

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Aleksandar N. Janković

UTICAJ RAZLIČITIH FAKTORA NA
PREŽIVLJAVANJE ARTERIOVENSКИH
FISTULA KOD BOLESNIKA NA
HEMODIJALIZI

doktorska disertacija

BEOGRAD, 2017

UNIVERSITY OF BELGRADE
MEDICAL FACULTY

Aleksandar N. Jankovic

INFLUENCE OF DIFFERENT FACTORS
ON ARTERIOVENOUS FISTULA
SURVIVAL IN HEMODIALYSIS PATIENTS

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

Mentor: Prof. dr Nada Dimković, redovni Profesor Interne medicine, Medicinski Fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi Komisije:

1. Prof. dr Višnja Ležaić, redovni Profesor Interne medicine, Medicinski Fakultet, Univerzitet u Beogradu, predsednik komisije
2. Prof. dr Nenad Ilijevski, vanredni Profesor Hirurgije, Medicinski Fakultet, Univerzitet u Beogradu, član komisije
3. Prof. dr Radojica Stolić, vanredni Profesor Interne medicine, Univerzitet u Kragujevcu, Fakultet medicinskih nauka, član komisije

Uticaj različitih faktora na preživljavanje arteriovenskih fistula kod bolesnika na hemodijalizi

REZIME

Uvod: Arteriovesnka fistula (AVF) se smatra vaskularnim pristupom koji je najsigurniji, najdugotrajniji, ima najmanji broj komplikacija i koji bi trebalo da bude prvi izbor kod svih bolesnika koji započinju hemodijalizu. Uočeno je da bolesnici koji kao vaskularni pristup koriste AVF, imaju najmanji mortalitet u poređenju sa onima koji koriste arteriovenski graft (AVG) ili trajni vaskularni kateter. Istovremeno, uz kardiovaskularni morbiditet, razlozi povezani sa komplikacijama vaskularnih pristupa za hemodijalizu predstavljaju najčešći razlog hospitalizacija ovih bolesnika. Stoga je i ispitivanje faktora koji utiču na preživljavanje AVF kao preporučenog vaskularnog pristupa od izuzetnog značaja. U literaturi je malo podataka koji govore o ulozi faktora endotelne disfunkcije i genskog polimorfizma pojedinih faktora na preživljavanje vaskularnog pristupa.

Cilj: Ciljevi istraživanja su bili ispitivanje uticaja vaskularnih kalcifikacija i uticaja polimorfizma gena koji imaju uticaj na endotelnu funkciju na preživljavanje primarnih AVF - (gena za angiotenzin I konvertujući enzim (ACE), matriks-metaloproteinazu 3 (MMP3) i endotelijalnu azot-oksidi sintazu (eNOS)). Takođe, ispitivan je uticaj serumskih koncentracija odabranih endotelnih faktora rasta i parametara endotelne disfunkcije kao i uremijskih toksina na preživljavanje primarnih AVF (*transforming growth factor beta-TGF- β* , *platelet derived growth factor-PDGF*, endotelin-1-ET1, asimetrični dimetil arginin-ADMA).

Materijal i metode: Ispitivanje preživljavanja primarnih AVF sprovedeno je kod bolesnika koji se nalaze na hroničnom programu lečenja hemodijalizama u Kliničkom odeljenju za nefrologiju i metaboličke poremećaje sa dijalizom „Prof. Dr Vasilije Jovanović“, Kliničko-bolničkog Centra Zvezdara u Beogradu duže od 6 meseci. Ukupno je bilo obuhvaćeno 314 bolesnika. Standardni demografski i laboratorijski podaci su dobijeni iz istorija bolesti bolesnika. Za skoriranje vaskularnih kalcifikacija korišćen je Adragao skor čiji rang može biti od 0 do 8. Ovom skorom dodat je i rentgenski određen skor kalcifikacija krvnih sudova regije AVF kojim je analizirano prisustvo kalcifikacija radijalne i ulnarne arterije kao i samog arteriovenskog spoja i rangiran je od 0 do 3. Tako je dobijen ukupni kalcifikacioni skor koji može biti od 0 do

11. *Polymerase-chain reaction* (PCR) metodom izvršena je genotipizacija i utvrđivanje I/D polimorfizma u genu za angiotenzin I konvertujući enzim (ACE), 5A/6A polimorfizma u genu za matriks-metaloproteinazu 3 (MMP3) i G/T polimorfizma u genu za endotelijalnu azot-oxid sintazu (eNOS). Serumska koncentracija TGF- β , PDGF, ET-1 i ADMA određivana je iz krvi uzete pre srednje hemodijalizne sesije u nedelji korišćenjem komercijalnih *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) testova.

Rezultati: Preživljavanje primarnih AVF shodno ukupnom kalcifikacionom skorom prospektivno je praćeno 5 godina. Korišćenjem *Cox proportional hazard* modela utvrđeno je da bolesnici sa srednje izraženim ukupnim kalcifikacionim skorom (skor 4 do 7) imaju povećan rizik za prestanak funkcionisanja AVF sa graničnom statističkom značajnošću (*hazard rate*-HR 3.82, 95% interval poverenja-CI 1.10-13.23; $p=0.055$), dok bolesnici sa najizraženijim ukupnim kalcifikacionim skorom (skor 8 do 11) imaju statistički značajno veći rizik za prestanak funkcionisanja AVF (HR 4.65, 95% interval poverenja 0.97-22.38; $p=0.035$). Praćenjem uticaja prisustva kalcifikacija u krvnim sudovima AVF regije uočeno je da prisustvo ovih kalcifikacija nosi statistički značajan rizik za prestanak funkcionisanja AVF (HR 3.42, 95% interval poverenja 1.00-11.67; $p=0.049$).

Sprovedeno je i retrospektivno ispitivanje preživljavanja primarnih AVF u odnosu na I/D polimorfizam u genu za ACE, 5A/6A polimorfizam u genu za MMP3 i G/T polimorfizam u genu za eNOS. Iako bez statističke značajnosti, uočeno je da je nakon deset godina najslabije preživljavaju primarne AVF kod II homozigota poredeći sa ID i DD polimorfizmima u genu za ACE (log rank test=0.133; $p=0.936$), a da je nakon 5 godina bolje preživljavaju primarne AVF kod bolesnika sa prisutnim 6A alelom u genu za MMP3 u odnosu na one koje ga nemaju (log rank test=3.415; $p=0.181$) kao i kod GG homozigota u poređenju sa GT i TT polimorfizmima u genu za eNOS (log rank test=1.973; $p=0.373$). Korišćenjem *Cox proportional hazard* modela ustanovljeno je da, iako bez statističke značajnosti, prisustvo D alela u genu za ACE smanjuje rizik za pojavu prestanka funkcionisanja primarne AVF za 14.2% (HR 0.858; CI 0.366-2.013, $p=0.725$). Prisustvo 5A alela u genu za MMP3 povećava rizik za pojavu prestanka funkcionisanja primarne AVF gotovo 2 puta (HR 1.963; CI 0.924-4.168, $p=0.079$), a prisustvo T alela u genu za eNOS 1.57 puta (HR 1.578; CI 0.569-4.373, $p=0.381$).

Preživljavanje primarnih AVF nakon određivanja serumskih koncentracija TGF- β , PDGF, ET-1 i ADMA praćeno je 18 meseci. Korišćenjem *Cox proportional hazard* modela ispitivan je uticaj TGF- β i ET-1 na prestanak funkcionisanja AVF, dok uticaj ADMA i PDGF nije, obzirom da su prosečne vrednosti ADMA i PDGF bile veće u grupi bolesnika koji nisu doživeli trombozu AVF. Iako bez statističke značajnosti, uočava se da jedinični porast vrednosti ET-1 povećava rizik za prestanak funkcionisanja AVF za 88.3%.

Zaključak: Sprovedenim ispitivanjem dokazano je da su bolesnici sa izraženim vaskularnim kalcifikacijama kao i sa prisutnim kalcifikacijama u krvnim sudovima regije AVF imali statistički značajno povećan rizik za prestanak funkcionisanja primarnih AVF. Iako bez statističke značajnosti, bolesnici sa prisutnim D alelom u genu za ACE imali su za 15% manji rizik, dok su bolesnici sa prisutnim 5A alelom u genu za MMP3 i T alelom u genu za eNOS imali za 1.96 odnosno 1.57 puta povećan rizik za prestanka funkcionisanja primarne AVF. Od ispitivanih markera endotelne disfunkcije, povećanje ET-1 i TGF- β vodi porastu rizika od prestanka funkcionisanja primarne AVF, ali bez statističke značajnosti.

Ključne reči: primarna AVF, preživljavanje, vaskularne kalcifikacije, genski polimorfizam, markeri endotelne disfunkcije.

Naučna oblast: Nefrologija

Influence of different factors on arteriovenous fistula survival in hemodialysis patients

ABSTRACT

Arteriovenous fistula (AVF) is considered as the safest and longest-running vascular access (VA), which has the lowest number of complications. Therefore, it was recommended to be the first choice in all patients starting hemodialysis. Also, it is shown that patients with AVF have the lowest mortality rate comparing with patients using arteriovenous graft (AVG) or tunneled catheter. Besides cardiovascular morbidity, complications related to VA are the main reason for hospitalization of hemodialysis patients. Therefore, the examination of the factors that affect the survival of AVF is of great importance. In the literature, there is little information about the role of factors of endothelial dysfunction and genetic polymorphisms of some factors on the vascular access survival.

Aim: Aim of the study was to analyse the influence of vascular calcifications on primary AVF survival and to analyse the influence of gene polymorphism related to endothelial function on primary AVF survival: gene for angiotensin I converting enzyme (ACE), gene for matrix-metalloproteinase 3 (MMP3) and gene for endothelial nitric oxide synthase (eNOS). In addition, study included the influence of endothelial growth factors and uremic toxins on primary AVF survival including serum concentrations of transforming growth factor beta-TGF- β , platelet derived growth factor-PDGF, endothelin-1-ET1, asymmetric dimethylarginine-ADMA).

Materials and methods: The study about primary AVF survival was conducted in Clinical Department for Nephrology and Metabolic Disorders with Dialysis „Prof. Dr Vasilije Jovanović“, Zvezdara University Medical Center, Belgrade and included 314 patients who were on regular hemodialysis for more than six months. Standard demographic and laboratory data were obtained from the medical records. Adragao method was used for vascular calcification scoring and score ranged from 0 to 8. This score was supplemented with calcification score of AVF according to presence of vascular calcification in ulnar and radial artery and region of arterio-venous anastomosis. The calcification score of AVF-region ranged from 0 to 3. Overall calcification score (Adragao score + AVF-region score) ranged from 0 to 11. *Polymerase-chain reaction* (PCR) was performed for genotyping and determination of

I/D polymorphism in ACE gene, 5A/6A polymorphism in MMP3 gene and G/T polymorphism in eNOS gene. Serum concentrations of TGF- β , PDGF, ET-1 and ADMA were measured from blood taken before middle-week hemodialysis using commercial *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) tests.

Results: Five-year survival of primary AVF according to presence of vascular calcification was prospectively followed for 5 years. Using *Cox proportional hazard* model it was confirmed that patients with moderate overall calcification score (from 4 to 7) had a higher risk of developing AVF failure (HR 3.82, CI 1.10-13.23, p=0.055). Patients with severe overall calcification score (from 8 to 11) had a 4.65-fold higher risk of developing AVF failure (CI 0.97-22.38, p=0.035). By analysing the influence of calcification in AVF blood vessels on AVF longevity it was shown that patients with calcified AVF-blood vessels had increased risk to develop AVF failure (HR 3.42 95% CI 1.00–11.67; P = 0.049).

The influence of ACE, MMP3 and eNOS gene polymorphism on AVF survival was analysed by retrospective analysis. Although without statistical significance, it was confirmed that after ten years, the lowest survival rate had AVFs of patients who were homozygote II for ACE gene compared with patients with ID and DD gene polymorphism (log rank test=0.133; p=0.936). Patients with 6A allele in MMP3 gene had a better survival rate after five years compared with patients without this allele (log rank test=3.415; p=0.181). Finally, AVFs in patients who were GG homozygote for eNOS had better five-year survival than AVFs in patients with GT and GG polymorphism (log rank test=1.973; p=0.373). Using *Cox proportional hazard* model it was shown that presence of D allele in ACE gene lowered risk of developing AVF failure for 14.2% (HR 0.858; CI 0.366-2.013, p=0.725) although without statistical significance. Presence of 5A allele in MMP3 gene almost duplicate risk for developing AVF failure (HR 1.963; CI 0.924-4.168, p=0.079) and presence of T allele in eNOS gene increased risk for developing AVF failure 1.57-fold (HR 1.578; CI 0.569-4.373, p=0.381).

Survival of primary AVFs after determination of serum concentrations of TGF- β , PDGF, ET-1 and ADMA was followed for 18 months. Since the mean serum concentrations of ADMA i PDGF was higher in group of patients who didn't develop AVF failure, *Cox proportional hazard* model was used to analyse the influence of TGF-

β and ET-1 on AVF failure. Although without statistical significance, it was shown that ET-1 increase for one unit raised the risk for AVF failure for 88.3% (HR 1.883; CI 0.003-1097.331, $p=0.846$).

Conclusion: This study has proved that patients with prominent overall vascular calcification and calcification in AVF region-blood vessels had statistically higher risk for developing AVF failure. Although without statistical significance, presence of D allele in ACE gene carried 15% lower risk and presence of 5A allele in MMP3 gene and T allele in eNOS gene carried 1.96-fold and 1.57-fold higher risk for developing AVF failure. Among analyzed markers of endothelial dysfunction, increased ET-1 and TGF- β were linked to higher risk for developing AVF failure, but without statistical significance.

Key words: primary AVF, survival, vascular calcification, genetic polymorphism, markers of endothelial dysfunction.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Terminalna bubrežna slabost, hemodijaliza i vrste vaskularnih pristupa	
1.1.1. Epidemiologija terminalne bubrežne slabosti	
1.1.2. Hemodijaliza i vrste vaskularnih pristupa	
1.1.3. Arteriovenska fistula (AVF) i njene prednosti	
1.2. Faktori koji utiču na preživljavanje arteriovenskih fistula	
1.2.1. Karakteristike bolesnika i uslovi dijaliznog lečenja	
1.2.2. Komplikacije arteriovenskih fistula	
1.2.3. Hiperkoagulabilno stanje	
1.2.4. Vaskularne kalcifikacije	
1.2.5. Polimorfizam gena za pojedine endotelne faktore	
1.2.6. Koncentracija pojedinih endotelnih faktora	
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	18
3. MATERIJAL I METODE.....	19
3.1. Bolesnici	
3.1.1. Bolesnici kod kojih je ispitivan uticaj vaskularnih kalcifikacija na preživljavanje primarnih AVF	
3.1.2. Bolesnici kod kojih je izvršena genotipizacija i ispitivan uticaj polimorfizma odabranih gena koji imaju uticaj na endotelnu funkciju (gen za angiotenzin I konvertujući enzim (ACE), matriks-metaloproteinazu 3 (MMP3) i endotelijalnu azot-oksidi sintazu (eNOS) na preživljavanje primarnih AVF	
3.1.3. Bolesnici kod kojih je ispitivan uticaj serumskih koncentracija odabranih endotelnih faktora rasta, parametara endotelne disfunkcije kao i uremijskih toksina (<i>endothelin-1</i> (ET-1), <i>transforming-growth</i> faktor- <i>beta</i> (TGF- <i>beta</i>), <i>platelet-derived growth</i> -faktor (PDGF) i asimetrični dimetilarginin (ADMA)) na preživljavanje primarnih AVF	

3.2.	Metode	
3.2.1.	Određivanje brzine pulsog talasa	
3.2.2.	Određivanje vaskularnih kalcifikacija	
3.2.3.	Genotipizacija	
3.2.3.1.	Određivanje I/D polimorfizma u genu za angiotenzin konvertujući enzim (ACE)	
3.2.3.2.	Određivanje 5A/6A polimorfizma u genu za matriksnu-metaloproteinazu-3 (MMP3)	
3.2.3.3.	Određivanje G/T polimorfizma u genu za endotelijalnu azot-monoksid sintazu (eNOS)	
3.2.4.	ELISA metoda za određivanje serumskih koncentracija TGF- β , PDGF, ET-1 i ADMA	
3.3.	Statistička analiza podataka	
4.	REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....	33
4.1.	Ispitivanje uticaja vaskularnih kalcifikacija na preživljavanje primarnih AVF	
4.1.1.	Ispitivanje uticaja ukupnog kalcifikacionog skora na preživljavanje primarnih AVF	
4.1.2.	Ispitivanje uticaja prisustva kalcifikacija u krvnim sudovima regije AVF na preživljavanje primarnih AVF	
4.2.	Ispitivanje uticaja polimorfizma odabranih gena koji imaju uticaj na endotelnu funkciju (gen za angiotenzin I konvertujući enzim (ACE), matriks-metaloproteinazu 3 (MMP3) i endotelijalnu azot-oksidi sintazu (eNOS)) na preživljavanje primarne AVF	
4.3.	Ispitivanje uticaja serumskih koncentracija odabranih endotelnih faktora rasta, parametara endotelne disfunkcije kao i uremijskih toksina (<i>endothelin-1</i> (ET-1), <i>transforming-growth</i> faktor- <i>beta</i> (TGF- β), <i>platelet-derived growth</i> -faktor (PDGF) i asimetrični dimetilarginin (ADMA)) na preživljavanje primarne AVF	
5.	DISKUSIJA.....	56
6.	ZAKLJUČCI.....	69
7.	LITERATURA.....	71

UVOD

1.1. Terminalna bubrežna slabost, hemodijaliza i vrste vaskularnih pristupa

1.1.1. Epidemiologija terminalne bubrežne slabosti

Broj bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću (TBS) koja dovodi do potrebe za zamenom bubrežne funkcije u značajnom je porastu u poslednjih 40 godina. Američki registar bubrežnih bolesnika prijavljuje porast ovakvih bolesnika sa 10.000 bolesnika 1973. godine na preko 660.000 bolesnika 2013. godine (1). Slična situacija je i u drugim delovima sveta, uključujući i Srbiju gde u poslednjoj deceniji broj bolesnika sa TBS konstantno raste, te je 2005. god. bio 3530, 2009. god. 5208, a 2014. god. 5858 bolesnika (2,3,4). Porast broja bolesnika sa TBS može se objasniti porastom stare populacije, kao i povećanom prevalencom osoba sa dijabetes melitusom (DM) i hipertenzijom (HTA) kao najčešćim etiološkim uzročnicima TBS (5). Podaci Svetske Zdravstvene Organizacije (SZO) ukazuju da je 1980. god. u ukupnoj svetskoj populaciji bilo 4.7% osoba sa DM, a čak 8.5% 2014. god. Istovremeno je došlo i do porasta broja ljudi sa loše kontrolisanom HTA sa 600 miliona koliko je bilo 1980. god, na gotovo jednu milijardu 2008. god (6,7).

U Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) na dan 31.12.2013. god., hemodijaliza je bila najviše korišćeni metod zamene bubrežne funkcije i to kod čak 63.7% bolesnika sa TBS, peritoneumsku dijalizu je koristilo svega 6.8% bolesnika, dok je 29.2% imalo funkcionalni transplantirani bubreg (8). U državama čiji su podaci bili dostupni prilikom formiranja Evropskog registra za 2014. god. pokazana je različita zastupljenost ove tri metode, ali posmatrano sveobuhvatno najveći broj bolesnika lečen je hemodijalizom (49.0%). Peritoneumska dijaliza je svugde bila najmanje zastupljeni način zamene bubrežne funkcije sa svega 5.4% bolesnika, a samo u Danskoj je prevazilazila 10% (10.7%). U Austriji, Danskoj, Finskoj, Estoniji, Islandu, Norveškoj, većini regija Španije, Švedskoj, Velikoj Britaniji, Holandiji veći je broj bolesnika sa funkcionalnim presađenim bubregom nego na hemodijalizi, dok je u Belgiji, Bosni i Hercegovini, Francuskoj, Grčkoj, Crnoj Gori, Rumuniji, Srbiji, mursijskom i valencijskom regionu Španije dominantna hemodijaliza (9). U Godišnjem izveštaju o lečenju dijalizama i transplantacijom bubrega u Srbiji 2014. godine, prikazano je da je

77.1% bolesnika lečeno hemodijalizom, 8.1% peritoneumskom dijalizom, a 14.1% ima funkcionalan presađeni bubreg (4).

1.1.2. Hemodijaliza i vrste vaskularnih pristupa

Imajući u vidu zastupljenost hemodijaze kao metode zamene bubrežne funkcije u Srbiji, opravdano je razmatrati dugovečnost arteriovenske fistule (AVF) kao jedne od vrsta trajnog vaskularnog pristupa za hemodijalizu. Naime, kvalitet hemodijalize zavisi od brojnih činilaca uključujući vrstu hemodijalizne procedure, opšteg stanja samog bolesnika, ali pre svega od vaskularnog pristupa kojim se omogućava priliv adekvatne količine krvi do hemodijaliznog filtera. Postoje tri osnovne vrste vaskularnih pristupa za hemodijalizu:

- AVF koja predstavlja subkutanu, artefijalno kreiranu komunikaciju između lumena arterije i vene, najčešće na nedominantnoj ruci.
- Arteriovenski graft (AVG) koji se interponira između native arterije i vene i koristi se kada ne postoji mogućnost kreiranja AVF; proteza koja se koristi može biti od prirodnog (najčešće goveđeg) ili sintetskog materijala (politetrafluoroetilen-PTFE, Gore-Tex i sl.).
- Dvolumenski centralni venski kateteri (CVK) koji se plasiraju u neku od velikih vena (*v.jugularis*, *v.subclavia*, *v.femoralis*), koriste se u slučaju kada je potrebno obavljanje neke od procedura koje zahtevaju hitan pristup krvnom sudu (hemodijaliza zbog akutne bubrežne slabosti, intoksikacije; terminalna faza bubrežne slabosti koja zahteva hemodijalizu a ne postoji obezbeđen trajni vaskularni pristup; hronični program hemodijalize u situacijama kada je trajni vaskularni pristup prestao da funkcioniše; neophodna plazmafereza; plasiran kateter za peritoneumsku dijalizu koji još ne može da se koristi; hemodijaliza usled odbacivanja kalema; potreba za kontinuiranim dijaliznim procedurama)-(10). Postoji i posebna vrsta dvolumenskih CVK koji se mogu koristiti kao trajni vaskularni pristup, uz razlike prilikom same insercije (formira se potkožni tunel uz postojanje dakronskog mufa) ali i materijala od kojih su izgrađeni (sačinjeni su od silikonske gume niske trombogenosti, fleksibilniji su i mekši). Ovo omogućava da se smanji rizik od propagacije infekcije i od akcidentalnog deplasiranja katetera.

1.1.3. Arteriovenska fistula i njene prednosti

Arteriovenska fistula se u različitim internacionalnim preporukama smatra vaskularnim pristupom koji je najsigurniji, najdugotrajniji, ima najmanji broj komplikacija i koji bi trebalo da bude prvi izbor kod svih bolesnika koji započinju hemodijalizu (11-14). Naime, spajanjem native arterije i vene, fistulna vena „arterijalizuje“ te se na taj način može pristupiti arterijskoj krvi bez punkcije same arterije. Za ovaj proces maturacije AVF neophodno je da protekne 4-6 nedelja. Najčešća mesta kreiranja AVF su: podlaktica (pravi se spoj *a. radialis* i *v. cephalicae* - AVF *radiocephalica*) i lakat (spoj *a. brachialis* i *v. cephalicae* - AVF *brachiocephalica*). Alternativno, može se kreirati i nadlaktatna AVF (spoj *a. brachialis* i *v. basilicae* - AVF *brachio basilica*) uz često neophodnu transpoziciju i superficijalizaciju *v. basilicae* obzirom na njenu dublju poziciju u unutrašnjoj strani nadlaktice. Anastomoza se može kreirati između bočnog zida arterije i bočnog zida vene (latero-lateralni tip anastomoze) ili između bočnog zida arterije i završetka vene (latero-terminalni tip anastomoze). U oba slučaja očuvan je distalni protok krvi kroz arteriju. Ređe se koriste termino-terminalne i termino-lateralne anastomoze (između završetka vene i završetka arterije odnosno između završetka arterije i bočnog zida vene). Nakon kreiranja AVF, neophodno je svakodnevno pratiti njeno sazrevanje pipanjem „trila“ i slušanjem sistolno-dijastolnog šuma iznad mesta anastomoze.

Brojne studije su dokazale da bolesnici sa AVF imaju najmanji broj komplikacija i najnižu stopu mortaliteta u odnosu na ostale forme vaskularnih pristupa. Istraživanjem *Pastana i sar.* ustanovljeno je da je kod bolesnika kojima se hemodijaliza obavlja preko vaskularnog katetera mortalitet 15.2%, kod onih koji imaju AVF 9.1%, a najmanji je kod bolesnika sa funkcionalnom AVF - 7.3% (15). Slični rezultati dobijeni su i CHOICE studijom kojom je pokazano da je mortalitet kod bolesnika čija se hemodijaliza obavlja preko vaskularnog katetera bio 16.1%, kod bolesnika sa AVF 14.2%, a kod bolesnika sa AVF 11.7% (16).

Pored mortaliteta, i povećan broj hospitalizacija ima uticaja kako na samog bolesnika, tako i na finansijsko opterećenje zdravstvenog sistema. Pored kardio-vaskularnih razloga, pokazano je da komplikacije povezane sa vaskularnim pristupom, kao i prestanak rada vaskularnih pristupa u SAD predstavljaju čest razlog hospitalizacije bolesnika na hemodijalizi (17).

Iz ovih razloga je istraživanje faktora koji utiču na dugoročno preživljavanje AVF posebno značajno.

1.2. Faktori koji utiču na preživljavanje arteriovenskih fistula

1.2.1. Karakteristike bolesnika i uslovi dijaliznog lečenja

Više studija se bavilo ispitivanjem karakteristika bolesnika i njihovog uticaja na lošije preživljavanje AVF. Najčešće navođeni uzroci su bili DM, ženski pol i starost koji su studijom *Salmele i sar.* pronađeni kao faktori koji smanjuju stepen sazrevanja AVF, za razliku od *Sedlaceka i sar.* koji su utvrdili da DM nije nezavisni faktor rizika za lošu maturaciju AVF (18,19). Slične rezultate navode i *Allon i sar.* po kojima ni DM ni starost nemaju negativan uticaj na sazrevanje AVF, ali značajno utiču na povećan proces neointimalne hiperplazije, koji dovodi do stenozе i tromboze AVF (20).

Na osnovu radova *Petersona i sar.* i *Rodrigeza i sar.* postojalo je mišljenje da bolesnici preko 65 godina imaju slabije preživljavanje vaskularnih pristupa (21-23). Međutim, *Lok i sar.* na osnovu svojih rezultata donose zaključak da godine ne bi trebale biti ograničavajući faktor u izboru vrste vaskularnog pristupa dok *Tordoir i sar.* savetuju da bi se kod strajjih, zbog češće pojave kalcifikovanih krvnih sudova, trebalo ranije planirati trajni vaskularni pristup (24,25).

U nekim istraživanjima pronađen je značajan negativni uticaj ženskog pola na produženo sazrevanje i preživljavanje AVF (18,21,26,27). U nekim drugim studijama ovakav uticaj nije potvrđen (20,28).

