

# Povezanost eozinofilnoga kationskoga proteina s uznapredovalošću ateroskleroze karotidne arterije i sveukupnim preživljenjem bolesnika na programu kronične hemodijalize

---

Sičaja, Mario

Doctoral thesis / Disertacija

2013

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:465798>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-14**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Mario Sičaja**

**Povezanost eozinofilnoga kationskoga  
proteina s uznapredovalošću  
ateroskleroze karotidne arterije i  
sveukupnim preživljenjem bolesnika  
na programu kronične hemodijalize**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2013.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Mario Sičaja**

**Povezanost eozinofilnoga kationskoga  
proteina s uznapredovalošću  
ateroskleroze karotidne arterije i  
sveukupnim preživljenjem bolesnika  
na programu kronične hemodijalize**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2013.

Rad je izrađen na Klinici za unutarnje bolesti i Kliničkom zavodu za biokemiju i laboratorijsku medicinu Kliničke bolnice «Dubrava».

Zahvaljujem se svojim mentorima, prof.dr.sc. Velimiru Božikovu i prof.dr.sc. Željku Romiću za podršku i savjete.

Zahvalan sam kolegama s Kliničkog zavoda za biokemiju i laboratorijsku medicinu, Zavoda za neurologiju, Zavoda za bolesti srca i krvnih žila i Zavoda za nefrologiju i dijalizu bez čije pomoći tehnički dio rada ne bi bio moguć.

Posebna hvala mojoj supruzi Maria Nicole na strpljenju i podršci pri izradi ovoga rada.

Disertaciju posvećujem mojim roditeljima Slavici i Marinku, njihov rad i trud inspiracija je za ići korak naprijed...

Voditelji rada:

Prof.dr.sc. Velimir Božikov i prof.dr.sc. Željko Romić

## **Popis kratica i znakova:**

95% CI – 95% interval pouzdanosti

ACE-blokatori - blokatori angiotenzin konvertirajućeg enzima

AGE – uznapredovali međuproducti glikacije

AT II – blokatori – blokatori angiotenzinskih receptora klase II

ECP – eozinofilni kationski protein

GM-CSF – granulocitno-monocitni čimbenik stimulacije kolonija

HDL- lipoprotein visoke gustoće

Hgb – hemoglobin

HR - omjer rizika (eng. *hazard ratio*)

hsCRP- visoko osjetljivi C- reaktivni protein

ICAM-1 - interstanična adhezijska molekula – 1

IL3 – interleukin – 3

IL-5 – interleukin – 5

IL-6 – interleukin – 6

IMT – debljina intima medija karotidne arterije

ITM – indeks tjelesne mase

LDL- lipoprotein male gustoće

M-CSF – čimbenik stimulacije kolonija makrofaga

NO - endotelni dušični oksid

NT-pro-BNP – proband moždani natrijuretski peptid (N-terminalni kraj)

oxLDL - oksidirani lipoprotein male gustoće

PS – ukupna težina aterosklerotskog plaka

RDW - raspodjela eritrocita po volumenu

ROS – reaktivni kisikovi radikali

TIBC - ukupni kapacitet nosača željeza

TNF- $\alpha$  – tumor nekrotizirajući čimbenik alfa ( $\alpha$ )

UIBC - nesaturirani kapacitet nosača željeza

VCAM-1 - vaskularna stanična adhezijska molekula - 1

Lektor: Danica Crnobrnja, prof.

# SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA	16
3.	ISPITANICI I METODE	18
4.	REZULTATI	27
5.	RASPRAVA	65
6.	ZAKLJUČAK	74
7.	SAŽETAK	76
8.	SUMMARY	78
9.	LITERATURA	80
10.	ŽIVOTOPIS	93
11.	IZABRANE PUBLIKACIJE	97
12.	DODATCI	98

## 1. UVOD

### 1.1. Srčano-žilne bolesti i hemodijaliza

Prevalencija srčano-žilnih bolesti u bolesnika na programu kronične hemodijalize značajno je viša u odnosu na opću populaciju.<sup>1,2</sup> Prvotna istraživanja Lindnera i suradnika koji datiraju iz 1974.godine, a isto je potvrđeno i u novijim publikacijama, identificiraju srčano-žilne bolesti kao glavni uzrok hospitalizacija i smrti u bolesnika na kroničnoj hemodijalizi.<sup>2,3</sup> Spektar srčano-žilnih bolesti uključuje koronarnu bolest srca, naglu srčanu smrt, kongestivno zatajivanje srca, moždani udar i perifernu aterosklerotsku bolest.<sup>3</sup> Bolesnici s terminalnom bubrežnom bolešću *a priori* se smatraju skupinom visokog rizika za neželjene srčano-žilne događaje. Navedeno je dokazano u skupini bolesnika s terminalnim bubrežnim zatajenjem koji se liječe bubrežnom nadomjesnom terapijom (hemodijaliza i peritonejska dijaliza), a nakon toga i u pojedinačnim skupinama bolesnika u čitavom spektru od početnog do uznapredovalog stupnja bubrežnog zatajenja.<sup>3</sup> Konkretno, u usporedbi s općom populacijom, a nakon stratifikacije po dobi, spolu, rasi i šećernoj bolesti, srčano-žilni mortalitet je 10 do 20 puta veći u bolesnika na kroničnoj hemodijalizi.<sup>1</sup> Uzrok tako visokoj prevalenciji srčano-žilnih bolesti primarno leži u proširenoj, generaliziranoj aterosklerozi koja je nazočna u skupini dijaliziranih bolesnika, a patogenetski se objašnjava hipotezom „akcelerirane ateroskleroze“.<sup>2</sup> Patogeneza ateroskleroze u uremičnih bolesnika drugačija je u odnosu na opću populaciju. Primaran događaj u razvoju akcelerirane ateroskleroze je vrlo rana pojava vaskularne disfunkcije koja se u svom spektru sastoji od izraženije ateroskleroze odnosno jačeg zadebljanja intima-medie arterijske stijenke, arterioskleroze koja se manifestira pojačanom



tvrdocom arterijske stijenke (eng. *arterial stiffness*), obilnim arterijskim kalcifikacijama i u konačnici poremećajem vaskularnog cijeljenja.<sup>4</sup> Čimbenici koji dovode do razvoja ateroskleroze djeluju vrlo rano, već u prvim fazama bubrežnog zatajenja. Istraživanja su jasno pokazala da je učestalost uznapredovalih arterosklerotskih lezija proporcionalna stupnju bubrežnog zatajenja.<sup>3,5</sup> Konkretno, bolesnici koji se liječe procesom kronične hemodijalize imaju, između ostaloga, značajno deblju intimu-mediū karotidne arterije što se može vidjeti već u mlađoj životnoj dobi u bolesnika koji su na nadomjesnom bubrežnom liječenju od ranog djetinjstva.<sup>6</sup>

