

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Светлана Јовичић Павловић

ИСПИТИВАЊЕ ПОВЕЗАНОСТИ ГЕНСКИХ
ПОЛИМОРФИЗАМА СА
КАРДИОВАСКУЛАРНИМ БОЛЕСТИМА КОД
БОЛЕСНИКА СА ТЕРМИНАЛНОМ БУБРЕЖНОМ
СЛАБОСТИ

докторска дисертација

Београд, 2022.

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Svetlana Jovičić Pavlović

ISPITIVANJE POVEZANOSTI GENSKIH
POLIMORFIZAMA SA KARDIOVASKULARNIM
BOLESTIMA KOD BOLESNIKA SA
TERMINALNOM BUBREŽNOM SLABOSTI

doktorska disertacija

Beograd, 2022.

UNIVERSITY IN BELGRADE

MEDICAL SCHOOL

Svetlana Jovičić Pavlović

IMPACT OF GENE POLYMORPHISMS ON
CARDIOVASCULAR DISEASES IN PATIENTS
WITH END STAGE RENAL DISEASE

Doctoral disertation

Beograd, 2022.

Mentor: Dr sci. med. Ivana Novaković, redovni profesor, Institut za humanu genetiku, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Komisija:

1. Dr sci. med. Dijana Jovanović, redovni profesor, Klinika za nefrologiju UKCS, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
2. Dr sci. med Momčilo Ristanović, vanredni profesor, Institut za humanu genetiku, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
3. Dr sci med. Lada Petrović, docent, Klinika za nefrologiju i kliničku imunologiju, Univezitetski Klinički centar Vojvodine, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

2022.

Zahvaljujem se mentoru Prof Dr Ivani Novaković i Prof Dr Sanji Simić Ogrizović, prethodnom mentoru, koje su primenile svo svoje znanje i pružile veliku sveobuhvatnu podršku i podsticaje tokom izrade ove disertacije.

SAŽETAK

UVOD: Hronična bubrežna bolest (HBB) je nezavistan faktori rizika za kardiovaskularne bolesti. Cilj ovog rada je da se ispita efekat polimorfizama gena za homocistein MTHFR 677C>T, MTHFR 1298 A>C, interleukin 6 -174G>C, interleukin 10 -1082G>A i -819T>C i fetuin 742 C>T i 766 C>G na koncentracije homocisteina, IL-6 i IL-10, fetuina i na rane i kasne pokazatelje ateroskleroze, pojavu kalcifikacija na koronarnim arterijama (KKA) i preživljavanje bolesnika.

METODE: U studiju za Hcy uključeno je 188 bolesnika, 82 lečeno hemodijalizama (HD) i 106 sa transplantiranim bubregom (TX). U studiji za IL-6 i IL-10 228 bolesnika (77 HD i 55 na peritoenumskoj dijalizi), a za fetuin 88 (46 sa HBB i 42 Tx) i kontrolnoj grupi 28 zdravih osoba.

Određivani su polimorfizmi u genima PCR metodom, bihemijske analize, CRP, amiloid A, fetuin-A, homocistein, IL-6 i IL-10. Merena je debljine intima medije (IMD) karotidnih arterija i prisustvo plaka, a skor kalcifikacija multislajmsnom tomografijom.

REZULTATI:

Bolesnici sa MTHFR 677 CT i TT genotipom su imali više vrednosti Hcy, ali bez statističke značajnosti. Homozigoti sa genotipom IL-6 -174CC su imali značajno više koncentracije IL-6 (6,4pg/ml), u odnosu na -174GC+GG genotipove (3,1pg/ml, p=0,30). Koncentracije IL-10 nisu razlikovale prema genotipovima IL-10 -1082G>A i -819T>C. Homozigoti sa genotipom u genu za fetuin 742TT i 766GG su imali najniže koncentracije fetuina-A (p=0,02).

Aterosklerotski plak na karotidnim arterijama je imalo 47% bolesnika. IMD i izraženost plaka nije se razlikovala među MTHFR genotipovima. Ispitanici sa plak skorom 1-3 su bili značajno stariji, češće su imali hipertenziju, viši C reaktivni protein i kreatinin, a najznačajniji prediktor je bila starost (B=0,133; p<0,001, OR =1,14).

KKA je imalo 46,5 % bolesnika. Bolesnici sa fetuinom-A <0,437g/l su imali češće KKA i veći skor. U univarijantnoj analizi prediktori KKA su bili starost, nivo fetuina-A i polimorfizam u genima za fetuin, a u multivarijantnoj analizi starost (OR=0,17) i fetuin-A (OR=0,17).

Heterozigoti MTHFR 677CT su imali lošije preživljavanje u odnosu na ostale MTHFR genotipove. Značajno veći mortalitet su imali bolesnici sa IL-6 -174CC genotipom (95%CI 20,0-32,2) u odnosu na GC i GG genotip (hi kvadrat 11,398; p=0,003), različiti IL-10 genotipovi nisu značajno uticali na preživljavanje. Najznačajniji prediktor za smrtnost su bili koncentracija IL-6, CRP, albumin, kt/v i polimorfizam u genu za IL-6 -174G>C.

Petogodišnje preživljavanje bolesnika bez mutacije u genu za fetuin 742C>T je bilo 100%, kod bolesnika sa mutacijom 81%, a ukoliko su imali i povišene vrednosti C reaktivnog proteina 50%.

ZAKLJUČAK: Ispitivanja u ovom radu nisu pokazala da je polimorfizam u genu za MTHFR značajno povezan sa koncentracijom homocisteina, niti sa parametrima ateroskleroze, heterozigoti MTHFR 677CT su imali lošije preživljavanje. Polimorfizam IL-6 -174G>C je bio povezan sa koncentracijama IL-6, homozigoti 174CC su imali značajno više koncentracije IL-6 i lošije preživljavanje. Polimorfizmi u genu za fetuin su bili udruženi sa nižim koncentracijama fetuina-A u krvi i sa lošijim preživljavanjem.

Ključne reči: genski polimorfizmi, kardiovaskularne bolesti, ateroskleroza, hronična bubrežna bolest, homocistein, inflamacija, fetuin-A, kalcifikacije krvnih sudova

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Nefrologija

UDK broj:

Abstract

Chronic kidney disease (CKD) is an independent risk factor for cardiovascular disease. The aim of this study was to examine the effect of gene polymorphisms for homocysteine MTHFR 677C> T, MTHFR 1298 A> C, interleukin 6 -174G> C, interleukin 10 -1082G> A and -819T> C for fetuin 742 C> T and 766 C> G on concentrations of homocysteine, IL-6 and IL-10, fetuin and on early and late indicators of atherosclerosis, the occurrence of coronary artery calcifications (COA) and patient survival.

METHODS: The Hcy study included 188 patients, 82 treated with hemodialysis (HD) and 106 with kidney transplantation (TX). In the study for IL-6 and IL-10 228 were included (77 HD and 55 on peritoneum dialysis), and for fetuin 88 (46 with HBB and 42 Tx) and the control group of 28 healthy individuals.

Polymorphisms in genes were determined by PCR, biochemical analysis, CRP, amyloid A, fetuin-A, homocysteine, IL-6 and IL-10. The thickness of the intima media (IMD) of the carotid arteries and the presence of plaque were measured, and the score was calcified by multislice tomography.

RESULTS: Patients with MTHFR 677CT and TT genotype had higher Hcy values, but no statistical significance. Homozygotes with genotype IL-6 -174CC had significantly higher IL-6 concentrations of 6.4pg / ml, compared to -174GC + GG genotypes (3.1pg / ml, $p = 0.30$). IL-10 concentrations did not differ according to IL-10 genotypes -1082G> A and -819T> C. Homozygotes for mutations in the fetuin gene 742TT and 766GG had the lowest concentrations of fetuin-A ($p = 0.02$).

IMD and plaque expression did not differ among MTHFR genotypes. Subjects with a plaque score of 1-3 were significantly older, more likely to have hypertension, higher C-reactive protein and creatinine, and the most significant predictor was age ($B = 0.133$; $p < 0.001$, $OR = 1.14$).

Patients with fetuin-A < 0.437 g / l had more frequent CCA and a higher score. In the univariate analysis, the predictors of CCA were age, fetuin-A level, and polymorphism in fetuin genes, and in the multivariate analysis, age ($OR = 0.17$) and fetuin-A ($OR = 0.17$).

Heterozygotes of MTHFR 677CT had poorer survival compared to other MTHFR genotypes. Patients with IL-6 -174CC genotype had significantly higher mortality (95% CI 20.0-32.2) compared to GC and GG genotype (chi square 11.398; $p = 0.003$), different IL-10 genotypes were not significantly affected to survival. The most important predictors for mortality were IL-6 concentration, CRP, albumin, kt / v , and IL-6 -174G> C gene polymorphism. The five-year survival of patients without mutation in the fetus 742C> T gene was 100%, in patients with mutation 81%, and in patients with elevated reactive protein C values 50%.

CONCLUSION: The studies in this paper did not show that polymorphism in the MTHFR gene was significantly associated with homocysteine concentration or atherosclerosis parameters, MTHFR 677CT heterozygotes had poorer survival. The IL-6 -174G>C polymorphism was associated with IL-6 concentrations, mutation homozygotes had significantly higher IL-6 concentrations and poorer survival. Polymorphisms in the fetuin gene 742 C>T and 766C>G were associated with lower blood concentrations of fetuin-A and poorer survival.

Key words: gene polymorphisms, cardiovascular diseases, atherosclerosis, chronic kidney disease, homocysteine, inflammation, fetuin A, coronary artery calcifications

Scientific field: Medicine

Narrow scientific field: Nephrology

UDC number:

SADRŽAJ

Broj poglavlja	Naslov	Strana
1.	Uvod	1
1.1.	Genski polimorfizmi	1
1.2.	Kardiovaskularne bolesti kao vodeći uzrok mortaliteta bolesnika sa hroničnom bubrežnom bolešću	2
1.2.1.	Tradicionalni faktori rizika	4
1.2.2	Netradicionalni faktori rizika	4
1.2.2.1	Homocisteini ateroskleroza	
1.2.2.1.1	Metabolizam homocisteina i dejstvo na endotel	4
1.2.2.1.2.	Povezanost koncentracije homocisteina u krvi i jačine glomerulske filtracije	5
1.2.2.1.3.	Genski polimorfizam homocisteina	6
1.2.2.2.	Hronična inflamacija i markeri inflamacije kod bolesnika sa hroničnom bubrežnom slabošću	7
1.2.2.2.1.	Etiologija inflamacije u bolesnika sa hroničnom bubrežnom bolešću	7
1.2.2.2.2.	Biomarkeri inflamacije	8
<i>1.2.2.2.2.1.</i>	<i>C reaktivni protein</i>	8
<i>1.2.2.2.2.2.</i>	<i>Interleukin 6</i>	8
<i>1.2.2.2.2.3</i>	<i>Interleukin 10</i>	9
1.2.2.2.3.	Povezanost malnutricije, inflamacije i ateroskleroze (MIA sindrom)	9
1.2.2.2.4.	Polimorfizam gena za inflamaciju	9
1.2.2.3..	Fetuin i vaskularne kalcifikacije kod bolesnika sa hroničnom bubrežnom bolešću	10
1.2.2.3.1.	Mehanizmi nastanka vaskularnih kalcifikacija kod bolesnika sa hroničnom bubrežnom bolešću-uloga fetuina	10
1.2.2.3.2.	Polimorfizmi u genu za fetuin	13
2.	Ciljevi istraživanja	15
3.	Materijal i metode	15
3.1.	Bolesnici	15
3.2.	Metode	17
3.2.1.	Molekularno ispitivanje	17
3.2.1.a.	Izolacija DNK iz leukocita periferne krvi	17
3.2..1.b.	PCR metoda i njene modifikacije	18
3.2..2.	Metode biohemijskih ispitivanja	21
3.2.3.	Metode procene kliničkih parametara	22
3.2.4.	Metode procene ranih i kasnih pokazatelja ateroskleroze	22
3.2.4.a.	Duplex-scan karitodnih arterija	22
3.2.4.b.	Skor kalcifikacija koronarnih arterija	22
3.2.5.	Statističke metoda	23
4.	Rezultati	23
4.1.	Učestalost polimorfizama u genu za MTHFR, interleukin 6, interleukin 10 i fetuin-A bolesnika u hroničnoj ili terminalnoj bubrežnoj slabosti koji se leče hemo ili peritoneumskom dijalizom i kod bolesnika sa transplantiranim bubregom	24

4.1.1. Učestalost 677 C>T i 1298A>C alela u genu za MTHFR kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću lečenih hemodijalizama, sa transplantiranim bubregom i zdravih osoba	24
4.1.2. Učestalost -174 G>C alela u genu za interleukin 6 i -1082 G/A i -819 T>C alela u genu za interleukin 10 kod bolesnika lečenih hemo i peritoneumskom dijalizom	25
4.1.3. Učestalost 742 C>T i 766 C>G alela u genu za fetuin kod bolesnika sa hroničnom bubrežnom slabošću i sa transplantiranim bubregom	26
4.2. Utvrđivanje povezanosti koncentracije homocisteina, interleukina 6, interleukina 10 i fetuina-A sa određenim genotipovima kod bolesnika u hroničnoj i terminalnoj bubrežnoj slabosti koji se leče hemo ili peritoneumskom dijalizom i kod bolesnika sa transplantiranim bubregom	27
4.2.1. Povezanost koncentracije homocisteina sa MTHFR genotipovima 677 C>T i 1298 A>C kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću lečenih hemodijalizama, sa transplantiranim bubregom i zdravih osoba	27
4.2.2. Povezanost koncentracije interleukina 6 sa genotipovima 174 G>C i interleukina 10 sa genotipovima -1082 G>A i -819 T>C kod bolesnika lečenih hemo i peritoneumskom dijalizom	29
4.2.3. Povezanost koncentracije fetuina A sa genotipovima 742 C>T i 766 C>G kod bolesnika sa hroničnom bubrežnom slabošću i sa transplantiranim bubregom	32
4.3. Ispitivanje udruženosti različitih pojedinih ili kombinovanih genotipova sa ranim i kasnim pokazateljima arteroskleroze kao i oboljevanja od kardiovaskularnih bolesti	34
4.3.1. Povezanost homocisteina, MTHFR 677 C>T i MTHFR 1298 A>C genotipova sa debljinom intime i intimalnim plakovima	34
4.3.2. Povezanost fetuina –A, fetuin –A 742 C>T i 766 C>G genotipova sa kalcifikacijama	37
5. Ispitivanje značaja različitih pojedinih ili kombinovanih genotipova u predikciji kardiovaskularnog mortaliteta bolesnika sa hroničnom bubrežnom slabošću stadijum 2-5, bolesnika u terminalnom bubrežnoj slabosti koji leče hemo ili peritoneumskom dijalizom ili je urađena transplantacija bubrega	38
5.1. Povezanost koncentracije homocisteina u serumu, MTHFR 677 C>T i MTHFR 1298 A>C genotipova sa preživljavanjem bolesnika	38
5.2. Povezanost nivoa interleukina 6, interleukina 10, interleukin-6 -174 G/C i interleukin-10 -1082 G/A i -819 T/C genotipova sa preživljavanjem	38
5.3. Povezanost koncentracije fetuina-A u serumu i polimorfizama u genu za fetuin 742 C>T i 766 C>G sa preživljavanjem bolesnika	41
6. Diskusija	43
7. Zaključci	51
Literatura	52

ISPITIVANJE POVEZANOSTI GENSKIH POLIMORFIZAMA SA KARDIOVASKULARNIM BOLESTIMA KOD BOLESNIKA SA TERMINALNOM BUBREŽNOM SLABOSTI

1.UVOD

U poslednje dve decenije učinjen je veliki napredak u identifikaciji i razumevanju genetske osnove kardiovaskularnih bolesti čija je klinička ili fenotipska heterogenost uočena kod osoba unutar porodice ili između porodica. Iako nose istu gensku mutaciju, osobe se mogu veoma klinički razlikovati počevši od stanja bez simptoma do teške bolesti ili prevremene smrti. Široka klinička heterogenost ukazuje da i drugi faktori pored genskih mutacija igraju značajnu ulogu u modifikovanju kliničkog fenotipa, a oni mogu da budu protektivni ili da pogoršavaju bolest. U modifikujuće faktore spadaju kako starost, pol, faktori spoljašnje sredine (vežbanje, dijeta), tako i i sekundarni genski faktori. Do danas, uloga sekundarnih genskih faktora je uglavnom fokusirana na genske varijante ili polimorfizme, koji ne uzrokuju direktno bolest ali mogu uticati na regulatorne činioce. Tako recimo, promotorski regioni gena menjaju gensku ekspresiju i utiču na funkciju ključnih enzima značajnih za normalnu kardiovaskularnu biologiju (Jameson i sar., 2001, Thommpson i sar 1991.).

1.1.Genski polimorfizam

Nasledna osnova tj. genom čoveka sadrži približno 30.000 gena, koji su smešteni na 23 para hromozima (22 para autozomnih i 1 par polnih hromozoma). Haploidni set humanog genoma sadrži oko 3 milijarde parova nukleinskih baza. Geni čine svega oko 10-15% genoma, od toga je 90% gena koji kodiraju proteine, a ostatak su sekvence čija funkcija nije razjašnjena do kraja (Jameson i sar., 2001).

Genski polimorfizmi su promene u sekvenci dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) koje se normalno nalaze u opštoj populaciji sa učestalošću većom od 1% (Thommpson i sar 1991). Nukleotidna raznolikost se definiše kao odnos broja različitih baza prema ukupnom broju baznih parova dva genoma koja se porede. Parametar *heterozigotnosti* π određuje verovatnoću da se nukleotid na određenoj poziciji nadje u heterozigotnom obliku, poređenjem dva hromozoma odabrana po principu slučajnosti u određenoj populaciji. Procenjuje se da heterozigotnost u naslednoj osnovi čoveka iznosi oko 7.51×10^{-4} što predstavlja pojavu 7.51 različitosti baza na 10 Kb. Varijabilnost za autozomne hromozome se kreće od 5.19-8.79 različitosti baza na 10 Kb. Za polne hromozome varijabilnost je znatno nižeg stepena, za X hromozom oko 4.69 različitosti baza po 10 Kb i oko 1.51 po 10 Kb za Y hromozom, u nerekombinujućim regionima (Li i sar 1997, International Human Genome Sequencing Consortium 2001).

Tipovi polimorfizama i mehanizam njihovog nastanka

Polimorfizmi mogu nastati kao posledica zamene jednog nukleotida, takozvani polimorfizam pojedinačnih nukleotida (SNP, single nucleotide polymorphism) ili varijacijama u broju repetitivnih DNK sekvenci i deleciono/insercioni polimorfizam. Polimorfizam pojedinačnih nukleotida (SNP) je najčešći izvor genskih varijacija i javlja se na svakih nekoliko stotina parova baza u humanom genomu. Dosadašnjim ispitivanjima identifikovano je oko 15 miliona DNK varijacija, uglavnom SNP. SNP se definiše pojavom 2 ili više alternativnih nukleotidnih baza na određenom genskom lokusu sa učestalošću većom od 1%. Ukoliko je promena nastala zamenom baze istog tipa purinskom (adenin umesto gvanina ili obrnuto) ili pirimidinskom (citozin umesto timina ili obrnuto) ta promena se naziva

tranzicijom, dok su transverzije zamene bazom drugog tipa (purin u pirimidin ili obrnuto) (Thommpson i sar 1991).

Najčešći oblik tranzicije nastaje usled modifikacije DNK metilacijom citozina, naročito kada je smešten na 5` kraju neposredno uz guanin (dinukleotid 5`-CpG-3`). Deaminacijom 5-metilcitozina u timidin dolazi do supstitucije CG u TG, povećava se broj vrućih mesta ("hotspots") za mutacije u humanom genomu i time, **nukleotidna raznovrsnost** (*International Human Genome Sequencing Consortium 2001*).

Nukleotidne *supstitucije* u kodirajućim regionima mogu se takodje klasifikovati i kao sinonimne i nesinonimne prema njihovom uticaju na krajnji proteinski produkt. Supstitucija je sinonimna kada mutacijom nukleotidne baze ne dolazi do zamene aminokiseline ("silent" mutacija), a nesinonimna kada usled promene u kodirajućem delu jedna aminokiselina biva zamenjena drugom ("missense" mutacija) ili nastane stop-kodon i prevremen prekid translacije ("nonsense" mutacija) (*International Human Genome Sequencing Consortium 2001*).

Ostali tipovi genetičkih polimorfizama rezultat su mutacija tipa insercija i delecija dela DNK, uključujući i mikrosatelitne ponavljajuće sekvence (VNTR, *variable number of tandem repeated DNA sequences*). Ove mutacije mogu biti tipa delecija i insercija baza (kada broj zahvaćenih baza nije umnožak od tri) sa promenom okvira čitanja (*frameshift* mutacije), delecija i insercija kodona (kada je broj zahvaćenih baza umnožak od tri), delecija i duplikacija čitavih gena usled nepravilnog crossing over-a izmedju homologih hromozoma kao i insercije ponovaka (Thommpson i sar 1991).

Polimorfizmi DNK su varijacije u naslednoj osnovi koje se sreću u populaciji zdravih osoba i njihov uticaj na izmenu proteinskih produkata i uloga u nastanku bolesti tek treba da bude rasvetljen. Genski polimorfizmi obično ne uzrokuju bolest direktno, već predstavljaju predisponirajuće faktore za nastanak bolesti te se ispituje njihova uloga kao mogućih markera predispozicije za razvoj bolesti. Ovo je posebno važno u ispitivanjima poligenskih bolesti, kod kojih sadejstvo više gena i faktora spoljašnje sredine određuju nastanak bolesti. Studije asocijacije ispituju udruženost određenih genskih varijanti, odnosno genskih polimorfizama, sa nastankom bolesti u poredjenju sa populacijom zdravih osoba (Gray i sar., 2000).

1.2. Kardiovaskularne bolesti kao vodeći uzrok mortaliteta bolesnika sa hroničnom bubrežnom bolešću

Hronična bubrežna bolest (HBB) predstavlja oštećenje strukture i/ili funkcije bubrega koje traje duže od 3 meseca (NIDDK, 2017). HBB ima progresivan tok i vodi trajnom gubitku bubrežne funkcije kada je neophodno započinjanje lečenja metodama zamene bubrežne funkcije, a koje podrazumevaju: hemodijalizu (HD), peritoneumsku dijalizu (PD) ili transplantaciju bubrega (Tx) (Stevens i Levin, 2013). Podaci Svetske zdravstvene organizacije iz 2020. godine ukazuju da HBB je deseti vodeći uzrok smrtnosti, a predviđanja su da će do 2040. godine HBB postati peti vodeći uzrok smrtnosti u svetu. U 2017. godini, prevalenca HBB je iznosila 9,1% svetske populacije.

Bolesnici sa terminalnom bubrežnom slabošću imaju značajno veći mortalitet nego osobe iste starosti u opštoj populaciji (Laysaght i sar 2022). Prema podacima United States Renal Data System (USRDS) mortalitet kod bolesnika na hemodijalizi je 6,5-7,9 puta veći u odnosu na podatke u opštoj populaciji, a nakon transplantacije bubrega 1-1,3 puta veći u poredjenju sa opštom populacijom. U 2006.g. petogodišnje preživljavanje bolesnika na hemodijalizi u Sjedinjenim Američkim Državama je iznosilo 30-36%, a nakon transplantacije bubrega 81-85% (Laysaght i sar 2022).

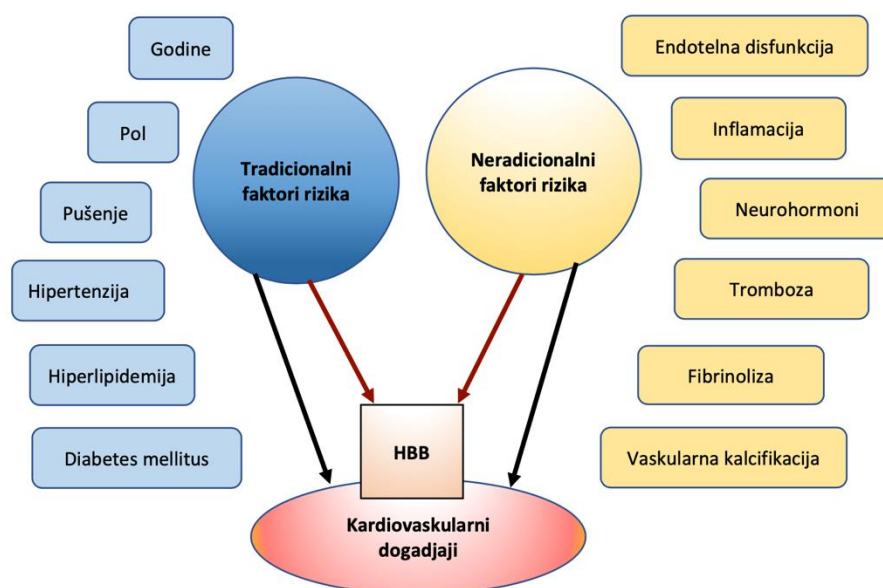
U našoj zemlji 2016. god. prevalenca bolesnika koji su lečili metodama za zamenu funkcije bubrega je iznosila 598/1 mil. stanovnika za HD, 65/1 mil. stanovnika za PD i 96/ 1 mil. stanovnika za T bolesnike a u Evropi prema ERA EDTA registru 476/1 mil. stanovnika za HD, 41/1 mil. stanovnika za PD i 306/1 mil. stanovnika za T bolesnike (Godišnji izveštaj o lečenju dijalizama i transplantacijom bubrega u Srbiji 2016. god. UNS, Beograd 2019.god). Analiza ERA –EDTA registra je pokazala da je

mortalitet bolesnika od perioda 2008-2012. god. iznosio 18.9%. kod bolesnika lečenih dijalizom i 3.2% za bolesnike sa transplantiranim bubregom (Haef J. i sar.). U Srbiji prema Godišnjem izveštaju za 2016. god. ukupan mortalitet računat kao procenat umrlih od ukupnog broja bolesnika lečenih metodama za zamenu bubrežne funkcije je u Srbiji iznosio 12,3% i to za HD 14,6%, za PD 13,9% i 1,2% za T bolesnike. Iste godine uzroci smrti kod skoro 45% bolesnika su bile KVB i cerebrovaskularne bolesti, 14 % infekcija, 11% malignitet, ostalo 16% i nepoznato 14% (Godišnji izveštaj o lečenju dijalizama i transplantacijom bubrega u Srbiji 2016. god. UNS, Beograd 2019.god).

Činjenica da osobe sa smanjenom bubrežnom funkcijom češće oboljevaju i umiru od KVB nego osobe koji imaju očuvanu funkciju bubrega kao i činjenica da bolesnici sa HBB često umru od KVB i pre nego što bubrežna slabost progredira do terminalnog stadijuma je navela Američko udruženje kardiologa da izdvoji HBB kao nezavistan faktor rizika za KVB i mortalitet. (Sarnak i sar., 2003, Go i sar., 2004)

Faktori rizika za razvoj kardiovaskularne bolesti bolesnika sa hroničnom bubrežnom bolešću

Kod bolesnika sa HBB tradicionalni faktori rizika, koji se sreću u opštoj populaciji, kao što su hipertenzija, pušenje, dislipidemija i dijabetes ne mogu u potpunosti objasniti ubranu progresiju aterosklerotskih procesa, KV događaje kao i višestruko povećan mortalitet koja se sreće kod ovih bolesnika. U poslednjih 20-tak godina veliki broj studija je nedvosmisleno ukazalo na značaj netradicionalnih faktora rizika vezanih za uremijski milje karakterističan za HBB, kao što su hiperhomocisteinemija, hronična inflamacija, oksidativni stres, vaskularne kalcifikacije -prikazani na Shemi 1. (Sarnak i sar., 2003, Goldsmith i sar., 2001, Collins i sar., 2001).



Shema 1 Tradicionalni i netradicionalni faktori rizika i HBB za nastanak KV događaja (Argawal R. The challenge of discovering patient-level cardiovascular risk factors in chronic kidney disease *Kidney International* (2008) 73, 1340–1342)

1.2.1. Tradicionalni faktori rizika

U nastanku KVB i kod bolesnika sa HBB klasični faktori rizika su izvedeni iz ranije Framingham studije (*Framingham*) sprovedene u opštoj populaciji i uključuju: starost bolesnika, dijabetes, muški pol, postojanje koronarne bolesti u porodici, hipertenzija, pušenje, smanjena fizička aktivnost, visoka koncentracija LDL i niska HDL, menopauza i stres. Analizajući bolesnike lečene dijalizom, na povećan mortalitet utiču bela rasa, starost, muški pol, prisustvo dijabetesa i pušenje i ovi faktori deluju kao nezavisni faktori rizika. Interesantno je da prisustvo hipertenzije i visoke koncentracije holesterola ne predstavljaju rizik za smrt ovih bolesnika. Ovaj paradoks je nazvan «reverzna epidemiologija kardiovaskularnih bolesti» koji označava da malnutricija i kardiomiopatija mogu izazvati smrt kod bolesnika sa najnižim holesterolom i normalnim krvnim pritiskom (Owen i sar 1993).

1.2.2. Netradicionalni faktori rizika

Kako je predstavljeno na Shemi 1 za razvoj ubrzane ateroskleroze u bolesnika sa HBB u pored navedenih tradicionalnih, odgovorni i faktori povezani sa samom bubrežnom bolesti kako prisustvo albuminurije i proteinurije, ekstraćelijsko opterećenje volumenom, poremećen odnos kalcijuma i fosfora, poremećaj ravnoteže elektrolita, tako i razni uremijski toksini, hronična inflamacija povišeni lipoprotein-i, trombogeni faktori, ali i malnutricija, anemija, povišen oksidativni stress (Owen i sar 1993).

Medju najčešće pročuvanim uremijskim toksinima vezanim za nastanak ateroskleroze spada svakako homocistein, a u poslednje vreme je aktuelno ispitivanje značaja proniflamatornih citokina u okviru hronične inflamacije vezano za uremiju kao i značaj snižene koncentracije fetuina u nastanku vaskularnih kalcifikacija.

1.2.2.1. **Homocisteini ateroskleroza**

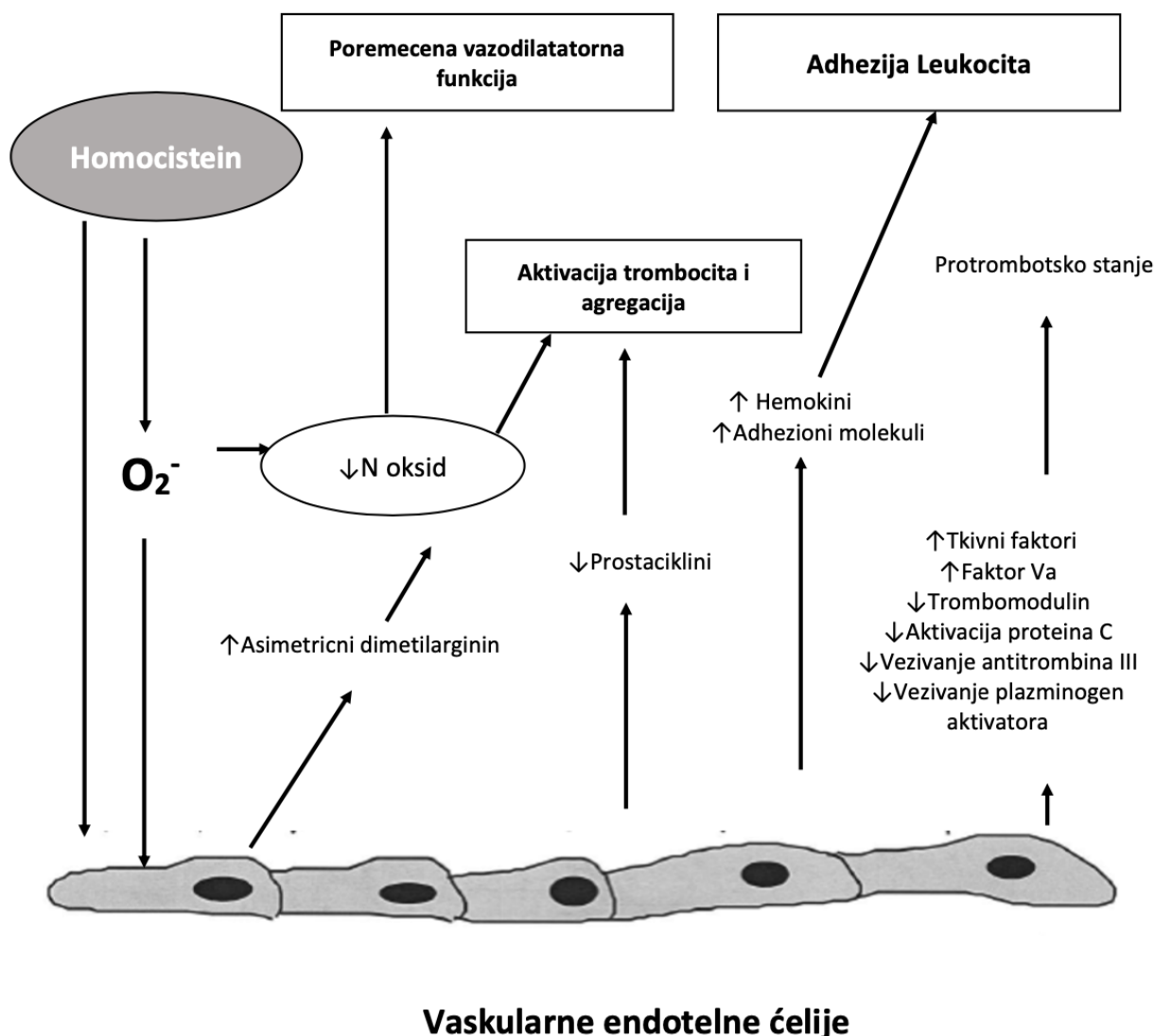
Homocistein (Hcy) je neesencijana aminokiselina koja sadrži sumpor i nastaje u organizmu kao toksični intermedijerni produkt u katabolizmu proteina. Ne nalazi se u hrani koju unosimo, već nastaje iz metionina unetog sa proteinima hrane. U poslednje tri decenije brojne prospektivne studije su ukazale da je hiperhomocisteinemija značajan nezavistan faktor rizika za kardiovaskularnu bolest u opštoj populaciji.