O uticaju različitih karakteristika bolesnika na dugoročno preživljavanje AVF nema jedinstvenog mišljenja. Istraživanje *Ravanija i sar.* ukazalo je da prisustvo kardiovaskularne bolesti, kratko vreme maturacije AVF (ispod 15 dana) i korišćenje CVK pri započinjanju hemodijalize predstavljaju faktore koji povećavaju rizik za lošije preživljavanje AVF (29). Studija *Asuna i sar.* ističe da je jedino prethodno korišćenje CVK nezavisni faktor koji utiče na dugoročno preživljavanje AVF (30). *Lee i sar.* sproveli su trogodišnje ispitivanje kojim su pokazali da su jedino intervencije na AVF pre maturacije nezavisno uticale na preživljavanje AVF dok pol, starost preko 65 godina, rasa, prisustvo DM, prisustvo periferne vaskularne bolesti, lokalizacija AVF i morbidna gojaznost nisu imali uticaj na preživljavanje AVF (31). Rad azijskih autora

ukazao je da muškarci imaju duplo veću šansu za preživljavanje radio-cefalične AVF (32), dok rad autora iz Mičigena ne pronalazi ni jedan nezavisan faktor rizika (starost, indeks telesne mase, pol, prisustvo DM, prisustvo HTA, hiperlipidemija) koji utiče na preživljavanje AVF (33) što navodi na zaključak da nema uniformnog mišljenja o uticaju različitih karakteristika bolesnika na preživljavanje AVF.

Hipotenzija se prepoznaje kao jedan od faktora rizika koji utiče na preživljavanje i pojavu tromboze vaskularnog pristupa AVF (34,35). Međutim, tokom godina je tehnološki napredak (korišćenje bikarbonatne dijalize, *high-flux* membrana, upotreba hemodijafiltracije, hlađenje dijalizata, profilisanje koncentracije Na u dijaliznoj tečnosti i profilisanje ultrafiltracije) doveo do popravljivanja uslova sprovođenja hemodijaliznih tretmana i smanjenje pre, post i intradijalizne hipotenzije. Ipak, ostaje otvoreno pitanje da li vrsta dijalizne membrane ili dijalizne tehnike ima uticaja na smanjenje pojave hipotenzije, a samim tim i na preživljavanje vaskularnih pristupa.

1.2.2. Komplikacije AVF

Najčešće komplikacije arteriovenskih pristupa su stenoza, tromboza, ishemija ekstremiteta, ishemijska polineuropatija, formiranje aneurizmi i pseudoaneurizmi, infekcija, zastojna srčana slabost.

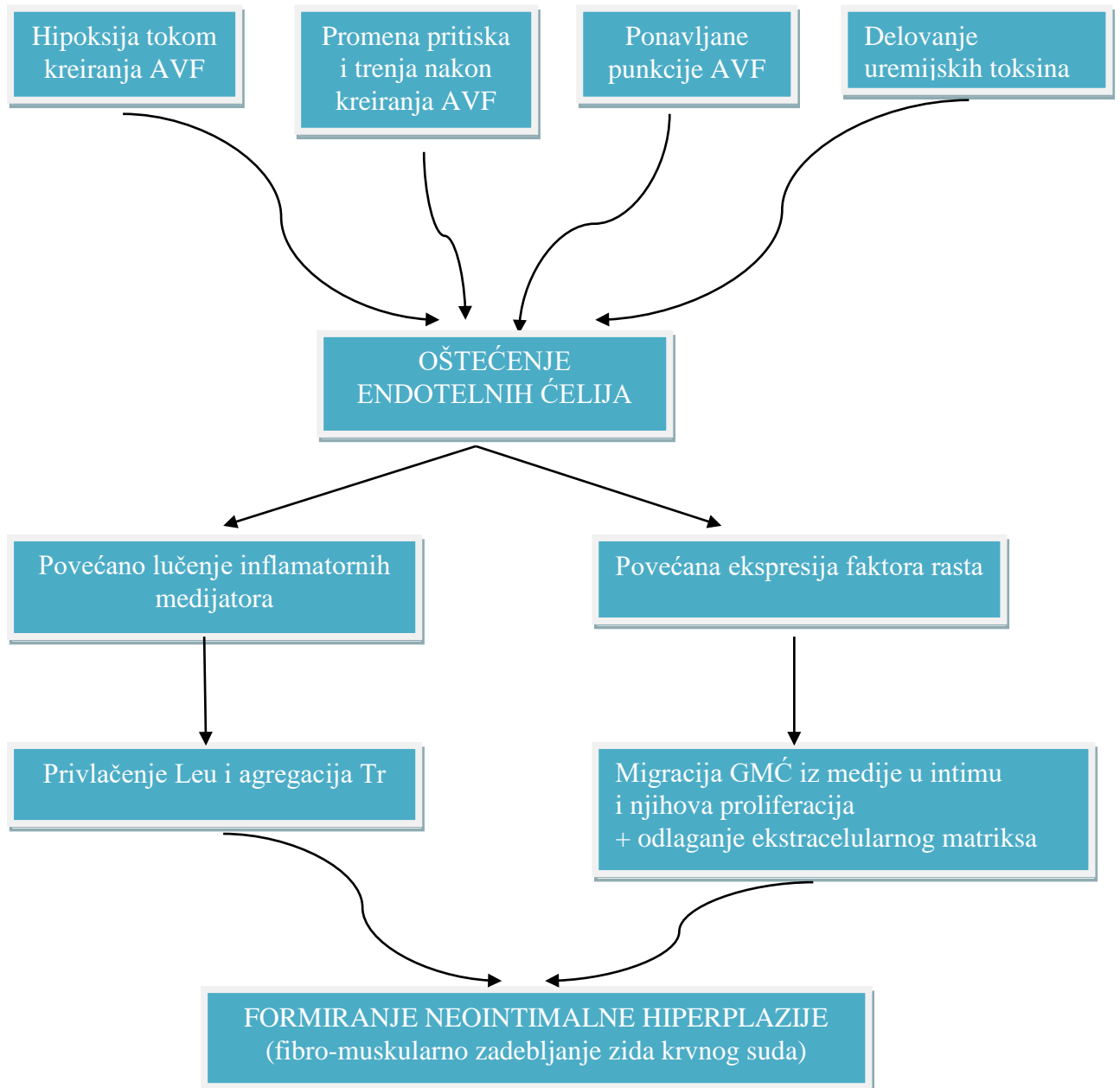
1.2.2.1. Stenoza je uz trombozu najčešća komplikacija AV pristupa (36). U osnovi nastanka stenozе je proces neointimalne hiperplazije koji nastaje u venskom delu tj. posle arterio-venske anastomze, a za koju su odgovorne sa jedne strane povreda endotelijalnih ćelija (tokom operacije, punkcije AVF, izmenjene hemodinamske sile) kao i odgovori na ovu povredu (adhezija inflamatornih ćelija, proliferacija i migracija glatkih mišićnih ćelija iz medije u intimu) (37). Naime, intravaskularno delovanje hemodinamskih sila može se podeliti na pritisak i trenje (38). Pritisak je delovanje na zid krvnog suda koje je zavisno od varijacija pulsog pritiska. Trenje je mehaničko delovanje na površinu zida krvnog suda, a potiče od proticanja krvi. U zavisnosti od protoka krvi, trenje može biti laminarno (kada krv protiče u jednom smeru) ali i poremećeno ili oscilatorno (kada je protok krvi turbulentan i povremeno povratan). Prisustvo laminarnog trenja igra veliku ulogu u normalnom funkcionisanju vaskulature obzirom da sprečava inflamaciju i hiperplaziju endotelnih ćelija (39). Nasuprot tome, prisustvo poremećenog trenja vodi endotelijalnoj disfunkciji i nastanku neointimalne

hiperplazije (40). Nakon kreiranja AVF, u venskom delu se povećava pritisak, menja se trenje u smislu pojave oscilacija, te je jasna patofiziologija nastanka oštećenja endotelnih ćelija (41,42). Ovako oštećene endotelijalne ćelije proizvode inflamatorne medijatore koji aktiviraju agregaciju trombocita i privlače leukocite na oštećeno mesto. Istovremeno, aktivirane endotelijalne ćelije povećavaju ekspresiju faktora rasta (*Histone deacetylase 3-HDAC3* i *platelet-derived growth factor-PDGF*) koji dovode do migracije glatko-mišićnih ćelija iz medije u intimu kao i njihove proliferacije (43). Ova proliferacija je praćena odlaganjem ekstracelularnog matriksa, slično kao kod stvaranja ožiljka (42,44). Postoji i potvrda da u slučajevima izražene neointimalne hiperplazije dolazi do migracije fibroblasta iz adventicije u mediju gde "doživljavaju" fenotipski preobražaj u migratorne miofibroblaste (45-48). Posledica svih ovih događaja je formiranje neointimalne hiperplazije koja u stvari predstavlja fibro-muskularno zadebljanje zida krvnog suda usled migracije i proliferacije glatkomišićnih ćelija iz medije u intimu (49). Postoji i drugi mehanizam oštećenja endotelijalnih ćelija i pokretanja kaskade formiranja neointimalne hiperplazije, a to je hipoksija izazvana ishemijom tokom same operacije kreiranja AVF kao i povrede koje se javljaju kod ponavljane kanulacije AVF (obzirom na klemovanje krvnih sudova i povrede vasa *vasorum*). Hipoksija pokreće izlučivanje reaktivnih oksigenih citokina kao što su HIF-1 α (*hypoxia-inducible factor 1-alpha*) i IEX-1 gen (*immediate-early responsive gene*) koji aktiviraju endotelijalne ćelije, inflamatorne ćelije i vaskularne glatko-mišićne ćelije (50-52). Naime, sa jedne strane ovi citokini utiču na proliferaciju tako što deluju na ushodnu regulaciju VEGFa (*vascular endothelial growth* faktora), posebno VEGF-A koji, aktiviranjem matrix-metaloproteinaza (MMP), pogotovo MMP-2, MMP-9, ADAMTS-1 utiče na remodelovanje ekstracelularnog matriksa i povećanje endotelne celularne proliferacije (51, 53-57). Istovremeno, hipoksija aktivira PDGF (*platelet-derived growth factor*) koji povećava broj miofibroblasta (52,56,58,59). Sa druge strane VEGF-A, IEX-1, HIF-1 α utiču na propagaciju inflamacije, obzirom da VEGF-A privlači leukocite, dok HIF-1 α aktivira inflamatorne ćelije (60). Ovi, ali i drugi citokini povezni su i sa aktivacijom IL-8 i MCP-1 koji preko CXCR motif receptora privlače monocite, memorijske-T limfocite i ćelije prirodne ubice ka regiji AVF (61). Postoji još molekula koji učestvuju u procesu neointimalne hiperplazije:

- *Heme oxygenase-1* (HO-1)-vazoprotektivni stres protein koji smanjuje inflamaciju, proliferaciju i fibrozu delujući preko *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1), MCP-1, MMP2 i MMP9 (62,63)
- *Heme oxygenase-2* (HO-2)-sličnog delovanja kao HO-1 (64)
- *Transforming-growth factor-beta* (TGF- β 1)-predvodnik promena u ekstracelularnom matriksu, celularnoj proliferaciji i formiranju tromba
- *Tumor necrosis factor-alpha* (TNF- α)-inflamatorni citokin koga luče leukociti, glatkomišićne i endotelne ćelije pod dejstvom hipoksije i deluje na ushodnu regulaciju *vascular cell adhesion* molekula-1 (VCAM-1) i IL-1 β . Dokazano je da utiče i na fibroblastnu celularnu proliferaciju (23,65)

Treba napomenuti da bolesnici sa TBS i pre formiranja vaskularnog pristupa imaju značajno povišene parametre inflamacije i oksidativnog stresa kao što su već pominjani TNF- α , zatim IL-6, te proliferativni citokin TGF- β (45,66-70). Neki od uremijskih faktora kao homocistein ili endogeni inhibitor azot-monoksid sintaze-asimetrična dimetilarginična kiselina (ADMA) mogu imati direktan toksični efekat na endotelne ćelije i pokrenuti pomenute kaskade formiranja neointimalne hiperplazije (71). Shematizovan patofiziološki proces nastanka neointimalne hiperplazije predstavljen je shemom 1.

Sumnju na stenozu treba postaviti ako postoji: rekurentna pojava tromba, otežano plasiranje igala prilikom kanulacije, teško uspostavljanje hemostaze nakon završenog hemodijaliznog tretmana ili ako je ruka duže vreme otečena. Incidenca stenoza se prijavljuje u 14-42% AVF (72).



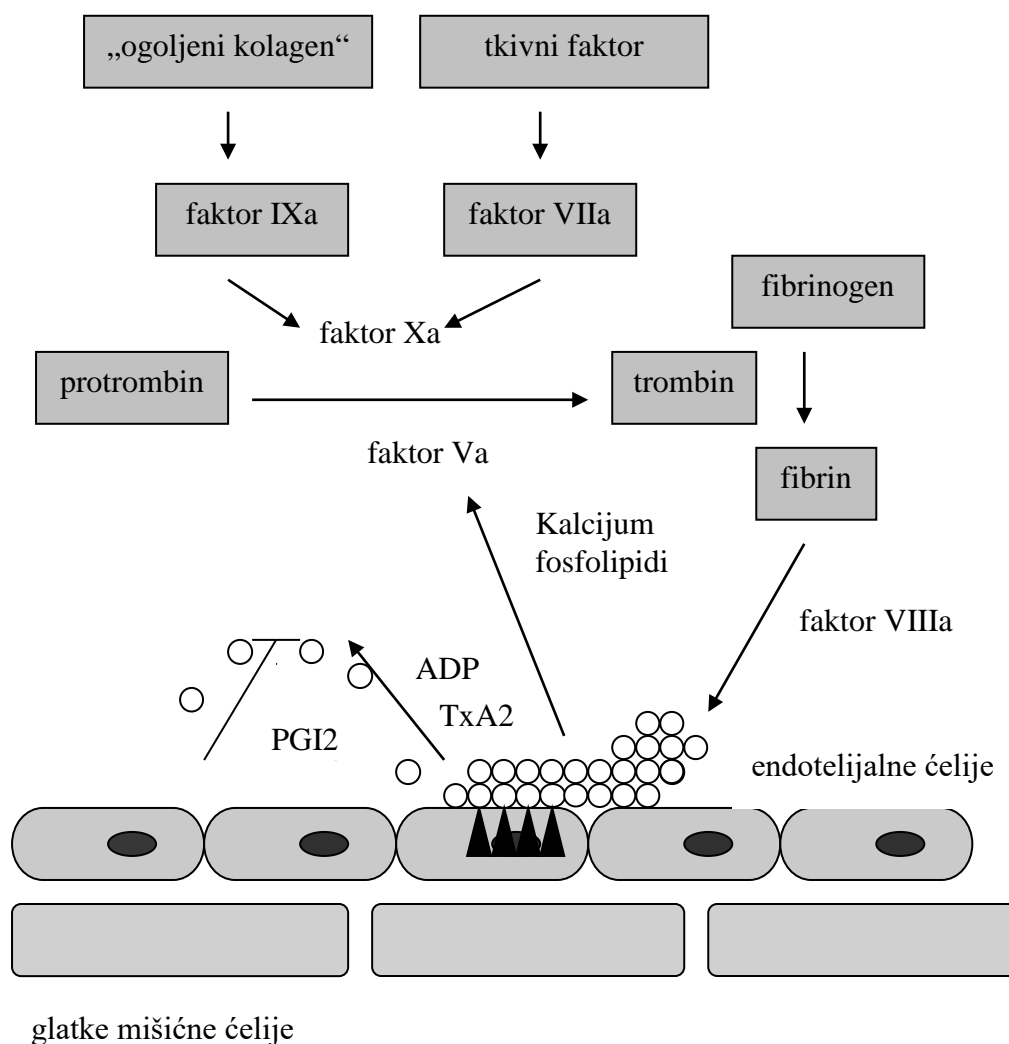
Shema 1-prikaz patofiziološke kaskade nastanka neointimalne hiperplazije

1.2.2.2. Tromboza – pored neointimalne hiperplazije koja je u osnovi nastanka stenozе, posleđično i tromboze, postoji i dodatni patofiziološki proces koji učestvuje u nastanku tromboze, a nastaje nakon kreiranja arteriovenske anastomoze. Naime, oštećene endotelijalne ćelije, pored drugih citokina, oslobađaju i von Willebrand-ov faktor čime se stvara mogućnost za adheziju trombocita (67). U nastavku procesa formiranja tromba, adherisani trombociti luče tromboksan A2 (TxA2) i adenzin-difosfat (ADP) koji deluju kao stimulatori dalje adhezije. Istovremeno, „ogoljeni“ kolagen i oslobađanje tkivnog faktora dovode do pokretanja koagulacione kaskade aktiviranjem faktora X, koji zajedno sa faktorom V, jonima kalcijuma i fosfolipidima oslobođenim iz trombocita formiraju faktor V kompleks. Ovaj kompleks dovodi do konverzije protrombina u trombin, koji dovodi do pretvaranja fibrinogena u fibrin. Aktivirani faktor VIII vodi umrežavanju fibrinskih polimera čime se stvara „potka“ za dalji rast tromba (shema 2).

Učestalost tromboze kao komplikacije AVF je između 17-25% (72). Sumnja na trombozu se postavlja u slučaju pojave bola u regionu AVF, palpiranjem tromba u AVF te gubitkom „trilla“ iznad AVF.

Terapijski, stenozа se može tretirati perkutanim intervencijama (balon dilatacija stenozе, implantacija stenta) ili hirurškom intevencijom. Iako manje invazivne, perkutane intervencije nose rizik od restenozе (73,74). Vršena su i ispitivanja korišćenja raznih farmakoloških sredstava za koja se pretpostavljalo da bi mogla imati efekat na sprečavanje stenozе i tromboze. Pokazano je da klopidogrel korišćenjem od momenta kreiranja AVF smanjuje pojavu tromboze u prvih 6 nedelja od operacije, ali ne i nakon 4-5 meseci. (75,76). Udruženo korišćenje dipiridamola i aspirina statistički značajno popravlja jednogodišnje preživljavanje AVG (77). Rezultati ovih velikih studija sugerišu da je prvencija stenozе i tromboze u lokalnom, a ne u sistemskom delovanju. Stoga je i pokušano korišćenje stentova koji izlučuju lek (najčešće neki antiproliferativni agens, npr. Paclitaxel ili Sirolimus) s obzirom da su preliminarni rezultati istraživanja na animalnim modelima, ali i kod bolesnika na hemodijalizi bili dobri (78,79). Međutim, ovakvi stentovi su uglavnom korišćeni za AVG, a i randomizovana klinička studija je prekinuta u fazi II zbog povećanog rizika od infekcije. Korišćenje *Vascugel*®, gela koji sadrži endotelne ćelije, tokom samog kreiranja AVF mogao bi sprečiti razvoj neointimalne hiperplazije i stenozе.

Preliminarni rezultati su bili zadovoljavajući i u pogledu terapijskog uspeha ali i bezbednosti, dok je randomizovana multicentrična studija u toku (80). *Vascular endothelial growth factor D* (VEGF-D) genska terapija u sprečavanju pojave stenoza kod bolesnika kojima se plasira AVG je i dalje u fazi kliničkog ispitivanja. Davanje rekombinantne elastaze (PRT-201) u animalnom modelu dovelo je do dilatacije i u arterijskom i u venskom delu AVF što ubrzava maturaciju dok je randomizovana klinička studija u toku (81). Za razliku od nabrojanih terapijskih mogućnosti koje se primenjuju uglavnom u trenutku kreacije vaskularnog pristupa, *Adventa® catheter* koji predstavlja mikroiglu omogućava da se bilo koji lek može, gotovo bez oštećenja krvnog suda, aplikovati u svakom trenutku i da se, kada se ukaže potreba, pokuša produžavanje života vaskularnog pristupa ubrizgavanjem određene supstance (82).



Shema 2: Prikaz patofiziološkog procesa nastanka tromboze nakon kreiranja arteriovenske anastomoze

1.2.2.3. Ishemija ekstremiteta - Ishemija ekstremiteta se može pojaviti distalno od AV pristupa u bilo kom trenutku nakon njegove kreacije, a nastaje zbog neadekvatnog protoka krvi distalno od anastomoze. Step en ishemije može biti različit: od blage (prezentuje se osećajem hladnoće, promenom u boji ekstremiteta) do izražene („steal“ fenomen: izražen bol u ruci, pojava ulceroznih promena) (83,84). Izražena ishemija predstavlja indikaciju za hirurški tretman tj. zatvaranje pristupa mada se mogu koristiti i rekonstruktivne vaskularne operacije sa ciljem ponovnog obezbeđivanja perfuzije (85). Veći rizik za razvoj ishemije imaju pacijenti sa DM, aterosklerozom, pušači (86).

Učestalost ishemijske ekstremiteta se prijavljuje u 10-25% slučajeva u različitim studijama kada se za kreiranje AV pristupa koristi *a. brachialis*, a svega u 1-2% kod radiocefalične AVF (87).

1.2.2.4. Ishemijska polineuropatija – javlja se brzo nakon kreacije vaskularnog pristupa, česta je kod dijabetičara koji već imaju perifernu arterijsku bolest, pogotovu kada se koristi i *a.brachialis* za formiranje pristupa. Osnovni simptomi su: slabost ruke, parestezije, bol. Neurološkim pregledom obično se konstatuje slabost mišićne grupe inervisane *n.medianusom* (72,88). Učestalost ove komplikacije je između 1 i 10% (72).

1.2.2.5. Formiranje aneurizmi i pseudoaneurizmi – Aneurizma AVF predstavlja proširenje krvnog suda koje je ograničeno zidom krvnog suda, dok je pseudoaneurizma takođe proširenje krvnog suda, uz otok perivaskularnog tkiva uz postojanje komunikacije sa krvnim sudom. Najčešći razlozi nastanka aneurizmi i pseudoaneurizmi AV pristupa su neadekvatna hemostaza i ekstravazacija krvi iz ubodnih mesta nakon vađenja igala za hemodijalizu, slabost zida venskog krvnog suda koja nastaje zbog čestih punkcija, te oštećenje proteze čestim punkcijama. Kada je već formirana, K/DOQI vodič savetuje da se aneurizmatički izmenjen deo ne upotrebljava tj. da se izbegava za punkciju (89). Isti vodič preporučuje da se, ukoliko je uočeno uvećanje aneurizme ili postoji izražena stenoza na AVF, pristupi hirurškoj resekciji.

1.2.2.6. Infekcija - veoma se retko javlja na AVF, svega u oko 3% slučajeva što je 10 puta ređe nego na AVG (90). Ako postoje lokalni znaci infekcije regije oko AVF, trebalo bi uzeti bris i započeti antibiotsku terapiju u ukupnom trajanju od 4-6 nedelja.

1.2.2.7. Zastojna srčana slabost – može se pojaviti kod pacijenata koji već imaju graničnu srčanu rezervu, a kod kojih postoji visokoprotokna AVF (91,92). Češće se javlja kod bolesnika koji imaju fistulu u nadlaktici ili u femoralnom predelu. Može se pokušati sa hirurškom intervencijom u cilju smanjenja protoka. Dugoročno gledano, prisustvo AV pristupa ne bi trebalo da ima uticaj na srčanu funkciju (93).

1.2.3. Hiperkoagulabilno stanje

Iako je uremija tradicionalno smatrana stanjem koje nosi povećani rizik od krvarenja, poslednjih godina je sve više radova koji TBS povezuju i sa visokom prevalencijom trombotičkih događaja kakvi su akutni infarkt miokarda, ishemijski infarkt mozga ali i tromboza AVF (94). Dokazano je da se sa početkom korišćenja biokompatibilnih membrana za hemodijalizu smanjuje aktivacija svih ćelija pa i trombocita što bi trebalo povoljno da utiče i na pojavu krvarenja i na pojavu tromboze. (95). Međutim, ispitivanja uticaja jedne hemodijalizne sesije na pojavu protrombotičkog stanja donela su kontraverzne rezultate bez obzira na vrstu dijaliznih membrana. Studija *Milburna i sar.* na 55 hemodijaliznih bolesnika pokazala je da se nakon hemodijalizne sesije (korišćene biokompatibilne membrane) povećava trombocitna, endotelijalna i koagulaciona aktivacija u gotovo svim ispitivanim markerima. Kao markeri trombocitne funkcije korišćeni su: ekspresija P-selektina nestimulisanog i stimulisanog adenosin-difosfatom (ADP), vezivanje fibrinogena za trombocite, agregabilnost trombocita, solubilni P-selektin i solubilni CD40-ligand. I P-selektin i CD40-ligand nalaze se deponovani u alfa granulama trombocita i luče se kada se ove ćelije aktiviraju. Kao markeri endotelne aktivacije korišćeni su vonWillebrandov faktor (vWF) i hs-CRP dok su kao koagulacioni marker korišćeni trombin-antitrombin III kompleks (TAT) i D-dimer (96). Ovim ispitivanjem pokazano je da je nakon dijalizne sesije povećana ekspresija kako nestimulisanog tako i stimulisanog P-selektina te solubilnog P-selektina i CD40-liganda, a povećano je i vezivanje fibrinogena za trombocite. Jedini trombocitni marker koji se smanjio nakon dijalize je agregabilnost trombocita što se može objasniti delovanjem heparina za koji je dokazano da smanjuje ovu pojavu (97). Istovremeno, dokazan je porast i TAT (marker intravaskularnog formiranja trombina) i D-dimera (marker ushodne regulacije koagulacione kaskade) kao i markera endotelijalne aktivacije (vWF i hs-CRP). Neka druga ispitivanja nisu imala ovakve, gotovo uniformne rezultate koji idu u prilog prokaagulaciji. Ispitivanje *Aggarwalla i sar.* donelo je suprotne rezultate. Naime, njihovim istraživanjem pokazano je da je ekspresija stimulisanog P-selektina bila niža nakon hemodijalize, a vezivanje fibrinogena za trombocite izraženije (98). TAT je i u drugim studijama rastao nakon HD (99,100). Pre i postdijalizne vrednosti D-dimera se u nekim istraživanjima nisu značajno menjale, dok su *Inoue i sar.* i *Yu i sar.* dokazali njegov porast (99,101). Ispitivanje

vrednosti vWF (medijator adhezije trombocita za vaskularni endotel) takođe je dovelo do raznolikih rezultata obzirom da su neke studije dokazale njegov postdijalizni porast (102,103), neke smanjenje (104), a u nekim nije postojala pre i postdijalizna razlika (105). CRP može dovesti do endotelne aktivacije indukcijom adhezionih molekula, hemokina i potenciranjem neutrofilne migracije (106). *Koulouridis i sar.* svojim ispitivanjem takođe su dokazali postdijalizni porast hs-CRPa (107).

Ranije je dokazano da ekstrakorporalna cirkulacija bez primene antikoagulanasa ima snažan protrombogeni efekat. Ipak, i pored primene antikoagulanasa i proizvodnje sve savremenijih biokompatibilnih membrana, zbog njihove velike površine, rizik za pojavu tromboze je i dalje veliki (108,109). Kako je napomenuto, pored drugih tromboembolijskih događaja, ovakvo prokoagulantno stanje može potencirati i trombozu AVF.

