidney Int*. 2005;67(4):1216-33.

117. Wang AY, Wang M, Woo J, Lam CW, Li PK, Lui SF, et al. Cardiac valve calcification as an important predictor for all-cause mortality and cardiovascular mortality in long-term peritoneal dialysis patients: a prospective study. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(1):159-68.
118. Goldwasser P, Feldman JG, Emiru M, Barth RH. Effect of dialysis modality on plasma fibrinogen concentration: a meta-analysis. *Am J Kidney Dis.* 2004;44(6):941-9.
119. Goodship TH. Fibrinogen in hemodialysis: the worst of both worlds? *Kidney Int.* 2003;63(1):379-80.
120. Kisilevsky R. Serum amyloid A (SAA), a protein without a function: some suggestions with reference to cholesterol metabolism. *Med Hypotheses.* 1991;35(4):337-41.
121. Maury CP. Comparative study of serum amyloid A protein and C-reactive protein in disease. *Clin Sci (Lond).* 1985;68(2):233-8.
122. Simic-Ogrizovic S, Dopsaj V, Bogavac-Stanojevic N, Obradovic I, Stosovic M, Radovic M. Serum amyloid-A rather than C-reactive protein is a better predictor of mortality in hemodialysis patients. *Tohoku J Exp Med.* 2009;219(2):121-7.
123. Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C. Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 1999;55(2):648-58.
124. Stenvinkel P, Heimbürger O, Lindholm B, Kaysen GA, Bergström J. Are there two types of malnutrition in chronic renal failure? Evidence for relationships between malnutrition, inflammation and atherosclerosis (MIA syndrome). *Nephrol Dial Transplant.* 2000;15(7):953-60.
125. Yeun JY, Levine RA, Mantadilok V, Kaysen GA. C-Reactive protein predicts all-cause and cardiovascular mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 2000;35(3):469-76.
126. Rao M, Guo D, Perianayagam MC, Tighiouart H, Jaber BL, Pereira BJ, et al. Plasma interleukin-6 predicts cardiovascular mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 2005;45(2):324-33.
127. Peruničić-Peković G, Rašić-Milutinović Z, Plješa S. Prediktori mortaliteta kod bolesnika na dijalizi - povezanost malnutricije, inflamcije i ateroskleroze (MIA SYNDROME). *Med Pregl.* 2004;LVII(3-4):149-52.
128. Honda H, Qureshi AR, Heimbürger O, Barany P, Wang K, Pecoits-Filho R, et al. Serum albumin, C-reactive protein, interleukin 6, and fetuin A as predictors of malnutrition, cardiovascular disease, and mortality in patients with ESRD. *Am J Kidney Dis.* 2006;47(1):139-48.
129. Kato A, Takita T, Furuhashi M, Maruyama Y, Hishida A. Comparison of serum albumin, C-reactive protein and carotid atherosclerosis as predictors of 10-year mortality in hemodialysis patients. *Hemodial Int.* 2010;14(2):226-32.
130. Paroni R, Fermo I, Fiorina P, Cighetti G. Determination of asymmetric and symmetric dimethylarginines in plasma of hyperhomocysteinemic subjects. *Amino Acids.* 2005;28(4):389-94.
131. The International Classification of Diseases, 10th Edition (ICD-10) changeover is coming. *Optometry.* 2010;81(10):551-3.