Etiologija akcelerirane ateroskleroze u bolesnika na dijalizi pripisuje se uremičnim toksinima i posljedičnoj endotelnoj, odnosno vaskularnoj disfunkciji.<sup>7</sup> Inicijalna teorija nastanka ateroskleroze kao procesa odgovora na ozljedu endotela,<sup>8</sup> danas je nadopunjena teorijom endotelne disfunkcije i kronične upalne reakcije, a pokriva proces od masnih pruga do razvoja kompleksnih, nestabilnih plakova i vaskularnih kalcifikacija. Točnije, obuhvaća sve stadije aterosklerotske bolesti i konstantno se nadopunjuje.<sup>8,9</sup> Dakle, ateroskleroza je kronična upalna bolest koju karakterizira upalni odgovor arterijske stijenke koji nastaje kao posljedica endotelne ozljede.<sup>9</sup>

Prvi korak u patogenetskom procesu ateroskleroze je stanična endotelna disfunkcija koja se manifestira pojačanom ekspresijom selektivnih adhezijskih molekula VCAM-1 (vaskularna stanična adhezijska molekula - 1) i ICAM-1 (interstanična adhezijska molekula - 1).<sup>8</sup> ICAM-1 je endotelna adhezijska molekula koja pripada superfamiliji imunoglobulina, a služi kao ligand za leukocitne integrine te tako omogućava adheziju i migraciju leukocita kroz stanični zid. VCAM-1 je također adhezijska molekula koja pripada superfamiliji imunoglobulina i facilitira adheziju limfocita, monocita i eozinofila.<sup>8</sup> U stanju

uremije upravo je pojačana ekspresija adhezijskih endotelih molekula. Posljedično pojačanoj membranskoj ekspresiji adhezijskih molekula dolazi do povećanog prijanjanja leukocita i njihove aktivacije na oštećenom endotelu što za posljedicu ima pojačanu lokalnu upalnu reakciju koja stimulira migraciju upalnih stanica.<sup>8</sup> Leukocitnu aktivaciju u uremiji stimulira nekoliko gvanidinskih međuprodukata, uznapredovalih međuprodukata glikacije (AGE) i p-cresil-sulfat.<sup>9-12</sup> Sukladno trenutno prihvaćenoj hipotezi ključnu ulogu u regulaciji upalnog procesa od strane upalnih stanica imaju monociti, odnosno transformirani makrofazi. Oni fagocitiraju velike količine lipoproteina, posebice oksidiranog lipoproteina male gustoće (oxLDL) što za posljedicu ima nastanak pjenušavih stanica. Pjenušave stanice postaju bogati izvor citokina (IL-6, TNF- $\alpha$ ) koji dalje reguliraju aterosklerotski upalni proces te stimuliraju proliferaciju glatkomišićnih stanica.<sup>4,8,9</sup> Produkcija reaktivnih kisikovih radikala (ROS) u endotelnim stanicama također pridonosi navedenoj upalnoj reakciji.<sup>13</sup> Istraživanja na modelu uremičnog miša pokazala su da aterosklerotske lezije imaju visok udio ROS-a i značajno višu ekspresiju AGE što za posljedicu ima pojačani upalni odgovor i dodatno stvaranje ROS-a. To u konačnici dovodi do ubrzanja procesa ateroskleroze.<sup>14</sup> Osim što se ateroskleroza kod uremičnog bolesnika manifestira izraženijim aterosklerotskim plakovima i debljom intimom-mediom magistralnih arterija, također su česti klinički korelati koji nastaju kao posljedica ruptуре aterosklerotskog plaka i trombotičnog događaja. To se često događa obzirom na činjenicu da je kod uremičnog bolesnika nedostatan endotelni antitrombotski potencijal, povišene su serumske koncentracije von Willebrandovog faktora, trombomedulina i inhibitora aktivatora plazminogena.<sup>15</sup> Istom značajno pridonosi intrinzična aktivnost matriks metaloproteinaza koja je visoka u serumu uremičnog bolesnika, a ključna u procesu ruptуре aterosklerotskog plaka.<sup>16</sup> Sve to dovodi do

povišenoga trombotskog potencijala i visokoga rizika potencijalno katastrofičnih srčano-žilnih sekvela.

Osim navedenoga, ključan indikator endotelne disfunkcije u patogenezi uremične ateroskleroze je poremećaj u stvaranju endotelnog dušičnog oksida (NO).<sup>17</sup> NO ima važnu ulogu u vaskularnoj protekciji jer inhibira proliferaciju i migraciju glatkomišićnih stanica, ekspresiju adhezijskih molekula i agregaciju trombocita.<sup>17</sup> Uremično okruženje na dva načina snižava razinu endotelnog NO. Prvo, aktivnost NO sintetaze u endotelu je inhibirana od strane ROS-a, AGE i asimetričnog dimetilarginina koji su povišeni u stanju uremije.<sup>17</sup> Drugo, uremija je asocirana s povišenim koncentracijama cirkulirajućih endotelnih mikročestica koji su mali fragmenti endotelne stanične membrane, a specifično inhibiraju metabolički put nastanka NO.<sup>18</sup> Navedeni čimbenici predstavljaju ključne dijelove patogenetskog lanca aterogeneze.

Akcelerirana ateroskleroza kod uremičnih bolesnika ima identificirane čimbenike rizika koji su povezani s razvojem i napredovanjem bolesti. Osim tradicionalnih rizičnih čimbenika kao što su arterijska hipertenzija, dijabetes, dislipidemija, pušenje, prekomjerna tjelesna težina i hiperhomocisteinemija za koje, temeljem mnogobrojnih studija nedvojbeno znamo da sudjeluju u patogenezi ateroskleroze, kod uremičnih bolesnika mogu se identificirati i specifični čimbenici rizika za kronično bubrežno zatajenje i proces dijalize (Tablica 1.).<sup>19</sup>

**Tablica 1. Rizični čimbenici tipični za populaciju uremičnih bolesnika**

Rizični čimbenici specifični za kronično bubrežno zatajenje	Rizični čimbenici specifični za proces dijalize
Hemodinamsko opterećenje (hipervolemija)	Intra- i inter-dijalizne promjene u srčanom punjenju
Anemija	Fluktuacije krvnog tlaka
Poremećaji metabolizma kalcija i fosfata	Fluktuacije serumskih elektrolita
Poremećaji elektrolita	Bioinkompatibilnost membrana za dijalizu
Kronična upala	Nečistoća dijalizata
Oksidativni stres	
Uremično stanje	

➤ Preuzeto iz Locatelli F i sur. *Epidemiology of cardiovascular risk in patients with chronic kidney disease; Nephrol Dial Transplant.* 2003; 18 (7): VII2-VII9.