1.2.4. Vaskularne kalcifikacije

Vaskularne kalcifikacije se često viđaju kod bolesnika sa TBS, posebno kod onih na dijalizi. Mogu se razlikovati dva tipa vaskularnih kalcifikacija: kalcifikacije *tunicae mediae* arterija (Monckeberg-ova kalcifikacija; *calcific arteriosclerosis*) i ubrzana kalcifikacija plaka intime (*calcific atherosclerosis*) (110,111). Obe vrste dovode do redukovano elastičnosti arterija i do ubrzanja brzine pulsne talasa (111). Na diferencijaciju kontraktilnih vaskularnih glatkomišićnih ćelija u *osteoblaste-like* ćelije utiču povišene koncentracije fosfora, *bone morphogenetic* proteina-2 (BMP-2), kao i prisustvo sekundarnog hipereparatireoidizma (112,113). Uočeno je i da povišene koncentracije endotelnih matriksnih metaloproteinaza potenciraju formiranje kalcifikacija, dok smanjena koncentracija *cathepsin S*, enzima koji utiče na elastičnost arterija, uočena u TBS ima uticaj na potenciranje vaskularnih kalcifikacija. (114,115). I neki od lipida kao što su palmitinska kiselina i *low-density* lipoproteini (LDL) mogu uticati na mineralizaciju i diferencijaciju u *osteoblast-like* ćelije (116,117). Dokazano je i da mikro-RNK kao i povećana ekspresija *adipokine c1q/tumour necrosis factor-related protein-3* potenciraju nastanak vaskularnih kalcifikacija (118,119). Dijabetes i korišćenje pojedinih lekova su takođe povezani sa nastankom vaskularnih kalcifikacija. Korišćenje kumarinskih produkata (Varfarin) inhibiše ciklus vitamina K a samim tim i

smanjenu aktivnost dokazanog inhibitora nastanka vaskularnih kalcifikacija: matrix-gla proteina (MGP).

Štetni efekat vaskularnih kalcifikacija na preživljavanje AVF može se objasniti njihovim delovanjem na promenu mehaničkih sila pri protoku krvi tačnije na silu trenja koja kada je poremećena vodi oštećenju endotelijalnih ćelija i pokretanju kaskade koja vodi do neointimalne hiperplazije, a posledično i povećanom riziku za trombozu AVF, kako je već objašnjeno u delu 2.2.1. (120). Istovremeno, dokazano je da endotelne mikropartikule posreduju u samom nastanku vaskularnih kalcifikacija (121). Dakle, može se spekulirati da postoji *circulus viciosus* tj da se tokom kreiranja AVF, kao i kasnije njenim korišćenjem formiraju endotelne mikropartikule koje utiču na nastanak vaskularnih kalcifikacija koje vode daljem oštećenju endotela i pokretanju nastanka neointimalne hiperplazije.

Takođe, pokazano je da pojedini uremijski toksini, kao što su *p-Cresyl sulfate (PCS)* i *indoxyl sulfate (IS)* favorizuju nastanak vaskularnih kalcifikacija, a istovremeno imaju negativan uticaj na preživljavanje AVF (122).

Pored nabrojanih promotera vaskularnih kalcifikacija, postoje i inhibitori:

- Fetuin A smanjuje direktno citotoksično delovanje kalciproteinskih partikula koje su okidač nastanka ektopičnih kalcifikacija i vezuje se direktno za BMP-2, BMP-4 i BMP-6 i tako sprečava njihovu osteohondrogeničku aktivnost (123,124)
- Matrix-gla protein (MGP)- nejasan tačan mehanizam delovanja, verovatno blokiranjem BMP-2 i BMP-4 (125)
- Osteoprotegerin-inhibira vezivanje RANKLA za RANK čime se smanjuje osteoklastna aktivnost (126)
- Pirofosfat-utiče na regulaciju ekstracelularnog fosfata, niske koncentracije kod dijaliznih bolesnika obrnuto srazmerno povećavaju rizik za nastanak kalcifikacija (127)
- Osteopontin-inhibiše narastanje kalcijumskih kristala i njegov nedostatak potencira nastanak vaskularnih kalcifikacija (128)

1.2.5. Polimorfizam gena za pojedine endotelne faktore

Imajući u vidu da su endotelni poremećaji u centru razvoja stenoze i tromboze AVF, pretpostavlja se da bi genski polimorfizam vezan za neke od gena koji regulišu funkciju endotela mogli imati uticaja na preživljavanje AVF. Često je ispitivan polimorfizam u genu koji kodira osnovne komponente RAS-a; polimorfizam I/D u genu za angiotenzin I konvertujući enzim (ACE). Međutim, rezultati su inkohherentni. U studiji *Sennera i sar.* nije dokazano postojanje razlike u distribuciji polimorfizma među gupama sa i bez doživljene tromboze AVF (129). *Isbir i sar.* su ispitivali polimorfizam kod bolesnika sa AVG i njihov zaključak je da bolesnici sa ID polimorfizmom imaju najveći rizik stvaranja tromboze (130). Rad *Heinea i sar.* je pokazao da najbolje 12-mesečno preživljavanje imaju AVF kod bolesnika sa DD polimorfizmom (131) dok je potpuno obrnut nalaz istraživanja *Moona i sar.* kojim je praćeno preživljavanje AVF 58 meseci u kome upravo bolesnici sa DD polimorfizmom imaju statistički značajno kraći vek AVF (132).

Endotelne matriksne metaloproteinaze (MMP) su značajan regulator kardiovaskularnog tonusa na nivou samih krvnih sudova. Istovremeno, predstavljaju i medijatore u procesu neointimalne hiperplazije. Često ispitivani polimorfizam je onaj u genu za matriks-metaloproteinazu 3 (6A/5A) i referisano je da u populaciji hemodijaliznih bolesnika, 6A/6A homozigoti imaju značajno izraženije kalcifikacije koronarnih arterija (133). U opsežnoj studiji *Lina i sar.* sa preko 500 HD bolesnika, 6A/6A polimorfizam je bio značajno više zastupljen od preostala dva među bolesnicima koji su imali trombozu AVF (134).

Azot monoksid (NO) je potentan vazodilatator koga proizvode endotelijalne ćelije procesom koga katališe endotelna azot-oksidi sintaza (eNOS). Ispitan je uticaj genskog polimorfizma (G/T) u genu za ovaj enzim kod bolesnika na hemodijalizi i pokazano je da T/T homozigoti imaju izraženije promene na karotidnim arterijama (135). Studija *Leeja i sar.* nije pokazala uticaj različitih polimorfizma gena za eNOS na preživljavanje AVF (136).

1.2.6. Koncentracija pojedinih endotelnih faktora

Ispitivan je uticaj brojnih markera neointimalne hiperplazije na preživljavanje AVF, a među njim su i *endothelin-1 (ET-1)*, *transforming-growth factor-beta (TGF-beta)* i *platelet-derived growth-factor (PDGF)* (137). ET-1 je protein koji je endotelni produkt, snažan je vazokonstriktor i pored svoje uloge u patogenezi hipertenzije, dokazano je i da učestvuje u procesu neointimalne hiperplazije nakon kreiranja vaskularnog pristupa za hemodijalizu (138,139). Ispitivanja njegove serumske koncentracije na pojavu tromboze AVF nije rađeno. TGF-beta je citokin koga proizvode leukociti i učesnik je brojnih signalnih procesa među kojima je i kaskada neointimalne hiperplazije i formiranje tromba AVF (137,140,141). Istraživanje *Wanga i sar* posredno je dokazalo da povišenje TGF-beta dovodi do prestanka funkcionisanja AVF. Naime, oni su pokazali da se blokiranjem aktiviranja Noctha gena sprečava formiranje neointimalne hiperplazije, a aktivator Noctha je upravo TGF-beta (142).

PDGF je jedan od faktora rasta, posebno značajan u procesu angiogeneze, deponovan u alfa granulama trombocita i izlučuje se po njihovoj aktivaciji (143). Predstavlja i jedan od markera stenozе AVF, a u studiji *Simonea i sar.* upravo je njemu dodeljena centralna uloga u ovom procesu (141,144).

Asimetrični dimetilarginin (ADMA) se normalno nalazi u plazmi i "konkurent" je L-argininu u produkciji NO, te povećane koncentracije ADMA negativno utiču na endotelijalnu funkciju tj. vazodilataciju. Jedan je od uremijskih toksina i prepoznat je kao faktor koji utiče na ubrzanu progresiju bubrežne slabosti, kao i na mortalitet kod bolesnika na hemodijalizi. Studija *Wua i sar.* dokazala je da povećana serumska koncentracija ADMA utiče na pojavu restenozе AVF nakon perkutane intervencije (145).

CILJEVI ISTRAŽIVANJA:

Ciljevi ovog istraživanja uključuju ispitivanje sledećih faktora na preživljavanje primarnih AVF:

- 1) Uticaj vaskularnih kalcifikacija na preživljavanje primarnih AVF
- 2) Uticaj polimorfizma odabranih gena koji imaju uticaj na endotelnu funkciju (gen za angiotenzin I konvertujući enzim (ACE), matriks-metaloproteinazu 3 (MMP3) i endotelijalnu azot-oksidi sintazu (eNOS) na preživljavanje primarnih AVF
- 3) Uticaj serumskih koncentracija odabranih endotelnih faktora rasta i parametara endotelne disfunkcije kao i uremijskih toksina (TGF- β , PDGF, endotelina-1, ADMA) na preživljavanje primarnih AVF

MATERIJAL I METODE

3.1. Bolesnici

Ispitivanje preživljavanja primarnih AVF sprovedeno je kod bolesnika koji se nalaze duže od 6 meseci na hroničnom programu lečenja hemodijalizama u Kliničkom odeljenju za nefrologiju i metaboličke poremećaje „Prof. dr Vasilije Jovanović“, Kliničko-bolničkog Centra Zvezdara u Beogradu. Ukupno je bilo obuhvaćeno 314 bolesnika.

Iz dijaliznih istorija bolesti dobijeni su podaci o polu, godinama starosti, osnovnoj bolesti koja je dovela do TBS, dužini hemodijaliznog staža, vrsti i lokalizaciji vaskularnog pristupa, pušačkom statusu, prisustvu DM, povišenog krvnog pritiska, periferne vakularne bolesti, korišćenju ACE inhibitora, ARBa, blokatora kalcijumskih kanala, statina, korišćenju eritropoetina i prosečnoj dozi eritropoetina u poslednjih 6 meseci, korišćenju antiagreganasa i/ili antikoagulanasa, vrsti korišćenog antiagregansa, korišćenju vezivača fosfata, korišćenju metabolita vitamina D. Navedene su i informacije o tome da li je bolesnik do započinjanja ispitivanja imao samo jedan, dva ili više vaskularnih pristupa, kolika je dužina korišćenja aktuelnog pristupa do započinjanja ispitivanja, koja je vrsta aktuelnog hemodijaliznog lečenja uključujući i vreme trajanja pojedinačne sesije, koliki je protok krvi kroz vaskularni pristup tokom hemodijalze.

Iz istorija bolesti, navedene su laboratorijske analize:

- korišćene su prosečne godišnje serumske vrednosti hemoglobina, trombocita, proteina, albumina, kalcijuma, fosfora, holesterola, triglicerida, alkalne fosfataze, intaktnog parathormona, natrijuma, kalijuma, CRPa (predstavljene su kao srednja vrednost±standardna devijacija; određene standardnim biohemijskim tehnikama)
- izračunat je *body-mass index* (BMI), Kt/V, proizvod kalcijuma i fosfora

Za svakog bolesnika je određen i skor komorbiditeta tako što je dodeljen poen za prisustvo svake od sledećih bolesti: infarkt miokarda, srčana slabost, cerebrovaskularni insult. BMI je izračunat po formuli: telesna težina bolesnika izražena u kg podeljena sa telesnom visinom izraženom u kvadratnim metrima

Kt/V je izračunat po formuli Daugirdasa iz 1993.god:

$$Kt/V = (-1) * \log(\text{Ratio} - 0.03) + ((4 - 3.5 * \text{Ratio})) * (\text{Ultrafiltracioni Volumen} / \text{Težina na kraju HD});$$
 Ratio=Postdijalizna koncentracija uree/Predijalizna koncentracija ureje
(146)

Vrednosti intaktnog parathormona (iPTH) određene su korišćenjem hemiluminiscencnog eseja (*DPC, Diagnostic Product Corporation, USA*).

Kako je kod pojedinih grupa bolesnika vršeno specifično ispitivanje (kalcifikacije, genetsko testiranje, određivanje markera endotelne disfunkcije) stoga su kod tih bolesnika korišćeni relevantni pokazatelji/analize za dato testiranje.

3.1.1. Bolesnici kod kojih je ispitivan uticaj vaskularnih kalcifikacija na preživljavanje primarnih AVF

Ovim delom ispitivanja obuhvaćeno je 90 bolesnika. Uključeni su oni bolesnici koji od početka hemodijaliznog tretmana imaju prvu AVF kao svoj vaskularni pristup dok ostali bolesnici (sa drugom i sa više od dve AVF, AVG ili trajnim vaskularnim kateterom) nisu uključeni u praćenje. Svi bolesnici su imali radiocefalične AVF. Osnovni podaci o bolesnicima predstavljeni su tabelom 1.

Tabela 1. Osnovni podaci o bolesnicima kod kojih je određivano prisustvo vaskularnih kalcifikacija

	Br (%) ili X±SD
Pol (muški)	49 (54%)
Starost, godine	63±10 (min 39-max 83)
Osnovna bolest	
HTN	42 (47%)
DM	7 (8%)
ADPBB	11 (12%)
UA	15 (17%)
HGN	12 (13%)
NZ	3 (3%)
Vrsta dijalize (LF/HF/HDF)	18/55/17 (20%/61.1%/18.9%)
DM, da	10 (11%)
HTA, da	41 (46%)
Pušenje, da	21 (23%)
Dužina korišćenja AVF do određivanja kalcifikacija, meseci	87±56 (12-260)
Protok krvi, ml/min	261±31 (180-330)
iPTH, pg/ml	509±566
iPTH grupe*	
<150 pg/ml	22 (26%)
150-650 pg/ml	44 (49%)
>650 pg/ml	24 (27%)
Kalcijum, mmol/L	2.33±0.16
Fosfor, mmol/L	1.54±0.39

HTN: hipertenzivna nefroangioskleroza; DM: dijabetesna nefropatija; ADPBB: autozomno-dominantna policistična bolest bubrega; UA: urološke abnormalnosti uključujući i hronični pijelonefritis; HGN: hronični glomerulonefritis; NZ: nepoznat uzrok TBS; iPTH: intaktni serumski parathormon; LF-low-flux; HF: high-flux; HDF-hemodijafiltracija; *prema KDIGO smernicama (147)

Kod 50 bolesnika (55%) protok krvi kroz AVF tokom hemodijalize bio je preko 250 ml/min, kod njih 23 (26%) je bio 250 ml/min, dok je kod preostalih 17 (19%) bio ispod 250 ml/min. Bolesnici kod kojih je protok krvi bio manji od 250 ml/min su uključeni u studiju obzirom da protok nije bio smanjen zbog lošeg funkcionisanja same AVF, već zbog drugih, uglavnom kardioloških razloga (srčana slabost, nestabilna *angina pectoris*, poremećaji srčanog ritma) i zato ove AVF nisu smatrane hipofunkcionalnim.

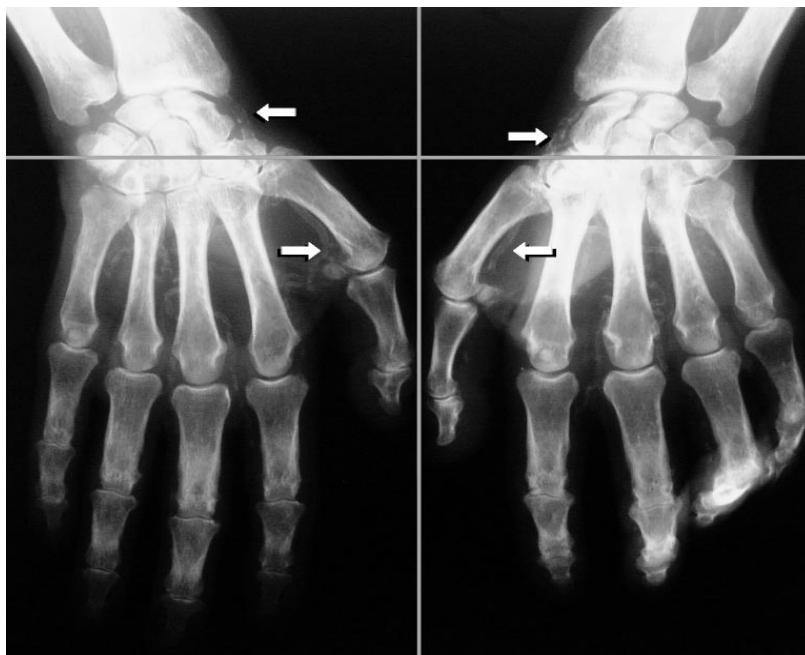
3.2. Metode

3.2.1. Određivanje brzine pulsog talasa

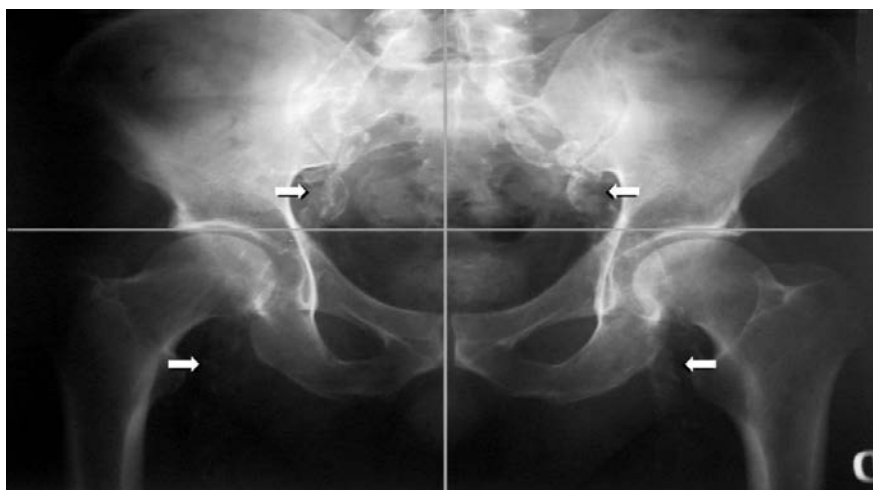
Bolesnicima uključenim u deo ispitivanja o uticaju vaskularnih kalcifikacija na preživljavanje primarnih AVF, određena je brzina pulsog talasa izražena u m/s korišćenjem Complior SP system-a (*Artech Medical, Pantin, France*) sa dva senzora (karotidnim i femoralnim) za simultanu procenu brzine pulsog talasa između ove dve tačke. Obučeni istraživač je svakom bolesniku izvršio dva merenja, a u istraživanju je korišćena prosečna vrednost.

3.2.2. Određivanje vaskularnih kalcifikacija

Bolesnicima uključenim u deo ispitivanja o uticaju vaskularnih kalcifikacija na preživljavanje primarnih AVF, konvencionalnim radiografskim pregledom karlice i šaka određeno je prisustvo kalcifikacija na ilijačnim i femoralnim arterijama odnosno na ularnoj, radijalnoj i interdigitalnim arterijama. Te kalcifikacije se definišu kao kalcifikacije medije (AKM). Skoriranje kalcifikacija medije određeno je korišćenjem Adragao skora (148)-Slike 1 i 2. Ukupan skor je suma svih polja, rangiran od 0 do 8. Ovom skoru dodat je i rentgenski određen skor kalcifikacija krvnih sudova regije AVF kojim je analizirano prisustvo linearnih kalcifikacija radijalne i ularne arterije kao i samog arteriovenskog spoja. Detekcija linearnih kalcifikacija na svakoj od tih struktura računata je kao 1, te je skor kalcifikacija krvnih sudova regije AVF rangiran od 0-3 (149)-Slika 3. Ukupan skor (Adragao + skor AVF-krvnih sudova) rangiran je od 0-11. Analiza svakog snimka vršena je od strane tri nezavisna ispitivača, neupućenih u informacije o bolesnicima, a rezultat je izražen kao konsenzus 2 istraživača. U slučaju tri različita nalaza vršena je ponovna analiza.



Slika 1. Rentgenski snimak šaka: regija svake šake je podeljena zamišljenom linijom koja prolazi kroz gornju ivicu metakarpalnih kostiju te se tako dobijaju 4 polja. Za pojavu linearnih kalcifikata u svakom od polja dobija se po jedan bod (maksimalno 4 boda). Strelice označavaju kalcifikovane krvne sudove (lični podaci)



Slika 2. Rentgenski snimak karlice: regija karlice podeljena je dvema zamišljenim linijama od kojih jedna prolazi kroz gornju ivicu glava femoralnih kostiju, a druga kroz kičmeni stub te se tako dobijaju 4 polja. Za pojavu linearnih kalcifikata u svakom od polja dobija se po jedan bod (maksimalno 4 boda). Strelice označavaju kalcifikovane krvne sudove (lični podaci)



Slika 3. Rentgenski snimak podlaktice sa AVF. Uočava se prisustvo linearnih kalcifikacija u radijalnim, ulnarnim krvnim sudovima i/ili u regiji anastomoze (lični podaci)

Na osnovu ukupnog kalcifikacionog skora, bolesnici su podeljeni u tri grupe: u grupi A su bolesnici sa blago izraženim kalcifikacijama (ukupni kalcifikacioni skor 0-3), u grupi B su bolesnici sa srednje izraženim kalcifikacijama tj. oni sa ukupnim kalcifikacionim skorom od 4-7, a u grupi C sa najizraženijim kalcifikacijama su oni sa ukupnim kalcifikacionim skorom od 8-11.

Na osnovu prisustva/odsustva kalcifikacija u krvnim sudovima regije AVF bolesnici su, takođe, podeljeni u dve grupe. U prvoj grupi (grupa I) su bolesnici bez prisustva kalcifikacija u krvnim sudovima regije AVF, a u grupi II su bolesnici sa uočenim kalcifikacijama u krvnim sudovima regije AVF.

Određivanje kalcifikacionog skora i brzine pulsog talasa sprovedeno je 2009 godine, a potom je prospektivno prećeno preživljavanje AVF u narednih pet godina odnosno do transplantacije ili letalnog ishoda.

3.1.2. Bolesnici kod kojih je izvršena genotipizacija i ispitivan uticaj polimorfizma odabranih gena koji imaju uticaj na endotelnu funkciju (gen za angiotenzin I konvertujući enzim (ACE), matriks-metaloproteinazu 3 (MMP3) i endotelijalnu azot-oksidi sintazu (eNOS) na preživljavanje primarnih AVF

U ovaj deo istraživanja uključeno je 200 bolesnika koji su 2010. godine bili na hroničnom programu lečenja hemodijalizama duže od 6 meseci. Svim bolesnicima je urađena genotipizacija za navedene gene. Osnovni podaci o bolesnicima predstavljeni su tabelom 2.

Tabela 2. Osnovni podaci o bolesnicima kod kojih je vršena genotipizacija gena za ACE, MMP3 i eNOS

	Br (%) ili X±SD
Pol (muški)	114 (57%)
Starost, godine	63±11 (30-87)
Dužina dijaliznog staža, godine	7±5
Osnovna bolest	
HTN	91 (45.5%)
DM	25 (12.5%)
ADPBB	21 (10.5%)
UA	32 (16%)
HGN	24 (12%)
NZ	7 (3.5%)
DM, da	30 (15%)
HTA, da	109 (54.5%)
iPTH, pg/ml	423±487

HTN: hipertenzivna nefroangioskleroza; DM: dijabetesna nefropatija; ADPBB: autozomno-dominantna policistična bolest bubrega; UA: urološke abnormalnosti uključujući i hronični pijelonefritis; HGN: hronični glomerulonefritis; NZ: nepoznat uzrok TBS; iPTH: intaktni serumski parathormon

Retrospektivnom analizom uočeno je da je od 200 ispitivanih bolesnika, kod 173 kao primarni trajni vaskularni pristup korišćena AVF. Kod 13 od ovih 173 bolesnika AVF nije funkcionisala duže od 6 meseci, pa oni nisu uvršćeni u analizu preživljavanja. Tačnije, korišćeni su podaci o dužini funkcionisanja 160 primarnih AVF koje su trajale duže od 6 meseci, a isključeni su bili i bolesnici kod kojih je kao primarni vaskularni pristup korišćen AVG ili trajni vaskularni kateter. Vrsta korišćene dijalizne membrane je kod 49 (24.5%) bolesnika bila *low-flux* dok je kod ostalih 124 (75.5%) korišćena *high-flux* membrana među kojima je i 25 (12.5%) bolesnika bilo na hemodijafiltraciji.

Prestanak funkcionisanja primarne AVF verifikovan je kod 55 bolesnika (34.4%) i ovi bolesnici su činili grupu B, dok su grupu A činili bolesnici kod kojih je u trenutku genotipizacije i dalje korišćena primarna AVF kao trajni vaskularni pristup za hemodijalizu.

3.2.3. Genotipizacija

Za izolaciju dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) korišćena je puna krv sa antikoagulantom EDTA (5ml sveže krvi, čuvana na +4°C najduže 4 dana ili duže na -20°C). DNK iz pune krvi izolovana je makrometodom izolovanja (150). Metoda se zasniva na lizi ćelija, enzimskoj i hemijskoj ekstrakciji sa svrhom uklanjanja ćelijskih proteina, RNK i drugih makromolekula, nakon čega sledi taloženje DNK u apsolutnom alkoholu.

Za genotipizaciju korišćena je metoda lančane reakcije polimeraze (PCR). PCR reakcija se odvija u mikrotubi (zapremine 0,2ml) gde se podvrgava cikličnim promenama temperature što ima za posledicu amplifikaciju tačno određenog gena ili dela gena. Jedan ciklus čine:

-denaturacija DNK matrice zagrevanjem na 94°C-96°C.

-hibridizacija prajmera sa matricom (*annealing*) pri temperaturi od 50-65°C i

-elongacija prajmera - sinteza novog lanca komplementarnog DNK regionu ograničenog prajmerima pomoću termostrabilne DNK polimeraze na temperaturi od 72°C. Ponavljanje ovakvih ciklusa 25-45 puta rezultira eksponencionalnim umnožavanjem željenog segmenta DNK. Uspešnost PCR amplifikacije proverava se elektroforezom na agaroznom gelu, nakon čega se pozitivni uzorci koriste za dalju analizu restrikcionim

endonukleazama. Restrikcioni enzimi su prečišćeni iz bakterija i pripadaju grupi endonukleaza, a supstrat im je dvolančana DNK. Specifičnost se ogleda u tome što za razliku od drugih nukleaza prepoznaju kratke redoslede nukleotida definisanog redosleda (restrikciona mesta) i seku DNK u okviru njih. Tretiranjem DNK restrikcionim enzimima dobijamo fragmente različite dužine. Dužina i broj fragmenata zavise od veličine genoma i od broja i rasporeda odgovarajućih restrikcionih mesta u genomu. Restrikcioni fragmenti se razdvajaju na osnovu dužine jer se različito ponašaju tokom elektroforeze. U električnom polju u blago alkalnom puferu, molekul DNK će se kretati kroz agarozni matriks od katode ka anodi, pri čemu brzina kretanja DNK molekula zavisi od njegove veličine, od veličine pora u ovom matriksu, od gustine agaroznog gela, primenjene električne struje i drugih parametara. Poređenjem brzine kretanja molekula DNK koji ispituujemo sa brzinom kretanja molekula DNK poznate veličine (DNK *marker-ledder*), elektroforezom u agaroznom matriksu možemo proceniti veličinu dobijenog DNK fragmenta.

