

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Petar S. Đurić

**UTICAJ MEMBRANA OBLOŽENIH VITAMINOM E NA NIVO  
POKAZATELJA OKSIDATIVNOG STRESA KOD  
HEMODIJALIZNIH BOLESNIKA SA HOMOZIGOTNOM  
DELECIJOM GENA ZA GLUTATION TRANSFERAZU M1**

Doktorska disertacija

Beograd 2021. g.

UNIVERSITY OF BELGRADE

MEDICAL FACULTY

Petar S. Đurić

**IMPACT OF VITAMIN E-BONDED MEMBRANE ON THE  
MARKERS OF OXIDATIVE STRESS IN HEMODIALYSIS  
PATIENTS WITH HOMOZYGOUS GLUTATHION  
TRANSFERASE M1 GENE DELETION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

Mentor: Prof. dr Nada Dimković, redovni profesor Interne medicine u penziji, Medicinski Fakultet Univerziteta u Beogradu

Komentor: Tatjana Simic, redovni profesor, Institut za medicinsku i kliničku biohemiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, dopisni član SANU

Članovi Komisije:

1. Prof. dr Dijana Jovanović, redovni Profesor Interne medicine, Medicinski Fakultet, Univerzitet u Beogradu, predsednik komisije
2. Doc. dr Sonja Šuvakov, docent, Institut za medicinsku i kliničku biohemiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, član komisije
3. Doc. dr Branka Mitić, docent Interne medicine, Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu, član komisije

Datum odbrane:

Želim da se zahvalim svim ljudima koji su doprineli nastajanju ove disertacije.

Prvo želim da se iskreno zahvalim profesorki Nadi Dimković na nesebičnoj pomoći i velikom trudu koji je uložila kako u izradu same teze, tako i u moju edukaciju tokom 12 godina zajedničkog rada. Takođe veliku zahvalnost dugujem i profesorki Tatjani Simić na sjajnim idejama u osmišljavanju same teze i nesebičnoj pomoći i savetima u samom nastajanju i izradi teze.

Želim da se zahvalim i Doc. dr Sonji Šuvakov na velikoj i nesebičnoj pomoći koju mi je pružala od prvog dana izrade teze.

Želeo bih i da se zahvalim i prof dr Dijani Jovanović i doc dr Benki Mitić, na strpljnu i savetima koji su dodatno unapredili tezu. Veliku zahvalnost dugujem i prof dr Radimiru Naumoviću na savetima i podršci tokom izrade teze.

Takođe veliku zahvalnost dugujem svim medicinskim tehničarima odseka hemodijalize KBC Zvezdare, a naročito sestri Divni i Branki.

Veliku zahvalnost dugujem i svim kolegama zaposlenim na Institutu za biohemiju, naročito dr Đurđi Jerotić i laborantkinji Sanji.

Veliku zahvalnost dugujem i svim kolegama odeljenja kliničke nefrologije na bodrenju i zajedničkom radu, na pomoći oko prikupljanja podaka i laboratorijskih uzoraka: Aci, Dragani, Ani, Jeleni, Tanji, Nikoli, Verici, Jovani i svima ostalima.

Koristim ovu priliku da se zahvalim i mojoj porodici. Mojoj voljenoj supruzi Anđelki koja je uz mene već skoro dve decenije i sve vreme velika podrška. Takođe mojoj deci, Petri, Nikoliji i Sofiji, koje su moja inspiracija. Takođe zahvaljujem se i ocu Stevanu, koji me je i uveo svet medicine i uvek bio najvažniji savetodavac.

I na kraju najveću zahvalnost dugujem svojoj prerano preminuloj majci Sofiji, koja nažalost nije dočekala da vidi brojne uspehe nas kao porodice i ostvarivanje naših brojnih zajedničkih snova. Hvala joj na njenoj žrtvi i svemu što je učinila za mene.

## **Uticaj membrana obloženih vitaminom E na nivo pokazatelja oksidativnog stresa kod hemodijaliznih bolesnika sa homozigotnom delecijom gena za glutacion transferazu M1**

### **Rezime:**

Uvod: Povećan nivo oksidativnog stresa predstavlja glavno obeležje terminalnog stadijuma bubrežne slabosti. Povećana produkcija slobodnih radikala i smanjena aktivnost antioksidantnih enzima doprinosi nagomilavanju biopokazatelja oksidativnog oštećenja proteina, lipida i DNK kod dijaliznih bolesnika. Članovi superfamilije enzima glutacion transferaze (GST) su u stanju da detoksikuju nagomilane uremijske toksine kod hemodijaliznih (HD) bolesnika i poseduju snažnu antioksidantnu aktivnost prema reaktivnim kiseoničnim vrstama (ROS) i peroksidima. Približno polovini populacije nedostaje aktivnost GSTM1 enzima usled homozigotne delecije glutacion transferaze M1 (*GSTM1*) gena. HD bolesnici kojima nedostaje GSTM1 aktivnost imaju povećana oksidativna oštećenja DNK i veću stopu mortaliteta nego oni koji imaju aktivan GSTM1 enzim. Jedna skorašnja studija je pokazala da je *GSTM1* nulti genotip faktor rizika za opšti i kardiovaskularni mortalitet kod hemodijaliznih bolesnika, dok je uticaj ovog genotipa na kardiovaskularni morbiditet nije ispitivan. Veruje se da kod bolesnika lečenih HD oksidativni stres izazivaju akumulacija uremijskih toksina, bioinkompatibilnost dijaliznih membrana i sistema za ekstrakorporalnu cirkulaciju, kao i kontaminacija dijalizata. Termin biokompatibilnost označava složene reakcije između ne-biološkog materijala i/ili uređaja i čitavog organizma. Membrana za dijalizu je centralna komponenta dijaliznog sistema i kao takva ima značajnu ulogu u nastanku reakcija bioinkompatibilnosti. Neadekvatna biokompatibilnost dijaliznih membrana smatra se da je najvažniji uzrok stvaranja slobodnih radikala tokom HD. Da bi se prevazišle prethodno navedene komplikacije lečenja HD, razmatrane su nove strategije u razvoju membrana za HD. Glavni fokus je bio na unapređenju biokompatibilnosti kao i poboljšanje antioksidantne zaštite ćelija krvi, cirkulišućih proteina i lipida korištenjem bioaktivnih jedinjenja. Plazmatski nivo antioksidanta vitamina E smanjen je tokom HD procedure što upućuje da njegova nadoknada može korigovati pokazatelje oksidativnog stresa. Upotreba membrana obloženih vitaminom E (VEM) se smatra kao način kojim se može smanjiti oksidativni stres. Ova strategija je bazirana na činjenici da vitamin E deluje kao snažan hidrofobni čistač koji obezbeđuje zaštitu lipida plazme i ćelijskih membrana od lipidne peroksidacije, direktno smanjujući stvaranje ROS na mestu kontakta ćelija krvi i membrane. Pojedine studije sugerišu da biokompatibilne VEM mogu pravovremeno ukloniti ROS i dovesti do supresije polimorfonuklearnog sagorevanja. Po našim saznanjima u ovoj tezi je prvi put ispitivana primena VEM kod bolesnika na hemodijalizi sa *GSTM1* delecijom gena.

Cilj: Ciljevi ovog istraživanja bili su da se utvrdi genski polimorfizam za *GSTM1* među hemodijaliznim bolesnicima i tako ustanovi učestalost bolesnika sa homozigotnom delecijom gena, kao i da se izvrši uporedna analiza kardiovaskularnog statusa i prethodnih kardiovaskularnih događaja kod bolesnika sa *GSTM1* aktivnim i *GSTM1* nultim genotipom. Takođe, cilj je bio da se ispita uticaj tromesečne primene dijaliznih membrana obloženih vitaminom E na parametre oksidativnog stresa i inflamacije kod bolesnika sa *GSTM1* nultim genotipom u odnosu na bolesnike sa *GSTM1* nultim genotipom lečenih standardnim polisulfonskim membranama, kao i da se ispituju parametri anemije, uhranjenosti i mineralokoštanog metabolizma kod bolesnika lečenih sa dve vrste dijaliznih membrana (VEM i polisulfonskim membranama).

Materijal i metode: Studija se sastojala iz dva dela. U prvom delu studije od ukupno 230 bolesnika koji su se lečili hroničnim programom HD u Kliničkom odeljenju za nefrologiju i metaboličke poremećaje sa dijalizom "Prof. dr Vasilije Jovanović" KBC Zvezdara u istraživanje je uključeno 170 bolesnika koji su ispunili uključujuće kriterijume i bili su voljni da učestvuju u istraživanju. Genotipizacija *GSTM1* je urađena kod svih 170 bolesnika uključenih u istraživanje i delecija gena *GSTM1* je pronađena kod 110 bolesnika, dok je 60 bolesnika imalo aktivan gen. Potom su prikupljeni podaci o kardiovaskularnom morbiditetu iz dijaliznih istorija (preležan infarkt miokarda, prisustvo ishemijske bolesti srca, periferne vaskularne bolesti, cerebrovaskularne ishemijske bolesti i srčane aritmije) i poreden je kardiovaskularni morbiditet između bolesnika sa aktivnim i nultim *GSTM1* genotipom. Takođe, poredeni su parametri

anemije, metabolizma minerala i nutricije. U drugom delu studije, od 110 bolesnika sa *GSTM1* nultim genotipom, 80 ih je randomizovano i uključeno u interventni deo studije. Od ukupno 80 bolesnika, 40 ih je dijalizirano u periodu od 3 meseca sa VEM, dok je preostalih 40 dijalizirano sa high-flux polisulfonskim membranama iste površine. Markeri oksidativnog oštećenja proteina, lipida i inflamacije (tiolne grupe, malondialdehid (MDA), interleukin-6 (IL-6), zajedno sa antioksidantnom aktivnošću plazme (glutation peroksidaza (GPX), superoksid dizmutaza (SOD)) određeni su pre i posle studije.

Rezultati: Dve grupe bolesnika su se međusobno razlikovale u odnosu na osnovi uzrok TBS, gde su bolesnici sa homozigotnom delecijom *GSTM1* gena ređe imali hipertenzivnu nefroangiosklerozu kao osnovni uzrok terminalnog stadijuma bubrežne slabosti (TBS) (39,1 % naspram 61,7%), dok se DM kao osnovni uzrok TBS češće javljao kod bolesnika sa nultim *GSTM1* genotipom (18,2 % naspram 8,3%). Što se tiče ostalih analiziranih demografskih karakteristika, osnovnih biohemijskih parametara i dijaliznih parametara, grupe bolesnika se nisu međusobno razlikovale. Pri poređenju prethodnog kardiovaskularnog morbiditeta između bolesnika, sa delecijom gena i sa aktivnim *GSTM1* genom, nije pronađena razlika i zaključeno je da su bolesnici u obe grupe podjednako često oboljevali od IM, CVI, AP, POAB i srčane aritmije. Nije pronađena razlika u učestalosti primene agenasa stimulacije eritropoeze (ASE), prosečnoj nedeljnoj dozi ASE (kod onih što su ih imali u terapiji), rezistenciji na iste, vrednostima hemoglobina i feritina, saturaciju transferina i serumskog gvožđa između bolesnika sa *GSTM1* aktivnim i nultim genotipom. U pogledu parametara nutricije, pronašli smo da su bolesnici sa *GSTM1* aktivnim genotipom imali statistički značajno niže vrednosti LDL holesterola i serumskog fosfata, dok u pogledu drugih parametara nutricije i mineralo-koštanog metabolizma između dve grupe bolesnika nije bilo statistički značajne razlike. Nakon tri meseca dijaliziranja sa VEM membranama, vrednosti GPX, MDA i tiolnih grupa su porasle u obe grupe, ali bez statistički značajne razlike između grupa. Vrednosti SOD i C reaktivnog proteina (CRP) se nisu značajno promenile nakon perioda lečenja od tri meseca. IL-6 je porastao u kontrolnoj grupi, istovremeno se smanjio u VEM grupi, ali bez statistički značajnosti. Vrednosti hemoglobina, eritrocita, indeksa rezistencije na eritropoetin, vrednosti serumskog gvožđa i feritina se nisu statistički značajno razlikovale nakon tri meseca kako unutar grupa, tako ni između grupa. U pogledu drugih laboratorijskih parametara, proteina, albumina, triglicerida, fosfora i Kt/V došlo je do značajnog poboljšanja unutar grupa, ali bez statistički značajne razlike između grupa.

Zaključak: Bolesnici lečeni HD u našem istraživanju češće su imali *GSTM1* nulti genotip u odnosu na *GSTM1* aktivni genotip. Oni sa *GSTM1* nultim genotipom ređe su imali hipertenzivnu nefroangiosklerozu kao osnovni uzrok TBS u odnosu na bolesnike sa aktivnim genotipom. Između bolesnika sa *GSTM1* aktivnim i nultim genotipom nije bilo razlike u pogledu kardiovaskularnog morbiditeta i prethodnih kardiovaskularnih događaja, kao ni u pogledu parametara anemije i parametara gvožđa. Nakon tromesečnog perioda dijaliziranja sa VEM nije došlo do dodatnih korisnih efekata u odnosu na standardne polisulfonske membrane u smanjenju bioprodukata oksidativnog stresa kod bolesnika sa *GSTM1* nultim genotipom. Marker zapaljenja IL-6 porastao u kontrolnoj grupi i istovremeno se smanjio u VEM grupi, ali razlika između grupa nije dostigla statističku značajnost. U pogledu parametara anemije i gvožđa, lečenje sa VEM uticalo je samo na smanjenje saturacije transferina, za istu količinu primenjenog gvožđa, istu prosečnu dozu ASE i isti nivo feritina u odnosu na grupu bolesnika lečenu standardnim membranama. Uvid u dugoročne efekte VEM kod rizičnih grupa, poput dijaliznih bolesnika sa delecionim polimorfizmom *GSTM1*, pružiće buduća longitudinalna istraživanja na većem broju bolesnika.

Ključne reči: hemodijaliza, glutation transferaza M1, vitaminom E obložene membrane, oksidativni stres

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Nefrologija

UDK broj:

## **Impact of vitamin E-bonded membrane on the markers of oxidative stress in hemodialysis patients with homozygous glutathione transferase M1 gene deletion**

### **Abstract:**

Introduction: Increased oxidative stress is a hallmark of end-stage renal disease. Both increased free radicals production and down-regulated antioxidant enzymes activities contribute to protein, lipid and DNA oxidative damage by-products accumulation in dialysis patients. Members of the glutathione transferase (GST) enzyme superfamily are able to detoxify accumulated uremic toxins in hemodialysis (HD) patients and possess strong antioxidant activity towards reactive oxygen species (ROS) and peroxides. Approximately half of the population lacks GSTM1 enzyme activity, due to a homozygous deletion of the glutathione transferase M1 (*GSTM1*) gene. HD patients lacking *GSTM1* activity exhibit enhanced oxidative DNA damage and higher mortality rate than those with an active GSTM1 enzyme. A recent study showed that *GSTM1*-null genotype is a risk factor for general and CV mortality in the HD population, but data about CV morbidity are lacking. It is believed that in patients treated with HD, oxidative stress is caused by the accumulation of uremic toxins, bioincompatibility of dialysis membranes and extracorporeal circulation systems, as well as dialysis fluid contamination. The term of biocompatibility refers to complex reactions between non-biological material and/or devices and the whole organism. The dialysis membrane is a central component of the dialysis system and as such plays a significant role in the formation of bioincompatibility reactions. Inadequate biocompatibility of dialysis membranes is considered to be the most important cause of free radical formation during HD. To overcome the aforementioned complications of HD treatment, new strategies in HD membrane development have been considered. The main focus was on improving biocompatibility as well as improving the antioxidant protection of blood cells, circulating proteins and lipids using bioactive compounds. The plasma level of the antioxidant vitamin E is reduced during the HD procedure, which indicates that its compensation can correct the indicators of oxidative stress. The use of vitamin E-bonded membranes (VEM) is considered a way to reduce oxidative stress. This strategy is based on the fact that vitamin E acts as a powerful hydrophobic scavenger that provides protection of plasma lipids and cell membranes from lipid peroxidation, directly reducing the formation of ROS at the point of contact of blood cells and membranes. Some studies suggest that biocompatible VEMs can remove ROS in a timely manner and lead to the suppression of polymorphonuclear afterburning. Also, previous studies have shown that the use of VEM leads to a significant reduction in inflammation levels and oxidative stress levels. There are also studies that indicate that the use of VEM can reduce the prevalence of cardiovascular events in patients treated with HD. To our knowledge, this is the first study to use the VEM in patients with homozygous *GSTM1* gene deletion.

Aim: The aims of this study were to determine the gene polymorphism for *GSTM1* among HD patients and thus to establish the frequency of patients with homozygous gene deletion, as well as to perform a comparative analysis of cardiovascular status and previous cardiovascular events in patients with *GSTM1* active and *GSTM1* null genotype. Also, we aimed to determine three month effect of VEM on oxidative and inflammatory status in HD patients with homozygous *GSTM1* gene deletion compared to patients treated with standard polysulfone membranes, as well as to compare the parameters of nutrition and bone and mineral metabolism in patients treated with two types of dialysis membranes.

Methods: The study consisted of two parts. In the first part of the study, out of a total of 230 patients being on chronic HD program in the Clinical Department of Nephrology and Metabolic Disorders with Dialysis "Prof. Dr. Vasilije Jovanović" University Hospital Zvezdara, study included 170 patients who fulfilled inclusion criteria and were willing to participate in research. *GSTM1* genotyping was performed in all 170 patients and *GSTM1* gene deletion was found in 110 (65%) patients, while other 60 (35%) patients had active gene. Data about CV morbidity were collected from medical charts (myocardial infarction, presence of ischemic heart disease, peripheral vascular disease, cerebrovascular ischemic disease, and cardiac arrhythmia) and date was compared between patients with *GSTM1* active and null genotype. Parameters of anemia, mineral metabolism and nutrition were also compared. Out

of 110 patients with *GSTM1* null genotype, 80 were randomized and included in the interventional part of the study. Forty patients were dialyzed for three months with VEM, while the other forty were dialyzed with high-flux same-surface polysulfone dialyzers. Markers of protein and lipid oxidative damage and inflammation (thiol groups, malondialdehyde (MDA), Interleukin-6 (IL-6)), together with plasma antioxidant activity (glutathione peroxidase (GPX), superoxide dismutase (SOD)) were determined before and after the study.

Results: The two groups of patients differed in the cause of end stage renal disease (ESRD), patients with homozygous deletion of the *GSTM1* gene were less likely to have hypertensive nephroangiosclerosis (39.1% vs. 61.7%), while diabetes melitus was more common in patients with *GSTM1* null genotype (18.2% vs. 8.3%). Regarding the other demographic characteristics, basic biochemical parameters and dialysis parameters, there were no significant differences between two groups. Patients equally suffered from myocardial infarction, ischemic heart disease, peripheral vascular disease, cerebrovascular accident and cardiac arrhythmia regardless of *GSTM1* genotype. No difference was found in the frequency of erythropoiesis-stimulating agents (ESA) administration, the average weekly dose of ESE (in those who had them in therapy), ESA resistance, hemoglobin and ferritin values, transferrin and S-iron saturation between groups. In terms of nutritional parameters, we found that patients with *GSTM1* active genotype had significantly lower values of LDL cholesterol and serum phosphate, while other parameters of nutrition and mineral-bone metabolism there was no significant difference. After three months of therapy, GPX, MDA, and thiol groups increased significantly in both groups, but without difference between groups. SOD and C reactive protein (CRP) did not change significantly during the three-month period. IL-6 increased in the control group, and at the same time, decreased in the VEM group, but without statistical significance. Hemoglobin (Hb) value, red blood cells, erythropoiesis resistance index (ERI), serum ferritin and iron did not change significantly within or between groups. Regarding other laboratory parameters, proteins, albumins, triglycerides, serum phosphorus, serum bicarbonate and Kt/V showed significant improvements within groups but with no significant difference between groups.

Conclusions: Patients treated with HD in our study were more likely to have the *GSTM1* null genotype compared to the *GSTM1* active genotype. Those with *GSTM1* null genotype were less likely to have hypertensive nephroangiosclerosis as the primary cause of ESRD compared to patients with active genotype. There was no difference between patients with *GSTM1* active and null genotype in terms of cardiovascular morbidity and previous cardiovascular events, as well as in terms of anemia and iron parameters. After a three-month period of dialysis with VEM, there were no additional beneficial effects compared to standard polysulfone membranes in reducing oxidative stress bioproducts in patients with *GSTM1* null genotype. The IL-6 inflammatory marker increased in the control group and decreased at the same time in the VEM group, but the difference between the groups did not reach statistical significance. In terms of anemia and iron parameters, treatment with VEM had only a reduction in transferrin saturation, for the same amount of iron administered, the same average dose of ASE and the same level of ferritin compared with the group of patients treated with standard membranes. Insight into the long-term effects of VEM in high-risk patients, such as dialysis patients with *GSTM1* deletion polymorphism, should be confirmed by future longitudinal studies in a larger number of patients.

Key words: hemodialysis, glutathione transferase M1, vitamin E bonded membranes, oxidative stress

Academic Expertise: Medicine

Field of Academic Expertise: Nephrology

UDK number:



## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Slobodni radikali i redoks homeostaza u organizmu.....	1
1.2. Antioksidativni sistem.....	3
1.2.1. Superoksid dismutaza .....	4
1.2.2. Glutation peroksidaza .....	4
1.2.3. Glutation-S-transferaze i polimorfizmi gena za GST.....	4
1.2.3.1. Polimorfizam gena za glutacion transferazu M1.....	5
1.3. Povezanost oksidativnog stresa i hronične bubrežne slabosti.....	5
1.4. Povezanost oksidativnog stresa i hemodijalizne procedure.....	6
1.4.1. Tipovi dijaliznih membrana i uticaj na oksidativni stres.....	7
1.4.2. Hemodijalizni modaliteti i oksidativni stres.....	11
1.5. Pokazatelji oksidativnog stresa kod bolesnika na hemodijalizi.....	11
1.6. Posledice oksidativnog stresa kod bolesnika na hemodijalizi.....	12
1.6.1. Inflamacija.....	12
1.6.2. Anemija.....	12
1.6.3. Kardiovaskularne komplikacije.....	13
1.7. Vitamin E i dijalizne membrane obložene vitaminom E.....	14
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	16
3. MATERIJAL I METODE.....	17
3.1. Bolesnici i dizajn istraživanja.....	17
3.2. Demografski, biohemijski i dijalizni podaci bolesnika.....	18
3.3. Genotipizacija glutacion transferaze .....	18
3.4. Utvrđivanje polimorfizma <i>GSTM1</i> gena.....	18
3.5. Izdvajanje plazme.....	18
3.6. Merenje proteinskih tiol grupa.....	19
3.7. Merenje nivoa malondialdehida.....	19
3.8. Merenje nivoa IL-6 u plazmi.....	19
3.9. Određivanje aktivnosti antioksidantnih enzima .....	19
3.10. Rutinske biohemijske analize .....	19

3.11.	Statistička analiza podataka.....	19
4.	REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....	21
4.1.	OBSERVACIONI DEO STUDIJE.....	21
4.1.1.	Distribucija delecionog polimorfizma gena za <i>GSTM1</i> kod hemodijaliznih bolesnika.....	21
4.1.2.	Analiza demografskih karakteristika i osnovnih biohemijskih parametara kod bolesnika sa <i>GSTM1</i> aktivnim i <i>GSTM1</i> nultim genotipom .....	21
4.1.3.	Analiza kardiovaskularnog statusa i prethodnih kardiovaskularnih događaja kod bolesnika sa <i>GSTM1</i> aktivnim i <i>GSTM1</i> nultim genotipom.....	23
4.1.4.	Osnovni parametri anemije kod bolesnika sa <i>GSTM1</i> aktivnim i <i>GSTM1</i> nultim genotipom.....	27
4.1.5.	Osnovni parametri nutricije i mineralo-koštanog metabolizma bolesnika kod bolesnika sa <i>GSTM1</i> aktivnim i <i>GSTM1</i> nultim genotipom.....	27
4.2.	INTERVENTNI DEO STUDIJE .....	28
4.2.1.	Osnovne demografske karakteristike.....	28
4.2.2.	Osnovni parametri anemije bolesnika.....	30
4.2.3.	Osnovni parametri nutricije i mineralno-koštanog metabolizma bolesnika.....	30
4.2.4.	Pokazatelji antioksidantne aktivnosti pre i posle studije.....	31
4.2.5.	Pokazatelji oksidativnog oštećenja lipida i proteina pre i posle studije.....	32
4.2.6.	Pokazatelji zapaljenja pre i posle studije.....	32
4.2.7.	Parametri anemije pre i posle studije.....	32
4.2.8.	Parametri nutricije i mineralno-koštanog metabolizma pre i posle studije.....	33
4.2.9.	Biohemijski parametri i adekvatnost hemodijalize pre i posle studije.....	34
5.	DISKUSIJA.....	35
6.	ZAKLJUČCI.....	42
7.	LITERATURA.....	43

## 1. UVOD

Terminalni stadijum bubrežne slabosti (TBS) je teško kliničko stanje koje nastaje kao posledica ireverzibilnog gubitka bubrežne funkcije. Klinički stadijumi hronične bubrežne slabosti (HBB) su posledica smanjenja jačine glomerulske filtracije, koji ukazuju na nivo bubrežnog oštećenja i gubitka bubrežne funkcije. *National Kidney Foundation Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease* klasifikuje TBS kao stadijum 5 HBB. U ovom stadijumu jačina glomerulske filtracije pada ispod 15 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> u periodu od minimum 3 meseca, te bolesnik zahteva zamenu bubrežne funkcije uz pomoć hemodijalize, peritoneumske dijalize ili transplanatcije bubrega (1). Oboleli bubrezi nisu više u stanju da uklanjaju uremijske toksine iz krvi u urin, dolazi do oštećenja ne samo ekskretorne, već i sekretorne i metaboličke funkcije bubrega što ima za posledicu nastanak uremije i nagomilavanje potencijalno štetnih uremijskih toksina u krvi kao što su urea, fosfor, homocistein, beta 2 mikroglobulin, ali i brojnih drugih poremećaja (2, 3). Uremija pogađa biološku funkciju brojnih tkiva u organima, indukujući imunološke promene te inhibira ili podstiče imuni odgovor sa poremećajima stečenog i/ili urođenog imuniteta (1). Aktivirani polimorfonukleari, neutrofil i monociti koji su deo urođenog imuniteta sposobni su da proizvode citokine i da aktiviraju druge zapaljenske ćelije i tako dovode do povećane proizvodnje pro-zapaljenskih citokina i reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS). Ovo ima za posledicu razvoj oksidativnog stresa kod bolesnika sa TBS (4, 5). Iz tog razloga, sistemsko zapaljenje i oksidativni stres su često zajedničke karakteristike bolesnika sa TBS i mogu voditi ka drugim komplikacijama kao što su atreoskleroza, endotelna disfunkcija, gubitak mišića, amiloidoza povezana sa dijalizom, kao i kaheksija (6-9). Od 1960-ih godina HD omogućava i produžava život bolesnicima obolelim od TBS. Međutim, uprkos tehnološkom napretku koji je doveo do brojnih unapređenja hemodijaliznog lečenja, hemodijalizna procedura *per se* je i dalje povezana sa brojnim akutnim i hroničnim komplikacijama. To se najviše ogleda u veoma visokom morbiditetu i mortalitetu bolesnika sa TBS. Kardiovaskularne (KV) bolesti predstavljaju vodeći uzrok smrti kod bolesnika lečenih HD (10). Na osnovu podataka dva najveća registra za TBS, *United States Renal Data System (USRDS)* i *European Registry (EDTA)*, rizik za nastanak KV komplikacija zavisi od stadijuma HBB je od 3,5 do 50 puta veći nego u opštoj populaciji, pogotovu u odmakloj fazi bolesti. KV faktori rizika u HBB mogu se podeliti u tradicionalne i netradicionalne. U netradicionalne faktore rizika spadaju: anemija, hiperhomocisteinemija, endotelna disfunkcija, hipervolemija, proteinurija, neadekvatno lučenje angiotenzina II, inflamacija, infekcija, poremećaj metabolizma minerala kao i oksidativni stres (11). *Parfrey i Foley* su podelili netradicionalne faktore rizika u dve grupe: u prvu grupu spadaju oni faktori koji se mogu prepoznati kao faktori rizika u opštoj populaciji, ali imaju višu prevalenciju u HBB (povišeni nivo homocisteina ili Lp(a) lipoprotein, kao i oksidativni stres). Druga grupa uključuje faktore rizika koji se primarno javljaju kod bolesnika sa HBB (anemija ili povišeni proizvod kalcijum – fosfor) (12).