1.2.2.1.1. Metabolizam homocisteina i dejstvo na endotel

Homocistein (Hcy) u serumu postoji u stanju konstantne razmene jedne od njene četiri forme: 1% se nalazi u slobodnom obliku, 70-80% vezano za albumine disulfidnim vezama i preostalih 20-30% se nalazi ili kao Hcy dimer ili cistein-Hcy-mesani disulfid. Homocistein nastaje iz metionina. Po ulasku u ćelijski prostor metionin se konvertuje u homocistein, koji se potom metaboliše jednim od dva glavna puta: transsulfurilacije ili remetilacije. Homocistein je intermedijerni proizvod u transferu aktivisane metil grupe iz tetrahidrofolata u S-adenosilmetionin u tzv. aktivisanom metil ciklusu. Homocistein je takodje intermedijer u putu sinteze cisteina iz metionina, poznat kao put transsulfurilacije. Referentne vrednosti Hcy u serumu se kreću od 5-15 $\mu\text{mol/l}$. Prekid metaboličkih puteva uzrokuje nakupljanje Hcy u ćelijama, koji prelazi u plazmu pre nego što se dostignu citotoksične koncentracije (Selhub i sar., 1999). Genske mutacije, nutricionalni deficiti, razne bolesti i lekovi mogu promeniti metaboličke puteve dovodeći do hiperhomocisteinemije. Dodatno izvesne demografske karakteristike su udružene sa povišenim koncentracijama Hcy (Jacques i sar., 2001).

Postoji nekoliko biohemijskih mehanizama kojima homocistein toksično deluje na endotel: Hcy podleže spontanoj autooksidaciji, pri čemu nastaju potentni reaktivni citotoksični radikali (superoxid, vodonik-peroksid, superoksid-anjon i hidroksi radikal). Slobodni radikali dovode do lipidne peroksidacije, kao inicijalnog koraka u nastanku aterosklerotične lezije. Hiperhomocisteinemija inhibira enzim glutation-peroksidazu, te se smanjenem njene aktivnosti povećava ekspozicija endotela reaktivnim kiseoničnim radikalima. Hcy povećava i stvaranje NO u glatkim mišićnim ćelijama krvnih sudova tako što aktivira transkripciju faktora NF-k beta. Pored navedenog postoje podaci da Hcy menja

normalni antitrombotički fenotip endotela tako što povećava aktivaciju faktora XII i faktora V i smanjuje aktivaciju proteina C; inhibira ekspresiju trombomodulina i heparin-sulfata na površini endotela, a indukuje i ekspresiju tkivnih faktora. Shema 2



Shema 2 . Pretpostavljeni mehanizmi i efekti endotelne disfunkcije uzrokovane Hcy (Weissa N, Kellera Ch, Hoffmanna U, Loscalzob J. Endothelial dysfunction and atherothrombosis in mild hyperhomocysteinemia. Vasc Med2002; 7: 227-239)

1.2.2.1.2. Povezanost koncentracije homocisteina u krvi i jačine glomerulske filtracije

Koncentracija Hcy u krvi raste sa padom glomerulske filtracije i progresijom hronične bubrežne insuficijencije, tako da većina (preko 85%) pacijenata na dijalizi pokazuje blagu do umerenu hiperhomocisteinemiju. Koncentracije Hcy inverzno korelišu sa jačinom glomerulske filtracije (JGF) i oko tri puta su više kod bolesnika na hemodijalizi nego kod zdravih osoba. Posle transplantacije bubrega Arandottir i sar. (Arandottir i sar., 1998) nalaze da je koncentracija Hcy značajno niža u odnosu na pre transplantacije (27,6-21,2umol/l), ali je ipak viša nego u kontrolnoj grupi (16,0 umol/l). Isti autor porast nivoa Hcy posle transplantacije je zabeležio kod 29% bolesnika (Arandottir i sar., 1998). Massy i sar. (Massy i sar., 1994) su pokazali da je značajna hiperhomocisteinemija (preko 14 umol/l) prisutna kod bolesnika sa transplantiranim bubregom i predstavlja mogući faktor rizika za

kardiovaskularnu bolest, za porast nivoa Hcy za 8,3 umol/l udvostručava se rizik za kardiovaskularne događaje.

1.2.2.1.3. Genski polimorfizam homocisteina

Genski uzroci hiperhomocisteinemije se mogu podeliti u dve grupe:

- A. Prvu grupu čine teški urođeni deficiti enzima uključenih u metabolizam homocisteina: cistation beta sintetaze (homocistinuria), metionin sintetaze i MTHFR, koji uzrokuju retka autozomno recesivna obolenja koja su udružena sa hiperhomocisteinemijom i vaskularnim trombozama (Nygard i sar., 1998, Vincent i sar., 1996, Yeun i sar.,1998).
- B. Drugu grupu genetičkih uzroka hiperhomocisteinemije čine genski polimorfizmi koji dovode do suptilnih ali značajnih promena u strukturi i aktivnosti ovih enzima.

Polimorfizmi u genu za 5,10- MTHFR

Metilen tetrahidrofolat reduktaza (MTHFR) je enzim koji ima ulogu u formiranju metiltetrahidrofolata, glavnog donora metil grupe za reemetilaciju Hcy u metionin u okviru folatnog ciklusa (Gaughan i sar., 2000). U humanom genomu gen za 5,10 MTHFR reduktazu nalazi se u regionu 1p36.3 kratkog kraka hromozoma 1. Ukupna dužina kodirajućeg regiona iznosi 1980 bp. Gen se sastoji se od 11 egzona, čija je dužina od 102 bp do 432 bp. Dužina introna se kreće od 250 bp do 1.5 kb, sa izuzetkom jednog čija je dužina čak 4.2 kb. U genu za MTHFR otkriveno je nekoliko polimorfnihih mesta, a najčešće su zastupljene supstitucije baza na nukleotidnim pozicijama 677. i 1298.

Polimorfizam MTHFR 677 C>T

Supstitucija citozina (C) timinom (T) na nukleotidnoj poziciji 677, lokalizovanog u egzonu 4, tj. 677C>T, dovodi do prevodjenja kodona GCT u kodon GTT, te se prilikom sinteze polipeptidnog lanca umesto alanina ugrađuje valin na 222. poziciji u proteinu u regulatornom domenu enzima (Kang i sar., 1988).

Takva promena prouzrokuje nastanak termolabilne forme enzima, koja je smanjene efikasnosti. Osobe sa koje su homozigoti sa genotipom MTHFR 677 TT imaju smanjenu enzimsku aktivnost na 30% normalne, dok je kod osoba sa heterozigotnim CT genotipom enzimska aktivnost smanjena na 60 % normalne MTHFR aktivnosti (Kang i sar., 1988).U kontekstu metabolizma Hcy to dovodi do usporavanja jednog od kataboličkih puteva, čime se stvaraju uslovi za njegovo nagomilavanje i hiperhomocisteinemiju.

Genotip MTHFR 677 TT je češće udružen sa visokim uHcy u plazmi u poredjenju sa heterozigotima za istu mutaciju ili normalnim homozigotima, što je uočeno širom svih zemalja i regiona Evrope.

Kod pacijenata u terminalnom stadijumu bubrežne insuficijencije značajan je uticaj MTHFR677C>T polimorfizma u razvoju aterosklerotskih komplikacija. Tako je u studiji u kojoj je ispitivana udruženost ovog polimorfizma i nivoa homocisteina sa prisustvom aterosklerotskih plakova na karotidnim arterijama, utvrđeno da je učestalost bolesnika sa TT genotipom na hemodijalizi sa značajnom karotidnom stenozom iznosila 17% , dok je u kontrolnoj iznosila 5% .

Direktnim merenjem količine metilovanog citozina u DNK, utvrđeno je da osobe sa genotipom MTHFR 677 TT imaju skoro duplo manje metilovanu DNK. Naravno, to može imati niz različitih posledica kako na razvoj kancera tako i na druge procese za koje je metilacija bitna, te će u narednom periodu istraživanja na tom polju biti veoma intenzivna (Gregg i sar., 1998).

Polimorfizam MTHFR 1298 A>C

Supstitucija adenina (A) citozinom (C) na poziciji 1298 nukleotida, lokalizovanog u egzonu 7, tj.1298A>C, dovodi do supstitucije glutamina alaninom na 429. poziciji polipeptidnog lanca, koja

predstavlja katalitički domen proteina (66). To dovodi do smanjenja enzimske aktivnosti, ali ne rezultuje pojavom termolabilne forme enzima. 1298A>C mutacija sama nema uticaja na folatni status i tHcy, ali udružena sa heterozigotima za 677C>T genotip, potencijalno dovodi do pada folata i povišenja tHcy u plazmi (Naomi i sar., 2001).

Učestalost 1298C alela pokazuje heterogenu distribuciju u različitim populacijama. Najmanja je kod Afro-Amerikanaca, 0.15, kod Belaca ona iznosi 0.30, dok je učestalost medju ostalim etničkim grupama još uvek predmet istraživanja.

O uticaju pomenutog polimorfizma u razvoju koronarne bolesti su prisutne brojne kontradiktornosti, a ukazuje se na mogući značaj 1298 A>C polimorfizma u nastanku koronarne vaskularne bolesti u ranom životnom dobu, čak i kada nivo homocisteina u krvi nije povišen.

Kod pacijenata sa bubrežnom insuficijencijom na hemodijalizi uočeno je da je frekvencija 1298 C alela 0.27, kao i da je kod obolelih sa 677 CC i 1298 CC udruženim genotipovima značajno povišen nivo homocisteina (37.7+/-12 μ mol/l) i povećan rizik za pojavu kardiovaskularnih bolesti.

1.2.2.2.Hronična inflamacija i markeri inflamacije kod bolesnika sa hroničnom bubrežnom slabošću

HBB je stanje hronične inflamacije praćeno povišenim vrednostima C reaktivnog proteina i proinflamatornih citokina koji zajedno povećavaju rizik od smrti bolesnika. Zajedno sa malnutricijom, oksidativnim stresom i nasleđem, hronična inflamacija dovodi do ubrzane ateroskleroze kod bolesnika sa uremijom.

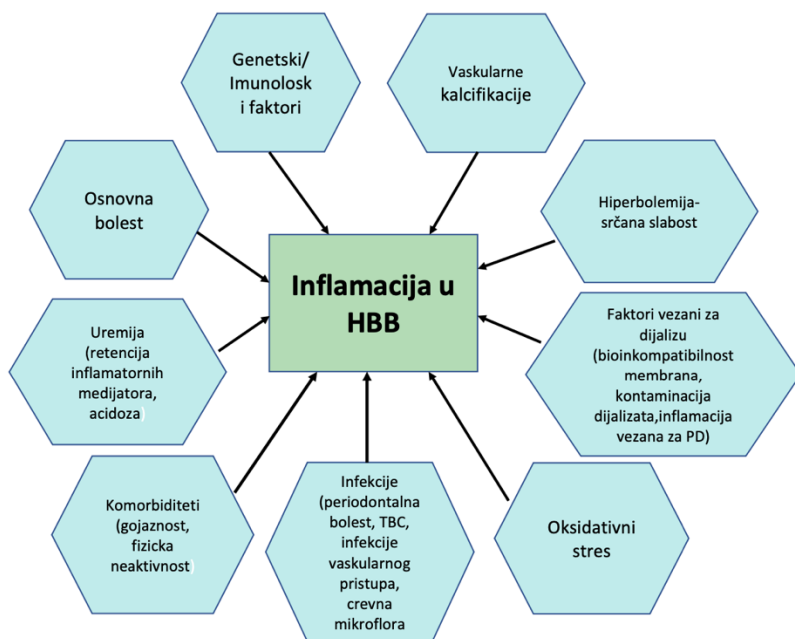
Inflamacija je deo kompleksa biološkog odgovora na ozledu tkiva, infekciju, ishemiju i autoimune bolesti. U fiziološkim granicama, inflamatorni odgovor omogućava odstranjenje štetnog agensa i započinje izlečenje. Medjutim, kada organizam nije u stanju da odstrani početni događaj nastaje stanje hronične inflamacije koje ima neželjene sistemske posledice.

Inflamacija je česta u HBB i njena prevalenca inverzno koreliše sa stepenom bubrežne funkcije, a pozitivno sa proteinurijom. Starija dob i prisustvo dijabetesa su nezavisni prediktori inflamacije u HBB. Neadekvatan imuni odgovori posledična inflamacija su medijatori i /ili katalizatori progresije HBB, KVB i razvoja insulinske rezitencije, malnutricije, anemije i koštano mineralnog metabolizma kod bolesnika sa HBB (Carrero i sar., 2010, Stenvinkel i sar., 2002, Akchurin i sar., 2015).

1.2.2.2.1. Etiologija inflamacije u bolesnika sa hroničnom bubrežnom bolešću

Etiologija inflamacije u HBB je multifaktorijalna i kako se može videti na Shemi 3, mnogi faktori doprinose nastanku hronične inflamacije u HBB uključujući povećano stvaranje inflamatornih citokina, oksidativni stres i acidozu, hronične i rekurentne infekcije, poremećen metabolizam masnog tkiva, disbioza mikroorganizama gastrointestinalnog trakta (Simona i sar.,2018).

Hemodijaliza sa infekcijama vaskularnog pristupa, inkompatibilnošću dijaliznih membrana i nečistoćama u dijalizatnoj tečnosti, epizode peritonitisa kod bolesnika na peritoneumskoj dijalizi su mogući faktori koji su povezani sa inflamacijom u HBB. Ali neke osobe razvijaju aterosklerozu i bez tih stimulusa i tu se zapaža uloga genetskih faktora (Akchurin i sar., 2015.).



Shema 3. Uzroci hronične inflamacije u bolesnika sa hroničnom bubrežnom bolešću (Filiopoulos, V., Vlassopoulos D. Inflammatory syndrome in chronic kidney disease: pathogenesis and influence on outcomes. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2009;8(5):369-382).

1.2.2.2.2. Biomarkeri inflamacije

1.2.2.2.2.1. C reaktivni protein

Od 1990 tih zapažena je povezanost parametara inflamacije - povišenog C reaktivnog proteina (CRP) kod bolesnika sa bubrežnom slabošću sa aterosklerozom i lošim ishodom.

CRP je reaktant akutne faze upale koji stvara u jetri pod stimulacijom inflamatornim citokini-ma, prvenstveno IL-6. CRP je prototipni marker inflamacije. Prema studijama u Evropi predložena granična vrednosti CRP-a za definisanje inflamacije u uremiji je 10 mg/L. Neke studije su pokazale povišen rizik za mortalitet već od nivoa CRP-a >3 mg/L (Stenvinkel i sar., 2002, 2005).

1.2.2.2.2.2. Interleukin 6

Interleukin 6 stvaraju mnogi tipovi ćelija uključujući monocyte, mezotelijalne ćelije, fibroblaste, adipocite i limfocite, obično u odgovoru na fiziološke stimuluse kao što je infekcija, trauma i druge ozlede tkiva. IL-6 indukuje reakciju akutne faze, jedan je od početnika inflamatornog odgovora. Može se detektovati u rangu od 1pg/mL kod zdravih osoba, a povišen je kod većine, ne svih, bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću. Smanjena eliminacija je glavni uzrok povišenih nivoa IL-6 kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabosti, ali i povećano stvaranje može imati ulogu. Na primer, posle hemodijalize nivo IL-6 u cirkulaciji raste što je i dokaz hemodijalizom indukovano inflamatornog odgovora. Nivoi IL-6 u plazmi korelišu sa povećanim mortalitetom i lošim ishodom bolesnika sa HBB. CRIC studija je pokazala da su biomarkeri inflamacije kao što su IL-1 beta, IL-6, CRP i fibrinogen inverzno udruženi sa parametrima bubrežne funkcije i pozitivno udruženi sa stepenom proteinurije (Gupta i sar., 2012, Simon i sar .,2015). Prediktivna vrednost IL-6 za KV i ukupni mortalitet je bolja u odnosu na prediktivnu vrednosti C reaktivnog proteina (CRP) i drugih

citokina kao što je TNF-alfa, IL 1- beta , IL-1RA i IL 18 (Tripepi i sar., 2005, Stenvinkel i sar., 2002). Dostupnost novih multipleks tehnologija omogućila je istraživačima da predju sa analize pojedinačnih citokina na određivanje panela citokina. Cohen i saradnici su u kohorti hemodijaliznih bolesnika određivali pro-inflamatorni šablon povišenih IL-1, IL-6 i TNF- α u kombinaciji sa niskim antiinflamatornim parametrima, uključujući IL-2, IL-4, IL-5, IL-12, CH50 i broj T-ćelija, i pokazali da bolesnici sa visokim pro-inflamatornim citokinima imaju smanjeno preživljavanje u poređenju sa bolesnicima bez karakterističnog citokinskog šablona (Cohen i sar., 2010, Yilmaz i sar., 2014).

1.2.2.2.2.3 Interleukin 10

Interleukin 10 (IL-10) je proizvod imunoaktivnih ćelija, uglavnom monocita i limfocita i ima ključnu ulogu u suprimiranju inflamatornog odgovora. Sekretuje se odloženo, uglavnom prati proinflamatorne faktore določeno nekoliko časova. IL -10 se eliminiše uglavnom putem bubrega, pa je poluživot značajno produžen u terminalnoj bubrežnoj slabosti. Neki autori spekulisu da osobe sa višim nivoima IL-10 imaju bolji imuni balans, ali skorašnje studije pokazuju da IL-10 može biti odraz proinflamatornog miljea i povezan sa lošijim ishodima. Za sada nema konkluzivnih podataka o ulozi IL-10 kao protektivnog ili faktoru rizika.

Na osnovu svega navedenog inflamacija dobro prepoznat i važan netradicionalni faktor rizika za morbiditet i mortalitet u HBB (Yilmaz i sar., 2014, Morita i sar., 1997).

1.2.2.2.2.3. Povezanost malnutricije, inflamacije i ateroskleroze (MIA sindrom)

Ateroskleroza je kompleksan proces koji započinju različite ozlede vaskularnog endotela. Endotelna disfunkcija nastala kao posledica inicijalne ozlede karakteriše se povećanom adhezivnošću endotela za leukocite i trombocite i sintezom vazoaktivnih molekula, citokina i prokoagulantnih faktora. Ovaj odbrambeni odgovor se karakteriše klasičnim inflamatornim promenama i može dovesti do stvaranja plaka, obstrukcije lumena i rupture plaka.

Već je napomenuto da su faktori uključeni u oštećenje arterija u HBB u rasponu od klasičnih faktora do specifičnih za bolest (anemija, sekundarni hiperparatiroidizam i izlaganje bioinkompatibilnim dijaliznim membranama i ili kontaminiranoj dijaliznoj tečnosti) i do novih faktora rizika kao što je hiperhomocisteinemija, infekcije i akumulacija endogenih inhibitora NO sinteze, asimetričnog dimetilarginina (ADMA).

Prema inflamatornoj hipotezi ateroskleroze (Ross 1990.) lokalni inflamatorni stimulusi, kao što su produkti oksidacije, uznepredovale glikacije i završni produkti raznih infektivnih procesa, mogu promeniti zid arterija. Ovo može izazvati stvaranje pro aterogenih adhezivnih molekula, faktora rasta i hemokina koji imaju značajnu ulogu u aterogenom procesu. Koncept inflamacije ima centralnu ulogu u patofiziologiji ateroskleroze (Ghanavatian i sar., 2014, Akdag i sar., 2008).

Gubitak proteina i energije ili njegova ekstremna forma kaheksija je maladaptivno stanje koje je često u inflamatornim stanjima, u kome se gubi suva telesna masa, a masni depoi su relativno neiskorišteni. Citokini regulišu neuroendokrine signale i podstiču smanjenje mišićne mase u cilju da održe sintezu reaktanata akutne faze kod bolesnika na hemodijalizi. (Cric study) (Kalender i sar., 2006, Stenvinkel i sar., 1999, 2000). Sve ovo dovodi do stanja *circulusa vitiosus-a*, nazvanog MIA (akronim za malnutricija, inflamacija i arteroskleroza) sindrom.

1.2.2.2.2.4. Polimorfizam gena za inflamaciju

Pojedini se tradicionalni faktori rizika, kao što su recimo holesterol ili uhranjenost, kod bolesnika sa HBB ponašaju prema postulatima reverzne epidemiologije, recimo hipo a ne hiperholesterolomija i smanjena uhranjenost povećavaju rizik za KVB morbiditete i mortalitet. Ova činjenica može dodatno ukazivati na značaj ispoljavanja genskih varijacija i u recimo genima koji kodiraju marekere inflamacije u nastanku i ubrzanju ateroskleroze kod bubrežnih bolesnika. Čak šta više, neke osobe razvijaju

aterosklerozu i u odsustvu poznatih faktora rizika te se može pretpostaviti da je kod njih ključna uloga u naslednoj osnovi. Tako su pojedine studije pokazale da je polimorfizam u promotornom regionu gena za interleukin 6 preciznije alel -174 G udružen sa većom incidencom kardiovaskularnih događaja i mortalitetom kod bolesnika na hemodijalizi (Aker i sar., 2009.).

1.2.2.3. Fetuin i vaskularne kalcifikacije kod bolesnika sa hroničnom bubrežnom bolešću

Fetuin-a, ili α_2 -Heremans-Šmid glikoprotein, je negativno naelektrisan cirkulišući protein koji deluje kao jak sistemski i lokalni inhibitor vaskularnih kalcifikacija (VK). Izlučuju ga ćelije jetre u cirkulaciju gde sprečava razvoj sistemske kalcifikacije tako što se direktno vezuje za kalcijum i fosfat i formira neaktivne komplekse. Karakteristična je funkcionalna raznolikost fetuina-A i da pored uloge glavnog sistemskog inhibitora VK ima i ulogu u metaboličkim poremećajima kao što su insulinska rezistencija i dijabetes melitus (DM) (Icer i sar., 2021, Meta analiza Guo-a i sar.)

Vaskularne kalcifikacije su često sreću kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabosti i glavna su karakteristika brzo progridirajuće aterosklerotske KVB. Sa druge strane, poslednjih 20-tak godina su nedvosmisleno izmerene značajno niže koncentracije fetuina-A u krvi bolesnika na dijalizi u poređenju sa zdravim kontrolama te su mnogi autori ispitivali tu povezanost (Ketteler i sar., 2003).

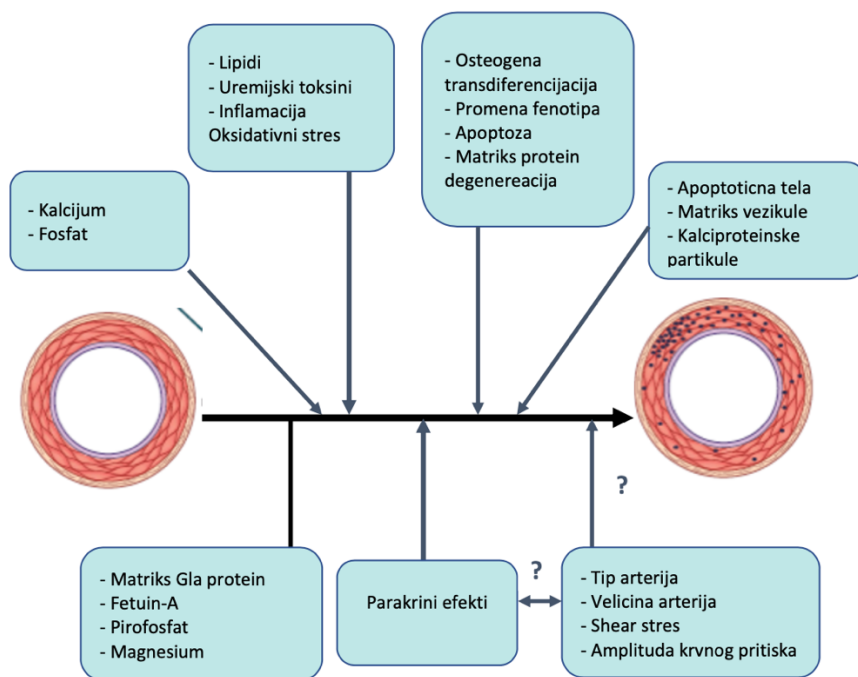
1.2.2.3.1. Mehanizmi nastanka vaskularnih kalcifikacija kod bolesnika sa hroničnom bubrežnom bolešću-uloga fetuina

Različiti mehanizmi su uključeni u razvoj VK kod bolesnika sa HBB (Martola i sar., 2005, Krasniak i sar., 2007, Floege i sar., 2004, Moe i sar., 2004, Cozzolino i sar., 2005, Drueke i sar. 2005) i u njima učestvuju kako tradicionalni tako i netradicionalni faktori rizika vezani za bubrežnu bolest koji su prikazani na Shemi 4.

U klasične faktore rizika spadaju dobro poznati starost, pol, pozitivna porodična anamneza, pušenje, gojaznost, hipertenzija, dijabetes i dislipidemija, a u faktore rizika povezane sa uremijom spadaju kako vreme provedeno na dijalizi, uremični toksini, zapaljenje (krajnji proizvodi napredne glikacije, oksidativni stres i azotni oksid, asimetrični dimetilarginin i homocistein) tako i povećani nivoi fosfata, kalcijuma u serumu -fosfatni proizvod i paratiroidni hormon (PTH) (Hamirani i sar., 2008, Kyriakidis i sar., 2021).

Postoje dokazi da je nastanak VK aktivan proces kome se suprotstavljani cirkulišući ili lokalni inhibitori kao što su fetuin-A, matriksni Gla protein i neorganski pirofosfat.

Tokom proteklih decenija, sve je više dokaza o ulozi fetuina-a u uremiji. Fetuin-a sprečava pojavu ektopičnih VK, na nekoliko načina: inhibicijom ekstracelularnog formiranja i ekspanzije kristala hidroksiapatita, inhibicijom diferencijacije vaskularnih glatkomišićnih ćelija i suzbijanjem upale i oksidativnog stresa (OS) (Reynolds i sar., 2005, Shroff i sar., 2007, Rudloff i sar., 2022).



Shema 4. Pretpostavljeni faktori rizika za nastanak vaskularnih kalcifikacija u bolesnika sa hroničnom bubrežnom slabošću (Schlieper G. Vascular calcification in chronic kidney disease: not all arteries are created equal. *Kidney International* 2014; 85: 501–503.)

Price i sar. (Price i sar., 2001) su u eksperimentalnim uslovima otkrili neaktivne komplekse visoke molekularne težine koji sadrže fosfat, kalcijum i fetuin- a i stoga pretpostavili da ovaj glikoprotein inhibira početak VK vezivanjem za cirkulišući kalcijum i fosfat. Čestice kalciproteina prenose precipitate kalcijuma iz ekstraskeltnih područja u kost, delujući kao „usisivači” za kalcifikovana mesta. Štaviše, fetuin-a može inhibirati lokalne VK unutar arterijskog zida vezivanjem direktno za VGMĆ i sprečiti transformaciju njihovog fenotipa. Na mestima povrede endotela, fetuin-a je ugrađen u apoptotska tela VGMĆ i stoga ograničava njihovu sposobnost da promovišu oksidativni stres (OS), zapaljenje i dalje vaskularno oštećenje (Smith i sar., 2013).

Podaci iz *in vitro* i *in vivo* studija su pokazali da fetuin-a može ispoljiti antiinflamatorna svojstva, poništavajući oslobađanje inflamatornog citokinskog faktora tumorske nekroze-a (TNF-a) iz stimulisanih makrofaga.

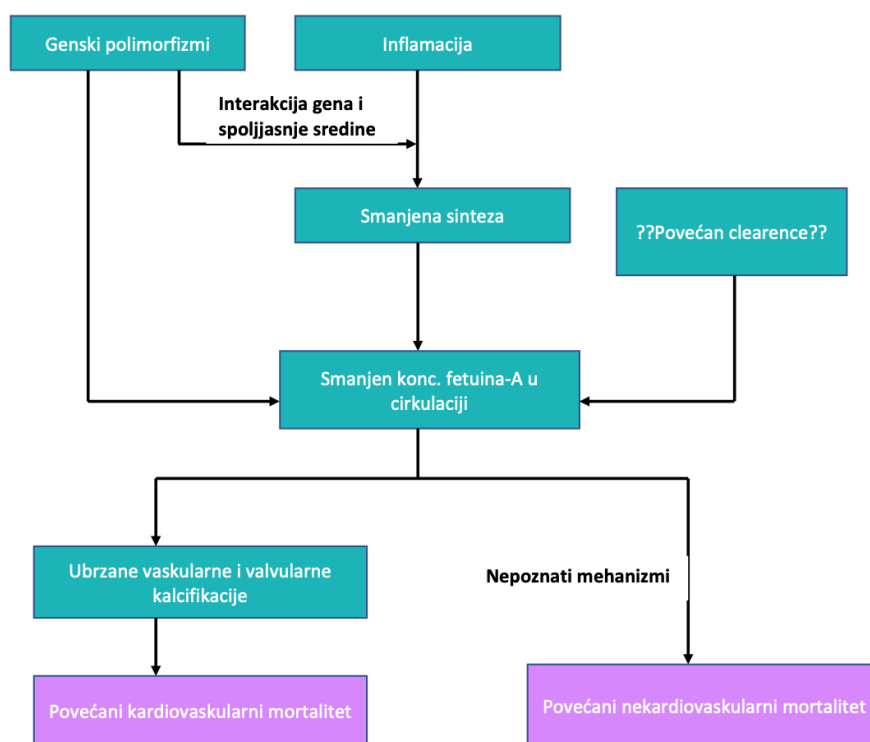
Važna uloga fetuina-a kao inhibitora VK potvrđena je u eksperimentalnim uslovima kod genetski modifikovanih fetuin-a nokaut miševa, kod kojih su nastale ekstenzivne fatalne ekstrakostane kalcifikacije u srcu, plućima, bubrezima i koži nakon ishrane bogate vitaminom D i fosforom (Jahnen i sar., 2001). Moe i saradnici (Moe i sar., 2005) su pokazali da su nivoi fetuina-a u serumu u obrnutoj korelaciji sa skorom kalcifikacije (procenjenim kompjuterskom tomografijom) koronarnih arterija pacijenata sa terminalnom bubrežnom insuficijencijom. Caglar i saradnici (Caglar i sar. 2008) su dokazali da se fetuin-A u cirkulaciji značajno smanjuje sa progresijom HBB i da je endotelna disfunkcija nezavisno povezana sa sniženim nivoima fetuina-A.

Koen i saradnici (Coen i sar., 2006) nalaze značajnu inverznu korelaciju između nivoa fetuina-a u serumu i depozita kalcijuma u srcu i koronarnim arterijama kod 132 bolesnika na hroničnoj hemodijalizi. Nekoliko tudija je dokumentovalo inverznu korelaciju između nivoa fetuina-A u serumu i preživljavanja pacijenata na dijalizi (Zhou i sar., 2019)

U kohorti od 258 pacijenata sa terminalnom bubrežnom slabošću koji su započeli HD ili PD, smanjeni nivoi fetuina-a u serumu su bili značajno povezani sa MIA sindromom i povećanom smrtnošću od svih uzroka i KV. Čini se da je povezanost između fetuina-a i VK/KV bolesti delimično posredovana hroničnom inflamacijom. Pošto je dobro utvrđeno da proinflamatorni citokini pojačavaju funkciju BMP-2, još jednog poznatog promotera VK, čini se da je patofiziologija VK kod pacijenata sa HBB veoma komplikovana i uključuje nekoliko molekularnih puteva.

Malo je podataka o fetuinu-A kod primalaca transplantiranog bubrega. Nedavno je pokazano da se nivoi fetuina-A povećavaju nakon transplantacije bubrega zajedno sa poboljšanjem endotelnih funkcija (Mazzaferro i sar., 2007).

Inflamacija i genski polimorfizam su najčešći razlozi niske koncentracije fetuina u krvi i na Shemi 5 je prikazana hipoteza kako smanjenje koncentracije fetuina u krvi doprinosi povećanom KV morbiditetu i mortalitetu kod bolesnika da dijalizi (Mehrotra R. i sar., 2007).



Shema 5. Povezanost smanjenjenog fetuina sa povećanim kardiovaskularnim morbiditetom i mortalitetom kod bolesnika da dijalizi (Mehrotra R. Emerging role for fetuin-A as contributor to morbidity and mortality in chronic kidney disease. *Kidney International* 2007; 72, 137–140.)