3.2.3.1. Određivanje I/D polimorfizma u genu za angiotenzin konvertujući enzim (ACE)

Fragment DNK od 287pb, koji predstavlja delecioni fragment u intronu 16 amplifikovan je PCR metodom. U procesu genotipizacije I/D polimorfizma, fragmenti dobijeni PCRom su bili dužine od 490kb i 190kb, a korišćenjem specifičnih insercionih setova prajmera dobijeni su fragmenti dužine 335bp. U reakciji su korišćeni: 2.5µl puferizovanog rastvora za PCR, 0.75µl MgCl₂, 0.5 µl dNTP, 1 µl prajmera I, 1 µl prajmera II, 0.2 µl DNK polimeraze, 5 µl genomske DNK u ukupnoj zapremini od 25 µl. Reakcija je rađena u *GeneAmp PCR System 2700, AB Applied Biosystem*. Amplifikacija se sastojala od 30 ciklusa, uključujući i denaturaciju na 94°C u dužini od jednog minuta, prajmeri su hibridizovani jedan minut na 58°C, a DNK elongacija dva minuta na 72°C. Fragmenti bez insercije (D alel) od 190bp i sa insercijom (I alel) od 490bp su detektovani korišćenjem 2% agaroznog matriksa sa etidium bromidom.

Radi poboljšanja specifičnosti DD genotipa korišćena je amplifikacija korišćenjem seta specifičnih insercionih prajmera u uslovima kao za PCR: 1 minut denaturacije na 94°C, praćeno sa 30 ciklusa na 94°C, hibridizacijom na 67°C i 2 minuta elongacije na 72°C. Samo prisustvo I alela dovodi do formiranja fragmenata dužine od 335-bp, što je identifikovano uz pomoć elektroforeze na 3% agarozu gelu. Umnoženi uzorak sa *Alu*

insercionom sekvencom predstavlja fragment of 490bp (genotipe II), dok DNA fragment od 190 bp predstavlja sekvencu sa delecijom u posmatranom alelu (genotip DD). Prisustvo oba fragmenta predstavlja heterozigot (genotip ID).

3.2.3.2. Određivanje 5A/6A polimorfizma u genu za matriksnu-metaloproteinazu-3 (MMP3)

Za genotipizaciju 5A/6A polimorfizma korišćena je PCR-RFLP metoda. Reakcija je urađena sledećim zapreminama: 2.5 µl puferizovanog rastvora za PCR, 0.75µl MgCl₂, 0.5 µl dNTP, 1 µl prajmera I, 1 µl prajmer II, 0.2 µl DNK polimeraze, 5 µl genomske DNK u ukupnoj zapremini od 25 µl. PCR produkti od 130 bp dužine izdvojeni su pomoću *Rsy I restricting* enzima, koji prepoznaje 5'-GACN↓NNGTC-3' sekvencu DNK koja sadrži 5A alel. Prisustvo 6A alela produkuje fragmente od 130-bp dužine, dok je 5A alel formira kraće fragmente od 110bp. Heterozigot 5A/6A sadrži oba fragmenta.

3.2.3.3. Određivanje G/T polimorfizma u genu za endotelijalnu azot-monoksid sintazu (eNOS)

Za genotipizaciju G/T polimorfizma korišćena je PCR metoda. U reakciji je korišćeno: 2 µl puferizovanog rastvora za PCR, 1 µl BAN II, 1 µl prajmera 5, 0.2 µl DNK polimeraze, 5 µl genomske DNK u ukupnoj zapremini od 25 µl. PCR produkti od 27 bp dužine izdvojeni su uz pomoć prajmera 5.

3.1.3. Bolesnici kod kojih je ispitivan uticaj serumskih koncentracija odabranih endotelnih faktora rasta, parametara endotelne disfunkcije kao i uremijskih toksina (*endothelin-1* (ET-1), *transforming-growth faktor-beta* (TGF-beta), *platlet-derived growth-faktor* (PDGF) i *asimetrični dimetilarginin* (ADMA)) na preživljavanje primarnih AVF

Ovim delom ispitivanja obuhvaćeno je 176 bolesnika koji su u aprilu 2015. bili na hroničnom programu lečenja hemodijalizama duže od 6 meseci, koji su kao tajni vaskularni pristup koristili AVF ili AVG. Osnovni podaci o bolesnicima uključenim u ovaj deo ispitivanja prikazane su u tabelama 3, 4, 5 i 6.

Tabela 3. Osnovni podaci o bolesnicima kod kojih su ispitivani markeri endotelne disfunkcije

	Br (%) ili X±SD
Pol, muški	103 (58.5%)
Godine starosti	63±12 (25-87)
Osnovna dijagnoza	
HTN	65 (36.9%)
DM	33 (18.8%)
ADPBB	19 (10.8%)
UA	14 (8%)
HGN	24 (13.6%)
NZ	21 (11.9%)
Dužina hemodijaliznog staža, meseci	80±75 (6-343)
Vrsta korišćene dijalize (LF/HF/HDF)	21/103/52 (11.9%/58.5%/29.5%)
Trajanje jedne hemodijalizne sesije u satima	4.07±0.32
Kt/V	1.41±0.30
HTA, da	157 (89.2%)
DM, da	42 (23.9%)
Periferna vaskularna bolest, da	19 (10.8%)
Skor komorbiditeta (0/1/2/3)	27/74/70/5 (15%/42%/40%/3%)

HTN: hipertenzivna nefroangioskleroza; DM: dijabetesna nefropatija; ADPBB: autozomno-dominantna policistična bolest bubrega; UA: urološke abnormalnosti uključujući i hronični pijelonefritis; HGN: hronični glomerulonefritis; NZ: nepoznat uzrok TBS

Tabela 4. Osnovni podaci o korišćenoj terapiji bolesnika kod kojih su ispitivani markeri endotelne disfunkcije

Varijabla	Br (%) ili X±SD
Statini, da	43 (24.4%)
ACE inhibitori, da	99 (56.3%)
ARB, da	24 (13.6%)
ACE+ARB, da	16 (9.1%)
Kalcijumski antagonist, da	75 (42.6%)
Vezivači fosfata, da	148 (84.1%)
Broj tbl. vezivača fosfata za godinu dana	980±366
Analozi vitamina D, da	72 (40.9%)
Broj tbl. vit. D od 0.25mcg za godinu dana	383±243
Antiagregansi, da	117 (66.5%)
Acetilsalicilna kiselina	26 (22.2%)
Tiklopidin	52 (44.4%)
Klopidogrel	39 (33.3%)
Oralni antikoagulanasi, da	15 (8.5%)
ASE preparat, da	152 (86%)
Prosečna nedeljna doza ASE preparata, i.j.	5500±4067

tbl.-tableta; vit.-vitamin; mcg-mikrogram; ASE-agens stimulacije eritropoeze; i.j.-internacionalna jedinica

Tabela 5. Osnovni podaci o vaskularnim pristupima bolesnika kod kojih su ispitivani markeri endotelne disfunkcije

Varijabla	Br (%) ili X±SD
Prvi vaskularni pristup, da	104 (59.1%)
Lokalizacija vaskularnog pristupa	
AVF <i>antebrachii l.sin.</i>	100 (56.8%)
AVF <i>cubiti l.sin.</i>	25 (14.2%)
AVF <i>antebrachii l.dex.</i>	29 (16.5%)
AVF <i>cubiti l.dex.</i>	3 (1.7%)
AVG bilo koje lokalizacije	19 (10.8%)
Dužina korišćenja pristupa pre određivanja markera, meseci	59±65 (1-343)

Tabela 6. Vrednosti određenih laboratorijskih parametara bolesnika kod kojih su ispitivani markeri endotelne disfunkcije

Varijabla	X±SD
Hgb, g/dL	104±15
Trombociti, x10 ⁹ /L	202±67
Proteini, g/L	69±5
Albumini, g/L	37±3
Kalcijum, mmol/L	2.32±0.22
Fosfor, mmol/L	1.45±0.46
Holesterol, mmol/L	4.6±1.3
Trigliceridi, mmol/L	2.0±1.3
iPTH, pg/mL	222±354
Alkalna fosfataza, U/L	77±45
Natrijum, mmol/L	136±3
Kalijum, mmol/L	5.2±0.8
CRP, mg/L	8.8±12.5

iPTH: intaktni serumski partahormon; CRP-C-reaktivni protein

Bolesnicima uključenim u ispitivanje je pre započinjanja srednje hemodijalizne sesije u nedelji uzeta krv radi određivanja vrednosti serumskih koncentracija TGF-β, PDGF, ET-1 i ADMA.

Potom je, prospektivno, praćeno preživljavanje primarnih AVF u narednih 18 meseci ili do pacijentove smrti ili transplantacije. Od 176 bolesnika uključenih u ispitivanje, u trenutku određivanja TGF-β, PDGF, endotelina-1 i ADMA, njih 104 je kao aktuelni trajni vaskularni pristup za hemodijalizu imalo i dalje primarnu AVF. Bolesnici su podeljeni u dve grupe: grupa I-bolesnici kod kojih je primarna AVF prestala da funkcioniše i grupa II-bolesnici kod kojih je primarna AVF funkcionisala i posle 18 meseci praćenja.

3.2.4. ELISA metoda za određivanje serumskih koncentracija TGF- β , PDGF, ET-1 i ADMA

Svim bolesnicima je izvađena puna krv, a da bi se izdvojio serum. Epruvete su bile ostavljene na sobnoj temperaturi tokom 30 min da bi se odigrao proces koagulacije nakon čega su centrifugirane 10 minuta na brzini od 3000 obrtaja/min. Uzorci seruma su čuvani na -80°C do testiranja. Serumsku koncentraciju navedenih citokina određivana je na aparatu *Eti-Max 3000* korišćenjem komercijalnih ELISA testova. Za određivanje serumске koncentracije PDGF korišćen je ELISA test proizvođača *ALPCO*, verzija *23.11.14(22)*. Za određivanje serumске koncentracije ADMA korišćen je ELISA test proizvođača *DLD Diagnostika GMBH*, verzija *EA201/96*. Za određivanje serumске koncentracije ET-1 korišćen je ELISA test proizvođača *Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG*, verzija *140722 (replacing: 140603)*. Za određivanje serumске koncentracije TGF- β korišćen je ELISA test proizvođača *Cusabio*, verzija *CSB-E04725h*.

3.3. Statistička analiza podataka

Statistička analiza podataka obuhvata metode deskriptivne statistike. Provera normalnosti distribucije podataka vršena je Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Za poređenje varijabli između različitih grupa bolesnika korišćen je t-test, Mann-Whitney test, χ^2 test, Fišerov exact test ili ANOVA u zavisnosti od broja grupa i normalnosti raspodele. Uticaj pojedinih varijabli na postojanje vaskularnih kalcifikacija ispitivan je multivarijantnom binarnom logističkom regresijom. Kaplan-Meierovom metodom, uz korišćenje log-rank testa (modifikovani χ^2 test) vršena je analiza preživljavanja gde je kao ishodna (outcome) varijabla korišćena: prestanak funkcionisanja AVF. Prediktivna vrednost ispitivanih varijabli, odnosno njihov uticaj na preživljavanje AVF određeni su univarijantnom i multivarijantnom Coxovom regresionom analizom. Sve varijable za koje je univarijantnom regresionom analizom dobijena statistička značajnost na nivou 0,05 uključivane su u multivarijantne modele prema različitim kriterijumima.

REZULTATI ISTRAŽIVANJA

4.1. Ispitivanje uticaja vaskularnih kalcifikacija na preživljavanje primarnih AVF

Ovim delom ispitivanja obuhvaćeno je 90 bolesnika. Uključeni su oni bolesnici koji od početka hemodijaliznog tretmana imaju prvu AVF kao svoj vaskularni pristup dok ostali bolesnici (sa drugom i sa više od dve AVF, AVG ili trajnim vaskularnim kateterom) nisu uključeni u praćenje. Svi bolesnici su imali radiocefalične AVF. Ovim bolesnicima određen je ukupni kalcifikacioni skor. Svega 4 bolesnika (4.4%) je imalo ukupni kalcifikacioni skor 0 (uključujući i kalcifikacije regije AVF), dok je 9 bolesnika (10%) imalo maksimalni kalcifikacioni skor.

Analize su rađene shodno opisanoj metodologiji koja uključuje tri grupe bolesnika kreirane na osnovu ukupnog skora kalcifikacija (grupe A,B i C) i dve grupe shodno prisustvu/odsustvu kalcifikacija regije AVF (grupe I i II)

4.1.1. Ispitivanje uticaja ukupnog kalcifikacionog skora na preživljavanje primarnih AVF

U tabeli 7 predstavljeno je poređenje tri grupe bolesnika na osnovu ukupnog kalcifikacionog skora u osnovnim bazalnim varijablama. Uočeno je da se grupe razlikuju po polu obzirom da je jedna polovina muških ispitanika u grupi sa najizraženijim kalcifikacijama, potom po prisustvu dijabetes melitusa gde u grupi sa niskim prisustvom kalcifikacija nema nijednog bolesnika sa dijabetesom, dok je u grupi sa srednje izraženim kalcifikacijama tek jedan bolesnik sa DM. U ostalim ispitivanim varijablama nije bilo statistički značajne razlike među ovim grupama bolesnika.

Tabela 7. Osnovni podaci o bolesnicima shodno vrednostima ukupnog kalcifikacionog skora

	Grupa A (skor 0-3)	Grupa B (skor 4-7)	Grupa C (skor 8-11)	p*
Broj bolesnika	36	24	30	
Pol (muški/ženski)	14/22	12/12	23/7	0.008
Starost, godine	63±11	64±9	61±11	0.582
DM, da/ne, Br	0/36	1/23	9/21	<0.001
HTA, da/ne, Br	20/16	13/11	16/14	0.983
Pušenje, da/ne, Br	8/28	6/18	7/23	0.969
Dužina korišćenja AVF do određivanja kalcifikacija, meseci (X±SD; Mediana;IQR)	87.5±53.5 77;56	77.7±47.4 72.5;61.5	95.0±65.9 85;98.5	0.536
Protok krvi, ml/min (X±SD; Mediana;IQR)	261±34 257.5;48	265±29 260;30	258±29 260;43	0.657
iPTH, pg/mL (X±SD; Mediana;IQR)	414±302 312;442.5	557±737 201.5;745	583±649 347;632	0.429
Kalcijum, mmol/L	2.34±0.14	2.32±0.20	2.33±0.17	0.939
Fosfor, mmol/L	1.48±0.35	1.51±0.44	1.64±0.39	0.229
BPT, m/s	9.63±2.36	10.06±2.96	10.27±3.18	0.442

iPTH: intaktni serumski parathormon; BPT: brzina pulsog talasa; IQR: interkvartilni rang; *prema χ^2 testu ili jednosmernom ANOVA testu u zavisnosti od vrste podataka;

Multiplom linearnom logističkom regresijom ispitivan je uticaj različitih varijabli na kalcifikacioni skor i pronađeno je da pol, prisustvo dijabetesa, dužina korišćenja AVF pre određivanja kalcifikacija, brzina protoka krvi i vrednosti iPTH statistički značajno utiču na pojavu kalcifikacija (tabela 8).

Tabela 8. Multipla linearna regresiona analiza uticaja povezanosti ukupnog kalcifikacionog skora i ostalih varijabli

	b	beta	95% CI for b	p
Pol	-3.11	-0.432	-4.41 to -1.86	<0.001
Diabetes mellitus, da	6.06	0.526	3.92 to 8.21	<0.001
HTA, da	0.81	0.111	-0.46 to 2.08	0.210
Pušenje, da	0.87	0.010	-1.425 to 1.599	0.909
Korišćenje AVF pre određivanja kalcifikacija, meseci	0.017	0.262	0.005 to 0.029	0.005
Godine	0.013	0.036	-0.06 to 0.08	0.733
Protok krvi kroz AVF	-0.026	-0.217	-0.048 to -0.003	0.026
iPTH*	0.001	0.191	0.000 to 0.002	0.032
Kalcijum	-3.005	-0.136	-7.046 to 1.036	0.143
Fosfor	1.025	0.110	-0.711 to 2.760	0.243
BPT**	0.038	0.029	0.76 to 0.28	0.761

* iPTH: intaktni serumski parathormon; **BPT: brzina pulsno talasa

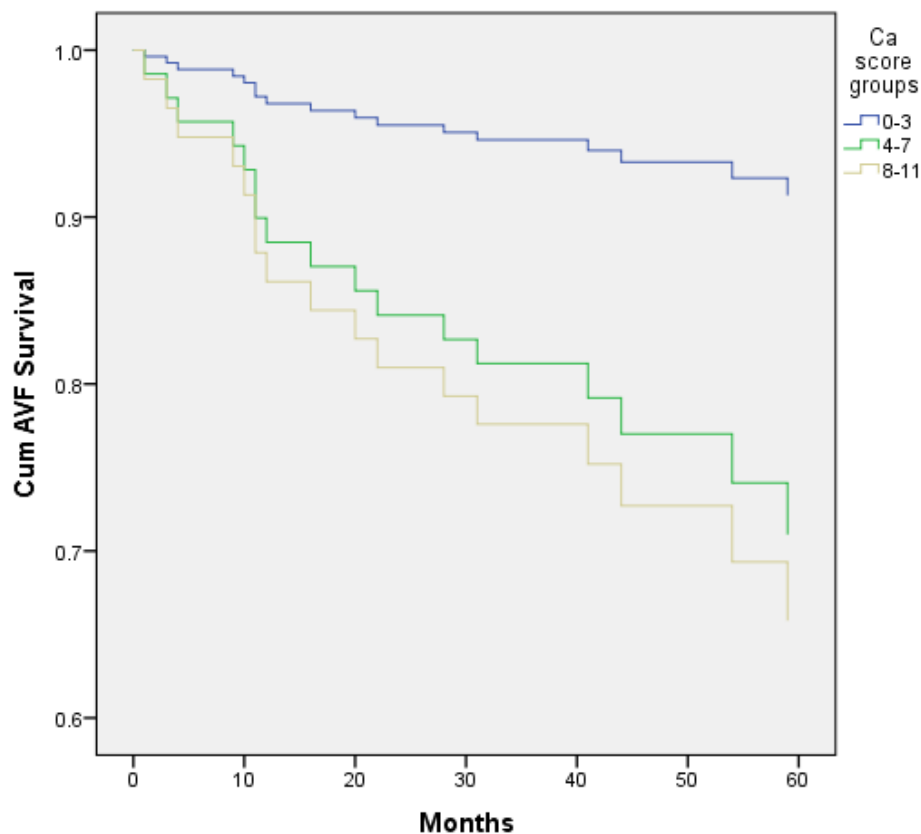
Preživljavanje primarne AVF shodno ukupnom kalcifikacionom skorom prospektivno je praćeno 5 godina. Uticaj različite izraženosti kalcifikacija na preživljavanje AVF određeno je korišćenjem *Cox proportional hazard* modela uz prilagođavanje za razlike prezentovane u tabeli 8. U odnosu na referentnu grupu bolesnika koji imaju ukupni kalcifikacioni skor od 0-3, bolesnici sa srednje izraženim ukupnim kalcifikacionim skorom imaju povećan rizik za prestanak funkcionisanja AVF sa graničnom statističkom značajnošću (HR 3.82, 95% interval poverenja 1.10-13.23; p=0.055), dok bolesnici sa najizraženijim ukupnim kalcifikacionim skorom imaju statistički značajno veći rizik za prestanak funkcionisanja AVF (HR 4.65, 95% interval poverenja 0.97-22.38; p=0.035) (Tabela 9).

Tabela 9. Uticaj ukupnog kalcifikacionog skora na pojavu prestanka funkcionisanja AVF

Grupe po ukupnom kalcifikacionom skoru	p	HR	95% CI
Nizak ukupan kalcifikacioni skor (0-3)	-	1.00	-
Srednji ukupan kalcifikacioni skor (4-7)	0.055	3.82	1.10-13.23
Najveći ukupan kalcifikacioni skor (8-11)	0.035	4.65	0.97-22.38

HR-hazard rate (stopa opasnosti); CI-confidence interval (interval poverenja);

Slikom 4 grafički je prikazan *Cox proportional hazard* model uticaja pripadnosti različitim grupama ukupnog kalcifikacionog skora na petogodišnje preživljavanje primarnih AVF.



Slika 4. Preživljavanje AVF shodno ukupnom kalcifikacionom skoru

Apsolutni broj AVF koje su prestale da funkcionišu tokom vremena praćenja prikazan je tabelom 10. Ovom tabelom predstavljeno je da je nakon petogodišnjeg praćenja od ukupno 36 AVF u grupi bolesnika sa niskim ukupnim kalcifikacionim skorom i dalje funkcionisalo 32 (88.9%). U grupi bolesnika sa srednjim kalcifikacionim skorom, funkcionalno je bilo 17 od 24 AVF (70.8%), dok je u grupi bolesnika sa najvećim ukupnim kalcifikacionim skorom, nakon pet godina praćenja i dalje funkcionisalo 24 od 30 AVF (80%).

Tabela 10. Prikaz broja bolesnika sa funkcionalnom AVF tokom praćenja do 60 meseci

Ukupan skor kalcifikacija	Broj funkcionalnih AVF			
	Početak ispitivanja	Nakon 12 meseci	Nakon 36 meseci	Nakon 60 meseci
0-3	36	35	32	32
4-7	24	21	18	17
8-11	30	27	27	24

4.1.2. Ispitivanje uticaja prisustva kalcifikacija u krvnim sudovima regije AVF na preživljavanje primarnih AVF

Kako smo potvrdili da ukupan skor vaskularnih kalcifikacija ima uticaja na preživljavanje AVF, pokušali smo da jednostavnijom i dostupnijom metodom potvrdimo značaj vaskularnih kalcifikacija na preživljavanje AVF. U tom smislu smo upotrebili prisustvo kalcifikacija krvnih sudova u regiji AVF i u tabeli 11 predstavljeno je poređenje dve grupe bolesnika u osnovnim karakteristikama formiranim na osnovu prisustva/odsustva isključivo kalcifikacija u krvnim sudovima regije AVF. Grupe se statistički značajno razlikuju po polu obzirom na prisustvo većeg broja muškaraca u grupi bolesnika sa kalcifikacijama u krvnim sudovima regije AVF kao i po prisustvu dijabetes melitusa sa napomenom da su svi bolesnici sa dijabetesom u grupi sa prisutnim kalcifikacijama u krvnim sudovima AVF regije. U ostalim ispitivanim varijablama nema statistički značajne razlike između ove dve grupe bolesnika.

Tabela 11. Osnovni podaci o bolesnicima shodno kalcifikacijama u krvnim sudovima AVF regije

	Ukupno	Grupa I	Grupa II	p*
Broj pacijenata	90	34	56	
Pol, m/ž, Br	49/41	12/22	37/19	0.008
Starost, godine	63±10	64±11	62±10	0.374
Dijabetes mellitus, da/ne, Br	10/80	0/34	10/46	0.012
Hipertenzija, da/ne, Br	49/41	14/20	27/29	0.663
Pušenje, da/ne, Br	21/69	9/25	12/44	0.614
Dužina korišćenja AVF do određivanja kalcifikacija, meseci (X±SD; Mediana; IQR)	87±56 77;69	75±46 66;48	94±61 81;90	0.104
Protok krvi, ml/min (X±SD; Mediana; IQR)	261±31 260;30	259±37 255;65	263±26 260;30	0.530
iPTH, pg/mL (X±SD; Mediana; IQR)	509±566 284;538	385±329 235;455	584±661 334;666	0.062
Kalcijum, mmol/L	2.33±0.16	2.31±0.15	2.34±0.17	0.326
Fosfor, mmol/L	1.54±0.39	1.49±0.44	1.57±0.36	0.367
BPT, m/s	9.96±2.80	9.88±2.30	10.01±3.07	0.815

iPTH: intaktni serumski parathormon; BPT: brzina pulsog talasa; IQR: interkvartilni rang; X-srednja vrednost; SD-standardna devijacija; * prema χ^2 testu, Studentovom t testu ili *Mann-Whitney* testu u zavisnosti od vrste podataka

Binarnom logističkom regresijom analiziran je uticaj varijabli na prisustvo kalcifikacija u krvnim sudovima regije AVF. Ustanovljeno je da na pojavu kalcifikacija statistički značajan uticaj imaju muški pol, prisustvo dijabetes melitusa i dužina korišćenja AVF pre određivanja kalcifikacija (Tabela 12).

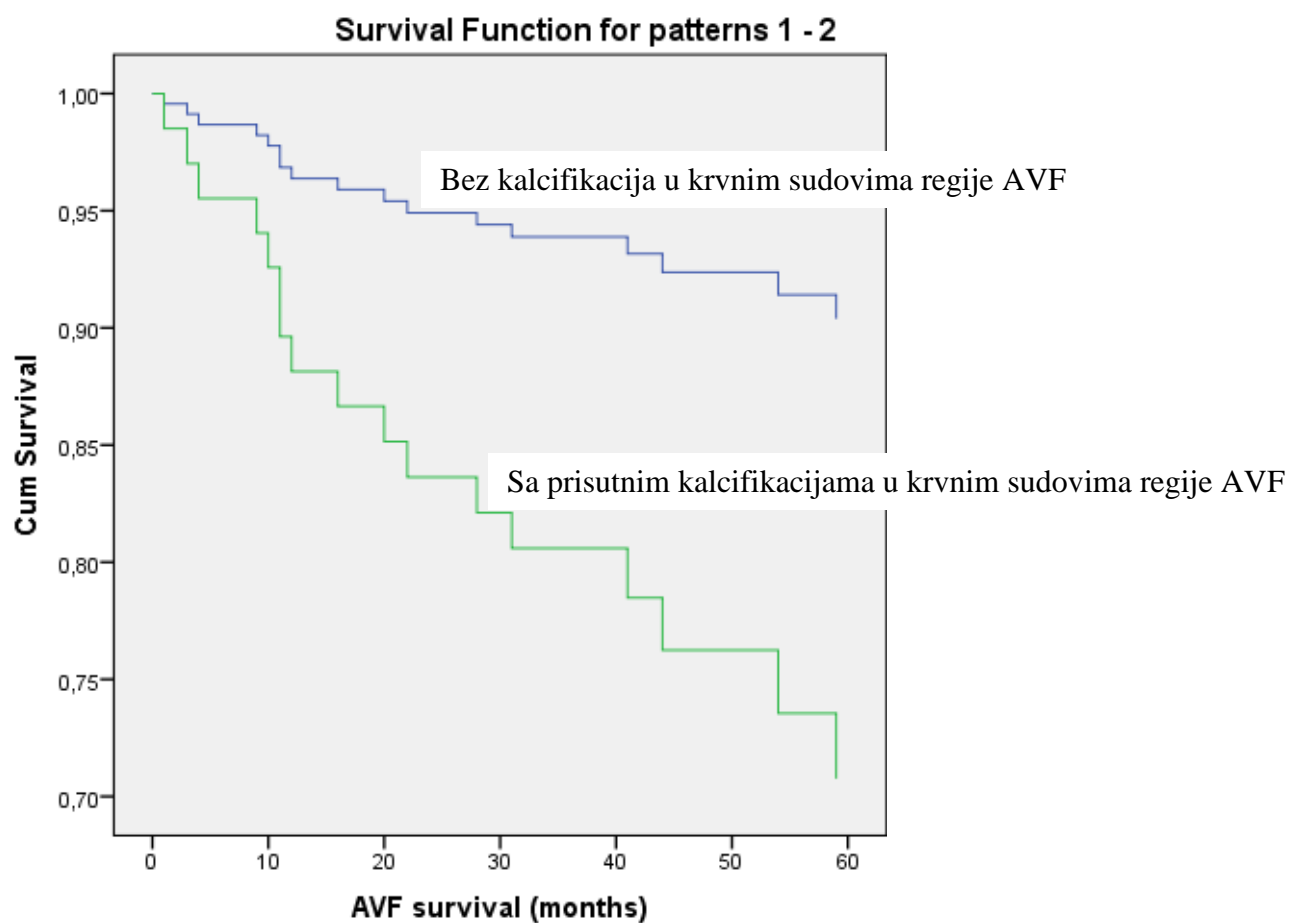
Tabela 12. Uticaj različitih varijabli na pojavu kalcifikacija u krvnim sudovima regije AVF (binarna logistička regresija)

	OR	95% CI	p
Pol	0.134	0.04-0.45	0.001
Diabetes mellitus, da*	39.498	1.22-139.50	0.034
HTA, da	2.624	0.92-8.03	0.071
Pušenje, da	0.857	0.239-2.949	0.786
Korišćenje AVF pre određivanja kalcifikacija (meseći)	1.014	1.004-1.029	0.009
Godine	0.99	0.926-1.077	0.903
Protok krvi kroz AVF	0.992	0.977-1.016	0.729
iPTH	1.001	1.000-1.002	0.103
Kalcijum	2.505	0.076-121.129	0.556
Fosfor	1.004	0.265-6.025	0.769
BPT	1.081	0.850-1.322	0.603

CI-interval poverenja; iPTH-intaktni serumski parathormon; BPT-brzina pulsog talasa; OR-odds ratio-odnos verovatnoće

*dijagnoza DM je nasumično dodeljena jednom bolesniku iz grupe bez prisustva kalcifikacija u AVF-krvnim sudovima (*Yates*-ova korekcija)

Preživljavanje AVF shodno prisustvu kalcifikacija u krvnim sudovima regije AVF prospektivno je praćeno pet godina. Uticaj prisustva kalcifikacija u krvnim sudovima AVF regije na preživljavanje AVF ispitan je korišćenjem *Cox proportional hazard* modela uz prilagođavanje za varijable koje su pokazane da imaju uticaj na nastanak kalcifikacija u AVF-krvnim sudovima (muški pol, dijabetes mellitus i dužina korišćenja AVF do određivanja kalcifikacija). Ustanovljeno je da bolesnici sa prisutnim kalcifikacijama u krvnim sudovima AVF regije u odnosu na bolesnike bez prisustva kalcifikacija u regiji AVF imaju statistički značajan rizik za prestanak funkcionisanja AVF-*hazard rate* (HR) je 3.42 (95% interval poverenja 1.00-11.67; $p=0.049$). Slikom 5 grafički je predstavljen *Cox proportional hazard* model uticaja prisustva/odsustva vaskularnih kalcifikacija u krvnim sudovima regije AVF na petogodišnje preživljavanje AVF.