### 1.1 Slobodni radikali i redoks homeostaza u organizmu

Kod aerobnih organizama u metaboličkim procesima dolazi do postepene oksidacije organskih jedinjenja, prenosa redukcionih ekvivalenata u formi redukovanih koenzima do kompleksa u respiratornom lancu mitohondrija, pomoću kojih se elektroni prenose na molekularni kiseonik kao krajnji akceptor elektrona. U procesu tkivnog disanja tj. oksidativnoj fosforilaciji u ćelijama koje sadrže mitohondrije, stvara se najveća količina energije. Evolutivno, aerobni organizmi su, razvijajući mehanizme korišćenja kiseonika, paralelno razvijali mehanizme zaštite od njegove toksičnosti. Toksičnost kiseonika proizilazi iz njegovog prelaska u slobodne radikale. Ovaj proces se dešava u katalizovanim reakcijama uz pomoć oksidaza i oksigenaza, transferom elektrona na molekularni kiseonik (13). U organizmu se i pod fiziološkim uslovima, produkuju slobodni radikali koji imaju važne uloge u prenosu signala u ćelijama (14, 15), regulisanju vaskularnog tonusa (16, 17), a aktivno

učestvuju i u imunološkoj regulaciji T ćelija (18) (Tabela 1). Najveći deo kiseonika nastalog metaboličkim procesima ćelija, redukuje se do vode ili transformiše uz pomoć enzima. Od preostalog, malog dela kiseonika nastaju reaktivne kiseonične vrste (ROS). ROS su porodica molekula koji se stvaraju u svim aerobnim ćelijama. Oni poseduju slobodne elektrone i veoma su reaktivni. U fiziološkim uslovima ROS se kontinuirano stvaraju kao proizvod ćelijskog disanja i enzimskih reakcija (ksantin oksidaza, mijeloperoksidaza, NO sintetaza, ciklookigenaza, lipookigenaza). Iako se ROS fiziološki stvara u mitohondrijama, ali se može sintetisati i u fagocitnim ćelijama, kao i u vaskularnom zidu i u mnogim drugim tkivima (19). Pored ROS, reaktivne azotne vrste (RNS) se javljaju tokom metaboličkih procesa u ćelijama (20). Reaktivne kiseonične i azotne vrste, imaju brojne značajne uloge, uključujući i prenos signala, eliminaciju invazivnih patogena, zarastanje rana kao i popravku oštećenog tkiva (Tabela 2).

Tabela 1. Reaktivne kiseonične i azotne vrste

REAKTIVNE KISEONIČNE VRSTE		REAKTIVNE AZOTNE VRSTE	
SLOBODNI RADIKALI	NERADIKALSKI OBLICI	SLOBODNI RADIKALI	NERADIKALSKI OBLICI
Superoxidni anjon radikal ( $O_2^{\cdot-}$ )	Vodonik peroksid ( $H_2O_2$ )	Azot-monoksid ( $\cdot NO$ )	Nitrozil katjon i anjon ( $NO^+$ i $NO^-$ )
Hidroksil radikal ( $OH^{\cdot}$ )	Hipohlorna kiselina (HOCl)	Radikal azot dioksida ( $\cdot NO_2$ )	Azotna kiselina ( $HNO_2$ )
Hidroperoksil radikal ( $HO_2^{\cdot}$ )	Singlet kiseonik ( $^1O_2$ )		Dinitro-trioksid ( $N_2O_3$ )
Alkoksil radikal ( $RO^{\cdot}$ )	Organski hidroperoksid (ROOH)		Dinitro-tetraoksid ( $N_2O_4$ )
Peroksil radikal ( $RO_2^{\cdot}$ )	Ozon ( $O_3$ )		Peroksinitrit ( $ONOO^-$ )
			Alkilil peroksinitrit (RONOO)

Iako se u organizmu nalaze u veoma niskoj koncentraciji, slobodni radikali mogu ispoljiti toksične efekte. Količina slobodnih radikala može prevazići celularni antioksidantni kapacitet, dovodeći do oksidativnog stresa. Težeći da spare elektrone u hemijskoj reakciji oksidacije, dolazi do brzog i nepredvidivog vezivanja za susedne molekule, proteine, lipide, ugljene hidrate i nukleinske kiseline od kojih su sačinjeni strukturni elementi ćelije (13). Stvaranjem novih hemijskih veza, oslobađa se energija i par elektrona prelazi u niže energetska stanja. Pored gore pomenutih endogenih, brojni egzogeni faktori dovode do prekomernog stvaranja slobodnih radikala, kao što su zagađenje, radijacija, pušenje cigareta, lekovi i ksenobiotici.

Mnoga klinička stanja izazvana zapaljenjem sklona su razvoju oksidativnog stresa (21) i raste broj dokaza koji sugeriše da je oksidativni stres uključen u patogenezu brojnih oboljenja od kojih su kardiovaskularna najčešća (22). Mnoge studije su pokazale da povećana proizvodnja ROS dovodi do započinjanja, ali i progresije KV bolesti kao i njihovih kliničkih posledica (23). Endotel ima važnu ulogu u kontroli vaskularne funkcije. Kad je netaknut, endotel proizvodi regulatorne molekule koji pružaju anti-aterogenu zaštitu. Visoko reaktivne vrste, kao što je ROS, menjaju ekspresiju endogenih vazoaktivnih medijatora endotela, doprinoseći aterogenim procesima. Upravo ta narušena ravnoteža između stvaranja slobodnih radikala i antioksidantnih odbrambenih mehanizama u korist prvih se definiše kao *oksidativni stres* (24).

Tabela 2: Reaktivne kiseonične vrste i njihove uloge u organizmu

<p><b>Superoksidni anjon radikal</b> (<math>O_2^{\cdot-}</math>)</p>	<p><math>O_2^{\cdot-}</math> stvara in vivo kao posledica redukcije molekularnog kiseonika kroz aktivnost nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaze. U toku procesa fagocitoze u leukocitima se stvara 16 puta više u odnosu na količinu stvorenu u ćelijama u mirovanju. Učestvuje u reakcionom mehanizmu indol-amin-dioksidogeneze, biosintezi prostaglandina kao i u procesu fagocitoze. U prevelikoj koncentraciji može dovesti do oštećenja tkiva. Dokazano je da povećana koncentracija <math>O_2^{\cdot-}</math> dovodi i do oštećenja DNK i do procesa lipidne peroksidacije (25).</p>
<p><b>Vodonik peroksid</b> (<math>H_2O_2</math>)</p>	<p>Vodonik peroksid nastaje dvoelektronskom redukcijom molekularnog kiseonika, redukcijom superoksid anjon radikala ili dizmutacijom superoksid anjon radikala u prisustvu SOD (26). Najstabilniji slobodni radikal, sposobnost da slobodno difunduje kroz ćelijske membrane omogućava mu da svoje toksične efekte ispoljava daleko od mesta nastanka ROS. Štetni efekti <math>H_2O_2</math> su dozno zavisni. Nastaje najviše u peroksidomima, ali i u mitohondrijama, mikrozomima i ćelijskoj membrani. Efekat vodonik peroksida obrnuto srazmeran koncentraciji katalaze u datom ćelijskom odeljku (27). Takođe, enzim glutation peroksidaza (GPx) razlaže vodonik peroksid. Indirektno, SOD može sprečiti aktivnost <math>H_2O_2</math>. Uklanjanje <math>O_2^{\cdot-}</math> onemogućava Haber-Weissov reakciju i stvaranje <math>H_2O_2</math> (28). S obzirom da ima sposobnost da prodire u jedro, <math>H_2O_2</math> u ćelijama može da izazove oštećenje DNK, sledstveno dovodeći do mutageneze i karcinogeneze. Takođe, dovodi do oštećenja ćelijske membrane i mobilisanja kalcijuma iz ćelijskih depoa, nakon čega se aktiviraju kalcijum zavisne proteaze i nukleaze (29). <math>H_2O_2</math> direktno interferira sa ćelijskim putevima koji regulišu proliferaciju (30).</p>
<p><b>Hidroksil radikal</b> (<math>OH^{\cdot}</math>)</p>	<p>Hidroksil radikal (<math>OH^{\cdot}</math>), koji nastaje nepotpunom redukcijom molekularnog kiseonika sa tri elektrona i tri protona, je najtoksičnija reaktivna kiseonična vrsta. Najodgovorniji je za citotoksične efekte kiseonika. Ima izuzetno kratko poluvreme života, što znači da brzo reaguje sa biomolekulima pored sebe. <math>OH^{\cdot}</math> reaguje sa skoro svim molekulima u organizmu: sa šećerima, aminokiselinama, fosfolipidima, DNK bazama i organskim kiselinama (31). <math>OH^{\cdot}</math> se stvara u procesu fagocitoze, kao i kad god postoje uslovi za Haber-Weissov i Fentonovu reakciju. Imajući u vidu da ne postoje specifični mehanizmi kojima se ovaj radikal uklanja iz organizma, ulogu preuzimaju mehanizmi kojima se sprečava njegov nastanak. Ti mehanizmi obuhvataju sprečavanje dizmutacije <math>O_2^{\cdot-}</math>, razlaganje <math>H_2O_2</math> do vode i vezivanje jona gvožđa i bakra (26, 27). U tom smislu njegovo toksično dejstvo inhibiraju katalaza, helatori gvožđa i SOD (32)</p>
<p><b>Singlet kiseonik</b> (<math>^1O_2</math>)</p>	<p>Singlet kiseonik nastaje u velikom broju enzimskih i neenzimskih reakcija, u kojima se formiraju holesterol, sekosterol aldehyd i ozon. Prekomerna produkcija ovih oksidanasa igra važnu ulogu u patogenezi fizioloških poremećaja kao što su dijabetes, kardiovaskularne bolesti, fotostarenje kože i pojedine vrste karcinoma. Kao visoko elektrofilni molekul, on reaguje sa nezasićenim masnim kiselinama, aminokiselinskim ostacima bogatim elektronima. Tokom akutne infekcije, kao deo procesa za uništenje bakterija, aktivisani neutrofili proizvode singlet kiseonik (33, 34).</p>

## 1.2 Antioksidativni sistem

Preduslov života u aerobnim uslovima je uklanjanje ROS i ublažavanje njihovih štetnih dejstava. Aerobni organizmi tokom evolucije su razvili složen sistem antioksidativne zaštite za sprečavanje stvaranja i 'hvatanje' već stvorenih radikala, kao i popravku oštećenja izazvanih kiseoničnim radikalima (35). Antioksidant je svaka supstanca koja, kada je prisutna u malim koncentracijama u poređenju sa oksidabilnim supstratom, značajno smanjuje ili sprečava oksidaciju tog supstrata (31). Idealan antioksidant je onaj koji smanjuje nivo ROS, istovremeno dozvoljavajući njihove korisne

uloge, kao što su ćelijska signalizacija i redoks regulacija (35). Brojna hidrosolubilna i liposolubilna antioksidativna jedinjenja, koja živi organizmi uzimaju putem hrane ili antioksidativni enzimi koje svi aerobni organizmi ekspimiraju, imaju ulogu da inaktiviraju ROS ili da prekidaju reakcije u kojima oni nastaju. Razlikujemo neenzimske i enzimске antioksidante. Antioksidantni enzimi razlažu i uklanjaju slobodne radikale (Tabela 3). Neenzimski antioksidansi predstavljaju sekundarnu liniju odbrane. Oni prekidaju lančane reakcije stvaranja slobodnih radikala. Tu spadaju endogeni produkti ćelije, egzogena jedinjenja koja se unose putem hrane i sintetički produkti. Neenzimski antioksidansi se dalje mogu podeliti na liposolubilne i hidrosolubilne, čime je predodređeno mesto njihovog delovanja. Liposolubilni (npr. vitamin E, karotenoidi, lipoinjska kiselina) deluju u unutrašnjosti membrane, a hidrosolubilni (npr. vitamin C) u ćelijskim tečnostima kao što je citosol (27, 36).

Tabela 3. Neenzimski i enzimski antioksidanti

Antioksidantni enzimi	Neenzimski antioksidanti
superoksid dismutaza (SOD) katalaza (CAT) glutation peroksidaza (GPx) glutation reduktaza (GR) glutation-S-transferaza (GST)	vitamini C i E, beta karoten, glutation, albumini, metalotionein, transferin, urati, bilirubin, ceruloplazmin, mokraćna kiselina, estrogeni, dihidrolipoinjska kiselina, koenzim Q10, flavonoidi, kalcijumski blokatori, alopurinol, deferoksamin, N-acetilcistein i inhibitori angiotenzin konvertujućeg enzima (ACE).

### 1.2.1 Superoksid dismutaza

Superoksid dismutaza (SOD) igra glavnu ulogu u zaštiti ćelije od oksidativnog oštećenja. Ona katalizuje reakciju dismutacije visoko reaktivnog superoksidni anjon radikala ( $O_2^{\cdot-}$ ) uz nastanak manje reaktivnog  $H_2O_2$  i molekularnog kiseonika, pri čemu se jedan molekul  $O_2^{\cdot-}$  prevodi u  $O_2$ , a drugi redukuje do  $H_2O_2$  (37). Nastali vodonik peroksid se pod dejstvom katalaze u peroksidomima i glutacion peroksidaze u mitohondrijama razlaže do vode i molekularnog kiseonika, čime se konačno sprečavaju oksidativna oštećenja ćelije (37). Superoksid dismutaza je primarni enzim u intracelularnom antioksidativnom sistemu zaštite i kompenzatorno povećava svoju aktivnost kada se prekomerno povećava stvaranje superoksidnog anjona. On se veoma često koristi kao pokazatelj antioksidativnog kapaciteta (32).

### 1.2.2 Glutation peroksidaza

Glutation peroksidaza (GPX) je seleno-cistein zavisni protein. Enzim se nalazi u mitohondrijama, citosolu, peroksidomima i intermembranskom prostoru, u skoro svim ćelijama. Redukuje  $H_2O_2$  u vodu i hidroperokside masnih kiselina do alkohola uz glutacion kao kofaktor (38, 39). Glutation (GSH) je najrasprostranjeniji unutarćelijski tiol (40). Tioli su klasa molekula koja se karakteriše prisustvom sulfhidrilnih ostataka (-SH) na njihovim aktivnim mestima (40). U normalnom redoks stanju ćelije, skoro sav glutacion je u redukovanom obliku (GSH), a svega oko 1% u oksidovanom obliku GSSG (glutation disulfid) (41). U stanju oksidativnog stresa, koncentracija GSH se brzo smanjuje, dok se potencijalno toksični GSSG povećava.

### 1.2.3 Glutation-S-transferaze i polimorfizmi gena za GST

Glutation transferaze (GSTs) su superfamilija enzima koji pripadaju fazi dva enzima koji igraju značajnu ulogu u reakcijama detoksikacije (42). Članovi ove velike porodice enzima su u stanju da detoksikuju brojna toksična jedinjenja i poseduju snažnu antioksidantnu aktivnost prema ROS i peroksidima (42). Superfamiliju glutacion S-transferaza čine tri familije:

- 1) citoplazmatske,
- 2) mitohondrijalne i
- 3) mikrozomalne GSTs.

Citoplazmatske GST sadrže 7 velikih klasa označenih imenima grčkih slova i skraćenicama rimskih slova: *alpha* (GST A; pet članova), *mu* (GST M; pet članova), *pi* (GST P; jedan član), *theta* (GST T; dva člana), *zeta* (GST Z; jedan član), *omega* (GST O; dva člana) i *sigma* (GST S; jedan član) (43). Svi GST izoenzimi igraju značajnu ulogu u biotransformaciji toksičnih jedinjenja i hemijskih agenasa iz okruženja (44). Pored metabolizma različitih egzogenih jedinjenja, glutation transferaze su uključene i u unutarćelijsko vezivanje, transport i katalizu leukotrijena, prostaglandina i steroidnih hormona (42). Nadalje, mnogi endogeno nastali bioprodukti oksidativnog stresa se takođe inaktiviraju delovanjem GST (45).

### 1.2.3.1 Polimorfizam gena za glutation transferazu M1

Termin genski polimorfizam odnosi se na razliku u DNK sekvenci između pojedinaca, grupa ili populacija. Genski polimorfizam predstavlja ponavljanje unutar populacije, dve ili više diskontinuiranih genetskih varijanti (alela) specifične osobine u takvim odnosima da se ne mogu održavati jednostavnom mutacijom. Određeni oblik genske varijante smatra se alelom ako je njegova učestalost veća od 1% u opštoj populaciji. Uzroci polimorfizama uključuju, polimorfizam jednog nukleotida ("snip"), ponavljanje sekvenci, insercije, delecije i rekombinacije. Najčešći polimorfizam je polimorfizam pojedinačnog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, *SNP*), u kome dolazi do zamene samo jednog nukleotida. Međutim i delecioni polimorfizam nije redak. Kod ovog tipa polimorfizma dolazi do kompletnog gubitka funkcionalnog gena što dovodi do odsustva transkripcije proteina.

Klasu *mu* gena čine proteini koji su približno 5 kb dužine i kod ljudi svih 5 gena je skupljeno zajedno na hromozomu 1p13.3 (46) raspoređeni kao 5'-GSTM4-GSTM2GSTM1-GSTM5-3' (47). Do sada su identifikovana tri alela GSTM1 klase: GSTM1\*A, GSTM1\*B i GSTM1\*0, a poslednji je rezultovao u deleciji celog gena i potom celoukupnim gubitkom enzimske aktivnosti. Distribucija delecije GSTM1 gena se kreće od 18-66 % u različitim etničkim grupama (48). Približno pola bele i azijske populacije nema aktivnost GST M1 enzima usled homozigotne delecije GST M1 gena, dok je u afričkoj populaciji delecija prisutna kod oko 25 % populacije (48,49). Bolesnici na HD kojima nedostaje aktivnost enzima GSTM1 pokazuju povećanu sklonost ka oksidativnim oštećenjima DNK i imaju veći mortalitet u odnosu na one sa aktivnim GSTM1 enzimom (50, 51). *Suvakov* i sar. su pokazali da delecija *GSTM1* gena dovodi do povećanog sadržaja proizvoda oštećenja lipida i proteina kod HD bolesnika (52). Skorašnje istraživanje u populaciji HD bolesnika je potvrdilo da je *GSTM1* nulti genotip faktor rizika za opštu, ukupnu KV smrtnost, kao i za smrtnost usled infarkta miokarda (53). Zaključak navedene studije ukazao je na mogućnost stratifikacije HD bolesnika na osnovu *GST* genotipa, što bi moglo dovesti do pokušaja individualizacije lečenja bolesnika antioksidantima (53).

## 1.3 Povezanost oksidativnog stresa i hronične bubrežne slabosti

Oksidativni stres predstavlja glavno obeležje TBS. Kako oboljenje bubrega napreduje i razvija se TBS, opisano je i povećano stvaranje slobodnih radikala (54). Takođe, pokazano je da se aktivnost GPX i SOD smanjuje sa progresijom bubrežne slabosti (55). Oksidativni molekuli doprinose napredovanju bubrežnog oštećenja potenciranjem bubrežne ishemije, iniciranjem glomerularne lezije, ćelijske smrti, apoptoze i konačno stimulisanjem teškog zapaljenskog procesa (56, 57). Štaviše, oksidativni stres značajno doprinosi nastanku nekoliko stanja koji predisponiraju hronične slabosti bubrega (HBS), kao što su dijabetes, hipertenzija i ateroskleroza dovodeći posredno do progresije bubrežne slabosti (56). U bubrežnoj slabosti se može uočiti nagomilavanje ROS i/ili smanjenje antioksidativnih kapaciteta (56). Konkretno, nakupljanje ROS, naročito  $O_2^{\cdot-}$ , dovodi do inaktivacije i deficita NO koji je ključni antioksidant koji štiti bubrežnu funkciju povećavajući protok krvi kroz

bubrege, povećavanjem natriureze, regulisanjem tubulo-glomerularne funkcije i održavanjem homeostaze tečnosti i elektrolita. Nedostatak NO i visok nivo  $O_2^{\cdot-}$  u plazmi se smatraju ključnim promoterima oksidativnog stresa. Nekoliko *in vivo* studija naglasilo je da je HBS stanje deficita NO<sup>-</sup> a životinjski modeli sa hipertenzijom su pokazali povišene vrednosti  $O_2^{\cdot-}$  u endotelu i u bubrezima. Životinje sa deficitom NO razvile su retenciju soli, hipertenziju, albuminuriju i glomeruloskelrozu. Oralni unos prekursora NO, L-arginina kod nefrektomisanih pacova povećao je procenjenu jačinu glomerulske filtracije (eGFR) i poboljšao funkciju glomerula (56-58). Mnoge studije su zaključile da nedostatak NO zbog inaktivacije sa  $O_2^{\cdot-}$  ili zbog smanjenog stvaranja NO u bubrezima doprinosi napredovanju HBS (56). U uslovima ograničenog substrata, kofaktorska oksidacija (59) ili posttranslaciona modifikacija tiola (60) endotelna NO sintetaza je pokazano da se odvaja, pri čemu umesto da oksidira arginin i da stvara citrulin i NO, elektroni se prenose univalentno na kiseonik i daju  $O_2^{\cdot-}$  (61). *Yilmaz* i sar. kao i *Oka* i sar. su pokazali da eritrociti kod bolesnika u ranim stadijumima HBB (1-2) imaju povišen oksidativni stres poredeći sa zdravim ispitanicima (62, 63). Nadalje, pokazatelji oksidativnog stresa su snažno obrnuto povezani sa eGFR i njihov nivo se progresivno povećava sa smanjenjem bubrežne funkcije (62). Slične rezultate su pokazali *Terawaki* i sar. u kohorti sa 55 nedijaliznih bolesnika sa različitim stadijumima bubrežne slabosti (prosečan eGFR 50 ml/min). Prema njihovim podacima, nivo oksidiranog albumina u plazmi se progresivno povećavao sa pogoršanjem HBS (64). U jednoj drugoj studiji preseka, biomarkeri oksidativnog stresa kao što su nivoi 8-izoprostana i serumskog totalnog antioksidantnog kapaciteta (TAC) menjali su se postepeno zajedno sa opadanjem bubrežne funkcije kod bolesnika sa HBB 1-4 i eGFR je bila jak i nezavisan prediktor nivoa 8-izoprostana, nakon prilagođavanja za nekoliko faktora (65). Međutim, ovi nalazi nisu u skladu sa rezultatima *Oberg* i sar. koji nisu pronašli povezanost između nivoa 2-izoprostana i eGFR u kohorti od 60 bolesnika (HBB 3-5). Relativno mali broj ispitanika i distribucija u svakoj fazi (60 % su bili u fazi 4-5 HBB, moglo bi se identifikovati kao ozbiljna limitacija navedene studije (66). Jedna druga prospektivna studija procenjivala je nekoliko pokazatelja oksidativnog stresa pre i posle transplantacije kod 19 bolesnika. Pre transplantacije nivoi CRP-a u plazmi, faktora tumorske nekroze- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-6, F2-izoprostana i karbonil proteinskih grupa su bili značajno povišeni u odnosu na zdrave dobrovoljce u kontrolnoj grupi, te su potom značajno opali nakon transplantacije bubrega. Stoga, autori su sugerisali da obnavljanje funkcije bubrega sa transplantacijom može igrati značajnu ulogu u suzbijanju hroničnog zapaljenja i oksidativnog stresa usled TBS i njenog lečenja (67).

Oksidativni stres prati HBS čak i u ranim fazama, napreduje zajedno sa slabljenjem bubrežne funkcije i postaje teži u TBS. Oksidativni stres i HBS i njihova međusobna povezanost može voditi ka daljem pogoršanju bubrežne slabosti (68).

#### **1.4 Povezanost oksidativnog stresa i hemodijalizne procedure**

Kod bolesnika lečenih hroničnom HD brojni faktori doprinose proizvodnji slobodnih radikala sa jedne strane, dok sa druge strane smanjen antioksidantni kapacitet dovodi do dobro definisanog koncepta oksidativnog stresa. Takođe, ovi bolesnici imaju značajan elektrolitni dizbalans, visoke koncentracije citokina i zapaljenskih medijatora. Uz to ovi bolesnici se obično leče od anemije kao i različitih metaboličkih poremećaja, koji takođe mogu biti uzrok oksidativnog stresa. Ipak, veruje se da je glavni uzrok oksidativnog stresa HD bolesnika nagomilavanje uremijskih toksina, bioinkompatibilnost dijaliznih membrana i kontaminacija dijalizata. Postoje brojni dokazi koji ukazuju da je povišen nivo oksidativnog stresa glavno obeležje HD procedure, koji je rezultat gubitka antioksidanata tokom same HD procedure i nagomilavanje oksidativnih proizvoda (68). *Chen* i sar. su sugerisali da HD procedura dovodi do stvaranja  $O_2^{\cdot-}$ , moćnog reaktivnog molekula kiseonika (69), dok je jedna druga studija pokazala direktan porast plazmatskog nivoa ROS nakon svake HD procedure (70). Tokom HD procedure, krv je izložena dijaliznim membranama i dijaliznoj tečnosti, što započinje aktivaciju komplemenata, trombocita i leukocita. To posledično dovodi do stvaranja ROS već nekoliko minuta



nakon početka HD (70-72). *Maher* i sar. su pokazali da proizvodi lipidne peroksidacije rastu 30 minuta nakon početka HD procedure i pretpostavili su da je mogući patofiziološki mehanizam ovih događaja aktivacija komplemenata ili oslobađanje slobodnih masnih kiselina usled heparina (71). *Loughrey* i sar. su upoređivali bolesnike lečene hroničnom HD i bolesnike u stadijumu 5 HBB lečenih konzervativnom terapijom. Poredeći sa bolesnicima u stadijum 5 HBB, bolesnici lečeni HD imali su značajno više pokazatelje lipidne peroksidacije (MDA) i niže koncentracije antioksidanata u plazmi (vitamin C i selen), ukazujući da se oksidativni stres povećava HD procedurama (72). Nadalje, *Nguyen-Khoa* i sar. pokazali su da trajanje dijaliznog tretmana je značajan nezavisan faktor oksidativnog stresa (73). Ova observacija bi mogla biti paradoksalna, s obzirom da produžena dijalizna sesija, kao što je produžena noćna hemodijaliza, ima brojne blagotvorne ishode.

Za bolesnike lečene HD karakteristično je povećanje nivoa inflamacije i lipidne peroksidacije (74). Sama HD procedura promovira stvaranje i nagomilavanje oksidativnih proizvoda kroz aktivaciju trombocita, komplemenata i polimorfonukleara. Nakon HD sesije, serumski ROS su bili viši nego pre početka dijalizne sesije u kohorti od 80 stabilnih HD bolesnika (75). Dve studije su pokazale da su plazmatski nivoi ROS porasli kod HD bolesnika poredeći sa zdravim kontrolama (76, 77). Da bi se ovaj pronalazak objasnio, *Grenata* i sar. su sugerisali da disfunkcija respiratornog sistema mitohondrija može biti razlog stvaranja ROS, koja je oštećena u HBS i dalje pogoršana kod HD bolesnika (77). *Handelman* i sar. su pokazali da je nivo F2-izoprostana u plazmi snažno povezan sa vrednostima CRP u HD grupi, sugerišući da postoji tesna veza između oksidativnog stresa i zapaljenja kod bolesnika lečenih hroničnim hemodijalizama (78).

Kod bolesnika na HD registrovana je i smanjena aktivnost SOD i GPX (62). Izgleda da intravenska primena heparina može da dovede do otpuštanja ekstracelularne SOD sa površine endotelnih ćelija (79). Obzirom da je ekstracelularna SOD važna odrednica bioraspodivnosti azot oksida u endotelnim ćelijama, bilo kakav gubitak ovog enzima remeti normalnu endotelnu funkciju (80). *Mimić Oka* i sar. su takođe opisali značajno niže vrednosti aktivnosti katalaze u plazmi, povezane sa većim stvaranjem vodonik peroksida kod bolesnika sa TBS (55). Čak i ne-enzimski sistem odbrane od oksidativnog stresa je kompromitovan kod bolesnika sa TBS. Naime, HD procedura sama po sebi doprinosi gubitku vitamina C, glavnog ne-enzimskog antioksidantnog molekula (81). Postoje dokazi da niska koncentracija vitamina C u plazmi može biti prediktor kako fatalnih tako i ne-fatalnih kardiovaskularnih događaja kod bolesnika lečenih HD (81). Takođe, *Taddei* i sar. su pokazali da niske koncentracije vitamina C u plazmi mogu uticati na endotel zavisnu vazodilataciju i doprineti endotelnoj disfunkciji i aterosklerotskim procesima (82).