Hipertenzija kao posljedica hipervolemije osobito je česta i ključna za razvoj aterosklerotskih komplikacija u ovoj specifičnoj skupini bolesnika.<sup>19,20</sup> Uvjerljivi rezultati HDFP (*Hypertension Detection and Follow-up Program*) i HOT (*Hypertension Optimal Treatment*) studija pokazali su značajno viši mortalitet kod hipertoničara s bubrežnom insuficijencijom u odnosu na hipertoničare s urednom bubrežnom funkcijom.<sup>20,21</sup> Ispitanici u HDFP studiji koji su imali serumske koncentracije kreatinina veće od 1,7 mg/dL imali su 2,22 puta veći 8-godišnji mortalitet u odnosu na ostale ispitanike.<sup>20</sup> HOT studija u kojoj je uključeno 18 597 bolesnika, pokazala je da ispitanici s klirens kreatininom nižim od 60 ml/min

imaju značajno veći srčano-žilni morbiditet i mortalitet u odnosu na ispitanike s urednom bubrežnom funkcijom ( $P < 0,001$ ).<sup>21</sup>

Anemija, česta pojava u bolesnika na hemodijalizi, ima ključan utjecaj na funkciju srca. Dokazano je da je stupanj težine anemije proporcionalan stupnju hipertrofije stijenke lijeve klijetke srca (HLV).<sup>22,23</sup> Sukladno navedenome, razumljiva je i visoka prevalencija dijastoličke disfunkcije i HLV-a u bolesnika na dijalizi koja je identificirana kao nezavisan čimbenik rizika nastupa smrti, kako u općoj populaciji tako i u skupini uremičnih bolesnika.<sup>23</sup>

Dislipidemije su često nazočne u bolesnika s kroničnim bubrežnim zatajenjem.<sup>19</sup> Pretežito nalazimo povećane serumske koncentracije triglicerida, snižene serumske koncentracije HDL-a, povećane serumske koncentracije malih LDL molekula, povećane serumske koncentracije lipoproteina (a), ali snižene serumske koncentracije ukupnog kolesterola i LDL-a.<sup>24</sup> Analizirajući odnos između ukupnog kolesterola i rizika srčane smrti nalazimo tzv. „dijalizni paradoks“. Naime, serumska koncentracija ukupnog kolesterola niža je u odnosu na opću populaciju obzirom da je definirana stanjem malnutricije, tako da je niski ukupni kolesterol u kombinaciji s niskim indeksom tjelesne mase snažan prediktor ukupnog mortaliteta.<sup>25</sup> Navedena činjenica značajno ograničava korisnost lipidograma u procjeni rizika kod dijaliziranih bolesnika. No, o tome nešto više u kasnijem dijelu uvoda (v. *Predikcija rizika u bolesnika na hemodijalizi*). U prilog tome govore i rezultati *German Diabetes and Dialysis Study Investigators* studije koji su ispitali uporabu statina u skupini bolesnika sa šećernom bolešću tip 2 koji se liječe metodom kronične hemodijalize.<sup>26</sup> Zaključak navedene studije je da uporaba statina u navedenoj skupini bolesnika ne smanjuje srčano-žilni mortalitet što još više stavlja naglasak na činjenicu da je ateroskleroza u uremičnih bolesnika ipak drugačiji proces u odnosu na opću populaciju.

Razmatrajući aterosklerotski proces u bolesnika koji se liječe postupkom kronične dijalize ključno je naglasiti izraženu nazočnost vaskularne kalcifikacije koja tipično nastaje na dva mjesta, u intimi odnosno u mediji stijenke arterije.<sup>4</sup> Intimalne kalcifikacije su sastavni dio aterosklerotskog procesa kojega nalazimo i u općoj populaciji, ali u usporedbi s njom, značajno je izraženiji u uremičnih bolesnika.<sup>27</sup> No, kalcifikacije medije nalaze se u području elastičnih vlakana koji okružuju glatkomišićne stanice u bolesnika sa šećernom bolešću i uremijom, a gotovo nikada u općoj populaciji.<sup>27</sup> Mogu nastati u bilo kojoj vrsti arterija, a uzrokuju očvršnuće stijenke aorte (eng. *arterial stiffness*). Hipoteza nastanka ovih kalcifikacija temelji se na aktivnosti osteoblastima - sličnih stanica koje stvaraju proteine koštanog matriksa. Pretpostavlja se da su podrijetla transformiranih glatkomišićnih stanica.<sup>28</sup> Signal koji uzrokuje transformaciju i posljedičnu kalcifikaciju primarno je hiperfosfatemija, ali su uključeni i ostali uremični toksini.<sup>29</sup> Veza između kalcifikacija i posljedične endotelne disfunkcije odnosno povećanoga srčano-žilnog mortaliteta jasno je dokazana.<sup>30</sup>

## 1.2. Eozinofilni kationski protein (ECP)

Novija istraživanja ateroskleroze naglašavaju ulogu kronične upale koja perzistira u stijenci arterije potencirajući disfunkciju endotela i porast koncentracije upalnih biomarkera. Njihova međusobna interakcija sugerira ulogu upalnih biomarkera kao promotora u procesu aterogeneze.<sup>31,32</sup> Na početku liječenja hemodijalizom u većine bolesnika određuju se tradicionalni čimbenici rizika, kao što su: dob, arterijska hipertenzija, dislipidemija, pušenje i šećerna bolest. Međutim, navedeni čimbenici ne mogu u potpunosti objasniti povećanu incidenciju srčano-žilnih događaja i ubranu aterosklerozu u tih bolesnika.<sup>4,33</sup> Smatra se, da bi se ubrzana ateroskleroza u bolesnika na programu hemodijalize bar djelomično mogla objasniti tzv. „novim“ čimbenicima rizika odnosno biomarkerima kao što su hsCRP, homocistein, lipoprotein (a), upala i oksidacijski stres općenito.<sup>33,34</sup> Mnogi bolesnici s terminalnim bubrežnim zatajenjem koji se liječe hemodijalizom u permanentnom su stanju kroničnog upalnog procesa koji je induciran hemodijalizom, a koji jasno povećava stupanj oksidativnog stresa. To je stanje povezano s dugoročnim komplikacijama kao što su srčano-žilne bolesti, malnutricija, veći udio nestabilnih ateromatoznih lezija i posljedično loš ishod odnosno kraće preživljenje.<sup>33</sup> Upravo navedene nestabilne ateromatozne lezije imaju obilni upalni infiltrat koji se patohistološki sastoji od makrofaga, limfocita T i mastocita, no nalazimo i eozinofile.<sup>34-37</sup> Medijatori producirani od strane leukocita ključni su u definiciji stabilnosti plaka.<sup>38</sup> Aktivirani leukociti luče čimbenike koji djeluju na način da promoviraju degradaciju matriksa od strane efektorskih stanica i sekreciju matriks metaloproteinaza.<sup>38-40</sup> Humane aterosklerotske lezije također imaju pojačanu eksprijesiju TNF- $\alpha$ .<sup>41</sup> Jedna od uloga TNF- $\alpha$  je regrutacija i aktiviranje upalnih stanica i adherencija monocita na