Slika 5. Uticaj kalcifikacija u krvnim sudovima regije AVF na preživljavanje AVF

U tabeli 13 predstavljen je broj funkcionalnih AVF u grupama sa/bez kalcifikacija u regiji AVF.

Tabela 13. Broj funkcionalnih AVF nakon 5 godina ispitivanja u grupama bolesnika bez i sa kalcifikacijama u krvnim sudovima regije AVF

	Broj bolesnika sa funkcionalnom AVF	
	Na početku praćenja	Nakon petogodišnjeg praćenja
Grupa I	36	32
Grupa II	54	41

4.2. Ispitivanje uticaja polimorfizma odabranih gena koji imaju uticaj na endotelnu funkciju (gen za angiotenzin I konvertujući enzim (ACE), matriks-metaloproteinazu 3 (MMP3) i endotelijalnu azot-oksidi sintazu (eNOS)) na preživljavanje primarnih AVF

Ispitivanje uticaja polimorfizma odabranih gena sprovedeno je retrospektivno obzirom na konstantnost genskog miljea. Naime, od 200 bolesnika kod kojih je izvršena genotipizacija za navedene polimorfizme gena, kod 173 (86.5%) je kao primarni trajni vaskularni pristup korišćena AVF. Kako kod 13 od ovih 173 bolesnika primarna AVF nije funkcionisala duže od 6 meseci, ni preživljavanje ovih AVF nije korišćeno u analizi. Tačnije, korišćeni su podaci o dužini funkcionisanja 160 primarnih AVF koje su trajale duže od 6 meseci, a isključeni su bili bolesnici kod kojih je kao primarni vaskularni pristup korišćen AVG ili trajni vaskularni kateter. Prosečno vreme funkcionisanja ovih primarnih AVF bilo je 5.7 ± 5.5 godina (0.5 godina-25.5 godina), prosečan protok kroz ove AVF je bio 254 ± 30 ml/min (150ml/min-330ml/min). Vrsta korišćene dijalizne membrane je kod 49 (24.5%) bolesnika bila *low-flux* dok je kod ostalih 124 (75.5%) korišćena *high-flux* među kojima je i 25 (12.5%) bolesnika na hemodijafiltraciji.

U trenutku genotipizacije, prestanak funkcionisanja primarne AVF doživelo je 55 bolesnika (34.4%) i ovi bolesnici su činili grupu B, dok su grupu A činili bolesnici kod kojih je i dalje korišćena primarna AVF kao trajni vaskularni pristup za hemodijalizu.

Tabelom 14 predstavljena je zastupljenost određenih polimorfizama među svim ispitivanim bolesnicima.

Tabela 14. Distribucija polimorfizama ispitivanih gena kod svih ispitivanih bolesnika

ACE polimorfizam (I/D)	Br (%)
I/I	20 (10%)
I/D	110 (55%)
D/D	70 (35%)
MMP3 polimorfizam (5A/6A)	
5A/5A	12 (6%)
5A/6A	144 (72%)
6A/6A	44 (22%)
eNOS polimorfizam (G/T)	
T/T	67 (33.5%)
G/T	114 (57%)
G/G	19 (9.5%)

Osnovni podaci o grupama bolesnika kod kojih je, u trenutku genotipizacije, i dalje funkcionalna odnosno nije funkcionala primarna AVF data je u tabeli 15. U ispitivanim varijablama nema statistički značajne razlike između ove dve grupe bolesnika. Tabelom 16 predstavljena je distribucija polimorfizama ispitivanih gena. Nema statistički značajne razlike u ovim raspodelama između dve ispitivane grupe.

Tabela 15. Osnovni podaci o bolesnicima sa funkcionalnom primarnom AVF (grupa A) i nefunkcionalnom primarnom AVF (grupa B) u trenutku genotipizacije

Varijabla	Grupa A	Grupa B	p*
Broj bolesnika	105	55	
Starost, godine	63±11	64±10	0.365
Pol, muški	62 (59%)	31 (56.4%)	0.866
Dužina dijaliznog staža, godine	7.5±5.3	7.8±5.2	0.552
Osnovna dijagnoza			0.286
HTN	50 (47.6%)	26 (47.3%)	
DM	11 (10.5%)	7 (12.7%)	
ADPBB	15 (14.3%)	5 (9.1%)	
UA	16 (15.2%)	9 (16.4%)	
HGN	12 (11.4%)	4 (7.3%)	
NZ	1 (1.0%)	4 (7.3%)	
Prisustvo HTA, da	50 (47.6%)	28 (50.9%)	0.409
Prisustvo DM, da	13 (12.4%)	8 (14.5%)	0.438
Vrsta korišćene dijalize			0.285
LF	26 (24.8%)	20 (36.4%)	
HF	63 (60%)	29 (52.7%)	
HDF	16 (15.2)	6 (10.9%)	
Protok krvi kroz AVF, ml/min	258±29	250±32	0.095
iPTH, pg/mL	472±528	352±461	0.106

HTN-hipertenzivna nefroangioskleroza; DM-dijabetes melitus; ADPBB-automno dominantna policistična bolest bubrega; UA-urološke abnormalnosti; HGN-hronični glomerulonefritis; NZ-nepoznato; LF-*low flux*; HF-*high flux*; HDF-hemodijafiltracija; iPTH-intaktni serumski parathormon

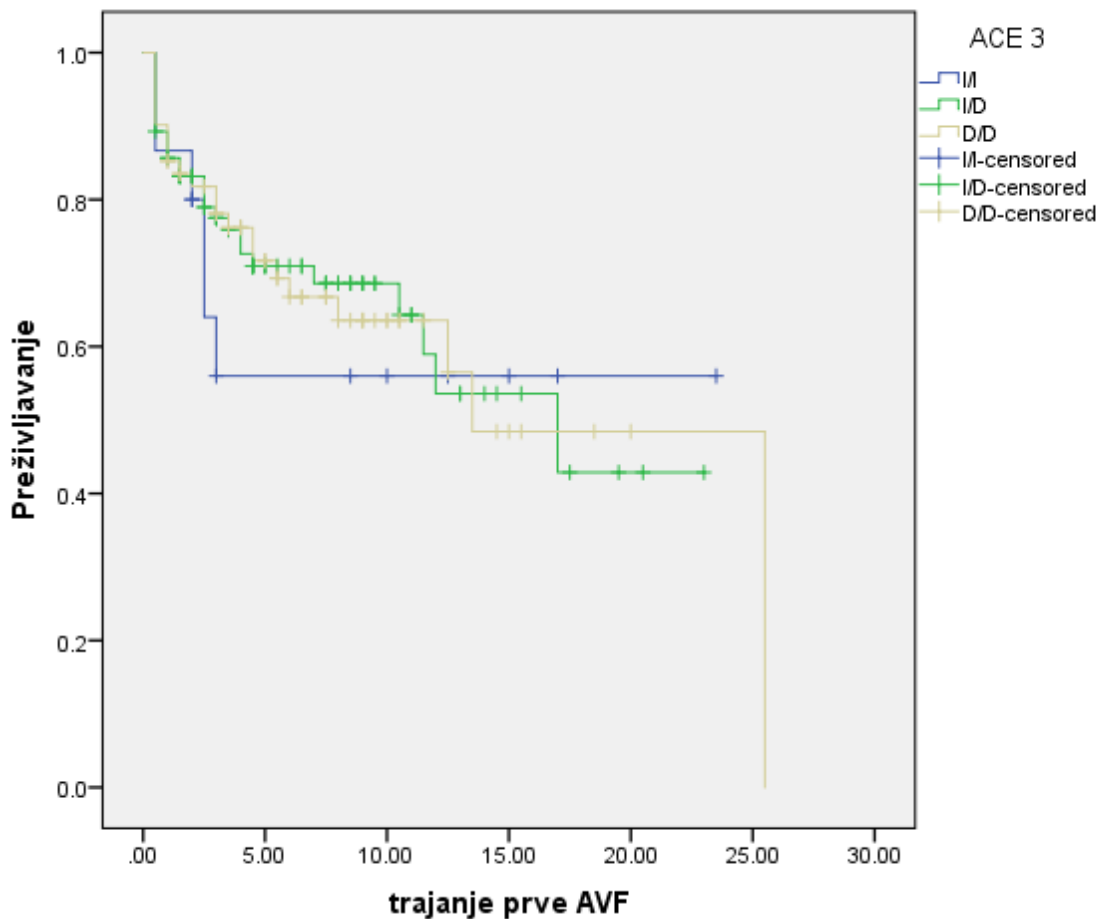
*prema χ^2 testu, Studentovom t testu ili *Mann-Whitney* testu u zavisnosti od vrste podataka

Tabela 16. Distribucija ACE, MMP3 i eNOS polimorfizama kod bolesnika sa funkcionalnom primarnom AVF (grupa A) i nefunkcionalnom primarnom AVF (grupa B) u trenutku genotipizacije

Varijabla	Grupa A	Grupa B	P
Br (%)	105	55	
ACE polimorfizam (I/D)			0.789
I/I	9 (8.6%)	6 (10.9%)	
I/D	57 (54.3%)	27 (49.1%)	
D/D	39 (37.1%)	22 (40%)	
MMP3 polimorfizam (5A/6A)			0.209
5A/5A	6 (5.7%)	3 (5.5%)	
5A/6A	71 (67.6%)	44 (80%)	
6A/6A	28 (26.7%)	8 (14.5%)	
eNOS polimorfizam (G/T)			0.586
T/T	38 (36.2%)	16 (29.1%)	
G/T	56 (53.3%)	34 (61.8%)	
G/G	11 (10.5%)	5 (9.1%)	

Kaplan-Meier-ovom metodom ispitivanja nije pronađen statistički značajan uticaj ispitivanih polimorfizama na preživljavanje primarnih AVF.

Ispitivanje preživljavanja primarnih AVF u odnosu na I/D polimorfizam u genu za ACE prikazano je Slikom 6. Iako bez statističke značajnosti, uočava se da je nakon deset godina praćenja najslabije preživljavanje AVF kod bolesnika sa I/I genotipom (log rank test=0.133; p=0.936).



Slika 6. Kaplan-Meire-ova kriva preživljavanja primarnih AVF u odnosu na I/D polimorfizam u genu za ACE

Tabelom 17 predstavljeno je jednogodišnje, petogodišnje i desetogodišnje preživljavanje primarne AVF u odnosu na I/D ACE polimorfizam. Uočava se da je jednogodišnje preživljavanje gotovo jednako u sve tri grupe (I/I, I/D, D/D). Ipak, posle 5 i 10 godina, zapaža se smanjen procenat i dalje funkcionalnih primarnih AVF kod bolesnika sa I/I genotipom u odnosu na I/D i D/D genotipom (56% vs 71% i 56% vs 68.6% i 63.6%).

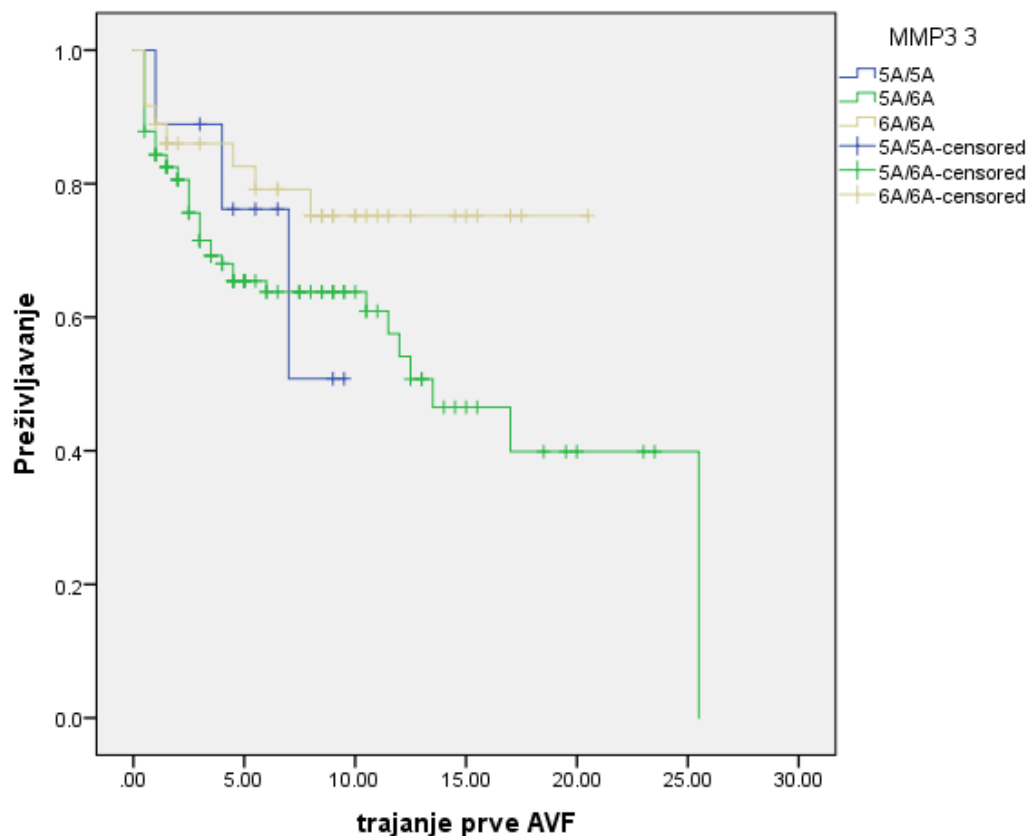
Tabela 17. Preživljavanje primarne AVF u zavisnosti od I/D polimorfizma u genu za ACE

ACE polimorfizam	Jednogodišnje preživljavanje	Petogodišnje preživljavanje	Desetogodišnje preživljavanje
I/I	86.7%	56.0%	56.0%
I/D	85.7%	71.0%	68.6%
D/D	85.2%	71.7%	63.6%

Ispitivanje preživljavanja primarnih AVF u odnosu na 5A/6A polimorfizam u genu za MMP3 prikazano je Slikom 7 i Tabelom 18 (log rank test=3.415; p=0.181). Iako bez statističke značajnosti, nakon 5 godina, procentualno bolje preživljavaju primarne AVF kod bolesnika sa prisutnim 6A alelom, a pogotovu kod 6A/6A homozigota.

Tabela 18. Preživljavanje primarne AVF u zavisnosti od 5A/6A polimorfizma u genu za MMP3

MMP3 polimorfizam	Jednogodišnje preživljavanje	Petogodišnje preživljavanje	Desetogodišnje preživljavanje
5A/5A	88.9%	76.2%	50.8%
5A/6A	84.3%	65.4%	63.8%
6A/6A	88.9%	82.6%	75.2%

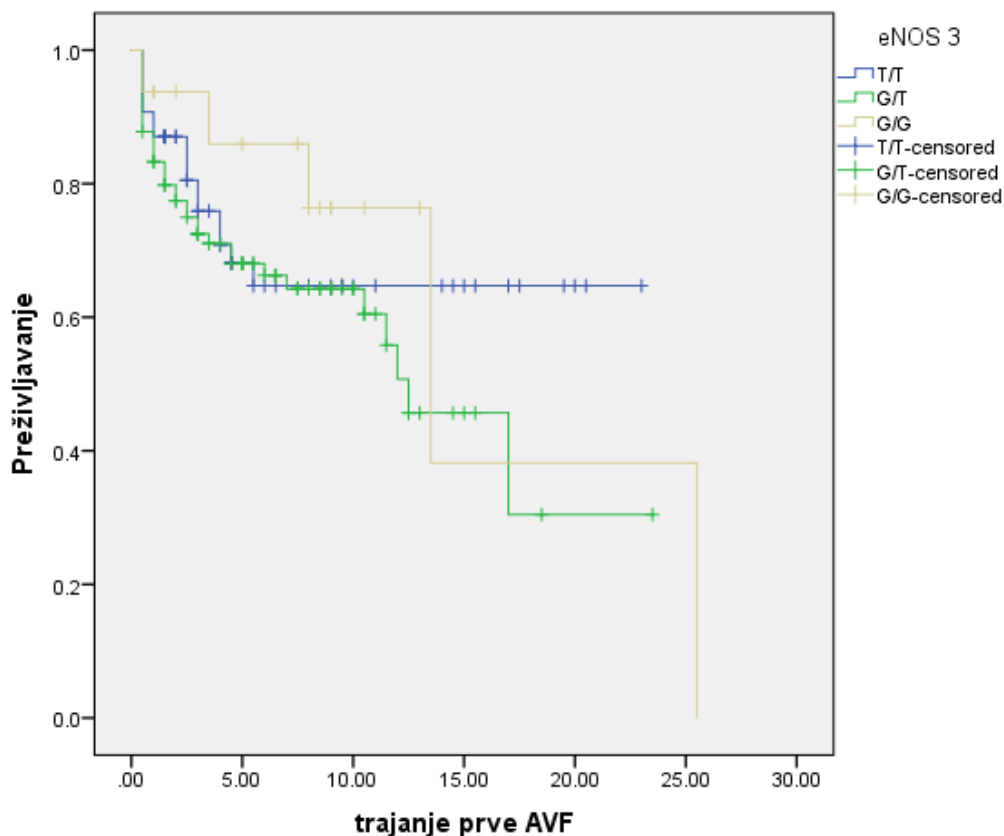


Slika 7. Kaplan-Meire-ova kriva preživljavanja primarnih AVF u odnosu na 5A/6A polimorfizam u genu za MMP3

Ispitivanje preživljavanja primarnih AVF u odnosu na G/T polimorfizam u genu za eNOS prikazano je Slikom 8 i Tabelom 19 (log rank test=1.973; p=0.373). Iako bez statističke značajnosti, nakon 5 godina, procentualno je bolje preživljavanje primarne AVF kod G/G homozigota.

Tabela 19. Prikaz procentualnog preživljavanja primarnih AVF u zavisnosti od G/T polimorfizma u genu za eNOS

eNOS polimorfizam	Jednogodišnje preživljavanje	Petogodišnje preživljavanje	Desetogodišnje preživljavanje
T/T	87%	68.1%	64.7%
G/T	83.3%	68.0%	64.3%
G/G	93.8%	85.9%	76.4%



Slika 8. Kaplan-Meire-ova kriva preživljavanja primarnih AVF u odnosu na G/T polimorfizam u genu za eNOS

Korišćenjem *Cox proportional hazard* modela dobijeni su relativni rizici uticaja pojedinih polimorfizama na prestanak funkcionisanja primarne AVF (Tabela 20). Iako bez statističke značajnosti, prisustvo D alela u genu za ACE, smanjuje rizik za pojavu prestanka funkcionisanja primarne AVF za 14.2%. Prisustvo 5A alela u genu za MMP3 povećava rizik za pojavu prestanka funkcionisanja primarne AVF gotovo 2 puta, a prisustvo T alela u genu za eNOS 1.57 puta.

Tabela 20. *Cox proportional hazard* model analize uticaja polimorfizama ispitivanih gena na pojavu prestanka funkcionisanja primarne AVF

polimorfizmi	HR	CI 95%	p
DD+ID (ACE)	0.858	0.366-2.013	0.725
5A/5A+5A/6A (MMP3)	1.963	0.924-4.168	0.079
TT+GT (eNOS)	1.578	0.569-4.373	0.381

4.3. Ispitivanje uticaja serumskih koncentracija odabranih endotelnih faktora rasta, parametara endotelne disfunkcije kao i uremijskih toksina (*endothelin-1* (ET-1), *transforming-growth faktor-beta* (TGF-beta), *platlet-derived growth-faktor* (PDGF) i asimetrični dimetilarginin (ADMA)) na preživljavanje primarnih AVF

Kod svih 176 bolesnika, prosečne vrednosti odabranih endotelnih faktora rasta, parametara endotelne disfunkcije i uremijskih toksina su bile:

- TGF- β : 38.1 \pm 27.7 pg/mL
- PDGF: 534 \pm 369 pg/mL
- ET-1: 0.30 \pm 0.16 pmol/L
- ADMA: 0.48 \pm 0.28 mcmmol/L

Od svih ispitanika, u trenutku određivanja odabranih markera (TGF- β , PDGF, endotelina-1, ADMA) njih 104 je kao aktuelni trajni vaskularni pristup za hemodijalizu imalo i dalje primarnu AVF. Od toga je 89 AVF (85.5%) bilo u levoj podlaktici, 3 (2.9%) u kubitalnom regionu leve ruke, 11 (10.6%) u desnoj podlaktici, a preostala 1 (1.0%) u kubitalnom regionu desne ruke. Tokom 18-mesečnog praćenja, kod njih 8 (7.7%) je primarna AVF prestala da funkcioniše. Tako su i bolesnici podeljeni u dve grupe: grupa I-bolesnici kod kojih je primarna AVF prestala da funkcioniše i grupa II-bolesnici kod kojih je primarna AVF funkcionisala i posle 18 meseci praćenja.

Osnovni podaci o bolesnicima u ove dve grupe predstavljeni su tabelama 21, 22 i 23. Statistički značajna razlika uočena je u srednjoj vrednosti trombocita koja je viša u grupi bolesnika kod kojih je došlo do prestanka funkcionisanja primarne AVF dok su srednje vrednosti iPTH i PDGF statistički značajno više u grupi bolesnika kod kojih je primarna AVF funkcionalna i nakon 18-mesečnog praćenja.

Tabela 21. Osnovni podaci o bolesnicima kojima je određivana serumska koncentracija TGF- β , ET1, PDGF i ADMA

Varijabla	Grupa I (No=8)	Grupa II (No=96)	p*
Pol, muški	6 (75%)	64 (66.7%)	1.000
Godine starosti	71 \pm 11	63 \pm 13	0.102
Osnovna dijagnoza			0.473
HTN	3 (37.5%)	40 (41.7%)	
DM	3 (37.5%)	13 (13.5%)	
ADPBB	1 (12.5%)	9 (9.4%)	
UA	0	9 (9.4%)	
HGN	0	11 (11.5%)	
NZ i ostalo	1 (12.5%)	14 (14.6%)	
Komorbidity (0/1/2/3)	0/2/6/0	17/40/34/5	0.148
HTA, da	7 (87.5%)	89 (92.7%)	0.485
DM, da	3 (37.5%)	18 (18.8%)	0.201
PVB, da	2 (25%)	8 (8.3%)	0.170
Dužina hemodijaliznog staža, meseci	80 \pm 54	71 \pm 75	0.237
Vrsta korišćene dijalize (LF/HF/HDF)	1/3/4	15/53/28	0.468
Trajanje jedne hemodijalizne sesije, sati	4.1 \pm 0.4	4.1 \pm 0.3	0.678
Kt/V	1.47 \pm 0.38	1.37 \pm 0.25	0.323

*prema χ^2 testu, Fisherovom exact testu, Studentovom t testu ili *Mann-Whitney* testu u zavisnosti od vrste podataka; HTN-hipertenzivna nefroangioskleroza; DM-dijabetes melitus; ADPBB-autozomno dominantna policistična bolest bubrega; UA-urološke abnormalnosti; HGN-hronični glomerulonefritis; NZ-nepoznato; PVB-periferna vaskularna bolest; LF-*low-flux*; HF-*high-flux*; HDF-hemodijafiltracija

Tabela 22. Podaci o korišćenoj terapiji kod bolesnika kojima je određivana serumska koncentracija TGF- β , ET1, PDGF i ADMA

Varijabla	Br (%) ili X \pm SD		p*
	Grupa I (No=8)	Grupa II (No=96)	
Statini, da	1 (12.5%)	22 (22.9%)	0.681
ACE inhibitori, da	4 (50%)	59 (61%)	0.709
ARB, da	1 (12.5%)	15 (15.6%)	1.000
ACE+ARB, da	0	11	
Kalcijumski antagonist, da	5 (62.5%)	39 (40.6%)	0.278
Vezivači fosfata, da	7 (87.5%)	76 (79.2%)	1.000
Broj korišćenih tbl. vezivača fosfata za godinu dana	1003 \pm 359	1304 \pm 464	0.127
Analozi vitamina D, da	4 (50%)	41 (42.7%)	0.724
Broj korišćenih tbl. vit. D od 0.25mcg za godinu dana	362 \pm 2	351 \pm 223	0.475
Antiagregansi, da	4 (50%)	58 (60.4%)	0.712
Vrsta antiagregansa			0.137
Acetilsalicilna kiselina	3	17	
Tiklopidin	0	21	
Klopidogrel	1	20	
Oralni antikoagulanasi, da	1 (12.5%)	8 (8.5%)	0.536
ASE preparat, da	8 (100%)	82 (85.4%)	0.594
Nedeljna doza ASE, i.j.	4375 \pm 1996	5679 \pm 3720	0.356

tbl.-tableta; vit.-vitamin; mcg-mikrogram; ASE-agens stimulacije eritropoeze; i.j.-internacionalna jedinica; *prema χ^2 testu, Fisherovom exact testu, Studentovom t testu ili *Mann-Whitney* testu u zavisnosti od vrste podataka

Tabela 23. Poređenje srednjih vrednosti određivanih laboratorijskih parametara kod bolesnika kojima je određivana serumska koncentracija TGF- β , ET1, PDGF i ADMA

Varijabla	Grupa I (No=8)	Grupa II (No=96)	p*
Hgb, g/dL	10.3 \pm 1.0	10.3 \pm 1.6	0.998
Trombociti, x10 ⁹ /L	233 \pm 53	193 \pm 61	0.046
Proteini, g/L	72 \pm 4	69 \pm 5	0.086
Albumini, g/L	37 \pm 2	37 \pm 3	0.971
Kalcijum, mmol/L	2.29 \pm 0.13	2.33 \pm 0.23	0.659
Fosfor, mmol/L	1.60 \pm 0.33	1.46 \pm 0.49	0.416
Holesterol, mmol/L	4.6 \pm 2.0	4.5 \pm 1.2	0.871
Trigliceridi, mmol/L	1.6 \pm 0.4	1.9 \pm 1.1	0.529
iPTH, pg/mL	48 \pm 40	227 \pm 286	0.007
Alkalna fosfataza, U/L	52 \pm 15	74 \pm 39	0.123
Natrijum, mmol/L	138 \pm 2	136 \pm 3	0.189
Kalijum, mmol/L	5.2 \pm 0.6	5.2 \pm 0.8	0.922
CRP, mg/L	5.3 \pm 3.7	9.5 \pm 14.1	0.817
TGF beta, pg/mL	40.62\pm25.10	38.99\pm27.44	0.702
ET1, pmol/L	0.31\pm0.17	0.29\pm0.17	0.737
ADMA, mcmol/L	0.43\pm0.24	0.49\pm0.28	0.537
PDGF, pg/mL	254.5\pm321.8	559.1\pm363.3	0.006

*prema Studentovom t testu ili ili *Mann-Whitney* testu u zavisnosti od vrste podataka

Hgb-hemoglobin; iPTH-intakt partathormon; CRP-C reaktivni protein; TGF beta- *transforming-growth* faktora-*beta*; ET1- *endothelin-1*; ADMA-asimetrični dimetil arginin; PDGF-*platlet-derived growth*-faktor

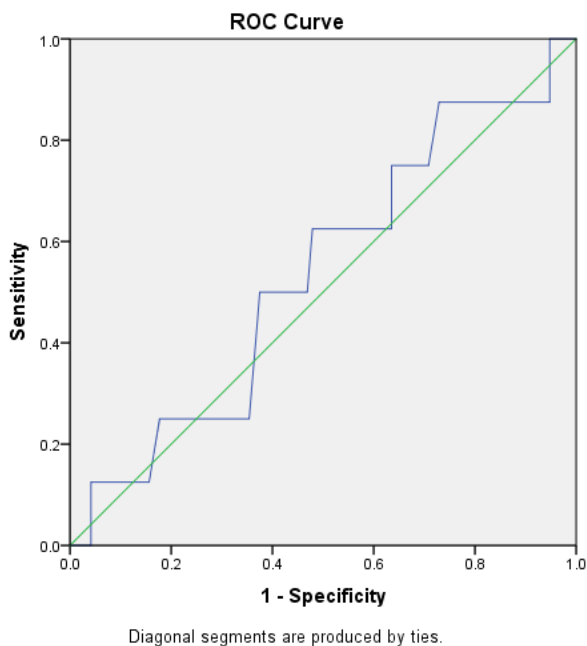
Korišćenjem *Cox proportional hazard* modela ispitivan je uticaj *transforming-growth* faktora-*beta* (TGF- β) i *endothelina-1* (ET-1) na prestanak funkcionisanja AVF, dok uticaj asimetričnog dimetil arginina (ADMA) i *platlet-derived growth*-faktora (PDGF) nije obzirom da su prosečne vrednosti ADMA i PDGF veće u grupi II. Relativni rizici i intervali poverenja korigovani za starost, pol, osnovno oboljenje, komorbiditet, dužinu korišćenja AVF pre određivanja serumskih koncentracija ispitivanih parametara ali i za vrednosti trombocita i iPTH koji su se statistički značajno

razlikovali u ispitivanim grupama predstavljeni su u tabeli 24. Iako bez statističke značajnosti, uočava se da jedinični porast vrednosti ET-1 88.3% povećava rizik za prestanak funkcionisanja AVF.