132. Kundu S, Aulchenko YS, van Duijn CM, Janssens AC. PredictABEL: an R package for the assessment of risk prediction models. *Eur J Epidemiol.* 2011;26(4):261-4.
133. Vanholder R, Massy Z, Argiles A, Spasovski G, Verbeke F, Lameire N, et al. Chronic kidney disease as cause of cardiovascular morbidity and mortality. *Nephrol Dial Transplant.* 2005;20(6):1048-56.
134. Lameire N, Jager K, Van Biesen W, de Bacquer D, Vanholder R. Chronic kidney disease: a European perspective. *Kidney Int Suppl.* 2005(99):S30-8.
135. Iseki K. Factors influencing the development of end-stage renal disease. *Clinical and experimental nephrology.* 2005;9(1):5-14.
136. Taal MW, Brenner BM. Predicting initiation and progression of chronic kidney disease: Developing renal risk scores. *Kidney Int.* 2006;70(10):1694-705.
137. Burdick RA, Bragg-Gresham JL, Woods JD, Hedderwick SA, Kurokawa K, Combe C, et al. Patterns of hepatitis B prevalence and seroconversion in hemodialysis units from three continents: the DOPPS. *Kidney Int.* 2003;63(6):2222-9.
138. Schneeberger PM, Keur I, van der Vliet W, van Hoek K, Boswijk H, van Loon AM, et al. Hepatitis C virus infections in dialysis centers in The Netherlands: a national survey by serological and molecular methods. *J Clin Microbiol.* 1998;36(6):1711-5.
139. Uzun H, Konukoglu D, Besler M, Erdenen F, Sezgin C, Muderrisoglu C. The effects of renal replacement therapy on plasma, asymmetric dimethylarginine, nitric oxide and C-reactive protein levels. *Clinical and investigative medicine Medecine clinique et experimentale.* 2008;31(1):E1-7.
140. Shi B, Ni Z, Zhou W, Yu Z, Gu L, Mou S, et al. Circulating levels of asymmetric dimethylarginine are an independent risk factor for left ventricular hypertrophy and predict cardiovascular events in pre-dialysis patients with chronic kidney disease. *Eur J Intern Med.* 2010;21(5):444-8.
141. Tsikas D, Junker W, Frolich JC. Determination of dimethylated arginines in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications.* 1998;705(1):174-6.
142. Martens-Lobenhoffer J, Westphal S, Awiszus F, Bode-Boger SM, Luley C. Determination of asymmetric dimethylarginine: liquid chromatography-mass spectrometry or ELISA? *Clin Chem.* 2005;51(11):2188-9.
143. Siroka R, Trefil L, Rajdl D, Racek J, Rusnakova H, Cibulka R, et al. Asymmetric dimethylarginine, homocysteine and renal function--is there a relation? *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC.* 2005;43(10):1147-50.
144. MacAllister RJ, Parry H, Kimoto M, Ogawa T, Russell RJ, Hodson H, et al. Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Br J Pharmacol.* 1996;119(8):1533-40.
145. Dayoub H, Achan V, Adimoolam S, Jacobi J, Stuehlinger MC, Wang BY, et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: genetic and physiological evidence. *Circulation.* 2003;108(24):3042-7.

146. Cooke JP. Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker? *Circulation*. 2004;109(15):1813-8.
147. Ravani P, Tripepi G, Malberti F, Testa S, Mallamaci F, Zoccali C. Asymmetrical dimethylarginine predicts progression to dialysis and death in patients with chronic kidney disease: a competing risks modeling approach. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(8):2449-55.
148. Leiper J, Murray-Rust J, McDonald N, Vallance P. S-nitrosylation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates enzyme activity: further interactions between nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(21):13527-32.
149. Kiechl S, Egger G, Mayr M, Wiedermann CJ, Bonora E, Oberhollenzer F, et al. Chronic infections and the risk of carotid atherosclerosis: prospective results from a large population study. *Circulation*. 2001;103(8):1064-70.
150. Kielstein JT, Bode-Boger SM, Frolich JC, Ritz E, Haller H, Fliser D. Asymmetric dimethylarginine, blood pressure, and renal perfusion in elderly subjects. *Circulation*. 2003;107(14):1891-5.
151. Leiper J, Nandi M, Torondel B, Murray-Rust J, Malaki M, O'Hara B, et al. Disruption of methylarginine metabolism impairs vascular homeostasis. *Nat Med*. 2007;13(2):198-203.
152. Teerlink T, Nijveldt RJ, de Jong S, van Leeuwen PA. Determination of arginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine in human plasma and other biological samples by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*. 2002;303(2):131-7.
153. Xiong Y, Yuan LW, Deng HW, Li YJ, Chen BM. Elevated serum endogenous inhibitor of nitric oxide synthase and endothelial dysfunction in aged rats. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2001;28(10):842-7.
154. Hill C, Lateef AM, Engels K, Samsell L, Baylis C. Basal and stimulated nitric oxide in control of kidney function in the aging rat. *Am J Physiol*. 1997;272(6 Pt 2):R1747-53.
155. Reckelhoff JF, Kellum JA, Blanchard EJ, Bacon EE, Wesley AJ, Kruckeberg WC. Changes in nitric oxide precursor, L-arginine, and metabolites, nitrate and nitrite, with aging. *Life sciences*. 1994;55(24):1895-902.
156. Jones LC, Tran CT, Leiper JM, Hingorani AD, Vallance P. Common genetic variation in a basal promoter element alters DDAH2 expression in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;310(3):836-43.
157. Horowitz JD, Heresztyn T. An overview of plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in health and disease and in clinical studies: methodological considerations. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007;851(1-2):42-50.
158. Boger RH, Maas R, Schulze F, Schwedhelm E. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a prospective marker of cardiovascular disease and mortality--an update on patient populations with a wide range of cardiovascular risk. *Pharmacol Res*. 2009;60(6):481-7.
159. Aucella F, Maas R, Vigilante M, Tripepi G, Schwedhelm E, Margaglione M, et al. Methylarginines and mortality in patients with end stage renal disease: a prospective cohort study. *Atherosclerosis*. 2009;207(2):541-5.