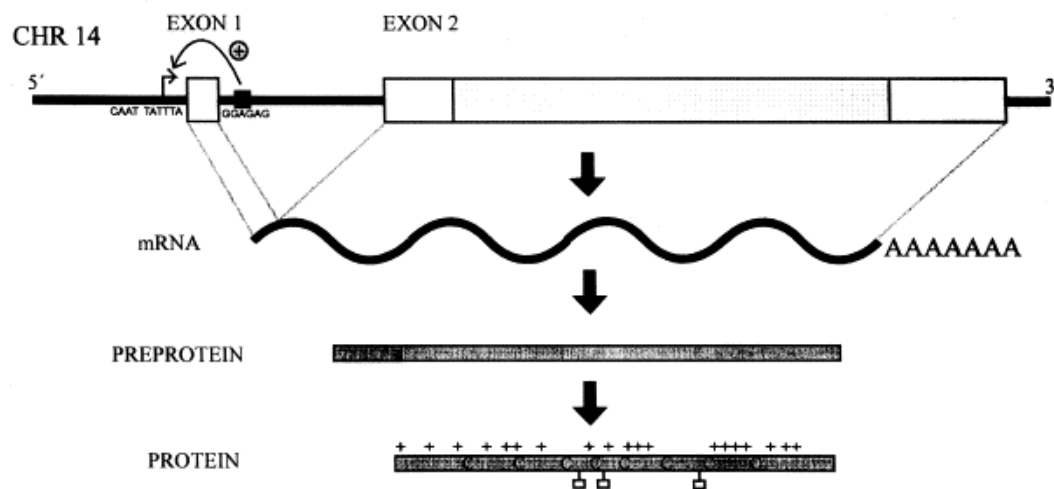
endotelne stanice što posljedično uzrokuje infiltraciju stijenke krvne žile.<sup>42</sup> Proces adhezije, vezanja i migracije reguliran je kemotaktičnim signalima koji su posredovani kemokinima.<sup>42</sup> Kemokini su mali proteini koji privlače upalne stanice, poglavito leukocite, na način da uzrokuju njihovo nakupljanje i aktivaciju. Eotaxin je C-C kemokin koji je potentan kemokin specifičan za privlačenje eozinofila.<sup>43,44</sup> Eotaxin i njegov receptor, CCR3 su veoma izraženi u humanoj aterosklerozi, sugerirajući da eotaksin participira u vaskularnoj inflamaciji i staničnoj regrutaciji u ateromu.<sup>45</sup> Novije studije također potvrđuju značajnu ulogu eozinofila u aterosklerozi kao i dokazanu povezanost između broja eozinofila i rizika za buduća srčano-žilna događanja.<sup>45</sup>

Eozinofilni kationski protein (ECP) je cink-kationski upalni protein težine 16-22 kDa, koji se normalno nalazi uskladišten u granulama eozinofila, luči se na različite poticaje, osobito imunoglobuline i komponente komplementa.<sup>46,47</sup> Gen za ECP je lociran na kromosomu 14 (q24-q31) (Slika 1.) a sastoji se od dva eksona.<sup>48</sup> Produkcija ECP-a vizualizirana je tri dana nakon stimulacije CD34+ stanica sa IL3, GM-CSF i IL-5 nakon čega slijedi diferencijacija u eozinofilnima-slične stanice, odnosno eozinofile.<sup>48,49</sup>



## Slika 1.

### Prikaz strukture gena za eozinofilni kationski protein (ECP)



➤ (Reproducirano uz dopuštenje Venge P i sur.)

Funkcionalne karakteristike ECP-a uključuju citotoksični i necitotoksični učinak (Tablica 2.). ECP je potentna citotoksična molekula sa sposobnostima uništavanja stanica, bakterija, virusa i parazita.<sup>50</sup> Temelj citotoksičnog mehanizma je stvaranje pora u strukturi membrane stanice.<sup>50</sup> Osim citotoksičnog učinka značajne su i ostale funkcije koje mu se pripisuju. *In vitro* inhibira proliferativni odgovor limfocita T, stimulira otpuštanje histamina iz mastocita podrijetla srčanog mišića odnosno bazofila.<sup>51</sup> Također su značajne interakcije sa sustavom koagulacije i fibrinolize. ECP skraćuje vrijeme koagulacije plazme na način da interferira s faktorom XII, a istodobno uzrokuje aktivaciju plazminogena.<sup>51</sup>

**Tablica 2. Osnovne karakteristike eozinofilnog kationskog proteina (ECP)**

<b>Citotoksični učinak ECP-a</b>	<b>Necitotoksični učinak ECP-a</b>
Uništavanje parazita	Inhibira proliferaciju T-limfocita
Uništavanje tumorskih stanica	Aktivira mastocite
Neurotoksičnost	Stimulira secerniranje sekreta u bronhima
Srčano-žilno oštećenje	Stupa u interakciju s komponentama komplementa
Oštećenje respiracijskog epitela	Povećava ekspresiju adhezijskih molekula
Anti-bakterijska aktivnost	Uzrokuje oslobađanje histamina iz bazofila
Anti-virusna aktivnost	Modificira aktivnost fibroblasta

Široki spektar stimulansa identificiran je kao pokretač sekrecije granula iz citoplazme eozinofila.<sup>46</sup> Primarno su identificirani imunoglobulini (IgE, IgA i IgG) i solubilni stimulansi, kao što su IL-3, IL-5, GM-CSF i komponente komplementa C5a, C3a kao ključni pokretači sekrecije ECP-a.<sup>51</sup> Poznata je uloga IL-3 u patogenezi ateroskleroze.<sup>52</sup> IL-3, izražen od strane aktiviranih limfocita T koji infiltriraju aterosklerotske plakove, podržavaju aterosklerotski proces te ili direktno aktiviraju migraciju glatkomišićnih stanica i njihovu proliferaciju ili indirektno preko indukcije vaskularnog endotelnog čimbenika rasta i njegove produkcije na membrani endotelnih stanica.<sup>52</sup> Navedeni mehanizam jedan je od ključnih koji povezuje eozinofile i proces ateroskleroze.