#### **1.4.1 Tipovi dijaliznih membrana i uticaj na oksidativni stres**

Iako HD svakako ima brojne benefite za same bolesnike obbolele od TBS, sama procedura može da izazove zapaljensku reakciju i da doprinese razvoju oksidativnog stresa. Opisane su brojne posledice upotrebe dijaliznih membrana. Tokom HD krv bolesnika dolazi u kontakt sa nekoliko komponenti ekstrakorporalnog sistema uključujući igle, krvne linije, tečnost za dijalizu i dijalizatore. Ovaj kontakt dovodi do pokretanja čitavog niza bioloških i kliničkih reakcija koje su obuhvaćene nazivom bio(in)kompatibilnost (83). Termin bio(in)kompatibilnost označava složene reakcije između ne-biološkog materijala i/ili uređaja i čitavog organizma. Na kliničkom planu to se manifestuje nizom akutnih (pirogene reakcije, alergijske reakcije, sindrom „prve upotrebe“, arterijska hipotenzija) i hroničnih poremećaja (hronično zapaljenje, dijalizna amiloidoza, malnutricija, infekcije, anemija, poremećaj sna i oksidativni stres). Membrana za dijalizu je centralna komponenta dijaliznog sistema i kao takva ima značajnu ulogu u nastanku reakcija bioinkompatibilnosti. Neadekvatna biokompatibilnost dijaliznih membrana smatra se najvažnijim uzrokom stvaranja slobodnih radikala tokom HD (84). Hemodijalizne membrane su se razvijale u nekoliko faza da bi unapredile svoju biokompatibilnost i HD adekvatnost, da bi povećale sposobnost smanjenja oksidativnog stresa i zapaljenja, kao i da bi bolje

uklanjale uremijske toksine. Sposobnost HD membrana da uklanjaju rastvorljive čestice iz krvi zavisi od veličine njihovih pora. Membrane se takođe dele na visoko ili nisko efikasne u zavisnosti od sposobnosti da uklanjaju male čestice. Visoko-propusne i nisko-propusne membrane se razlikuju na osnovu sposobnosti da uklanjaju velike molekule. Visoko-propusne membrane imaju veće pore nego nisko-propusne, što dozvoljava difuziju veće količine molekula srednje molekulske mase kao što je  $\beta$ 2-mikroglobulin, koji je nezavisan prediktor za sveopšti mortalitet (85-87). Nekoliko studija je pokazalo da je primena visoko-propusnih membrana povezana sa poboljšanjem klirensa molekula srednje molekulske mase (88). U poređenju sa nisko-propusnim membranama, visoko-propusne membrane imaju i druge prednosti: manju prokoagulantnu aktivnost i manju aktivaciju komplemenata, manji inflamatorni odgovor sa manjom sekrecijom citokina i proteina akutne faze (IL-6, CRP), bolje dejstvo na lipidni profil i manji rizik od infekcija (89). Ove prednosti objašnjavaju učestaliju primenu visoko-propusnih membrana koje poboljšavaju ishod bolesnika i stope preživljavanja. Prethodnih godina, strategija HD je bila da se koriste ultra visoko-propusni protein-vezujući dijalizatori i tehnike koristeći protein adsorbujuće površine membrana. Takve tehnike kombinuju direktno uklanjanje velikih molekula i njihovu adsorbciju (90). Pored razlike u propusnoj moći, dijalizne membrane se razlikuju i po materijalu od kojeg su napravljene. U Tabeli 4 je prikazano da HD membrane mogu biti napravljene od prirodnih ili sintetskih polimera nezavisno da li su visoko ili nisko propusne (91).

Nekoliko istraživačkih grupa je pokazalo da tip dijalizne membrane koja se koristi kod HD bolesnika može imati značajnu ulogu i u nastanku oksidativnog stresa. *Dasgupta* i sar. su pronašli da je primena polisulfonskih dijalizatora praćena nižim nivoom stvaranja proizvoda lipidne peroksidacije, poredeći sa kuprofanskim membranama (92). Jedna druga studija je pokazala da u poređenju sa kuprofanskim, regenerisane celulozne mebrane su bile povezane sa nižim stvaranjem pokazatelja oksidativnog stresa (93). Efekti ova dva tipa membrana na stvaranje oksidativnog stresa pripisani su povećanoj proizvodnji  $H_2O_2$  i stvaranju vode, zbog regenerisanih celuloznih membrana kroz aktivnosti katalaze i GPX. U saglasju sa ovim saznanjima, drugi istraživači su pokazali da bolesnici koji se leče HD sa kuprofanskim membranama pokazuju značajno viši nivo ROS u monocitima i PMN u poređenju sa onima koji se dijaliziraju sintetskim polusulfonskim membranama (94,95).

Tabela 4. Sastav hemodijaliznih membrana: prednosti i ograničenja

TIP MEMBRANE	NAZIV	PREDNOSTI	OGRANIČENJA
Nemodifikovana celulozna	Cuprophan®	Dobro odstranjuje male supstance Veća adekvatnost HD tretmana u odnosu na modifikovane celulozne i PS membrane	Veća aktivacija PMN i komplemenata u odnosu na modifikovane celulozne i sintetske membrane Penetracija bakterijskih produkata iz dijalizata u krvotok Ne uklanjana molekule srednje veličine iz krvi
Modifikovana celulozna	Celulozno acetatna (CA) (zamena - hidroksilne grupe - acetatnom)	Manja aktivacija komplemenata u odnosu na nemodifikovane celulozne membrane	Apoptoza neutrofila veća u odnosu na PS membrane Veća aktivacija komplemenata u odnosu na sintetske membrane

	Hemophan® (-hidroksilne grupe zamenjene -tercijalnim aminima)	Manja aktivacija komplementa u odnosu na nemodifikovane celulozne	Veća produkcija proinflammatoryh citokina u odnosu na PAM membrane
	Sintetska modifikovana celulozna (SMC) (-hidroksilne grupe parcijalno zamenjene - benzil grupama)	Manja aktivacija komplementa u odnosu na nemodifikovane celulozne membrane	Manje uklanjane $\beta_2$ - mikroglobulina u odnosu na sintetske membrane
	Kupramonijum rajonska vlakna	Manja aktivacija komplementa u odnosu na Hemophan® i nemodifikovane celulozne membrane	Veći gubitak albumina nego kod PS i PAM membrane
Sintetske	Polikarbonatna (PC)	Prirodno hidrofilnih karakteristika Niža aktivacija komplementa u odnosu na nemodifikovane celulozne membrane	Veća produkcija inflammatoryh markera u odnosu na PAM membrane Veća aktivacija komplementa u odnosu na PAN i PS membrane
	Polisulfonska (PS)	Dobro odstranjivanje $\beta_2$ - mikroglobulina Manja stopa mortaliteta u odnosu na celulozne membrane	Izaziva aktivaciju neutrofila Veća aktivnost neutrofila u odnosu na EVAL membrane Povećana produkcija proinflammatoryh citokina
	Poliamidna (PAM)	Odlično odstranjivanje $\beta_2$ - mikroglobulina	Rizik od anafilaktičke reakcije Perzistentna neznatna aktivacija komplemena
	Polietersulfonska (PES)	Odlično uklanjanje srednje velikih molekula	Adsorpcija proteina na površini membrane Perzistentna aktivacija imunskog sistema
	Poliakrilonitrilna (PAN)	Adsorpcija proinflammatoryh, malih i srednje velikih proteina i produkata bakterija Niža neutrofilna aktivnost u odnosu na PMMA membrane	Produkcija bradikinina Veći rizik od anafilaktičkih reakcije u odnosu na druge sintetske membrane Perzistentna neznatna aktivacija komplementa
	Poli (metil-metakrilat) (PMMA)	Odlično uklanjanje srednje velikih molekula Niža produkcija proinflammatoryh citokina u odnosu na PS membrane Pozitivni efekti na anemiju	Perzistentna neznatna aktivacija komplementa Uzrokuje srednje izraženu leukopeniju

	Poliester polimer legure (PEPA)	Niska permeabilnost albumina Dobro odstranjivanje $\beta_2$ -mikroglobulina	Perzistentno niska aktivacija komplemента
	Etilen-vinil alkohol kopolimer (EVAL)	Prirodno hidrofilne osobine sa niskom adsorpcijom proteina Uklanja molekule velike molekularne mase Bolja redukcija oksidativnog stresa u odnosu na CA membrane Niža aktivacija neutrofila u odnosu na PS membrane	Nisu opisane
Bioaktivne membrane	Obložene vitaminom E	Smanjuje oksidativni stres Poboljšava zapaljenski status i anemiju	Perzistentna niska aktivacija komplemента kao kod PS membrana

Tabela preuzeta i adaptirana od *Kohlová M i sar. (89)*

Pored proizvodnje ROS, nekoliko istraživača je proučavalo uticaj različitih membrana za HD na lipidnu peroksidaciju. *Sevillano i sar.* su pronašli da HD sa kuprofanskim membranama izaziva porast koncentracije MDA u eritrocitima, dok su se istovremeno nivoi smanjili sa HD procedurama uz celulozno acetatne membrane (96). *Kosch i sar.* sproveli su randomizovanu, jednostruko-slepu, studiju preseka sa ciljem da utvrde uticaj različitih HD membrana na oksidativni stres i endotelnu disfunkciju. Ukupno dvanaest stabilnih hemodijaliznih bolesnika su randomizovali na kuprofansku i polisulfonsku membranu za dijalizu. Protokom-posredovana dilatacija brahijalne arterije i plazmatski nivoi alfatokoferola (AT) i ox-LDL su procenjeni pre i posle dijalizne procedure. Nasuprot polisulfonskoj, HD sa kuprofanskom membranom bila je praćena značajnim smanjenjem kako protok-posredovanom dilatacijom brahijalne arterije tako i serumskim nivoima AT, sugerišući da je vrsta membrane značajna odrednica endotelne disfunkcije i oksidativnog stresa. Međutim, na nivo ox LDL nije uticao ni jedan tretman (97). Nasuprot tome, neki istraživači nisu pronašli razliku u efektima dijalize sa kuprofanskim membranama u odnosu na dijalizu sa polisulfonskim membranama po pitanju stvaranja ROS (98), dok su neke druge studije pokazale da polisulfonske membrane stvaraju manji oksidativni stres od kuprofanskih membrana (93). Jedna druga studija poredila je celulozne membrane obložene vitaminom E i polisulfonske membrane. Membrane od celuloze di-acetata su dovele do povećanog oštećenja DNK oksidativnim stresom u leukocitima poredeći sa polisulfonskim membranama, dok je oštećenje DNK bilo približno isto kod vitaminom E obloženih membrana i polisulfonskih membrana (99). Slično tome, polisulfonske membrane su dovele do viših nivoa MDA u plazmi i do smanjene GPX aktivnosti i nivoa selena u plazmi, poredeći sa modifikovanom celuloznom membranom (hemofanskom) kod hemodijaliznih bolesnika (100). Postoje podaci da je regenerisana celulozna membrana dovela do značajnog porasta nivoa serumske mijeloperoksidaze (MPO), naprednih produkata oksidacije proteina (AOPP) i 8-hidroksi-2'-deoksigunozina, poredivši sa polisulfonskim membranama. Autori su došli do zaključka, da biokompatibilnost HD membrana ima ključni uticaj na razvoj oksidativnog stresa povezanog sa HD procedurom (101). Dijaliza sa kuprofanskim membranama dovodi do većeg porasta MDA i većeg smanjenja antioksidanata (vitamina E, katalaze) poredeći sa polisulfonskim membranama (102). Međutim, po našim saznanjima, nisu rađene studije koje su ispitivale preživljavanje bolesnika i velike kardiovaskularne događaje u zavisnosti od primene gore navedenih membrana. Stoga je tip dijalizne membrane koja se koristi tokom HD značajna odrednica statusa oksidativnog stresa i može imati značajnu ulogu u razvoju endotelne disfunkcije.

Iako je više istraživača proučavalo efekte različitih tipova dijaliznih membrana na stvaranje oksidativnog stresa, rezultati su i dalje kontradiktorni.

### 1.4.2 Hemodijalizni modaliteti i oksidativni stres

Poredeći sa standardnom HD, lečenje hemodijafiltracijom (HDF) kod hemodijaliznih bolesnika ima značajne pozitivne efekte na pokazatelje oksidativnog stresa i zapaljenja i stoga može imati zaštitnu ulogu protiv ateroskleroze i KVB (103). Blagotvorni zaštitni uticaj HDF na oksidativni stres je posledica nekoliko faktora: ultračista dijalizna tečnost, biokompatibilne membrane, hemodinamska stabilnost i bolja kontrola anemije. Takođe, poboljšanje klirensa uremijskih toksina velike i srednje molekulske težine, kao što su inflamatorni citokini, homocistein, poliamini i  $\beta$ 2- mikroglobulin (103-106). Nakon 6-mesečnog perioda lečenja standardnom HD, *Filiopoulos* i sar. nastavili su lečenje 9 stabilnih HD bolesnika sa postdilucionom hemodijafiltracijom u periodu od 9 meseci i pokazali su da je na kraju studije postajao značajan porast totalnog antioksidantnog kapaciteta kao i značajno smanjenje markera oksidativnog stresa kao što su SOD i ROS. Nadalje, hemodijafiltracija je smanjila zapaljenje, što je pokazano smanjenjem visoko osetljivog CRP-a i IL-6 (107).

### 1.5 Pokazatelji oksidativnog stresa kod bolesnika na hemodijalizi

Direktno merenje ROS i RNS *in vivo* je veoma teško i često nepouzđano zbog veoma kratkog poluživota slobodnih radikala kao i posledičnih veoma brzih promena koncentracije istih. U pokušaju da se prevaziđu ove poteškoće, uvedene su metode za određivanje stabilnih krajnjih proizvoda oksidacije makromolekula (Tabela 5).

Tabela 5. Biopokazatelji oksidativnog oštećenja mereni u plazmi ili urinu

Biomarkeri oksidativnog oštećenja		
Proteini	Lipidi	DNK
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tiol (-SH) grupe</li> <li>• Karbonilne grupe</li> <li>• AOPP</li> <li>• Nitrotirozin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• MDA</li> <li>• MDA-konjugati</li> <li>• F2-izoprostani</li> <li>• 4-HNE</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 8-OH-deoksiguanozin</li> <li>• 5-OH-metil uracil</li> </ul>

AOPP- uznapredovali proizvodi oksidacije proteina (engl. *advanced oxidation protein products*); AGEs- uznapredovali krajnji proizvodi glikozilacije; MDA- malondialdehid, 4-HNE, četiri hidroksi nonenal

Modifikovanje bioloških makromolekula (proteina, lipida, DNK i ugljenih hidrata) se dešava stvaranjem ROS *in vivo*. Njihovi proizvodi se mere u različitim biološkim uzorcima (plazma, serum, ćelijski lizat, homogenat tkiva) i mogu da odraze stepen oksidativnog stresa u različitim patološkim stanjima. Proteini su vrlo skloni oksidativnom oštećenju. Značajan proizvod oksidativnog oštećenja proteina je smanjenje količine tiol (SH-) grupa. SH-grupe albumina se smatraju da su mete za reakciju sa slobodnim radikalima. Ostaci aminokiselina Hcy i Cys formiraju disulfide u reakcijama oksidacije i spremene su za dalju modifikaciju. Gubitak tiola je opisan kod HBS (58,108). Lipidi su takođe pogođeni oksidativnim oštećenjima. Određivanje obima peroksidacije uključuje pre svega merenje MDA i ostalih aldehida koji predstavljaju degradacione produkte lipidne peroksidacije i u stanju su da reaguju sa tiobarbituričnom kiselinom. MDA je triugljenični aldehid, koji može nastati različitim mehanizmima. *Dahle* i sar. su prvi opisali mehanizam nastanka zasnovan na činjenici da samo oni peroksidi koji poseduju  $\alpha$  ili  $\beta$  nezasićene veze su sposobni da se podvrgnu ciklizaciji i da konačno formiraju MDA (109). Nepoznata je distribucija MDA kao i referentna koncentracija u opštoj populaciji. Međutim, dokumentovano je da su koncentracije MDA u plazmi povišene kod različitih bolesti,

uključujući i HD (110) u porođenje sa zdravim dobrovoljcima. Opisano je da je povišen nivo MDA povezan sa povećanim kardiovaskularnim rizikom (111, 112). Malondialdehid je u stanju da veže proteine i formira stabilne proizvode, koji se takođe nazivaju uznapredovalim produktima peroksidacije lipida. Ove modifikacije mogu prouzrokovati strukturne i funkcionalne promene oksidovanih proteina. Pored činjenice da su bioprodukti oksidativnog oštećenja makromolekula povišeni, pokazano je da njihove koncentracije kod bolesnika sa HBS dalje rastu kako opada bubrežna funkcija (62, 113)

## **1.6 Posledice oksidativnog stresa kod bolesnika na hemodijalizi**

### **1.6.1 Inflamacija**

Oksidativni stres i zapaljenje su nerazdvojno povezni i glavne su karakteristike HBS kao i pokretači daljeg napredovanja HBS. Prisustvo i težina sistemskog zapaljenja doprinosi nastanku oksidativnog stresa koji je povezan sa HBS, što predstavlja uslov u kom stvaranje ROS premašuje kapacitet antioksidantne zaštite (114). Zapaljensko mikrookruženje posredovano citokinima, indukuje prekomernu ekspresiju reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta, bioaktivnih lipida kao i adhezivnih molekula. Citokini kontrolišu zapaljenski odgovor i posreduju u njihovim posledičnim efektima preko proteina akutne faze, kao što su CRP, fibrinogen i albumin. U skorašnjoj studiji koja je analizirala povezanost između nekoliko inflamatornih biomarkera i napredovanja HBS, autori su izvestili da su povišeni cirkulišući nivoi fibrinogena i TNF-a, kao i smanjen serumski albumin povezani sa brzim gubitkom funkcije bubrega kod bolesnika sa HBS i ovi markeri su nezavisni prediktori napredovanja HBS (115).

Kod velikog broja bolesnika, koji se leče ponavljanim hemodijalizama postoji serološki dokaz o povišenim nivoima cirkulišućih pokazatelja zapaljenja, kao što su interleukin 6 (IL-6) i CRP (116, 117). IL-6 jedan je od pokazatelja zapaljenja i zavisno od okolnih činioca, može imati i pro-inflamatorne i anti-inflamatorne efekte. Izlučuju ga makrofagi i T limfociti, kao i glatkomišične ćelije u zidovima krvnih sudova ali i skeletni mišići, osteoblasti i adipociti (116). Svoje pro-zapaljenske efekte ostvaruje putem započinjanja imunskog odgovora podstaknutog traumom tkiva, tako što stimuliše sintezu IL-10, dok antiinflamatorno deluje tako što inhibiše izlučivanje faktora nekroze tumora (TNF) i interleukina 1 (IL-1). On je reaktant akutne faze, slobodno prolazi hemato-encefalnu barijeru i inicira sintezu prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) u hipotalamusu, te tako posredno učestvuje u povećanju telesne temperature. U odgovoru na infektivne agense, luče ga makrofagi a IL-6 tada preko *toll like* receptora (TLR) aktivira intracelularne signalne puteve, što vodi amplifikaciji inflamatornog odgovora i dodatnoj produkciji citokina (118).

### **1.6.2 Anemija**

Anemija je često prisutna kod bolesnika sa TBS i uglavnom je posledica nemogućnosti obolelih bubrega da stvaraju dovoljnu količinu eritropoetina da bi otpočela eritropoeza i posledično korigovala anemija (119). Prisustvo zapaljenja kod HD bolesnika je takođe povezano sa smanjenim odgovorom na agense stimulacije eritropoeze (ASE) koji se koriste za lečenje anemije (120, 121). Nivo nekoliko pro-zapaljenskih citokina je povišen kod bolesnika na HD, kao što su IL-1, faktor tumorske nekroze alfa (TNF- $\alpha$ ), interferon  $\gamma$  (IFN) i IL-6, a koji su u stanju da inhibiraju eritropoezu i da doprinose pogoršanju anemije (122). Tako je pokazano da IL-6 ometa proliferaciju koštane srži (123) i da je povezan i sa dozom ASE kod HD bolesnika (124). Takođe, neke studije su pokazale da je korekcija anemije uz ASE bolja kada se smanji oksidativni stres (125). Uz to, anemija sama po sebi pogoršava oksidativni stres kroz faktore kao što su tkivna hipoksija i promene u metabolizmu kateholamina.

Primena intravenskog gvožđa dodatno pojačava oksidativni stres (126). Ovo naročito dolazi do izražaja pri primeni gvožđa niskomolekularne težine (127). Primena i.v. gvožđa saharoze kod hemodijaliznih bolesnika bila je praćena sa značajnim porastom slobodnog gvožđa, ukupnog peroksida

i bioloških pokazatelja lipidne peroksidacije koji su se nakupili gotovo odmah nakon početka primene gvožđa i dostigli maksimalne nivoe kroz 30 minuta (128). Slično navedenoj studiji, *Muller* i sar. su pronašli da su bolesnici koji su primali intra vensko (i.v.) gvožđe tokom HD sesije imali značajno povećano stvaranje MDA i specifična oštećenja DNK izazavanja oksidativnim stresom nakon 30 minuta od početka primene infuzije sa gvoždem (99). *Tovbin* i sar. pokušali su da utvrde uticaj primene i.v. gvožđa na oksidaciju proteina i zapaljenje kod HD bolesnika. Intravenska primena 100 mg gvožđa posle 3,5 sati dijalize sa visokopropusnim membranama dovodi do porasta oksidacije proteina za 37 % što je ustanovljeno preko nivoa AOPP (129). Nasuprot ovome, jedna druga studija nije pronašla vezu između nivoa nekoliko markera oksidativnog stresa u plazmi (GPX, SOD, TAC, vitamin C i MDA), kao i nivoa feritina, saturacije transferina i intravenske primene gvožđa kod 34 stabilna HD bolesnika koji se leče ASE (130).

Iako je široko prihvaćeno, da je i.v. primena gvožđa snažno povezana sa oksidativnim odgovorom tokom HD sesija, nedostatak dokaza koji podržavaju direktnu vezu između i.v. primene gvožđa i loših kliničkih ishoda, kao i nesporna korisna uloga korekcije anemije na oksidativni stres, zapaljenje i preživljavanje dovodi nas do snažne preporuke za oprezanu i pravilnu primenu gvožđa u cilju lečenja anemije kod HD bolesnika (68).

### **1.6.3 Kardiovaskularne komplikacije**

Tokom prvih godina lečenja hemodijalizom, HD procedura je trajala do 20 h i odvijala se jednom do dva puta nedeljno u bolničkim uslovima i od tada do danas ona produžava život obolelima od TBS (131). HD koja se odvija tri puta nedeljno u kućnim uslovima uvedena je u kliničku praksu 1964. godine (132, 133). Nakon što se vreme trajanja HD skratilo tokom 80-ih godina, zahvaljujući napretku dijalizne procedure, bolesnici i nefrolozi suočili su se sa nizom problema, iako se klinički ishod dijalizne prokripcije smatrao prihvatljiv. *Degoulet* i sar. (134) 1982. g. izvestili su o velikoj učestalosti intradijaliznih neželjenih događaja i o visokoj stopi kardiovaskularnog mortaliteta kod bolesnika na HD iako nije utvrđena direktna veza između HD prakse i ishoda bolesnika. Danas je poznato da bolesnici na HD imaju znatno povećanu stopu smrtnosti u odnosu na opštu populaciju, uglavnom od kardiovaskularnih uzroka (135). Kardiovaskularni mortalitet je povećan 20-30 puta kod HD bolesnika (135, 136). Postoje podaci koji ukazuju da nakon 5 godina lečenja HD, približno polovina bolesnika umire (136). Stoga je jasno da su bolesnici na hemodijalizi skloni razvoju i napredovanju kardiovaskularnih bolesti (137). Kardiovaskularne bolesti (KVB) se mogu podeliti u dve grupe: ishemijske i ne-ishemijske KVB. Ishemijsku grupu čine bolest koronarnih arterija, ishemijska kardiomiopatija, cerebrovaskularni insult (CVI ili šlog) i periferna arterijaska bolest. Neishemijske KVD su aritmije i valvularna bolest srca. Ateroskleroza predstavlja glavni patološki mehanizam u razvoju ishemijske bolesti srca, cerebralne bolesti i periferne arterijske bolesti (138). Iako je više istraživača pokušalo da ustanovi snažnu vezu između oksidativnog stresa i progresije ateroskleroze, tačan patofiziološki mehanizam još nije jasan. Pokazano je da oksidativni stres dovodi do smanjenja nivoa azot monoksida i posledično dovodi do endotelne disfunkcije (139) što direktno utiče na vaskularni tonus. Čak i jedna HD procedura može favorizovati endotelnu disfunkciju zbog razgradnje azot monoksida i povećanja nivoa ROS (140).

Raste broj dokaza koji ukazuju da je oksidativni stres zajedno sa inflamacijom ključni činilac u razvoju i napredovanju vaskularnih kalcifikacija koje doprinose sveukupnom i kardiovaskularnom mortalitetu kod bolesnika sa HBS (141-143). Prvi korak u nastanku vaskularnih kalcifikacija je disfunkcija endotela (144). Dokazano je da je HD procedura okidač za nakupljanje brojnih oksidativnih faktora, te samim tim doprinosi razvoju endotelne disfunkcije i KVB (145), dok proaterogeni molekuli kao što je vaskularni endotelni faktor rasta i pokazatelj oksidativnog stresa antioksidantni enzim Cu/Zn SOD su snažno povezani sa dužinom lečenja HD (144). Slično, dužina lečenja HD (u godinama) ima tendenciju povezanosti sa kalcifikacionim skorom koronarnih arterija (145). U multivarijantnom

modelu, lipidni peroksidi su snažan prediktor kalcifikacija koronarnih arterija, nezavisno od nekoliko tradicionalnih faktora rizika za aterosklerozu (146).

### **1.7 Vitamin E i dijalizne membrane obložene vitaminom E**

Da bi se prevazišle prethodno navedene komplikacije lečenja HD, razmatrane su nove strategije u razvoju membrana za HD. Glavni fokus je bio na unapređenju biokompatibilnosti kao i poboljšanje antioksidantne zaštite ćelija krvi, cirkulišućih proteina i lipida korištenjem bioaktivnih jedinjenja (147, 148).

Vitamin E ima osam izoformi, a jedna od njih je *α tokoferol* koji je najpotentniji poznati liposolubilni antioksidant u prirodi. Vitamin E deluje tako što inhibira oksidaciju LDL i ograničava ćelijski odgovor na oksidovani LDL. Takođe, smanjuje nivoe LDL(-), čestice za koju je sugerisano da je uključena u aterogenezu i koja je prisutna u visokim koncentracijama kod HD bolesnika (149). Vitamin E može da se primeni kao dijetna suplementacija, ili kao integralni deo HD procedure uz korišćenje membrana obloženih vitaminom E. Pre skoro dvadesetak godina, *SPACE* studija je pokazala suštinsku dobit oralne primene vitamina E na kardiovaskularni ishod kod HD bolesnika (150). Približno 200 bolesnika koji su već imali kardiovaskularnu bolest randomizovani su i primali ili 800 IU/dan vitamina E ili placebo. Tokom prosečnog perioda praćenja od 17 meseci, bolesnici u aktivnoj grupi imali su značajno niži relativni rizik (-64 %) da dobiju neželjeni kardiovaskularni događaj ili infarkt u odnosu na placebo grupu (-70%). U skorije vreme, mala randomizovana studija sa dvostruko slepom probom uključila je 93 pacijenta i otkrila da kombinovana terapija pravastatinom, vitaminom E i folnom kiselinom, koji su davani redom smanjuje debljinu intime medije i povećava protok kroz brahijalnu arteriju u odnosu na placebo (151). Takođe, postoje podaci koji ukazuju da oralno davanje vitamina E može poboljšati odgovor na ASE (152) i smanjiti oksidativni stres izazvan intravenskom primenom gvožđa (153). Poznato je da je plazmatski nivo vitamina E smanjen tokom HD procedure što sugeriše da njegova nadoknada može smanjiti nivo pokazatelja oksidativnog stresa. Međutim, još uvek ne postoje vodiči za doziranje vitamina E i učestalost primene kod bolesnika na HD, imajući u vidu da je on liposolubilni vitamin i da ne prolazi dijaliznu membranu (opasnost od akumulacije).