1.2.2.3.2. Polimorfizmi u genu za fetuin

Udruženost polimorfizma u genu za fetuin 742C>T sa nivoima serumskog fetuina-A, pojavom VK i mortalitetom ispitivana je u nekoliko studija u opštoj populaciji i kod bolesnika sa HBB.

U European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition-Potsdam study analiza polimorfizama u genu za fetuin je izdvojila 742C-alel kao značajno udružen sa nivoima fetuina-A i povećanje relativnog rizika za akutni infarkt miokarda za 1,59 za 1 SD porasta fetuina-A (Fisher i sar., 2009).

Studija ispitanika sa asimptomatskom vaskularnom bolesti utvrdila je da je ASHG genotip nezavisni prediktor sniženih nivoa fetuina-A u cirkulaciji, ali ne i vaskularnih kalcifikacija (Bellia i sar 2016). Mohammadi i sar. nalaze da je 742 T alel risk alel za VK i da nivoi fetina-A negativno korelišu sa pojavom kardiovaskularne bolesti (Mohammadi-Noori i sar., 2020).

Kod bolesnika sa HBB prisustvo 742 T alela je bilo udruženo sa sniženim nivoima fetuina A i većim mortalitetom i kardiovaskularnim morbiditetom u prisustvu povišenih markeria inflamacije. Nekoliko studija takođe pokazuje da je polimorfizam u genu za fetuin odnosno 742 T mutacija od visokog uticaja na nivo cirkulišućeg fetuina A i na ishod bolesnika sa bubrežnom slabošću, posebno kod osoba sa znacima inflamacije i ukazuje na potrebu daljih prospektivnih studija (Stenvinkel i sar., 2005, Ketteler i sar., 2003). Studije pacijenata sa transplantiranim bubregom takođe pokazuju da su niski nivoi fetuina-A određeni varijantama u genu za fetuin i nezavisno povezani sa VK i većim rizikom od KV događaja i mortaliteta (Marechal i sar., 2011).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Utvrđivanje učestalosti genotipova i alela za polimorfizme: 677C>T (rs 1801133) i 1298A>C (rs 1801131) u genu za MTHFR, -174 G>C (rs 1800795) u genu za interleukin 6 (IL-6) i -1082 G>A (rs 1800896) kao i -819 T>C (rs 1800871) u genu za IL 10 i u genu za fetuin 256 C>G (rs 4918) i 766C>G (rs 4917) kod bolesnika u terminalnoj bubrežnoj slabosti koji leče hemo ili peritoneumskom dijalizom ili im je urađena transplantacija bubrega.
2. Utvrđivanje povezanosti koncentracije homocisteina, IL-6 i IL-10 i fetuina u serumu sa odgovarajućim genotipovima kod bolesnika u terminalnom bubrežnoj slabosti kod navedenih pacijenata.
3. Ispitivanje udruženosti različitih pojedinačnih ili kombinovanih genotipova sa ranim i kasnim pokazateljima arterioskleroze kao i oboljevanjem od kardiovaskularnih bolesti.
4. Ispitivanje značaja pojedinačnih ili kombinovanih genotipova u predikciji kardiovaskularnog mortaliteta u terminalnom bubrežnoj slabosti kod navedenih pacijenata.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. BOLESNICI

3.1.1. Ispitivanje koncentracije homocisteina u serumu bolesnika lečenih hemodijalizama i u serumu bolesnika sa transplantiranim bubregom

U studiji koja je analizirala koncentraciju homocisteina u krvi bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću i polimorfizme gene uključene u njegov metabolizam, ispitano je ukupno 188 bolesnika, 102 muškarca i 86 žena, prosečne starosti 45,77 (od 23 do 78) godina. U ispitanoj kohorti, 82 bolesnika je lečeno ponavljanim hemodijalizama (HD) a 106 bolesnika je imalo stabilnu funkciju transplantiranog bubrega (Tx). Ispitani bolesnici su lečeni i kontrolisani na Klinici za nefrologiju, KCS u Beogradu. Dužina praćenja bolesnika je bilo 60 meseci.

Dvadesetosam zdravih osoba su činile kontrolnu grupu ispitanika, prosečne starosti 45.5 godina.

Na Tabeli 1 su prikazani demografski podaci HD grupe i Tx grupe bolesnika.

Tabela 1. Demografski podaci ispitanih bolesnika lečenih hemodijalizama i grupe sa transplantiranim bubregom

Ispitani bolesnici (N)	Starost (godine)	Pol (m/ž)	Dužina trajanja HD (mes) ili vreme od Tx (mes)
HD bolesnici (82)	54,8 ± 13,19	36/46	83,6 ± 57,62
Tx bolesnici (106)	38.85 ± 10,36	66/40	63.43 ± 50,1

Osnovne bubrežne bolesti u HD grupi su bile: policistična bolest bubrega (DRP) kod 15 (18.3%) bolesnika, hronični glomerulonefritis (GN) kod 15 (18.3%), hronični pijelonefritis (PN) kod 10 (12.2%), nefroangioskleroza (NAS) kod 10 (12.2%) a 2 (2.4%) bolesnika je imalo balkansku nefropatiju (BEN) i tuberkulozu dok je 3 (3.7%) bolesnika je imalo dijabetesnu nefropatiju (DN), 5 (6.1%) rapidnoprogresivni glomerulonefritis (RPG), 7 (8.5%) sistemske bolesti i 15 (18.3%) bolesnika je imalo bubrežnu bolest nepoznatog uzroka.

Osnovne bubrežne bolesti u Tx grupi su bile hronični GN kod 41 (39%) bolesnika, hronični PN kod 3 (3%) bolesnika, NS kod 5 (5%), DRP kod 4 (4%) dok su kod 13 (12%) bolesnika bile kongenitalne anomalije urinarnog trakta, kod 30 (28%) druge bolesti i kod 10 (9%) bolesnika bubrežna bolest je bila nepoznatog porekla.

Tx bolesnici su proveli prosečno vreme na dijalizi pre transplantacije 32.69 ± SD (2-120) meseci. Kod 86 bolesnika davaoc bubrega je bila živasrodna osoba, kod 20 bolesnika učinjena je transplantacija bubrega sa umrle osobe a prosečna starost davaoca bubrega je bila 54,9 (18-82) godina.

Imunosupresivni protokol Tx bolesnika se sastojao od ciklosporina, prednizolona i azatioprina a lečenje epizoda akutnih odbacivanja je vršeno pulsni dozama kortikosteroida.

3.1.2. Ispitivanje koncentracije interleukina -6 i interleukina -10 u serumu bolesnika lečenih ponavljanim hemodijalizama i peritoneumskom dijalizom

U studiji koja je analizirala koncentracije interleukina -6 (IL-6) i IL-10 u krvi bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću i polimorfizme gena za navedene ineterleukine ispitano je ukupno 128 bolesnika, 65 muškog i 63 ženskog pola, prosečne starosti 53.81 (24-78) godina. Od svih ispitanih bolesnika, 77 je bilo na redovnom programu hemodijalize (HD) a 51 na program peritoneumske dijalize (PD) Klinike za nefrologiju, UKCS, u Beogradu, prosečnog trajanja dijalize 64.78 (1-314) meseci.

Bolesnici su bili praćeni 30 meseci.

Osnovne bubrežne bolesti kod ispitanih bolesnika su bili hronični GN kod 18 (14,1%) bolesnika, hronični PN kod 16 (12,5%) bolesnika, NAS kod 23 (18%) kao i DN kod istog broja bolesnika, DRP kod 13 (10%) bolesnika, kod 16 (12,5%) bolesnika je bila sistemske bolesti a ostale bubrežne bolesti kod 19 (14,8%) bolesnika.

3.1.3. Ispitivanje koncentracije fetuina serumu bolesnika sa hroničnom bubrežnom bolešću stadijum 2-5 i bolesnika sa transplantiranim bubregom.

U studiji koja je analizirala koncentracije fetuina-A u krvi bolesnika sa hroničnom bubrežnom slabošću (HBB) i bolesnika sa transplaniranim (Tx) bubregom, kao i polimorfizme gena za fetuin A ispitano je ukupno 88 bolesnika, 48 muškog i 40 ženskog pola, prosečne starosti 43.69 (21-70) godina. Od svih ispitanih bolesnika, 46 bolesnika je imalo hroničnu bubrežnu slabost stadijum 2-5 koji nisu na dijalizi a 42 bolesnika je bilo sa stabilnom funkcijom transplaniranog bubrega. Ispitanici su selektovani iz populacije bolesnika koji su se redovno kontrolisali u Klinici za nefrologiju, KCS u Beogradu.

Bolesnici su praćeni 72 meseca.

Na Tabeli 2 su prikazani demografski podaci ispitanih bolesnika sa HBB i i grupe bolesnika sa transplantiranim bubregom,

Tabela 2. Demografski podaci ispitanih bolesnika sa hroničnom bubrežnom slabošću i grupe bolesnika sa transplantiranim bubregom

Ispitani bolesnici (N)	Starost (godine)	Pol (m/ž)	Vreme od Tx (godine)
HBB bolesnici (46)	38.21±15.56	23/23	
Tx bolesnici (42)	49.18±10.58	25/17	9.56 ± 5.27

Osnovne bubrežne bolesti kod HBB bolesnika su bili: hronični GN kod 14 (30,4%) bolesnika, hronični PN i kongenitalne anomalije urinarnog trakta kod 4 (8,7%) bolesnika, NAS kod 14 (30,4%) i DRP kod 6 (13,0%) bolesnika, a ostale bubrežne bolesti kod 8 (17,4%) bolesnika.

Osnovne bubrežne bolesti kod Tx bolesnika su bili hronični GN 26 (61,9%), hronični PN i kongenitalne anomalije urinarnog trakta 5 (11,9%), NAS 3 (7,14%), DRP kod 2 (4,7%), ostalo 3 (7,14%) kao i nepoznato 3 (7,14%)

U Tx grupi, 31 bolesnik je primio bubreg od živog srodnog davaoca, a 11 od umrle osobe. Prosečno vreme od transplantacije iznosilo je 9.56 ± 5.27 godina.

Imunosupresivni protokol kod Tx bolesnika se sastojao od indukcione terapije antitimocitnom globulinom ili baziliksimumabom i terapije održavanja sa kalcineurinskim inhibitorima (takrolimus ili ciklosporin), mikofenolat mofetilom ili azatioprinom i prednizolon. Bolesnici sa HBB čija je osnovna bolest neka od formi glomerulonefritisa primali su kortikosteroide i druge imunosupresive prema protokolu.

3.2. METODE

3.2.1. Molekularno ispitivanje

U ovom radu molekularno ispitivanje podrazumeva: izolovanje ukupne genomske DNK, analizu polimorfizma gena za MTHFR u okviru 677C>T i -1298A>C polimorfni mesta, gena za IL-6 u okviru -174G>C, gena za IL10 u okviru -1082G>A i -819T>C polimorfni mesta, i gena za fetuin u okviru polimorfni mesta 742C>T i 766C>G, primenom metoda PCR/RFLPs (restriction fragment length polymorphisms), alel specifični PCR i PCR u realnom vremenu. Sve analize su rađene u laboratoriji Instituta za humanu genetiku Medicinskog fakulteta u Beogradu.

3.2.1.a. Izolacija DNK iz leukocita periferne krvi

Za gensku analizu DNK je izolovana iz leukocita periferne krvi ispitanika metodom isaljavanja ("salting out") (Miller i sar., 1988).

Uzorak od 5 ml venske krvi sa antikoagulansima (Na-citrat, EDTA) se inkubira sa istom količinom pufera za lizu 15 do 20 min na +4°C. Potom se centrifugira 15 min na 2000 obrtaja, supernatant je odbačen, a talog resuspendovan sa 5-10 ml fiziološkog rastvora. Uzorak je potom centrifugiran 15 min na 2000 obrtaja i postupak ponovljen 2-3 puta dok talog ne pobeli. Nakon poslednjeg "ispiranja" supernatant je odbačen, a talogu dodato 3 ml pufera A, 50 mikrolitara 10% proteinaze K i 200 µl 10% SDS (Na-dodecilsulfat). Uzorak je resuspendovan i inkubiran preko noći na 37° C. Sledećeg dana je dodato 1 ml 6 M NaCl i centrifugirano 15 minuta na 3000 obrtaja. Supernatant je prenet u čistu epruvetu i centrifugiran 15 minuta na 4000 obrtaja. Supernatant je pažljivo prelišen u čistu graduisanu epruvetu, a zatim je dodat isti volumen izopropanola. Pažljivim mućkanjem izdvojen je beličasti končić DNK.

Končić se pažljivo pokupi staklenim štapićem i potopi 30 sekundi u 70% etanolu. DNK se osuši na vazduhu 30 sekundi, a zatim se rastvori u 300 mikrolitara TE pufera ili redestilovane vode.

Koncentracija DNK u uzorku merena je spektrofotometrom na 260 nm, a čistoća DNK određivana je na osnovu absorbance uzoraka na 260 i 280 nm.

Pufer za lizu :

- 0.32 M SAHAROZA
 - 10 mM TRIS HCl, pH 7.5
 - 1% TRITON x 100
 - 5 mM MgCl₂
- Autoklavirati i čuvati na +4 ° C.

Fizioloski pufer :

- 0.075 M NaCl
- 0.025 M EDTA ph 8

Pufer A :

- 10 mM TRIS HCl ph 8
- 400 ml NaCl

- 2 mM EDTA
- *TE pufer* :
- 10 mM TRIS HCl
- 1 mM EDTA

3.2.1.b. PCR metoda i njene modifikacije

Princip PCR reakcije je selektivno umnožavanje željenog regiona DNK pomoću termostabilne DNK polimeraze – Taq polimeraze. Za reakciju su neophodni specifični oligonukleotidni graničnici – prajmeri, koji su komplementarni terminalnim delovima analiziranog regiona, zatim dezoksiribonukleotid trifosfati (dNTP) kao prekursori za sintezu DNK, kao i joni Mg^{++} i pufer, koji katalizuju reakciju. Reakciona smeša prolazi kroz cikluse koji se sastoje od tri koraka: 1. DNK se denaturiše; 2. zatim se prajmeri komplementarno vezuju za granične sekvence regiona koji se umnožava i određuju početno mesto sinteze DNK ; i 3. Taq polimeraza ugrađuje dezoksiribonukleotid trifosfate i sintetiše nove lance DNK, koristeći stare lance kao matrice. Svaki korak se karakteriše određenom temperaturom i vremenom trajanja, a najspecifičnija faza je povezivanje prajmera. Broj kopija segmenta DNK između prajmera se uvećava po geometrijskoj progresiji i nakon 25-40 ciklusa segment je umnožen do 100.000 puta, pa se može videti nakon gel elektroforeze.

PCR reakcija u analizi polimorfizma MTHFR gena na 677 poziciji

U PCR reakciji u ovom ispitivanju korišćeni su prajmeri koji ograničavaju region od 198 bp (baznih parova) MTHFR gena u kome se nalazi polimorfno mesto 677C>T. Reakcionu smešu od 25 μ l su činili: DNK (c = 100 μ g/ μ l) – 2 μ l ; katalizator $MgCl_2$ (25 mM) – 1,5 μ l ; prajmer 1: 5' – TGA.AGG.AGA. AGG. TGT. CTG. CGG. GA-3' (c = 300 ng/ μ l) – 0,5 μ l ; prajmer 2: 5'AGG. ACG. GTG. CGG. TGA. GAG. TG-3' (c = 300 ng/ μ l) – 0,5 μ l ; dNTP (10mM) – 0,5 μ l ; 10xPCR pufer – 2,5 μ l i voda – do 21 μ l ; rastvor Taq polimeraze: 1 U enzima po reakciji i voda - do 4 μ l.

Uslovi PCR reakcije su bili :

- početna denaturacija DNK na 94° C, 5 min
- 40 ciklusa od tri koraka : 1. denaturacija DNK na 94° C, 1 min. ; 2. vezivanje prajmera na 60° C, 1 min. ; 3. ekstenzija prajmera i polimerizacija DNK na 72° C , 1 min.
- završna ekstenzija na 72° C, 5 min.

Provera PCR produkta, čija je veličina 198 bp, je vršena elektroforezom u 8% poliakrilamidnom (PAA) gelu.

Restrikcioni postupak u analizi polimorfizma MTHFR gena na poziciji 677

Restrikcija PCR produkata je vršena upotrebom restrikcionog enzima Hinf I koji je dobijen izolacijom iz *H. Influenzae*, koji prepoznaje niz nukleotida C T n A G, i vrši zasecanje lanca DNK na mestu T. U slučaju postojanja MTHFR C677T mutacije enzim prepoznaje navedeni niz nukleotida i iseca PCR produkt čime ga deli na dva fragmenta: od 175 bp i 23 bp. Restrikcija enzimom Hinf I se odvijala u restrikcionoj smeši koja sadrži : 10 μ l PCR produkta , 10 jedinica (1,25 μ l) enzima, 1,25 μ l 8X pufera H i vode do 15 μ l. Inkubacija je trajala 4 časa na 37⁰C. Analiza produkata digestije je usledila nakon elektroforeze u 12% PAA gelu, imajući u vidu da :

- Homozigoti genotipa MTHFR 677 CC (bez mutacije) poseduju jedan fragment 198 bp.
- Heterozigoti za mutaciju (MTHFR 677C>T), genotipa CT, poseduju tri fragmenta –198 bp, 175 bp i 23 bp. Najkraći fragment (23 bp) tokom elektroforeze izadje sa gela pa se ne uočava.

- Homozigoti za mutaciju (MTHFR 677 C> T), genotipa TT, poseduju dva fragmenta 175 bp i 23 bp, ali se kao i kod heterozigota fragment od 23 bp ne uočava na gelu.

PCR reakcija u analizi polimorfizma gena MTHFR na poziciji 1298

U PCR reakciji u ovom ispitivanju korišćeni su prajmeri koji ograničavaju region od 163 bp (baznih parova) MTHFR gena u kome se nalazi polimorfno mesto 1298A>C. Reakcionu smešu od 25 µl su činili : DNK (c = 100 µg/µl) – 2 µl ; katalizator MgCl₂ (25 mM) – 1,5 µl ; prajmer 1: 5' – CTT.TGG.GGA. GCT. GAA. GGA. CTA. CTA C-3' (c = 400 pmol/µl) – 0,5 µl ; prajmer 2: 5' CAC. TTT. GTG. ACC. ATT. CCG. GTT. TG-3' (c = 400 pmol/µl) – 0,5 µl ; dNTP (10mM) – 0,5 µl ; 10xPCR pufer – 2,5 µl i voda – do 21 µl ; rastvor Taq polimeraze : 1 U enzima po reakciji i voda - do 4 µl.

Uslovi PCR reakcije su bili :

- početna denaturacija DNK na 92° C, 2 min
- 35 ciklusa od tri koraka : 1. denaturacija DNK na 92° C, 1 min. ; 2. vezivanje prajmera na 51° C, 1 min. ; 3. ekstenzija prajmera i polimerizacija DNK na 72° C, 1 min.
- završna ekstenzija na 72° C, 7 min.

Provera PCR produkta, čija je veličina 163 bp, je vršena elektroforezom u 8% poliakrilamidnom (PAA) gelu.

Restrikcioni postupak u analizi polimorfizma MTHFR gena na 1298 poziciji

Restrikcija PCR produkata je vršena restrikcionim enzimom MboII koji je dobijen izolacijom iz *M. bovinum*. Enzim prepoznaje niz nukleotida GAAGA(N)₈, i vrši zasecanje lanca DNK na kraju ovog niza. U slučaju postojanja MTHFR A1298C mutacije enzim prepoznaje navedeni niz nukleotida i iseca PCR produkt čime ga deli na pet fragmenta : od 84 bp, 56 bp, 31bp, 30bp, 28bp i 18bp.

Restrikcija enzimom Mbo II se odvijala u restrikcionoj smeši koja sadrži: 10µl PCR produkta, 10 jedinica (2 µl) enzima, 1,5 µl 8X pufera H i vode do 15 µl. Inkubacija je trajala 4 časa na 37⁰C.

Analiza produkata digestije je usledila nakon elektroforeze u 12% PAA gelu, imajući u vidu da :

- Homozigoti genotipa MTHFR 1298 AA (bez mutacije) poseduju pet fragmenta. Fragment od 84 bp se seče na fragmente od 56 i 28 bp, tako da se uočavaju fragmenti od 56 bp, 31 bp, 30 bp, 28b i fragment od 18 bp koji kao najkraći tokom elektroforeze izadje sa gela pa se ne uočava.
- Heterozigoti za mutaciju (MTHFR 1298A>C), genotipa AC, poseduju četiri fragmenta – 84 bp, 56 bp, 31 bp i 30 bp.
- Homozigoti za mutaciju (MTHFR1298A >C), genotipa CC, poseduju četiri fragmenta- 84bp, 31bp, 30bp i 18 bp, ali se kao i kod homozigota fragment od 18 bp ne uočava na gelu.

PCR reakcija u analizi polimorfizma gena za IL6 -174G>C

Analiza genotipa polimorfizma IL6 -174G>C vršena je metodom alel-specifičnog PCR. Reakciona smesa za PCR imala je sastav: 10x PCR Buffer 2,5mcl, 10mM dNPP 1mcl, prajmeri po 0,5mcl tj. 20pmol, TaqPolymerase 0,5U, DNK 1mcl, reH₂O do 25mcl, dok su uslovi za amplifikaciju bili: 94 0 C/3min, 40 ciklusa (94 0 C/45sec, 59,5 0 C/45sec, 72 0 C/60sec), 72 0 C/5min. Sekvenca prajmera je bila: Fw1(C): 5'-CCCTAGTTGTGTCTTGCC-3', Fw1(G): 5'-CCCTAGTTGTGTCTTGCG-3' i Rv: 5'-GAGCTTCTTTTCGTTCC-3'. Za svaki uzorak radjene su dve odvojene PCR reakcije sa prajmerom Fw1(C) i Fw2(G). PCR produkti dužine 190bp vizuelizovani su nakon elektroforeze na 10% PAA gelu, bojenja etidijum bromidom i prosvetljavanja na UV transiluminatoru. Uočavanje PCR produkta ukazivalo je na postojanje alela koji je korišćen Fw prajmer.

PCR reakcija i restrikciona digestija u analizi polimorfizma gena za IL10 -1082G>A

Analiza genotipa polimorfizma IL10 -1082G>A vršena je metodom PCR/RFLPs. Reakciona smesa za PCR imala je sastav: 10x PCR Buffer 2,5mcl, 10mM dNPP 1mcl, prajmeri po 0,5mcl tj. 20pmol, Taq Plymerase 0,5U, DNK 1mcl, reH2O do 25mcl, dok su uslovi za amplifikaciju bili: 94⁰C/3min, 33 ciklusa (94⁰C/30sec, 54⁰C/35sec, 72⁰C/30sec), 72⁰C/5min. Sekvenca prajmera je bila: Fw: 5'-CCAAGACAACACTACTAAGGGCTCCTTT-3' i Rv: 5'-GCTTCTTATATGCTAGTCAGGTA-3'. PCR produkt dužine 377bp izlagan je digestiji restrikcionim enzimom XagI (MBI Fermentas, Lithuania). Restrikcioni fragmenti dužine 280+97bp ukazuju na postojanje A alela, dok fragmenti dužine 253+27bp ukazuju na postojanje G alela. Vizuelizacija restrikcioni fragmenta vršena je nakon elektroforeze na 10% PAA gelu, bojenja gela etidijum bromidom i prosvetljavanja na UV transiluminatoru.

PCR reakcija u analizi polimorfizma gena za IL10 -819T>C

Analiza genotipa polimorfizma IL10 -819T>C vršena je metodom alel-specifičnog PCR. Reakciona smesa za PCR imala je sastav: 10x PCR Buffer 2,5mcl, 10mM dNPP 1mcl, prajmeri po 0,5mcl tj. 20pmol, Taq Plymerase 0,5U, DNK 1mcl, reH2O do 25mcl, dok su uslovi za amplifikaciju bili: 94⁰C/3min, 33 ciklusa (94⁰C/45sec, 62⁰C/60sec, 72⁰C/60sec), 72⁰C/5min. Sekvenca prajmera je bila: Fw: 5'-TCATTCTATGTGCTGGAGATGG-3', Rv1(T): 5'-TGGGGGAAGTGGGTAAGAGT-3' i Rv2(C): 5'-TGGGGGAAGTGGGTAAGAGC-3'. Za svaki uzorak rađene su dve odvojene PCR reakcije sa prajmerom Rv1(T) i Rv2(C). PCR produkti dužine 209bp vizuelizovani su nakon elektroforeze na 10% PAA gelu, bojenja etidijum bromidom i prosvetljavanja na UV transiluminatoru. Uočavanje PCR produkta ukazivalo je na postojanje alela koji je korišćen Rv prajmer.

Analiza polimorfizma u genu za fetuin 742C>T i 766C>G

Analiza genotipova polimorfizama C742T i C766G u genu za fetuin A vršena je metodom PCR u realnom vremenu (real time PCR) uz upotrebu komercijalnih TaqMan SNP Genotyping eseja (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sastav reakcione smese je bio TaqMan SNP Genotyping esej 0,375mcl, TaqMan Universal Master Mix 7,5mcl, dH2O do 15mcl. Analize su vršene na aparatu 7500 RT-PCR System a obrada podataka je vršena pomoću inkorporiranog 7500 Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). TaqMan SNP Genotyping eseji sadrže specifične prajmere za dati region kao i dve oligonukletidne probe koje su specifične za određenu alelnu formu, a koje su obeležene različitim fluoroforima tj. fluorescentnim bojama (Vic i Fam). Kada se u toku reakcije odaje samo jedna boja, to ukazuje na homozigotnu konstituciju za odgovarajući alel, dok odavanje obe boje ukazuje na heterozigotan genotip.

3.2.2. Metode biohemijskih ispitivanja

Kod ispitivanih bolesnika uziman je po jedan uzorak krvi za određivanje određivanje sledećih parametara: kompletna krvna slika, serumske koncentracije kreatinina (s-kreatinin), mokraćne kiseline, albumina, pre-albumna, transferina, kalcijuma, fosfata, intaktnog paratireoidnog hormona (iPTH), holesterola, triglicerida, visoko-senzitivnog CRP (vs-CRP), serum amiloida A (SAA), fetuina-A, ukupnog homocisteina (uHc), interleukina-6 (IL-6) i interlukina-10.

Koncentracija uHcy u serumu je određivana HPLC metodom. Redukcija Hcy je vršena u cilju oslobađanja Hcy iz odgovarajućih disulfida i proteina, trialkilfosfinom. Derivatizacija tiolnih grupa Hcy i srodnih biogenih tiola, koja sledi, je vršena 4-(aminosulfonyl)-7-fluoro-2-oxa-1,3-diazolom (ABD-F). Dobijeni fluorescentni derivati su razdvajani HPLC tehnikom na "BIO-RAD" reverzno faznoj koloni, uz korišćenje izokratske mobilne faze istog proizvođača. Detekcija fluorescentnih derivata Hcy, glutathiona, cisteina, cisteinil-glicina i odgovarajućeg internog standarda je vršena pri ekscitaciji na 385 nm i emisiji na 515 nm. Kvantifikacija odgovarajućih pikova je vršena korišćenjem odgovarajućeg programa "BIO-RAD, CHROMLINE 4,20". Referentne vrednosti tHcy u serumu se kreću od 5-15 $\mu\text{mol/l}$.

Koncentracija interleukina u serumu

Nivoi IL-6 i IL10 u serumu su određivani visoko senzitivnim kolorimetrijskim sandwichELISA kitom (Human IL-6 Quantikine HS ELISA kit; R&D Systems, GmbH, Germany).

Koncentracija fetuina A u serumu određivana je metodom ELISA (Epitope Diagnostics, Inc., San Diego, California, USA).

Hematološki profil je određivan upotrebom LH 750 hematološkog analizatora (Beckman Coulter Inc., California, USA).

Koncentracija kreatinina u serumu je određena po modifikovanoj Jaffe-ovoj metodi, a brzina glomerulske filtracije je procenjena upotrebom Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) formule (Levey et al., 2006.).

Koncentracije holesterola u serumu je određivana enzimskom END POINT metodom iz uzorka seruma nakon enzimatske hidrolize i oksidacije. Referentna vrednost koncentracije ukupnog holesterola je 3,1-6,5mmol/L.

Koncentracija triglicerida u serumu je određivana GPO-PAP (glicerol-fosfat-oksidaza-paraaminofenazon) metodom korišćenjem RANDOX testa. Referentne koncentracije triglicerida u serumu su < 1,95 mmol/L.

Koncentracija ukupnih proteina i albumina u serumu je određivana automatizovanom enzimskom metodom.

Koncentracija folne kiseline u serumu je određivana metodom imunoenzimske jonske kaptaze. Molekuli folne kiseline se vezuju za antifolat antitela na polianjonskom nosaču. Pomenuti kompleks stupa u jonsku interakciju sa pozitivno naelektrisanom potkom od staklenih vlakana. Antianalički specifični konjugat obeležen alkalnom fosfatazom se vezuje za prethodno nagrađeni jonski par, a dalji proces je identičan kao kod određivanja vitamina B 12. Referentne vrednosti za koncentraciju folne kiseline su 7,02-28,01 $\mu\text{mol/L}$. Korišteni su kitovi firme "ABBOT".

Koncentracije visoko senzitivnog C reaktivnog proteina, amiloida A, pre-albumina i transferin u serumu su merene pomoću imunonefelometrijskog eseja (Dade-Behring, BN II, Marburg, Germany). Uzorak krvi je uziman kod bolesnika sa HBB, bolesnika na peritonemskoj dijalizi i bolesnika sa transplantiranim bubregom u danima kada su dolazili na redovnu kontrolu, a bolesnicima na hemodijalizi u danima u sredini nedelje pred hemodijalizu. U isto vreme uzimani su i uzorci krvi za genetičku analizu i čuvani na minus 20 stepeni Celzusa do momenta analize.

3.2.3. Metode procene kliničkih parametara

Procena stanja uhranjenosti

Za procenu stanja uhranjenosti korišćeni su indeks telesne mase i procenat telesne masti (PM). *Indeks telesne mase* (BMI- body mass index) je izračunat na osnovu visine, telesne težine prema poznatoj formuli (BMI= telesna masa u kg/ telesna visina u m². *Procenat telesne masti* (PM) je izračunat pomoću zbira četiri kožna nabora prema metodi Durnin i Wormslay.

Procena hipertenzije

Arterijska hipertenzija je dijagnostikovana kada je sistolni krvni pritisak ≥ 140 mmHg ili dijastolni pritisak ≥ 90 mmHg, ili ako je prepisivana antihipertenzivna terapija. Srednji arterijski pritisak (SAP) je računat kao dijastolni krvni pritisak plus 1/3 pulsnoeg pritiska.

3.2.4. Metode procene ranih i kasnih pokazatelja ateroskleroze

3.2.4.a. Duplex-scan karotidnih arterija

Izraženost ateroskleroze se procenjivala na obe karotidne arterije merenjem debljine intima medije i prisustva aterosklerotičnog plaka.

Prilikom merenja bolesnici su bili u ležećem položaju sa ekstenzijom vrata i rotacijom glave na suprotnu stranu od pregledane arterije. Za ovaj pregled je korišćena linearna sonda rezolucije od 7.5 MHz (PLE-705S). Karotidne arterije su pregledane iz dva longitudinalna i jednog poprečnog preseka. Na 2 cm od grananja zajedničke karotidne arterije mereni su (Stefan Rosfors 1998) :

- Prečnik arterije u sistoli i dijastoli,
- Debljina intima medije na istom mestu.
- Debljina plaka i procenat suženja lumena.

Za merenje prečnika arterije polazno mesto je bio prvi eho koji odgovara prednjem zidu arterije, a mesto pozicioniranja drugog kalipera je bio drugi eho koji odgovara početku zadnjeg zida arterije. Korišten je b-mod sa uvećanjem regiona (RES funkcija aparata) tri puta uzastopno, a iz tri ponovljena merenja je izračunat prosek koji je korišćen za analize.

Debljina intima medije je merena na istom mestu gde i prečnik arterije, od prvog intraluminalnog ehoa do zadnjeg zida arterije i izražena je u milimetrima. Na osnovu procene prisustva plakova i postojanja stenoze merenog krvnog suda određivan je plak-skor koji je gradiran od 0-3 (0-nema plakova, 1-minimalna stenoza <30%, 2- umerena stenoza 30-50%, i 3- teška stenoza >50%).

3.2.4.b. *Skor kalcifikacija koronarnih arterija*

Skor kalcifikacija koronarnih arterijaje određivan upotrebom multi-detector row spiral computed tomography (MSCT) (General Electric Medical System, USA) pri sledećim parametrim: 64 preseka sa 912 detektora, 0.625 mm rastojanja između preseka, 0.35s vreme rotacije i tube current of 800 mA at 120 kV. Podaci su dobijeni tokom dijastolne faze srčanog ciklusa. Skor kalcifikacija kornarnih arterija je računat iz formule bazirane na merenju totalne zapremine i polja kalcifikovanih lezija, kao i srednjeg i maksimalnog denziteta. Individulani skor kalcifikacija je računat za glavnu levu koronarnu arteriju, nishodnu granu leve koronarne arterije, cirkumfleksnu granu leve koronarne arterije i desnu koronarnu arteriju. Ovi skorovi su dodavani da bi se dobio totalni skorkalcifikacija. Finalni skor je izražen u modifikovanim Agatston jedinicama (AGATSTON et al.,1990). Skor kalci-fikacija je izabran prema poslednjim vodičima American College of Cardiology and the American So-ciety of Nuclear Cardiology, endorsed by the American Heart Association (ACC/ASNC) (GREEN-LAND et al.,2007).