Drugi mehanizam koji jasno povezuje ECP i aterogenezu je činjenica da ECP uzrokuje porast endotelnih ICAM-1 molekula koje su ključne u nastanku aterosklerotskog plaka.<sup>53</sup> U uvodu je ranije obrazložena uloga ICAM-1 molekula

u patogenetskom procesu ateroskleroze (*vidi. 1.1 Srčano-žilne bolesti i hemodijaliza*).

Poluvrijeme raspada ECP-a ( $T_{1/2}$ ) u cirkulaciji je relativno brzo i iznosi oko 45 minuta.<sup>54</sup> Obzirom na navedeno, mjerenje koncentracije ECP-a u serumu koristi se kao marker eozinofilne aktivnosti u upali, a povišene koncentracije se pripisuju aktivnosti i težini astme, atopičnom dermatitisu, te imunim bolestima kao što su reumatoidni artritis, psorijaza i celijačna bolest.<sup>55</sup> Kod uremičnih bolesnika jasno je dokazana povišena razina ECP-a koja je u prosjeku do tri puta viša u usporedbi s normalnom populacijom.<sup>56</sup> Štoviše, tijekom procesa hemodijalize na celofanskim dijalizatorima dolazi do porasta serumske koncentracije ECP-a što se pripisuje lokalnoj degranulaciji u dijalizatoru.<sup>57</sup> Temeljem istraživanja profesora Niccolija i suradnika koncentracija ECP-a proporcionalna je proširenošću aterosklerotske bolesti na koronarnim arterijama u općoj populaciji, te ga smatraju novim biomarkerom koronarne ateroskleroze.<sup>58</sup> ECP je povezan s težinom koronarne ateroskleroze kao i njegov tkivni surogat kemokin – eotaksin.<sup>59</sup> Emanuelle i suradnici dokazali su povezanost eotaksina i broja bolesnih koronarnih krvnih žila i tako ukazali na ulogu eozinofila u patogenezi ateroskleroze.<sup>59</sup> Navedeno navodi na zaključak o mogućoj ulozi ECP-a u patogenezi ateroskleroze, posebice koronarne.

### 1.3. Predikcija rizika u bolesnika na hemodijalizi

Predikcija srčano-žilnog i ukupnog mortaliteta, odnosno stratifikacija rizika temeljni je pristup liječenju srčano-žilnih bolesnika. Prediktivni potencijal klasičnih srčano-žilnih čimbenika rizika kao što su hipertenzija, adipozitet ili hiperlipidemija relativno je nepouzdan kod bolesnika na hemodijalizi, što čini stratifikaciju rizika izrazito teškom.<sup>60</sup> Nakon jasno potvrđene hipoteze da bolesnici na kroničnoj hemodijalizi imaju povećani srčano-žilni morbiditet i mortalitet, čitav niz istraživanja fokusirao se na identifikaciju biomarkera temeljem kojega će se jasno identificirati bolesnici koji pripadaju najugroženijoj skupini s ciljem optimizacije dijagnostike i liječenja. Osobita pozornost stavlja se na prognostičku značajnost serumskih koncentracija visoko osjetljivog proteina C (hsCRP) i serumskih koncentracija probanda moždanog natrijuretskog peptida (N-terminalni kraj) (NT-pro-BNP).<sup>61</sup> Noviji radovi identificiraju čimbenik stimulacije kolonija makrofaga (M-CSF), interleukina-6 (IL-6) i TNF- $\alpha$  kao značajnih i nezavisnih biokemijskih markera temeljem kojih se može učiniti stratifikacija rizika. Obzirom da se radi o sporadičnim studijama s malim brojem ispitanika, isti još uvijek nisu prihvaćeni kao etablirani standard.<sup>62</sup>

Poznata je vrijednost hsCRP-a u procjeni srčano-žilnog rizika opće populacije koja je tijekom godina dokazana u primarnoj i sekundarnoj prevenciji.<sup>62</sup> Navedene opservacije su također primjenjive i na populaciju uremičnih bolesnika i smatraju se korisnima u svakodnevnoj kliničkoj praksi.<sup>63</sup> Temeljem rezultata meta-analize, povišene vrijednosti hsCRP-a za sveukupni mortalitet na dijalizi nose izračunati omjer rizika (HR) od 1,142 (95% CI: 1.118-1.166).<sup>63</sup>

NT-pro-BNP je dobro poznati biomarker srčanog popuštanja koji je uz navedeno i nezavisni čimbenik rizika srčano-žilnog mortaliteta u općoj populaciji.<sup>64</sup> Recentne studije su identificirale porast NT-pro-BNP-a kao nezavisan prognostički parametar u bolesnika na hemodijalizi.<sup>65</sup> Konkretno, porast serumske koncentracije od 40% jasno je identificirao sveukupni i srčano-žilni mortalitet u sljedećoj godini (P= 0.004, P= 0.002).<sup>65</sup>

Glede ECP-a, dokazana je prognostička značajnost serumske koncentracije ECP-a u predikciji mortaliteta u bolesnika s koronarnom bolešću i implantacijom koronarne potpornice koja otpušta lijek (eng. *drug-eluting stent*).<sup>66</sup> Etiologija navedene veze nije objašnjena, te nije jasno je li isto posljedica uloge ECP-a u progresiji ateroskleroze ili posljedica alergijske reakcije na strano tijelo.<sup>66</sup> Za bolesnike s uremijom u dostupnoj literaturi ne nalazi se podataka o prognostičkoj značajnosti ECP-a.

Interesantni su radovi koji naglasak stavljaju na identifikaciju biomarkera koji bi bio jeftin, široko dostupan i jednostavan za korištenje. Nekoliko recentnih studija identificirali su volumen distribucije eritrocita (eng. *red blood cell distribution width*) (RDW) kao jak i nezavisan prediktor mortaliteta i morbiditeta u općoj populaciji,<sup>67,68</sup> kao i u specifičnim skupinama bolesnika s kroničnim srčanim zatajenjem, srčanim arestom, plućnom embolijom, akutnim koronarnim sindromom, pa čak i upalom pluća.<sup>69-74</sup> Štoviše, RDW je identificiran kao kratkoročni i dugoročni prognostički čimbenik u jedinicama intenzivne skrbi koji značajno poboljšava stratifikaciju rizika učinjenu uz pomoć prognostičkog alata SAPS-a (eng. *Simplified Acute Physiology Score*).<sup>75</sup> RDW se definira kao mjera varijabilnosti veličine cirkulirajućih eritrocita i tradicionalno se koristi u diferencijalnoj dijagnostici anemije.<sup>70</sup> U svakodnevnoj kliničkoj praksi to je automatski mjereni indeks koji se računa na način da se standardna devijacija

veličine eritrocita podjeli sa srednjim volumenom eritrocita (MCV) i pomnoži sa 100 da bi se izrazio rezultat kao postotak.<sup>70,76</sup> Nedavno je pokazano da RDW može biti aditivni prognostički parametar za sveukupnu smrtnost u bolesnika s akutnim bubrežnim zatajenjem koji se liječe kontinuiranom nadomjesnom bubrežnom terapijom.<sup>76</sup> Za bolesnike na kroničnoj hemodijalizi nema podataka u dostupnoj literaturi.