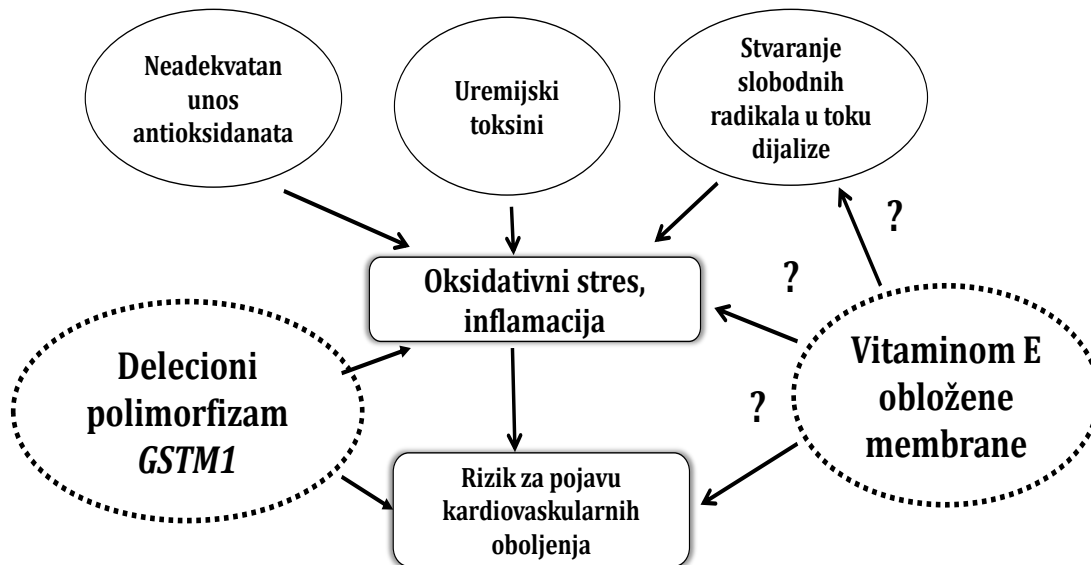
Upotreba membrana obloženih vitaminom E (VEM) se smatra pogodnim načinom kojim se može smanjiti oksidativni stres. Ova strategija je bazirana na činjenici da vitamin E deluje kao snažan hidrofobni čistač koji obezbeđuje zaštitu lipida plazme i ćelijskih membrana od lipidne peroksidacije, direktno smanjujući stvaranje ROS na mestu kontakta ćelija krvi i membrane (154). Pored toga, približno četvrtina HD bolesnika ima nedostatak vitamina E koji se može korigovati primenom VEM (155). Treba naglasiti, da kod onih bolesnika sa normalnim nivoima vitamina E u krvi primena VEM ne dovodi do značajnog povećanja nivoa vitamina E u krvi tako da se suplementacijom na ovaj način izbegava intoksikacija što je moguće kod oralne primene ovog vitamina. Stoga su VEM efikasne u korekciji deficita vitamina E, ali bez posledica od hipervitaminoze (155). Pojedine studije sugerišu da biokompatibilne VEM mogu pravovremeno ukloniti ROS i dovesti do supresije polimorfonuklearnog sagorevanja. Takođe, u prethodnim studijama je pokazano da upotreba VEM dovodi do značajnog smanjenja nivoa inflamacije i nivoa oksidativnog stresa (83, 154, 155). Postoje i radovi koji ukazuju da primena VEM može uticati na smanjenje prevalencije kardiovaskularnih događaja kod bolesnika lečenih HD (149, 156).

VEM se učestalo primenjuju u Japanu, odakle dolaze izveštaji o povoljnim kliničkim efektima njihove primene kao što su poboljšana biokompatibilnost, smanjena doza heparina, ublažavanje anemije, poboljšanja endotelna disfunkcija, poboljšani nutritivni status, smanjenje učestalosti intradijalizne hipotenzije, smanjenje insulinske rezistencije i poboljšanje kvaliteta života (154).



Nedavna meta-analiza *D'Arrigo* i saradnika (148), koja je uključila šezdeset studija, poredila je efekte VEM i konvencionalnih membrana na parametre anemije, zapaljenja, oksidativnog stresa i adekvatnosti dijalize, kao glavna ishodišta. Njihovi zaključci bili su u saglasnosti sa prethodnom meta-analizom *Yang* i sar. (157) i potvrdili su pozitivne uticaje primene VEM na smanjenje pokazatelja oksidativnog stresa i zapaljenja, tj na smanjenje nivoa IL-6. Međutim, u njihovom istraživanju nisu nađeni pozitivni učinci VEM na parametre anemije, kao ni na adekvatnost dijalize, lipidni profil ili na nivo serumskih albumina.

U našoj zemlji se od skora primenjuju VEM u lečenju dijaliznih bolesnika. S obzirom da je pokazano da su HD bolesnici sa homozigotnom delecijom *GSTM1* gena skloniji oksidativnom stresu i imaju lošije kardiovaskularno preživljavanje (50,51), naša pretpostavka je bila da će bolesnici sa *GSTM1* delecijom imati dodatnu korist od lečenja sa VEM u smislu smanjenja oksidativnih oštećenja i inflamacije (Shema 1).



**Shema 1.** Potencijalni efekti membrana obloženih vitaminom E kod dijaliziranih bolesnika sa homozigotnom delecijom gena za *GSTM1*

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

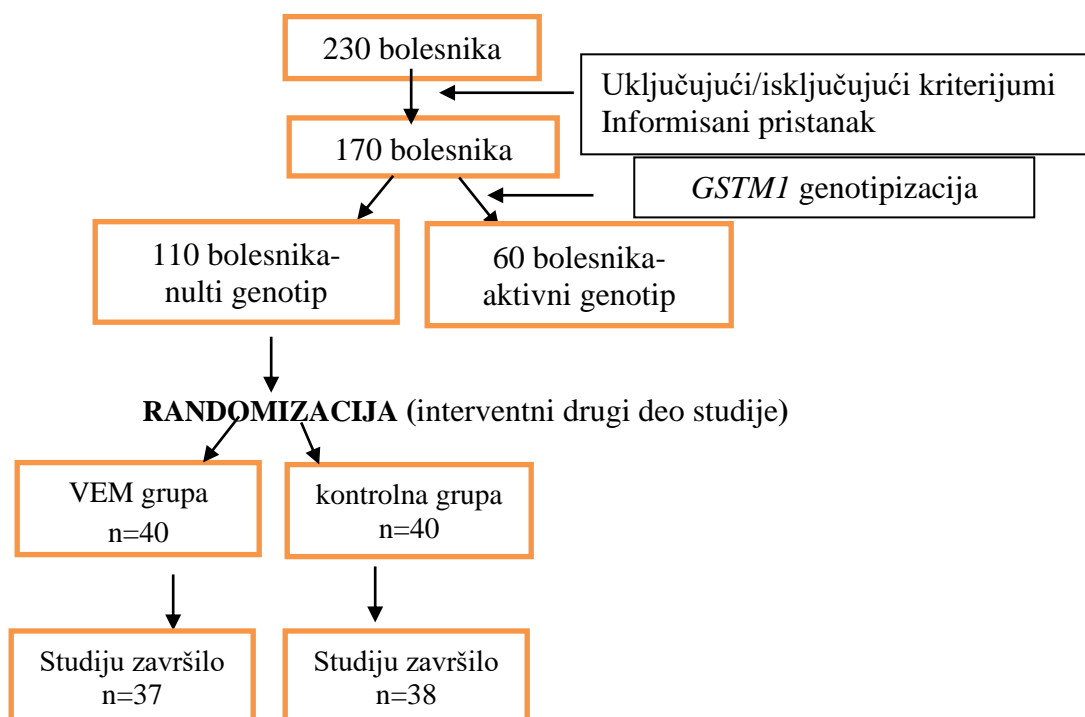
Ciljevi ovog istraživanja bili su:

1. Da se utvrdi genski polimorfizam za *GSTM1* među hemodijalizim bolesnicima i tako ustanovi učestalost bolesnika sa homozigotnom delecijom gena.
2. Da se izvrši uporedna analiza kardiovaskularnog statusa i prethodnih kardiovaskularnih događaja kod bolesnika sa *GSTM1* aktivnim i *GSTM1* nultim genotipom.
3. Da se ispita uticaj tromesečne primene dijaliznih membrana obloženih vitaminom E na parametre oksidativnog stresa i inflamacije kod bolesnika sa *GSTM1* nultim genotipom u odnosu na bolesnike sa *GSTM1* nultim genotipom lečenih standardnim polisulfonskim membranama.
4. Da se ispitaju parametri anemije, uhranjenosti i mineralokoštanog metabolizma kod bolesnika lečenih sa dve vrste dijaliznih membrana (VEM i polisulfonskim membrana)

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1 Bolesnici i dizajn istraživanja

Studija se sastojala iz dva dela. U prvom delu studije od ukupno 230 bolesnika koji su se lečili hroničnim programom HD u Kliničkom odeljenju za nefrologiju i metaboličke poremećaje sa dijalizom “Prof dr Vasilije Jovanović” KBC Zvezdara u istraživanje je uključeno 170 bolesnika koji su ispunili uključujuće kriterijume i bili su voljni da učestvuju u istraživanju. Izvođenje istraživanja je odobreno od strane lokalnog Etičkog odbora i svi bolesnici su potpisali informisani pristanak za učestvovanje u istraživanju nakon detaljnog informisanja o samom protokolu istraživanja. Genotipizacija *GSTM1* je urađena kod svih 170 bolesnika uključenih u istraživanje i delecija gena *GSTM1* je pronađena kod 110 bolesnika (Shema 2).



**Shema 2.** Ispitivana populacija bolesnika (objašnjenje u tekstu)

Uključujući kriterijumi su bili: lečenje HD duže od 3 meseca, stariji od 18 godina i sposobni da daju informisani pristanak. Isključujući kriterijumi su bili: trudnoća, uključenost u drugo istraživanje, prisustvo aktivne maligne bolesti, primena antioksidantne i anti-zapaljenske terapije.

Prvi deo studije je bio retrospektivni, observacioni i obuhvatao je prikupljanje podataka o kardiovaskularnom morbiditetu iz istorija bolesti (preležani akutni infarkt miokarda, prisustvo ishemijske bolesti srca, periferne vaskularne bolesti, cerebrovaskularne ishemijske bolesti, poremećaja srčanog ritma) i poreden je kardiovaskularni morbiditet kod bolesnika sa *GSTM1* aktivnim i *GSTM1* nultim genotipom. Takođe su poredeni parametri anemije, metabolizam minerala i uhranjenost. Drugi deo istraživanja je dizajniran kao randomizovana, placebo-kontrolisana, jednostruko-slepa (slepa za istraživača) studija i trajala je tri meseca. Od 110 bolesnika sa *GSTM1* nultim genotipom, u skladu sa normativima i standardima o primenama dijaliznim membrana Republičkog fonda za zdravstveno osiguranje, bilo nam je omogućeno da uključimo ukupno 80 bolesnika u istraživanje (zbog troškova

primene membrana). Bolesnici su randomizovani u dve grupe uz pomoć *online* programa dostupnog na adresi (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/randomize1.cfm>). Bolesnici u interventnoj grupi (n=40) su dijalizirani uz pomoć VEM (*Vitabran E, Asahi Kasei Medical Corporation Limited, Japan*, 1.8 m<sup>2</sup> površina membrane) tri puta nedeljno tokom perioda od tri meseca, dok su bolesnici u kontrolnoj grupi dijalizirani sa sintetskim polisulfonskim membranama identične površine u istom vremenskom periodu (*FX80, Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Germany*, 1.8 m<sup>2</sup> površina membrane). Dijalize su izvođene sa ultra-čistom dijaliznom tečnošću. Uticaj lečenja je dokumentovan tako što su poredene analize uzete na početku istraživanja i nakon tromesečnog perioda. Poređeni su pro-oksidativni, antioksidativni i antiinflamatorni parametri na kraju sa početnim vrednostima parametara. Takođe su poređeni parametri anemije, metabolizma minerala i uhranjenosti.

### 3.2 Demografski, biohemijski i dijalizni podaci bolesnika

Karakteristike bolesnika su prikupljene iz medicinske dijalizne istorije i uključivale su: starost, pol, trajanje lečenja dijalizom, prisustvo arterijske hipertenzije i dijabetes melitusa i prethodnih KV oboljenja. Rutinske laboratorijske analize uzete su neposredno pred HD proceduru nakon trodnevne pauze pre i nakon istraživanja. Adekvatnost dijalize je utvrđena uz pomoć vrednosti Kt/V, koja je izračunata na osnovu *Daugirdasove* formule (158). Indeks rezistencije na eritropoetin (ERI) je definisan kao nedeljna doza ASE (IJ) podeljena sa proizvodom bolesnikove telesne težine (kg) i vrednostima hemoglobina (g/dl). Odnos 1:200 je korišćen za konverziju doze darbopoetina (µg) u internacionalne jedinice (IJ) epoetina (159)

### 3.3 Genotipizacija glutation transferaze

DNK je izolovana iz pune krvi uz pomoć *QIAGEN QIAmp kit (Qiagen, Inc., Chatsworth, CA, USA)* kod svih 170 bolesnika u skladu sa uputstvom proizvođača. Ova metoda zasnovana na "spin-koloni" obezbeđuje DNK prečišćenu od svih zagađivača i inhibitora. Ukratko, ovom metodom ćelijske membrane leukocita se uništavaju inkubacijom u puferu za lizu. Histoni i drugi proteini se uklanjaju enzimskom digestijom sa proteinazom K. U narednim koracima DNK sa prenosi na "spin-kolone" gde se selektivno vezuju na silika gelu i prečišćavaju odgovarajućim puferima koje obezbeđuje proizvođač. Čistoća uzorka je proverena sa analiziranjem na *Gene Quant Pro*. Ako je odnos apsorbancija 260/280 bio veći od 1,8, kvalitet izolovane DNK se smatrao dobrim. Izdvojena DNK je čuvana u AE puferu (obezbeđena od *QIAamp DNA Mini Kit*) na 20° C do dalje upotrebe.

#### 3.4 Utvrđivanje polimorfizma *GSTM1* gena

Analiza polimorfizma *GSTM1* gena je izvedena multipleksnom lančanom reakcijom polimerizacije (PCR) (160). PCR reakciona mikstura je inkubirana i inicijalno denaturisna na 94 °C tokom 3 minuta. Nakon toga, sledeći koraci su izvedeni: denaturacija (94 °C, 30 s), zagrevanje (30 s na 59 °C) i ekstenzija "prajmera". Definitivna ekstenzija je trajala 4 minuta na 72 °C. PCR produkti su podeljeni na 2% agaroznom gelu na 125 V tokom 20 minuta i obojeni sa etidijum bromidom. DNK *GSTM1* fragmenti su amplifikovani i bili su veličine 215 bp. Odsustvo veličine od 215 bp je bilo indikativno za *GSTM1* nulti genotip. Prisustvo *GSTM1* aktivnog genotipa (referentnog genotipa) bilo je potvrđeno veličinom od 215 bp. Analizom se ne razlikuje heterozigotni od homozigotnog referentnog genotipa.

### 3.5 Izdvajanje plazme

Uzorci venske krvi (približno 5 ml) su uzimani u standardnim sterilnim polistirenskim vakutajnerima, koji su sadržali etilen diamin tetra sirćetnu kiselinu (EDTA), na početku dijaliznih procedura, pre davanja heparina. Za odvajanje plazme, uzorci su centrifugirani na 3600 obrtaja u minutu tokom 10 minuta. Uzorci plazme su podeljeni u alikvote da bi se izbeglo često odmrzavanje/zamrzavanje i čuvani na -80 °C do dalje upotrebe.

### 3.6 Merenje proteinskih tiol grupa

Ukupan sadržaj proteinskih tiolnih grupa u plazmi je utvrđen prema metodi koja je ranije opisana od *Jocelyn* (161). Ova metoda se bazira na reakcijama tiolnih grupa sa *Ellman*-ovim reagensom (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoična kiselina) ili DTNB. Proteinske tiolne grupe reaguju sa DTNB cepajući disulfidnu vezu dajući 2-nitro-5tiobenzoat (TNB-), koji jonizuje na na TNB<sup>2-</sup>-dianjon u vodi u vodi u neutralnom ili alkalnom pH. Ovaj TNB<sup>2-</sup>- jon ima žutu boju. Molarni koeficijent ekstinkcije je  $13.6 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  na talasnoj dužini od 412 nm. S obzirom da sunčeva svetlost može smanjiti DTNB, sve reakcije su izvedene na tamnom mestu ili zaštićene od sunčeve svetlosti.

### 3.7 Merenje nivoa malondialdehida

Nivoi MDA su mereni uz pomoć kompetitivnog enzimskog imunoseja (Elabscience, Wuhan, China, Catalog No : E-EL-0060) sledeći uputstvo proizvođača. Promena boje je izmerena spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 450 nm. Koncentracija MDA je izražena u ng/ml.

### 3.8 Merenje nivoa IL-6 u plazmi

Koncentracija IL-6 u plazmi je merena uz pomoć ELISA kompleta prema uputstvu proizvođača (*Human IL-6 (Interleukin-6, ELISA Kit, Reactivity: Human, Detection 96T, Elabscience)*).

### 3.9 Određivanje aktivnosti antioksidantnih enzima

Aktivnost SOD i glutation peroksidaze kod bolesnika je određena uz primenu spektrofotometrijskih metoda. Aktivnost SOD je merena uz pomoć metode koju su opisali *Misra* i *Fridovich* (162). Ukratko, test se zasniva na sposobnosti SOD da inhibira spontanu autooksidaciju adrenalina u alkalnom okruženju (pH = 10.2). Aktivnost SOD u uzorku se izračunava kao procenat inhibicije autooksidacije adrenalina. Aktivnost GPX je određena praćenjem oksidacije NADPH na 340 nm prisustvu vodonik peroksida (163).

### 3.10 Rutinske biohemijske analize

Standardnim laboratorijskim tehnikama na Cobas 501 (Rosche Diagnostics) analizatoru određivane su sledeće analize (u zagradama je prikazano kako su izraženi nivoi): urea (mmol/l), kreatinin (umol/l), saturacija transferina (%), feritin (ng/ml), serumsk nivo gvožđa (umol/l), albumini (g/l), ukupni proteini (g/l), ukupni holesterol (mmol/l), lipoproteini visoke gustine- holesterol (HDL- holesterol) (mmol/l), lipoproteini niske gustine- holesterol (LDL- holesterol) (mmol/l), trigliceridi (mmol/l), serumski nivo Ca (mmol/l), serumski nivo fosfata (S-PO<sub>4</sub>) (mmol/l), serumski nivo bikarbonata (mmol/l), mokraćna kiselina (umol/l), C-reaktvi protein (CRP) (mg/l).

Parametri krvne slike su određivani na analizatoru XN1000 (Sysmex) (u zagradama je prikazano kako su izraženi nivoi) : Hemoglobin (Hb) (g/dl), Eritrociti (Er) ( $10^{12}/l$ ), Hematokrit (%).

Vrednosti intaktnog parathormona (iPTH) (pg/ml) odredjivane su na analizatoru Cobas e 411 rack (Rosche Diagnostics).

### 3.11 Statistička analiza podataka

Statistička analiza podataka je učinjena uz pomoć *Statistical Package for the Social Sciences SPSS* (verzija 22.0) programa. Provera normalnosti distribucije podataka vršena je *Kolmogorov-Smirnovljevim* testom. Podaci su izraženi kao frekvencije za diskretne varijable, ili srednje vrednosti sa standardnom devijacijom za kontinuirane varijable. Povezanost između genetskog polimorfizma i kardiovaskularnog morbiditeta testirana je univarijantnom i multivarijantnom logističkom regresijom pomoću  $\chi^2$  testa ili Fišerovog testa, zavisno gde je jedan od ova dva testa bio adekvatan za primenu. Analizirani su *Per-protocol* podaci. Statističke analize su uključile eksplorativnu deskripciju i

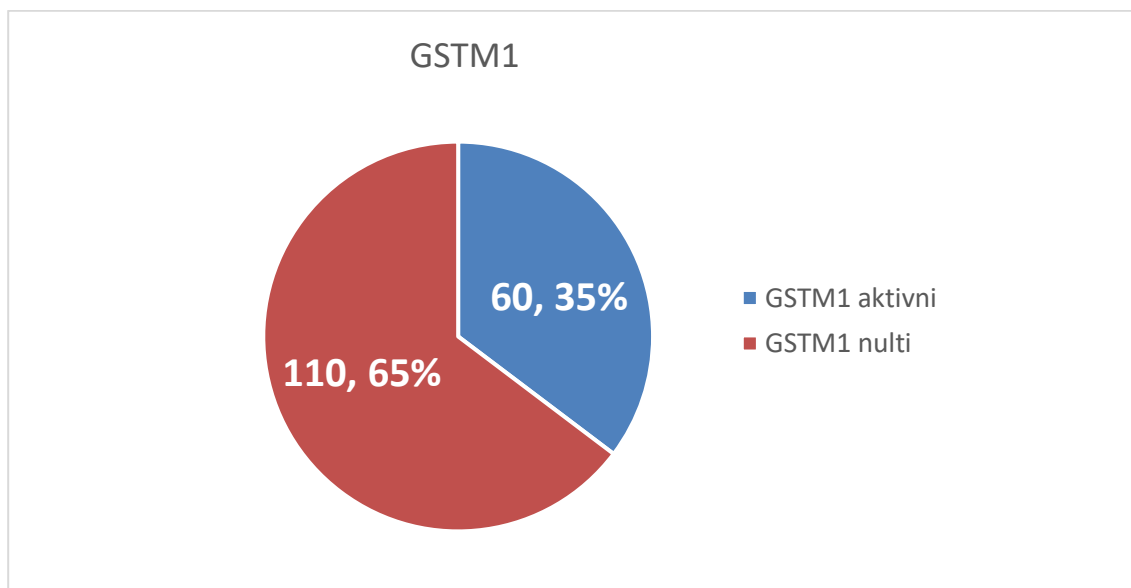
analitičku statistiku. Studentov T test za nezavisne uzorke je korišćen za poređenje varijabli sa normalnom distribucijom između različitih grupa. U slučajevima gde varijable nisu imale normalnu distribuciju korišćen je *Mann–Whitney* test. Jednosmerna analiza varijanse za ponovljena merenja je korišćena za poređenje srednjih vrednosti grupa, gde su isti učesnici u svakoj grupi. To se dešavalo kada smo imali ponovljena merenja da bi videli promene u intervenciji na podacima prikupljenim u dve vremenske tačke. Rezultati su prikazani tabelarno i grafički. P manje od 0,05 smatrano statistički je značajnim.

## 4 REZULTATI ISTRAŽIVANJA

### 4.1 OBSERVACIONI DEO STUDIJE

#### 4.1.1. Distribucija delecionog polimorfizma gena za *GSTM1* kod hemodijaliznih bolesnika

Od ukupno 230 bolesnika koji su lečeni hroničnom HD u našoj ustanovi prilikom početka istraživanja, u studiju je uključeno 170 bolesnika koji su ispunili kriterijume za uključenje i bili voljni da učestvuju u istoj (Shema 2). *GSTM1* genotipizacija je urađena kod svih 170 bolesnika i homozigotna delecija je pronađena kod 110 bolesnika (65 %), dok je barem jedan aktivni *GSTM1* gen imalo 60 bolesnika (35%) (Grafikon 1).



**Grafikon 1.** Distribucija *GSTM1* genotipa kod bolesnika lečenih hroničnom hemodijalizom (broj bolesnika i procenat od ukupnog broja)

#### 4.1.2. Analiza demografskih karakteristika i osnovnih biohemijskih parametara kod bolesnika sa *GSTM1* aktivnim i *GSTM1* nultim genotipom

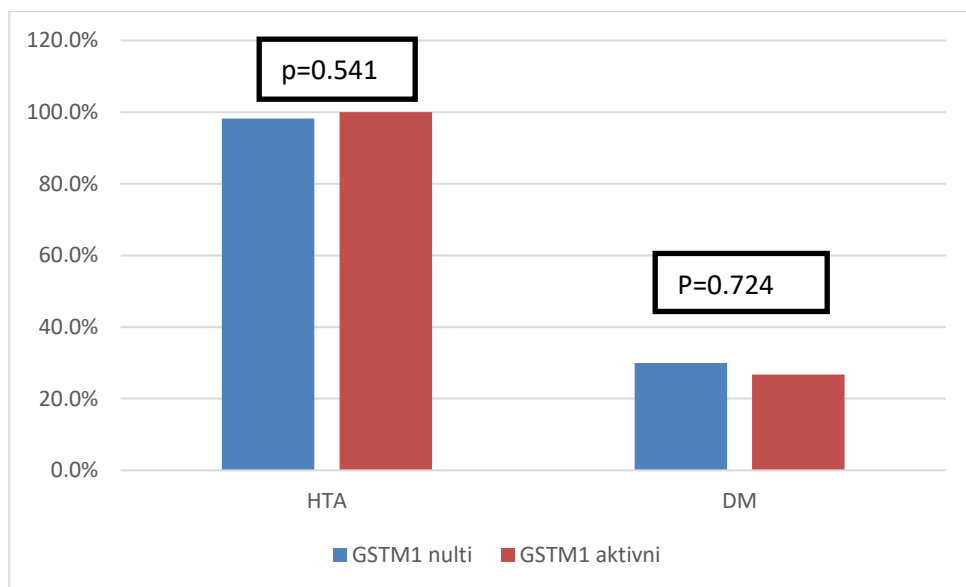
Poređenjem dve grupe bolesnika, sa aktivnim ili nultim *GSTM1* genotipom, uočeno je da postoje razlike u odnosu na osnovni uzrok TBS, gde su bolesnici sa homozigotnom delecijom *GSTM1* gena ređe imali hipertenzivnu nefroangiosklerozu kao osnovni uzrok TBS (39,1 % naspram 61,7%), dok se DM kao osnovni uzrok TBS češće javljao kod bolesnika sa nultim *GSTM1* genotipom (18,2 % naspram 8,3%). Takođe, adultna dominantna policistična bolest bubrega (ADPKD) kao osnovni uzrok TBS češće je bio prisutan kod bolesnika sa nultim *GSTM1* genotipom (14,5 % naspram 11,7%) (Tabela 6). Iako je DM bio osnovni uzrok TBS u oko 18% (sa nultim) i 8% bolesnika sa aktivnim genotipom, procenat obolelih od DM je bio znatno veći ako se u obzir uzme i dijabetes kao komorbiditet, ali takođe u pogledu prisustva DM (kao osnovnog oboljenja ili komorbiditeta) kao arterijske hipertenzije, između dve grupe bolesnika nije bilo razlike (Grafikon 2).

**Tabela 6.** Osnovne demografske karakteristike, dijalizni i biohemijski podaci bolesnika

	<i>GSTMI</i> nulti	<i>GSTMI</i> aktivni	
	n =110	n=60	p
Muškarci, %	56.4	68.3	0.142
Starost, godine	65±11	65±13	0.815
Telesna težina, kg (srednja±SD)	71.4±16.5	67.2±15.9	0.104
AVF, No, %	99/90.0	51/85.0	0.626
Dijalizni staž, meseci	64.5±60.7	52.7±47.5	0.193
Statini (da) No, %	38/34.5	24/40	0.508
Osnovno uzrok TBS (No, %):			
Hipertenzija	43/39.1	37/61.7	<b>0.010</b>
Dijabetes melitus	20/18.2	5/8.3	
Glomerulonefritis	12/10.9	7/11.7	
ADPKD	16/14.5	1/1.7	
Ostala	19/17.3	10/16.7	
S-urea, mmol/l	23.9±7.3	22.9±6.5	0.381
S-kreatinin, umol/l	847±181	807±202	0.192
Kt/V	1.29±0.31	1.25±0.27	0.412
CRP, mg/l	7.59±11.55	8.86±7.12	0.443

AVF: arterio-venska fistula, HTA: arterijska hipertenzija, CRP: C-reaktvi protein. ADPKD: adultna dominantna policistična bolest bubrega.