160. Busch M, Fleck C, Wolf G, Stein G. Asymmetrical (ADMA) and symmetrical dimethylarginine (SDMA) as potential risk factors for cardiovascular and renal outcome in chronic kidney disease - possible candidates for paradoxical epidemiology? *Amino Acids*. 2006;30(3):225-32.
161. Cowley AW, Jr., Mori T, Mattson D, Zou AP. Role of renal NO production in the regulation of medullary blood flow. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2003;284(6):R1355-69.
162. Kielstein JT, Impraim B, Simmel S, Bode-Boger SM, Tsikas D, Frolich JC, et al. Cardiovascular effects of systemic nitric oxide synthase inhibition with asymmetrical dimethylarginine in humans. *Circulation*. 2004;109(2):172-7.
163. Fujiwara N, Osanai T, Kamada T, Katoh T, Takahashi K, Okumura K. Study on the relationship between plasma nitrite and nitrate level and salt sensitivity in human hypertension : modulation of nitric oxide synthesis by salt intake. *Circulation*. 2000;101(8):856-61.
164. Ito A, Egashira K, Narishige T, Muramatsu K, Takeshita A. Renin-angiotensin system is involved in the mechanism of increased serum asymmetric dimethylarginine in essential hypertension. *Japanese circulation journal*. 2001;65(9):775-8.
165. Schulze F, Maas R, Freese R, Schwedhelm E, Silberhorn E, Boger RH. Determination of a reference value for N(G), N(G)-dimethyl-L-arginine in 500 subjects. *Eur J Clin Invest*. 2005;35(10):622-6.
166. Palomo I, Contreras A, Alarcon LM, Leiva E, Guzman L, Mujica V, et al. Elevated concentration of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in individuals with metabolic syndrome. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*. 2011;24(4):224-8.
167. Coen G, Mantella D, Sardella D, Beraldi MP, Ferrari I, Pierantozzi A, et al. Asymmetric dimethylarginine, vascular calcifications and parathyroid hormone serum levels in hemodialysis patients. *J Nephrol*. 2009;22(5):616-22.
168. Zoccali C, Maas R, Cutrupi S, Pizzini P, Finocchiaro P, Cambareri F, et al. Asymmetric dimethyl-arginine (ADMA) response to inflammation in acute infections. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22(3):801-6.
169. Takahashi R, Ito Y, Takahashi H, Ishii H, Kasuga H, Mizuno M, et al. Combined values of serum albumin, C-reactive protein and body mass index at dialysis initiation accurately predicts long-term mortality. *Am J Nephrol*. 2012;36(2):136-43.
170. Kumagai H, Sakurai M, Takita T, Maruyama Y, Uno S, Ikegaya N, et al. Association of homocysteine and asymmetric dimethylarginine with atherosclerosis and cardiovascular events in maintenance hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*. 2006;48(5):797-805.
171. Stuhlinger MC, Oka RK, Graf EE, Schmolzer I, Upson BM, Kapoor O, et al. Endothelial dysfunction induced by hyperhomocyst(e)inemia: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation*. 2003;108(8):933-8.
172. Vallance P, Leiper J. Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine:dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(6):1023-30.