Osim navedenih biokemijskih markera stratifikacije rizika u bolesnika na hemodijalizi nekoliko neinvazivnih markera proširenosti ateroskleroze ima svoje mjesto u svakodnevnoj kliničkoj uporabi. Najčešći su debljina intima-medie karotidne arterije (IMT) i dilatacija brahijalne arterije izazvane protokom krvi (FMD).<sup>62</sup> Koriste se kao surogati proširenosti i težine ateroskleroze zajedno s ukupnom težinom aterosklerotskog plaka u ekstrakranijalnom dijelu karotidne arterije.<sup>62,63</sup> IMT je strukturalni marker koji predstavlja kronično vaskularno zadebljanje i aterosklerozu, dok FMD predstavlja funkcionalnu sposobnost endotela.<sup>62</sup> Bitno je naglasiti da je prognostička vrijednost svih navedenih biomarkera nezavisna i aditivna na osnovni rizik definiran čimbenicima identificiranim u poznatoj Framingham studiji.<sup>62</sup>

Temeljem izloženoga, predložena je hipoteza „multimarker“ pristupa obzirom na osnovni rizik koji je definiran tradicionalnim čimbenicima rizika na koji se nadopunjuju nezavisni čimbenici rizika iz biokemijske skupine (CRP, NT-proBNP), odnosno neinvazivni markeri srčano-žilnih bolesti kao što je IMT.<sup>62</sup> Vjeruje se da će konačni sustav biti superiorniji tradicionalnoj procjeni rizika.

No za definitivne zaključke bit će potrebno sačekati rezultate multicentričnih randomiziranih studija koje će definitivno validirati ili odbaciti predložene biomarkere. Za sada isti nisu dostupni široj javnosti.

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA HIPOTEZA**

HIPOTEZA:

Koncentracija eozinofilnog kationskog proteina povezana je sa debljinom intima-medie karotidne arterije i ukupnom težinom arterosklerotskog plaka.

Koncentracija eozinofilnog kationskog proteina povezana je sa sveukupnim godišnjim preživljenjem bolesnika na programu kronične hemodijalize.

## OPĆI CILJ:

Istražiti odnos između težine ateroskleroze karotidne arterije i različitih čimbenika srčano-žilnog rizika, koncentracije eozinofilnog kationskog proteina i upalnih markera u bolesnika na hemodijalizi.

## SPECIFIČNI CILJEVI ISTRAŽIVANJA:

1. Istražiti povezanost eozinofilnog kationskog proteina sa debljinom intima medije i ukupnom težinom aterosklerotskog plaka karotidne arterije kao surogatima uznapređovalosti i proširenosti ateroskleroze.
2. Ispitati eozinofilni kationski protein kao biomarker karotidne ateroskleroze.
3. Ispitati eozinofilni kationski protein kao nezavisan prognostički čimbenik u bolesnika na programu kronične hemodijalize i istražiti odnos s drugim upalnim parametrima, poglavito C-reaktivnim proteinom.
4. Ispitati povezanost raspodjele eritrocita po volumenu (RDW) sa sveukupnim preživljenjem u bolesnika na programu kronične hemodijalize.



### **3. ISPITANICI I METODE**

#### **3.1. Ispitanici**

U istraživanje su uključeni bolesnici s programa kronične hemodijalize koji se liječe na Odjelu hemodijalize Kliničke bolnice Dubrava. Studijsko mjesto je tercijarna zdravstvena ustanova čiji Odjel hemodijalize prosječno ima oko 115 bolesnika na programu kronične hemodijalize. Svi bolesnici koji su bili liječeni u razdoblju od 1.12.2010. do 1.1.2011. god. na Odjelu hemodijalize KB Dubrava razmatrani su za uključenje u studiju.

Kriteriji uključivanja u studiju su podrazumijevali:

- a) dob stariju od 18 godina
- b) najmanje godinu dana na programu kronične hemodijalize
- c) uvjet da je bolesnik ili skrbnik bolesnika informiran o prirodi kliničke studije te da je potpisao informirani pristanak odobren od strane nadležnog Etičkog povjerenstva

Kriteriji isključivanja su podrazumijevali:

- a) bolesnik s poznatom malignom bolešću od ranije
- b) bolesnici s akutnim i kroničnim upalnim bolestima
- c) bolesnici s autoimunim bolestima i imunološkim poremećajima u anamnezi
- d) bolesnici koji kontinuirano koriste protuupalne ili imunosupresivne lijekove
- e) bolesnici s anamnezom nedavne (<3 mjeseca) traume ili kirurške procedure

Redosljed uključivanja u studiju bio je kontinuiran od početka trajanja studije do ispunjenja broja. Uključeno je ukupno 100 bolesnika koji čine glavnu, dijaliziranu skupinu. U kontrolnu skupinu uključeno je ukupno 30 zdravih dragovoljaca, koju su odabrani po dobi i spolu, a na način da odgovaraju ispitnoj, dijaliziranoj skupini. Nakon što se bolesnicima na hemodijalizi i zdravim ispitanicima detaljno i u potpunosti objasnio cilj i detalji studije, isti su potpisali pristanak prije uključivanja u studiju. Nakon toga su pregledani od strane glavnoga istraživača, te je na temelju anamnestičkih podataka i kliničkog pregleda ispunjen upitnik koji se sastojao od osnovnih demografskih podataka i temeljnih kliničkih podataka ispitanika uključujući srčano-žilne čimbenike rizika za razvoj ateroskleroze. U kliničkom pregledu naglasak se stavio na srčano-žilni sustav. Izmjerena je tjelesna visina i težina te je izračunat indeks tjelesne mase (ITM). ITM se definira kao težina u kilogramima (kg) izražena na metar kvadratni površine tijela ( $m^2$ ). Svakom bolesniku snimljen je elektrokardiogram (EKG) kojim se definirao status srčanog ritma u trenutku uključivanja u studiju u smislu sinus srčane akcije ili fibrilacije atrijske. Anamnestički podaci uključivali su i vrstu kronične medikamentozne terapije, a specifično uporabu blokatora angiotenzin konvertirajućeg enzima (ACE-blokatori), blokatora angiotenzinskih receptora klase II (AT II receptora), acetilsalicilne kiseline, beta-blokatora, blokatora utoka kalcija, statina i inhibitora protonske pumpe. Utjecaj liječenja dijalizom se izrazio kroz njegovu duljinu trajanja u mjesecima, te izračunom indeksa Kt/V metodom po Dugiradasu koji se temelji na smanjenju ureje tijekom procesa dijalize.<sup>77</sup>