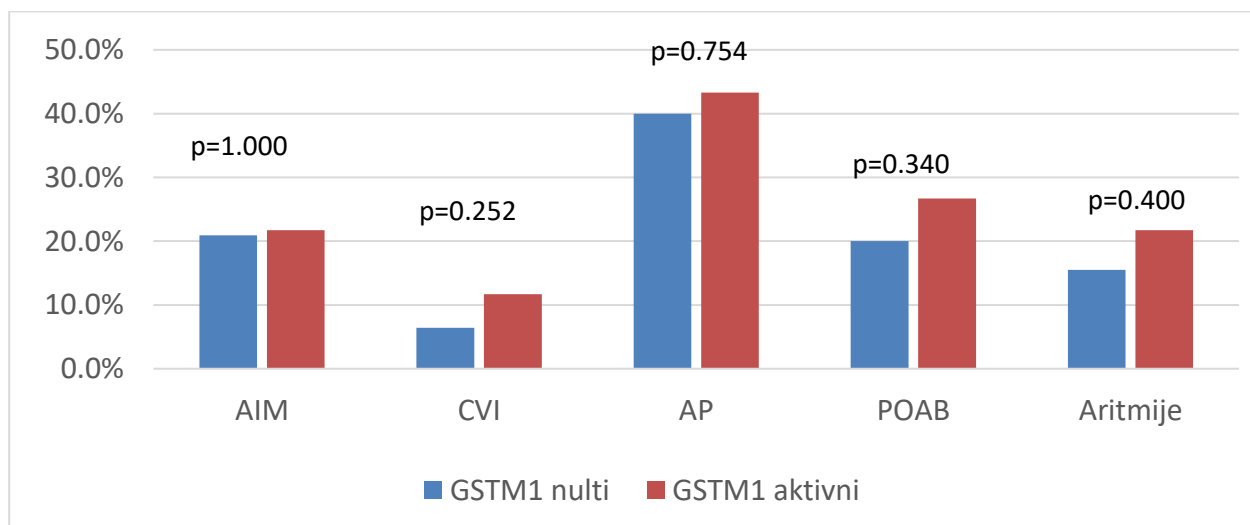
**Grafikon 2.** Učestalost dijabetesa melitusa (kao osnovnog oboljenja ili komorbiditeta) i hipertenzije (kao osnovnog oboljenja ili komorbiditeta) kod bolesnika sa *GSTM1* aktivnim i *GSTM1* nultim genotipom

HTA: arterijska hipertenzija, DM: dijabetes melitus

Što se tiče ostalih analiziranih demografskih karakteristika, osnovnih biohemijskih parametara i dijaliznih parametara, grupe bolesnika se nisu međusobno razlikovale.

#### 4.1.3. Analiza kardiovaskularnog statusa i prethodnih kardiovaskularnih događaja kod bolesnika sa *GSTM1* aktivnim i *GSTM1* nultim genotipom

Nije bilo razlike u učestalosti kardiovaskularnih morbiditeta kod bolesnika sa nultim odnosno aktivnim *GSTM1* genotipom. Od zabeleženih kardiovaskularnih oboljenja na početku studije, bolesnici obe grupe najčešće su bolovali od angine pektoris (40,0% u *GSTM1*-nultoj i 43,3% sa *GSTM1*-aktivnim genotipom), zatim od akutnog infarkta miokarda (20,9% u *GSTM1*-nultoj i 21,7% sa *GSTM1*-aktivnim genotipom) i POAB (20% u *GSTM1*-nultoj i 26,7% sa *GSTM1*-aktivnim genotipom). (Grafikon 3).



**Grafikon 3.** Prikaz kardiovaskularnog statusa i prethodnih kardiovaskularnih događaja kod bolesnika sa *GSTM1* aktivnim i *GSTM1* nultim genotipom

IM: infarkt miokarda, CVI: cerebrovaskularni insult, AP: angina pektoris, POAB: periferna arterijska okluzivna bolest,

Takođe analizirali smo i kardiovaskularni morbiditet između dve grupe bolesnika, onih sa delecijom gena i sa aktivnim *GSTM1* genom, ali u odnosu na osnovni uzrok TBS, takođe nije pronađena razlika između dve grupe, bez obzira na osnovno oboljenje bubrega (Tabela 7)

**Tabela 7.** Prikaz kardiovaskularnog statusa i prethodnih kardiovaskularnih događaja kod bolesnika sa *GSTM1* aktivnim i *GSTM1* nultim genotipom

	<b>GSTM1 nulti</b>	<b>GSTM1 aktivni</b>	
	<b>n =110</b>	<b>n=60</b>	<b>p</b>
<b>IM (da) No,%</b>	23/20.9	13/21.7	1.000
Hipertenzija, IM (da) No,%	8/18.6	7/18.9	
Dijabetes mellitus, IM (da) No,%	7/35	2/40	
Glomerulonefritis, IM (da) No,%	3/25	1/14.3	
ADPKD, IM (da) No,%	3/18.8	0/0	
Ostala, IM (da) No,%	2/10.5	3/30	
<b>CVI (da) No, %</b>	7/6.4	7/11.7	0.252
Hipertenzija, IM (da) No,%	2/4.7	7/18.9	
Dijabetes mellitus, IM (da) No,%	3/15	0/0	
Glomerulonefritis, IM (da) No,%	0/0	0/0	
ADPKD, IM (da) No,%	1/6.3	0/0	
Ostala, IM (da) No,%	1/5.3	0/0	
<b>AP (da) No, %</b>	44/40.0	26/43.3	0.745
Hipertenzija, IM (da) No,%	16/37.2	17/45.9	

Dijabetes mellitus, IM (da) No,%	9/45	3/60	
Glomerulonefritis, IM (da) No,%	8/66.7	2/28.6	
ADPKD, IM (da) No,%	5/31.3	1/100	
Ostala, IM (da) No,%	6/31.6	3/30	
<b>POAB (da) No, %</b>	<b>22/20.0</b>	<b>16/26.7</b>	<b>0.340</b>
Hipertenzija, IM (da) No,%	8/18.6	9/24.3	
Dijabetes mellitus, IM (da) No,%	8/40	3/60	
Glomerulonefritis, IM (da) No,%	1/8.3	1/14.3	
ADPKD, IM (da) No,%	2/12.5	0/0	
Ostala, IM (da) No,%	3/15.8	3/30	
<b>Srčane aritmije (da) No, %</b>	<b>17/15.5</b>	<b>13/21.7</b>	<b>0.400</b>
Hipertenzija, IM (da) No,%	9/20.9	8/21.6	
Dijabetes mellitus, IM (da) No,%	2/10	2/40	
Glomerulonefritis, IM (da) No,%	0/0	1/14.3	
ADPKD, IM (da) No,%	3/18.8	0/0	
Ostala, IM (da) No,%	3/15.8	2/20	

IM: infarkt miokarda, CVI: cerebrovaskularni insult, AP: angina pektoris, POAB: periferna arterijska okluzivna bolešt,

#### 4.1.4. Osnovni parametri anemije kod bolesnika sa *GSTMI* aktivnim i *GSTMI* nultim genotipom

Naša pretpostavka je bila da bolesnici sa nultim genotipom češće mogu imati uremijske komplikacije uključujući i anemiju, te smo ispitivali parametre koji se odnose na terapiju kao i ciljne vrednosti istih. Tako je pokazano da nije bilo razlike u učestalosti primene ASE, prosečnoj nedeljnoj dozi ASE (kod onih što su ih imali u terapiji), rezistenciji na iste, vrednostima hemoglobina i feritina, saturaciju transferina i S-gvožđa. Rezultati su prikazani u **Tabeli 8**.

**Tabela 8.** Osnovni parametri anemije kod bolesnika sa *GSTMI* nultim i *GSTMI* aktivnim genotipom

	<i>GSTMI</i> nulti	<i>GSTMI</i> aktivni	p
	n =110	n=60	
ASE (da) No, %	87/79.1	54/90.1	0.088
ASE doza, IJ /nedeljno	6264±3930	6518±4628	0.728
Hb, g/dl	10.4±1.2	10.1±1.0	0.079
ERI	9.2±6.8	10.2±8.9	0.453
Saturacija transferina, %	29±10	27±08	0.101
Feritin, ng/ml	245±191	231±176	0.659
S-Gvožđe, umol/l	11.5±4.1	11.6±3.7	0.945

ASE: agensi stimulacije eritropoeze, ERI: indeks rezistencije na eritropoetin, Hb: hemoglobin

#### 4.1.5. Osnovni parametri nutricije i mineralo-koštanog metabolizma bolesnika kod bolesnika sa *GSTMI* aktivnim i *GSTMI* nultim genotipom

Zbog značaja koji ima nutritivni status u lečenju i ishodu lečenja bolesnika sa uremijom, ispitali smo osnovne nutritivne parametre i parametre mineralo-koštanog metabolizma shodno *GSTMI* genotipu. Rezultati ukazuju da su bolesnici sa *GSTMI* aktivnim genotipom imali statistički značajno niže vrednosti LDL holesterola i serumskog fosfata, dok u pogledu drugih parametara nutricije i mineralo-koštanog metabolizma između dve grupe bolesnika nije bilo statistički značajne razlike. Rezultati su prikazani u Tabeli 9.

**Tabela 9.** Osnovni parametri nutricije i minerano-koštanog metabolizma bolesnika kod bolesnika sa *GSTM1* aktivnim i *GSTM1* nultim genotipom

	<i>GSTM1</i> nulti	<i>GSTM1</i> aktivni	
	n =110	n=60	p
Albumini, g/l	38.9±3.3	38.0±2.7	0.061
Ukupni proteini, g/l	68.3±5.0	68.1±5.0	0.749
Ukupni holesterol, mmol/L	4.49±1.31	4.15±1.05	0.088
HDL- holesterol, mmol/L	1.12±0.54	1.12±0.46	0.988
LDL- holesterol, mmol/L	2.44±0.83	2.18±0.81	<b>0.048</b>
Trigliceridi, mmol/l	2.21±3.18	1.63±0.79	0.168
S-Ca, mmol/l	2.27±0.22	2.24±0.16	0.360
S-PO <sub>4</sub> , mmol/l	1.70±0.58	1.47±0.62	<b>0.016</b>
iPTH, pg/ml	267±393	175±152	0.086

HDL: lipoprotein visoke gustine holesterol, LDL: lipoprotein niske gustine holesterol, S-Ca: serumski kalcijum, S-PO<sub>4</sub>: serumski fosfat, iPTH: intaktni parathormon.

## 4.2. INTERVENTNI DEO STUDIJE

Od ukupno 110 bolesnika sa *GSTM1* nultim genotipom, nakon randomizacije bolesnici su podeljeni u dve grupe, 40 bolesnika je randomizovano u interventnu grupu (VEM grupu), dok je 40 bolesnika randomizovano u kontrolnu grupu. Randomizacija je učinjena uz pomoć *online* programa dostupnog na adresi (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/randomize1.cfm>). Istraživanje nisu završila 3 bolesnika iz VEM grupe: jedan bolesnik je umro nakon cerebrovaskularnog insulta, jedan nakon infarkta miokarda i jedan je povukao informisani pristanak za učešće u istraživanju iz ličnih razloga. U kontrolnoj grupi, dva bolesnika su napustila istraživanje. Jedan je umro usled hipervolemije i edema pluća, dok je jedan umro od hronične obstruktivne bolesti pluća. Stoga, na kraju istraživanja, 75 bolesnika je analizirano (*per-protocol* analiza).

### 4.2.1. Osnovne demografske karakteristike

Između dve grupe bolesnika koji su uključeni u drugi deo studije, nije bilo statistički značajne razlike u pogledu demografskih karakteristika, osnovnih biohemijskih parametara kao ni u pogledu dijaliznih parametara. Rezultati su prikazani u Tabeli 10.

**Tabela 10.** Osnovne demografske karakteristike, dijalizni i biohemijski podaci bolesnika

	Kontrolna grupa	VEM grupa	p
	n =40	n=40	
Muškarci, %	55	60	0.651
Starost, godine	65±12	62±11	0.225
Telesna težina, kg (srednja±SD)	69.8±15.4	74.3±14.8	0.182
AVF, No, %	39/97.5	36/90.0	0.210
Dijalizni staž, meseci	71.5±65.7	66.6±58.7	0.726
Dijabetes (osnovno oboljenje ili komorbiditet), No, %	11/27.5 %	12/32.2 %	0.875
IM (da) No,%	4/10	2/5	0.675
CVI (da) No, %	1/2.5	1/2.5	1.000
HTA (da) No, %	39/97.5	39/97.5	1.000
Osnovno uzrok TBS (No, %):			
Hipertenzija	19/47.5	12/30.0	0.273
Dijabetes melitus	7/17.5	6/15.0	
Glomerulonefritis	6/15.0	5/12.5	
ADPKD	4/10.0	10/25.0	
Ostala	4/10.0	7/17.5	
HDF (da) No,%	6/15	10/25	0.264
Površina dijalizatora, m <sup>2</sup>	1.62±0.27	1.67±0.32	0.407
S-urea, mmol/l	23.1±7.1	23.0±6.0	0.981
S-kreatinin, umol/l	872±211	853±154	0.649
S-bikarbonati, mmol/l	20.3±2.4	13.0±3.8	0.782
Kt/V	1.32±0.31	1.35±0.30	0.657
Kt/V u ciljnom opsegu, %	68.4	73.0	0.801
CRP, mg/l	4.57±5.07	5.49±5.29	0.430
CRP u referentnom opsegu, %	72.5	60.0	0.344

AVF: arterio-venska fistula, IM: infarkt miokarda, CVI: cerebrovaskularni insult, HTA: arterijska hipertenzija, HDF: hemodijafiltracija, CRP: C-reaktvi protein. ADPKD: adultna dominantna policistična bolest bubrega.

#### 4.2.2 Osnovni parametri anemije bolesnika

Između dve grupe bolesnika nije bilo statistički značajne razlike u pogledu analiziranih parametara, izuzev saturacije transferina i u vrednosti serumskog gvožđa, koja je statistički značajno bila viša u VEM grupi bolesnika. Rezultati su prikazani u Tabeli 10.

**Tabela 11.** Osnovni parametri anemije bolesnika na početku studije

	Kontrolna grupa n =40	VEM grupa n=40	p
ASE (da) No, %	31/77.5	32/80.0	0.785
ASE doza, IJ /nedeljno	6677±3995	5156±3380	0.108
Hb, g/dl	10.5±1.0	10.5±1.0	0.874
Hb u ciljnom opsegu, %	92.5	92.5	1.000
ERI	11.3±10.1	7.4±5.6	0.063
Saturacija transferina, %	28±9	34±10	<b>0.014</b>
Feritin, ng/ml	212±224	258±146	0.281
S-Gvožđe, umol/l	10.8±3.7	13.0±3.8	<b>0.010</b>

ASE: agensi stimulacije eritropoeze, ERI: indeks rezistencije na eritropoetin, Hb: hemoglobin

#### 4.2.3 Osnovni parametri nutricije i mineralno-koštanog metabolizma bolesnika

Između dve grupe bolesnika nije bilo statistički značajne razlike u pogledu parametara nutricije i mineralno-koštanog metabolizma. Rezultati su prikazani u Tabeli 12.



**Tabela 12.** Osnovni parametri nutricije i mineralno-koštanog bolesnika na početku studije

	<b>Kontrolna grupa n =40</b>	<b>VEM grupa n=40</b>	<b>p</b>
Albumini, g/L	39.0±2.9	40.1±3.3	0.165
Ukupni proteini, g/L	68.3±5.5	67.6±5.0	0.552
Ukupni holesterol, mmol/L	4.25±0.98	4.54±0.88	0.170
HDL- holesterol, mmol/L	1.08±0.41	0.99±0.24	0.260
LDL- holesterol, mmol/L	2.38±0.75	2.67±0.79	0.106
Trigliceridi, mmol/L	1.83±1.24	2.22±1.22	0.161
S-Ca, mmol/L	2.29±0.24	2.29±0.23	0.925
S-PO <sub>4</sub> , mmol/L	1.61±0.57	1.8±0.51	0.109
iPTH, pg/ml	278±361	290±524	0.905

HDL: lipoprotein visoke gustine holesterol, LDL: lipoprotein niske gustine holesterol, S-Ca: serumski kalcijum, S-PO<sub>4</sub>: serumski fosfat, iPTH: intaktni parathormon.

#### 4.2.4 Pokazatelji antioksidantne aktivnosti pre i posle studije

Bolesnici u obe grupe su imali značajan porast aktivnosti GPX nakon tri meseca studije (Tabela 13). Međutim, poređenje između dve grupe, nije pokazalo statistički značajnu razliku (p=0.474). Aktivnost SOD ostala je nepromenjena u obe grupe nakon tromesečnog perioda.

**Tabela 13.** Pokazatelji antioksidantne aktivnosti pre i posle studije

	<b>Kontrolna grupa</b>		<b>VEM grupa</b>		<b>P</b>	<b>P*</b>
	<b>pre</b>	<b>posle</b>	<b>pre</b>	<b>posle</b>		
GPX U/L	206.7±67.2	273.7±61.6	203.7±59.1	285.7±78.7	<b>0.000</b>	0.474
SOD Ux10 <sup>3</sup> /L	55.4±11.7	60.4±22.4	53.8±9.8	55.1±21.2	0.269	0.607

P- unutar grupa P\*- između grupa. GPX, Glutation peroksidaza, SOD, Superoksid dizmutaza.

#### 4.2.5. Pokazatelji oksidativnog oštećenja lipida i proteina pre i posle studije

Koncentracija MDA u serumu bolesnika iz kontrolne i VEM grupe porasla je znacajno nakon tri meseca za vreme trajanja studije. Iako je porast unutar grupa bio statisticki znacajan, poređenje između grupa nije pokazalo značajnost ( $p=0.446$ ) (Tabela 14). Sa druge strane zabeležen je porast sadržaja proteinskih tiol grupa u obe grupe, ali je statistička značajnost između grupa izostala ( $p=0.445$ ).

**Tabela 14.** Pokazatelji oksidativnog oštećenja proteina i lipida pre i posle studije

	Kontrolna grupa		VEM grupa		P	P*
	pre	posle	pre	posle		
MDA ng/mL	510.9±394.7	769.5±440.7	403.4±218.8	752.1±439.0	<b>0.000</b>	0.446
Tiolne grupe mcmol/L	6.79±1.81	8.33±2.26	7.31±2.58	8.31±2.48	<b>0.000</b>	0.445

P- unutar grupa P\*- između grupa. MDA, malondialdehid

#### 4.2.6 Pokazatelji zapaljenja pre i posle studije

Uoceno je da je kontrolna grupa bolesnika nakon studije imala porast koncentracije serumskog IL-6 ( $48.5±40.7$  vs.  $67.6±120$ ). Sa druge strane, kod bolesnika koji su za vreme studije dijalizirani sa VEM, koncentracija ovog pokazatelja zapaljenja se smanjila ( $37.9±28.4$  vs  $34.4±32.4$ ), ali statistički značajna razlika između grupa nije dostignuta (Tabela 15). Nivo serumskog CRP-a se nije menjao ni u jednoj grupi u zavisnost od tretmana kojem su bolesnici bili podvrgnuti.

**Tabela 15.** Pokazatelji zapaljenja pre i posle studije

	Kontrolna grupa		VEM grupa		P	P*
	pre	posle	pre	posle		
IL-6 ng/ml	48.5±40.7	67.6±120.2	37.9±28.4	34.4±32.4	0.543	0.376
CRP, mg/l	4.9±5.4	5.5±6.2	5.1±4.8	5.9±7.0	0.458	0.894

P- unutar grupa P\*- između grupa. IL-6, Interleukin-6

#### 4.2.7 Parametri anemije pre i posle studije

Tokom tromesečnog perioda, ukupna doza i.v. gvožđa koju su bolesnici primili nije se razlikovala između grupa (kontrolna grupa naspram VEM grupe,  $202 \pm 255$  mg naspram  $222 \pm 199$  mg;  $p = 0.697$ ). Vrednosti hemoglobina, broja eritrocita, ERI, feritina i serumskog gvožđa, nisu se značajno promenile, kako unutar grupa, tako ni između grupa u posmatranom periodu (Tabela 16). Saturacija transferina se smanjila u VEM grupi, istovremeno porasla u kontrolnoj grupi i razlika je dostigla statističku značajnost ( $p = 0.020$ ).

**Tabela 16.** Parametri anemije pre i posle studije

	Kontrolna grupa		VEM grupa		P	P*
	pre	posle	pre	posle		
ASE doza, IJ/nedeljno	$6862 \pm 4033$	$6344 \pm 3957$	$5630 \pm 3443$	$5593 \pm 3765$	0.427	0.491
ASE (da) No, %	31/81	33/86.8	31/83.8	29/78.4	0.540	0.213
Saturacija transferina, %	$28.0 \pm 8.8$	$33.0 \pm 11.5$	$33.8 \pm 10.1$	$30.4 \pm 10.9$	0.766	<b>0.020</b>
Feritin, ng/ml	$215 \pm 230$	$271 \pm 274$	$245 \pm 141$	$230 \pm 165$	0.262	0.061
S-Gvožđe, umol/l	$10.8 \pm 3.8$	$11.7 \pm 4.2$	$13.1 \pm 3.7$	$11.9 \pm 4.1$	0.817	0.087
Hb, g/dl	$10.48 \pm 0.94$	$10.17 \pm 0.93$	$10.49 \pm 1.06$	$10.53 \pm 1.37$	0.347	0.229
Er, $10^{12}/l$	$3.49 \pm 0.35$	$3.36 \pm 0.34$	$3.42 \pm 0.36$	$3.49 \pm 0.51$	0.598	0.053
Hematokrit, %	$32.9 \pm 2.7$	$31.8 \pm 2.8$	$32.8 \pm 3.5$	$32.9 \pm 4.2$	0.313	0.200
ERI	$11.77 \pm 10.28$	$10.67 \pm 9.75$	$8.08 \pm 5.78$	$8.13 \pm 6.29$	0.352	0.310

P- unutar grupa P\*- između grupa. ASE: agensi stimulacije eritropoeze, ERI: indeks rezistencije na eritropoetin, Hb: hemoglobin

#### 4.2.8 Parametri nutricije i mineralno-koštanog metabolizma pre i posle studije

Uprkos značajnom poboljšanju u vrednostima ukupnih proteina, albumina, triglicerida, serumskih fosfata i bikarbonata unutar grupa, statistički značajna razlika između VEM grupe i kontrolne grupe nije dostignuta. Jedino su vrednosti HDL holesterola bile blizu statističke značajnosti (Tabela 17).

**Tabela 17.** Parametri nutritivne i mineralo-koštanog metabolizma pre i posle studije

	Kontrolna grupa		VEM grupa		P	P*
	pre	posle	pre	posle		
Ukupni proteini, g/l	68.3±5.5	69.5±5.7	67.2±5.0	68.2±5.9	<b>0.048</b>	0.853
Albumini, g/l	39.08 ± 2.96	40.87± 0.94	39.97± 3.26	41.03± 4.29	<b>0.003</b>	0.421
Uk. Holesterol, mmol/l	4.23 ±1.00	4.20 ±0.91	4.57±0.87	4.50±1.25	0.361	0.986
HDL-Holesterol, mmol/L	1.09±0.42	1.11±0.50	0.99±0.25	1.10±0.28	<b>0.004</b>	0.064
LDL-Holesterol, mmol/L	2.36±0.76	2.26±0.73	2.68±0.80	2.67±1.05	0.553	0.641
Trigliceridi, mmol/L	1.80±1.27	1.66±1.14	2.28±1.25	1.77±0.74	<b>0.003</b>	0.102
S-Ca, mmol/L	2.27±0.23	2.31±0.19	2.30±0.23	2.37±0.27	0.052	0.562
S-PO <sub>4</sub> , mmol/L	1.61±0.59	1.39±0.51	1.82±0.52	1.59±0.50	<b>0.000</b>	0.909

P- unutar grupa P\*- između grupa. HDL: lipoprotein visoke gustine holesterol, LDL: lipoprotein niske gustine holesterol, S-Ca: serumski kalcijum, S-PO<sub>4</sub>: serumski fosfat.

#### 4.2.9 Biohemijski parametri i adekvatnost hemodijalize pre i posle studije

Tokom studije došlo je značajnog poboljšanja vrednosti ureje, bikarbonata, kao adekvatnosti hemodijalize unutar grupa, međutim statistički značajna razlika između VIE grupe i kontrolne grupe nije dostignuta (Tabela 18).

**Tabela 18.** Biohemijski parametri i adekvatnost hemodijalize pre i posle studije

	Kontrolna grupa		VEM grupa		P	P*
	pre	posle	pre	posle		
Mokraćna kiselina, umol/l	365 ± 67	339 ± 64	346 ± 67	338 ± 71	0.069	0.333
S-Kreatinin, umol/l	872 ±217	819±247	860±158	854±159	0.092	0.179
S-Urea, mmol/l	23.2 ± 7.3	20.1 ± 5.8	22.7 ± 6.0	21.4 ±6.2	<b>0.021</b>	0.540
Serum bikarbonat, mmol/l	20.32±2.47	21.55±1.48	20.60±4.63	21.49±3.00	<b>0.009</b>	0.664
Kt/V	1.32±0.29	1.39±0.33	1.35±0.31	1.39±0.25	<b>0.044</b>	0.567

P- unutar grupa P\*- između grupa

## 5 DISKUSIJA

Istraživanju značaja delecionog polimorfizma gena za *GSTM1* i uticaja vitaminom E obloženih membrana na pokazatelje oksidativnog stresa kod ovih bolesnika na hemodijalizi je pristupljeno iz dve perspektive. Naime, u prvom delu teze analizirana je distribucija delecionog polimorfizma gena za *GSTM1* kod 170 hemodijaliznih bolesnika i homozigotna delecija je pronađena kod 110 bolesnika (65 %), dok je aktivni gen imalo 60 bolesnika (35%). Kao što je već ranije napomenuto, distribucija delecije *GSTM1* gena se kreće od 15-66 % u opštoj populaciji u različitim etničkim grupama (48, 164). Približno pola bele i azijske populacije nema aktivnost *GSTM1* enzima usled homozigotne delecije *GSTM1* gena, dok je u afričkoj populaciji delecija prisutna kod oko 25 % populacije (48, 49). Značaj *GSTM1* polimorfizma gena kod ljudi je prvi put prepoznat u studijama o karcinomima koje su pokazale da su osobe *GSTM1* nultim genotipom izložene povećanom riziku od pojave raka debelog creva i pluća (165,166). Genski polimorfizam za *GSTM1* podrazumeva varijacije u enzimskoj aktivnosti koje mogu rezultirati u povećanoj osetljivosti na oksidativni stress (167). Prethodne studije su sugerisale da je homozigotna delecija ovog lokusa povezana sa nastankom brojnih bolesti, uključujući alkoholnu cirozu jetre i astmu (168,169). Bilo je i izveštaja koji povezuju *GSTM1* nulti genotip sa reumatoidnim artritisom, što u jednoj meta analizi nije potvrđeno (170).

Ispitivanje polimorfizma *GSTM1* gena među hemodijaliznim bolesnicima do sad je rađeno u nekoliko studija i u jednoj od njih homozigotna delecija *GSTM1* gena nađena kod 59,8% hemodijaliznih bolesnika, što je slično rezultatu zabeleženom u ovoj tezi. Istovremeno u istom istraživanju, zdravi pojedinci u kontrolnoj grupi iz populacije stanovnika u Srbiji imali su prisustvo homozigotne delecije gena u 48,7 %, te je zaključak navedenog istraživanja bio da pojedinci sa homozigotnom delecijom *GSTM1* gena imaju 1,6 puta veću podložnost razvoju TBS u odnosu na osobe sa *GSTM1* aktivnim genom (171). U jednoj drugoj studiji, među hemodijaliznim bolesnicima, takođe slično rezultatu ove teze, *GSTM1* nulti genotip je nađen kod 63,8 % bolesnika (172). U studiji u Indiji, koja je poredila učestalost *GSTM1* nultog genotipa u dijaliznoj populaciji u odnosu na zdrave pojedince, nulti genotip je značajno češće bio prisutan kod dijalizne populacije (40.54 %, naspram 15.34%) (164). Ako uzmemo u obzir jedinu studiju koja je sprovedena u Srbiji do sad (171) u kojoj je zaključeno da je veća progresija *GSTM1* nultog genotipa ka TBS, onda nije iznenadjujuće da je više *GSTM1* nultih bolesnika na HD nego onih sa aktivnim *GSTM1* genotipom. Međutim, postoji nekoliko studija čiji rezultati nisu ukazali na povezanost *GSTM1*-nultog genotipa kao faktorom rizika za razvoj TBS, kao što je studija među tajvanskim Kinezima (173), populacija Taipeia (172) i bolesnici sa TBS azijskih Indijanaca (174), što je moguće da je posledica etničke specifičnosti. To navodi na zaključak da su genske varijante različite kod različitih etničkih grupacija što opravdava istraživanja u različitim regionima.

U jednoj skorašnjoj studiji pokazano je da pojedinci sa *GSTM1* nultim genotipom, u odnosu na one sa aktivnim genom, imaju tri puta povećan rizik za razvoj HBB, a oni sa prisustvom bubrežne slabosti i *GSTM1* nultim genotipom imaju dva puta povećan rizik od progresije ka TBS (175).