Tabela 24. *Cox proportional hazard* model analize uticaja ET-1 I TGF-beta na pojavu prestanka funkcionisanja AVF

Varijabla	HR	CI 95%	p
TGF-beta (pg/mL)	1.017	0.974-1.061	0.447
ET1 (pmol/L)	1.883	0.003-1097.331	0.846

Korišćenjem ROC analize određena je i *cut-off* vrednost endotelina-1 iznad koje se sa specifičnošću od 62.5% i senzitivnošću od 52.1% povećava rizik za prestanak funkcionisanja AVF i ta vrednost iznosi 0.230 (AUC 0.536; p=0.737; CI 95% 0.333-0.738-Slika 9).



Slika 9. ROC kriva-Endotelin 1

DISKUSIJA

Otkrića i kasnija usavršavanja dijaliznih procedura dovela su do razvoja savremenog hemodijaliznog lečenja koje omogućava da se veliki broj bolesnika kojima je neophodna zamena bubrežne funkcije leče sa sve manje komplikacija i sa sve manjim mortalitetom. Paralelno sa tehnološko-medicinskim razvojem hemodijalize, u svetu je rastao broj bolesnika sa TBS koji zahtevaju zamenu bubrežne funkcije. Ovaj porast je nastao kao posledica epidemije DM i HTA poslednjih decenija, a poznatao je da su ove dve bolesti najčešći uzročnici TBS (5). U Sjedinjenim Američkim Državama je broj bolesnika sa TBS od 1973. do 2013 porastao sa 10.000 na čak 660.000. (1). Podaci iz Srbije govore da je samo u 21. veku broj bolesnika sa TBS gotovo udvostručio od 2005. god. kada je bilo 3530 bolesnika do 2014. god. kada je bilo 5858 bolesnika koji su koristili neku metodu zamene bubrežne funkcije (2,4). Istovremeno, hemodijaliza je u SAD, Belgiji, Bosni i Hercegovini, Francuskoj, Grčkoj, Crnoj Gori, Srbiji, Rumuniji i nekim regijama Španije najčešće korišćeni vid zamene bubrežne funkcije (8,9).

Kvalitet hemodijalize kao metode zavisi od brojnih činilaca uključujući vrstu hemodijalizne procedure, opšte stanje bolesnika, ali pre svega zavisi od kvaliteta vaskularnog pristupa. Naime, kvalitetan vaskularni pristup je "*conditio sine qua non*" adekvatne dijalize jer omogućava priliv dovoljne količine krvi do hemodijaliznog filtera.

Stoga je uspešno kreiranje i dugotrajno preživljavanje AVF bilo predmet brojnih istraživanja. Obzirom da je hemodijaliza i dalje najzastupljeniji vid zamene bubrežne funkcije u Srbiji, ispitivanja u vezi sa vaskularnim pristupom su od posebnog značaja u naših bolesnika. Ovaj rad je zato pokušao da rasvetli neke aspekte koji potencijalno utiču na preživljavanje AVF, uključujući vaskularne kalcifikacije, genski polimorfizam pojedinih gena i izabrane markere endotelne disfunkcije.

Pokazano je da su za prestanak funkcionisanja AVF najodgovornije vaskularne kalcifikacije kako ukupne tako i lokalne u krvnim sudovima regije AVF što je prikazano Tabelama 9 i 13, kao i Slikama 4 i 5.

Pored AVF, AVG i dvolumenski CVK se mogu koristiti kao vaskularni pristupi za hemodijalizu. Parametri kvaliteta vaskularnih pristupa se mogu meriti na više načina: brojem komplikacija, dugovečnošću vaskularnog pristupa, mortalitetom bolesnika

shodno korišćenom vaskularnom pristupu, brojem hospitalizacija u vezi sa vaskularnim pristupom. Smatra se da je AVF najsigurniji, najdugotrajniji i vaskularni pristup sa najmanjim brojem komplikacija te da bi trebalo da bude prvi izbor vaskularnog pristupa kod svih bolesnika koji započinju hemodijalizni program (11-14). Studijom *Pastana i sar.* (15) ustanovljeno je da bolesnici koji kao vaskularni pristup imaju AVF imaju i manji mortalitet u odnosu na one koji koriste AVG ili CVK. Naime, ovom retrospektivno-prospektivnom analizom obuhvaćeno je preko 7000 bolesnika iz više hemodijaliznih Centara u SAD i praćena je njihova smrtnost u zavisnosti od vrste vaskularnog pristupa i ustanovljeno je da je mortalitet bolesnika koji su koristili CVK kao trajni vaskularni pristup bio 15.2%, kod onih koji su imali AVG 9.1%, a najmanji je kod bolesnika sa AVF-7.3%. Često se navode i rezultati CHOICE studije (16), koja je bila prospektivna i koja je obuhvatila 1041 incidentnog hemodijaliznog bolesnika u 79 dijaliznih Centara u više američkih država, a potom je praćena njihova smrtnost u naredne tri godine. Mortalitet bolesnika kod kojih se hemodijaliza obavljala preko vaskularnog katetera bio je 16.1%, kod bolesnika sa AVG 14.2%, a kod bolesnika sa AVF 11.7%. Kada se razmatra broj hospitalizacija, podaci iz Američkog registra bubrežnih bolesnika pokazuju da su nakon kardiovaskularnih razloga, komplikacije vezane za vaskularni pristup drugi najčešći uzrok indikacija za hospitalizaciju među bolesnicima na hemodijalizi (17). Ipak, dokazano je da su komplikacije AVF ređe nego drugih vaskularnih pristupa za hemodijalizu (151).

Od ovih parametara kvaliteta vaskularnog pristupa, mi smo ispitivali preživljavanje primarnih AVF kao i faktore rizika preživljavanja, a ne broj hospitalizacija i mortalitet bolesnika.

Istraživanje faktora koji utiču na dugoročno preživljavanje AVF posebno je značajno i uključuje brojne parametre: karakteristike bolesnika, markere procesa neointimalne hiperplazije, vaskularne kalcifikacije, genski polimorfizam pojedinih gena koji utiču na funkciju endotela.

Karakteristike bolesnika koji započinju hemodijalizu imaju uticaj i na preživljavanje njihovih AVF, ali rezultati istraživanja nisu uniformni. U našem istraživanju DM se pokazao kao faktor koji utiče na pojavu vaskularnih kalcifikacija za koje je dokazano da statistički značajno povećavaju rizik za prestanak funkcionisanja AVF. U drugim delovima našeg istraživanja dijabetes se nije izdvojio kao faktor koji

utiče na prestanak funkcionisanja primarnih AVF. U delimičnoj saglasnosti sa našim rezultatima su i oni *Salmele i sar.* (18), koji su sprovedli studiju u koju je bilo uključeno 218 bolesnika praćenih od 2.3 do 5.8 godina koji su ustanovili da prisustvo DM skraćuje preživljavanje AVF. Slične rezultate prezentovali su i *Rodriguez i sar.* (22) koji su 13 godina pratili 1033 trajna vaskularna pristupa za hemodijalizu sa zaključkom da je najbolji vaskularni pristup radiocefalična AVF, ali da dijabetičari imaju slabije preživljavanje vaskularnih pristupa. Drugačije zaključke donelo je istraživanje američkih autora *Sedlaceka i sar.* (19) sprovedeno na 195 bolesnika koje je bilo fokusirano na DM kao faktor rizika koji skraćuje preživljavanje AVF i gde negativan uticaj prisustva DM nije dokazan. Slične rezultate dobili su i *Fokou i sar.* (152) koji su pratili 518 AVF (mediana praćenja 275 dana) sa registrovanom pojavom 188 komplikacija kod kojih prisustvo dijabetesa nije imalo statistički značajan uticaj na pojavu komplikacija.

I u pogledu uticaja godina starosti na preživljavanje AVF rezultati istraživanja su kontradiktorni. U našem istraživanju, bolesnici kod kojih je došlo do prestanka funkcionisanja primarne AVF nisu bili statistički značajno stariji od onih kod kojih je AVF i dalje funkcionisala. U saglasnosti sa našim su i rezultati studije *Loka i sar.* (24) koji su minimum 6 meseci pratili preživljavanje 444 AVF (248 kod mlađih od 65 godina, a 196 kod starijih od 65 godina). Kako u posmatrane dve grupe nije bilo razlike u preživljavanju AVF zaključili su da godine ne bi trebale biti odlučujući faktor prilikom odluke da li bolesniku kreirati AVF. Nasuprot njima, *Rodriguez i sar.* (22) su dokazali da bolesnici stariji od 65 godina imaju kraće vreme preživljavanja AVF. Sličnog mišljenja su i *Tordoir i sar.* (25) koji savetuju da se kod starijih, zbog češće pojave kalcifikovanih krvnih sudova, ranije planira trajni vaskularni pristup i da bi brahiobazilična AVF bila dobra opcija obzirom na smanjenje lumena distalnih krvnih sudova, ali uz rizik za prolongiranu maturaciju AVF.

Kada se razmatra uticaj pola na preživljavanje AVF, našim istraživanjem je dokazano da bolesnici muškog pol imaju izraženije kalcifikacije, a samim tim i veći rizik za prestanak funkcionisanja AVF. Ipak, u suprotnosti sa našim rezultatima su oni prezentovani u studijama *Salmele i sar.* (18) i *Rodrigeza i sar.* (22) kod kojih je dokazano da kod osoba ženskog pola lošije preživljavaju AVF odnosno trajni vaskularni pristupi. *Asano i sar.* (30) takođe napominju da je rizik od prestanka funkcionisanja AVF

38% veći kod osoba ženskog pola u njihovih ispitivanoj populaciji sa preko 2000 bolesnika sa AVF. Takođe, rad *Loa i sar.* (32) koji su maksimalno 6 godina pratili 436 AVF ukazao je da muškarci imaju dvostruko bolje preživljavanje radio-cefalnih AVF u odnosu na žene.

Pored karakteristika bolesnika, veliku pažnju istraživača preživljavanja AVF privlači proces neointimalne hiperplazije koji je u osnovi nastanka stenozе i tromboze kao najčešćih komplikacija AVF. Proces neointimalne hiperplazije nastaje u venskom delu AVF nakon njenog kreiranja, a predstavlja fibro-muskularno zadebljanje zida krvnog suda usled migracije i proliferacije glatkomišićnih ćelija iz medije u intimu (49). Osnova ovog procesa je oštećenje endotelnih ćelija. Naime, u krvnim sudovima deluju dve hemodinamske sile: pritisak i trenje i obe se menjaju nakon kreiranja AVF obzirom da u venski krvni sud ulazi krv pod većim pritiskom nego inače, a istovremeno zbog novonastale anastomoze krv više ne protiče laminarno, već oscilatorno što povećava trenje (38,40,41,42). Ovakve promene hemodinamskih sila dovode do oštećenja endotelnih ćelija. Preostali načini oštećenja endotelnih ćelija su: direktno toksično delovanje nekih od uremijskih faktora (homocistein, ADMA); hipoksija izazvana ishemijom tokom kreiranja AVF i direktno oštećenje endotelnih ćelija prilikom ponavljanih punktiranja maturirane AVF. Oštećene endotelne ćelije proizvode inflamatorne medijatore koji aktiviraju agregaciju trombocita i privlače leukocite na oštećeno mesto, a istovremeno povećavaju ekspresiju faktora rasta koji dovode do migracije glatkomišićnih ćelija iz medije u intimu kao i njihove proliferacije (43). Ova proliferacija je praćena odlaganjem ekstracelularnog matriksa, slično kao kod stvaranja ožiljka (42,44). Posledica svih ovih događaja je formiranje neointimalne hiperplazije. I pre nego što se pristupi kreiranju AVF, odnosno pre nastanka opisanih načina oštećenja endotelnih ćelija, bolesnici sa TBS imaju povišene pojedine parametre inflamacije i oksidativnog stresa čime je proces neointimalne hiperplazije kasnije olakšan (45,66-70).

Kako u ovom složenom patofiziološkom procesu učestvuju brojni citikini, stoga je i ovaj rad uključio ispitivanje serumskih koncentracija *endotelina-1 (ET-1)*, *transforming-growth factor-beta (TGF-beta)*, *platelet-derived growth-factor (PDGF)* i asimetričnog-dimetilarginina (ADMA) na prestanak funkcionisanja primarne AVF.

U našem 18-mesečnom praćenju prestanka funkcionisanja AVF, nije dokazan statistički značajan uticaj porasta serumske koncentracije ET1 na prestanak

funkcionisanja primarne AVF, ali je pokazano da jedinični porast ET1 1.88 puta povećava rizik za prestanak funkcionisanja primarne AVF. Iako bez statističke značajnosti, kao cut-off vrednost iznad koje raste rizik za prestanak funkcionisanja AVF označena je serumska vrednost ET1 od 0.230 pmol/l. Inače, ET-1 je endotelni produkt i snažan je vazokonstriktor ali i značajan faktor koji vodi nastanku hipertenzije (153). *Wilkie i sar.* (154) su još 1992. god. dokazali da bolesnici na hemodijalizi imaju značajno veće serumske koncentracije ET1 u odnosu na zdravu populaciju, ali da bolesnici sa AVF imaju veću koncentraciju nego oni sa CVK. Kasnije je ispitivanjem *Weissa i sar.* (137) dokazano da u krvnim sudovima koji učestvuju u građi vaskularnog pristupa, a kod kojih je došlo do prestanka funkcionisanja istog, postoji izraženo nakupljanje ET1 u neointimi sa širenjem ka subintimalnim slojevima što se ne vidi u uzorcima krvnih sudova zdravih volontera. U njihovoj grupi bolesnika sa prestankom funkcionisanja vaskularnog pristupa bilo je bolesnika sa AVF, ali i sa AVG. Ispitivanje uticaja serumske koncentracije ET-1 na pojavu tromboze AVF do sada nije rađeno.

TGF-beta je citokin koga proizvode leukociti i učesnik je brojnih signalnih procesa među kojima je i kaskada neointimalne hiperplazije i formiranja tromba AVF (137,140,141). Naše istraživanje je pokazalo da se prosečna serumska koncentracija TGF-beta nije statistički značajno razlikovala između grupa bolesnika kod kojih je došlo/nije došlo do prestanka funkcionisanja primarne AVF nakon 18-mesečnog praćenja. Slične rezultate prezentovali su i *Stracke i sar.* (155) koji su sa jedne strane dokazali da postoji pojačana ekspresija TGF-beta u neointimi i mediji uzoraka krvnih sudova ruku bolesnika čiji je vaskularni pristup prestao da funkcioniše u poređenju sa uzorcima krvnih sudova uremičara koji nisu imali stenozu i zdravih volontera, ali su istovremeno merili i serumsku koncentraciju TGF-beta u pomenute tri grupe bolesnika i pronašli da nema statistički značajne razlike. Istraživanjem *Wanga i sar.* (143) sprovedenom na miševima, dokazano je da blokiranje aktiviranja *Notch* gena sprečava formiranje neointimalne hiperplazije. Kako je aktivator *Notch* gena TGF-beta, može se zaključiti da ovaj citokin svojim uticajem na stvaranje neointimalne hiperplazije utiče i na prestanak funkcionisanja AVF. Iako posredno, suprotno našim rezultatima su oni prezetnovani u studiji *Heinea i sar.* (156) u kojoj je ispitivano preživljavanje AVF u zavisnosti od polimorfizma gena za TGF-beta u dva kodona. Na osnovu razlika u ovim polimorfizmima, 120 bolesnika je raspoređeno u tri grupe: visoki, srednji i niski

proizvođači TGF-beta. Nakon trogodišnjeg praćenja statistički su najlošije preživljavale AVF u grupi bolesnika koji spadaju u visoke proizvođače TGF-beta. Slično *Strackeu i sar.* (155) i japanska grupa autora na čelu sa *Ikegayaom* (157) je dokazala pojačanu ekspresiju TGF-beta u uzorku stenotičnog dela krvnog suda kod 16 dijaliznih bolesnika kod kojih je AVF prestala da funkcioniše u poređenju sa drugim delovima krvnog suda. U korelaciji sa njihovim bili su i rezultati *Weissa i sar.* (137) koji su, pored ET-1, dokazali i pojačanu ekspresiju TGF-beta u neointimi i mediji krvnih sudova njihovih bolesnika koji su doživeli trombozu AVF u poređenju sa zdravim volonterima.

PDGF je jedan od faktora rasta, deponovan u alfa granulama trombocita i izlučuje se po njihovoj aktivaciji i značajan je u procesu angiogeneze (143). Povišena serumska koncentracija kod dijaliznih bolesnika u odnosu na zdrave volontere je pokazana, ali bez statističke značajnosti (158). U našem istraživanju PDGF je, paradoksalno, bio statistički značajno viši u grupi bolesnika kod kojih nije došlo do pojave prestanka funkcionisanja AVF. Ovo se može objasniti, pre svega, malim brojem događaja na osnovu kojeg su pacijenti podeljeni u grupe, kratkim vremenom praćenja, ali i samo jednokratnim uzimanjem krvi radi određivanja vrednosti serumskih koncentracija ispitivanih markera endotelne disfunkcije odnosno nepoznavanjem variranja vrednosti ovog markera tokom vremena. Uloga PDGF u procesu neointimalne hiperplazije i AVG i AVF je dokazana u poslednjoj deceniji prošlog veka (159). *Weiss i sar.* (137) su u svojoj seriji bolesnika dokazali njegovu pojačanu ekspresiju, kako u samoj neointimi tako i u neovaskulaturi koja je jedan od sastavnih delova neointimalne hiperplazije. Slične rezultate su predstavili i *Roy-Chaudhury i sar.* (160) u grupi od 11 bolesnika sa AVG. Najopsežnija studija vezana za uticaj PDGF u neointimalnoj hiperplaziji vezanoj za AVF objavljena je 2014.god, sprovedena je od strane grupe istraživača iz Barija. Naime, *Simone i sar.* (144) su prosečno 26 meseci pratili 45 bolesnika sa novokreiranom AVF i u period praćenja desilo se 10 prestanka funkcionisanja AVF, svi uzrokovani stenozom AVF. Uzorci krvnih sudova uzeti su svim bolesnicima na početku praćenja tj. prilikom kreiranja primarne AVF kao i u momentu reintervencije kada je za to bilo potrebe. Ispitivana je histološka ekspresija nekoliko faktora rasta uključujući i PDGF. Uočena je značajno povišena ekspresija receptora β za PDGF u uzorcima krvnih sudova AVF koje su prestale da funkcionišu u

odnosu na one uzete na početku studije. Ipak, do sada nije rađeno ispitivanje uticaja serumske koncentracije PDGF na prestanak funkcionisanja AVF.

Asimetrični dimetilarginin (ADMA) se normalno nalazi u plazmi i “konkurent” je L-argininu u produkciji NO, tako da povećane koncentracije ADMA negativno utiču na endotelnu funkciju tj. vazodilataciju. U našem istraživanju koje je podrazumevalo 18-mesečno praćenje funkcije 104 primarne AVF nije dokazano da je serumska koncentracija ADMA faktor rizika za prestanak funkcionisanja AVF. Njene koncentracije bile su veće u grupi bolesnika sa i dalje funkcionalnom AVF, ali bez statističke značajnosti. Razlog ovome se možda može naći, pored ranije navedenih limitirajućih strana studije (kratko vreme praćenja, mali broj događaja), u izvesnom broju bolesnika koji su umrli tokom trajanja studije ali sa funkcionalnom AVF. Naime, ADMA ima značajnu patofiziološku ulogu i u drugim vaskularnim oštećenjima kao što su cerebrovaskularna i kardiovaskularna te su možda povećane koncentracije ADMA u ovih bolesnika uticale da njena koncentracija bude veća u grupi sa funkcionalnom AVF (161,162). Još 1992. god. *Vallance i sar.* (163) su prezentovali rad u kome su serumske koncentracije ADMA značajno više kod bolesnika sa TBS u odnosu na zdravu populaciju i od tada ADMA spada u grupu uremijskih toksina. Do sada najveća studija koja je ispitivala uticaj serumske koncentracije ADMA na neki aspekt AVF je ona *Wua i sar.* (145) i donela je rezultate koji nisu u saglasnosti sa našim. Naime, ovom studijom praćen je uticaj ADMA serumske koncentracije na pojavu restenoze AVF nakon prethodne perkutane intervencije na fistuli. Ova grupa istraživača je pratila 100 AVF kojima je rađena perkutana intervencija i dokazali su da su ADMA koncentracije u trenutku intervencije značajno više u odnosu na 30 kontrolnih bolesnika na hemodijalizi. Šestomesečnim praćenjem 46 AVF je pokazalo znake disfunkcije, a kao nezavisni prediktor ovakvog stanja izdvojila se serumska koncentracija ADMA uz dijabetes i LDL holesterol. Ovi rezultati nisu u saglasnosti sa onim dobijenim našim ispitivanjem.

Kardiovaskularne kalcifikacije kod bolesnika sa hroničnom i terminalnom bubrežnom slabošću su veoma zastupljene i predstavljaju značajan prediktor kardiovaskularnog mortaliteta ovih bolesnika (110). Dve su vrste kalcifikacija koje nastaju kod ovih bolesnika: kalcifikacija medije arterijskih krvnih sudova (Mönckebergova skleroza) i ubrzana kalcifikacija intimalnih plakova. Nastanak

ekstraosealnih kalcifikacija kod bolesnika sa TBS objašnjava se poremećenom homeostazom promotera i inhibitora kalcifikacija (164). Dokazani su mnogobrojni promotori i inhibitori kalcifikacija. Promotori kalcifikacija su: BMP 2,4 i 6, osteokalcin, koštani sialoprotein, alkalna fosfataza, kalcijum i fosfat, oksidativni stress, inflamatorni citokini (IL6, IL1, TNF), dijabetes (hiperglikemija, AGE), izmenjeni lipidi i holesterol, derivati kumarina, matriksne vezikule/apoptozni derivati, MMP 2, 3 i 7, Run X2, Sox9, Osterix/Sp7. Inhibitori kalcifikacija su: Matirx Gla protein, osteopontin, osteoprotegerin, fetuin A, klotho, pirofosfat, karbo-anhidraza, BMP 7, vitamin K, magnezijum, natrijum-tiosulfat (110).

Određivanje prisustva vaskularnih kalcifikacija može se vršiti na više načina. Neki od njih obuhvataju pregled arterija ultrazvučnim B-modom (165), dok neki zahtevaju upotrebu kompjuterizovane tomografije i korišćenje Agatston skora (166, 167). Ovakva ispitivanja obuhvataju uglavnom jedan tip arterija (koronarne, karotidne, aortu..), zahtevaju skupu opremu uz izlaganje bolesnika značajnom zračenju. Stoga smo u našem istraživanju iskoristili jednostavan i najčešće korišćen kalcifikacioni skor koji je predložila Teresa Adragao (148) koji podrazumeva tri rentgenska snimka: RTG snimak obe šake i RTG snimak karlice sa kukovima gde se opisuje prisustvo linearnih kalcifikacija. Ovaj kalcifikacioni skor dopunjen je i rentgenskim snimkom podlaktice u kojem se nalazi AVF radi pronalaženja kalcifikacija u ularnoj arteriji, radijalnoj arteriji ili regiji anastomoze. Prednost ovakvog tipa određivanja ekstraosealnih kalcifikacija je u jednostavnosti, manjoj dozi zračenja, ispitivanju različitih arterijskih korita i manjoj ceni.