3.2.5. **Statističke metode:**

U stasisičkoj obradi podataka korištene su deskriptivne statističke metode, metode za testiranje statističkih hipoteza i metode za ispitivanje zavisnosti. U analizi primarnih podtaka kao deskriptivne statističke metode korištene su mere centralne tendencije (aritmetička sredina, medijana, mod), mere varijabiliteta (standardna devijacija) i relativni brojevi (pokazatelji strukture). Za testiranje statističkih hipoteza korišten je t-test, hi-kvadrat test i analiza varijanse, a od metoda za analizu zavisnosti koeficijent linearne korelacije i regresiona analiza. Sve statističke hipoteze su testirane na nivou statističke značajnosti (alfa nivo) od 0,05.

4.REZULTATI

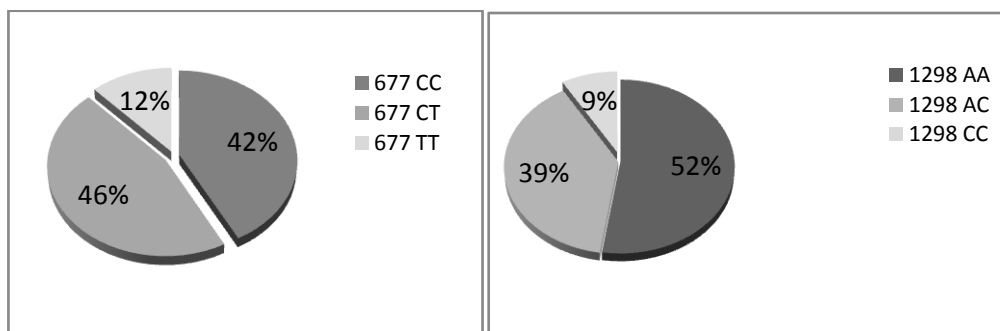
4.1. Učestalost polimorfizama u genu za MTHFR, interleukin 6, interleukin 10 i fetuin-A bolesnika u hroničnoj ili terminalnoj bubrežnoj slabosti koji se leče hemo ili peritoneumskom dijalizom i kod bolesnika sa transplantiranim bubregom

4.1.1. Učestalost 677 C>T i 1298A>C alela u genu za MTHFR kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću lečenih hemodijalizama, sa transplantiranim bubregom i zdravih osoba

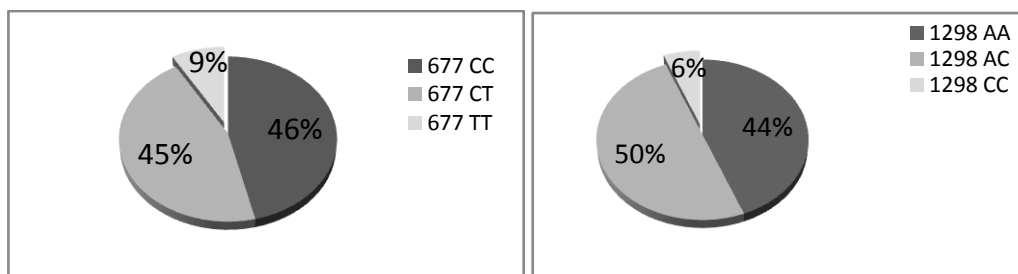
Kod 82 bolesnika lečenih ponavljanim hemodijalizama, 106 bolesnika sa transplantiranim bubregom i 28 zdravih osoba ispitana je učestalost 677 C>T i 1298A>C alela u genu za MTHFR i distribucija bolesnika sa određenim genotipovima je prikazana na grafikonima 1 a i 1b, 2a i 2b i 3a i 3b.

Odredjivanje MTHFR 677 C>T kod bolesnika na hemodijalizi je pokazalo da je učestalost TT genotipa je bila 12%, a CT genotipa 42%. Kod bolesnika sa transplantiranim bubregom učestalost MTHFR 677 TT genotipa je bila 9%, a CT genotipa 44%, dok je kod zdravih osoba učestalost TT genotipa bila 7%, a CT genotipa 54%. Ukupna učestalost MTHFR 677 TT genotipa kod bolesnika lečenih ponavljanim hemodijalizama i kod bolesnika sa transplantiranim bubregom iznosila je 11,3%, a CT genotipa 47,5%.

Između grupa nije postojala statistički značajna razlika po distribuciji bolesnika za MTHFR 677 C>T alele.

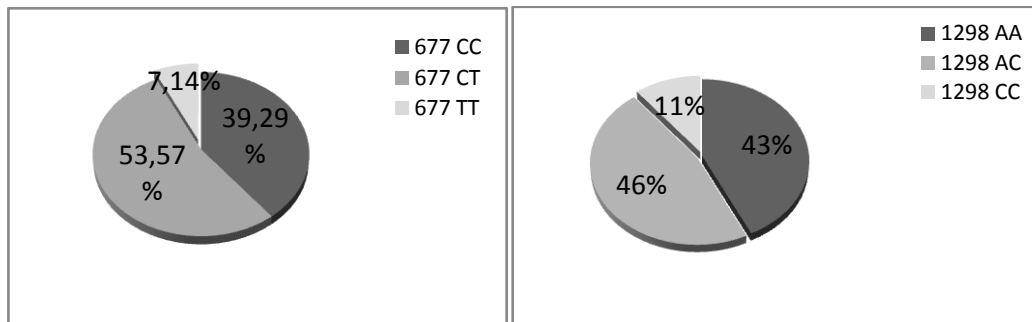


Grafikon 1a. Učestalost 677 C>T alela **Grafikon 1b.** Učestalost 1298 A>C alela kod bolesnika lečenih hemodijalizama



Grafikon 2a. Učestalost 677 C>T alela **Grafikon 2b.** Učestalost 1298 A>C kod bolesnika sa transplantiranim bubregom

Određivanje MTHFR 1298 A>C alela kod bolesnika na hemodijalizi je pokazala da učestalost CC genotipa je bila 9%, a AC genotipa 39%, kod bolesnika sa transplantiranim bubregom učestalost CC genotipa je bila 6% a AC genotipa 50% dok je kod zdravih osoba učestalost CC genotipa bila 11% a AC genotipa 46%. Ukupna učestalost kod bolesnika na hemodijalizi i sa transplantiranim bubregom MTHFR 1298 CC genotipa je bila 7,6%, a AC genotipa 44,8%, dok je kod zdravih osoba učestalost CC genotipa bila 11%, a AC genotipa 46%. Između grupa nije postojala statistički značajna razlika po distribuciji bolesnika za MTHF 1298 A>C alele.

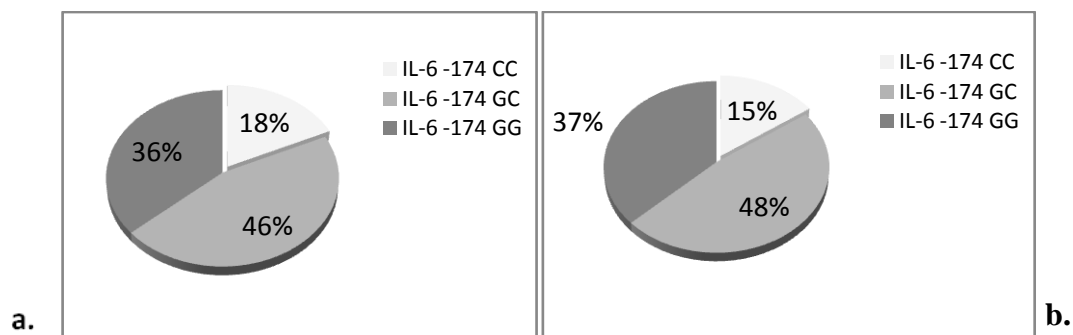


Grafikon 3a. Učestalost 677 C>T alela **Grafikon 3b.** Učestalost 1298 A>C alela zdravih osoba

4.1.2. Učestalost -174 G>C alela u genu za interleukin 6 i -1082 G>A i -819 T>C alela u genu za interleukin 10 kod bolesnika lečenih hemo i peritoneumskom dijalizom

Kod 77 bolesnika lečenih ponavljanim hemodijalizama i kod 51 bolesnika na peritoneumskoj dijalizi ispitana je učestalost -174 G>C alela u genu za IL-6 kao i -1082 G>A i -819 T>C alela u genu za IL-10. Distribucija bolesnika sa određenim genotipovima je prikazana na grafikonima 4 a i b, 5a i b kao i 6a i b. Određivanje IL-6 -174 G>C alela kod bolesnika na hemodijalizi je pokazalo učestalost GG genotipa 36%, GC 46%, a CC 18%, kod bolesnika na peritoneumskoj dijalizi GG 37%, GC 44% i CC 15%, dok je od svih ispitanih bolesnika 36% imalo GG genotip, 48% GC genotip, a GG genotip 16%.

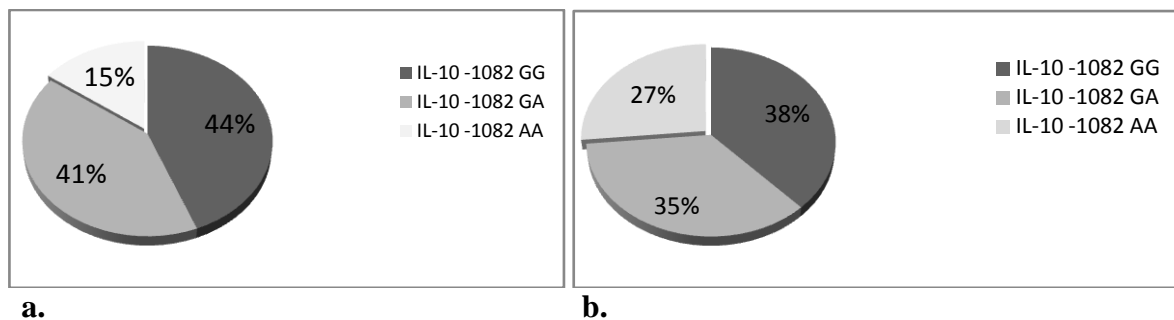
Između grupa nije postojala statistički značajna razlika po distribuciji bolesnika za IL-6 -174 G>C alele (p=0,95).



Grafikon 4. Učestalost -174 G>C alela u genu za IL-6 kod bolesnika lečenih a. ponavljanim hemodijalizama i b. peritoneumskom dijalizom

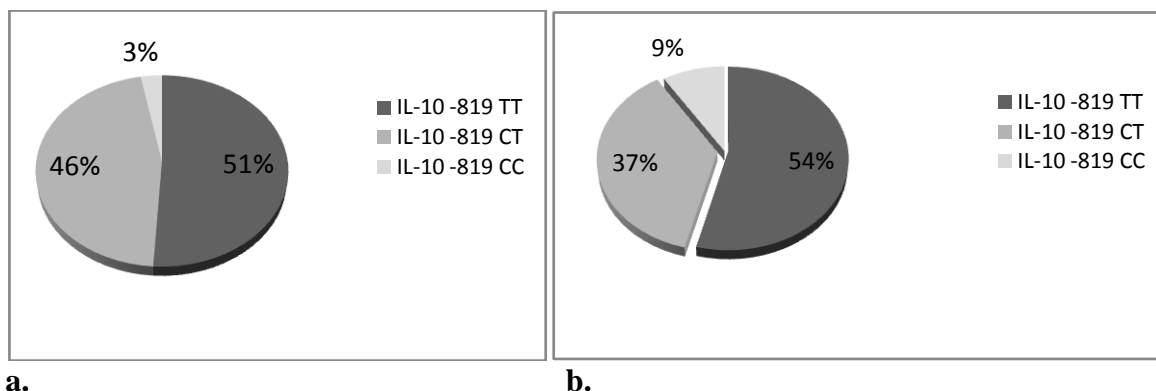
Određivanje IL-10 -1082 G>A alela kod bolesnika na hemodijalizi je pokazala učestalost GG genotipa 44%, a GA genotipa 41% i AA genotipa 15%, a kod bolesnika na peritoneumskoj dijalizi učestalost GG genotipa je bila 38%, GA genotipa 35% i AA 27%. Kod svih ispitanih bolesnika učestalost IL-10 -1082 GG genotipa iznosila je 40,4%, GA 40,4% i AA 19,2%.

Između grupa nije postojala statistički značajna razlika po distribuciji bolesnika za IL-10 -1082 G>A allele (p 0,42).



Grafikon 5. Učestalost -1082 G>A alela u genu za IL-10 kod bolesnika lečenih a. ponavljanim hemodijalizama i b. peritoneumskom dijalizom

Određivanje IL-10 -819 T>C alela kod bolesnika na hemodijalizi je pokazala učestalost TT genotipa 51%, TC genotipa 46 %, a CC genotipa 3%. Kod bolesnika na peritoneumskoj dijalizi učestalost IL-10 -819 TT genotipa je bila 54 %, TC genotipa 37% i CC genotipa 9%. Kod svih ispitanih bolesnika učestalost IL-10 -819 genotipa TT je iznosila 50%, TC 45,7% i CC 4,3%. Između grupa nije postojala statistički značajna razlika po distribuciji bolesnika za -819T>C allele (p=0,61).



Grafikon 6. Učestalost -819 T>C alela u genu za IL-10 kod bolesnika lečenih a. ponavljanim hemodijalizama i b. peritoneumskom dijalizom

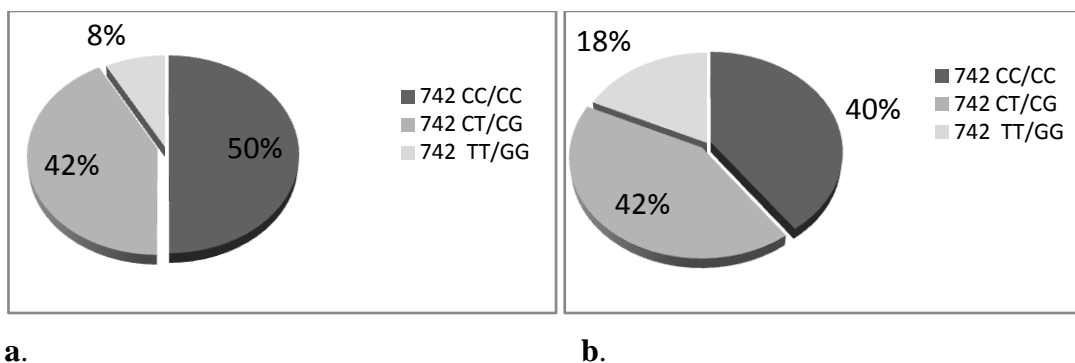
Distribucija genotipova kod svih ispitanika se razlikovala između -819T>C i -1082 G>A (p=0,001).

4.1.3. Učestalost 742 C>T i 766 C>G alela u genu za fetuin kod bolesnika sa hroničnom bubrežnom slabošću i sa transplantiranim bubregom

Kod 46 bolesnika sa HBS stadijum 2-5 koji nisu zahtevali dijalizu kao i kod 42 bolesnika sa transplantiranim bubregom ispitana je učestalost 742 C>T alela kao i 766 C>G alela u genu za fe-

tuin A. Ispitanici sa alelom 742T su u isto vreme imali i alel 766G. Na grafikonu 7 je prikazana distribucija bolesnika prema učestalosti 677 C>T odnosno 766 C>G alela u genu za fetuin A.

Određivanje učestalosti je pokazalo da je kod bolesnika sa HBS bilo 8% TT/GG kombinovanih genotipova, 42% CT/CG i 50% CC/CC, kod Tx 18% TT/GG, 42% CT/CG i 40% CC/CC, a kod svih bolesnika CC/CC 44.3%, CT/CG 42.3% i TT/GG 13.4% .



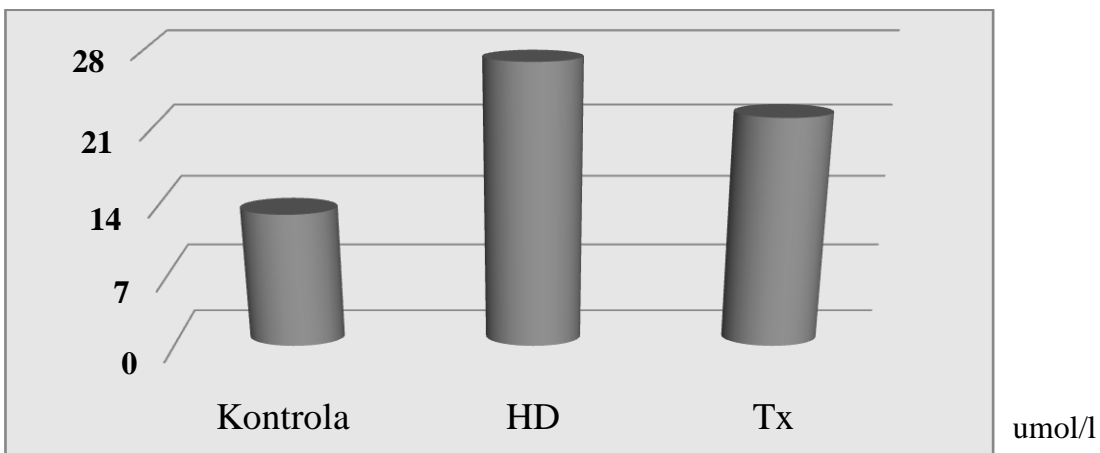
Grafikon 7. Učestalost 742 C>T odnosno 766 C>G alela u genu za fetuin A kod a. bolesnika HBS stadijum 2-5 i kod b. transplantiranih bolesnika.

4.2. Utvrđivanje povezanosti koncentracije homocisteina, interleukina 6, interleukina 10 i fetuina-A sa određenim genotipovima kod bolesnika u hroničnoj ili terminalnoj bubrežnoj slabosti koji se leče hemo ili peritoneumskom dijalizom i kod bolesnika sa transplantiranim bubregom

4.2.1. Povezanost koncentracije homocisteina sa MTHFR genotipovima 677 C>T i 1298 A>C kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću lečenih hemodijalizama, sa transplantiranim bubregom i zdravih osoba

Nivo ukupnog Hcy u krvi određivan je u grupi bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću lečenih ponavljanim hemodijalizama (HD), kod bolesnika sa transplantiranim bubregom (Tx) i kod kontrolne grupe zdravih osoba i rezultati su prikazani na Grafikonu 8.

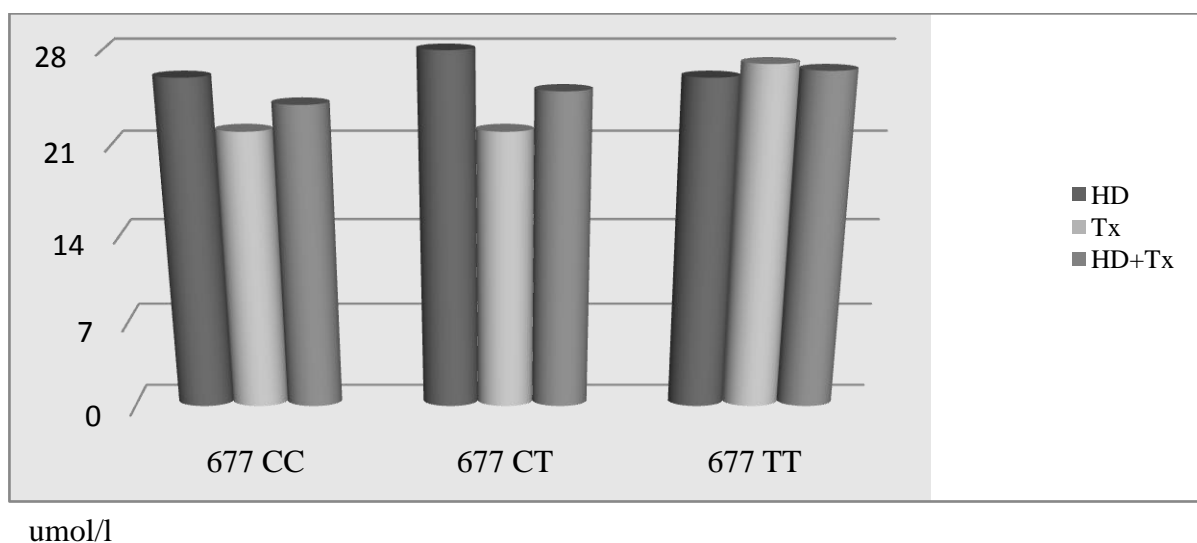
Na grafikonu 8 se može videti da su značajno najviše vrednosti bile u HD grupi ($p=0,001$) a obe ispitivane grupe bolesnika imale značano više vrednosti uHcy u krvi u odnosu na kontrolnu grupu ($p=0,001$).



Grafikon 8. Koncentracija ukupnog Hcy u krvi grupi bolesnika lečenih ponavljanim hemodijalizma (HD), kod bolesnika sa transplantiranim bubregom (Tx) i kod kontrolne grupe zdravih osoba

Na Grafikonu 9 je su prikazane koncentracije uHcy u krvi prema različitim MTHFR 677 C>T genotipovima u grupi bolesnika lečenih ponavljanim hemodijalizma (HD), kod bolesnika sa transplantiranim bubregom (Tx) i kod svih ispitanih bolesnika.

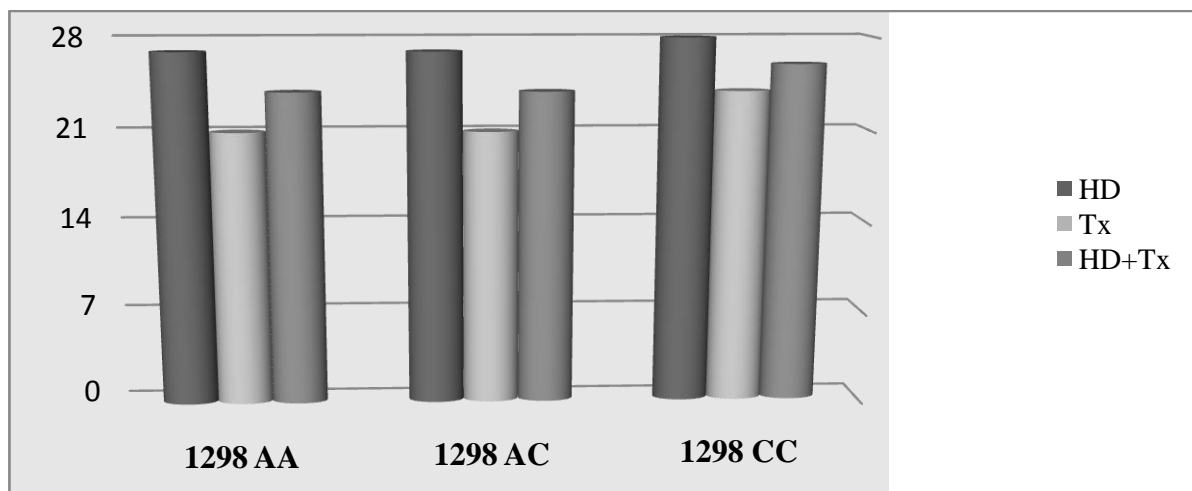
U HD grupi najviše vrednosti uHcy su bile kod bolesnika sa MTHFR 677 CT genotipom ali bez statistički značajne razlike, a u Tx grupi kod bolesnika sa 677 TT genotipom takođe bez statistički značajne razlike. Kod svih ispitanih bolesnika nije bilo značajne razlike u koncentraciji Hcy prema različitim MTHFR 677 genotipovima ($p=0,55$).



Grafikon 9. Koncentracija ukupnog Hcy u krvi prema različitim MTHFR 677 C>T genotipovima u grupi bolesnika lečenih ponavljanim hemodijalizma (HD), kod bolesnika sa transplantiranim bubregom (Tx) i kod svih ispitanih bolesnika

Na Grafikonu 10 su prikazane koncentracije uHcy u krvi prema različitim MTHFR 1298 A>C genotipovima u grupi bolesnika lečenih ponavljanim hemodijalizma (HD), kod bolesnika sa transplantiranim bubregom (Tx) i kod svih ispitanih bolesnika.

Kod obe grupe ispitivanih bolesnika kao i kod svih ispitanih bolesnika koncentracija uHcy je bila najviša bolesnika sa MTHFR 1298 CC genotipom ali bez statistički značajne razlike ($p=0,46$).



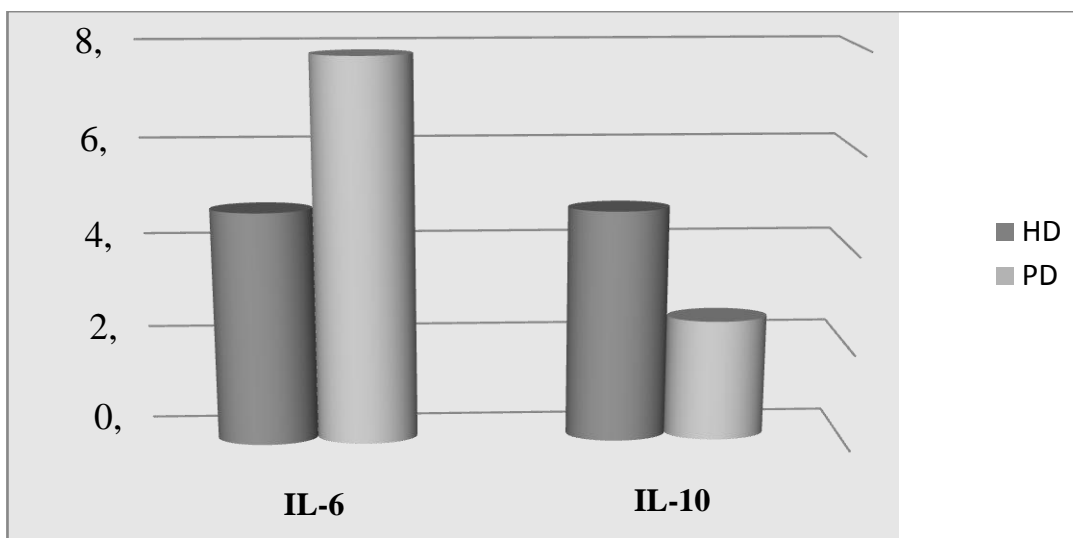
umol/l

Grafikon 10. Koncentracija ukupnog Hcy u krvi prema različitim MTHFR 1298 A>C genotipovima u grupi bolesnika lečenih ponavljanim hemodijalizma (HD), kod bolesnika sa transplantiranim bubregom (Tx) i kod svih bolesnika

4.2.2. Povezanost koncentracije interleukina 6 sa genotipovima -174 G>C i interleukina 10 sa genotipovima -1082 G>A i -819 T>C kod bolesnika lečenih hemo i peritoneumskom dijalizom

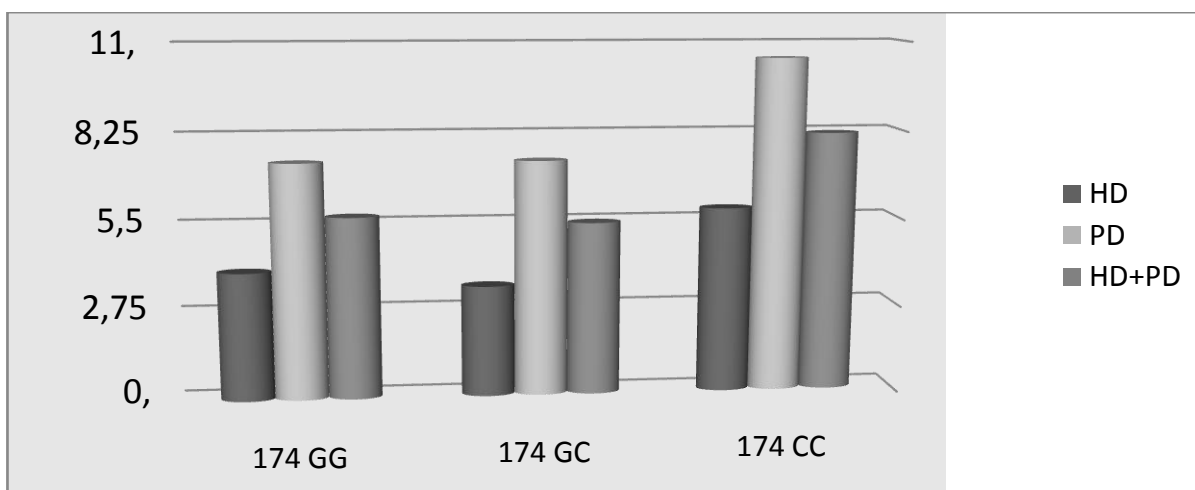
Koncentracija IL-6 i IL-10 je određena kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću koji se leče hemo (HD) ili peritoneumskom dijalizom (PD) i rezultati su prikazani na na grafikonu 11.

Kako se na grafikonu može videti koncentracije IL-6 su bile statistički značajno više u PD ($p=0,07$) nego HD grupi bolesnika dok nije postojala značajna razlika u vrednostima IL-10.



Grafikon 11. Koncentracija IL-6 i IL-10 u krvi bolesnika lečenih hemo ili peritoneumskom dijalizom

Na grafikonu 12. su prikazane koncentracije IL-6 u krvi prema različitim IL-6 -174 G>C genotipovima kod bolesnika na hemo ili peritoneumskoj dijalizi i kod svih ispitanih bolesnika.



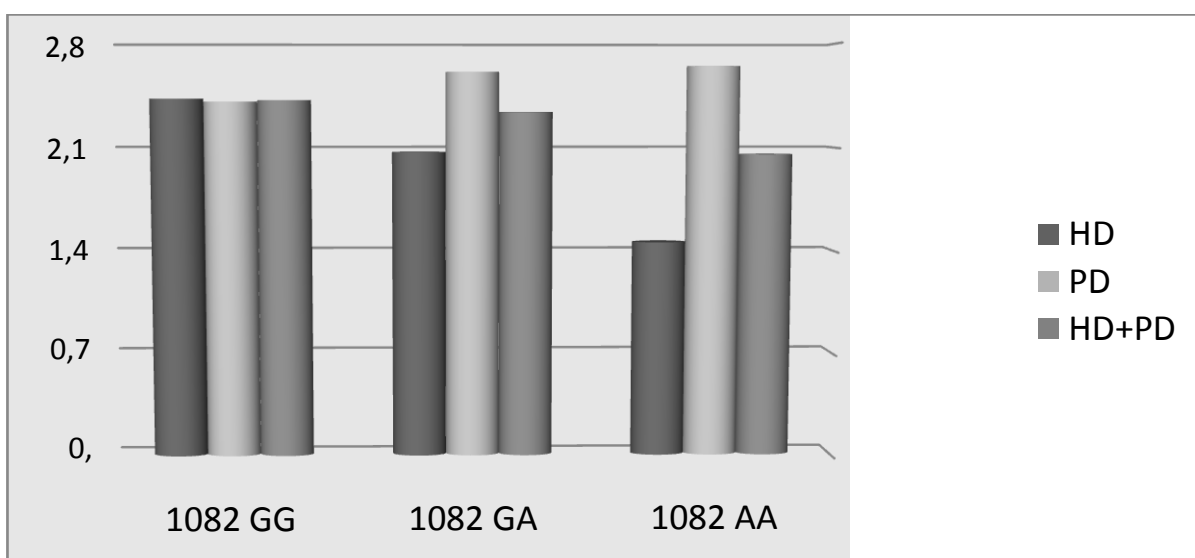
pg/ml

Grafikon 12. Koncentracije IL-6 u krvi prema različitim IL-6 -174 G>C genotipovima kod bolesnika na hemo ili peritoneumskoj dijalizi i kod svih ispitanih bolesnika.

Na grafikonu se može videti da se koncentracija IL-6 kod HD bolesnika nije značajno razlikovala prema IL-6 -174 G>C genotipovima dok je kod PD bolesnika ona bila najviša kod bolesnika sa IL-6 -174 CC genotipom kao kod svih ispitanih bolesnika ($p=0,43$).

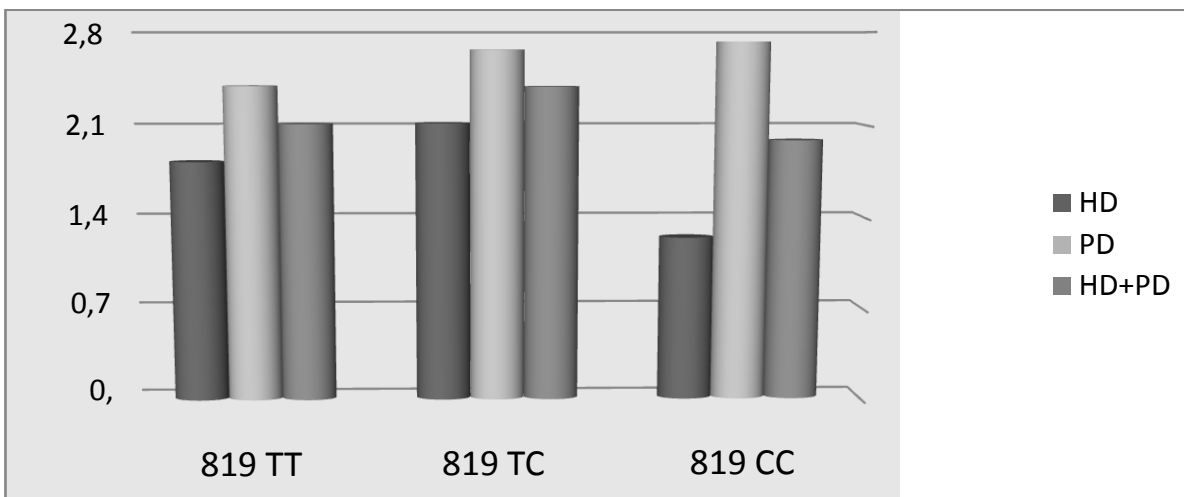
Na grafikonu 13. su prikazane koncentracije IL-10 u krvi prema različitim IL-10 -1082 G>A genotipovima a na grafikonu 14. prema različitim IL-10 -819T>C genotipovima kod bolesnika na hemo ili peritoneumskoj dijalizi i kod svih ispitanih bolesnika.