Nakon analiziranja *GSTM1* genotipa, bolesnici su podeljeni u dve grupe u zavisnosti od prisustva *GSTM1* aktivnog ili nultog genotipa, a potom su i analizirani osnovni demografski i biohemijski parametri. Dve grupe bolesnika su se međusobno razlikovale u odnosu na osnovni uzrok TBS, gde su bolesnici sa homozigotnom delecijom *GSTM1* gena ređe imali hipertenzivnu nefroangiosklerozu kao osnovni uzrok TBS (39,1 % naspram 61,7%), dok se DM kao osnovni uzrok TBS češće javljao kod bolesnika sa nultim *GSTM1* genotipom (18,2 % naspram 8,3%). Takođe, ADPKD kao osnovni uzrok TBS češće je bio prisutan kod bolesnika sa nultim *GSTM1* genotipom (14,5 % naspram 11,7%). Jedna studija je utvrdila je povezanost *GSTM1* aktivnog gena sa Balkanskom endemskog nefropatijom (176), što u ovoj tezi nije posebno analizirano. U studiji Petrovič i sar. (177) pronađeno je da je *GSTM1* nulti genotip nezavisan faktor rizika za razvoj esencijalne arterijske hipertenzije kod bolesnika sa dijabetes melitusom tip 2. Slične rezultate je zabeležila i mala egipatska

studija (178). Dve druge studije su pronašle povezanost između esencijalne arterijske hipertenzije i *GSTM1* nultog genotipa (179,180) u opštoj populaciji. Nasuprot tome u studiji iz Egipta u opštoj populaciji povezanost *GSTM1* nultog genotipa sa esencijalnom arterijskom hipertenzijom nije pronađena (178). Poredeći sa aktivnim genotipom, *GSTM1* nulti genotip je povezan sa bržom progresijom HBB kod afroamerikanaca (181). Ni jedna od studija, po našim saznanjima, nije analizirala osnovni uzrok TBS u odnosu na prisustvo *GSTM1* aktivnog ili nultog gena, te rezultate ne možemo da poredimo. U pogledu prisustva dijabetesa, bilo kao komorbiditeta ili osnovnog uzroka TBS, nije bilo razlike između grupa. Sličan rezultat u pogledu prisustva DM, zabeležen je i u studiji Lin-a i saradnika (172). U odnosu na prisustvo *GSTM1* gena, grupe se međusobno nisu razlikovale po polu, životnoj dobi, telesnoj težini, vaskularnom pristupu, dijaliznom stažu, adekvatnosti dijalize, kao i u vrednostima CRP-a. Rezultati slične ovima viđeni su kod Lin i sar. (172). Postavlja se pitanje koji bi mogao biti biološki efekat kojim *GSTM1* delecija utiče na napredovanje bolesti bubrega (182). U skorašnjoj studiji Jerotić i sar. je zaključeno da postoji povezanost između nishodne regulacije *GSTM1* gena sa izmenjenom ekspresijom adhezivnih molekula i može biti barem delimično odgovorna za povećanu osetljivost bolesnika sa TBS prema kardiovaskularnim bolestima (183). U uslovima in vitro Chang i sar. na izolovanim primarnim mišijim vaskularnim glako-mišićnim ćelijama (VSMCs) su pokazali da utišavanje ili *knockout* *GSTM1* gena dovodi do povećanih nivoa reaktivnog aldehida 4-HNE (182). Utišavanje ekspresije *GSTM1* u endotelnim ćelijama ima za posledicu pojačanu produkciju malondialdehida. Nivo malondialdehida kod bolesnika sa nultim *GSTM1* genotipom je viši nego onih sa aktivnim genotipom studija (182, 184). Kod bolesnika sa bubrežnom slabošću, nivoi 4-HNE i MDA su značajno povišeni (185) i pokazano je da direktno koreliraju sa stepenom bubrežne anemije (186). Svi ovi rezultati nedvosmisleno pokazuju da prisustvo nultog genotipa se može povezati sa progresivnom HBB, a u osnovi ove pojave najverovatnije je postojanje jačeg oksidativnog stresa, usled nedostatka antioksidantne i detoksikacione aktivnosti *GSTM1* proteina. Važno je pomenuti da progresivna HBB i KV morbiditet i mortalitet dele slične faktore rizika (oksidativni stres, endotelna disfunkcija, ubrzana ateroskleroza). Pristup u ovom istraživanju je bio dizajn studije preseka, a s obzirom da nisu bili dostupni detalji o dužini trajanja HBB pre terminalne faze ne može sa sigurnošću govoriti o brzini napredovanja bolesti u odnosu na *GSTM1* genotip.

Prevalencija kardiovaskularnih bolesti kod bolesnika na HD do 20 puta je viša u odnosu na opštu populaciju, te predstavlja najčešći pojedinačni uzrok morbiditeta i mortaliteta kod ovih bolesnika (187). Iako tačan mehanizam ubrzanih aterosklerotskih promena koji dovodi do razvoja kardiovaskularnih bolesti nije u potpunosti jasan, zabeleženo je da endotelna disfunkcija koja je prisutna u TBS povezana sa povećanom proizvodnjom ROS (188,189). Prospektivna Holandska studija potvrdila je ubranu stopu progresije ateroskleroze među pušačima kojima nedostaje *GSTM1* enzim. Ovo je naročito dolazilo do izražaja kod muškaraca (190). U ovoj tezi poređen je prethodni kardiovaskularni morbiditet između dve grupe hemodijaliznih bolesnika, onih sa delecijom gena i sa aktivnim *GSTM1* genom i zaključeno je da su bolesnici u obe grupe imali sličnu učestalost IM, CVI, AP, POAB i srčane aritmije. Pregledom literature nismo uspeali da pronađemo druge studije koje su poredile na isti ili sličan način kardiovaskularni morbiditet između ove dve grupe bolesnika. Međutim, uloga *GSTM1* genotipa je do sada ispitivana u kontekstu preživljavanja dijaliziranih bolesnika uključujući i kardiovaskularni mortalitet u nekoliko radova. Tako su Šuvakov i sar, analizirajući 119 bolesnika sa nultim genotipom i 80 sa aktivnim genotipom u periodu praćenja od 96 meseci pokazali da *GSTM1* nulti genotip ima prediktivnu ulogu kako u ukupnom mortalitetu, tako i kardiovaskularnom mortalitetu. Tokom 8-godišnjeg praćenja, pokazano je da su bolesnici sa *GSTM1* nultim genotipom imali 1,6 puta veći rizik od sveukupnog mortaliteta, a 2,1 put od kardiovaskularnog mortaliteta u odnosu na bolesnike sa aktivnim genotipom (51). U jednoj drugoj studiji, nakon praćenja od 70 meseci, slično prethodno navedenoj studiji, pokazano je da bolesnici sa *GSTM1* nultim genotipom imaju opšti mortalitet veći 4,6 puta u odnosu na one sa aktivnim genotipom (164) i kao u prethodnoj studiji

zaključeno je da je *GSTM1* nulti genotip nezavisan prediktor mortaliteta. *Lin* i sar. su takođe zabeležili rezultate slične prethodnim studijama (172). U jednoj drugoj studiji je pokazano da bolesnici sa *GSTM1* nultim genotipom imaju značajno veći rizik od CVI u odnosu na bolesnike sa aktivnim genotipom (191). Iako je bilo očekivano da su patofiziološki mehanizmi koji kod dijaliziranih bolesnika sa nultim *GSTM1* genotipom dovode do povećanog kardiovaskularnog mortaliteta slični kao i u patogenezi kardiovaskularnih događaja, naši rezultati koji se odnose na kardiovaskularni morbiditet nisu to pokazali. Kao jedan od mogućih razloga za neusaglašenost ovih rezultata uticaja *GSTM1* nultog genotipa na kardiovaskularni mortalitet i morbiditet može biti pomenuti dizajn studije preseka. Naime, ispitivane grupe naših bolesnika su bile heterogene u pogledu dužine vremena provedenog na dijalizi do momenta registrovanja kardiovaskularnih događaja, kao i u pogledu uzroka koji je doveo do nastanka terminalne bubrežne slabosti. Pored toga, zabeleženi broj kardiovaskularnih događaja je relativno mali. Kako je ranije napomenuto da je mortalitet bio veći u bolesnika sa *GSTM1* nultim genotipom, to remeti uporednu analizu preživelih bolesnika po pitanju morbiditeta u studiji preseka. Buduće longitudinalno praćenje ovih bolesnika i analiza broja kardiovaskularnih događaja u odnosu na vreme od početka lečenja hemodijalizom omogućiće bolju uporednu analizu kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta kod bolesnika sa aktivnim i nultim *GSTM1* genotipom.

Poredeći parametre anemije, između grupe bolesnika sa *GSTM1* nultim i aktivnim genotipom između analiziranih parametara anemije nije bilo statistički značajne razlike (učestalosti primene ASE, prosečnoj nedeljnoj dozi ASE, vrednostima Hb i ERI). Jedina studija u kojoj su poređeni parametri anemije između dijaliziranih bolesnika sa *GSTM1* nultim i aktivnim genotipom bila je studija *Lin* i sar. i u njoj, za razliku od naših rezultata, bolesnici sa *GSTM1* nultim genotipom su imali niže prosečne vrednosti Hb i zahtevali su veće doze ASE (172). Uzrok anemije u TBS je multifaktorijalan, od neadekvatnog sinetisanja eritropoetina iz obolelih bubrega, do povišenog nivoa prozapaljenkih citokina koji inhibiraju eritropoezu (116, 119) i povišenog oksidativnog stresa (125). S obzirom na postojanje brojnih dokaza o povećanom oksidativnom stresu kod bolesnika sa *GSTM1* nultim genotipom u odnosu na aktivni genotip, moglo se očekivati da bolesnici sa *GSTM1* nultim genotipom imaju lošije parametre anemije u odnosu na aktivni genotip, što nije viđeno u prikazanoj ispitivanoj populaciji bolesnika. Moguće objašnjenje je da je bilo u pitanju samo jedno merenje, te da bi se pravi rezultat mogao videti tek dužim praćenjem pomenutih vrednosti.

Pored apsolutnog nedostatka gvožđa, mnogi bolesnici sa HBB imaju i funkcionalni nedostatak gvožđa, koji se karakteriše neadekvatnim oslobađanjem gvožđa iz depoa što onemogućava eritropoezu (119). Dostupnost gvožđa za eritropoezu je važna za postizanja ciljnog hemoglobina pri primeni ASE. Vezivanje hepcidina za ferroportin indukuje endocitozu i lizozomsku degradaciju ferroportina, smanjujući isporuku gvožđa u plazmu kao i dostupnost gvožđa za eritropoezu (192,193). Takođe, zabeleženo je da se hepcidin može direktno vezati za gvožđe (194, 195). U studiji sa više od 400 HD bolesnika pokazana je direktna povezanost između hepcidina i feritina u svim nivoima upale (195). Bolesnicima na HD se daju ASE i suplementi gvožđa, međutim proinflamatorni citokini uzrokuju rezistenciju na primenjene ASE, što zahteva korišćenje velikih doza ASE za održavanje ciljnog nivoa Hg (197-200) Korišćenje visokih doza ASE povezano je sa povećanim kardiovaskularnim rizikom (201,202). Homeostaza gvožđa održava se na osnovu interakcije između ferroportina, ćelijskog izvoznika gvožđa, koji prenosi gvožđe u plazmu i hepcidina proizvedenog u hepatocitima, regulatornog hormona gvožđa koji inhibira aktivnost ferroportina u smislu transporta gvožđa u plazmu (203). U literaturi se sugerise da IL-6 ima sposobnost da indikuje transkripciju hepcidina (204). U našim rezultatima, poredeći status gvožđa, nije bilo razlike između dve grupe bolesnika u pogledu feritina, serumskog gvožđa i saturacije transferin. Studija *Lin* i sar. zabeležila je slične rezultate (172).

Zbog značaja koji imaju nutritivni status i mineralno-koštani metabolizam u lečenju i ishodu lečenja bolesnika sa uremijom, ispitali smo osnovne nutritivne parametre i parametre mineralno-koštanog metabolizma shodno *GSTM1* genotipu. Rezultati su ukazali da su bolesnici sa *GSTM1*

aktivnim genotipom imali statistički značajno niže vrednosti LDL holesterola i serumskog fosfata, dok u pogledu drugih parametara nutricije i mineralno-koštanog metabolizma (serumskih albumina, ukupnih proteina, ukupnog holesterola, HDL holesterola, triglicerida, serumskog kalcijuma i iPTH) između dve grupe bolesnika nije bilo statistički značajne razlike. Takođe, pregledom literature, jedina studija sa hemodijaliznom populacijom gde su poređeni pojedini parametri nutritivnog statusa (holesterol, serumski albumini, trigliceridi), između dijaliznih bolesnika sa *GSTM1* nultim i aktivnim genotipom bila je studija *Lin i sar.* i rezultati te studije su slični prikazanim u ovom radu (172). Poređenjem gojaznih osoba sa zdravim kontrolama zabeleženo je da je *GSTM1* nulti genotip povezan sa dislipidemijom kao i sa gojaznošću (205, 206). U studiji *Almoshabek i sar.* zabeležene su niže vrednosti HDL holesterola, a više LDL holesterola kod gojaznih bolesnika sa *GSTM1* nultim genotipom u odnosu na kontrolu sa aktivnim genotipom (205). Zaključak pomenute studije je bio da *GSTM1* nulti genotip može doprinosti komplikacijama koje su u vezi sa gojaznošću kao što je dislipidemija.

Ni u jednoj drugoj studiji nismo pronašli da su poređeni parametri mineralno-koštanog metabolizma između bolesnika sa *GSTM1* aktivnim i nultim genotipom. Jedino je studija *Varadaraj i sar.* poredila pojedine parametre mineralo-koštanog metabolizma kod bolesnika sa HBB (bez TBS) sa *GSTM1* nultim i aktivnim genotipom, gde je slično našim rezultatima viđeno da su bolesnici na nultim *GSTM1* genotipom imali statistički značajno više vrednosti serumskih fosfata, dok u vrednostima kalcijuma nije bilo razlike (164). Oni su stoga pretpostavili da je moguće da je gubitak aktivnosti *GSTM1* uključen u patomehanizam razvoja osnovne bolesti i progresije HBB (164).

Sugestije nekoliko prethodnih studija, odnose se na činjenicu da bolesnici na HD koji imaju *GSTM1* nulti genotip su u većem riziku od kardiovaskularnog i opšteg mortaliteta i da su takvi bolesnici potencijalni kandidati za antioksidantnu terapiju, tj. da bi oni imali najveću korist od iste (53). U jednoj randomizovanoj kontrolisanoj studiji je pokazano da pušači sa *GSTM1* nultim genotipom koji su uzimali vitamin E (400 IJ/dan) tokom perioda od 2 godine su imali upola manji porast debljine intime medije karotidnih arterija u poređenju sa pušačima sa *GSTM1* nultim genotipom koji nisu uzimali vitamin E (189). *SPACE* studija je pokazala smanjenje učestalosti IM kod dijaliznih bolesnika koji su pili vitamin E (800 IJ/dan) (150).

Razvoj HD membrana nije imao samo za cilj poboljšanje adekvatnosti hemodijalize, već i poboljšanje biokompatibilnosti membrana kao i smanjenje oksidativnog stresa. Ovaj napredak u karakteristikama HD membrana doveo je do ukupnog poboljšanja dobrobiti po bolesnika kao i kvaliteta života (89). Vitamin E se primenjuje od ranih '90-ih i to vezan za površinu celuloznih, potom i sintetskih membrana, sa ciljem daljeg poboljšanja biokompatibilnosti, kao i zbog pružanja antioksidantne zaštite ćelijama krvi kao i cirkulišućim lipoproteinima (207,208). Ipak, uprkos mnoštvu prikupljenih podataka, još uvek nema sigurnih dokaza koji bi potvrdili prednost ovih membrana u odnosu na standardne polisulfonske membrane. Iako su bolesnici sa *GSTM1* delecijom u posebnom riziku od lošeg ishoda usled povećanog oksidativnog stresa (51), do danas nije pronađen adekvatan pristup za sprečavanje nastanka pojačanih oksidativnih oštećenja. Stoga, dostupnost VEM je obećavajuća prilika za individualizaciju tretmana i obezbeđivanje ovih membrane pre svega najugroženijoj populaciji bolesnika. U našoj zemlji se od skora primenjuju VEM u lečenju dijaliznih bolesnika. S obzirom da literaturni podaci ukazuju da su HD bolesnici sa homozigotnom delecijom *GSTM1* gena skloniji oksidativnom stresu, naša pretpostavka je bila da će bolesnici sa *GSTM1* delecijom imati dodatnu korist od lečenja sa VEM u smislu smanjenja oksidativnih oštećenja i inflamacije, te je iz tog razloga sproveden i drugi interventni deo istraživanja.

Nažalost, naše istraživanje nije pokazalo da primena VEM u trajanju od tri meseca značajnije utiče na promenu nivoa antioksidativnih markera, prooksidantnih markera, i zapaljenskih parametara nakon tri meseca lečenja.



Rezultati u literaturi koji se odnose na oksidativni stres u HBB nisu uvek konzistentni, ali uglavnom se beleži pad aktivnosti GPX u HBB (54, 55, 209, 210). Bitno je napomenuti da za razliku od eritrocitne GPX aktivnosti, značajan pad plazmatske GPX aktivnosti kod HBB je posledica činjenice da je bubreg glavni izvor GPX3 izoenzima u krvi. Dakle, funkcionalno oštećenje bubrega vodi do niže aktivnosti ovog enzima u cirkulaciji (209, 210). Za razliku od aktivnosti GPX, podaci iz literature ukazuju da se uglavnom aktivnost SOD ne smanjuje u početnim stadijumima HBB (211, 212), ali podaci nisu uvek konzistentni (213,214). *Mimic-Oka* i saradnici (55) nisu pronašli značajnu razliku u aktivnosti u plazmi SOD kod bolesnika sa HBS sa klirensom kreatinina iznad 20 ml/min u odnosu na zdrave kontrole, ali kod bolesnika sa klirensom ispod 20 ml/min i kod onih na hemodijalizi su pronašli značajnu nižu SOD aktivnost u odnosu na zdrave kontrole. Rezultati određivanja aktivnosti antioksidantne aktivnosti u ovom istraživanju nisu pokazali prednosti VEM nad standardnim polisulfonskim membranama. Naime, posle tri meseca lečenja, aktivnost GPX porasla je značajno u obe grupe, ali bez statistički značajne razlike između grupa. Razlog porasta aktivnosti GPX najverovatnije je posledica povećanja površine dijaliznih membrane u obe grupe tokom istraživanja (pre studije prosečna površina dijaliznih membrane iznosila je prosečno 1,62 i 1,67 m<sup>2</sup>). Međutim, neke dodatne prednosti primene VEM nad standardnim sintetskim membranama nisu zabeležene. U skorašnjoj meta analizi *D'Arrigo* i saradnika (148), koja je uključivala 60 studija, poređeni su efekti VEM nad konvencionalnim HD membranama i zaključak navedene studije je bio da primena VEM nije uticala na aktivnost GPX u plazmi. Pored toga, aktivnost SOD nije se statistički značajno promenila nakon tri meseca. Takođe u saglasju sa našim podacima, *D'Arrigo* i saradnici nisu pronašli da terapija VEM pravi značajne razlike u SOD aktivnosti. Takođe, aktivnost GPX i SOD aktivnost ostala je nepromenjena u jednoj drugoj studiji (215). Iz navedenog se može zaključiti da je procena korisnih efekata VEM određivanjem aktivnosti antioksidantnih enzima u plazmi dijaliziranih bolesnika veoma delikatna jer zavisi od više činilaca: trenutnog stanja bolesnika, druge primenjene terapije, ostalih uslova dijalize izvan membrane. Moguće je pretpostaviti da bi višestruka merenja aktivnosti antioksidantnih enzima u dužem vremenskom periodu bila merodavnija uz strogo praćenje bolesnika i eventualnih dodatnih faktora od uticaja na pokazatelje aktivnosti navedenih markera antioksidantnog statusa.

U našem istraživanju VEM nisu uticale ni na promenu nivoa markera oksidativnog oštećenja lipida i proteina s obzirom da su koncentracije MDA i tiol grupa značajno porasle u obe grupe, bez obzira na vrstu membrana koje su korišćene. Nasuprot našim podacima, *D'Arrigo* i sar. su pronašli da lečenje sa VEM smanjuje nivo MDA (148). Takođe, meta analiza *Yang* i sar. je pronašla značajno smanjenje nivoa MDA pri lečenju sa VEM (157), što je u suprotnosti sa našim podacima. Ipak u jednoj drugoj studiji, zabeležen je porast nivoa MDA nakon tromesečnog dijaliziranja sa VEM, što je u skladu sa rezultatima našeg istraživanja (216). Porast MDA nakon tri meseca lečenja sa VEM membranama je neočekivan, s obzirom da je MDA pokazatelj lipidne peroksidacije i snažan prediktor kardiovaskularnih događaja (217). *Suvakov* i sar. (51) su pokazali značajnu prediktivnu ulogu povišenih vrednosti MDA kod HD bolesnika kako na opšti tako i na kardiovaskularni mortalitet. Važno je napomenuti da se MDA u biološkim uzorcima najčešće meri kao sadržaj reaktivnih jedinjenja sa tiobarbiturnom kiselinom, metodom koja je relativno nespecifična (218). Najveći deo sadržaja tiol grupa u plazmi pripada albuminima, a manji deo uključuje tirole male molekulske težine, uključujući cistein, glutation, homocistein i cistinil-glicin (219). Pokazano je da uremijski toksini smanjuju nivo tiol grupa u plazmi, te da učestale HD sesije dovode do porasta nivoa tiol grupa u plazmi uz smanjenje disulfidnih veza (220). Skorašnja studija koja je poredila srednje *cut-off* membrane sa niskopropusnim i visokopropusnim membranama, nije primetila razlike u nivou tiola sa različitim membranama (221). Podaci koji se odnose na oksidativna oštećenja proteina, kao što su nivoi tiolnih grupa nakon lečenja sa VEM nedostaju u literaturi i to zahteva dalja istraživanja. Sve to ukazuje na kompleksnost interakcije

dijalizne procedure, medikamentozne terapije, komorbiditeta i aktuelnog stanja bolesnika. Ta kompleksnost ograničava i primenu samo jedne mere koja bi imala za efekat antioksidantno dejstvo.

Zapaljenski status bolesnika na HD jasno pokazuju povišeni nivoi CRP-a, IL-6 i hepcidina, koji su dobro znani markeri zapaljenja. Sinteza CRP-a u jetri pokreće se oslobođenim IL-6 iz aktiviranih zapaljenskih ćelija koje takođe indukuju proizvodnju hepcidina u jetri. Kao što je već prethodno napomenuto, povišeni nivoi hepcidina doprinose pogoršanju anemije menjajući metabolizam gvožđa (222). Marker zapaljenja CRP ostao je nepromenjen u obe ispitivane grupe, dok je IL-6 porastao u kontrolnoj grupi i istovremeno se smanjio u VEM grupi nakon tromesečnog lečenja, ali razlika između grupa nije dostigla statističku značajnost. Ovo bi moglo biti posledica velikih inter-individualnih varijacija u nivoima IL-6 u obe grupe. Zapravo, nivo IL-6 nije samo marker kontakta dijalizne membrane i krvi, već na njegov nivo utiču osnovna bubrežna bolest, komorbiditeti, starost i primenjena terapija, te se stoga više posmatra kao nespecifični marker zapaljenja, nego kao specifični marker membranske prooksidativne aktivnosti. Meta analiza *D'Arrigo* i sar. (148) pokazala je rezultate slične našima, tj. da je primena VEM dovela do smanjenja nivoa IL-6. S druge strane, tri randomizovne kontrolisane studije nisu potvrdile takve rezultate (223-225). Takođe slično našim rezultatima, meta analiza *D'Arrigo* i sar. (148) nije pronašla da primena VEM dovodi do smanjenja nivoa CRP-a. U pet drugih studija viđeni su slični rezultati (224-228). Nasuprot ovome, samo je u jednoj studiji zabeleženo značajno smanjenje nivoa CRP-a uz primenu VEM (229).

U pogledu parametara anemije i gvožđa, lečenje sa VEM uticalo je samo na saturaciju transferina, koja se smanjila (ali ostala unutar referentnog opsega), za istu količinu ordiniranog gvožđa, istu prosečnu dozu ASE i isti nivo feritina. Ovo bi se moglo tumačiti sa boljim iskorišćavanjem serumskog gvožđa za eritropoezu kod bolesnika lečenih VEM. Ostali parametri anemije ostali su nepromenjeni. Rezultati meta analize ukazuju da primena VEM ne utiče značajno na broj eritrocita, nivo hemoglobin kao ni na prosečnu dozu ASE (148). Za razliku od naših rezultata, oni su pronašli da primena VEM dovodi do smanjenja ERI, ali ovo nije viđeno u nekim drugim randomizovanim kontrolisanim studijama (230). Slično rezultatima našeg istraživanja, nisu pronašli razlike u vrednostima serumskog gvožđa i feritina između grupa, dok je postojalo značajno smanjenje saturacije transferina u VEM grupi. Kao što je već naglašeno od strane *Locatelli*-jeve grupe (231), poboljšanje anemije je obično praćeno smanjenjem nivoa IL-6, što sugerise da primena VEM može imati blagotvorne efekte na indikatore anemije. Zaštita membrane eritrocita je posredovana smanjenjem peroksidacije kao i smanjenjem proinflamatornih citokina i nivoa hepcidina koji inhibiraju eritropoezu i/ili menjaju dostupnost gvožđa za eritropoezu.

Uprkos izuzetnom tehnološkom napretku dijaliznog lečenja i dalje postoje brojni problemi koji su povezani sa prolongiranim lečenjem, kao što je proteinska malnutricija i ateroskleroza (232). Rezultati prethodnih studija ukazuju da je 20-80 % bolesnika na HD blago do umereno pothranjeno (233,234). U upalnom procesu kakav možemo da vidimo kod HD bolesnika, zapaljenski citokini indukovani bioinkompatibilnim membranama i bakterijskom kontaminacijom dijalizata, mogu da aktiviraju reaktante akutne faze jetre što dovodi do smanjenja nivoa serumskih albumina (235). Rezultati nekih kohortnih studija ukazuju na povezanost pothranjenosti i zapaljenja (236,237). Kako je u prethodnim studijama pokazano da primena VEM smanjuje oksidativni stres i nivo zapaljenja (157), naša pretpostavka je bila da će primena VEM verovatno poboljšati nutritivni status bolesnika, smanjenem nivoa zapaljenja, jer su neke prethodne studije sugerisale da je suplementacija vitaminom E popravila neuhranjenost bolesnika na HD (234). Našom analizom nismo utvrdili da se nutritivni status menja tokom primene VEM. Naravno, za dublju analizu potrebne su i dodatne analize nutritivnog statusa a pre svega dugotrajnije praćenje bolesnika, ali je važno napomenuti da su svi bolesnici bili dobrog nutritivnog statusa te se nije ukazivala potreba za rešavanjem malnutricije.

Oko 40 % bolesnika sa hroničnog programa HD umire usled ateroskleroze i posledičnih kardiovaskularnih bolesti (238). Pretpostavka je između ostalog, da to može biti posledica i oksidativnog stresa izazvanog ekstrakorporalnom cirkulacijom i primenom bioinkompatibilnih dijalizatora (239). Mnoge studije ukazuju da primena VEM može smanjiti oksidativni stres i poboljšati endotelnu disfunkciju (239), te je pretpostavka da VEM mogu usporiti aterosklerozu i poboljšati lipidni status.

Iako je zabeleženo značajno poboljšanje u vrednostima HDL, triglicerida, serumskih albumina, proteina i vrednostima Kt/V unutar grupa, statistički značajna razlika između grupa nije pronađena. Slični rezultati su zabeleženi u prethodno pomenutoj meta-analizi (148). Takođe u meta analizi *Huang i sar.* (240) nije pokazan uticaj primene VEM na lipide i nivo albumina. Nasuprot tome, nivoi LDL i HDL su opali kod bolesnika lečenih kako VEM tako i standardnim membranama u jednoj drugoj nerandomizovanoj studiji (241). Prema podacima *Tsuruoka i sar.* zabeleženo je smanjenje nivoa LDL kod bolesnika lečenih VEM (242). Rezultati ove studije ukazuju da primena VEM ne utiče dovoljno značajno na aterosklerozu indukovanu hemodijalizom i dislipidemiju. Meta analiza *D'Arrigo i sar.* (148) slično našim rezultatima, nije pronašla razlika u vrednostima mokraćne kiseline sa primenom VEM. Podaci koji se odnose na vrednosti serumskog kalcijuma i fosfata nakon lečenja sa VEM nedostaju u literaturi te nije moguća komparacija naših rezultata sa rezultatima drugih autora.