173. Sladek T, Gerova M, Znojil V, Devat L. Morphometric characteristics of cardiac hypertrophy induced by long-term inhibition of NO synthase. *Physiol Res*. 1996;45(4):335-8.
174. Schnabel R, Blankenberg S, Lubos E, Lackner KJ, Rupprecht HJ, Espinola-Klein C, et al. Asymmetric dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease: results from the AtheroGene Study. *Circ Res*. 2005;97(5):e53-9.
175. Bai Y, Sun L, Du L, Zhang T, Xin W, Lan X, et al. Association of circulating levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA) with carotid intima-media thickness: Evidence from 6168 participants. *Ageing research reviews*. 2012.
176. Kielstein JT, Fliser D. The past, presence and future of ADMA in nephrology. *Nephrol Ther*. 2007;3(2):47-54.
177. Schulze F, Carter AM, Schwedhelm E, Ajjan R, Maas R, von Holten RA, et al. Symmetric dimethylarginine predicts all-cause mortality following ischemic stroke. *Atherosclerosis*. 2010;208(2):518-23.
178. Kielstein JT, Salpeter SR, Bode-Boeger SM, Cooke JP, Fliser D. Symmetric dimethylarginine (SDMA) as endogenous marker of renal function--a meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(9):2446-51.
179. Koenig W, Lowel H, Baumert J, Meisinger C. C-reactive protein modulates risk prediction based on the Framingham Score: implications for future risk assessment: results from a large cohort study in southern Germany. *Circulation*. 2004;109(11):1349-53.
180. Ridker PM, Paynter NP, Rifai N, Gaziano JM, Cook NR. C-reactive protein and parental history improve global cardiovascular risk prediction: the Reynolds Risk Score for men. *Circulation*. 2008;118(22):2243-51, 4p following 51.
181. Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2002;347(20):1557-65.
182. Menon V, Greene T, Wang X, Pereira AA, Marcovina SM, Beck GJ, et al. C-reactive protein and albumin as predictors of all-cause and cardiovascular mortality in chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2005;68(2):766-72.
183. Iseki K, Tozawa M, Yoshi S, Fukiyama K. Serum C-reactive protein (CRP) and risk of death in chronic dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 1999;14(8):1956-60.
184. Rački S, Vujičić B, Bubić I, Mračković-Šutić I, Kes P, Dvornik Š, Mavrić Ž, Zaputović L. Clinical significance of the malnutrition-inflammation-atherosclerosis syndrome in the patients on maintenance hemodialysis. *Medicina Fluminensis*. 2010;46(4):519-32.
185. Stenvinkel P, Alvestrand A. Inflammation in end-stage renal disease: sources, consequences, and therapy. *Semin Dial*. 2002;15(5):329-37.
186. Witko-Sarsat V, Nguyen-Khoa T, Jungers P, Drueke TB, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as a novel molecular basis of oxidative stress in uraemia. *Nephrol Dial Transplant*. 1999;14 Suppl 1:76-8.
187. Galli F, Ronco C. Oxidant stress in hemodialysis. *Nephron*. 2000;84(1):1-5.

188. Owen WF, Lowrie EG. C-reactive protein as an outcome predictor for maintenance hemodialysis patients. *Kidney Int.* 1998;54(2):627-36.
189. Lloyd-Jones DM, Liu K, Tian L, Greenland P. Narrative review: Assessment of C-reactive protein in risk prediction for cardiovascular disease. *Ann Intern Med.* 2006;145(1):35-42.
190. Lowrie EG, Lew NL. Death risk in hemodialysis patients: the predictive value of commonly measured variables and an evaluation of death rate differences between facilities. *Am J Kidney Dis.* 1990;15(5):458-82.
191. Hakim RM, Levin N. Malnutrition in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 1993;21(2):125-37.
192. Friedman AN, Fadem SZ. Reassessment of albumin as a nutritional marker in kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(2):223-30.
193. Akdag I, Yilmaz Y, Kahvecioglu S, Bolca N, Ercan I, Ersoy A, et al. Clinical value of the malnutrition-inflammation-atherosclerosis syndrome for long-term prediction of cardiovascular mortality in patients with end-stage renal disease: a 5-year prospective study. *Nephron Clin Pract.* 2008;108(2):c99-c105.
194. Cueto Manzano AM. [Hypoalbuminemia in dialysis. Is it a marker for malnutrition or inflammation?]. *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion.* 2001;53(2):152-8.
195. Dimitrijevic Z. Kliničko-biohemijska korelacija parametara oksidativnog stresa kod bolesnika na hemodijalizi lečenih eritropoetinom. Niš: Univerzitet u Nišu; 2012.
196. Stenvinkel P, Heimbürger O, Paulter F, Diczfalusy U, Wang T, Berglund L, et al. Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int.* 1999;55(5):1899-911.
197. Kalantar-Zadeh K, Kopple JD, Kilpatrick RD, McAllister CJ, Shinaberger CS, Gjertson DW, et al. Association of morbid obesity and weight change over time with cardiovascular survival in hemodialysis population. *Am J Kidney Dis.* 2005;46(3):489-500.
198. Mafra D, Guebre-Egziabher F, Fouque D. Body mass index, muscle and fat in chronic kidney disease: questions about survival. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23(8):2461-6.
199. Weekley CC, Peralta CA. Advances in the use of multimarker panels for renal risk stratification. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2012;21(3):301-8.
200. Kidney Disease: Improving Global Outcomes CKD-MBDWG. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl.* 2009(113):S1-130.
201. Tripepi G, Mattace Raso F, Sijbrands E, Seck MS, Maas R, Boger R, et al. Inflammation and asymmetric dimethylarginine for predicting death and cardiovascular events in ESRD patients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011;6(7):1714-21.
202. Zethelius B, Berglund L, Sundstrom J, Ingelsson E, Basu S, Larsson A, et al. Use of multiple biomarkers to improve the prediction of death from cardiovascular causes. *N Engl J Med.* 2008;358(20):2107-16.