Na oba grafikona se može videti da su vrednosti IL-10 kod svih ispitanih bolesnika bile najniže kod bolesnika IL-10 -1082 AA genotipom odnosno -819 CC genotipom ali bez statistički značajne razlike.



pg/ml

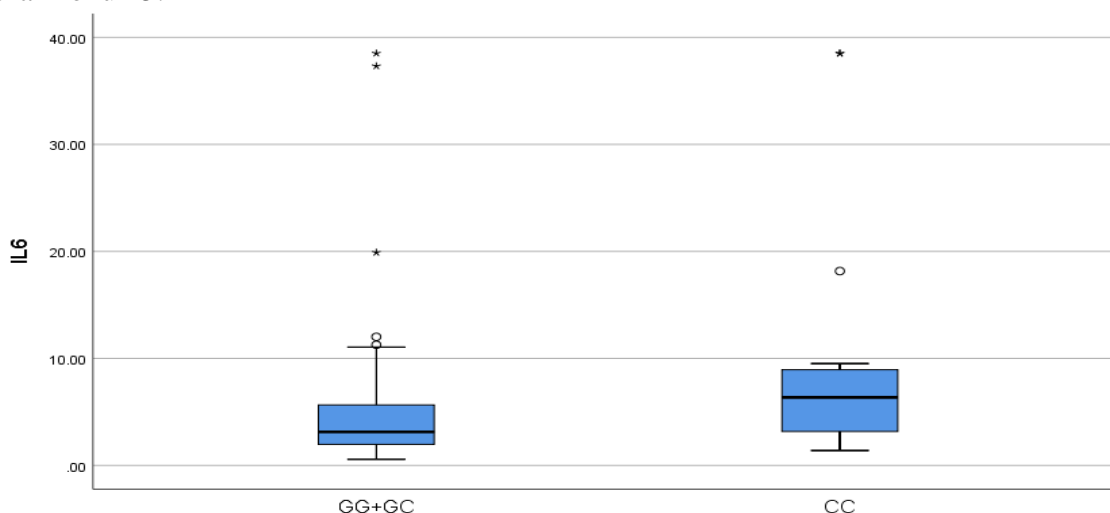
Grafikon 13. Koncentracije IL-10 u krvi prema različitim IL-10 -1082 G>A genotipovima kod bolesnika na hemo ili peritoneumskoj dijalizi i kod svih ispitanih bolesnika.



pg/ml

Grafikon 14. Koncentracije IL-10 u krvi prema različitim IL-10 -819 T>C genotipovima kod bolesnika na hemo ili peritoneumskoj dijalizi i kod svih ispitanih bolesnika.

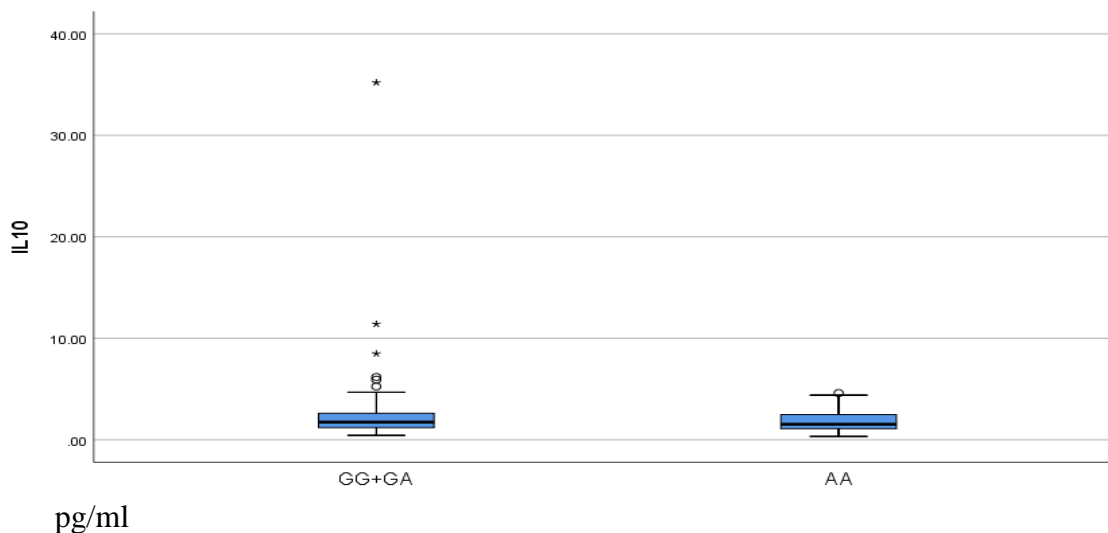
Medijana i opseg IL-6 kod ispitanika sa GG+GC genotipom iznosila je 3,1 pg/ml (0,6-38,5), dok je kod CC genotipa iznosila 6,4 pg/ml (1,4-38,5), što je statistički značajna razlika ($U=387,0$; $p=0,030$). Ispitanici sa CC genotipom imali su značajno više vrednosti IL-6 što je prikazano na Grafikonu 15.



pg/ml

Grafikon 15. Koncentracije IL-6 u krvi prema genotipovima IL-6 -174 GG+GC u poredjenju sa genotipovima CC

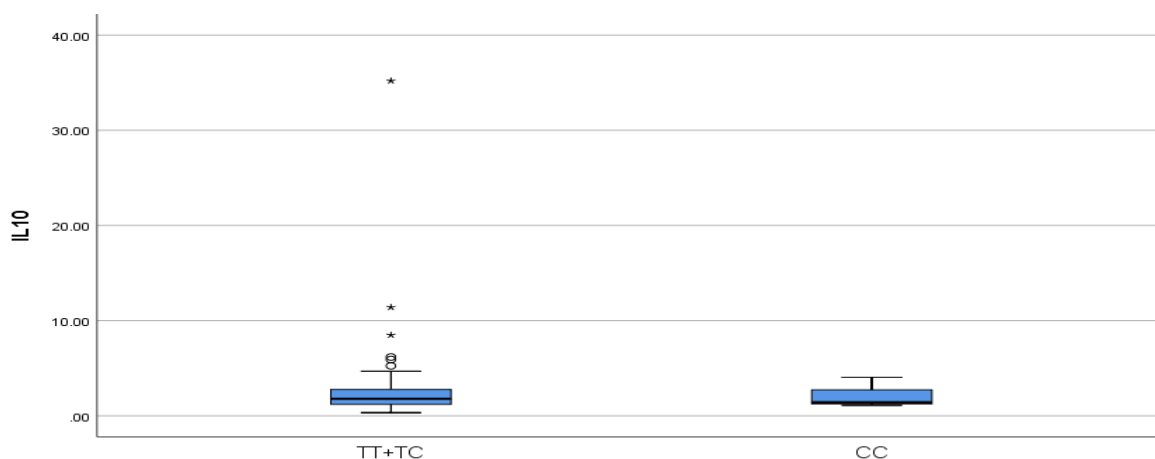
Medijana i opseg IL10 kod ispitanika sa IL-10 -1082 GG+GA genotipom iznosila je 1,74 pg/ml (0,32-35,2), dok je kod AA genotipa iznosila 1,41 pg/ml (1,09-4,05), što nije statistički značajna razlika ($U=718,0$; $p=0,544$) prikazano na Grafikonu 16.



Grafikon 16. Koncentracije IL-10 u krvi prema genotipovima IL-10 -1082 GG+GA u poredjenju sa genotipovima AA

Medijana i opseg IL10 kod ispitanika sa IL-10-819 TT+TC genotipom iznosila je 1,78 pg/ml (0,32-35,2), dok je kod CC genotipa iznosila 1,41 pg/ml(1,09-4,05), što nije statistički značajna razlika (U=150,5; p=0,649) prikazano na Grafikonu 17.

Ispitanici sa IL-10 -819 TT+TC genotipom su imali slične vrednosti IL10 u krvi kao i genotip CC što je prikazano na Grafikonu 17.

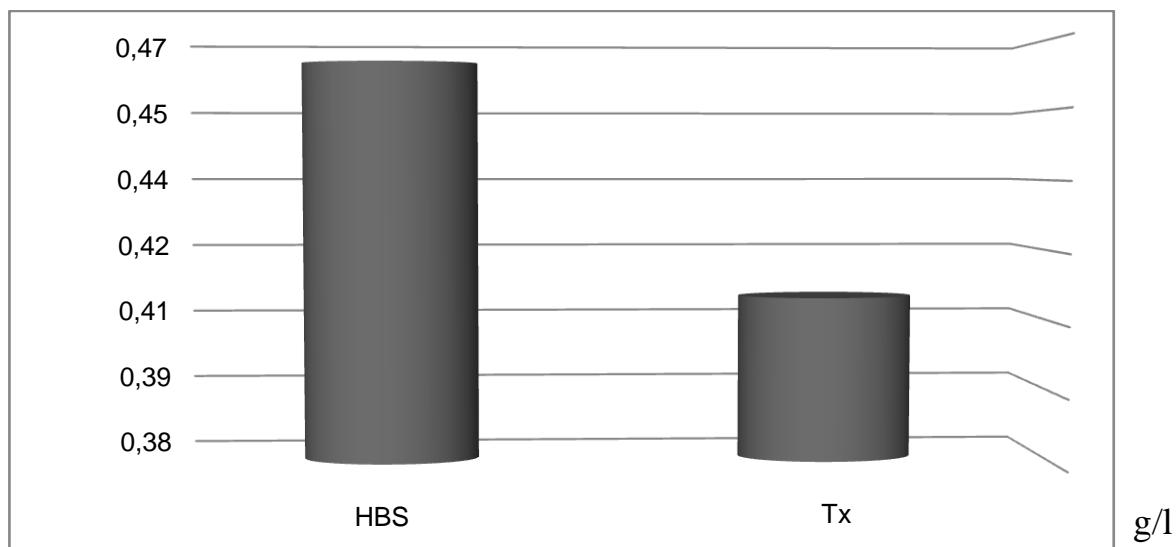


Grafikon 17. Koncentracije IL-10 u krvi prema genotipovima IL-10 -819 TT+CC u poredjenju sa genotipovima CC

4.2.3. Povezanost koncentracije fetuina A sa genotipovima 742 C>T i 766 C>G kod bolesnika sa hroničnom bubrežnom slabošću i sa transplantiranim bubregom

Kod bolesnika sa hroničnom bubrežnom slabošću (HBS) stadijum 2-5 koji nisu zahtevali dijalizu kao i bolesnika sa transplantiranim bubregom (Tx) određena je koncentracija fetuina A u krvi i rezultati su prikazani na Grafikonu 18.

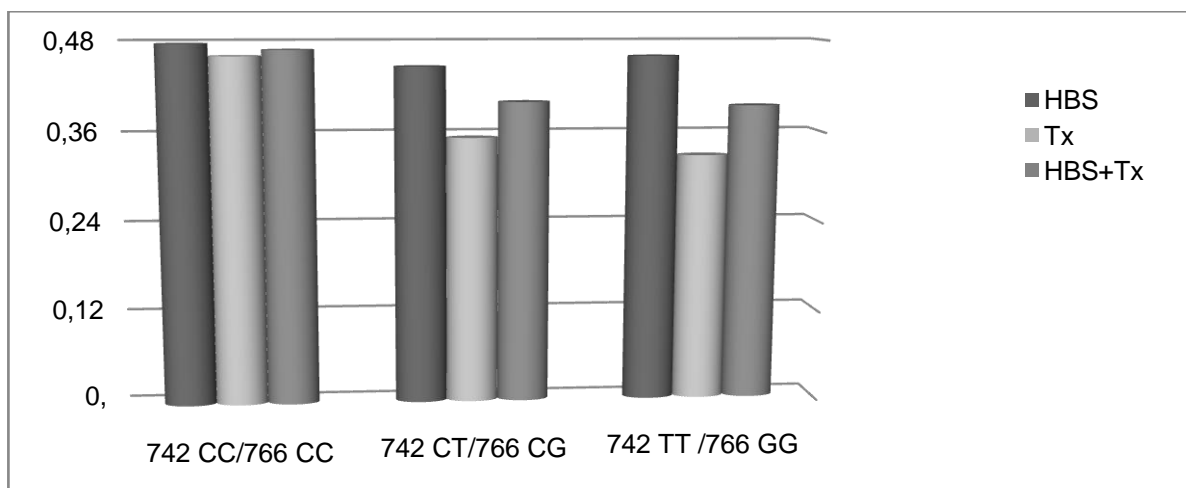
Kako se na grafikonu može uočiti Tx bolesnici su imali značajno nižu koncentraciju fetuina A u krvi u poredjenju sa HBS bolesnicima (p=0,04).



Grafikon 18. Koncentracija fetuina A u krvi bolesnika sa hroničnom bubrežnom slabošću (HBS) stadijum 2-5 koji nisu zahtevali dijalizu kao i bolesnika sa transplantiranim bubregom (Tx)

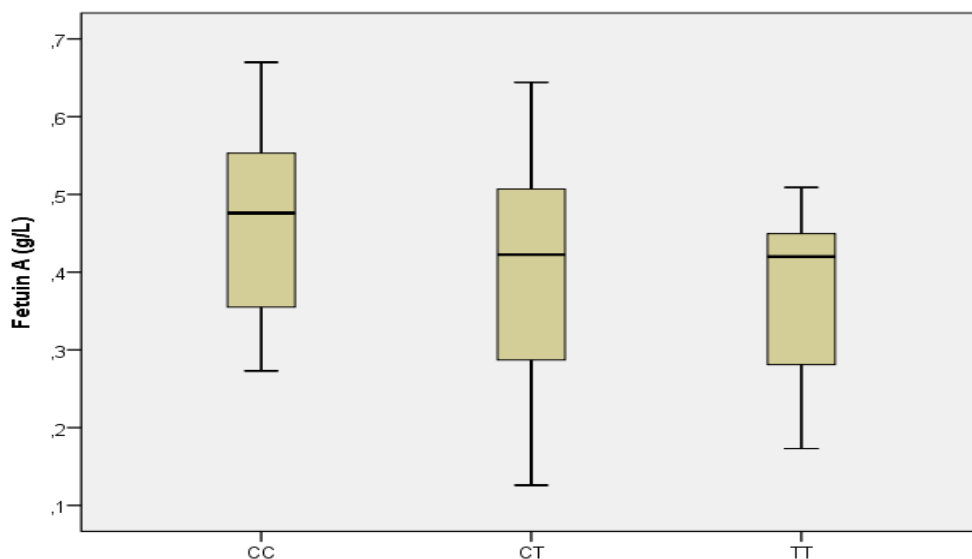
Na grafikonu 19. su prikazane koncentracije fetuina A u krvi prema različitim fetuin-A 766 C>T genotipovima. Kod bolesnika sa hroničnom bubrežnom slabošću stadijum 2-5 koji nisu zahtevali dijalizu, bolesnika sa transplantiranim bubregom kao i kod svih ispitanih bolesnika. Već je napomenuto da su ispitanici sa alelom 742T su u isto vreme imali i alel 766G.

Na grafikonu 20. se može videti da su svi ispitanici bolesnici sa fetuin 742 TT, odnosno 766 GG genotipom imali značajno nižu koncentraciju fetuina A u krvi u odnosu na bolesnike sa ostalim genotipovima ($p= 0,02$).



g/l

Grafikon 19. Koncentracija fetuina A u krvi bolesnika sa različitim fetuin 742 C>T i 766 C>G genotipovima kod bolesnika sa hroničnom bubrežnom slabošću stadijum 2-5 koji nisu zahtevali dijalizu, bolesnika sa transplantiranim bubregom i kod svih ispitanih bolesnika.



Grafikon 20. Koncentracija fetuina A u krvi sa različitim fetuin A 742 C>T genotipovima kod svih ispitanih bolesnika

Na Tabeli 3. je prikazana distribucija genotipova u odnosu na cut off vrednosti fetuina A za nastanak kalcifikacija na koronarnim arterijama koja je iznosila 0.437 g/L.

Tabela 3. Fetuin A 742C>T distribucija genotipova između bolesnika prema koncentraciji fetuina A u serumu.

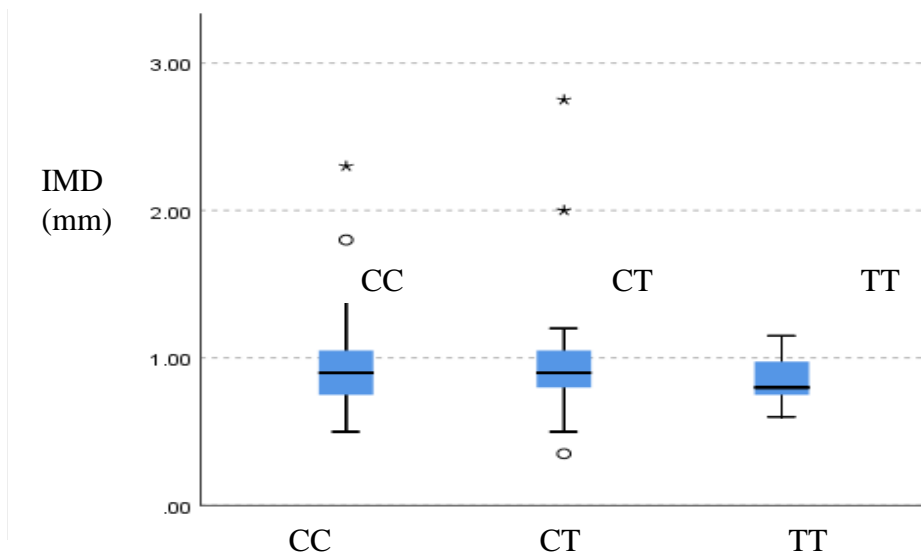
Fetuin 742 C>T	fetuin \leq 0.437 g/L	fetuin $>$ 0.437 g/L
CC genotip N (%)	13 (30.2)	27 (60)
CT genotip N (%)	22 (51.2)	14 (31.1)
TT genotip N (%)	8(18.6)	4 (8.9)

4.3.Ispitivanje udruženosti različitih pojediničanih ili kombinovanih genotipova sa ranim i kasnim pokazateljima arteroskleroze kao i oboljevanja od kardiovaskularnih bolesti

4.3.1. Povezanost homocisteina, MTHFR 677 C>T i MTHFR 1298 A>C genotipova sa debljinom intime i intimalnim plakovima

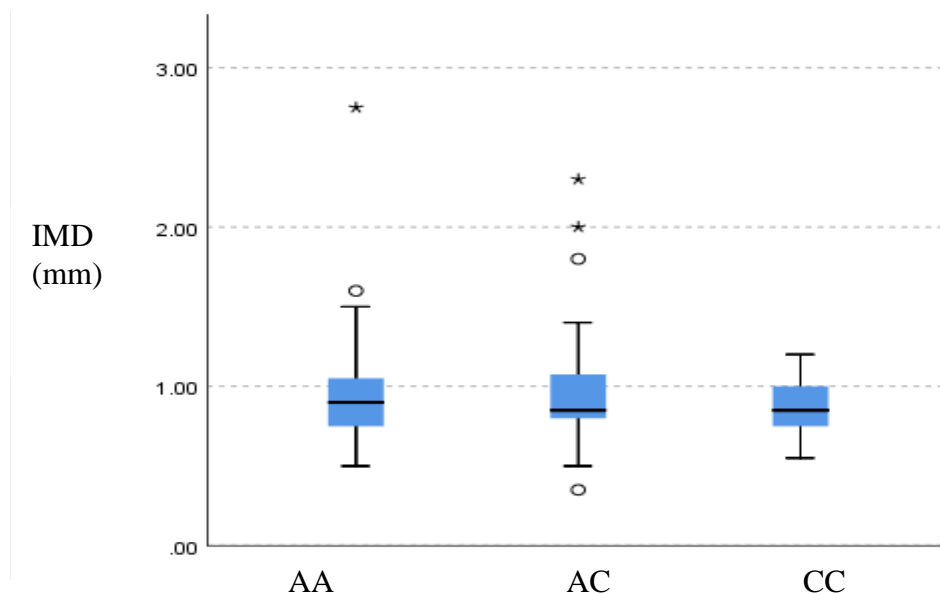
U grupi bolesnika lečenih ponavljanim hemodijalizama i bolesnika sa transplantiranim bubregom određivana je debljina intime medije u mm na karotidnim arterijama i izraženost intimalnih plakova (skor 0-3) i ispitivana je njihova povezanost sa Hcy i MTHFR 677 C>T i MTHFR 1298 A>C genotipova ali i sa drugim parametrima kao što su starost, pol, BMI, dužina trajanja HD, odnosno vreme od transplantacije, kao i koncentracijom C-reaktivnog proteina (CRP), holesterola, kreatinina u serumu.

Mediana i opseg debljine intima medije karotidnih arterija u genotipu MTHFR 677CC iznosila je 0,9 (0,5-2,3), genotipu CT 0,9 (0,35-2,75) i genotipu TT 0,8 (0,6-1,15) mm. Na grafikonu 21 može videti da među MTHFR 677 C>T genotipovima nije bilo statistički značajne razlike u debljini intima medije karotidnih arterija ($p=0,637$).



Grafikon 21. Debljina intime karotidnih arterija (IMD) u različitim MTHFR 677C>T genotipovima

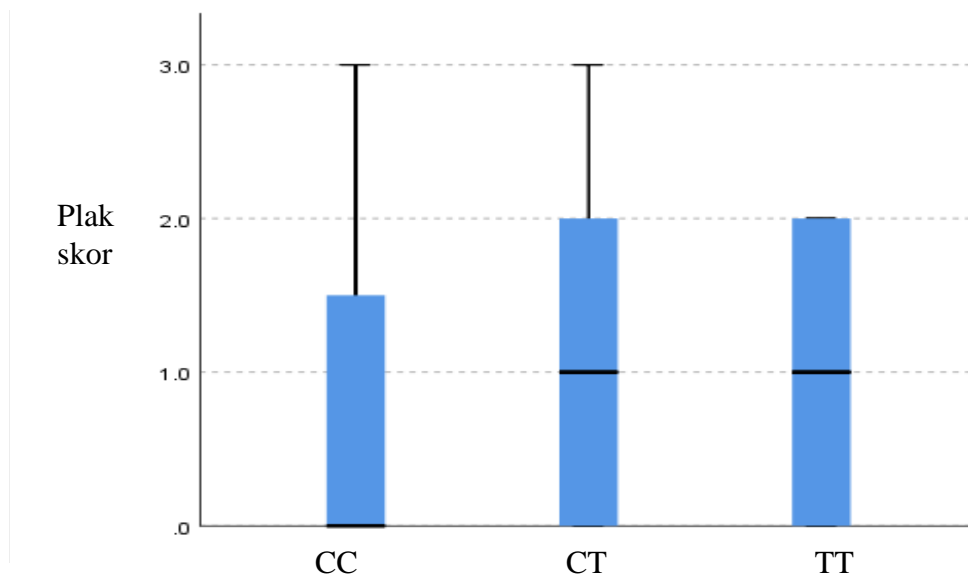
Mediana i opseg debljine intime medije karotidnih arterija u genotipu MTHFR 1298 AA iznosila je 0,9 (0,5-2,75), genotipu AC 0,85 (0,35-2,30) i genotipu CC 0,85 (0,55-1,20) mm. Na grafikonu 22. može videti da među MTHFR 1298A>C genotipovima nije bilo statistički značajne razlike u debljini intima medije karotidnih arterija ($p=0,762$).



Grafikon 22. Debljina intime karotidnih arterija (IMD) u različitim MTHFR 1298A>C genotipovima

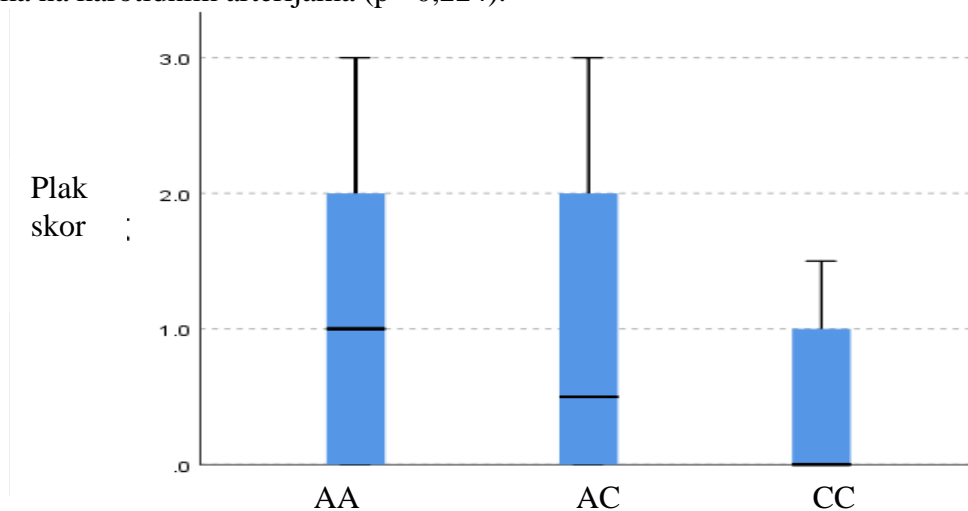
Mediana i opseg vrednosti skora plaka na karotidnim arterijama u genotipu MTHFR 677CC iznosila je 0,0 (0-3), genotipu CT 1,0 (0-3) i genotipu TT 1,0 (0-2). Na grafikonu 23

može videti da medju MTHFR 677 C>T genotipovima nije bilo statistički značajne razlike u pogledu izraženosti plaka na karotidnim arterijama ($p= 0,269$).



Grafikon23. Izraženost plaka karotidnih arterija u različitim MTHFR 677C>T genotipovima

Mediana i opseg vrednosti skora plaka na karotidnim arterijama u genotipu MTHFR 1298AA iznosila je 1,0 (0-3), genotipu AC 0,5 (0-3) i genotipu CC 0,0 (0-1,5). Na grafikonu 24 može se videti da medju MTHFR 1298A>C genotipovima nije bilo statistički značajne razlike u pogledu izraženosti plaka na karotidnim arterijama ($p= 0,224$).



Grafikon 24. Izraženost plaka karotidnih arterija u različitim MTHFR 1298A>C genotipovima

Analiza povezanosti ispitivanih parametara sa debljinom intime medije karotidnih arterija je pokazala da sa njom značajano koreliraju starost ($r=0,397$, $p=0,000$), dužina trajanje dijalize ($r=0,209$, $p= 0,04$) kao i koncentracija holesterola ($r=0,273$, $p=0,006$) i kretainina u serumu ($r=-0,197$, $p=0,05$). Nivo Hcy u krvi kao ni genotipovi MTHFR 677C>T i MTHFR 1298A>C nisu bili značajno povezani sa ispitivanim parametrima.

Analiza povezanosti ispitivanih parametara sa izraženošću plaka na karotidnim arterijama je pokazala da sa njim značajano pozitivno koreliraju starost ($r=0,696$, $p=0,00$), dužina trajanje dijalize ($r=0,396$, $p= 0,000$) kao i koncentracija CRP-a ($r=0,279$, $p=0,014$) i kretainina u serumu ($r=-0,277$, $p=0,005$). Nivo Hcy u krvi kao ni genotipovi MTHFR 677C>T i MTHFR 1298A>C nisu bili značajno povezani sa ispitivanim parametrima.

4.3.2. Povezanost fetuina –A, fetuin –A 742 C>T i 766 C>G genotipova sa kalcifikacijama koronarnih arterija

U grupi bolesnika sa hroničnom bubrežnom slabošću stadijum 2-5 koji nisu zahtevali dijalizu (HBS) i bolesnika sa transplantiranim bubregom (Tx) određivan je skor kalcifikacija na koronarnim arterijama (KKA) i ispitivana je njegova povezanost sa koncentracijom fetuina-A u krvi, sa fetuin –A 742 C>T i 766 C>G genotipovima, ali i sa drugim parametrima kao što su starost, pol, BMI, vreme od transplantacije, kompletna krva slika, kao i koncentracijom kreatinina, kalcijuma, fosfata, iPTH, holesterola, triglicerida, hsCRP u krvi.

Kako je već rečeno svi bolesnici su podeljeni na grupe prema cut off vrednosti fetuina A za pojavu KKA koja je iznosila 0.437 g/L.

Grupa ispitanika sa nivoom fetuina-A u serumu ≤ 0.437 g/L imala statistički značajno češće KKA i veći skor KKA u odnosu na grupu sa nivoom fetuina-A u serumu > 0.437 g/L što je prikazano na Tabeli 4.

Tabela 4. Logistička regresiona analiza nivoa Fetuina-A u serumu i KKA

	fetuin ≤ 0.437 g/L	fetuin > 0.437 g/L	P
KKA skor grupa, mediana (opseg)	2.00 (0-4)	0 (0-4)	0.029
KKA prisustvo, n (%)	22 (51.2%)	11 (24.4%)	0.010

Logistička univarijantna analiza je pokazala da su značajni prediktori za nastanak KKA: starost (OR= 1.156, 95%CI 1.093-1.223, $p < 0.001$), nivo fetuina-A u serumu (OR=3,238, 95%CI 1,309-8,008, $p = 0.011$) i fetuin 742C>T i 766C>G genotip (OR=2,801, 95%CI 1,172-6,696, $p = 0.021$), dok je u multivarijantni logistički model izdvojio samo starost bolesnika i nivo fetuina-A u serumu ≤ 0.437 . Bolesnici su imali za 17% veću šansu za prisustvo kalcifikacija za svaku godinu starosti (OR=1,17). Ispitanici sa nivoom fetuina-A u serumu ≤ 0.437 g/L su imali skoro 5 puta veću šansu za nastanak kalcifikacija (OR=4,77) (Tabela 5).

Tabela 5. Logistički multivarijantni model sa prisustvom KKA kao zavisnom varijablom

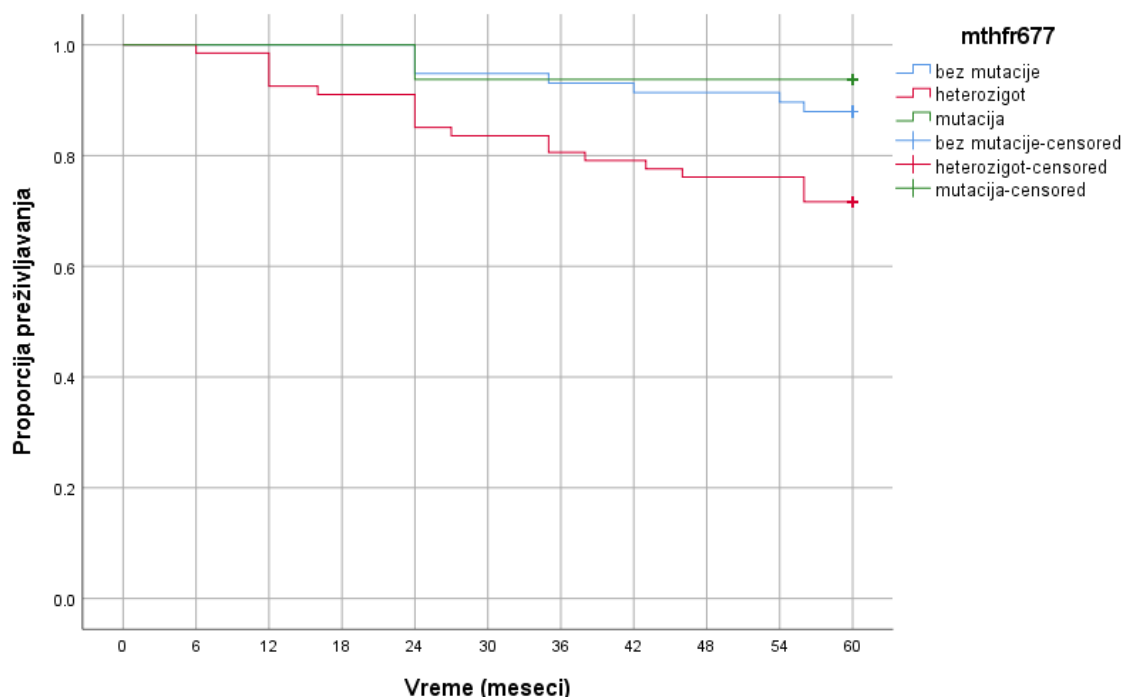
	B	p	OR	OR 95% CI
Starost	0.15	0.001	1.17	1.09-1.24
Fetuin-A nivo	1.56	0.03	4.77	1.15-19.74
Polimorfizam	0.15	0.82	1.16	0.30-4.47

5. Ispitivanje značaja različitih pojedinačnih ili kombinovanih genotipova u predikciji kardiovaskularnog mortaliteta bolesnika sa hroničnom bubrežnom slabošću stadijum 2-5, bolesnika u terminalnom bubrežnoj slabosti koji leče hemo ili peritoneumskom dijalizom ili je urađena transplantacija bubrega

5.1. Povezanost koncentracije homocisteina u serumu, MTHFR 677 C>T i MTHFR 1298 A>C genotipova sa preživljavanjem bolesnika

U studiji koja je povezanost koncentracije homocisteina u serumu, MTHFR 677 C>T i MTHFR 1298 A>C genotipova sa preživljavanjem, 188 bolesnika (82 na hroničnom programu lečenja hemodijalizom i 106 bolesnika sa stabilnom funkcijom transplantiranog bubrega) je praćeno 60 meseci. Za to vreme 53 bolesnika je umrlo.