Ni jedna studija do sada, po našim saznanjima nije poredila kardiovaskularni morbiditet i mortalitet kod HD bolesnika između onih koji su lečeni VEM i standardnim polisulfonskim membranama. Sve dosadašnje studije su poredile uticaj primene VEM na određene faktore rizika za nastanak KVB i kardiovaskularnog morbiditeta. Pored onih opštih faktora rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti, bolesnici na HD imaju i dodatne faktore rizika kao što su anemija, sekundarni hiperparatireoidizam, mikroinflamacija, intradijalizna hipotenzija, hipervolemija itd. Tokom trajanja našeg istraživanja iz VEM grupe preminula su dva bolesnika (jedan od CVI, drugi od IM). Istovremeno u kontrolnoj grupi su preminula dva bolesnika (hipervolemija i edem pluća) i respiratorna insuficijencije zbog hronične obstruktivne bolesti pluća). Potrebna su duža istraživanja koja bi poredila kardiovaskularni mortalitet HD bolesnika, kao i opšti mortalitet i eventualni benefit primene VEM.

Ovo istraživanje je imalo nekoliko ograničenja. Tri meseca možda nije dovoljno dug period da se sagledaju korisni efekti lečenja sa VEM. Pojedinačna merenja parametra oksidativnog stresa i zapaljenja mogu izostaviti varijacije koje se mogu događati (čak pre i posle hemodijalizne sesije), samim tim nedostaje i bolji uvid u kontinuirano stanje zapaljenja i oksidativnog stresa. Povećanjem broja bolesnika, neke vrednosti bi mogle dostići statističku značajnost. Konačno, podaci o ishodu su merodavni jedino nakon duže primene VEM. Međutim, kao prva randomizovana studija koja je sprovedena sa visokorizičnim bolesnicima (sa *GSTM1* delecijom), dovela je do utiska da je prednost VEM, kao jedne skupe membrane, potrebno u budućnosti dodatno dokumentovati.

## 6 ZAKLJUČCI

- Bolesnici lečeni HD u našem istraživanju češće su imali *GSTM1* nulti genotip u odnosu na *GSTM1* aktivni genotip.
- Bolesnici sa *GSTM1* nultim genotipom ređe su imali hipertenzivnu nefroangiosklerozu kao osnovni uzrok TBS u odnosu na bolesnike sa aktivnim genotipom
- Između bolesnika sa *GSTM1* aktivnim i nultim genotipom nije bilo razlike u pogledu kardiovaskularnog morbiditeta i prethodnih kardiovaskularnih događaja, kao ni u pogledu parametara anemije i parametara gvožđa
- Bolesnici sa *GSTM1* aktivnim genotipom imali su značajno niže vrednosti LDL holesterola i serumskog fosfata u odnosu na bolesnike sa *GSTM1* nultim genotipom
- Nakon tromesečnog perioda dijaliziranja sa VEM nije došlo do dodatnih korisnih efekata u odnosu na standardne polisulfonske membranama u smanjenju bioprodukata oksidativnog stresa kod bolesnika sa *GSTM1* nultim genotipom
- Marker zapaljenja CRP ostao je nepromenjen u obe ispitivane grupe nakon tromesečnog lečenja, dok je IL-6 porastao u kontrolnoj grupi i istovremeno se smanjio u VEM grupi, ali razlika između grupa nije dostigla statističku značajnost.
- U pogledu parametara anemije i gvožđa, lečenje sa VEM uticalo je samo na smanjenje saturacije transferina, za istu količinu primenjenog gvožđa, istu prosečnu dozu ASE i isti nivo feritina u odnosu na grupu bolesnika lečenu standardnim membranama.
- U pogledu parametara uhranjenosti i mineralno-koštanog metabolizma nije pokazana statistički značajna razlika između grupe bolesnika lečenih VEM i standardnim membranama
- Uvid u dugoročne efekte VEM kod rizičnih grupa, poput dijaliznih bolesnika sa delecionim polimorfizmom *GSTM1*, pružiće buduća longitudinalna istraživanja na većom broju bolesnika.

## 7 LITERATURA

1. National Kidney F. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis.* 2002; 39:1–266.
2. Karkar A. Modalities of hemodialysis: quality improvement. *Saudi J Kidney Dis Transplant.* 2012; 23:1145–61.
3. Vanholder R, De Smet R, Glorieux G, Argiles A, Baurmeister U, Brunet P, et al. Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int.* 2003; 63:1934–43.
4. Libetta C, Sepe V, Esposito P, Galli F, Dal Canton A. Oxidative stress and inflammation: implications in uremia and hemodialysis. *Clin Biochem.* 2011; 44:1189–98.
5. Morena M, Delbosc S, Dupuy AM, Canaud B, Cristol JP. Overproduction of reactive oxygen species in end-stage renal disease patients: a potential component of hemodialysis-associated inflammation. *Hemodial Int.* 2005; 9:37–46.
6. Cohen G, Horl WH. Immune dysfunction in uremia—an update. *Toxins (Basel).* 2012; 4:962–90.
7. Galli F. Protein damage and inflammation in uraemia and dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2007; 22:20–36.
8. Himmelfarb J. Oxidative stress in hemodialysis. *Contrib Nephrol.* 2008; 161:132–7.
9. Oberg BP, McMenamin E, Lucas FL, McMonagle E, Morrow J, Ikizler TA, et al. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2004; 65:1009–16.
10. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalisation. *N Engl J Med* 2004; 351:1296–305.
11. Zoccali C, Bode-Boger S, Mallamaci F, Benedetto F, Tripepi G, Malatino L et al. Plasma concentration of asymmetrical dimethyl-arginine and mortality in patients with end-stage renal diseases: a prospective study. *Lancet* 2001; 358: 2113-7.
12. Parfrey PS, Foley RN. The clinical epidemiology of cardiac disease in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:1606-15.
13. Belhadj SI, Najjar T, Ghram A, Dabbebi H, Ben Mrad M, et al. Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review. *Int J Hyperth.* 2014; 30: 513-23.
14. Mittal CK, Murad F. Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation . *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74:4360-4.
15. White AA, Crawford KM, Patt CS, Lad PJ. Activation of soluble guanylate cyclase from rat lung by incubation or by hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* 1976; 251:7304-12.
16. Ignarro LJ, Kadowitz PJ. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1985; 25:171-91.
17. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol.* 1987; 92:639-46.
18. Roth S, Dröge W. Regulation of T-cell activation and T-cell growth factor (TCGF) production by hydrogen peroxide *Cell Immunol* 1987; 108:417-24.
19. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M.T.D, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007; 39:44–84.
20. Bedard K, Krause KH, The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. 2007; 87:245–313.

21. Yamakura F, Kawasaki H. Post-translational modifications of superoxide dismutase. *Biochim. Biophys.* 2010; 1804:318–325.
22. Dhalla N.S, Temsah RM, Netticadan T, Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J. Hypertens* 2000; 18, 655–673.
23. Csányi G, Yao M, Rodríguez AI, Al Ghoulh I, Sharifi-Sanjani M, Frazziano G et al. Thrombospondin-1 regulates blood flow via CD47 receptor-mediated activation of NADPH oxidase 1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32:2966-73.
24. Sies H. Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr* 1991; 69: 965–968.
25. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012; 5: 9-19.
26. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev.* 2014; 94: 909-50.
27. Nimse SB, Pal D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv.* 2015; 5: 2786-8006.
28. Valko M, Jomova K, Rhodes CJ, Kuča K, Musílek K. Redox- and non-redox-metalinduced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch Toxicol.* 2016; 90: 1-37.
29. Marinho HS, Real C, Cyrne L, Soares H, Antunes F. Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biol.* 2014; 2: 535-62.
30. Weidinger A, Kozlov AV. Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. *Biomolecules.* 2015; 5: 472-84.
31. Halliwell B, Gutteridge JM Free radicals in biology and medicine. New York: Oxford University Press, 1999.
32. Đorđević BV, Pavlović DD, Kocić MG. Biohemija slobodnih radikala. Niš, Medicinski fakultet, 2000.
33. Ghogare AA, Greer A. Using Singlet Oxygen to Synthesize Natural Products and Drugs. *Chem Rev.* 2016; 116: 9994-1034.
34. Onyango AN. Endogenous Generation of Singlet Oxygen and Ozone in Human and Animal Tissues: Mechanisms, Biological Significance, and Influence of Dietary Components. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016: Article ID 2398573.
35. Rajendran P, Nandakumar N, Rengarajan T, Palaniswami R, Gnanadhas EN, Lakshminarasaiiah U, et al. Antioxidants and human diseases. *Clin Chim Acta.* 2014; 436: 332-47.
36. Poprac P, Jomova K, Simunkova M, Kollar V, Rhodes CJ, Valko M. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2017; 38: 592-607.
37. Che M, Wang R, Li X, Wang H-Y, Zheng XFS. Expanding roles of superoxide dismutases in cell regulation and cancer. *Drug Discov Today.* 2016; 21: 143-9.
38. Moloney JN, Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 2018; 80: 50-64.
39. Jiao Y, Wang Y, Guo S, Wang G. Glutathione peroxidases as oncotargets. *Oncotarget.* 2017; 8: 80093-102.
40. Sen CK, Packer L. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *Am J Clin Nutr* 2000; 72:653-69.
41. Dickinson DA, Forman HJ. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol* 2002; 64:1019-26.
42. Hayes J.D, Flanagan J.U, Jowsey I.R, Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2005; 45, 51–88.
43. Mannervik B, Board P.G, Hayes J.D, Listowsky I, Pearson W.R. Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases. *Methods Enzymol.* 2005; 401, 1–8.

44. Luo W, Kinsey M, Schiffman J.D, Lessnick S.L. Glutathione S transferases in pediatric cancer. *Front. Oncol.* 2011; 1-39.
45. Seeley S.K, Poposki J.A, Maksimchuk J, Tebbe J, Gaudreau J, Mannervik B, Bull A.W. Metabolism of oxidized linoleic acid by glutathione transferases: peroxidase activity toward 13-hydroperoxyoctadecadienoic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 2006; 1760: 1064–1070.
46. Ross E.A, Koo L.C, Moberly J.B. Low whole blood and erythrocyte levels of glutathione in hemodialysis and peritoneal dialysis patients. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 1997; 30:489–494.
47. Xu S, Wang Y, Roe B, Pearson W.R. Characterization of the human class Mu glutathione S-transferase gene cluster and the GSTM1 deletion. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 3517–3527.
48. Weidong Wu, David Peden, David Diaz-Sanchez Role of GSTM1 in resistance to lung inflammation *Free Radic Biol Med.* 2012; 53:721-9.
49. Board P, Coggan M, Johnston P et al. Genetic heterogeneity of the human glutathione transferases: a complex of gene families. *Pharmacol Ther* 1990; 48: 357–369.
50. Lin YS, Hung SC, Wei YH, Tarng DC. GST M1 polymorphism associates with DNA oxidative damage and mortality among hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 405–415.
51. Suvakov S, Jerotic Dj, Damjanovic T, Milic N, Pekmezovic T, Djukic T, et al. Markers of Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction Predict Haemodialysis Patients Survival *Am J Nephrol.* 2019;50:115-125.
52. Suvakov S, Damjanovic T, Stefanovic A, Pekmezovic T, Savic-Radojevic A, Pljesa-Ercegovac M, et al. Glutathione S-transferase A1, M1, P1 and T1 null or low-activity genotypes are associated with enhanced oxidative damage among haemodialysis patients *Nephrol Dial Transplant .* 2013; 28:202-12.
53. Suvakov S, Damjanovic T, Pekmezovic T, Jakovljevic J, Savic-Radojevic A, Pljesa-Ercegovac M et al. Associations of GSTM1\*0 and GSTA1\*A genotypes with the risk of cardiovascular death among hemodialyses patients. *BMC Nephrol.* 2014; 14:12-15.
54. Mimic-Oka J, Simic T, Djukanovic L, Stefanovski J, Ramic Z. Glutathione and its associated enzymes in peripheral blood cells in different stages of chronic renal insufficiency. *Amino Acids* 1992; 2: 215–224.
55. Mimić-Oka J, Simić T, Djukanović L, Reljić Z, Davicević Z. Alteration in plasma antioxidant capacity in various degrees of chronic renal failure. *Clin. Nephrol.* 1999; 51, 233–241.
56. Modlinger P. S, Wilcox C. S and Aslam S. Nitric oxide, oxidative stress, and progression of chronic renal failure, *Seminars in Nephrology*, 2004; 24: 354–365.
57. Haugen E. and. Nath K. A, The involvement of oxidative stress in the progression of renal injury, *Blood Purification*, 1999; 17:58–6.
58. Aiello S, Noris M, Todeschini M, Zappella S, Foglieni C, Benigni A et al. Renal and systemic nitric oxide synthesis in rats with renal mass reduction, *Kidney International*, 1997; 52: 171–181.
59. Karuppiah K, Druhan LJ, Chen CA, Smith T, Zweier JL, Sessa WC et al. Suppression of eNOS-derived superoxide by caveolin-1: a biopterin-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 301: H903–H911.
60. Chen CA, Lin CH, Druhan LJ, Wang TY, Chen YR, Zweier JL. Superoxide induces endothelial nitric-oxide synthase protein thiyl radical formation, a novel mechanism regulating eNOS function and coupling. *J Biol Chem* 2011; 286: 29098–107.
61. Wu F, Szczepaniak WS, Shiva S, Liu H, Wang Y, Wang L, et al. NOX2-dependent glutathionylation of endothelial NOS leads to uncoupled superoxide production and endothelial barrier dysfunction in acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2014; 307(12):L987-97.

62. Yilmaz M. I, Saglam M, Caglar K, Cakir E, Sonmez A, Ozgurtas T et al. The determinants of endothelial dysfunction in CKD: oxidative stress and asymmetric dimethylarginine. *American Journal of Kidney Diseases* 2006; 47: 42–50.
63. Mimić-Oka J, Djukanović L, Marković B. Erythrocyte and plasma glutathione levels in patients with chronic renal insufficiency. *Biochem Med Metab Biol.* 1988; 39:48-54.
64. Terawaki H, Yoshimura K, Hasegawa T, Matsuyama Y, Negawa T, Yamada K et al. Oxidative stress is enhanced in correlation with renal dysfunction: examination with the redox state of albumin. *Kidney International*, 2004; 66:1988–93.
65. Dounousi E, Papavasiliou E, Makedou A, Ioannou K, Katopodis KP, Tselepis A et al., “Oxidative stress is progressively enhanced with advancing stages of CKD,” *American Journal of Kidney Diseases*, 2006; 48: 752–760.
66. Oberg B.P, McMEnamin E, Lucas F.L, McMonagle E, Morrow J, Ikizler TA et al. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease, *Kidney International*, 2004; 65:1009–16.
67. Simmons E.M, Langone A, Sezeretal M.T. Effect of renal transplantation on biomarkers of inflammation and oxidative stress in end-stage renal disease patients. *Transplantation*, 2005; 79: 914–919.
68. Liakopoulos V, Roumeliotis S, Gorny X, Dounousi E, Peter R. Mertens Oxidative Stress in Hemodialysis Patients: A Review of the Literature *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 2017: 3081856.
69. Chen M.F, Chang C.L, Liou S. Y. Increase in resting levels of superoxide anion in the whole blood of uremic patients on chronic hemodialysis. *Blood Purification*, 1998; 16:290–300.
70. Nguyen A.T, Lethias C, Zingra J, Herbelin A, Naret C, Descamps-Latscha B. Hemodialysis membrane-induced activation of phagocyte oxidative metabolism detected in vivo and in vitro within microamounts of whole blood. *Kidney International*, 1985; 28: 158–167.
71. Maher ER, Wickens DG, Griffin JF, Kyle P, Curtis JR, Dormandy TL. “Increased free-radical activity during haemodialysis?,” *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 1987;2(3):169-71.
72. Loughrey CM, Young IS, Lightbody JH, McMaster D, McNamee PT, Trimble ER, “Oxidative stress in haemodialysis,” *QJM : Monthly Journal of the Association of Physicians*, 1994;87:679-83.
73. Nguyen-Khoa T, Massy ZA, DeBandtetal JP. Oxidative stress and haemodialysis: role of inflammation and duration of dialysis treatment. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 2001; 16: 2, 335–340.
74. Bayés B, Pastor MC, Bonal J, Juncà J, Romero R., “Homocysteine and lipid peroxidation in haemodialysis: role of folic acid and vitamin E,” *Nephrology, Dialysis, Transplantation, Nephrol Dial Transplant.* 2001; 16:2172-5.
75. Yang CC, Hsu SP, Wu MS, Hsu SM, Chien CT. Effects of vitamin C infusion and vitamin E-coated membrane on hemodialysis-induced oxidative stress. *Kidney International*, 2006; 69: 706–714.
76. Fiorillo C, Oliviero C, Rizzuti G, Nediani C, Pacini A, Nassi P. “Oxidative stress and antioxidant defenses in renal patients receiving regular haemodialysis,” *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Clin Chem Lab Med.* 1998;36:149-53.
77. Granata S, Zaza G, Simone S, Villani G, Latorre D, Pontrelli P et al., “Mitochondrial dysregulation and oxidative stress in patients with chronic kidney disease,” *BMC Genomics.* 2009; 10: 388.
78. Handelman GJ, Walter MF, Adhikarla R, Gross J, Dallal GE, Levin NW et al., “Elevated plasma F2-isoprostanes in patients on long-term hemodialysis. *Kidney Int.* 2001; 59:1960-6.



79. Faraci FM, Didion SP.. Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24(8):1367-73.
80. Fukai T, Folz RJ, Landmesser U, Harrison DG. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.* 2002; 55(2):239-49.
81. Deicher R, Ziai F, Bieglmayer C, Schillinger M, Hörl WH. Low total vitamin C plasma level is a risk factor for cardiovascular morbidity and mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* 2005; 16:1811-8.
82. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation.* 1998; 97:2222-9.
83. Hrvačević R. Biokompatibilnost dijalize. U: Hrvačević R. (urednik). *Savremene metode dijalize.* Grafolik, Beograd 2012; 47-74.
84. Filiopoulos V, Takouli L, Vlassopoulos D. The effect of vitamin E-coated membrane dialysers on inflammation and oxidative stress in maintenance haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2011; 26:3064-5.
85. Merello Godino JI, Rentero R, Orlandini G, Marcelli D, Ronco C. Results from EuCliD (European Clinical Dialysis Database): impact of shifting treatment modality. *Int J Artif Organs.* 2002; 25:1049–60.
86. Oshvandi K, Kavyannejad R, Borzuo SR, Gholyaf M. High-flux and low-flux membranes: efficacy in hemodialysis. *Nurs Midwifery Stud.* 2014;3:e21764.
87. Ward RA. Do clinical outcomes in chronic hemodialysis depend on the choice of a dialyzer? *Semin Dial.* 2011; 24:65–71.
88. Debska-Slizien A, Malgorzewicz S, Dudziak M, Ksiazek A, Sulowicz W, Grzeszczak W et al. Cardiovascular risk in patients undergoing maintenance hemodialysis with Helixone(R) membrane: a multicenter randomized study. *Pol Arch Med Wewn.* 2014; 124:593–8.
89. Kohlová M, Amorim CG, Araújo A, Santos-Silva A, Solich P, Montenegro MCBSM. The biocompatibility and bioactivity of hemodialysis membranes: their impact in end-stage renal disease. *J Artif Organs.* 2019 Mar;22(1):14-28.
90. Aucella F, Gesuete A, Vigilante M, Prencipe M. Adsorption dialysis: from physical principles to clinical applications. *Blood Purif.* 2013; 35:42–7.
91. Sakai K, Matsuda M. Solute removal efficiency and biocompatibility of the high-performance membrane—from engineering points of view. *Contrib Nephrol.* 2011;173:11–22.
92. Dasgupta A, Hussain S, Ahmad S. Increased lipid peroxidation in patients on maintenance hemodialysis. *Nephron.* 1992; 60(1):56-9.
93. Biasioli S, Schiavon R, Petrosino L, Cavallini L, Zambello A, De Fanti E et al. Free radicals and oxidative stress challenge dialysis patients: effects of two different membranes. *ASAIO J.* 1997 Sep-Oct;43(5):M766-72.
94. Cristol JP, Canaud B, Rabesandratana H, Gaillard I, Serre A, Mion C. Enhancement of reactive oxygen species production and cell surface markers expression due to haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant.* 1994; 9:389-94.
95. Descamps-Latscha B, Goldfarb B, Nguyen AT, Landais P, London G, Haeffner-Cavaillon N et al., “Establishing the relationship between complement activation and stimulation of phagocyte oxidative metabolism in hemodialyzed patients: a randomized prospective study. *Nephron.* 1991;59(2):279-85.
96. Sevillano G, Rodríguez-Puyol M, Martos R, Duque I, Lamas S, Díez-Marqués ML, et al., Cellulose acetate membrane improves some aspects of red blood cell function in haemodialysis patients,” *Nephrol Dial Transplant.* 1990; 5:497-9.

97. Kosch M, Levers A, Fobker M, Barenbrock M, Schaefer RM, Rahn KH et al. Dialysis filter type determines the acute effect of haemodialysis on endothelial function and oxidative stress. *Nephrol Dial Transplant*. 2003 Jul; 18:1370-5.
98. Schettler V, Wieland E, Verwiebe R, Schuff-Werner P, Scheler F, Oellerich M. Plasma lipids are not oxidized during hemodialysis. *Nephron*. 1994; 67:42-7.
99. Müller C, Eisenbrand G, Gradinger M, Rath T, Albert FW, Vienken J. et al., Effects of hemodialysis, dialyser type and iron infusion on oxidative stress in uremic patients. *Free Radic Res*. 2004 Oct; 38:1093-100.
100. Yavuz O, Bicik Z, Cinar Y, Guney Y, Guler S. The effect of different dialysis membranes on oxidative stress and selenium status. *Clin Chim Acta*. 2004 Aug 16; 346(2):153-60.
101. Wu CC, Chen JS, Wu WM, Liao TN, Chu P, Lin SH. Myeloperoxidase serves as a marker of oxidative stress during single haemodialysis session using two different biocompatible dialysis membranes. *Nephrol Dial Transplant*. 2005 Jun; 20:1134-9
102. Varan HI, Dursun B, Dursun E, Ozben T, Suleymanlar G. Acute effects of hemodialysis on oxidative stress parameters in chronic uremic patients: comparison of two dialysis membranes. *Int J Nephrol Renovasc Dis*. 2010; 3:39-45.
103. Calò LA, Naso A, Carraro G, Wratten ML, Pagnin E, Bertipaglia L Carraro et al. Effect of haemodiafiltration with online regeneration of ultrafiltrate on oxidative stress in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2007; 22:1413-9
104. Davenport A. Effects of hemodiafiltration of inflammation and oxidative stress. 2016. *Hemodiafiltration*, pp. 153–163, Springer.
105. González-Diez B, Cavia M, Torres G, Abaigar P, Muñoz P. Effect of a hemodiafiltration session with on-line regeneration of the ultrafiltrate on oxidative stress. Comparative study with conventional hemodialysis with polysulfone *Blood Purif*. 2008; 26:505-10.
106. Canaud B, Bosc JY, Leray H, Stec F, Argiles A, Leblanc M. et al. On-line haemodiafiltration: state of the art. *Nephrol Dial Transplant*. 1998; 13 Suppl 5:3-11.
107. Filiopoulos V, Hadjiyannakos D, Metaxaki P, Sideris V, Takouli L, Anogiati A. et al. Inflammation and oxidative stress in patients on hemodiafiltration. *Am J Nephrol*. 2008; 28(6):949-57.
108. Himmelfarb J, McMenamin E, McMonagle E. Plasma aminothiols oxidation in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int*. 2002 Feb; 61(2):705-16.
109. Dahle LK, Hill EG, Holman RT. The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Arch. Biochem. Biophys*. 1962; 98:253 -61.
110. Nally JV. Cardiac disease in chronic uremia: investigation. *Adv. Ren. Replace. Ther*. 1997; 4, 225–233.
111. Rumley AG, Woodward M, Rumley A, Rumley J, Lowe GDO. Plasma lipid peroxides: relationships to cardiovascular risk factors and prevalent cardiovascular disease. *QJM* 2004; 97:809-16.
112. Smith FB, Lowe GD, Fowkes FG, Rumley A, Rumley AG, Donnan PT et al.. Smoking, haemostatic factors and lipid peroxides in a population case control study of peripheral arterial disease. *Atherosclerosis* 1993; 102:155–162.
113. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int*. 1996; 49:1304–1313.
114. S. Ruiz, P. E. Pergola, R. A. Zager, and N. D. Vaziri, “Targeting the transcription factor Nrf2 to ameliorate oxidative stress and inflammation in chronic kidney disease,” *Kidney International*, vol. 83, no. 6, pp. 1029–1041, 2013.

115. R. L. Amdur, H. I. Feldman, J. Gupta et al., "Inflammation and progression of CKD: the CRIC study," *Clinical journal of the American Society Society of Nephrology*, vol. 11, no. 9, pp. 1546–1556, 2016.
116. Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ, Lindholm B, Pecoits-Filho R, Riella M, Heimbürger O, Cederholm T, Grindt M. IL-10, IL-6 and TNF- $\alpha$ : Central factors in the altered cytokine network of uremia- The good, the bad, and the ugly. *Kidney Int* 2005 ISSN 0085-2538, Vol. 67, no 4, p. 1216-33.
117. Girndt M, Köhler H, Schiedhelm-Weick E, Schlaak JF, Meyer zum Büschenfelde KH, Fleischer B. Production of interleukin-6, tumour necrosis factor alpha and interleukin-10 in vitro correlates with the clinical immune defect in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int.* 1995 Feb; 4:559-65.
118. Mihara M, Hashizume M, Yoshida H, Suzuki M, Shiina M. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)*. 2012; 122(4):143-59.
119. Babitt JL, Lin HY. Mechanisms of anemia in CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2012; 23:1631–4.
120. Malyszko J, Malyszko JS, Mysliwiec M. Hyporesponsiveness to erythropoietin therapy in hemodialyzed patients: potential role of prohepcidin, hepcidin, and inflammation. *Ren Fail*. 2009; 31:544–8.
121. Costa E, Swinkels DW, Laarakkers CM, Rocha-Pereira P, Rocha S, Reis F, et al. Hepcidin serum levels and resistance to recombinant human erythropoietin therapy in haemodialysis patients. *Acta Haematol*. 2009;122:226–9.
122. Stenvinkel P. The role of inflammation in the anaemia of endstage renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2001; 16:36–40.
123. Shooley JC, Kullgren B, Allison AC. Inhibition by interleukin-1 of the action of erythropoietin on erythroid precursors and its possible role in the pathogenesis of hypoplastic anaemias. *Br J Haematol*. 1987; 67(1):11-7.
124. Kalantar-Zadeh K, McAllister CJ, Lehn RS, Lee GH, Nissenson AR, Kopple JD: Effect of malnutrition-inflammation complex syndrome on EPO hypo responsiveness in maintenance haemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2003; 42(4):761–773.
125. Monostori P, Hracsko Z, Karg E, Varga IS, Kiss Z, Boros T, et al. Erythropoiesis-stimulating agent withdrawal and oxidative stress in hemodialysis. *Clin Nephrol* 2009; 71(5):521–526.
126. Ganguli A, Kohli HS, Khullar M, Lal Gupta K, Jha V, Sakhuja V: Lipid peroxidation products formation with various intravenous iron preparations in chronic kidney disease. *Ren Fail* 2009; 31(2):106–110.
127. Balakrishnan VS, Rao M, Kausz AT, Brenner L, Pereira BJ, Frigo TB et al. Physicochemical properties of ferumoxytol, a new intravenous iron preparation. *Eur J Clin Invest* 2009; 39(6):489–496.
128. Roob JM, Khoschsorur G, Tiran A, Horina JH, Holzer H, Winklhofer-Roob BM. Vitamin E attenuates oxidative stress induced by intravenous iron in patients on hemodialysis. *J Am Soc Nephrol*. 2000 Mar; 11:539-49.
129. Tovbin D, Mazor D, Vorobiov M, Chaimovitz C, Meyerstein N. Induction of protein oxidation by intravenous iron in hemodialysis patients: role of inflammation. *Am J Kidney Dis*. 2002; 40(5):1005-12.
130. Senol E, Ersoy A, Erdinc S, Sarandol E, Yurtkuran M. Oxidative stress and ferritin levels in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2008; 23(2):665-72.
131. Murray JS, Pendras JP, Lindholm DD, Erickson RV Twenty-five months' experience in the treatment of chronic uremia at an outpatient community hemodialysis center. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 1964; 10:191-9.