203. Veeranna V, Zalawadiya SK, Niraj A, Pradhan J, Ference B, Burack RC, et al. Homocysteine and reclassification of cardiovascular disease risk. *Journal of the American College of Cardiology*. 2011;58(10):1025-33.

BIOGRAFIJA

Osnovni podaci:

Aleksandra Ignjatović



Datum i mesto rođenja:

04.06.1980. godine u Nišu

Naučna oblast i uža specijalnost:

Molekularna medicina, Medicinska statistika

Obrazovanje

Naziv završenog fakulteta:

Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu

Studijska grupa:

Medicina

Datum diplomiranja:

16.06.2006. godine sa prosečnom ocenom 9,27
Ocena 10 na diplomskom ispitu

Stipendije

Stipendija Ministarstva prosvete i sporta Republike Srbije (1999-2005)

Stipendija Republičke Fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka (2006-2008)

Rezultati naučno-istraživačkog rada:

Izabrane publikacije:

Ignjatovic AM, Cvetkovic TP, Pavlovic RM, Đorđević VM, Milosevic ZG, Đorđević VB, Pavlović DD, Stojanović IR, Bogdanović D. Endothelial dysfunction, inflammation and malnutrition markers as predictors of mortality in dialysis patients: multimarker approach. *Int Urol Nephrol*. 2013. *In press*

Ignjatović AM, Cvetković TP, Pavlović RM, Dorđević VM, Milošević ZG, Dorđević VB, Pavlović DD, Stojanović IR, Živanović SC. ADMA and C-reactive protein as mortality predictors in dialysis patients. *Centr Eur J Med* 2013, 8(3):346-353

Izabrana saopštenja na skupovima od nacionalnog i internacionalnog značaja:

Cvetković T, Pavlović R, **Topalović A**, Pavlović Dušica, Đorđević V, Veličković-Radovanović Radmila, Đorđević V, Stefanović Nikola. Dimetilarginin i klasični inflamatorni marker kod pacijenata na hemodijalizi. *Kardionefrologija*, Punta Niš, 2011, 27-33.

Cvetković Tatjana, Veličković-Radovanović Radmila, Pavlović Radmila, Đorđević V, Vlahović P, Stefanović N, Sladojević N, **Ignjatović A**. The level of arginine metabolic products in kidney transplantation patients. *NEPHROLOGY DIALYSIS TRANSPLANTATION*, 2012 27 (Suppl2): 523. 49th Congress of the European-Renal-Association/European-Dialysis-and-Transplant-Association (ERA-EDTA), Paris, 24-27 May, 2012.

Vlahovic P, Cvetkovic T, Djordjevic V, Velickovic-Radovanovic R, Stefanovic N, Ignjatovic A, Sladojevic N. The effect of different calcineurin inhibitors on oxidative stress parameters in renal transplant recipients. *NEPHROLOGY DIALYSIS TRANSPLANTATION*, 2012 27 (Suppl2): 525. 49th Congress of the European-Renal-Association/European-Dialysis-and-Transplant-Association (ERA-EDTA), Paris, 24-27 May, 2012.