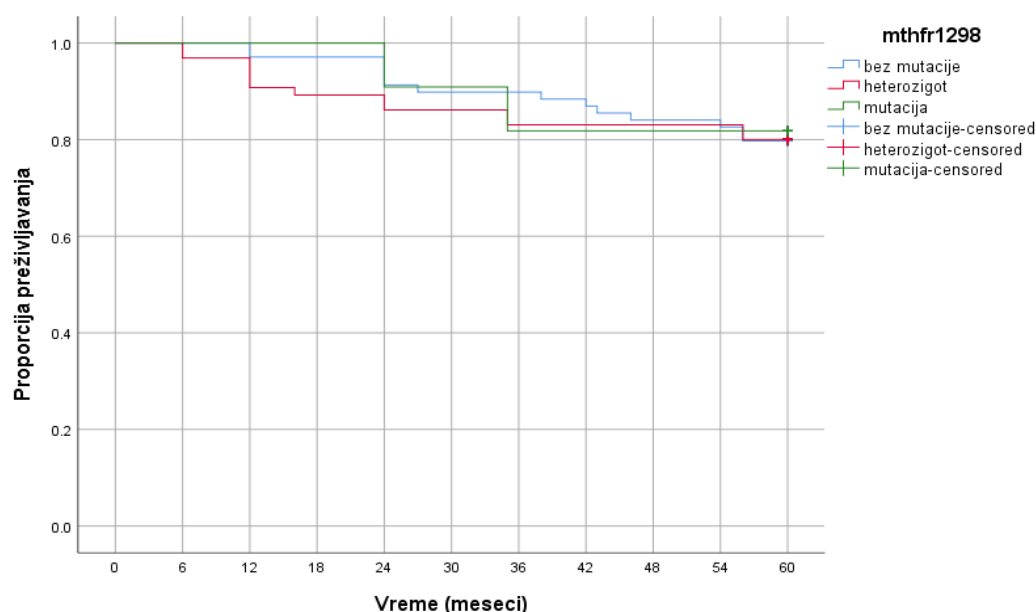
Koncentracija Hcy nije značajno uticala na preživljavanje ispitanih bolesnika dok je procenjena aritmetička sredina preživljavanja kod ispitanika sa MTHFR 677CC genotipom iznosila je 57,2 meseca (95% CI 54,9-59,4), kod CT genotipa 51,31 meseci (95% CI 47,4-55,1) i TT genotipa 57,7 meseci (95% CI 53,4-62,0). Postoji statistički značajna razlika u vremenu preživljavanja u odnosu na genotip (hi-kvadrat=7,50; p=0,024). Ispitanici sa MTHFR CT genotipom su imali značajno niže vreme preživljavanja što je prikazano na grafikonu 25.



Grafikon 25. Kaplan Meier analiza uticaja MTHFR 677 C>T genotipova na preživljavanje

Procenjena aritmetička sredina preživljavanja kod ispitanika sa MTHFR 1298AA genotipom iznosila je 54,8 meseci (95% CI 51,9-57,7), kod AC 52,7 meseci (95% CI 48,7-56,6) i kod CC

genotipa 54,4 meseci (95% CI 47,3-56,1). Ne postoji statistički značajna razlika u vremenu preživljavanja u odnosu na MTHFR 1298A>C genotip (hi-kvadrat=0,34; p=0,983) što je prikazano na grafikonu 26.



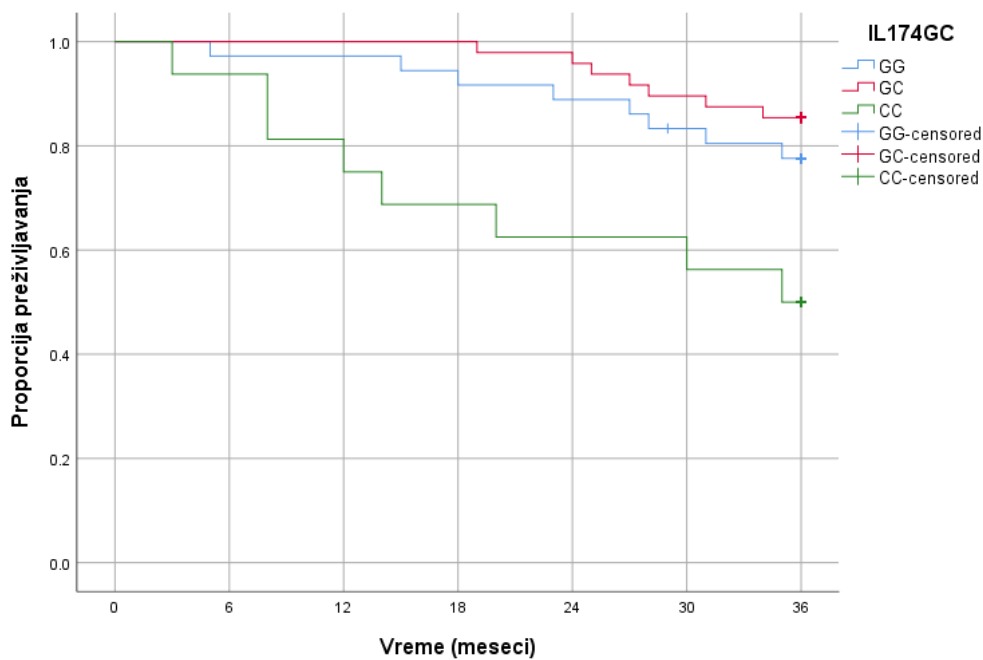
Grafikon 26. Kaplan Meier analiza uticaja MTHFR 1298A>C genotipova na preživljavanje

5..2. Povezanost nivoa interleukina 6, interleukina 10, interleukin-6 -174 G>C i interleukin-10 -1082 G>A i -819 T>C genotipova sa preživljavanjem

U studiji koja je ispitivala povezanost koncentracije interleukin -6 i interleukin -10 u serumu, kao i interleukin -6 -174 G>C i interleukin-10 -1082 G>A i -819 T>C genotipova sa preživljavanjem, 128 bolesnika (77 na hroničnom programu lečenja hemodijalizom i 51 bolesnik peritoneumskom dijalizom) je praćeno 36 meseci. Za to vreme 37 bolesnika je umrlo.

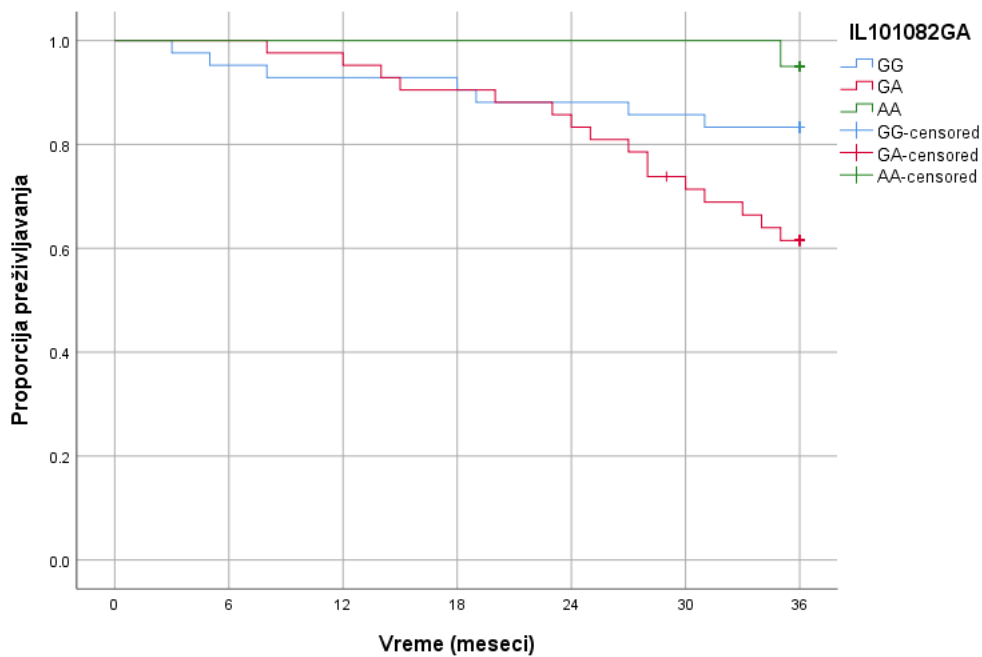
Pored navedenih parametara praćeni su starost, pol, BMI, dužina trajanja HD, odnosno PD, kao i koncentracija C-reaktivnog proteina (CRP), albumina u serumu, BMI. Univarijantna analiza je pokazala da su značajni prediktori mortaliteta starost (OR= 1.16, 95%CI 1.061-1.269, p=0,001), koncentraciju albumina (OR= 0.81, 95%CI 0.656-0.999, p=0,049), CRP (OR= 1.06, 95%CI 1.003—1.124, p=0,039) i IL-6 (OR= 1.12, 95%CI 1.038-1.216, p=0,004), kao i IL-6 176G>C genski polimorfizam (OR= 0.82, 95%CI 0.097-0.805, p=0,018), dok je u multivarijantni logistički model izdvojio samo koncentraciju IL-6 i polimorfizam u genu za IL-6 -174 G>C.

Procenjena aritmetička sredina preživljavanja kod ispitanika sa IL-6 -174GG genotipom iznosila je 33,1 mesec (95% CI 30,8-35,3), GC 34,6 meseci (95% CI 33,6-35,7) i CC 26,1(95% CI 20,0-32,2). Postoji statistički značajna razlika u vremenu preživljavanja u odnosu na genotip (hi-kvadrat=11,398; p=0,003) što se može uočiti na grafikonu 27.



Grafikon 27. Kaplan Meier analiza uticaja IL-6 G>C genotipova na preživljavanje

Procenjena aritmetička sredina preživljavanja kod ispitanika sa IL-10 -1082 GG genotipom iznosila je 32,6 meseci (95% CI 30,5-35,2), kod GA 31,5 (95% CI 29,2-33,8) i kod AA 36,0 (95% CI 35,9-36,1). Postoji statistički značajna razlika u vremenu preživljavanja u odnosu na genotip (hi-kvadrat=9,669; p=0,008) što se može uočiti na grafikonu 28.

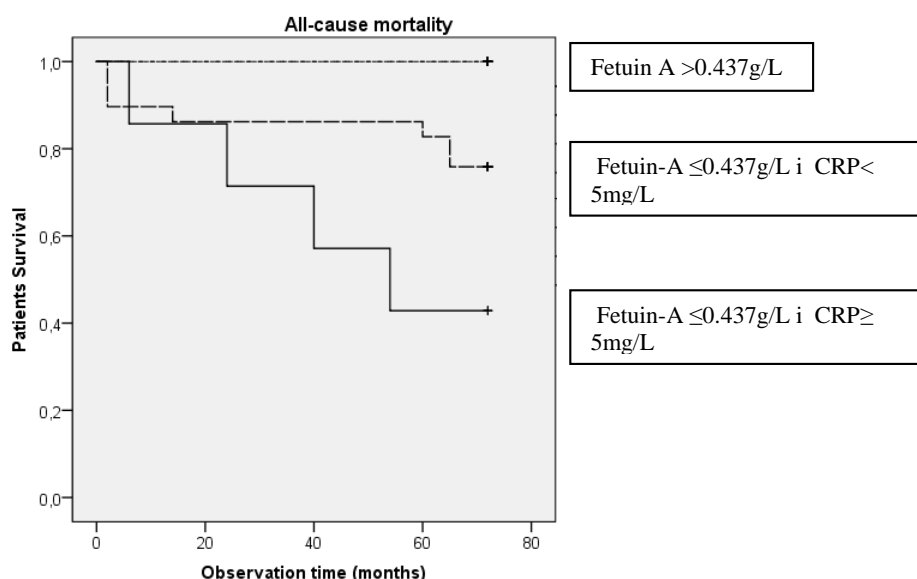


Grafikon 28. Kaplan Meier analiza uticaja IL-10 1082 G>A genotipova na preživljavanje bolesnika

5.3. Povezanost koncentracije fetuina-A u serumu i polimorfizama u genu za fetuin 742 C>T i 766 C>G sa preživljavanjem bolesnika

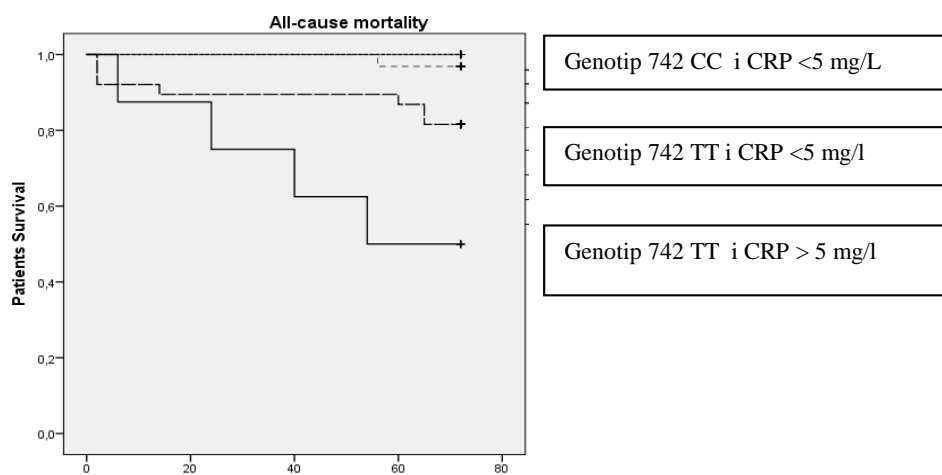
U studiji koja je ispitivala povezanost koncentracije fetuina-A u serumu, kao i fetuin 742 C>T i 766 C>G genotipova sa preživljavanjem, 88 bolesnika (46 sa hroničnom bubrežnom slabošću stadijum 2-5 i 42 bolesnika sa stabilnom funkcijom transplantiranog bubrega), je praćeno 72 meseca. Tokom perioda praćenja 11 bolesnika je umrlo.

Pored navedenih ispitivani su parametri kompletna krvna slika, koncentracije u krvi kreatinina, albumina, holesterola, triglicerida, CRP, serum amiloida A, homocisteina i interleukina 6, BMI i arterijska hipertenzija. Kaplan –Meier analiza preživljavanja je pokazala da su bolesnici sa sniženim nivoima fetuina-A ($\leq 0.437\text{g/L}$) i povišenim CRP $> 5\text{mg/L}$ imali preživljavanje samo 42%. Bolesnici sa sniženim fetuinom-A ($\leq 0.437\text{g/L}$) i sa CRP $< 5\text{mg/L}$ su imali preživljavanje od 75%, a kod bolesnika sa nivoom fetuina-A u serumu $> 0.437\text{g/L}$ preživljavanje je iznosilo 100% ($p < 0.001$) bez obzira na nivo CRP (Grafikon 29).



Grafikon 29. Kaplan-Meier analiza uticaja koncentracije fetuina-A i CRP i na preživljavanje bolesnika

Bolesnici sa 742 T alelom u genu za fetuin i koncentracijom CRP $\geq 5\text{mg/L}$ su imali procenat preživljavanja 50%, bolesnici sa 742 T alelom i nivoom CRP $< 5\text{mg/L}$ 81%. Bolesnici koji nisu bili nosioci T alela i sa koncentracijom CRP $> 5\text{mg/L}$ su preživljavali 96,9%, a ukoliko je CRP iznosio $\leq 5\text{mg/L}$ preživljavanje je bilo 100% što je prikazano na grafikonu 30.



Grafikon 30. Kaplan-Meier analiza uticaja fetuin -A 742C>T genotipa i CRP na preživljavanje bolesnika

6. DISKUSIJA

Genski polimorfizmi predstavljaju izraz normalnih varijacija u naslednoj osnovi. Prosečno svaki 1000. nukleotid u humanom genomu je polimorfan, tj. razlikuje se od osobe do osobe. Ove varijacije imaju uticaj na fenotip, a naročito je aktuelno istraživanje povezanosti sa sklonošću ka određenim bolestima. Kod bolesnika sa HBB, lečenih ponavljanim hemodijalizama i bolesnika sa transplantiranim bubregom hiperHcy kao jedan do nezavisnih faktora rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti nije samo posledica smanjene bubrežne funkcije i sniženog nivoa folata u serumu, već je i genetički determinisana (Gaughan i sar., 2000, Bosotm i sar., 1999, Fodinger i sar., 1999, Fodinger i sar., 2000).

U ovom radu ispitivali smo učestalost polimorfizama u genu za MTHFR, interleukin 6, interleukin 10 i fetuin-A bolesnika u hroničnoj ili terminalnoj bubrežnoj slabosti koji se leče hemo ili peritoneumskom dijalizom i kod bolesnika sa transplantiranim bubregom.

Učinjeno je ispitivanje učestalosti polimorfizma u genu za MTHFR na lokusima 677C>T i 1298A>C kod 188 bolesnika, od kojih su 82 lečena ponavljanim hemodijalizama, 106 bolesnika sa transplantiranim bubregom, i 28 zdravih osoba. Učestalost 677C>T mutacije (T alela) u genu za MTHFR iznosila je 35,11% u grupi bolesnika, odnosno 34% u grupi zdravih osoba. Zastupljenost 1298A>C mutacija (C alel) u istom genu kod obolelih je bila 30,35%, dok je u kontrolnoj grupi zdravih osoba iznosila 10,71%. Statistička analiza je pokazala da nema značajne razlike u učestalosti alela između grupa, kako za jednu, tako i za drugu mutaciju, što je u saglasnosti sa rezultatima sličnih istraživanja drugih autora (Fodinger i sar., 1999, 2000). Učestalost homozigota za MTHFR 677C>T mutaciju (TT) kod zdravih osoba je bila 7,14% slično populacijama u Evropi, Australiji, Kanadi, Japanu, dok su u Africi i Americi niže zastupljenosti. Zbirni podaci iz literature pokazuju zastupljenost homozigota TT u opštoj populaciji je 5-15%, uz postojanje etničkih varijacija u učestalosti MTHFR genotipa (Stevenson i sar., 1997). U našem istraživanju u grupi bolesnika na hemodijalizi učestalost homozigota za MTHFR677C>T mutaciju (TT) je bila 12%, a heterozigota (CT) 42%. Kod bolesnika sa transplantiranim bubregom učestalost homozigota za MTHFR 677C>T mutaciju (TT) bila 9%, a učestalost heterozigota (CT) 45% što je u skladu sa istraživanjima Fodinger i saradnika (Fodinger i sar., 1999). Homozigota za MTHFR1298A>C mutaciju (CC) kod zdravih osoba je bilo 11%, što je približno učestalosti posmatranog genotipa u Holandiji i Kanadi (Klerk i sar., 2002, Osganian i sar., 1999). U grupi bolesnika na hemodijalizi učestalost CC genotipa iznosila je 9%, a kod bolesnika sa transplantiranim bubregom 6%. Statističkim analizama nismo pronašli značajnu razliku u učestalostima 677C>T i 1298 A>C genotipova između obolelih osoba i zdravih kontrola.

Na postojanje populacionih specifičnosti u učestalosti MTHFR genotipova su ukazali Cortese i saradnici (Cortese i sar., 2001). Prevalenca termolabilne forme MTHFR je različita u različitim populacijama, te učestalost MTHFR 677 TT homozigota iznosi 5-16 % u zdravoj populaciji, u Americi i Australiji oko 11,5%, a u Evropi varira od 5,4% u Holandiji do 11,4 % u Italiji. Učestalost T alela u mediteranskom delu Evrope je veoma visoka (40-50%) i zabeleženo je da se učestalost povećava od severnih ka južnim delovima kontinenta. Razlozi za tu pojavu nisu dovoljno razjašnjeni, moguće da se prednost u preživljavanju dovodi u vezu sa drugim genetskim bolestima koje su prevalentne u oblasti Mediterana, kao što su poremećaj u metabolizmu eritrocita. Slično je i u Azijskoj populaciji gde je visoka učestalost MTHFR 677 T alela od 32% nadjena u Japanu i Kini, a veoma niska <5% u Indoneziji, dok su veoma niske u subsaharskoj i etiopijskoj populaciji (5 i 3%), kao i kod afroamerikanaca. U populacijama Južne Amerike (Kolumbilja i Brazil) učestalost MTHFR 677 T alela je slična evropskoj (40%). Takođe učestalost MTHFR 1298 C alela pokazuje heterogenu distribuciju u različitim populacijama. Najmanja je kod Afro-Amerikanaca, 15%, kod Belaca iznosi 30% (Cortese i sar.,2001).

Inflamacija je česta karakteristika kod bolesnika sa HBB, koje se obično povećava sa progresijom HBB. C reaktivni protein (CRP) i interleukin (IL-6) su inflamatorni medijatori koji su povišeni kod bolesnika sa HBB, posebno kod bolesnika na dijalizi. Nakupljanje uremijskih toksina, višak tečnosti, razvoj oksidativnog stresa, pored ostalih poremećaja u HBB, doprinose porastu IL-6, a smanjenje bubrežne funkcije snižavanjem klirensa IL-6 dodatno doprinosi povećanju koncentracije u krvi. Dijalizne procedure doprinose stimulaciji inflamatornog odgovora, dalje povećavajući stvaranje IL-6. Kontinuirano povišeni nivoi inflamatornih citokina su udruženi sa kardiovaskularnom bolešću, koja je glavni uzrok smrti ovih bolesnika.

Uočene su interindividualne varijabilnosti u sekreciji citokina u odgovoru na stimuluse, koje su bar delimično određene polimorfizmima u promotornim regionima gena za citokine i mogu imati značajan uticaj na individualnu predispoziciju za citokinima indukovanu hroničnu inflamaciju i njen uticaj na mortalitet. Nekoliko studija je ispitivalo odnos polimorfizama u genima koji kodiraju biohemijske markere inflamacije kod bolesnika sa HBB i njihov mogući uticaj na ishod bolesnika (Corredor i sar 2020, Köttgen i sar., 2009, Okada i sar., 2012), ali taj odnos još uvek nije u potpunosti razjašnjen.

Inflamatorni biomarker IL-6 je posebno povišen kod bolesnika sa terminalnom HBB koji se leče ponavljanim dijalizama i udružen je sa povišenim rizikom za KV događaje, koji su glavni uzrok smrti ovih bolesnika (Barreto i sar., 2010). Još uvek nije dovoljno razjašnjeno kako polimorfizmi gena utiču na inflamatorni odgovor i ishod bolesnika. Polimorfizam pojedinačnih nukleotida u promotornom regionu genu za IL-6 -174G>C je funkcionalna varijanta koja reguliše brzinu transkripcije gena za IL-6 i zato predstavlja moguće sredstvo za ispitivanje uzročno posledičnog odnosa između IL-6 i kardiovaskularnih ishoda u HBB (Jones i sar., 2001, Jenny i sar., 2022).

U ovoj studiji učinjeno je ispitivanje učestalosti polimorfizma u promotornom regionu gena za IL-6 -174G>C kod 128 bolesnika (77 lečenih hemodijalizom i 51 peritoneumskom dijalizom). Učestalost 174G>C mutacije u genu za IL-6 iznosila je 40% za alel C, što je u skladu sa nalazima u Evropskoj populaciji prema bazi podataka engl. *Reference SNP (rs) Report database for rs1800795, February, 25th 2021* (www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1800795), u kojoj su zabeležene učestalosti 44%/56% za alele C/G. Za razliku od toga Hoffmann i saradnici (Hoffmann i sar., 2002) nalaze da je u Americi kod pripadnika bele rase distribucija nosioca IL-6 -174 G/C alela u 62/38% i da je različita u odnosu ostale tri populacije (azijsku, crnu i hispano). Spoto i saradnici u Italiji (Spoto i sar., 2015) nalaze sličnu učestalost C alela 31% kod bolesnika sa HBB i nalaze da je veća nego kod zdravih ispitanika. Homozigota za IL-6-174G>C mutaciju (CC) je bilo 18% kod bolesnika na hemodijalizi i 15% kod bolesnika na peritoneumskoj dijalizi. Analiza distribucije -174G>C genotipova kod bolesnika na hemodijalizi je pokazala da je genotip GG imalo 36% bolesnika, GC 46%, CC 18%, a kod bolesnika na peritoneumskoj dijalizi genotip GG 37%, GC 44% i CC 15%, dok je od svih ispitanih bolesnika 36% imalo GG genotip, 48% GC, a CC genotip 16%. Statističkim analizama nismo pronašli značajnu razliku u učestalostima i distribuciji IL-6 174G>C genotipova između grupa.

Naši nalazi u pogledu distribucije genotipova su u skladu sa podacima Hoffmann-a i saradnika (Hoffmann i sar., 2002). Za razliku od našeg ispitivanja nešto manju učestalost GG genotipova objavili su istraživanja autora iz Poljske (Kurzawski i sar., 2005) gde je učestalost IL6 -174 G>C genotipova je iznosila: GG 28.8%, GC 49.3% i CC 21.9%, slično populaciji Nemačke i Britanije. Za razliku od toga studija bolesnika na hemodijalizi u Portugalu je pokazala učestalost genotipova (IL-6 -174GG 47,4%, GC 42,9%, CC 9,7%) sličnu populaciji Italije i Amerike u kojima je GG najčešći genotip, a CC genotip je manje učestao (Rochai sar., 2021, Balakrishnan i sar., 2004, Spoto i sar., 2015).

Interleukin-10 ima jak regulatorni uticaj na stvaranje proinflamatornih interleukina, što ukazuje da sinergistički ili antagonistički efekti genotipskih kombinacija mogu imati ključnu ulogu u predispoziciji za hroničnu inflamaciju i njene posledice (Balakrishnan i sar., 2004.).

U našem istraživanju polimorfizma u genu za IL-10-1082G>A učestalost alela A je iznosila 39,42% što je nešto niže u odnosu na učestalost u nalazima Hofmana i saradnika koji nalazi učestalost A alela od 54% kod pripadnika bele rase u Americi (Hoffmann i sar., 2002). U grupi bolesnika na

hemodijalizi homozigota za IL-10 -1082 G>A mutaciju (AA) je bilo 15%, a heterozigota (GA) 41%. Kod bolesnika na peritoneumskoj dijalizi učestalost homozigota za IL-6 -1082 G>A mutaciju (AA) je bila 38%, a heterozigota (GA) 35%. Kod svih ispitanih bolesnika učestalost GG genotipa iznosila je 40,4%, GA 40,4% i AA 19,2%.

Ispitivanjem polimorfizma u genu za IL-10-819 T>C učestalost alela C je bila 27,2% što je slično kao kod pripadnika bele rase u Americi (23%) (Hoffmann i sar., 2002). Učestalost homozigota za IL-10 -819 T>C mutaciju (CC) kod bolesnika na hemodijalizi je bila 3%, a heterozigota (TC) 46%. Kod bolesnika na peritoneumskoj dijalizi učestalost homozigota za IL-10 -819 T>C mutaciju (CC) je bila 9%, a heterozigota (TC) 37%. Analiza distribucije IL-10 -819 T>C genotipova kod bolesnika na hemodijalizi je pokazala učestalost IL-10 -819 TT genotipa 51%, TC 46 %, a CC 3%. Kod bolesnika na peritoneumskoj dijalizi učestalost IL-10 -819 TT genotipa je bila 54 %, TC 37% i CC genotipa 9%. Kod svih ispitanih bolesnika učestalost IL-10 -819 genotipova je bila za TT 50%, TC 45,7% i CC 4,3%. Statistička analiza je pokazala da nema značajne razlike u učestalosti alela između grupa, kako za jednu, tako i za drugu mutaciju. Distribucija genotipova kod svih ispitanika se razlikovala između -819T>C i -1082G>A (p 0,001) što je u skladu sa nalazima studija u opštoj populaciji (Hoffmann i sar., 2002).

Balakrishnan (Balakrishnan i sar., 2004.) je određivao polimorfizme u genima a za IL-6, TNF-alfa i IL-10 u kohorti 183 bolesnika na hemodijalizi koji su bili uključeni u HEMO studiju i pokazao značajno povišenje nivoa IL6 i komorbidnog skora kod nosioca IL-6-174G alela (visoko produkujući) i niže koncentracije albumina u serumu. Takodje je pokazana i udruženost IL-6-174 GG genotipa sa koronarnom bolešću. (Burzotta i sar.,2001) Iako IL-10 genotip nije bio udružen sa komorbiditetom i koncentracijom albumina u serumu, ispitanici koji su bili sa visoko ili intermedijerno produkujućim genotipom su češće imali veći bolji funkcionalni status procenjen pomoću Karnofsky skora (Rettig i sar., 1997). Studije na blizancima su pokazale da je oko 75% varijacija u stvaranju IL-10 genetski deteminisano i kontrolisano na transkripcionom nivou (Burzotta i sar., 2001). Ispitanici sa kombinacijom IL-10 visoko ili intermedijerno produkujućeg genotipa sa IL-6 nisko-produkujućim genotipom su imali manje komorbiditeta ili veći Karnofsky skor nego ispitanici sa suprotnim kombinacijama genotipova (Balakrishnan i sar., 2004.).

Vaskularne kalcifikacije (VK) su česte kod bolesnika sa HBB i udružene su sa visokim kardiovaskularnim morbiditetom i mortalitetom (Russo i sar., 2004; Kumarisar., 2014; Kramer i sar., 2005; Kestenbaumi sar., 2009; Covici sar.,2010; Schiffrini sar., 2007; Oritz i sar., 2014). VK progrediraju kod bolesnika na hemodijalizi, transplantacija bubrega ih donekle usporava, ali ne zaustavlja u potpunosti (Jansz i sar., 2018., Meier-Kriesche i sar.,2004; Moei sar., 2005; Mazzaferro i sar., 2009).

Pored opštih i za uremiju specifičnih faktora koji su uključeni u arterosklerotski proces u nastanku VK kod bolesnika na hemodijalizi utiču i povišene vrednosti kalcijuma i fosfora u serumu kao i povišen paratireoidni hormon. Pokazano je da su VK aktivan proces kome su suprotsavljeni lokalni i sistemski inhibitori kalcifikacija, od kojih je najznačajniji fetuin-A. Postoje podaci da su nivoi fetuina-A genetski determinisani polimorfizmima 742C>T i 766T>G u genu za fetuin (Stenvinkel i sar., 2005, Marechal i sar., 2011, Hamirani i sar., 2008, Podesta i sar., 2021).

U ovoj studiji učinjeno je ispitivanje učestalosti polimorfizma u genu za fetuin 742C>T i 766C>G kod 88 bolesnika (42 bolesnika sa transplantiranim bubregom najmanje šest meseci od transplantacije i sa stabilnom funkcijom alografta i 46 bolesnika sa HBB u stadijumu 2-5 koja nije zahtevala lečenje dijalizom). Učestalost mutacija u genu za fetuin 742C>T za alel T iznosila je 34,5 %, a ista učestalost je bila za mutaciju u genu za fetuin 766 C>G (alel G). Polimorfizmi u genu za fetuin 742C>T i 766T>G su bili 100% vezani. Ovakav nalaz je u skladu sa ispitivanjima Jansena i saradnika (Jansen i sar., 2017). Učestalost homozigota za 742C>T mutaciju (CC) i 766C>G mutaciju (GG) iznosila je 13,4% kod svih bolesnika. U grupi ispitanika sa HBB bilo je 8% homozigota (TT /GG), heterozigota (CT/CG) 42%. Kod bolesnika sa transplantiranim bubregom bilo je 18% homozigota (TT/GG), a heterozigota (CT/CG) 42%.

Dalje ispitivanje odnosilo se na utvrđivanje povezanosti koncentracije homocisteina, interleukina 6, interleukina 10 i fetuina-A sa određenim genotipovima kod bolesnika u hroničnoj ili terminalnoj bubrežnoj slabosti koji se leče hemo ili peritoneumskom dijalizom i kod bolesnika sa transplantiranim bubregom.

Učestalost hiperHcy kod bolesnika na hemodijalizi analiziranih u ovoj studiji iznosila je 92,68% (97% kod muškaraca i 88% kod žena), srednja vrednost koncentracije Hcy $26,52 \pm 8,93$ umol/L, a kod bolesnika sa transplantiranim bubregom 82% (90% kod muškaraca i 65% kod žena), a srednja vrednost koncentracije Hcy $22,02 \pm 8,02$ umol/L, što je u obe grupe značajno više u odnosu na kontrolnu grupu zdravih osoba. Naši podaci su u saglasnosti sa nalazima drugih studija koje ukazuju da oko 90% bolesnika na hemodijalizi imaju povišene koncentracije Hcy (Tremblay i sar., 2000), a da posle transplantacije bubrega 50 do 60% bolesnika ima umereno povišene koncentracije Hcy u serumu (Fodinger i sar., 2000, Bostom i sar., 1999).