Na temelju svakodnevnih aktivnosti i sposobnosti ispitanici su klasificirani sukladno ECOG klasifikaciji koja se rutinski primjenjuje godinama u procjeni

općeg stanja onkoloških bolesnika, ali se može primijeniti i u procjeni funkcionalnog stanja bilo kojega bolesnika s kroničnom bolešću.<sup>78</sup>

**Tablica 3. ECOG klasifikacije opće sposobnosti bolesnika**

Ocjena	ECOG funkcionalno stanje
0	Potpuno aktivan, sposoban za svezkupnu fizičku aktivnost u omjeru kakva je bila prije nastupa bolesti
1	Ograničen u fizički zahtjevnijim aktivnostima, ambulatoran, sposoban izvršavati posao sedentarne prirode, npr. rad u uredu
2	Ambulantni bolesnik koji je sposoban za skrb o sebi, ali nije u mogućnosti provoditi radne aktivnosti. Više od 50% vremena tijekom budnog stanja provodi izvan kreveta ili stolice.
3	Sposoban samo za ograničenu skrb o sebi. Više od 50% vremena tijekom budnog stanja provodi u krevetu ili stolici.
4	Potpuno nesposoban. Nije u mogućnosti za bilo kakvu skrb o sebi. Ne može napustiti krevet ili stolicu
5	Smrt

### 3.2. Biokemijsko-imunološke metode

Svi su uzorci krvi uzeti tijekom rutinskog, mjesečnog ispitivanja kvalitete liječenja dijalizom, a neposredno prije procesa dijalize. U izabranim slučajevima krv je izuzeta i nakon procesa dijalize s ciljem ispitivanja utjecaja procesa dijalize na serumsku koncentraciju ECP-a. Nakon što je izuzet uzorak krvi isti je odmah odnesen u Klinički zavod za laboratorijsku medicinu i dijagnostiku. Kompletna krvna slika s diferencijalnom krvnom slikom određena je iz pune krvi s K2EDTA kao antikoagulansom na Advia 2110i analizatoru (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY, SAD). Krv predviđena za biokemijske analize centrifugirana je na 1370 x g 15 minuta na 35 R Rotina Hettich centrifugi (Tuttlingen, Njemačka). Iz tako dobivenoga seruma određena je koncentracija glukoze u krvi, visoko osjetljivog C – reaktivnog proteina, ureje, kreatinina, urične kiseline, albumina, ukupnih proteina, triglicerida, ukupnog kolesterola, lipoproteina visoke gustoće (HDL), ukupnog bilirubina, aspartat-aminotransferaze, alanin-aminotrasferaze, gama-glutamilttransferaze, željeza i nesaturiranog kapaciteta nosača željeza (UIBC), te feritina. Ostatak seruma je pohranjen na -80 C° za naknadne analize tijekom kojih je određen ECP i NT-pro-BNP.

Eozinofilni kationski protein je određen pomoću flouoroimunoesej metode na analizatoru Phadia 100 (Phadia AB, Uppsala, Švedska). Princip metode uključuje reakciju između anti-ECP kovalentno vezanog protutijela na ImmunoCAP s eozinofilnim kationskim proteinom iz seruma ispitanika. Nakon ispiranja, enzimom označena protutijela vezana na ECP se dodaju s ciljem formiranja kompleksa koji se nakon inkubacije miješa s razvojnim spojem sa svojstvom

fluorescencije. Izmjerena fluorescencije eluata proporcionalna je koncentraciji ECP-a u uzorku.<sup>79</sup>

Koncentracija NT-pro-BNP-a određena je metodom elektokemiluminiscencije na analizatoru Cobas e411 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka) na način kako je opisano u literaturi.<sup>80</sup> Temelji se na principu „sandwich“ koji uključuje reakciju između antigena iz uzorka, biotiniliranog monoklalnog anti-NT-proBNP-a specifičnog protutijela i monoklalnog NT-pro-BNP protutijela obilježenoga rutenijem. Navedeni elementi stupaju u reakciju na način da formiraju „sandwich“ kompleks. Nakon toga se novonastali kompleks miješa sa streptavidinom vezanim na mikročestice koje su magnetski povezane s površinom elektrode. Primjena napona na elektrodu inducira kemoluminiscenciju koja se mjeri i proporcionalna je koncentraciji NT-pro-BNP-a u uzorku.

Koncentracija visoko osjetljivog C-reaktivnog proteina (hsCRP) određena je metodom imunoturbidimetrije na AU 2700 plus analizatoru (Beckman-Coulter, Tokyo, Japan). Ukratko, C-reaktivni protein (CRP) reagira s antitijelima protiv humanog CRP-a koji su vezani na latex čestice te formiraju netopive agregate. Apsorpcija generiranih agregata je proporcionalna koncentraciji CRP-a u uzorku. Metoda je kalibrirana primjenom Latex CRP Calibrator Set High Sensitive (ODCO27) s pet različitih kalibracijskih koncentracija za visoko osjetljivo područje.<sup>81</sup>

Kreatinin je određen kinetičkim kolorimetrijskim testom (Jafféova metoda). Metoda se temelji na reakciji kreatinina i pikrinske kiseline u alkalnom mediju pri čemu nastaje žuto-narančasto obojani kompleks. Brzina promjene apsorbancije proporcionalna je koncentraciji kreatinina u uzorku.<sup>82</sup>

Albumin, željezo i UIBC su također određeni na AU 2700 plus analizatoru (Beckman-Coulter, Tokyo, Japan). Ukupni kolesterol je određen pomoću

enzimatskih metoda, dok su albumin, željezo i UIBC određeni pomoću fotometrijskih testova koji su u standardnoj uporabi.

Sveukupni laboratorijski posao proveden je sukladno trenutno važećim standardima kvalitete i važećim certifikatima.