Stefanovic N, Cvetkovic T, Velickovic-Radovanovic R, Djordjevic V, Sladojevic N, **Ignjatovic A**, Zivanovic S, Pavlovic R. Determination of C-reactive protein, serum amyloid and asymmetric-dimethylarginine levels in patients on hemodialysis. *Abstractbook*, 10th BANTAO Congress, Sani Beach, Greece, 13-15 October, 2011.

PRIMENA MULTIMARKER PRISTUPA U PROCENI RIZIKA KOD PACIJENATA NA DIJALIZI

Sažetak

Uvod: Pacijente na dijalizi karakteriše izuzetno visoka smrtnost, uglavnom kardiovaskularne etiologije. Patofiziološki mehanizmi koji dominiraju kod ovih pacijenata su endotelna disfunkcija, inflamacije i malnutricija. Procena rizika kod ovih pacijenata izuzetno važna. Da bi jedan marker ili grupa markera bila prihvaćena kao novi faktor rizika potrebno je sprovesti nekoliko statističkih testova. Multimarker pristup je set statističkih testova kojima se procenjuje prediktivna vrednost više markera i utvrđuje da li statistički model sa novim markerima doprinosi boljoj stratifikaciji rizika u odnosu na tradicionalne faktora rizika.

Cilj: Cilj ovog istraživanja je određivanje i upoređivanje individualnih prediktivnih vrednosti markera endotelne disfunkcije (ADMA), markera inflamacije (CRP i SAA) i malnutricije (albumin) kod pacijenata na dijalizi. Multimarker pristupom treba odrediti zajedničku prediktivnu vrednosti i utvrditi kojom kombinacijom markera se postiže najbolja stratifikacija rizika.

Metode: U ovoj trogodišnjoj studiji praćenja koncentracija ADMA i SDMA merena je HPLC metodom. Koncentracija CRP određivana je imunoturbidimetrijskom metodom, a koncentracija SAA je određivana imunonefalometrijskom metodom. Koncentracija albumina je određivana rutinskim biohemijskim testovima.

Značaj: Upotreba multimarker pristupa pri validaciji markera endotelne disfunkcije, inflamacije i malnutricije donosi nova saznanja vezana za stratifikaciju rizika kod pacijenata na dijalizi. Ovo istraživanje pokazuje da su sva četiri ispitivana markera nezavisni prediktori ukupne i kardiovaskularne smrtnosti. ADMA i albumin predstavljaju najbolju kombinaciju markera pri proceni rizika kod ovih pacijenata. Ispitivanja vezana za validaciju markera ili grupe markera kod pacijenata na dijalizi doprinosi boljoj klasifikaciji pacijenata u grupe sa različitim rizikom. Samim tim pacijenti dobijaju tretman i lečenje koje je prilagođeno riziku za razvoj fatalnog ishoda.

APPLICATION OF MULTIMARKER APPROACH TO RISK STRATIFICATION AMONG PATIENTS ON DIALYSIS

Summary

Introduction: The mortality rate of hemodialysis patients is very high, 10-20 times higher than in general population. Cardiovascular disease is reported to be major cause of death. By using this approach many different pathophysiological components will be covered. For validation one marker or combination of few markers as risk factors is needed to perform several statistical tests.

Aim: The main goal of this thesis is to compare predictive values of ADMA as marker of endothelial dysfunction, CRP and SAA, as markers of inflammation and albumin as marker of malnutrition among patients on dialysis, and in addition to create a common predictive value for patients with several risk factors.

Methods: In this 3-years follow-up study, plasma concentrations of ADMA and SDMA was measured by HPLC. CRP was measured using immunoturbidimetric assays; SAA was measured using immunonephalometric assays. Albumin level was obtained using standard clinical laboratory methods.

Importance: The use of multimarker approach in evaluating markers of endothelial dysfunction, inflammation and malnutrition gives a new data related to risk stratification among patients on dialysis. This research shows that all markers are independent predictors of all-cause and cardiovascular cause of death. It is demonstrated that combined use of biomarkers increases the predictive power of prognostic model, which would improve risk stratification among patients on dialysis. Best combination of markers for risk stratification is ADMA and albumin. Study of assessment of novel markers as risk factors contributes to better classification patients on dialysis in groups with different risk level. Therefore, management and treatment of patients on dialysis is adjusted by risk level.