Mehanizmi koji dovode do hiperHcy u hroničnoj bubrežnoj insuficijenciji, a naročito posle transplantacije bubrega nisu razjašnjeni. Pored uticaja pola, starosti, deficita folata i vitamina B, bubrežne funkcije i genetski faktori mogu imati značajnu ulogu u nastanku hiperHcy (Bostom i sar., 1999, Frosst i sar., 1995). Simić i saradnici nalaze da su nivoi Hcy posle transplantacije su mnogo viši u odnosu na bolesnike sa istom bubrežnom funkcijom koji nisu transplantirani. Kako pri transplantaciji bubreg pretrpi ishemijsku ozledu tubulskih ćelija, koje se dodatno mogu oštetiti imunološkim reakcijama i imunosupresivnim lekovima, smanjen metabolizam Hcy u tubulima može doprinosti povišenim nivoima Hcy kod bolesnika sa transplantiranim bubregom (Simic Ogrizovic i sar., 2006). U studijama na opštoj populaciji kao što je Framingamska pokazano je da su folat i vitamin B 12 glavne determinante koncentracije Hcy u plazmi, a dalje studije su pokazale da subklinički nasledni defekti u ključnim enzimima remetilacije i transsulfurilacije sami ili inetrakcijom sa vitaminskim statusom mogu uticati na nivo Hcy u opštoj populaciji. Frost je objavio da termolabilna forma MTHFR može biti udružena sa višim koncentracijama Hcy (Frosst i sar., 1995).

Polimorfizam u genu za MTHFR na poziciji 677 dovodi do zamene alanina u valin u egzonu 4 u kodirajućem regionu za mesto vezivanja folata. Kod homozigota za mutaciju MTHFR C677T (genotip TT) enzimaska aktivnost je smanjena na 50% normalnih vrednosti što dovodi do smanjenog stvaranja 5 metilentetrahidrofolata. Pokazano je da u opštoj populaciji homozigoti MTHFR 677 TT imaju više vrednosti Hcy u serumu u odnosu na heterozigote i osobe sa divljim tipom alela (Brattstrom i sar., 1998). *U.S. Physicians Health Study* (Stampfer i sar., 1992) je pokazala da je MTHFR 677 TT genotip udružen sa višim koncentracijama Hcy ali ne i udruženost sa kardiovaskularnim bolestima.

Drugi polimorfizam u genu za MTHFR 1298C>T je smešten na egzonu unutar regulatornog domena (Yeun i sar., 1998, Finkelstein i sar., 1990, Scelhub i sar., 1992). Ova tranzicija dovodi do zamene glutamina alaninom i takodje do smanjene enzimske aktivnosti na oko 60 % od normalnih vrednosti, kod osoba koji su homozigoti za mutirani alel, ali ne utiče na koncentracije Hcy i folata (Finkelstein i sar., 1990).

Kod bolesnika sa normalnom bubrežnom funkcijom MTHFR 677TT genotip povećava nivo Hcy u serumu za 25%, a kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabosti za 40-100% (Blankenberg i sar., 2002, Cortese i sar., 2001). Postoje podaci i da kombinovani heterozigoti CT/AC genotip imaju sniženu enzimsku aktivnost na 50 do 60 % (Scelhub i sar., 1992), ali i više koncentracije Hcy u serumu i niže koncentracije folata, slično homozigotima za MTHFR 677 genotip TT (Finkelstein i sar., 1990).

Ispitivanja u našem radu su pokazala da su u grupi homozigota za mutaciju MTHFR 677 genotip TT koncentracije Hcy veće u odnosu na ostale heterozigote i bolesnike bez mutacije na navedenom lokusu, ali bez statističke značajnosti. I u grupi homozigota za mutaciju MTHFR 1298 CC genotip zapažene su više koncentracije Hcy u donosu na heterozigote i osobe bez mutacije, ali bez statističke značajnosti. Naši podaci su u skladu sa nalazima Bostoma i saradnika (Bostom i sar., 1999)

koji nalazi povećanu učestalost hiperHcy kod bolesnika sa transplantiranim bubregom i dovodi u vezu sa poremećenom bubrežnom funkcijom, unosom folata i vitamina B6, ali ne nalazi povezanost sa mutacijama u genima za enzime transulfurilacije ili remetilacije. Nasuprot tome podaci drugih autora pokazuju značajan uticaj polimorfizma MTHFR 677C>T i nalaze da homozigoti za TT mutaciju imaju značajno veće koncentracije Hcy u serumu u odnosu na heterozigote i osobe bez mutacije (Tremblay i sar., 2000, Fodinger i sar., 1999, Fodinger i sar., 2000).

Hronična inflamacija je važan netradicionalni faktor rizika za morbiditet i mortalitet u HBB. Kod bolesnika sa HBB zapažena je udružena pojava malnutricije, inflamacije i ateroskleroze koja je označena kao MIA sindrom i predstavlja začarani krug u kome proinflamatorni citokini imaju ključnu ulogu (Stenvinkel i sar., 2000). Poznato je da postoje individualne razlike u stvaranju citokina, a pretpostavlja se da polimorfizmi u promotornim regionima gena za citokine, kao i sinergistički ili antagonistički efekti genotipskih kombinacija mogu imati ključnu ulogu u predispoziciji za hroničnu inflamaciju i njene posledice.

Inflamatorni biomarker interleukin 6 je posebno povišen kod bolesnika sa terminalnom HBB koji se leče ponavljanim dijalizama i udružen je sa povišenim rizikom za KV događaje, koji su glavni uzrok smrti ovih bolesnika (Barreto i sar., 2010). Ispitivanja u našem radu su pokazala da su bolesnici na peritoneumskoj dijalizi (PD) imali značajno više koncentracije IL-6 nego bolesnici na hemodijalizi (HD). Koncentracija IL-6 kod HD bolesnika nije se značajno razlikovala prema IL-6 -174 G>C genotipovima dok je kod PD bolesnika ona bila najviša kod bolesnika sa IL-6-174 CC genotipom kao kod svih ispitanih bolesnika, ali ta razlika nije dostizala statističku značajnost. U grupi homozigota za mutaciju IL-6 -174 CC genotip koncentracije IL-6 su bile veće u odnosu na ostale heterozigote i bolesnike bez mutacije na navedenom lokusu i ta razlika je bila statistički značajna. Naši podaci su u saglasnosti sa studijom Spoto i saradnika (Spoto i sar., 2015) koja kod 755 bolesnika sa HBB i nalazi da su ispitanici sa CC genotipom imali više koncentracije IL-6 (medijana 2,9 pg/ml) nego bolesnici sa GC i GG (2,4 i 2,5pg/ml). Ovakav nalaz je ukazao da je odnos između IL-6-174 G>C polimorfizma i inflamatornih markera objašnjen recesivnim modelom nasledjivanja (CC genotip za razliku od GC/GG genotipa). Incidenca kardiovaskularnih događaja je bila veća kod bolesnika sa povišenim IL-6, a bolesnici sa CC genotipom su imali dva puta veći rizik od KV događaja u odnosu na GC i GG genotip. Na taj način pokazana je paralelna veza između koncentracija IL-6 i genskog markera za citokine za isti događaj. Nasuprot tome, Balakrishnan (Balakrishnan i sar., 2004) je odredjivao relativnu učestalost alela/genotipova za IL-6, TNF-alfa i IL-10 u kohorti 183 bolesnika na hemodijalizi koji su bili uključeni u HEMO studiju i pokazao značajno povišenje nivoa IL-6 i komorbidnog skora kod nosioca IL6 -174G alela i niže koncentracije albumina u serumu.

Proinflamatorni citokini su pod kontrolom regulatornih - antiinflamatornih citokina, kao što je interleukin 10 koji ograničava nivo inflamacionog odgovora na određeni stimulus. (Grindt i sar., 2001). Polimorfizmi u promotornom regionu gena za IL-10 određuju individualne razlike u stvaranju IL-10. Ispitivanja u našem radu su pokazala da su koncentracije IL-10 bile niže kod bolesnika na PD u odnosu na bolesnike na HD, ali bez statističke značajnosti. Moguće objašnjenje za ovu razliku je veća stimulacija inflamatornog odgovora kod bolesnika na hemodijalizi. Yilmaz i saradnici (Yilmaz i sar., 2014) su našli da nivoi IL-10 rastu sa progresijom HBB, kao i da se nivoi IL-10 se menjaju tokom inflamatornog odgovora i moguće je da su odraz regulatornog mehanizma u odgovoru na povišene nivoe inflamatornih citokina. Homozigoti IL-10 -1082 AA genotipa odnosno -819CC genotipa su imali niže vrednosti IL-10, ali bez statistički značajne razlike. Ispitanici sa IL-10 -1082 GG+GA genotipom su imali slične vrednosti IL-10 u krvi kao i genotip AA, kao i ispitanici sa -819 TT i TC genotipom u odnosu na CC. Naši rezultati su delom u saglasnosti sa studijom Balakrishnana i sar. (Balakrishnan i sar., 2004) u kojoj bolesnici na hemodijalizi sa IL-10 -1082 GG genotipom imaju veće koncentracije IL-10.

Fetuin-A ima važnu ulogu u inhibiciji nastanka i progresije vaskularnih kalcifikacija. Poznato je da su koncentracije fetuina-A snižene kod bolesnika sa HBB, a pretpostavlja se da je polimorfizam u promotornom regionu gena za fetuin uz prisustvo hronične inflamacije najčešći uzrok snižene

koncentracije fetuina-A kod ovih bolesnika. Posle transplantacije bubrega sa oporavkom bubrežne funkcije i popravljanjem uremijskih faktora povećavaju se koncentracije fetuina-A, ali su još uvek niže nego kod zdravih osoba. Pojedini bolesnici i pored prisustva klasičnih i za uremiju specifičnih faktora nikada ne razviju vaskularne kalcifikacije, te se pretpostavlja moguća uloga genskih faktora u determinisanju predispozicije za nastanak VK (Stenvinkel i sar., 2005).

U našem ispitivanju koncentracije fetuina A u krvi kod bolesnika sa HBB su bile značajno niže u odnosu na bolesnike sa transplantiranim bubregom. Pokazali smo da su snižene koncentracije fetuina-A kod bolesnika sa hroničnom bubrežnom slabošću stadijum 2-5 koji nisu zahtevali dijalizu (HBB) i bolesnika sa transplantiranim bubregom (Tx) pod uticajem polimorfizma u genu za fetuin. Kod svih ispitanih bolesnika (HBB i Tx) homozigotisa fetuin 742 TT, odnosno 766 GG genotipom su imali značajno nižu koncentraciju fetuina A u krvi u odnosu na bolesnike sa ostalim genotipovima. Koncentracije fetuina-A su inverzno korelisale sa svakim dodatnim mutiranim alelom (T odnosno G). Ispitivanja u ovoj studiji su u saglasnosti sa nalazima drugih autora. Stenvinkel i saradnici (Stenvinkel i sar., 2005) nalaze da polimorfizam u genu za fetuin utiče na nivoe fetuina-a kod bolesnika na dijalizi u Švedskoj. Slično je pokazala meta analiza u opštoj populaciji (Laugsand i sar., 2015, Verduijn i sar., 2015) kod bolesnika na hemodijalizi u Holandiji su takodje pokazali razlike u novoima fetuina-A prema fetuin 742 C>T prema genotipovima i da su nosioci T alela imali nižu koncentraciju fetuina-A u dozno zavisnom obliku. Studije pacijenata sa transplantiranim bubregom takodje pokazuju da su niske koncentracije fetuina-A određene varijantama u genu za fetuin i nezavisno povezani sa VK i većim rizikom od KV događaja i mortaliteta (Marechal i sar., 2011). Za razliku od navedenog, Cozzolino i saradnici (Cozzolino i sar., 2007) ne nalaze povezanost izmedju koncentracija fetuina-A i polimorfizma u genu za fetuin. Najnovija istraživanja Jansen-a i saradnika (Jansen i sar., 2017) koji su ispitivali genske varijacije i nivoe fetuina-A u meta analizi engl. *Cohorts for Heart and Aging Research in Genome Epidemiology* iz šest populacionih studija (engl. *Atherosclerosis Risk in Communities Study (ARIC)*, *Cardiovascular Health Study (CHS)*, *Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (ME-SA)*, *Framingham Heart Study*, *Health, Aging, and Body Composition (Health ABC)* i *Nurses' Health Study*) su pokazala snažnu udruženost polimorfizama u genu za fetuin sa nivoima fetuina-A u krvi i da polimorfizam u genu 742C>T određuje 14% varijacija u nivou fetuina-A.

Sledeći cilj našeg ispitivanja je bio da se ispita udruženost različitih pojediničanih ili kombinovanih genotipova sa ranim i kasnim pokazateljima arterioskleroze kao i oboljevanja od kardiovaskularnih bolesti.

U poslednje dve decenije veliki broj prospektivnih studija ukazao je da je Hcy nezavistan faktor rizika za kardiovaskularne bolesti u opštoj populaciji, kod bolesnika sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom i na hemodijalizi, a potom je objavljeno nekoliko studija koje pokazuju da i posle transplantacije bubrega hiperHcy predstavlja nezavistan faktor rizika za kardiovaskularnu bolest (Clarke i sar., 1991., Stampfer i sar., 1992, Malinow i sar., 1990, Ducloux i sar., 1998). Koncentracije Hcy su povišene u bubrežnoj insuficijenciji, posle uspešne transplantacije se smanjuju, ali su ipak značajno viši u odnosu na opštu populaciju (Arandottir i sar., 1998). Mutacija u MTHFR genu dovodi do hiperHcy i razmatrana je kao mogući faktor rizika za vaskularne bolesti. Inicijalna observacija Kanga i saradnika sugerise da je termolabilna MTHFR faktor rizika za kardiovaskularnu bolest.

U našoj studiji 47% bolesnika je imalo izraženu aterosklerozu. Ispitivanjem učestalosti i distribucije MTHFR genotipova 677C>T i 1298 A>C nije bilo povezanosti sa izraženošću ateroskleroze. Bolesnici sa izraženom aterosklerozom su bili stariji, imali su češće arterijsku hipertenziju, više vrednosti C reaktivnog proteina i serumskog kreatinina. Nivoi Hcy su bili viši kod bolesnika sa izraženom aterosklerozom, ali bez dostignute statističke značajnosti. Multivarijantna analiza je izdvojila starost kao najznačajniji statistički prediktor i pokazala da sa svakom godinom starosti raste šansa za nastanak plak skora za 14%.

Mnoge studije su ispitivale mutacije MTHFR kao faktor rizika u vaskularnim bolestima u opštoj populaciji, ali sa nekoliko izuzetaka, rezultati većine studija ne podržavaju bilo kakvu asocijaciju. U meta analizi Bratstroma MTHFR 677TT mutacija je glavni uzrok blage hiperhomocisteinemije,

ali ne povećava kardiovaskularni rizik. U nalazima engl. *U.S. Physicians health study* MTHFR 677 TT genotip je udružen sa blagom hiperHcy, ali ne i sa rizikom od akutnog infarkta miokarda. U engl. *Health Professionals Follow up Study* ispitivanja ukazuju na odsustvo asocijacije MTHFR 677 TT genotipa i rizika od kardiovaskularne bolesti. Podaci velike engl. *European population based study* (Stampfer i sar., 1992) ukazuju da je Hcy nezavistan faktor rizika za kardiovaskularnu bolest u MTHFR 677TT genotipu, a da kod MTHFR 677CC i CT genotipova dodatne determinante hiperHcy kao hipertenzija i pušenje mogu povećati vaskularni rizik. Ovaj interakcijski efekat može objasniti zašto su osobe sa MTHFR 677 CC i CT genotipom imale veći rizik od MTHFR 677 TT pri sličnim koncentracijama Hcy. Ovo se objašnjava do sada nedovoljno ispitanom činjenicom da je hiperHcy često povezana sa tradicionalnim faktorima rizika za kardiovaskularne bolesti. Raymond nalazi da je MTHFR 677 TT genotip, uglavnom preko njegovih efekata na nivo uHcy, udružen sa umerenim ali značajnim rizikom, posebno za ishemijsku bolest srca (Raymond i sar., 2003). Refsum i Ueland nalaze da nivoi Hcy u plazmi često nisu presudni, ali mogu uzrokovati vaskularne poremećaje pod uslovima koji predisponiraju vaskularnu bolest (Ueland i sar.).

U našoj studiji multivarijantnom regresionom analizom je izdvojena starost bolesnika kao najznačajnija nezavisna varijabla za izraženost ateroskleroze na karotidnim arterijama. Bolesnici sa izraženom aterosklerozom su imali češće imali hipertenziju, više vrednosti CRP i serumskog kreatinina. Koncentracije Hcy bile su više u grupi bolesnika koji su imali izraženu aterosklerozu, ali bez statističke značajnosti.

Vaskularne kalcifikacije su multifaktorijalna bolest i njihovu patofiziologiju ne može objasniti jedan specifični faktor, već je rezultat udruženosti nekoliko genskih varijanti, interakcije molekularnih puteva i spoljašnjih faktora u nastanku ove bolesti. (Hernández i sar., 2017). Različiti mehanizmi su uključeni u nastanku vaskularnih kalcifikacija u HBB (Martola i sar, 2005, Krasniak i sar., 2007). Pored tradicionalnih i uremijskih faktora rizika koji uključuju inflamaciju, oksidativni stres, hiperhomocisteinemiju, poremećen metabolizam kalcijum i fosfora, povišen paratiroidni hormon, značajnu ulogu imaju inhibitori kalcifikacija.

Nastanak VK je aktivan proces u kome važnu ulogu imaju inhibitori kalcifikacija (Meier-Kriesche i sar,2004; Moe i sar., 2005; Mazzaferro i sar., 2009). Fetuin je glavni cirkulišući i lokalni inhibitor VK. Stenvinkel i saradnici (Stenvinkel i sar., 2005) su pokazali da na sniženje nivoa fetuina A utiče polimorfizam u promotornom genu za fetuina-A u prisustvu inflamacije.

U našem ispitivanju 46,5% od svih bolesnika bolesnika je imalo VK, s tim da je kod bolesnika sa HBB 20,8 % je imalo VK, a kod Tx 55,1%. Poznato je da oko 66% bolesnika sa HBB, 65% PD i 80-85% bolesnika na HD imaju izvestan stepen vaskularnih kalcifikacija (VK) i da svaka godina na HD povećava rizik za VK za 15%. (D.Yuen i sar., 2006) Transplantacija bubrega može usporiti progresiju VK, ali je ne zaustavlja u potpunosti (Podesta i sar., 2021). Medijana vrednosti fetuina za pojavu VK je bila 0,437g/L, ispitanici sa vrednostima fetuina-A iznad medijane su češće imali VK u odnosu na ispitanike sa vrednostima fetuina-A ispod medijane (51,2% vs. 21 %). U univarijantnoj analizi prediktori VK su bili starost, nivo fetuina-A u serumu, polimorfizmi u genu za fetuin 742C>T i 766C>G. U multivarijantnoj analizi starost ispitanika i nivo fetuina-A su bili najznačajniji prediktor VK. Ispitanici su za svaku godinu starosti imali za 17% veću šansu za prisustvo kalcifikacija, a ispitanici sa nivoom fetuina A $\leq 0,437$ su imali oko 5x veću šansu za nastanak VK. Naši nalazi su u skladu sa studijom Hann-a i saradnika (Hann i sar., 2022) koji su kod ispitanika PREVEND (engl. *Prevention of renal and vascular end stage disease*) studije pronašli da polimorfizmi u genu za fetuin 742 C>T utiču na kardiovaskularne ishode posebno kod bolesnika sa HBB i da je Alel 742 T u genu za fetuin je udružen i sa niskim nivoom fetuina i sa arterijskim kalcifikacijama. Takodje, Nori i saradnici (Nor i sar., 2020) nalaze da su 742 CT i TT genotip i alel T udruženi sa kalcifikacijama koronarnih arterija, a da ispitanici sa navedenim genotipovima imaju 1,27 do 1,31 x veću šansu za nastanak kalcifikacija. Marechal i saradnici (Marechal i sar., 2011) nalaze da polimorfizam u genu za fetuin 742C>T nezvezano od inflamacije dovodi do sniženja nivoa fetuina koji je potom udružen sa nastankom VK. Za razliku od toga analiza Laugslanda (Laugslanda i sar., 2015) je pokazala jaku povezanost polimorfi-

zama u genu za fetuin sa nivoima fetuina-A, ali ne i sa koronarnom bolesti u populaciji starijih osoba i navode da je potrebno sprovesti ispitivanja na mlađoj populaciji.

U ovoj studiji nije nađeno lošije preživljavanje MTHFR 677 TT homozigota, ali su značajno niže preživljavanje imali heterozigoti sa MTHFR 677 CT genotipom. Prema podacima u literaturi Boger i saradnici (Boger i sar. 2007) ne nalaze povezanost MTHFR 677C>T genotipova sa mortalitetom bolesnika na dijalizi. Takodje kod bolesnika na hemodijalizi u Italiji nije nađena povezanost sa MTHFR 677C>T genotipovima (Aucella i sar., 2005). Za razliku od toga Jamison i saradnici (Jamison i sar., 2009) su našli uticaj MTHFR T alela i povećanog mortaliteta, tj. da homozigoti TT genotipa MTHFR 677 imaju značajno veći mortalitet drugih MTHFR 677 genotipova. Stoga se nalazi manja učestalost T alela kod bolesnika koji su duže od jedne godine na lečenju dijalizama, sličan trend, ali ne statistički značajan, je nađjen i kod bolesnika sa uznapredovalom HBB, ukazujući da štetan efekat TT genotipa može da se ispolji i pre nastanka terminalne bubrežne slabosti. U pogledu uticaja MTHFR 1298A>C polimorfizma u našoj studiji nije nađena povezanost sa mortalitetom. Drugi autori (Jamison i sar., 2009) nalaze da je povezanost MTHFR 1298A>C polimorfizma sa mortalitetom još kompleksnija. Ispitivali su bolesnike na HD i sa HBB sveukupno i nisu našli povezanost sa MTHFR 1298A>C polimorfizmom, ali nalaze da kod bolesnika na dijalizi MTHFR 1298 C alel pokazuje značajno manji mortalitet što se objašnjava zapažanjem da ovi bolesnici često nisu nosioci MTHFR 677 T alela (tj. nemaju ni TT, niti CT genotip).

Analiza preživljavanja u našoj studiji je pokazala da ispitanici sa IL-6-174CC genotipom imaju značajno lošije preživljavanje u odnosu na heterozigote i ispitanike bez mutacija. Ovakav nalaz je u skladu sa najnovijim rezultatima studije Rocha i saradnika (Rocha i sar., 2021, Spoto i sar., 2015) koje je pokazala da je IL-6 -174CC genotip udružen sa lošijim preživljavanjem bolesnika na dijalizi. U našoj studiji ispitanici sa IL-10 -1082AA genotipom su imali najbolje preživljavanje, a najlošije preživljavanje je bilo kod GA genotipa. Drugi autori nalaze da nema povezanosti IL-10 -1082 G>A polimorfizma sa mortalitetom bolesnika na dijalizi (Kholeif i sar., 2007, Balakrishnan 2004)

U ovoj studiji bolesnici sa 742T alelom u genu za fetuin su imali lošiju šansu za preživljavanje i taj efekat se pogoršavao u prisustvu povišenih parametara inflamacije te je kod tih bolesnika preživljavanje iznosilo 50%, dok su bolesnici bez mutacije imali značajno bolje preživljavanje, posebno u odsustvu inflamacije (100%). Ovakav nalaz je u skladu sa drugim studijama (Stenvinkel i sar., 2005, Marechal i sar., 2011) koje su ispitivale uticaj polimorfizma u genima za fetuin kod bolesnika na hemodijalizi i kod transplantiranih bolesnika, kao i Verdujina (Verdujin i sar, 2011) je ispitivao u velikoj kohorti bolesnika na hemodijalizi iz engl. *Netherlands Cooperative Study on the Adequacy of Dialysis* (NECOSAD) i našao veći rizik za mortalitet kod osoba koje su genetski predisponirane za niže koncentracije fetuina.

7.ZAKLJUČCI

1. Kod 188 bolesnika kod kojih je ispitivan MTHFR 677C>T polimorfizam, učestalost MTHFR 677 TT genotipa je u grupi od 82 bolesnika lečenih ponavljanim hemodijalizama iznosila 12% a u grupi od 106 bolesnika sa stabilnom funkcijom transplantiranog bubrega 9%. Ispitivanje MTHFR 1298 A>C polimorfizma je pokazalo učestalost MTHFR 1298 CC genotipa u prvoj grupi bolesnika 9%, a u drugoj 6%.
2. Kod 128 bolesnika kod kojih je ispitivan interleukin-6-174 G>C polimorfizam, učestalost il-6 -174 CC genotipa je u grupi od 77 bolesnika lečenih ponavljanim hemodijalizama iznosila 18% a u grupi od 51 bolesnika lečenih peritoneumskom dijalizom 15 %. Ispitivanje učestalosti interleukin -10 1082 G>A i 819 T>C polimorfizma je pokazalo učestalost il-10 -1082 AA genotip u prvoj grupi bolesnika 15% a u drugoj 27 % dok je učestalost il -10 -819 CC u prvoj grupi iznosila 3% a u drugoj 9%.
3. Kod 88 bolesnika kod kojih je ispitivana učestalost polimorfizama u genu za fetuin 742C>T i 766 C>G pokazalo se da su oni 100 % vezani i da ona iznosi kod 46 bolesnika sa hroničnom bubrežnom slabosti (stadijum 2-5) 8%, a kod 42 bolesnika sa stabilnom funkcijom transplantiranog bubrega 18%.
4. Ispitivanje povezanosti koncentracije homocisteina sa različitim genotipovima, kod 188 ispitanih bolesnika kao i ispitivanje po grupama nije pokazalo značajne razlike u koncentraciji homocisteina prema različitim MTHFR 677 C>T genotipovima. Kod svih ispitanih bolesnika, kao i u obe grupe bolesnika koncentracija homocisteina je bila najviša kod bolesnika sa MTHFR 1298 CC genotipom ali bez statističke značajnosti.
5. Ispitivanje povezanosti koncentracije interleukina -6 u krvi kod 128 bolesnika sa različitim genotipovima je pokazalo da je koncentracija IL- 6 u krvi je bila značajno viša kod svih bolesnika sa IL-6-174 CC genotipom, i po grupama kod bolesnika lečenih peritoneumskom dijalizom, dok je ona kod bolesnika na hroničnom program lečenja hemodijalizama bila viša ali bez statičke značajnosti. Ispitivanje koncentracije interleukina -10 prema IL-10 -1082 G>A i iL-819 T>C genotipovima je pokazalo da genotipovi IL-10 -1028 AA i IL -10 -819 CC imaju niže vrednosti IL - 10, ali bez statističke značajnosti.
6. Ispitivanje povezanosti koncentracije fetuina-A u krvi kod 88 bolesnika sa različitim genotipovima je pokazalo da su kod svih bolesnika i po grupama kod bolesnika sa stabilnom funkcijom transplantiranog bubrega te koncentracije bile značajno niže kod bolesnika sa fetuin 742 TT genotipom.

7. Ispitivanje povezanosti polimorfizma MTHFR 677 C>T i 1298 A>C kod 128 bolesnika sa ranim i kasnim pokazateljima ateroskleroze (debljina intima medije i izraženost plaka na karotidnim arterijama) je pokazalo da nije bilo statistički značajne povezanosti između različitih genotipova sa ovim parametrima i da je najznačajniji prediktor za ove pokazatelje ateroskleroze bila starost bolesnika.
8. Ispitivanje povezanosti polimorfizma u genu za fetuin 742 C>T kod 88 bolesnika sa učestalošću i izraženošću kalcifikacija na koronarnim arterijama je pokazalo značajnu povezanost fetuin 742 TT genotipa sa njima. Sa kalcifikacijama na koronarnim krvnim sudovima značajno su korelirale i koncentracije fetuina-A $\leq 0,437$ g/l kao i povišena koncentracija C reaktivnog proteina u krvi.
9. Praćenje preživljavanja 188 bolesnika tokom 60 meseci je pokazalo da su bolesnici sa MTHF 677 CT genotipom imali najlošije preživljavanje, a između bolesnika sa različitim MTHFR 1298 genotipovima nije bilo značajnih razlika u preživljavanju. U ovoj grupi bolesnika najznačajniji prediktor smrtnosti je bila starost bolesnika.
10. Praćenje preživljavanja kod 128 bolesnika tokom 36 meseci je pokazalo da su značajno veći mortalitet imali bolesnici sa IL -6 -174 CC genotipom dok različiti polimorfizmi u genu za IL -10 -1082 G>A i -819T>C nisu značajno uticali na preživljavanje. U ovoj grupi bolesnika osim IL- 6 -174 CC genotipa značajni prediktori smrtnosti su bili i koncentracija IL-6, C reaktivnog proteina i albumina u krvi kao i Kt/V.
11. Praćenje preživljavanje kod 88 bolesnika tokom 72 meseca je pokazalo da su bolesnici sa fetuin 742TT genotipom i povišenom koncentracijom C reaktivnog proteina u krvi imali značajno veći mortalitet u odnosu na ispitane ostale fetuin 742 C>T genotipove i niži C-reaktivni protein.