Patofiziološki, prisustvo kalcifikacija menja silu trenja koja deluje u krvnim sudovima AVF, što dovodi do oštećenja endotelnih ćelija i pokretanja kaskade formiranja neointimalne hipeplazije (168). Međutim, ispitivanja uticaja vaskularnih kalcifikacija na preživljavanje AVF nisu često sprovedena, pogotovo ne na dugotrajno preživljavanje AVF. U prvom delu našeg ispitivanja uticaja ukupnog kalcifikacionog skora na preživljavanje AVF uz prilagođavanje za pol, prisustvo DM, korišćenje AVF pre određivanja prisustva kalcifikacija, protok krvi kroz AVF i iPTH, pokazano je da bolesnici sa srednje izraženim ukupnim kalcifikacionim skorom imaju povećan rizik za prestanak funkcionisanja AVF, ali bez statističke značajnosti (HR 3.82, 95% interval poverenja 1.10-13.23; p=0.055), dok bolesnici sa najizraženijim ukupnim

kalcifikacionim skorom imaju statistički značajno veći rizik za prestanak funkcionisanja AVF (HR 4.65, 95% interval poverenja 0.97-22.38; $p=0.035$). Kako određivanje ukupnog kalcifikacionog skora podrazumeva 4 rentgenska snimka, pokušali smo da pronađemo pristupačniju metodu koja bi bila jednostavnija, a precizna u smislu utvrđivanja rizika prisustva kalcifikacija na preživljavanje primarnih AVF. Tako je pokazano da snimak podlaktice u kojoj se nalazi AVF i nalaz linearnih kalcifikacija u ularnoj, radijalnoj ili regiji anastomoze uz prilagođavanje za varijable koje su pokazane da imaju uticaj na nastanak kalcifikacija u krvnim sudovima regije AVF, predstavlja statistički značajan rizik za prestanak funkcionisanja AVF-*hazard rate* (HR) je 3.42 (95% interval poverenja 1.00-11.67; $p=0.049$). Poredeći rezultate našeg ispitivanja sa drugim, slične rezultate prikazali su *Choi i sar.* (169) koji su pratili 114 incidentnih hemodijalznih bolesnika i kojima je prilikom kreiranja AVF uziman uzorak krvnog suda za određivanje prisustva mikrokalifikacija. Nakon jednogodišnjeg praćenja zaključili su da su AVF u grupi bolesnika sa prisutnim mikrokalifikacijama imale značajno lošije preživljavanje od onih koji nisu imali mikrokalifikacije. Sličnu studiju sprovedli su *Allon i sar.* (170) na 127 bolesnika sa zaključkom da prisustvo mikrokalifikacija nema uticaja na maturaciju AVF, pojavu stenozе i na vreme do prve intervencije. Razlika u rezultatima između ovog i našeg istraživanja bi se mogla pronaći u tome što je studija istraživača iz Alabame bila fokusirana na kratkoročne događaje vezane za funkciju AVF. *Georgiadis i sar.* (171) su, slično našem istraživanju, prisustvo kalcifikacija određivali rentgenskim snimkom podlaktice na kojoj se planira kreiranje AVF. U njihovo ispitivanje uključeno je 72 bolesnika sa TBS i DM. Nakon četvorogodišnjeg praćenja, zaključili su da je preživljavanje AVF statistički niže u grupi koja je imala kalcifikacije pre kreiranja AVF što je sličan zaključak našem. Ipak, razlika našeg i istraživanja autora iz Grčke je u tome što su oni uključili samo bolesnike sa DM i incidentne bolesnike dok je naše istraživanje obuhvatilo prevalentne bolesnike od kojih je njih 10% imalo DM. U radu Tajvanskih autora (172) kao surogat sistemskih kalcifikacija korišćeno je prisustvo kalcifikacija luka aorte na rentgenskom snimku pluća. Na osnovu njega stepen kalcifikacija je gradiran od 0-3. U studiju su uključeni incidentni bolesnici kojima je kreirana AVF, a potom je trajanje fistule praćeno maksimalno 7 godina. Rezultati njihovog istraživanja su u saglasnosti sa našim tj. kao nezavisni faktori rizika prestanka funkcionisanja primarnih AVF izdvojili su se stepen

kalcifikacija aortnog luka gradiran kao 3 i visok nivo iPTH. Poređenjem ovih pet istraživanja, među našim bolesnicima je čak kod 62% potvrđeno prisustvo kalcifikacija u krvnim sudovima AVF regije. U studiji Tajvanskih autora procenat bolesnika sa prisutnim kalcifikacijama luka aorte je i veći (79%) što je značajno više nego kod ostalih autora (*Choi i sar* 38%; *Allon i sar.* 40%; *Georgiadis i sar.* 54%). Objašnjenje se može naći u ispitivanoj populaciji. Naime, mi smo obuhvatili prevalentne bolesnike na hemodijalizi, dok su ostali istraživači ispitivanje sprovedli na incidentnim bolesnicima, a poznata je činjenica da proces kalcifikacije napreduje kako raste dijalizni staž (173). Istovremeno, primetno je da je procenat bolesnika sa kalcifikacijama u istraživanjima koji su koristili radiografiju za dokazivanje kalcifikacija viši nego u onima gde je korišćeno dokazivanje mikrokalcifikacija u uzorku krvnog suda. Takođe je vredno napomenuti da su u Srbiji dostupni samo kalcijumski vezivači fosfata koji se neretko koriste i u dozama većim od preoručenih.

Obzirom da endotel ima centralnu ulogu u nastanku neointimalne hiperplazije što posledično vodi stenozu i trombozi, a samim tim i preživljavanju AVF, ispitivan je uticaj genskih polimorfizama pojedinih gena koji utiču na funkciju endotela na preživljavanje AVF. Jedan od najčešće analiziranih je polimorfizam u genu koji kodira osnovne komponente RAS-a i to I/D polimorfizam u genu za angiotenzin I konvertujući enzim (ACE). Rezultati našeg ispitivanja nisu pokazala razliku u distribuciji I/D polimorfizma u grupama bolesnika koji su doživeli trombozu primarne AVF i koji u trenutku genotipizacije i dalje imaju funkcionalnu primarnu AVF. Slične rezultate predstavili su turski autori *Sener i sar.* (129) kod kojih je takođe ispitivana distribucija I/D polimorfizma u tri grupe bolesnika: 47 hemodijaliznih bolesnika koji su doživeli trombozu AVF, 51 hemodijaliznih bolesnik koji nisu imali trombozu AVF i 40 zdravih osoba. Zaključak njihovog ispitivanja je bio da nema statistički značajne razlike u distribuciji I/D polimorfizma u genu za ACE među ove tri grupe bolesnika. Iako se ne može porediti sa našim istraživanjem obzirom da se studija bavila pojavom tromboze u AVG femoralne lokalizacije, vredno je pomena da su *Isbir i sar.* (130) dokazali da su bolesnici koji su heterozigoti u genu za I/D polimorfizam kasnijim prospektivnim praćenjem doživeli najveći broj tromboza AVG. Rad *Heinea i sar.* (131) je ispitivao 137 bolesnika kojima je kreirana primarna AVF, a potom je praćen prestanak funkcionisanja istih. Raspored distribucija genotipova je komparabilan sa našim istraživanjem (37%

DD, 49% ID i 14% II-*Heine i sar.* vs 35% DD, 55% ID, 10% II u našem istraživanju), a tokom praćenja oni su registrovali 70 prestanaka funkcionisanja AVF. Kao i u našem istraživanju, ni kod njih nije pronađena statistički značajna razlika u distribuciji polimorfizama, ali je 12-mesečno i 24-mesečno praćenje ukazalo da je najbolje preživljavanje AVF bilo kod bolesnika koji su II homozigoti. Suprotno od njihovog istraživanja, kod naših bolesnika najlošije 5-godišnje i 10-godišnje preživljavanje primarnih AVF je bilo upravo u grupi II homozigota, dok je 12-mesečno preživljavanje bilo gotovo jednako kod svih polimorfizama. Ipak, potpuno poređenje našeg istraživanja i istraživanja Nemačkih naučnika nije moguće obzirom da je njihovo ispitivanje bilo prospektivno, a naše retrospektivno. Slično našem ispitivanju u kome je pokazano da prisustvo D alela ima zaštitnu ulogu na preživljavanje primarnih AVF, rad *Moona i sar.* (132) je praćenjem 58-mesečnog preživljavanja primarnih AVF kod 155 bolesnika, potvrdio da AVF kod bolesnika koji su DD homozigoti statistički značajno bolje preživljavaju u odnosu na one koji su II homozigoti kao i heterozigoti.

Endotelne matriksne metaloproteinaze (MMP) pored toga što su značajan regulator kardiovaskularnog tonusa na nivou samih krvnih sudova, predstavljaju i medijatore u procesu neointimalne hiperplazije. Često je ispitivan polimorfizam u genu za MMP 3 (6A/5A) i u studiji *Lina i sar.* (134) sa preko 500 hemodijaliznih bolesnika, 6A/6A polimorfizam je bio značajno više zastupljen od preostala dva genotipa među bolesnicima koji su imali trombozu AVF. Suprotno njihovom istraživanju, naše je pokazalo da AVF kod bolesnika koji imaju 6A alel, a pogotovu kod 6A/6A homozigota bolje preživljavaju, ali bez statističke značajnosti. Najveća razlika našeg i istraživanja Tajvanskih autora je u broju bolesnika, ali i konceptu studije obzirom da su oni pratili samo pojavu tromboze, dok im dužina korišćenja AVF nije bila cilj istraživanja. Drugih studija koje ispituju uticaj ovog polimorfizma na preživljavanje AVF nije bilo.

Azot monoksid (NO) kao potentan vazodilatator koga proizvode endotelijalne ćelije procesom koga katališe endotelna azot-oksida sintaza (eNOS) mogao bi imati uticaj i na preživljavanje AVF. Jedino do sada objavljeno ispitivanje je sprovedeno od strane *Leeja i sar.* (136) u kome je retrospektivno ispitivan uticaj različitih polimorfizama u genu za eNOS i nijedan nije pokazao uticaj na pojavu tromboze AVF. Ipak, do sada ni jedan rad nije ispitivao uticaj G/T polimorfizma u genu za eNOS na preživljavanje AVF. Naše istraživanje je pokazalo, da iako bez statističke značajnosti,

procentualno najbolje preživljavanje imaju AVF kod bolesnika koji su homozigoti za G alal, a da prisustvo T alela 1.57 puta povećava rizik za prestanak funkcionisanja primarne AVF.

Postoje i brojni drugi faktori koji bi mogli uticati na preživljavanje AVF (ranije prisustvo CVK, intervencije na AVF pre maturacije, gojaznost, kardiovaskularni morbiditet, poremećaji koagulacije, intradijalizna hipotenzija) koji nisu bili obuhvaćeni našim ispitivanjem. Ipak, ni o uticaju ovih karakteristika bolesnika na dugoročno preživljavanje AVF nema jedinstvenog mišljenja. Istraživanje *Ravanija i sar.* (29) na 535 bolesnika sa primarnom AVF koji su praćeni prosečno 42 meseca otkrilo je da prisustvo kardiovaskularne bolesti, kratko vreme maturacije AVF (ispod 15 dana) i korišćenje CVK pri započinjanju hemodijalize predstavljaju faktore koji povećavaju rizik za lošije preživljavanje AVF. Studija *Asuna i sar.* (30) u koju je uključeno preko 2000 bolesnika sa AVF ističe da je jedino prethodno korišćenje CVK nezavisni faktor koji nepovoljno utiče na dugoročno preživljavanje AVF. *Lee i sar.* (31) sproveli su trogodišnje ispitivanje 173 AVF kojim su jedino intervencije na AVF pre maturacije nezavisno uticale na preživljavanje AVF dok pol, starost preko 65 godina, rasa, prisustvo dijabetesa, prisustvo periferne vaskularne bolesti, lokalizacija AVF i morbidna gojaznost nisu imali uticaj na preživljavanje AVF. Istraživanje autora iz Mičigena koji su maksimalno 6 godina pratili 165 AVF koje su bile ili radiocefalične ili brahiobazilicne ne pronalazi ni jedan nezavisni faktor (starost, BMI, pol, prisustvo DM, prisustvo HTA, hiperlipidemija) uticaja na preživljavanje AVF (33). Kada je u pitanju intradijalizna hipotenzija, dokazan je njen nedvosmisleni uticaj na nastanak tromboze AVF, a samim tim i na preživljavanje AVF. Kao primer se može navesti post-hoc analiza podataka 1426 bolesnika koji su učestvovali u HEMO studiji i koji su praćeni prosečno 3.1 godinu. Naime, *Chang i sar.* (34) su ove bolesnike podelili u kvartile shodno stepenu intradijalizne hipotenzije i dokazali da bolesnici sa najizraženijom intradijalznom hipotenzijom imaju 2.45 puta veći rizik za pojavu tromboze AVF. Kako je intradijalizna hipotenzija jedna od najčešćih komplikacija dijalize, napredak same dijalizne procedure, biotehnoško usavršavanje dijalizatora i preciznija kontrola ultrafiltracije dovela je do smanjenja pojave intradijalizne hipotenzije kod većine, ali ne i kod onih bolesnika kod kojih je interdijalizni prinos i dalje veliki (174).

Naše ispitivanje ima svojih nedostataka. Analiza prevalentnih bolesnika daje manje pouzdane podatke od analize incidentnih bolesnika. Iako se deo rezultata odnosi na retrospektivnu analizu funkcionisanja AVF, to se može tolerisati imajući u vidu da su u tom delu rada ispitivani genski polimorfizmi, prisutni od rođenja što je analogno prospektivnom praćenju. Takođe, deo rada koji se odnosi na markere endotelne disfunkcije je sproveden u vremenskom intervalu od 18 meseci tokom kog perioda se desilo svega 8 tromboza primarnih AVF što predstavlja malu statističku grupu. Uz to, jedokratno praćenje serumskih markera je manje pouzdano od višekratnog, ali ni drugi autori nisu sugerisali ponavljanje analiza. Ipak, i pored ovih nedostataka ovako opsežno ispitivanje dovelo je do značajnih rezultata koji bi se daljim praćenjem i istraživanjem mogli poboljšati na većoj populaciji bolesnika i u dužem vremenskom periodu praćenja.

ZAKLJUČCI

Ovo ispitivanje vezano za preživljavanje primarnih AVF je obuhvatilo vaskularne kalcifikacije, polimorfizam određenih gena koji učestvuju u funkciji endotela i pojedine makere endotelne disfunkcije koji su učesnici procesa neointimalne hiperplazije. Sprovedenim ispitivanjem dokazano je da:

1. Linearna multivarijantna regresiona analiza je pokazala da su faktori rizika za povećavanje ukupnog kalcifikacionog skora: muški pol, prisustvo DM, dužina korišćenja AVF pre određivanja kalcifikacija, brzina protoka krvi kroz AVF i vrednosti iPTH
2. Bolesnici sa srednje izraženim ukupnim kalcifikacionim skorom (skor 4 do 7) imaju povećan rizik za prestanak funkcionisanja AVF, na granici statističke značajnosti (HR 3.82, 95% interval poverenja 1.10-13.23; $p=0.055$), dok bolesnici sa najizraženijim ukupnim kalcifikacionim skorom (skor 8 do 11) imaju statistički značajno veći rizik za prestanak funkcionisanja AVF (HR 4.65, 95% interval poverenja 0.97-22.38; $p=0.035$).
3. Binarna multivarijantna regresiona analiza je pokazala da su faktori rizika za pojavu kalcifikacija u krvnim sudovima regije AVF bili muški pol, prisustvo DM i dužina korišćenja AVF
4. Bolesnici sa kalcifikacijama u krvnim sudovima regije AVF imaju statistički povećan rizik za prestanak funkcionisanja AVF (HR 3.42, 95% interval poverenja 1.00-11.67; $p=0.049$).
5. Distribucija ACE, MMP3 i eNOS genskog polimorfizma se nije značajno razlikovala između bolesnika sa funkcionalnom primarnom AVF i bolesnika sa tromboziranom primarnom AVF
6. Iako bez statističke značajnosti, bolesnici sa pristnim D alelom u genu za ACE imali su za 15% manji rizik, dok su bolesnici sa prisutnim 5A alelom u genu za MMP3 i T alelom u genu za eNOS imali 1.96 odnosno 1.57 puta povećan rizik za prestanak funkcionisanja primarne AVF.
7. Od ispitivanih markera endotelne disfunkcije, povećanje serumske koncentracije ET-1 i TGF-beta vodi porastu rizika za prestanak funkcionisanja primarne AVF, ali bez statističke značajnosti.

8. Prikazani rezultati ukazuju na značaj prevencije i eventualnog lečenja vaskularnih kalcifikacija imajući u vidu da je to bio najznačajniji faktor koji je uticao na preživljavanje primarnih AVF

LITERATURA

1. United States Renal Data System. USRDS 2013 Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States. National Institutes of Health; National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD 2013.
2. Special analyses, USRDS ESRD Database.
3. Djukanović L, Aksić-Miličević B, Antić M, et al. Epidemiology of end-stage renal disease and hemodialysis treatment in Serbia at the turn of the millennium. *Hemodial Int.* 2012 Oct;16(4):517-25.
4. Godišnji izveštaj Udruženja nefrologa Srbije za 2014.
5. United Nations. Probabilistic Population Projections based on the World Population Prospects.: The 2015 Revision. Population Division. DESA. <http://esa.un.org/unpd/ppp>
6. WHO. Diabetes Fact sheet. Reviewed November 2016. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>
7. WHO. Raised blood pressure. Situation and trends. http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/blood_pressure_prevalence_text/en/
8. United States Renal Data Service 2015 Annual Data Report.
9. Annual report 2014. ERA EDTA Registry. <https://www.era-edta-reg.org/files/annualreports/pdf/AnnRep2014.pdf>
10. Vanholder R, Ringoir S. Vascular access for hemodialysis. *Artif Organs* 1994; 18(4):263-5.
11. Clinical practice guidelines vascular access for haemodialysis. UK renal association 5th edition, 2008-2011 final version (5.01.11) <http://www.renal.org/guidelines/modules/vascular-access-for-haemodialysis#sthash.TPmyndRS.dpbs>
12. VAS Guidelines. <http://www.vascularaccesssociety.com/intro/guidelines>
13. Tordoir J, Canaud B, Haage P. EBPG on vascular access. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22: Sii88-Sii117 (suppl 2).

14. Clinical practice guidelines for vascular access
http://www2.kidney.org/professionals/KDOQI/guideline_upHD_PD_VA
15. Pastan S, Soucie JM, McClellan WM. Vascular access and increased risk of death among hemodialysis patients. *Kidney Int* 2002; 62:620-26.
16. Astor BC, Eustace JA, Powe NR, Klag MJ, Fink NE, Coresh J; CHOICE Study. Type of vascular access and survival among incident hemodialysis patients: the Choices for Healthy Outcomes in Caring for ESRD (CHOICE) Study. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16(5):1449-55.
17. US Renal Data System Data Base 2016.
<https://www.usrds.org/2016/view/Default.aspx>
18. Salmela B, Hartman J, Peltonen S, Alback A, Lassila R. Thrombophilia and arteriovenous fistula survival in ESRD. *Clin J Am Soc Nephrol* 2013; 8:962e8.
19. Sedlacek M, Teodorescu V, Falk A, Vassalotti JA, Uribarri J. Hemodialysis access placement with preoperative noninvasive vascular mapping: comparison between patients with and without diabetes. *Am J Kidney Dis* 2001; 38:560e4.
20. Allon M, Litovsky S, Young CJ, Deierhoi MH, Goodman J, Hanaway M, et al. Medial fibrosis, vascular calcification, intimal hyperplasia, and arteriovenous fistula maturation. *Am J Kidney Dis* 2011; 58:437e43.
21. Peterson WJ, Barker J, Allon M. Disparities in fistula maturation persist despite preoperative vascular mapping. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3:437e41.
22. Rodriguez JA, Armadans L, Ferrer E, Olmos A, Codina S, Bartolome J, et al. The function of permanent vascular access. *Nephrol Dial Transpl Off Publ Eur Dial Transpl Assoc Eur Ren Assoc* 2000;15:402e8.
23. Feldman HI, Joffe M, Rosas SE, Burns JE, Knauss J, Brayman K. Predictors of successful arteriovenous fistula maturation. *Am J Kidney Dis* 2003; 42:1000e12
24. Lok CE, Oliver MJ, Su J, Bhola C, Hannigan N, Jassal SV. Arteriovenous fistula outcomes in the era of the elderly dialysis population. *Kidney Int* 2005; 67:2462e9.

25. Tordoir JH, Bode AS, van Loon MM. Preferred strategy for hemodialysis access creation in elderly patients. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2015; 49:738e43.
26. Jemcov TK. Morphologic and functional vessels characteristics assessed by ultrasonography for prediction of radiocephalic fistula maturation. *J Vasc Access* 2013. *J Vasc Access*. 2013;14(4):356-63
27. Bashar K, Zafar A, Elsheikh S, Healy DA, Clarke-Moloney M, Casserly L, et al. Predictive parameters of arteriovenous fistula functional maturation in a population of patients with end-stage renal disease. *PLoS One* 2015; 10:e0119958
28. Khavanin Zadeh M, Gholipour F, Naderpour Z, Porfakharan M. Relationship between vessel diameter and time to maturation of arteriovenous fistula for hemodialysis access. *Int J Nephrol* 2012; 2012:942950
29. Ravani P, Brunori G, Mandolfo S, Cancarini G, Imbasciati E, Marcelli D, Malberti F. Cardiovascular comorbidity and late referral impact arteriovenous fistula survival: a prospective multicenter study. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Jan; 15(1):204-9.
30. Asano M, Thumma J, Oguchi K, Pisoni RL, Akizawa T, Akiba T, Fukuhara S, Kurokawa K, Ethier J, Saran R, Saito A; J-DOPPS Research Group. Vascular access care and treatment practices associated with outcomes of arteriovenous fistula: international comparisons from the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study. *Nephron Clin Pract*. 2013; 124(1-2):23-30.
31. Lee T, Ullah A, Allon M, Succop P, El-Khatib M, Munda R, et al. Decreased cumulative access survival in arteriovenous fistulas requiring interventions to promote maturation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011; 6:575e81.
32. Joseph Lo Z, Tay WM, Lee Q, Chua JL, Tan GW, Chandrasekar S, Narayanan S. Predictors of radio-cephalic arteriovenous fistulae patency in an Asian population. *J Vasc Access*. 2016; 17(5):411-416.

33. Korepta LM, Watson JJ, Elder EA, Davis AT, Mansour MA, Chambers CM, Cuff RF, Wong PY. Outcomes for forearm and upper arm arteriovenous fistula creation with the transposition technique. *J Vasc Surg.* 2016; 63(3):764-71.
34. Chang TI, Paik J, Greene T, et al. Intradialytic hypotension and vascular access thrombosis. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22:1526–1533.
35. Puskar D, Pasini J, Savić I, Bedalov G, Sonicki Z. Survival of primary arteriovenous fistula in 463 patients on chronic hemodialysis. *Croat Med J.* 2002; 43(3):306-11.
36. Weiss MF, Scivittaro V, Anderson JM. Oxidative stress and increased expression of growth factors in lesions of failed hemodialysis access. *Am J Kidney Dis.* 2001; 37(5):970-80.
37. Remuzzi A, Ene-Iordache B. Novel paradigms for dialysis vascular access: Upstream hemodynamics and vascular remodeling in dialysis access stenosis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2013; 29:1–8.
38. Davies PF, Barbee KA, Volin MV. Spatial relationships in early signaling events of flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Annu Rev Physiol.* 1997; 59:527–49.
39. Chien S. Role of shear stress direction in endothelial mechanotransduction. *Mol Cell Biomech.* 2008; 5:1–8.
40. Cheng C, Tempel D, van Haperen R et al. Atherosclerotic lesion size and vulnerability are determined by patterns of fluid shear stress. *Circulation* 2006; 113:2744–53
41. Sukhatme VP, Cheung AK. Hemodialysis vascular access dysfunction: A cellular and molecular viewpoint. *J Am Soc Nephrol.* 2006; 17:1112–27
42. Badero OJ, Salifu MO, Wasse H, Work J. Frequency of swingsegment stenosis in referred dialysis patients with angiographically documented lesions. *Am J Kidney Dis.* 2008; 51:93–8
43. Chiu JJ, Chien S. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiol Rev* 2011; 91:327–387

44. Haruguchi H, Teraoka S. Intimal hyperplasia and hemodynamic factors in arterial bypass and arteriovenous grafts: a review. *J Artif Organs* 2003; 6:227–235
45. Lee T, Chauhan V, Krishnamoorthy M, Wang Y, Arend L, Mistry MJ, El-Khatib M, Banerjee R, Munda R, Roy-Chaudhury P. Severe venous neointimal hyperplasia prior to dialysis access surgery. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26:2264–2270
46. Roy-Chaudhury P, Arend L, Zhang J, Krishnamoorthy M, Wang Y, Banerjee R, Samaha A, Munda R. Neointimal hyperplasia in early arteriovenous fistula failure. *Am J Kidney Dis* 2007; 50:782–790
47. Roy-Chaudhury P, Wang Y, Krishnamoorthy M, Zhang J, Banerjee R, Munda R, Heffelfinger S, Arend L. Cellular phenotypes in human stenotic lesions from haemodialysis vascular access. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24:2786–2791
48. Majesky MW, Dong XR, Hoggund V, Daum G, Mahoney WM., Jr. The adventitia: a progenitor cell niche for the vessel wall. *Cells Tissues Organs* 2012; 195:73–81
49. Mitra AK, Gangahar DM, Agrawal DK. Cellular, molecular and immunological mechanisms in the pathophysiology of vein graft intimal hyperplasia. *Immunol Cell Biol* 2006; 84:115–124
50. Brahmabhatt A, NievesTorres E, YangB, et al. The role of Icx-1 in the pathogenesis of venous neointimal hyperplasia associated with hemodialysis arteriovenous fistula. *PLoS ONE* 2014; 9(7):e102542
51. Misra S, Shergill U, Yang B, Janardhanan R, Misra KD. Increased expression of HIF-1 alpha, VEGF-A and its receptors, MMP-2, TIMP1, and ADAMTS-1 at the venous stenosis of arteriovenous fistula in a mouse model with renal insufficiency. *J Vasc Interv Radiol* 2010; 21(8):1255–1261
52. Wan J, Lata C, Santilli A, Green D, Roy S, Santilli S. Supplemental oxygen reverses hypoxia-induced smooth muscle cell proliferation by modulating HIF-alpha and VEGF levels in a rabbit arteriovenous fistula model. *Ann Vasc Surg* 2014; 28(3):725–736

53. Ohtani K, Egashira K, Hiasa K, et al. Blockade of vascular endothelial growth factor suppresses experimental restenosis after intraluminal injury by inhibit ingrecruitmentof monocyte line age cells. *Circulation* 2004; 110(16):2444–2452
54. Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem Mol Biol* 2006; 39(5):469–478
55. Huusko J, Merentie M, Dijkstra MH, et al. The effects of VEGF-R1 andVEGF-R2ligandsonangiogenicresponsesandleft ventricular function in mice. *Cardiovasc Res* 2010; 86(1):122–130
56. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(10):721–732
57. Fragoso A, Silva AP, Gundlach K, Büche IJ, NevesPL. Magnesium and FGF-23 are independent predictors of pulse pressure in predialysis diabetic chronic kidney disease patients. *Clin Kidney J* 2014; 7(2):161–166
58. Simone S, Loverre A, Cariello M, et al. Arteriovenous fistula stenosis in hemodialysis patients is characterized byan increased adventitial fibrosis. *J Nephrol* 2014; 27(5):555–562
59. Yang B, Janardhanan R, Vohra P, et al. Adventitial transduction of lentivirus-shRNA-VEGF-Ainarteriovenousfistulareducesvenous stenosis formation. *Kidney Int* 2014; 85(2):289–306
60. Veillat V, Carli C, Metz CN, Al-Abed Y, Naccache PH, Akoum A. Macrophage migration inhibitory factor elicits an angiogenic phenotype in human ectopic endometrial cells and triggers the production of major angiogenic factors via CD44, CD74, and MAPK signaling pathways. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(12):E403–E412
61. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res* 2009; 29(6):313–326
62. Durante W, Lin C-C. HOming in on arteriovenous fistula survival. *Kidney Int* 2008; 74(1):9–11

63. Juncos JP, Tracz MJ, Croatt AJ, et al. Genetic deficiency of heme oxygenase-1 impairs functionality and form of an arteriovenous fistula in the mouse. *Kidney Int* 2008; 74(1):47–5
64. Kang L, Grande JP, Farrugia G, Croatt AJ, Katusic ZS, Nath KA. Functioning of an arteriovenous fistula requires hemeoxygenase 2. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013; 305(4):F545–F55
65. Huijbregts HJT, Bots ML, Wittens CHA, Schrama YC, Moll FL, Blankestijn PJ; CIMINO Study Group. Hemodialysis arteriovenous fistula patency revisited: results of a prospective, multicenter initiative. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3(3):714–719
66. Kokubo T, Ishikawa N, Uchida H, et al. CKD accelerates development of neointimal hyperplasia in arteriovenous fistulas. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20(6):1236–1245 1
67. Yang B, Vohra PK, Janardhanan R, Misra KD, Misra S. Expression of profibrotic genes in a murine remnant kidney model. *J Vasc Interv Radiol* 2011; 22(12):1765–72.e1 16
68. Liang A, Wang Y, Han G, Truong L, Cheng J. Chronic kidney disease accelerates endothelial barrier dysfunction in a mouse model of an arteriovenous fistula. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013; 304(12): F1413–F1420
69. Granata S, Zaza G, Simone S, et al. Mitochondrial dysregulation and oxidative stress in patients with chronic kidney disease. *BMC Genomics* 2009; 10:388
70. Font R, Prats M, Gutiérrez C, et al. Is there a relationship between cystatin C and inflammatory status, oxidative stress and other cardiovascular risk factors in non-diabetic patients with chronic kidney disease? *Nefrologia* 2009; 29(3):228–235
71. Morris ST, McMurray JJ, Rodger RS, Jardine AG. Impaired endothelium-dependent vasodilatation in uraemia. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15:1194-1200.
72. Stolic R. Most important chronic complications of arteriovenous fistulas for hemodialysis. *Med Princ Pract.* 2013; 22(3):220-8.