132. Curtis FK, Cole JJ, Tyler LL, Scribner BH. Hemodialysis in the home. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 1965; 11: 7-10.
133. Shaldon S. Experience with home hemodialysis. U: BH Scribner. Proceedings of the working conference on chronic dialysis. Seattle, WA: University of Washington, 1964; 66-69.
134. Degoulet P, Legrain M, Réach I, Aimé F, Devriés C, Rojas P et al Mortality risk factors in patients treated by chronic hemodialysis: report of the Diaphane collaborative study. *Nephron* 1982; 31: 103–110.
135. Choi H, Kim M, Kim H, Pyo Lee J, Lee J, Tak Park J et al Excess mortality among patients on dialysis: Comparison with the general population in Korea. *Kidney Res Clin Pract.* 2014 Jun; 33(2):89-94.
136. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 1998; 9(12 Suppl): S16-23.
137. Go AS. Cardiovascular Disease Consequences of CKD. *Semin. Nephrol.* 2016; 36, 293–304.
138. Brevetti G, Giugliano G, Brevetti L, Hiatt WR. Inflammation in Peripheral Artery Disease. *Circulation.* 2010; 122(18):1862-75.
139. Münzel T, Heitzer T, Harrison DG. The physiology and pathophysiology of the nitric oxide/superoxide system. *Herz.* 1997; 22(3):158-72.
140. Errakonda PR, Paladugu R, Bitla AR, Musturu SM, Lakshman J, Pemmaraju SR et al Effect of a single hemodialysis session on endothelial dysfunction. *J Nephrol.* 2011 Jan-Feb;24(1):83-90.
141. Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, Hakim M. The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int.* 2002 Nov; 62(5):1524-38.
142. Bayés B, Pastor MC, Bonal J, Foraster A, Romero R. Oxidative stress, inflammation and cardiovascular mortality in haemodialysis—role of seniority and intravenous ferrotherapy: analysis at 4 years of follow-up. *Nephrol Dial Transplant.* 2006; 21(4):984-90.
143. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease *N Engl J Med.* 2005 Apr 21; 352(16):1685-95.
144. Ghiadoni L, Cupisti A, Huang Y, Mattei P, Cardinal H, Favilla S et al., Endothelial dysfunction and oxidative stress in chronic renal failure. *J Nephrol.* 2004; 17(4):512-9.
145. Pawlak K, Pawlak D, Mysliwiec M. Impaired renal function and duration of dialysis therapy are associated with oxidative stress and proatherogenic cytokine levels in patients with end-stage renal disease,” *Clin Biochem.* 2007; 40(1-2):81-5.
146. Taki K, Takayama F, Tsuruta Y, Niwa T. Oxidative stress, advanced glycation end product, and coronary artery calcification in hemodialysis patients *Kidney Int.* 2006 Jul;70(1):218-24.
147. Galli F, Piroddi M, Annetti C, Aisa C, Floridi E, Floridi A. Oxidative stress and reactive oxygen species. *Contrib Nephrol.* 2005;149:240–60.
148. D’Arrigo G, Baggetta R, Tripepi G, Galli F, Bolignano D. Effects of vitamin E-coated versus conventional membranes in chronic hemodialysis patients: a systematic review and meta-analysis. *Blood Purif.* 2017;43:101–22.
149. Mafra D, Santos FR, Lobo JC, de Mattos Grosso D, Barreira AL, Velarde LG et al. Alpha-tocopherol supplementation decreases electronegative low-density lipoprotein concentration [LDL(-)] in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24(5):1587–1592.
150. Boaz M, Smetana S, Weinstein T, Matas Z, Gafter U, Iaina A, et al. Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in end stage renal disease (SPACE): randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2000; 356(9237):1213– 1218.

151. Nanayakkara PW, van Guldener C, terWee PM, Scheffer PG, van Ittersum FJ, Twisk JW et al. Effect of a treatment strategy consisting of pravastatin, vitamin E, and homocysteine lowering on carotid intima-media thickness, endothelial function, and renal function in patients with mild to moderate chronic kidney disease: results from the Anti-Oxidant Therapy in Chronic Renal Insufficiency (ATIC) Study. *Arch Intern Med.* 2007;167(12):1262-70.
152. Cristol JP, Bosc JY, Badiou S, Leblanc M, Lorrho R, Descomps B et al. Erythropoietin and oxidative stress in haemodialysis: beneficial effects of vitamin E supplementation. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12(11):2312–2317.
153. Roob JM, Khoschsorur G, Tiran A, Horina JH, Holzer H, Winklhofer Roob BM: Vitamin E attenuates oxidative stress induced by intravenous iron in patients on hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 2000;11(3):539–549,
154. Kitamura Y, Kamimura K, Yoshioka N, Hosotani Y, Tsuchida K, Koremoto M et al. The effect of vitamin E-bonded polysulfone membrane dialyzer on a new oxidative lipid marker. *J Artif Organs.* 2013;16(2):206-10.
155. Rodríguez-Ribera L, Corredor Z, Silva I, Díaz JM, Ballarín J, Marcos R et al. Vitamin E-coated dialysis membranes reduce the levels of oxidative genetic damage in hemodialysis patients. *Mutat Res.* 2017;815:16-21.
156. Zoccali C. Cardiovascular risk in uraemic patients—is it fully explained by classical risk factors? *Nephrol Dial Transplant.* 2000;15:454–7.
157. Yang SK, Xiao L, Xu B, Xu XX, Liu FY, Sun L. Effects of vitamin E-coated dialyzer on oxidative stress and inflammation status in hemodialysis patients: a systematic review and meta-analysis. *Ren Fail.* 2014;36:722–31.
158. Daugirdas, J.T. Second generation logarithmic estimates of single-pool variable volume Kt/V: An analysis of error. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1993, 4, 1205–1213.
159. The Renal Association. UK Renal Registry: The Fourteenth Annual Report; The Renal Association: Bristol, UK, 2011.
160. Abdel-Rahman SZ, el-Zein RA, Anwar WA, Au WW. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett.* 1996, 107, 229–233.
161. Jocelyn, P.C. Spectrophotometric Assay of Thiols. *Methods Enzymol.* 1987; 143: 44–67.
162. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 1972; 247: 3170–3175.
163. Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1984; 105:114–121.
164. Vasudevan V, Ramprasath T, Sampathkumar K, Puhari SSM, Yuvaraj S, Selvam GS. *GSTM1*-null allele predicts rapid disease progression in nondialysis patients and mortality among South Indian ESRD patients *Molecular and Cellular Biochemistry.* Mol Cell Biochem. 2020; 469:21-28.
165. Cotton SC, Sharp L, Little J, Brockton N. Glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2000; 151:7-32.
166. Hou SM, Ryberg D, Fält S, Deverill A, Tefre T, Børresen AL et al. *GSTM1* and *NAT2* polymorphisms in operable and non-operable lung cancer patients. *Carcinogenesis.* 2000 Jan;21(1):49-54
167. Aydemir B, Onaran I, Kiziler AR, Alici B, Akyolcu MC. Increased oxidative damage of sperm and seminal plasma in men with idiopathic infertility is higher in patients with glutathione S-transferase Mu-1 null genotype. *Asian J Androl* 2007; 9: 108–115.

168. Marcos M, Pastor I, Chamorro AJ, Ciria-Abad S, González-Sarmiento R, Laso FJ. Meta-analysis: glutathione-S-transferase allelic variants are associated with alcoholic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011 Nov; 34(10):1159-72.
169. Liang S, Wei X, Gong C, Wei J, Chen Z, Chen X et al. Significant association between asthma risk and the GSTM1 and GSTT1 deletion polymorphisms: an updated meta-analysis of case-control studies. *Respirology.* 2013;18(5):774-83.
170. Song GG, Bae SC, Lee YH . The glutathione S-transferase M1 and P1 polymorphisms and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 2012; 39: 10739–10745.
171. Suvakov Sonja, 2016, doktorska disertacija, Association of glutathione transferase A1, M1, P1 and T1 polymorphism with oxidative stress byproducts and cardiovascular complications in patients with end-stage renal disease. Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu.
172. Lin YS, Hung SC, Wei YH, Tarng DC. GST M1 polymorphism associates with DNA oxidative damage and mortality among hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* 2009; 20:405-15.
173. Yang Y, Kao MT, Chang CC, Chung SY, Chen CM, Tsai JJ et al. Glutathione S-transferase T1 deletion is a risk factor for developing end-stage renal disease in diabetic patients. *Int. J. Mol. Med.* 2004; 14: 855–859.
174. Tiwari AK, Prasad P, B K T, Kumar KM, Ammini AC, Gupta A Oxidative stress pathway genes and chronic renal insufficiency in Asian Indians with Type 2 diabetes. *J Diabetes Complications.* 2009; 23(2):102-11.
175. Vasudevan V, Ramprasath T, Sampathkumar K. GSTM1-null allele predicts rapid disease progression in nondialysis patients and mortality among South Indian ESRD patients. *Mol Cell Biochem.* 2020; 469(1-2):21-28.
176. Andonova IE, Sarueva RB, Horvath AD, Simeonov VA, Dimitrov PS, Petropoulos EA, et al. Balkan endemic nephropathy and genetic variants of glutathione S-transferases. *J Nephrol.* 2004;17(3):390-8.
177. Petrovič D, Peterlin B. GSTM1-null and GSTT1-null genotypes are associated with essential arterial hypertension in patients with type 2 diabetes. *Clin Biochem.* 2014 May; 47:574-7.
178. Bessa SS, Ali EM, Hamdy SM. The role of glutathione S-transferase M1 and T1 gene polymorphisms and oxidative stress-related parameters in Egyptian patients with essential hypertension. *Eur J Intern Med* 2009; 20:625–30.
179. Polimanti R, Piacentini S, Lazzarin N, Re MA, Manfellotto D, Fuciarelli M. Glutathione S-transferase variants as risk factor for essential hypertension in Italian patients. *Mol Cell Biochem* 2011; 357:227–33.
180. Oniki K, Hori M, Takata K, Yokoyama T, Mihara S, Marubayashi T et al. Association between glutathione S-transferase A1, M1 and T1 polymorphisms and hypertension. *Pharmacogenet Genomics.* 2008;18(3):275-7.
181. Bodonyi-Kovacs G, Ma JZ, Chang J, Lipkowitz MS, Kopp JB, Winkler CA, et al. Combined Effects of GSTM1 Null Allele and APOL1 Renal Risk Alleles in CKD Progression in the African American Study of Kidney Disease and Hypertension Trial *J Am Soc Nephrol.* 2016 Oct; 27(10):3140-3152.
182. Chang J, Ma JZ, Zeng Q, Cechova S, Gantz A, Nievergelt C et al. Loss of *GSTM1*, a *NRF2* target, is associated with accelerated progression of hypertensive kidney disease in the African American Study of Kidney Disease (AASK). *Am J Physiol Renal Physiol.* 2013; 304(4):F348-55.

183. Jerotic D, Suvakov S, Matic M, Alqudah A, Grieve DJ, Pljesa-Ercegovac M et al. GSTM1 Modulates Expression of Endothelial Adhesion Molecules in Uremic Milieu. *Oxid Med Cell Longev*. 2021 Jan 25;2021:6678924. doi: 10.1155/2021/6678924.
184. Siems W, Grune T. Intracellular metabolism of 4-hydroxynonenal. *Mol Aspects Med* 2003; 24: 167–175.
185. Wiswedel I, Hirsch D, Carluccio F, Hampl H, Siems W. F2-isoprostanes as biomarkers of lipid peroxidation in patients with chronic renal failure. *Biofactors* 2005; 24: 201–208.
186. Siems W, Quast S, Carluccio F, Wiswedel I, Hirsch D, Augustin W, et al. Oxidative stress in cardio renal anemia syndrome: correlations and therapeutic possibilities. *Clin Nephrol* 2003; 60, Suppl 1: S22–S30.
187. Cozzolino M, Mangano M, Stucchi A, Ciceric P, Conte F, Galassi A. Cardiovascular disease in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2018; 33(suppl\_3):iii28–34.
188. Dell'Oglio MP, Simone S, Ciccone M, Corciulo R, Gesualdo M, Zito A, et al. Neutrophil-dependent pentraxin-3 and reactive oxygen species production modulate endothelial dysfunction in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2017; 32(9): 1540–9.
189. Sugiyama S, Kugiyama K, Aikawa M, Nakamura S, Ogawa H, Libby P. Hypochlorous acid, a macrophage product, induces endothelial apoptosis and tissue factor expression: involvement of myeloperoxidase-mediated oxidant in plaque erosion and thrombogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24(7): 1309–14.
190. de Waart FG, Kok FJ, Smilde TJ, Hijmans A, Wollersheim H, Stalenhoef AF: Effect of glutathione S-transferase M1 genotype on progression of atherosclerosis in lifelong male smokers. *Atherosclerosis* 2001; 158:227–231.
191. Türkanoğlu A, Demirdöğen BC, Demirkaya S, Bek S, Adali O. Association analysis of GSTT1, GSTM1 genotype polymorphisms and serum total GST activity with ischemic stroke risk *Neurol Sci*. 2010;31(6):727-34.
192. Ganz T, Nemeth E. The hepcidin-ferroportin system as a therapeutic target in anemias and iron overload disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011; 2011:538-42.
193. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 2004; 306:2090-3.
194. Kroot JJ, Tjalsma H, Fleming RE, Swinkels DW. Hepcidin in human iron disorders: diagnostic implications. *Clin Chem*. 2011; 57:1650-69.
195. Farnaud S, Rapisarda C, Bui T, Drake A, Cammack R, Evans RW. Identification of an iron-hepcidin complex. *Biochem J*. 2008; 413:553-7.
196. Wish JB. Assessing iron status: beyond serum ferritin and transferrin saturation. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2006; 1 Suppl 1:S4-S8.
197. Smrzova J, Balla J, Barany P: Inflammation and resistance to erythropoiesis stimulating agents—What do we know and what needs to be clarified? *Nephrol Dial Transplant* 2005 Sep;20 Suppl 8:viii2-7.
198. Priyadarshi A, Shapiro JJ: Erythropoietin resistance in the treatment of the anemia of chronic renal failure. *Semin Dial* 2006; 19: 273–278.
199. Panichi V, Rosati A, Bigazzi R, Paoletti S, Mantuano E, Beati S et al.; RISCAVID Study Group: Anaemia and resistance to erythropoiesis stimulating agents as prognostic factors in haemodialysis patients: Results from the RISCAVID study. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26: 2641–2648.
200. Kuragano T, Kitamura K, Matsumura O, Matsuda A, Hara T, Kiyomoto H et al. ESA hyporesponsiveness is associated with adverse events in maintenance hemodialysis (MHD) patients, but not with iron storage. *PLoS One* 2016; 11: e0147328.

201. Singh AK, Szczech L, Tang KL, Barnhart H, Sapp S, Wolfson M et al.; CHOIR Investigators: Correction of anemia with epoetin alfa in chronic kidney disease. *N Engl J Med* 2006; 355: 2085–2098.
202. Pfeffer MA, Burdmann EA, Chen CY, Cooper ME, de Zeeuw D, Eckardt KU et al; TREAT Investigators: A trial of darbepoetin alfa in type 2 diabetes and chronic kidney disease. *N Engl J Med* 2009; 361: 2019–2032.
203. Ganz T: Anemia of inflammation. *N Engl J Med* 2019; 381: 1148–1157.
204. Ganz T, Nemeth E: Iron sequestration and anemia of inflammation. *Semin Hematol* 2009; 46: 387–393.
205. Almoshabek HA, Mustafa MD, Al-Asmari MM, Alajmi TK, Abdulrahman K polymorphisms with obesity and their relationship with body mass index, lipoprotein and hypertension among young age JRSM Cardiovasc Dis. 2016; 5:2048004016669645.
206. Mustafa MD, Pathak R, Ahmed T, Ahmed RS, Tripathi AK, Guleria K et al. Association of glutathione S-transferase M1 and T1 gene polymorphisms and oxidative stress markers in preterm labor. *Clin Biochem* 2010; 43: 1124–1128.
207. Piroddi M, Pilolli F, Aritomi M, Galli F. Vitamin E as a functional and biocompatibility modifier of synthetic hemodialyzer membranes: An overview of the literature on vitamin E-modified hemodialyzer membranes. *Am J Nephrol*. 2012; 35(6):559-72.
208. Galli, F. Vitamin E-derived copolymers continue the challenge to hemodialysis biomaterials. *World J. Nephrol*. 2012; 1:100–105.
209. Zachara BA, Adamowicz A, Trafikowska U, Pilecki A, Manitius J. Decreased plasma glutathione peroxidase activity in uremic patients. *Nephron* 2000; 84:278–279.
210. Atamer A, Kocyigit Y, Ecdet SA, Selek S, Ilhan N, Ecdet T et al. Effect of oxidative stress on antioxidant enzyme activities, homocysteine and lipoproteins in chronic kidney disease. *J Nephrol* 2008; 21(6):924–930.
211. Yoshimura S, Suemizu H, Nomoto Y, Sakai H, Katsuoka Y, Kawamura N et al. Plasma glutathione peroxidase deficiency caused by renal dysfunction. *Nephron* 1996; 73:207–211.
212. Pavlović D, Savić-Radojević A, Plješa-Ercegovac M, Radić T, Ristić S, Ćorić V Biomarkers of oxidative damage and antioxidant enzyme activities in pre-dialysis Balkan endemic nephropathy patients *Int Urol Nephrol*. 2016; 48(2):257-63.
213. Günel SY, Ustündağ B, Günel AI. The assessment of oxidative stress on patients with chronic renal failure at different stages and on dialysis patients receiving different hypertensive treatment. *Indian J Clin Biochem* 2013; 28(4):390–395.
214. Singh DK, Winocour P, Farrington K. Oxidative stress in early diabetic nephropathy: fueling the fire. *Nat Rev Endocrinol* 2011; 7(3):176–184.
215. Mydlík M, Derzsiová K, Ráč Z, Sipulová A, Lovásiová, E, Molcányiová A et al. Vitamin E-coated dialyzer and antioxidant defense parameters: Three-month study. *Semin. Nephrol*. 2004; 24: 525–531.
216. Bargnoux AS, Cristol JP, Jaussent I, Chalabi L, Bories P, Dion JJ et al. Vitamin E-coated polysulfone membrane improved red blood cell antioxidant status in hemodialysis patients. *J. Nephrol*. 2013; 26:556–563.
217. Boaz M, Matas Z, Biro A, Katzir Z, Green M, Fainaru M, et al. Serum malondialdehyde and prevalent cardiovascular disease in hemodialysis. *Kidney Int* 1999; 56: 1078–1083
218. Knight JA, Pieper RK, McClellan L. Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation. *Clin. Chem*. 1988; 34: 2433–2438.



219. Ayar G, Sahin S, Yazici MU, Neselioglu S, Erel O, Bayrakçı US. Effects of hemodialysis on thiol-disulphide homeostasis in critically ill pediatric patients with acute kidney injury. *Biomed Res Int* 2018; 2018:1898671.
220. Galli F, Piroddi M, Bartolini D, Ciffolilli S, Buoncristiani E, Ricci G et al. Blood thiol status and erythrocyte glutathione-S-transferase in chronic kidney disease patients on treatment with frequent (daily) hemodialysis. *Free Radic Res* 2014; 48(3):273–281.
221. Yeter HH, Korucu B, Akcay OF, Derici K, Derici U, Arinsoy T. Effects of medium cut-off dialysis membranes on inflammation and oxidative stress in patients on maintenance hemodialysis. *Int Urol Nephrol*. 2020; 52(9):1779-1789.
222. van der Weerd NC, Grooteman MP, Nubé MJ, ter Wee PM, Swinkels DW, Gaillard CA. Hepcidin-25 in chronic hemodialysis patients is related to residual kidney function and not to treatment with erythropoiesis stimulating agents. *PLoS One*. 2012; 7:e39783.
223. Mandolfo S, Corradi B, Bucci R, Farina M, Pilolli F, Galli F. Evaluation of the impact of a new synthetic vitamin E-bonded membrane on anemia and rHuEPO requirement in ESRD patients with central venous catheters: A pilot study. *Int. Urol. Nephrol*. 2012; 44:1493–1500.
224. Andrulli S, Di Filippo S, Manzoni C, Stefanelli L, Floridi A, Galli F et al. Effect of synthetic vitamin E-bonded membrane on responsiveness to erythropoiesis-stimulating agents in hemodialysis patients: A pilot study. *Nephron Clin. Pract*. 2010; 115: 82–89.
225. Aoun B, Janssen-Lozinska Y, Ulinski T. Effect of vitamin E coated dialyzers on anticoagulation requirement in hemodialyzed children. *Saudi J. Kidney Dis. Transpl*. 2010; 21: 466–470.
226. Sanaka T, Mochizuki T, Kinugasa E, Kusano E, Ohwada S, Kuno T, et al; VEESA Study Group: Randomized controlled open-label trial of vi-tamin E-bonded polysulfone dialyzer and erythropoiesis-stimulating agent response. *Clin J Am Soc Nephrol* 2013; 8: 969–978.
227. Lines SW, Carter AM, Dunn EJ, Lindley EJ, Tattersall JE, Wright MJ. A randomized con-trolled trial evaluating the erythropoiesis stimulating agent sparing potential of a vita-min E-bonded polysulfone dialysis mem-brane. *Nephrol Dial Transplant* 2014; 29: 649–656.
228. Aoun B, Janssen-Lozinska Y, Ulinski T: Effect of vitamin E coated dialyzers on anticoagulation requirement in hemodialyzed chil-dren. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2010; 21: 466–470.
229. Yang CC, Hsu SP, Wu MS, Hsu SM, Chien CT: Effects of vitamin C infusion and vitamin E-coated membrane on hemodialysis-in-duced oxidative stress. *Kidney Int* 2006; 69: 706–714.
230. Lines SW, Carter AM, Dunn EJ, Lindley EJ, Tattersall JE, Wright MJ. A randomized controlled trial evaluating the erythropoiesis stimulating agent sparing potential of a vitamin E-bonded polysulfone dialysis membrane. *Nephrol. Dial. Transplant*. 2014; 29:649–656.
231. Locatelli F, Andrulli S, Vigano SM, Concetti M, Urbini S, Giacchino F et al. Evaluation of the impact of a new synthetic vitamin E-bonded membrane on the hypo-responsiveness to the erythropoietin therapy in hemodialysis patients: A multicenter study. *Blood Purif*. 2017; 43: 338–345.
232. Rao P, Reddy GC, Kanagasabapathy AS. Malnutrition-inflammation- atherosclerosis syndrome in Chronic Kidney disease. *Indian J Clin Biochem*. 2008; 23(3):209–217.
233. de Mutsert R, Krediet RT. Malnutrition, inflammation and atherosclerosis (MIA-syndrome) in dialysis patients. *Ned Tijdschr Geneesk*. 2006; 150(37):2023–2027.
234. Ahmadi A, Mazooji N, Roozbeh J, Mazloom Z, Hasanzade J. Effect of alpha-lipoic acid and vitamin E supplementation on oxidative stress, inflammation, and malnutrition in hemodialysis patients. *Iran J Kidney Dis*. 2013; 7(6):461–467.

235. Kim Y, Molnar MZ, Rattanasompattikul M, Hatamizadeh P, Benner D, Kopple JD et al. Relative contributions of inflammation and inadequate protein intake to hypoalbuminemia in patients on maintenance hemodialysis. *Int Urol Nephrol*. 2013; 45(1):215–227.
236. Streja E, Kovesdy CP, Molnar MZ, Norris KC, Greenland S, Nissenson AR, et al. Role of nutritional status and inflammation in higher survival of African American and Hispanic hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*. 2011; 57(6):883–893.
237. Rambod M, Bross R, Zitterkoph J, Benner D, Pithia J, Colman S et al. Association of Malnutrition-Inflammation Score with quality of life and mortality in hemodialysis patients: A 5-year prospective cohort study. *Am J Kidney Dis*. 2009; 53(2):298–309.
238. Drueke TB, Massy ZA. Atherosclerosis in CKD: Differences from the general population. *Nat Rev Nephrol*. 2010; 6(12):723–735.
239. Kobayashi S, Moriya H, Aso K, Ohtake T. Vitamin E-bonded hemodialyzer improves atherosclerosis associated with a rheological improvement of circulating red blood cells. *Kidney Int*. 2003;63(5):1881–1887.
240. Huang J, Yi B, Li AM, Zhang H. Effects of vitamin E-coated dialysis membranes on anemia, nutrition and dyslipidemia status in hemodialysis patients: a meta-analysis *Ren Fail*. 2015 Apr;37(3):398-407.
241. Tanaka H, Nishikawa O, Yukawa S, Yoshimoto M, Nishide I. Effects of hemodialysis membrane on serum lipid profile of maintenance hemodialysis patients. *Nihon Jinzo Gakkai Shi* 1999; 41:1–7.
242. Tsuruoka S, Kawaguchi A, Nishiki K, Hayasaka T, Fukushima C, Sugimoto K et al. Vitamin E-bonded hemodialyzer improves neutrophil function and oxidative stress in patients with end-stage renal failure. *Am. J. Kidney Dis* 2002; 39:127–133.

## **Biografija**

Petar Đurić, rođen 03.03.1984. godine u Kninu, upisao je Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu 2002. godine. Diplomirao je 2008. godine sa prosečnom ocenom tokom studiranja 9,20. Od marta 2010. godine je stalno zaposlen u Kliničkom odeljenju za nefrologiju i poremećaje metabolizma sa dijalizom „prof dr Vasilije Jovanović“- KBC Zvezdara.

Specijalističke studije iz oblasti Interne medicine je upisao novembra 2012. godine na Medicinskom fakultetu u Beogradu i i oktobra 2017. godine položio specijalistički ispit sa odličnim uspehom.

Specijalističke akademske studije iz oblasti Nefrologije na Medicinskom fakultetu u Beogradu je upisao 2010. godine. Završni specijalistički akademski rad pod nazivom „Uticaj nedeljnog trajanja hemodijalize na parametre efikasnosti i kardiovaskularni morbiditet“ odbranio je marta 2013. godine. Autor i koautor je ukupno 169 stručno-naučnih radova. Objavio je ukupno 36 radova u celini, od toga su 15 radova objavljeni u časopisima koji su indeksirani u JCR listi. U časopisima indeksiranim u *MEDLINE* objavio je 7 radova. Takođe, objavio je 74 izvoda u zbornicima sa međunarodnih sastanaka i 59 izvoda u zbornicima sa nacionalnih sastanaka. Autor je i koautor u 2 poglavlja u monografiji.

Doktorske studije iz oblasti Nefrologije upisao je 2012. godine na Medicinskom fakultetu u Beogradu, pod mentorstvom prof.dr Nade Dimković i prof dr. Tatjane Simić.

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

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Petar Đurić

broj upisa NF-03/12

Izjavljujem

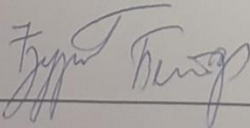
da je doktorska disertacija pod naslovom

**Uticaj membrana obloženih vitaminom E na nivo pokazatelja oksidativnog stresa kod hemodijaliznih bolesnika sa homozigotnom delecijom gena za glutation transferazu M1**

- 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, 16. jun 2021. god

  
\_\_\_\_\_

Prilog 2.

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora \_\_\_\_\_ Petar Đurić \_\_\_\_\_

Broj upisa \_\_\_\_\_ NF-03/12 \_\_\_\_\_

Studijski program \_\_\_\_\_ Nefrologija \_\_\_\_\_

Naslov rada " Uticaj membrana obloženih vitaminom E na nivo pokazatelja oksidativnog stresa kod hemodijaliznih bolesnika sa homozigotnom delecijom gena za glutation transferazu M1 "

Mentor Prof. dr Nada Dimković

Komentor Prof. dr Tatjana Simić

Potpisani Petar Đurić

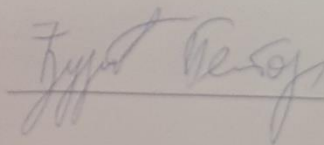
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

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, 16. jun 2021. god.



Prilog 3.

### Izjava o korišćenju

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

Uticaj membrana obloženih vitaminom E na nivo pokazatelja oksidativnog stresa kod hemodijaliznih bolesnika sa homozigotnom delecijom gena za glutathion transferazu M1 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, 16. jun 2021. god