LITETRATURA

- Akchurin OM, Kaskel F. Update on inflammation in chronic kidney disease. *Blood Purif.* 2015;39:84–92.
- Akdag I, Yilmaz Y, Kahvecioglu S, Bolca N, Ercan I, Ersoy A, Gullulu M. Clinical value of the malnutrition-inflammation-atherosclerosis syndrome for long-term prediction of cardiovascular mortality in patients with end-stage renal disease: a 5-year prospective study. *Nephron Clin Pract.* 2008;108(2):c99-c105.
- Aker S, Bantis C, Reis P, Kuhr N, Schwandt C, Grabensee B, Heering P, Ivens K. Influence of interleukin-6 G-174 gene polymorphism on coronary artery disease, cardiovascular complications and mortality in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2009 Sep;24(9):2847-51.
- Arandottir M, Hultberg B, Vladov V, Nillson-Ehle P, Thysell H: Hyperhomocysteinemia in cyclosporine-treated renal transplant recipients. *transplantation.* 1996;61:509-512.
- Arandottir M, Hultberg B, Wahlberg J, Fellstrom B, Dimeny E :Serum total homocysteine concentration before and after renal transplantation. *Kidney International* Vol.54 (1998), pp.1380-1384.
- Argawal R. The challenge of discovering patient-level cardiovascular risk factors in chronic kidney disease. *Kidney International* 2008; 73, 1340–1342.
- Aucella F, Margaglione M, Grandone E, et al. Genetic Polymorphisms in Dialysis Study Group. The C677T methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation does not influence cardiovascular risk in the dialysis population: results of a multicentre prospective study, *Nephrol Dial Transplant*, 2005; (20): 382-386.
- Balakrishnan VS, Guo D, Rao M, Jaber BL, Tighiouart H, Freeman RL, Huang C, King AJ, Pereira BJ; HEMO Study-Group. Cytokine gene polymorphisms in hemodialysis patients: association with comorbidity, functionality, and serum albumin. *Kidney Int.* 2004 Apr;65(4):1449-60
- Barreto DV, Barreto FC, Liabeuf S, Temmar M, Lemke HD, Tribouilloy C, Choukroun G, Vanholder R, Massy ZA, European Uremic Toxin Work Group (EUTox): Plasma interleukin-6 is independently associated with mortality in both hemodialysis and pre-dialysis patients with chronic kidney disease. *Kidney Int* 2019;77: 550-556.
- Batra G, Lakic TG, Lindbäck J, et al. Interleukin 6 and cardiovascular outcomes in patients with chronic kidney Disease and chronic coronary syndrome. *JAMA Cardiol.* Published online August 25, 2021.
- Bellia C, Agnello L, Lo Sasso B, Milano S, Bivona G, Scazzone C, Pivetti A, Novo G, Palermo C, Bonomo V, LaGrutta L, Midiri M, Novo S, Ciaccio M. Fetuin-A is Associated to Serum Calcium and AHSG T256S Genotype but Not to Coronary Artery Calcification. *Biochem Genet.* 2016 Jun;54(3):222-231.
- Böger CA, Stubanus M, Haak T, Götz AK, Christ J, Hoffmann U, Riegger GA, Krämer BK. Effect of MTHFR C677T genotype on survival in type 2 diabetes patients with end-stage diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2007 Jan;22(1):154-62.
- Bostom AG, Gohh RY, Beaulieu AJ, Han H, Jacques PH, Selhub J, Dworin I, Rosenberg IH: Determinants of fasting total plasma homocysteine levels among chronic stable renal transplant recipients. *transplantation* 1999; 68: 257-261
- Blankenberg S, Rupprecht HJ, Peetz D, Bickel C, Hofman KP, Tiret L, Meyer J. Homocysteine, Methylenetetrahydrofolat reductase/C677T-Genotyp und Risiko für koronare Herzkrankheit. Die AtheroGene Studie Homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase/C677T genotype and risk for coronary heart disease. The AtheroGene study. *Dtsch Med Wochenschr.* 2002 Apr 5;127(14):729-35.
- Brattstrom L, Israellson B, Lingarde F, Hultberg B: Higher total plasma homocysteine in vitamin B12 deficiency than in heterozygosity for homocystinuria due to cystathionase β-synthase deficiency. *Metabolism* 1998; 37:175-178

- Burzotta F, Iacoviello L, Di Castelnuovo A, et al. Relation of the -174 G/C polymorphism of interleukin-6 to interleukin-6 plasma levels and to length of hospitalization after surgical coronary revascularization. *Am J Cardiol*, 88 (2001), 1112-1125
- Caglar K, Yilmaz MI, Saglam M, Cakir E, Kilic S, Sonmez A, et al. (2008). Serum fetuin-a concentration and endothelial dysfunction in chronic kidney disease. *Nephron Clin Pract*, 108:c233-240.
- Carrero J, Stenvinkel P. Inflammation in end-stage renal disease--what have we learned in 10 years? *Semin Dial*. 2010 Sep-Oct;23(5):498-509
- Clarke R, Daly L, Robinson K et al. Hyperhomocysteinemia :an independent risk factor for vascular disease. *N.Engl J Med* 1991;324:1149-1155
- Coen G, Manni M, Agnoli A, Balducci A, Dessi M, De Angelis S, Jankovic L, Mantella D, Morosetti M, Naticchia A, Nonfroni I, Romagnoli A, Gallucci MT, Tomassini M, Simonetti G, Splendiani G. Cardiac calcifications: Fetuin-A and other risk factors in hemodialysis patients. *ASAIO J*. 2006 Mar-Apr;52(2):150-6.
- Cohen SD, Phillips TM, Khetpal P, Kimmel PL. Cytokine patterns and survival in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2010 Apr;25(4):1239-43
- Collins AJ, Li S, Ma JZ, Herzog C. Cardiovascular disease in end-stage renal disease patients. *Am J Kidney Dis*. 2001 Oct;38(4 Suppl 1):S26-9.
- Corredor Z, Filho MIDS, Rodríguez-Ribera L, Velázquez A, Hernández A, Catalano C, Hemminki K, Coll E, Silva I, Diaz JM, Ballarin J, Vallés Prats M, Calabia Martínez J, Försti A, Marcos R, Pastor S. Genetic Variants Associated with Chronic Kidney Disease in a Spanish Population. *Sci Rep*. 2020 Jan 10;10(1):144
- Cortese C, Motti C. MTHFR gene polymorphism, homocysteine and cardiovascular disease. *Public Health Nutr*. 2001 Apr;4(2B):493-7.
- Cozzolino M, Butti A, Chiarelli G, Rocca-Rey L, Santagostino G, Gallieni M, Brancaccio D. Calcificazioni cardiovascolari e aterosclerosi accelerata in corso di uremia [Cardiovascular calcification and accelerated atherosclerosis in chronic kidney disease]. *Ital Heart J Suppl*. 2005 Jan;6(1):25-8.
- Douclox D, Fournier V, Rebibou JM, Bresson-Vautrin C, Gibey R, Chalopin JM: Hyperhomocyst(e)inemia in renal transplant recipients with and without cyclosporine. *Clin Nephrol* 1998;49:232-235
- Ducloux D, Rudein C, Givey R, Vautrin P, Bresson-Vautrin C, rebibou JM, Chalopin JM: Prevalence determinants and clinical significance of hyperhomocyst(e)inemia in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:2890-2893
- Ducloux D, Klein A, Kazory A, Devillard N, Chalopin JM. Impact of malnutrition-inflammation on the association between homocysteine and mortality. *Kidney Int*. 2006 Jan;69(2):331-5.
- Drüeke TB. Pathophysiological aspects of vascular calcification in chronic renal failure. *Nefrologia*. 2005;25 Suppl 2:96-9.
- Finkelstein JD: Methionin metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1990; 1:228
- Fisher E, Stefan N, Saar K, Drogan D, Schulze MB, Fritsche A, Joost HG, Häring HU, Hubner N, Boeing H, Weikert C. Association of AHSR gene polymorphisms with fetuin-A plasma levels and cardiovascular diseases in the EPIC-Potsdam study. *Circ Cardiovasc Genet*. 2009 Dec;2(6):607-13.
- Filiopoulos, V., Vlassopoulos D. Inflammatory syndrome in chronic kidney disease: pathogenesis and influence on outcomes. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2009;8(5):369-382).
- Födinger M, Wöfl G, Fischer G, Rasoul-Rockenschaub S, Schmid R, Hörl WH, Sunder-Plassmann G. Effect of MTHFR 677C>T on plasma total homocysteine levels in renal graft recipients. *Kidney Int*. 1999 Mar;55(3):1072-80.
- Födinger M, Wagner OF, Hörl WH, Sunder-Plassmann G. Recent insights into the molecular genetics of the homocysteine metabolism. *Kidney Int Suppl*. 2001 Feb;78:S238-42.
- Fodinger M, Buchmayer H., Heinz G., Papagiannopoulos M., Kletzmayer J., Rasoul-Rockenschaub S., Horl W. and

- Saunders-Plasman G.: Effect of MTHFR 1298 A→C and MTHFR 677 C→T genotypes on total homocysteine, folate and vitamin B 12 plasma concentrations in kidney graft recipients. *J Am Soc Nephrol* 11:1918-1925, 2000
- Floege J, Ketteler M. Vascular calcification in patients with end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2004 Aug;19 Suppl 5:V59-66. doi: 10.1093/ndt/gfh1058.
- Frosst P, HJ Blom, et al. "A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase [letter]. *Nat Genet* 10 (1) 1995; 111-3.
- Gaughan DJ, Barbaux S., Kluijtmans LA, Whitehead AS: The human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes: genomic organization, mRNA structure and linkage to the CLCN6 gene. *Gene* 2000;257:279-289.
- Geoffrey A. Block, David M. Spiegel, James Ehrlich, Ravindra Mehta, Jill Lindbergh, Albert Dreisbach, Paolo Raggi, Effects of sevelamer and calcium on coronary artery calcification in patients new to hemodialysis, *Kidney International*, Volume 68, Issue 4, 2005, Pages 1815-1824.
- Ghanavati S, Diep LM, Bárány P, Heimbürger O, Seeberger A, Stenvinkel P, Rohani M, Agewall S. Subclinical atherosclerosis, endothelial function, and serum inflammatory markers in chronic kidney disease stages 3 to 4. *Angiology*. 2014 May;65(5):443-9.
- Girndt M, Kaul H, Sester U, et al. Anti-inflammatory interleukin-10 genotype protects dialysis patients from cardiovascular events. *Kidney Int*. 2002; 62: 949-955
- Godišnji izveštaj Udruženja nefrologa Srbije, 2012. Beograd: Udruženje nefrologa Srbije 2014.
- Go A.S., G.M. Chertow, D. Fan, *et al.* Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization *N Engl J Med*, 351 (2004), pp. 1296-1305.
- Goldsmith DJ, Covic A. Coronary artery disease in uremia: Etiology, diagnosis, and therapy. *Kidney Int*. 2001 Dec;60(6):2059-78.
- Gregg J, Bando JM, Crandall BF, Grody WW. Frequencies of two common polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene in four different ethnic American populations. *Am J Hum Genet* 1998;63 Supl 1: A 213.
- Gupta N, Mitra, P. A. Kanetsky et al., "Association between albuminuria, kidney function, and inflammatory biomarker profile in CKD in CRIC," *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 7, no. 12, pp. 1938–1946, 2012.
- Haef J. Current trends in European renal epidemiology. *Clin Kidney J* 2017; 10(2) : 149-153
- Haan Amber, Ahmadizar Fariba, van der Most Peter J., Thio Chris H. L., Kamali Zoha, Ani Alireza, Ghanbari Mohsen, Chaker Layal, van Meurs Joyce, Ikram M. Kamran, van Goor Harry, Bakker Stephan J. L., van der Harst Pim, Snieder Harold, Kavousi Maryam, Pasch Andreas, Eijgelsheim Mark, de Borst Martin H. Genetic Determinants of Serum Calcification Propensity and Cardiovascular Outcomes in the General Population, *Frontiers in Cardiovascular Medicine* (8) 2022
- Hamirani YS, Pandey S, Rivera JJ, Ndumele C, Budoff MJ, Blumenthal S, Nasir K. Markers of inflammation and coronary artery calcification: a systematic review. *Atherosclerosis* 2008. 201(1):1-7.
- Hermans MM, Brandenburg V, Ketteler M, Kooman JP, van der Sande FM, Boeschoten EW, Leunissen KM, Krediet RT, Dekker FW; Netherlands cooperative study on the adequacy of Dialysis (NECOSAD). Association of serum fetuin-A levels with mortality in dialysis patients. *Kidney Int*. 2007 Jul;72(2):202-7.
- Hoffmann SC, Stanley EM, Cox ED, DiMercurio BS, Koziol DE, Harlan DM, Kirk AD, Blair PJ. Ethnicity greatly influences cytokine gene polymorphism distribution. *Am J Transplant*. 2002 Jul;2(6):560-7
- Honda H, Qureshi AR, Heimbürger O, Barany P, Wang K, Pecoits-Filho R, Stenvinkel P, Lindholm B: Serum albumin, C-reactive protein, interleukin 6, and fetuin A as predictors of malnutrition, cardiovascular disease, and mortality in patients with ESRD. *Am J Kidney Dis* 47: 139–148, 2006
- Howren MB, Lamkin DM, Suls J. Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis. *Psychosom Med*. 2009 Feb;71(2):171-86.

- Icer MA, Yildiran H. Effects of fetuin-A with diverse functions and multiple mechanisms on human health. *Clin Biochem.* 2021 Feb;88:1-10.
- Ignatescu MC, Kletzmayer J, Fodinger M, Bieglmayer C, Horl WH, Sunder-Plasman G. Influence of mycophenolic acid and tacrolimus on homocysteine metabolism. *Kidney Int.* 2002 May;61(5):1894-8.
- Jacques PF, Bostom AG, Wilson PW, Rich S, Rosenberg IH, Selhub J. Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring cohort. *Am J Clin Nutr.* 2001 Mar;73(3):613-21
- Jansz TT, Verhar MC, London G, Van Jaarsveld BC. Is progression of coronary artery calcification influenced by modality of renal replacement therapy? A systematic review. *Clinical Kidney Journal.* 2018 11 (3): 353–361
- Jamison RL, Hartigan P, Kaufman JS, Goldfarb DS, Warren SR, Guarino PD, Gaziano JM; Veterans Affairs Site Investigators. Effect of homocysteine lowering on mortality and vascular disease in advanced chronic kidney disease and end-stage renal disease: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2007 Sep 12;298(10):1163-70.
- Jensen MK, Jensen RA, Mukamal KJ, et al. Detection of genetic loci associated with plasma fetuin-A: a meta-analysis of genome-wide association studies from the CHARGE Consortium. *Hum Mol Genet.* 2017;26(11):2156-2163.
- Jenny NS, Tracy RP, Ogg MS, Luong A, Kuller LH, Arnold AM, Sharrett AR, Humphries SE: In the elderly, interleukin-6 plasma levels and the -174G>C polymorphism are associated with the development of cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*22: 2066–2071, 2002
- Jones KG, Brull DJ, Brown LC, Sian M, Greenhalgh RM, Humphries SE, Powell JT: Interleukin-6(IL-6) and the prognosis of abdominal aortic aneurysms. *Circulation*103: 2260–2265, 2001.
- Ko GJ, Kim MG, Yu YM, Jo SK, Cho WY, Kim HK. Association between depression symptoms with inflammation and cardiovascular risk factors in patients undergoing peritoneal dialysis. *Nephron Clin Pract.* 2010;116(1):c29-35
- Köttgen A, Glazer NL, Dehghan A, Hwang SJ, Katz R, Li M, Yang Q, Gudnason V, Launer LJ, Harris TB, Smith AV, Arking DE, Astor BC, Boerwinkle E, Ehret GB, Ruczinski I, Scharpf RB, Chen YD, de Boer IH, Haritunians T, Lumley T, Sarnak M, Siscovick D, Benjamin EJ, Levy D, Upadhyay A, Aulchenko YS, Hofman A, Rivadeneira F, Uitterlinden AG, van Duijn CM, Chasman DI, Paré G, Ridker PM, Kao WH, Witteman JC, Coresh J, Shlipak MG, Fox CS. Multiple loci associated with indices of renal function and chronic kidney disease. *Nat Genet.* 2009 Jun;41(6):712-7.
- Kang SS, Zhou J, Wong PWK, Kowalysyn J, Strokosch G: Intermediate homocysteinemia: A thermolabile variant of methylentetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* 1988;43:414-421
- Kalender B, Ozdemir AC, Koroglu G. Association of depression with markers of nutrition and inflammation in chronic kidney disease and end-stage renal disease. *Nephron Clin Pract* 2006;102:c115–21.
- Ketteler M, Bongartz P, Westendorf R, Wildberger JE, Mahnen AH, Böhm R, Metzger T, Wanner C, Jahnke-Dechent W, Floege J. Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. *Lancet.* 2003 Mar 8;361(9360):827-33.
- Ketteler M, Gross ML, Ritz E. Calcification and cardiovascular problems in renal failure. *Kidney Int. Suppl.,* 94:S120-7.
- Klerk M, Verhoef P, Clarke R, et al. *MTHFR* 677C→T Polymorphism and Risk of Coronary Heart Disease: A Meta-analysis. *JAMA.* 2002;288(16):2023–2031.
- Kraśniak A, Drozd M, Pasowicz M, Chmiel G, Michałek M, Szumilak D, Podolec P, Klimeczek P, Koniecznyńska M, Wicher-Muniak E, Tracz W, Khoa TN, Souberbielle JC, Druke TB, Sulowicz W. Factors involved in vascular calcification and atherosclerosis in maintenance haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2007 Feb;22(2):515-21.
- Kramer H, Toto R, Peshock R, Cooper R. Association between chronic kidney disease and coronary artery calcification: the Dallas Heart Study. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2005, 2:507-13.
- Kumar S, Bogle R, Banerjee D. Why do young people with chronic kidney disease die early? *World J. Nephrol.* 2014, 4:143-55.

Kurzawski M, Pawlik A, Czerny B, Domański L, Rózański J, Drożdżik M. Frequencies of the common promoter polymorphisms in cytokine genes in a Polish population. *Int J Immunogenet.* 2005 Oct;32(5):285-91.

Kyriakidis NC, Cobo G, Dai L, Lindholm B, Stenvinkel P. Role of Uremic Toxins in Early Vascular Ageing and Calcification. *Toxins (Basel).* 2021 Jan 3;13(1):26.

Lary Jameson JL and Petter Kopp: Genetics and Diseases. In: Eugene Braunwald, Antony S Fauci, Dennis L Kasper, Stephen I Hauser, Dan L Longo, J Larry Jameson, Harrison's Principals of Internal Medicine, 15th ed. New York 2001; 375-396.

Laysaght MJ: Maintenance dialysis population dynamics: Current trends and long-term implications. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: (supl 1), p 37-40.

LI WH: Molecular evolution. Sinauer Associates., Inc. Publishers, MA, USA, 1997. International Sequencing Consortium (IHGSC): Initial sequencing and analysis of the human genome in *Nature* 2001;409:860-921. Gray IC, Campbell DA, Spurr NK. Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics. *Hum Mol Genet.* 2000 Oct;9(16):2403-8. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet (London, England)*, 395(10225), 709–733.

Laugsand LE, Ix JH, Bartz TM, et al. Fetuin-A and risk of coronary heart disease: A Mendelian randomization analysis and a pooled analysis of AHSR genetic variants in 7 prospective studies. *Atherosclerosis.* 2015;243(1):44-52.

Malinow MR: Hyperhomocystein(e)mia: a common and easily reversible factor of occlusive atherosclerosis. *Circulation* 1990; 81:2004-2006

Massy ZA, Chadeaux-Vekemans B, Chevalier A, Bader CA, Druke TB, Legendre C, Lacour B, Kamoun P and Kreis H: Hyperhomocysteinemia: a significant risk for cardiovascular disease in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transpl* 1994, 9:1103-1108.

Margaret W Thompson, Roderick R Mc Innes, Huntington F Willard. Structure and Function of Chromosomes and genes. In: *Genetics in Medicine*, 15th ed., 1991; 31-51.

Mark A Vickers, Fiona R Green, Catherine Terry, Bongani M Mayosi, Cecile Julier, Mark Lathrop, Peter J Ratcliffe, Hugh C Watkins, Bernard Keavney, Genotype at a promoter polymorphism of the interleukin-6 gene is associated with baseline levels of plasma C-reactive protein, *Cardiovascular Research*, Volume 53, Issue 4, March 2002, Pages 1029–1034.

Martola L, Elinder CG, Stenvinkel P. Varför får njursjuka ett hjärta av sten? Störd kalk-fosfatbalans och kronisk inflammation viktiga orsaker [Why do patients with kidney diseases end up with a heart of stone? Disturbances in calcium-phosphate balance and chronic inflammation important causes. *Lakartidningen.* 2003 Dec 11;100(50):4180-3. Swedish. PMID: 14717005.

Marechal C, Schlieper G, Nguyen P, Kruger T, Coche E, Robert A, et al. (2011). Serum fetuin-A levels are associated with vascular calcifications and predict cardiovascular events in renal transplant recipients. *Clin J Am Soc Nephrol*, 6:974-985

Mazzaferro S, Pasquali M, Pugliese F, et al: Serum levels of calcification inhibition proteins and coronary artery calcium score: comparison between transplantation and dialysis. *Am J Nephrol* 2007;27:75–83.)

Mehrotra R. Emerging role for fetuin-A as contributor to morbidity and mortality in chronic kidney disease. *Kidney International* 2007; 72, 137–140.

Meier Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Reed A, Kaplan B. Kidney transplantation halts cardiovascular disease progression in patients with end-stage renal disease. *Am. J. Transplant.* 2004, 4(10):1662-8.

Moe S, Reslerova M., Ketteler M., Westenfeld R, Jahnke-Dechent W, Chen N. Role of calcification inhibitors in the pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease (CKD) *Kidney Int* 67(6)2295-2304 .

Moe SM, Chen NX. Pathophysiology of vascular calcification in chronic kidney disease. *Circ Res.* 2004 Sep 17;95(6):560-7.

Mohammad Taraz, Saeideh Taraz, Simin Dashti-Khavidaki. Association between depression and inflammatory/anti-inflammatory cytokines in chronic kidney disease and end-stage renal disease patients: A review of literature. *Hemodialysis International* 2014;6:11-22

Mohammadi-Noori E, Salehi N, Mozafari H, Elieh Ali Komi D, Saidi M, Bahrehmand F, Vaisi-Raygani A, Elahirad S, Moini A, Kiani A. Association of AHSR gene polymorphisms with serum Fetuin-A levels in individuals with cardiovascular calcification in west of Iran. *Mol Biol Rep.* 2020 Mar;47(3):1809-1820.

Morita Y, Yamamura M, Kashihara N, Makino H. Increased production of interleukin-10 and inflammatory cytokines in blood monocytes of hemodialysis patients. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 1997;98(1):19–33

Naomi Q Hanson, Omer Aras, Feng Yang and Michael Y Tsai: C677T and A1298C polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene: Incidence and effect of combined genotypes on plasma fasting and post-methionine load homocysteine in vascular disease. *Clinical Chemistry* 2001;47:661-666.

Nygard O, Refsum H, Keland PM, Vollset SE: Major lifestyle determinants of plasma total homocysteine distribution. *Am J Clin Nutr* 1998;67:263-70.

Okada R, Wakai K, Naito M, Morita E, Kawai S, Hamajima N, Hara M, Takashima N, Suzuki S, Takezaki T, Ohnaka K, Arisawa K, Hirohata H, Matsuo K, Mikami H, Kubo M, Tanaka H; Japan Multi-Institutional Collaborative Cohort (J-MICC) Study Group. Pro-/anti-inflammatory cytokine gene polymorphisms and chronic kidney disease: a cross-sectional study. *BMC Nephrol.* 2012 Jan 9;13:2

Osganian S, Stampfer M, Spiegelman D, Rimm E, Cutler J, Feldman H et al: Distribution of and factors associated with serum homocysteine levels in children. *JAMA* 1999;281:1189-96.

Podesta MA, Cucchiari D, Ciceri P, Messa P, Torregrosa JV, Cozzolino M. Cardiovascular calcifications in kidney transplant recipients. *Nephrol. Dial Transplant.* 2021, 9-1

Price P.A. Buckley J.R. Williamson M.K. The amino bisphosphonate ibandronate prevents vitamin D toxicity and inhibits vitamin D-induced calcification of arteries, cartilage, lungs and kidneys in rats. *J Nutr.* 2001; 131: 2910-2915

Pérez-Hernández N, Aptilon-Duque G, Blachman-Braun R, Vargas-Alarcón G, Rodríguez-Cortés AA, Azrad-Daniel S, Posadas-Sánchez R, Rodríguez-Pérez JM. Vascular Calcification: Current Genetics Underlying This Complex Phenomenon. *Chin Med J (Engl).* 2017 May 5;130(9):1113-1121

Raison CL, Capuron L, Miller AH. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol.* 2006 Jan;27(1):24-31.

Raymond M, Ueland PM, Blom H et al: Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase, homocysteine, and cardiovascular disease risk: the European Concerted Action project. *Am J of Clin Nutrition*; Jan 2003, Vol. 77, No 63-70.

Rocha, S., Valente, M.J., Coimbra, S. *et al.* Interleukin 6 (rs1800795) and pentraxin 3 (rs2305619) polymorphisms- association with inflammation and all-cause mortality in end-stage-renal disease patients on dialysis. *Sci Rep* 11, 14768 (2021).

Ross R :Atherosclerosis-An Inflammatory Disease. *New Engl J Med* 1999;340(2):115-26. Klerk, M.; Verhoef, P.; Clarke, R.; Blom, H. J.; Kok, F. J.; Schouten, E. G.; MTHFR Studies Collaboration Group : MTHFR 677C-T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *J.A.M.A.* 2002; 288: 2023-2030
Refsum H, Ueland PM. Population determinants of homocysteine. *Am J Clin Nutr.* 2001 Mar; 73(3):499-500.

Rettig R, Sadler J., Meyer K., *et al.* Assessing health and quality of life outcomes in dialysis: A report on an Institute of Medicine workshop *Am J Kidney Dis*, 30 (1997), pp.

Rex L. Jamison, Mei-Chiung Shih, Donald E. Humphries, Peter D. Guarino, James S. Kaufman, David S. Goldfarb, Stuart R. Warren, J. Michael Gaziano, Philip Lavori, Effect of the MTHFR C677T and A1298C Polymorphisms on Survival in Patients With Advanced CKD and ESRD: A Prospective Study, *American Journal of Kidney Diseases*, Volume 53, Issue 5, 2009, Pages 779-789, ISSN 0272-6386.

Reynolds JL, Skepper JN, McNair R, Kasama T, Gupta K, Weissberg PL, Jahnen-Dechent W, Shanahan CM. Multifunctional roles for serum protein fetuin-a in inhibition of human vascular smooth muscle cell

calcification. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Oct;16(10):2920-30.

Roumeliotis S, Roumeliotis A, Dounousi E, Eleftheriadis T, Liakopoulos V, Chapter Four - Biomarkers of vascular calcification in serum, Editor(s): Gregory S. Makowski, *Advances in Clinical Chemistry*, Elsevier, Volume 98, 2020, Pages 91-147.

Rudloff S, Jahnen-Dechent W, Huynh-Do U. Tissue chaperoning-the expanded functions of fetuin-A beyond inhibition of systemic calcification. *Pflugers Arch.* 2022 Apr 11.

Russo D, Palmiero G, De Blasio AP, Balletta MM, Andreucci VE. Coronary artery calcification in patients with CRF not undergoing dialysis. *Am. J. Kidney Dis.* 2004, 6:1024-30.

Sarnak MJ. Cardiovascular complications in chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis.* 2003;41(5 Suppl):11-7.

Sarnak MJ, A.S. Levey, A.C. Schoolwerth, *et al.* Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology.

Scelhub J, Miller JW: The pathogenesis of homocysteinemia: Interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of remethylation and transulfuration of homocysteine. *Am J Clin Nutr* 1992; 55:131-8.

Selhub J: Homocysteine metabolism. *Ann Rev Natur* 1999;19:217-246

Schlieper G. Vascular calcification in chronic kidney disease: not all arteries are created equal. *Kidney International* 2014; 85: 501–503.

Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JF. Chronic Kidney Disease: Effects on the Cardiovascular System. *Circulation*, 2007, 118:85-97.

Shroff RC, Shanahan CM. The vascular biology of calcification. *Semin Dial.* 2007 Mar-Apr;20(2):103-9.

Simon A. Jones, Donald J. Fraser, Ceri A Fielding, Gareth W. Jones, Interleukin-6 in renal disease and therapy, *Nephrology Dialysis Transplantation*, Volume 30, Issue 4, April 2015, Pages 564–574.

Simona Mihai, Elena Codrici, Ionela Daniela Popescu, Ana-Maria Enciu, Lucian Albuлесcu, Laura Georgiana Necula, Cristina Mambet, Gabriela Anton, Cristiana Tanase, "Inflammation-Related Mechanisms in Chronic Kidney Disease Prediction, Progression, and Outcome", and *Epidemiology and Prevention Circulation*, 108 (2003), pp. 2154-2169.

Smith ER, Hanssen E, McMahoin L, Holt SG. Fetuin-A containing calciprotein particles reduce mineral stress in macrophage, *Plos One* 2013.

Spoto B, Mattace-Raso F, Eric Sijbrands E, Leonardis D, Testa A, Pisano A, Pizzini P, Cutrupi S, Parlongo R, D'Arrigo G, Tripepi G, Mallamaci F and Zoccali C, Association of IL-6 and a Functional Polymorphism in the IL-6 Gene with Cardiovascular Events in Patients with CKDCJASN February 2015, 10 (2) 232-240.

Stampfer MJ, Malinow MR, Willet WC et al. A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA* 1992;268:877-881.

Stenvinkel P, Heimbürger O, Paulre F, Diczfalusy U, Wang T, Berglund L, Jogestrand T. Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int.* 1999 May;55(5):1899-911.

Stenvinkel P, Heimbürger O, Lindholm B, Kaysen GA, Bergström J. Are there two types of malnutrition in chronic renal failure? Evidence for relationships between malnutrition, inflammation and atherosclerosis (MIA syndrome). *Nephrol Dial Transplant.* 2000 Jul;15(7):953-60.

Stenvinkel P, Wanner C, Metzger T, et al. Inflammation and outcome in end-stage renal failure: does female gender constitute a survival advantage? *Kidney Int.* 2002;62(5):1791–1798.

Stenvinkel P, Barany P, Heimbürger O, Pecoits-Filho R, Lindholm B: Mortality, malnutrition, and atherosclerosis in ESRD: what is the role of interleukin-6? *Kidney Int* 2002;80(suppl):S103-S108.

Stenvinkel P, Pecoits-Filho R, Lindholm B; DialGene Consortium. Gene polymorphism association studies in dialysis: the nutrition-inflammation axis. *Semin Dial.* 2005 Jul-Aug;18(4):322-30.

- Stenvinkel P, Wang K, Qureshi AR et al: Low fetuin-A levels are associated with cardiovascular death: impact of variations in gene encoding fetuin. *Kidney Int* 2005;67:2383-2392
- Stenvinkel P, Alvestrand A: Inflammation in end-stage renal disease: sources, consequences, and therapy. *Semin Dial* 2002;15:329-337 *Journal of Immunology Research*, vol. 2018, Article ID 2180373, 16 pages, 2018.
- Stevenson RE, Schwartz CE, Du Y-Z, Adams MJ Jr; Differences in methylenetetrahydrofolate reductase genotype frequencies between whites and blacks. *Am J Hum Genet* 1997; 60:229–23. Stenvinkel
- Ketteler P, Johnson RJ, Lindholm B, Pecoits-Filho R, Riella M, Heimbürger O, Cederholm T, Girndt M: IL-10, IL-6, and TNF- α : Central factors in the altered cytokine network of uremia—the good, the bad, and the ugly. *Kidney Int* 67: 1216–1233, 2005
- Talbot B, Athavale A, Jha V, Gallagher M. Data Challenges in Addressing Chronic Kidney Disease in Low- and Lower-Middle-Income Countries. *Kidney Int Rep.* 2021 Apr 17;6(6):1503-1512.
- Tremblay R, Bonnardeaux A, Geadah D, Busque L, Lebrun M, Ouimet D, Leblanc M, Hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients: Effects of 12-month supplementation with hydrosoluble vitamins, *Kidney International*, Volume 58, Issue 2, 2000, Pages 851-858, ISSN 0085-2538,
- Tripepi G, Mallamaci F, Zoccali C. Inflammation markers, adhesion molecules, and all-cause and cardiovascular mortality in patients with ESRD: searching for the best risk marker by multivariate modeling. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Mar;16 Suppl 1:S83-8.
- United States Renal Data System Coordinating Center. *USRDS 2013 Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States.* Bethesda, MD, United States: National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK), National Institutes of Health, 2013.
- Ueland PM, Refsum H, Brattstrom I. Plasma homocysteine and cardiovascular disease. In Francis RB Jr ed. *Atherosclerotic cardiovascular disease, hemostasis, and endothelial function.* New York: Marcel Dekker Inc, 1192; 183-236.
- Vincent W, Dennis R, Killian R: Homocysteinemia and vascular disease in end stage renal disease. *Kidney International* 50(Suppl.57)1996;S11-S13.
- Vaidyanathapuram S, Balakrishnan, Daqing Guo, Madhumathi Rao, Bertrand L. Jaber, Hocine Tighiouart, Richard L. Freeman, Chao Huang, Andrew J. King, Brian J.G. Pereira, The HEMO Study Group. Cytokine gene polymorphisms in hemodialysis patients: Association with comorbidity, functionality, and serum albumin, *Kidney International*, Volume 65, Issue 4, 2004, Pages 1449-1460, ISSN 0085-2538.
- Verdujin M, Prein RA, Stenvinkel P, Carrero JJ, Le Cessie S, Witasp A, Nordfors L, Krediet RT, Krediet RT, Boeschoten EW, Dekker FW. Is fetuin-A a mortality risk factor in dialysis patients or a mere risk marker? A Mendelian randomization approach. *Nephrol. Dial Transplant.* 2011, 26(1):239-45.
- Vollset SE, Jähnen-Dechent W., Schäfer C., Heiss A. et al. Systemic inhibition of spontaneous calcification by the serum protein α 2-HS glycoprotein/fetuin. *Z Kardiol* 90, 47–56 (2001).
- Weissa N, Kellera Ch, Hoffmann U, Loscalzo J. Endothelial dysfunction and atherothrombosis in mild hyperhomocysteinemia. *Vasc Med* 2002; 7: 227-239)
- Yen YJ. The role of homocysteine in end stage renal disease. *Seminars in Dialysis* 1998;11(2):95-101.
- Yilmaz MI, Solak Y, Saglam M, et al. The relationship between IL-10 levels and cardiovascular events in patients with CKD. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014 Jul;9(7):1207-16.
- Zhou Z, Ji Y, Ju H, Chen H, Sun M. Circulating Fetuin-A and Risk of All-Cause Mortality in Patients With Chronic Kidney Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Physiol.* 2019 Jul 30;10:966.
- Zoccali C, Tripepi G, Mallamaci F: Dissecting inflammation in ESRD: Do cytokines and C-reactive protein have a complementary prognostic value for mortality in dialysis patients? *J Am Soc Nephrol* 17[Suppl 3]: S169–S173, 2006

BIOGRAFIJA

Svetlana Jovičić Pavlović rođena je 12.09.1963.god. u Sarajevu.

Medicinski fakultet u Beogradu završila 1987.god.

Od 1990. god.zaposlena na Klinici za nefrologiju UKCS.

Specijalistički ispit iz Interne medicine položila 1996.god. sa odličnom ocenom.

Magistarsku tezu sa temom Povezanost polimorfizam gena za metilen tetrahidrofolat reduktazu sa koncentracijom homocisteina i karotidnomaterosklerozom kod bolesnika sa transplantiranim bubregom je odbranila na Medicinskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu 2006. godine.

Užu specijalizaciju iz nefrologije sa temom Analiza činilaca koji utiču na ishod lečenja bolesnika na hroničnom programu hemodijalize završila na Medicinskom fakultetu u Beogradu 2010.godine.

Objavila je više naučnih radova u domaćim i inostranim časopisima.

Član je Srpskog lekarskog društva, Udruženja nefrologa Srbije, Evropskog udruženja nefrologa, Evropskog udruženja za transplantaciju organa.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Svetlana Jovicic Pavlovic

Број индекса _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

ISPITIVANJE POVEZANOSTI GENSKIH POLIMORFIZAMA SA KARDIOVASKULARNIM
BOLESTIMA KOD BOLESNIKA SA TERMINALNOM BUBREŽNOM SLABOSTI

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

Потпис аутора

У Београду, 11.05.2022.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Svetlana Jovicic Pavlovic

Број индекса _____

Студијски програм _____

Наслов рада ISPITIVANJE POVEZANOSTI GENSKIH POLIMORFIZAMA SA KARDIOVASKULARNIM BOLESTIMA KOD BOLESNIKA SA TERMINALNOM BUBREŽNOM SLABOSTI

Ментор Prof Dr Ivana Novakovic

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 11.05.2022.

Изјава о коришћењу

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

ISPITIVANJE POVEZANOSTI GENSKIH POLIMORFIZAMA SA KARDIOVASKULARNIM BOLESTIMA KOD BOLESNIKA SA TERMINALNOM BUBREŽNOM SLABOSTI

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____