73. Van Tricht I, De Wachter D, Tordoir J, Verdonck P. Hemodynamics and complications encountered with arteriovenous fistulas and grafts as vascular access for hemodialysis: a review. *Ann Biomed Eng* 2005; 9:1142-1157.
74. Saeed F, Kousar N, Sinnakirouchenan R, Ramalingam VS, Johnson PB, Holley JL. Blood loss through AV fistula: a case report and literature review. *Int J Nephrol*. 2011; 350870.
75. Dember LM, Beck GJ, Allon M, Delmez JA, Dixon BS, Greenberg A, Himmelfarb J, Vazquez MA, Gassman JJ, Greene T, Radeva MK, Braden GL, Ikizler TA, Rocco MV, Davidson IJ, Kaufman JS, Meyers CM, Kusek JW, Feldman HI, Dialysis Access Consortium Study Group. Effect of clopidogrel on early failure of arteriovenous fistulas for hemodialysis: a randomized controlled trial. *JAMA* 2008; 299(18): 2164-71
76. Dixon BS, Beck GJ, Dember LM, Depner TA, Gassman JJ, Greene T, Himmelfarb J, Hunsicker LG, Kaufman JS, Lawson JH, Meyers CM, Middleton JP, Radeva M, Schwab SJ, Whiting JF, Feldman HI, DAC Study Group. Design of the Dialysis Access Consortium (DAC) Aggrenox Prevention Of Access Stenosis Trial. *Clin Trials* 2005; 2(5):400-12.
77. Dixon BS, Beck GJ, Vazquez MA, Greenberg A, Delmez JA, Allon M, Dember LM, Himmelfarb J, Gassman JJ, Greene T, Radeva MK, Davidson IJ, Ikizler TA, Braden GL, Fenves AZ, Kaufman JS, Cotton JR Jr, Martin KJ, McNeil JW, Rahman A, Lawson JH, Whiting JF, Hu B, Meyers CM, Kusek JW, Feldman HI, DAC Study Group. Effect of dipyridamole plus aspirin on hemodialysis graft patency. *N Engl J Med* 2009; 360(21):2191-201.
78. Masaki T, Rathi R, Zentner G, Leyboldt JK, Mohammad SF, Burns GL et al. Inhibition of neointimal hyperplasia in vascular grafts by sustained perivascular delivery of paclitaxel. *Kidney Int* 2004; 66(5):2061-9.
79. Rotmans JJ, Pattynama PM, Verhagen HJ, Hino I, Velema E, Pasterkamp G et al. Sirolimus-eluting stents to abolish intimal hyperplasia and improve flow in porcine arteriovenous grafts: a 4-week follow-up study. *Circulation* 2005; 111(12):1537-42.

80. Lawson JH, Glickman M, Schuman E, Schild AF, Ross J, Berman S, Roy-Chaudhury R. Safety of Vascugel Treatment after the Creation of Arteriovenous Access. Philadelphia: American Society of Nephrology; 2008.
81. Burke SK, FNF, LaRoche A, Mendenhall HV. Local Application of Recombinant Human Type I Pancreatic Elastase (PRT-201) to an Arteriovenous Fistula (AVF) Increases AVF Blood Flow in a Rabbit Model. Philadelphia: American Society of Nephrology; 2008.
82. Roy-Chaudhury P. for The Mercator Study Investigators Perivascular Dexamethasone for PTFE Graft Stenosis. The HAPPI (Hemodialysis Access Patency Extension with Percutaneous Transluminal Infusion of Dexamethasone) Study. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18:468A.
83. Scheltinga MR, van Hoek F, Bruijninx CM. Time of onset in haemodialysis access-induced distal ischaemia (HAIDI) is related to the access type. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24:3198-3204.
84. Schanzer A, Nguyen LL, Owens CD, Schanzer H. Use of digital pressure measurements for the diagnosis of AV access-induced hand ischemia. *Vasc Med* 2006; 11:227-231.
85. Mickley V. Steal syndrome - strategies to preserve vascular access and extremity. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23:19-24.
86. Bachleda P, Utikal P, Kojecky Z, Drac P, Köcher M, Cerna M, Zadrazil J. Autogenous arteriovenous elbow fistula for haemodialysis and upper extremity ischemia. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2007; 151:129-132.
87. Tordoir JH, Dammers R, van der Sande FM. Upper extremity ischemia and hemodialysis vascular access. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004; 27:1-5.
88. London GM. Left ventricular alterations and end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17:29-36.
89. NKF-KDOQI clinical practice guidelines for vascular access. Available from

http://www.kidney.org/professionals/kdoqi/guideline_uphd_pd_va/index.htm

90. Schild AF, Perez E, Gillaspie E, Seaver C, Livingstone J, Thibonnier A. Arteriovenous fistulae vs arteriovenous grafts: a retrospective review of 1 700 consecutive vascular access cases. *J Vasc Access* 2008; 9:231-235
91. Dikow R, Schwenger V, Zeier M, Ritz E. Do AV fistulas contribute to cardiac mortality in hemodialysis patients? *Semin Dial* 2002; 15(1):14-7.
92. Santoro D, Savica V, Bellinghieri G. Vascular access for hemodialysis and cardiovascular complications. *Minerva Urol Nefrol* 2010; 62(1):81-5.
93. Hiremath S, Doucette SP, Richardson R, Chan K, Burns K, Zimmerman D. Left ventricular growth after 1 year of haemodialysis does not correlate with arteriovenous access flow: a prospective cohort study. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25(8):2656-61.
94. Casserly LF, Dember LM. Thrombosis in end-stage renal disease. *Semin Dial* 2003; 16: 245-56
95. Sirolli V, Ballone E, Di Stante S, Amoroso L, Bonomini M. Cell activation and cellular-cellular interactions during hemodialysis: effect of dialyzer membrane. *Int J Artif Organs* 2002; 25:529-37
96. Milburn JA, Cassar K, Ford I, Fluck N, Brittenden J. Prothrombotic changes in platelet, endothelial and coagulation function following hemodialysis. *Int J Artif Organs* 2011; 34(3):280-7.
97. Malhotra S, Bhargava VK, Grover A, Pandhi P, Sharma YP. A randomized trial to compare the efficacy, safety, cost and platelet aggregation effects of enoxaparin and unfractionated heparin (the ESCAPEU trial). *Int J Clin Pharmacol Ther* 2001; 39:110-5.
98. Aggarwal A, Kabbani SS, Rimmer JM, et al. Biphasic effects of hemodialysis on platelet reactivity in patients with endstage renal disease: a potential contributor to cardiovascular risk. *Am J Kidney Dis* 2002; 40:315-22

99. Inoue A, Wada H, Takagi M, et al. Hemostatic abnormalities in patients with thrombotic complications on maintenance hemodialysis. *Clin Appl Thromb Hemost* 2000; 6:100-3.
100. Sagedal S, Hartmann A, Sundstrom K, Bjornsen S, Brosstad F. Anticoagulation intensity sufficient for haemodialysis does not prevent activation of coagulation and platelets. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16:987-93.
101. Yu A, Egberg N, Jacobson SH. Haemostatic complications in haemodialysis patients: effect of type of vascular access and dialysis filter. *Scand J Clin Lab Invest* 2003; 63:127-33.
102. Takagi M, Wada H, Mukai K, et al. Increased vascular endothelial cell markers in patients with chronic renal failure on maintenance haemodialysis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994; 5:713-7
103. Tomura S, Nakamura Y, Deguchi F, et al. Plasma von Willebrand factor and thrombomodulin as markers of vascular disorders in patients undergoing regular hemodialysis therapy. *Thromb Res* 1990; 58:413-9.
104. Vaziri ND, Gonzales EC, Wang J, Said S. Blood coagulation, fibrinolytic, and inhibitory proteins in end-stage renal disease: effect of hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 1994; 23:828-35.
105. Naumnik B, Borawski J, Pawlak K, Myliwiec M. Effect of hemodialysis on plasma levels of vascular endothelial markers. *Clin Appl Thromb Hemost* 2002; 8:245-50.
106. Paffen E, DeMaat MP. C-reactive protein in atherosclerosis: A causal factor? *Cardiovasc Res* 2006; 71:30-9.
107. Koulouridis E, Tzilianos M, Katsarou A, et al. Homocysteine and C-reactive protein levels in haemodialysis patients. *Int Urol Nephrol* 2001; 33:207-15.
108. Ambühl PM, Wuthrich RP, Korte W, Schmid L, Krapf R. Plasma hypercoagulability in haemodialysis patients: impact of dialysis and anticoagulation. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12:2355-64.

109. Hernández MR, Galan AM, Cases A, et al. Biocompatibility of cellulosic and synthetic membranes assessed by leukocyte activation. *Am J Nephrol* 2004; 24:235-41.
110. Ketteler M, Schlieper G, Floege J. Calcification and cardiovascular health: new insights into an old phenomenon. *Hypertension* 2006; 47:1027–1034
111. Schlieper G, Schurgers L, Brandenburg V, Reutelingsperger C, Floege J. Vascular calcification in chronic kidney disease: an update. *Nephrol Dial Transplant*. 2016;31(1):31-9
112. Derwall M, Malhotra R, Lai CS et al. Inhibition of bone morphogenetic protein signaling reduces vascular calcification and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32:613–622
113. Qi Q, Monier-Faugere MC, Geng Z et al. Predictive value of serum parathyroid hormone levels for bone turnover in patients on chronic maintenance dialysis. *Am J Kidney Dis* 1995; 26:622–631
114. Basalyga DM, Simionescu DT, Xiong W. Elastin degradation and calcification in an abdominal aorta injury model: role of matrix metalloproteinases. *Circulation* 2004; 110:3480–3487
115. Aikawa E, Aikawa M, Libby P et al. Arterial and aortic valve calcification abolished by elastolytic cathepsin S deficiency in chronic renal disease. *Circulation* 2009; 119:1785–1794
116. Kageyama A, Matsui H, Ohta M et al. Palmitic acid induces osteoblastic differentiation in vascular smooth muscle cells through ACSL3 and NF-kappaB, novel targets of eicosapentaenoic acid. *PLoS One* 2013; 8:e68197 33.
117. Taylor J, Butcher M, Metal Z. Oxidized low-density lipoprotein promotes osteoblast differentiation in primary cultures of vascular smooth muscle cells by up-regulating Osterix expression in an Msx2-dependent manner. *J Cell Biochem* 2011;112:581–588
118. Massy ZA, Drueke TB. Vascular calcification. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2013; 22:405–412

119. Zhou Y, Wang JY, Feng H et al. Overexpression of c1q/tumor necrosis factor-related protein-3 promotes phosphate-induced vascular smooth muscle cell calcification both in vivo and in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014; 34:1002–1010
120. Janković A, Damjanovic T, Djuric Z et al. Impact of vascular calcifications on arteriovenous fistula survival in hemodialysis patients: a five-year prospective study. *Nephron* 2015;129(4):247-52.
121. Buendia P, Montes de Oca A, Madueno JA et al. Endothelial microparticles mediate inflammation-induced vascular calcification. *FASEB J* 2015; 9:73–181
122. Lin CJ, Pan CF, Liu HL, Chuang CK, Jayakumar T, Wang TJ, Chen HH, Wu CJ. The role of protein-bound uremic toxins on peripheral artery disease and vascular access failure in patients on hemodialysis. *Atherosclerosis* 2012; 225(1):173-9.
123. Reynolds JL, Skepper JN, McNair Ret al. Multifunctional roles for serum protein fetuin-A in inhibition of human vascular smooth muscle cell calcification. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:2920–2930
124. Demetriou M, Binkert C, Betal S. Fetuin/alpha2-HS glycoprotein is a transforming growth factor-beta type II receptor mimic and cytokine antagonist. *J Biol Chem* 1996; 271:12755–12761
125. Schurgers LJ, Uitto J, Reutelingsperger CP. Vitamin K-dependent carboxylation of matrix Gla-protein: a crucial switch to control ectopic mineralization. *Trends Mol Med* 2013; 19:217–226
126. Hofbauer LC, Schoppet M. Osteoprotegerin: a link between osteoporosis and arterial calcification? *Lancet* 2001; 358:257–259
127. Lomashvili KA, NarisawaS, Letal MJ. Vascular calcification is dependent on plasma levels of pyrophosphate. *Kidney Int* 2014; 85:1351–1356
128. Speer MY, McKee MD, Guldberg RE et al. Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo. *J Exp Med* 2002; 196:1047–1055

129. Sener EF, Taheri S, Korkmaz K, Zararsiz G, Serhatlioglu F, Unal A, Emirogullari ON, Ozkul Y. Association of TNF- α -308 G>A and ACE I/D gene polymorphisms in hemodialysis patients with arteriovenous fistula thrombosis. *Int Urol Nephrol* 2014; 46:1419-25
130. Isbir CS, Akgun S, Yilmaz H, Civelek A, Ak K, Tekeli A, Agachan B, Cobanoglu A. Is there a role of angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in the failure of arteriovenous femoral shunts for hemodialysis? *Ann Vasc Surg.* 2001; 15(4):443-6.
131. Heine GH, Ulrich C, Köhler H, Girndt M. Is AV fistula patency associated with angiotensin-converting enzyme (ACE) polymorphism and ACE inhibitor intake? *Am J Nephrol.* 2004; 24(4):461-8.
132. Moon JY, Jeong KH, Paik SS, Han JJ, Lee SH, Lee TW, Ihm CG, Kim MJ, Chung JH. Arteriovenous fistula patency associated with angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism and ACE inhibition or AT1 receptor blockade. *Nephron Clin Pract.* 2009; 111(2):c110-6.
133. Cozzolino M, Biondi ML, Galassi A, Turri O, Brancaccio D, Gallieni M. Matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-3 gene promoter polymorphisms are associated with mortality in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2009; 24(7):2207-12.
134. Lin CC, Yang WC, Chung MY, Lee PC. Functional polymorphisms in matrix metalloproteinases-1, -3, -9 are associated with arteriovenous fistula patency in hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; 5(10):1805-14.
135. Spoto B, Benedetto FA, Testa A, Tripepi G, Mallamaci F, Maas R, Boeger RH, Zoccali C. An additive effect of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms contributes to the severity of atherosclerosis in patients on dialysis. *Am J Hypertens* 2007; 20(7):758-63.
136. Lee KH, Tsai WJ, Chen YW, Yang WC, Lee CY, Ou SM, Chen YT, Chien CC, Lee PC, Chung MY, Lin CC. Genotype polymorphisms of genes regulating nitric oxide synthesis determine long-term arteriovenous fistula patency in male hemodialysis patients. *Ren Fail* 2016; 38(2):228-37.

137. Weiss MF, Scivittaro V, Anderson JM. Oxidative stress and increased expression of growth factors in lesions of failed hemodialysis access. *Am J Kidney Dis* 2001; 37(5):970-80.
138. El-Shafey EM, El-Nagar GF, Selim MF, El-Sorogy HA, Sabry AA. Is there a role for endothelin-1 in the hemodynamic changes during hemodialysis? *Clin Exp Nephrol* 2008; 12(5):370-5
139. Hehrlein C: How do A-V fistulae lose function? The roles of haemodynamics, vascular remodelling, and intimal hyperplasia. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10:1287-1290
140. Massagué J. TGF β signalling in context. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2012; 13(10):616–30
141. Hruby Z, Stanek-Piotrowska M, Turek J, Witkiewicz W, Jonkisz A, Konieczny A, Kosiński M, Dobosz T. The clinicopathological determinants of native arteriovenous fistula failure in patients on maintenance hemodialysis. *Adv Clin Exp Med* 2013; 22(4):495-500
142. Kumar, Vinay. *Robbins and Coltran Pathologic Basis of Disease*. 2010. China: Elsevier. pp. 88–89
143. Wang Y, Liang A, Luo J, Liang M, Han G, Mitch WE, Cheng J. Blocking Notch in endothelial cells prevents arteriovenous fistula failure despite CKD. *J Am Soc Nephrol* 2014; 25(4):773-83
144. Simone S, Loverre A, Cariello M, Divella C, Castellano G, Gesualdo L, Pertosa G, Grandaliano G. Arteriovenous fistula stenosis in hemodialysis patients is characterized by an increased adventitial fibrosis. *J Nephrol* 2014; 27(5):555-62
145. Wu CC, Wen SC, Yang CW, Pu SY, Tsai KC, Chen JW. Plasma ADMA predicts restenosis of arteriovenous fistula. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20(1):213-22
146. Daugirdas JT: Second generation logarithmic estimates of single pool variable volume Kt/V: an analysis of error. *J Am Soc Nephrol* 1993; 4:1205-1213
147. KDIGO guidelines. <http://kdigo.org/home/guidelines/>

148. Adragao T, Pires A, Lucas C, Birne R, Magalhaes L, Gonçalves M, et al: A simple vascular calcification score predicts cardiovascular risk in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19:1480–1488
149. Schlieper G, Krüger T, Djuric Z, Damjanovic T, Markovic N, Schurgers LJ, et al. Vascular access calcification predicts mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2008; 74:1582–1587
150. Miller SA, Dykes DD, Polesky H F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cell. *Nucl Acid Res* 1988; 16 (3):1215
151. Santoro D, Benedetto F, Mondello P, Pipitò N, Barillà D, Spinelli F, Ricciardi CA, Cernaro V, Buemi M. Vascular access for hemodialysis: current perspectives. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 2014; 7:281-94
152. Fokou M, Ashuntantang G, Teyang A, Kaze F, Chichom Mefire A, Halle MP, Angwafo F 3rd, Takongmo S, Sandmann W. Patients characteristics and outcome of 518 arteriovenous fistulas for hemodialysis in a sub-Saharan African setting. *Ann Vasc Surg* 2012; 26(5):674-9
153. Teng J, Tian J, Lv WL, Zhang XY, Zou JZ, Fang Y, Yu J, Shen B, Liu ZH, Ding XQ. Inappropriately elevated endothelin-1 plays a role in the pathogenesis of intradialytic hypertension. *Hemodial Int* 2015; 19(2):279-86
154. Wilkie ME, Khandan-Nia N, Ghatei MA, Bloom SR, Raftery MJ, Cunningham J. Does the arteriovenous fistula in chronic haemodialysis patients stimulate endothelin-1 release? *Nephrol Dial Transplant* 1992; 7(10):1019-21
155. Stracke S, Konner K, Köstlin I, Friedl R, Jehle PM, Hombach V, Keller F, Waltenberger J. Increased expression of TGF-beta1 and IGF-I in inflammatory stenotic lesions of hemodialysis fistulas. *Kidney Int* 2002; 61(3):1011-9
156. Heine GH, Ulrich C, Sester U, Sester M, Köhler H, Girndt M. Transforming growth factor beta1 genotype polymorphisms determine AV fistula patency in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2003; 64(3):1101-7

157. Ikegaya N, Yamamoto T, Takeshita A, Watanabe T, Yonemura K, Miyaji T, Ohishi K, Furuhashi M, Maruyama Y, Hishida A. Elevated erythropoietin receptor and transforming growth factor-beta1 expression in stenotic arteriovenous fistulae used for hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11(5):928-35
158. Paczek L, Gomółka M, Niemczyk S, Bartłomiejczyk I, Gerwatowska D, Sebekova K, Heidland A. Serum growth factors in hemodialyzed patients. *Artif Organs* 2004; 28(3):314-6
159. Hehrlein C. How do A-V fistulae lose function? The roles of haemodynamics, vascular remodelling, and intimal hyperplasia. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10:1287-1290
160. Roy-Chaudhury P, Kelly BS, Miller MA, Reaves A, Armstrong J, Nanayakkara N, Heffelfinger SC. Venous neointimal hyperplasia in polytetrafluoroethylene dialysis grafts. *Kidney Int* 2001; 59(6):2325-34
161. Kielstein JT, Impraim B, Simmel S, Bode-Boger SM, Tsikas D, Frolich JC, Hoepfer MM, Haller H, Fliser D. Cardiovascular effects of systemic nitric oxide synthase inhibition with asymmetrical dimethylarginine in humans. *Circulation* 2004; 109:172– 177
162. Achan V, Broadhead M, Malaki M, Whitley G, Leiper J, MacAllister R, Vallance P: Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:1455–1459
163. 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
164. Ketteler M, Rothe H, Kruger T et al. Mechanisms and treatment of extraosseous calcification in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2011; 7:509–516
165. London GM, Guerin AP, Marchais SJ, Pannier B, Safar ME, Day M, Metivier F. Cardiac and arterial interactions in end-stage renal disease. *Kidney Int* 1996; 50(2):600-8

166. Goodman WG, Goldin J, Kuizon BD, Yoon C, Gales B, Sider D, Wang Y, Chung J, Emerick A, Greaser L, Elashoff RM, Salusky IB. Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *N Engl J Med* 2000; 342:1478-1483
167. Agatston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, Zusmer NR, Viamonte M Jr, Detrano R. Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J Am Coll Cardiol* 1990; 15(4):827-32
168. Lehoux S, Castier Y, Tedgui A. Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. *J Intern Med* 2006; 259:381–392
169. Choi SJ, Yoon HE, Kim YS, Yoon SA, Yang CW, Kim YS, Kim YS, Park SC, Kim YO. Pre-existing Arterial Micro-Calcification Predicts Primary Unassisted Arteriovenous Fistula Failure in Incident Hemodialysis Patients. *Semin Dial* 2015; 28(6): 665-669
170. Allon M, Robbin M, Umphrey HR, Young CJ, Deierhoi MH, Goodman J, Hanaway M, Lockhart ME, Barker-Finkel J, Litovsky S. Preoperative Arterial Microcalcification and Clinical Outcomes of Arteriovenous Fistulas for Hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 2015; 66(1): 84-90
171. Georgiadis GS, Georgakarakos EI, Antoniou GA, Panagoutsos S, Argyriou C, Mourvati E, Passadakis P, Lazarides MK. Correlation of pre-existing radial artery macrocalcifications with late patency of primary radiocephalic fistulas in diabetic hemodialysis patients. *J Vasc Surg* 2014; 60(2): 462–470
172. Noordzij M, Cranenburg EM, Engelsman LF, Hermans MM, Boeschoten EW, Brandenburg VM, Bos WJ, Kooman JP, Dekker FW, Ketteler M, Schurgers LJ, Krediet RT, Korevaar JC; NECOSAD Study Group. Progression of aortic calcification is associated with disorders of mineral metabolism and mortality in chronic dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26(5): 1662-1669
173. Yap YS, Ting KT, Chi WC, Lin CH, Liu YC, Chuang WL. Aortic Arch Calcification Predicts Patency Loss of Arteriovenous Fistula in End-Stage Renal Disease Patients. *Sci Rep* 2016;6:24943.

174. Davenport A. Using dialysis machine technology to reduce intradialytic hypotension. *Hemodial Int* 2011;15 Suppl 1:S37-42.

BIOGRAFIJA AUTORA

Aleksandar (Novice) Janković rođen je 22.03.1980. godine u Smederevu, gde je završio osnovnu školu i Gimnaziju. Medicinski Fakultet u Beogradu upisao je školske 1999/2000 god., a završio 24.03.2006. godine sa prosečnom ocenom 9.20 (devet, dvadeset).

Od novembra 2006. do decembra 2008. god. radio je u ZC “Sv. Luka “ u Smederevu u službama Hitne medicinske pomoći i Hitnog prijema. Od decembra 2008. zaposlen je u Kliničkom odeljenju za nefrologiju i poremećaje metabolizma sa dijalizom “Prof. dr Vasilije Jovanović”, KBC Zvezdara, Beograd.

Februara 2011. godine na Medicinskom Fakultetu, Univerziteta u Beogradu, odbranio je završni rad u okviru Specijalističkih akademskih studija-oblast Nefrologija. Tema rada bila je “Učestalost, faktori rizika i ishod aneurizmalne bolesti arteriovenskih pristupa kod bolesnika na programu hronične hemodijalize”. Mentor rada je bila Prof. dr Nada Dimković.

Specijalistički ispit iz Interne Medicine položio je oktobra 2013. god. na Medicinskom Fakultetu, Univerziteta u Beogradu sa odličnim uspehom.

Jula 2016. god. izabran je za Kliničkog Asistenta na predmetu Interna Medicina na Medicinskom Fakultetu, Univerziteta u Beogradu.

Doktorske studije iz oblasti Nefrologije upisao je školske 2011/2012 godine.

**IZJAVA O AUTORSTVU, IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I
ELEKTRONSKE VERZIJE, IZJAVA O KORIŠĆENJU**

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Aleksandar Janković

broj upisa NF-02/11

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Učestalost različitih faktora na preživljavanje arteriovenskih pritsupa kod bolesnika na hemodijalizi

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 19. jula 2017. god



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora _____ Aleksandar Janković _____

Broj upisa _____ NF-02/11 _____

Studijski program _____ Nefrologija _____

Naslov rada "Učestalost različitih faktora na preživljavanje arteriovenskih pritsupa kod bolesnika na hemodijalizi"

Mentor Prof. dr Nada Dimković

Potpisani Aleksandar Janković

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 19. jula 2017. god.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Učestalost različitih faktora na preživljavanje arteriovenskih pritsupa kod bolesnika na hemodijalizi

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

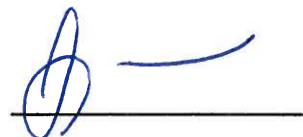
Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 19. jula 2017. god



1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.