### 3.3. Slikovno-dijagnostičke metode

Debljina intima-medie na arteriji karotis (IMT) rutinski se koristi kao surogat proširenosti ateroskleroze na krvožilnom sustavu.<sup>83</sup> IMT i ukupna težina aterosklerotskog plaka ekstrakranijalnog dijela karotidne arterije u ovome se istraživanju određuje sukladno „Mannheim Carotid Intima-Media Thickness“ konsenzusu.<sup>83</sup> Tijekom mjerenja ključno je razlikovanje ranog aterosklerotskog plaka od zadebljanja IMT-a. Temeljem navedenoga konsenzusa aterosklerotski plak se definira kao fokalna struktura koja strši u lumen arterije više od 50% debljine okolnog IMT-a, odnosno zadebljanje koje iznosi više od >1,5 mm mjereno od granice medija-adventicija do granice intima-lumena krvne žile. Ultrazvučna mjerenja u ovome istraživanju obavljaju se ultrazvučnim aparatom modela Aloka 5500 Prosound koji je opremljen 7,5MHz linearnom ultrazvučnom sondom uz pomoć sustava za detekciju rubova koji je propisno kalibriran. Ultrazvučno se IMT definira kao struktura vidljiva na ultrazvučnom prikazu zajedničke karotidne arterije a omeđena je dvjema linijama koje predstavljaju dvije anatomske granice: granicu između lumena i intime, te granicu između medije i adventicije. Mjerenje IMT-a se obavlja u području zajedničke karotidne arterije, neposredno prije bulbosa ili unutar 10mm proksimalno bulbosu karotidne arterije na području koje je slobodno od aterosklerotskih plakova uz uvjet da je dvostruka linija IMT-a jasno vidljiva. Za analizu se uzimaju vrijednosti srednjeg i maksimalnog IMT-a. Ukupna težina aterosklerotskog plaka (PS) definira se kao zbroj maksimalnih visina svakog pojedinačnog aterosklerotskog plaka koji su smješteni u ekstrakranijalnom dijelu obje karotidne arterije sukladno ranije publiciranoj metodologiji.<sup>83,84</sup>

### **3.4. Praćenje bolesnika**

Bolesnici su kontaktirani osobno od strane istraživača tijekom redovitog ciklusa dijalize u našem Centru.

Ispitanici su praćeni tijekom 12 mjeseci nakon uključanja u studiju, a tijekom kojih se zabilježio smrtni ishod i uzrok smrtni, ako je bio jasno dostupan. Bitno je naglasiti da bolesnici uključeni u studiju nisu bili drugačije liječeni ili tretirani izvan opće prihvaćenih smjernica dobre kliničke prakse odnosno okvira svakodnevnog kliničkog rada i načela etičkog rada liječnika.

### **3.5. Statistička obrada podataka**

Podaci su priređeni, kodirani i uneseni u računalo uz strogo poštivanje tajnosti podataka bolesnika sukladno trenutno važećim kodeksima i deklaracijama. Mjerene varijable su prikazane tekstualno, tablično i grafički. Sve varijable su testirane na normalnu distribuciju Kolmogorov-Smirnovim testom. Ovisno o razdiobi podataka, vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija, odnosno kao medijan s rasponom. Usporedbe između dvije skupine testirane su Mann-Withney U testom. Kategorički podaci su izraženi kao broj (N), a usporedbe između skupina s kategoričkim podacima testirane su Chi-square testom. Korelacije između testiranih varijabli studirane su Pearsonovim testom ili Spearmanovom korelacijom, ovisno o distribuciji podataka. Prognostička značajnost ispitivanog biomarkera prikazana je Kaplan-Meierovim krivuljama preživljenja i izračunom vrijednosti Log-rank za statističku značajnost. Prognostička značajnost pojedinih varijabli u odnosu na opći mortalitet testirana je primjenom univarijatnog Cox proporcijskog hazard modela, te multivarijatnog



Cox proporcijskog hazard modela i to na način da su sve varijable s P-vrijednošću  $<0,1$  korištene u multivarijantnoj Cox proporcijskoj hazard analizi („stepwise“). Rezultati univarijatne i multivarijatne Cox regresijske analize prikazani su kao omjer rizika („hazard ratio“) (HRs) i 95%-tnim intervalom pouzdanosti (95% CI). P vrijednost manja od 0,05 smatra se statistički značajnom.

### **Izračun veličine uzorka – snaga studije**

Za primarnu hipotezu istraživanja uzeto je testiranje povezanosti između dva numerička obilježja, koncentracije ECP-a i debljine intima-medie (IMT) odnosno težine aterosklerotskog plaka. Snaga studije izračunava se uz uvjet vrijednosti Pearsonovog koeficijenta korelacije od  $r \geq 0,5$ , razinu značajnosti od 5% i snagu testa od najmanje 90%. Sukladno navedenom, najmanji potreban uzorak iznosi  $N = 37$  jedinki. Za specifičan izračun veličine uzorka potrebnog za dokazivanje utjecaja procesa hemodijalize na serumsku koncentraciju ECP-a uz korištenje usporedbe dva parna uzorka, koristit će se ista procedura kao za izračun jedne aritmetičke sredine. Uz hipotezu aritmetičke sredine ECP-a od 18,93, sa standardnom devijacijom od 17,2 uz nul-hipotezu vrijednosti 0, tip I greške (alfa) 0,05; tip II greške (beta) 0,1 minimalni potrebiti uzorak iznosi 9 (podaci derivirani iz glavne skupine dijaliziranih bolesnika).

Programska rješenja MedCalc v.11.4.2.0 i JMP v. 9.0.2, licencirana na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu korišteni su za statističke izračune.

## 4. REZULTATI

U istraživanju je sudjelovalo ukupno 100 bolesnika u glavnoj, dijaliziranoj skupini, dok je u kontrolnu skupinu uključeno ukupno 30 zdravih dragovoljaca odgovarajuće dobi i spola. Obje skupine bolesnika praćene su tijekom jedne godine. Iz kontrolne i ispitne skupine nije bilo isključenja tijekom praćenja.

### 4.1 Osnovne karakteristike ispitne i kontrolne skupine

Tablica 4. Raspodjela osnovnih demografskih karakteristika dijalizirane i kontrolne zdrave skupine

Varijabla	Dijalizirana skupina (N=100)	Kontrolna skupina (N=30)	P-vrijednost
Dob (godine, medijan (raspon))	71,5 (28-93)	68,5 (46-87)	P=0,6033
Spol (muškarci, N)	52 (52%)	15 (50%)	P=0,4612
Indeks tjelesne težine (kg/m <sup>2</sup> )	25,7±5,1	25,6±3,05	P=0,6287

§ P<0,05 se smatra statistički značajnim

U osnovnim demografskim karakteristikama kao što su dob, spol i indeks tjelesne težine (BMI) nema statistički značajne razlike između dijalizirane i kontrolne

skupine zdravih ispitanika. Medijan dužine trajanja dijaliziranog liječenja je iznosio 36 mjeseci (raspon 6-360 mjeseci) za dijaliziranu skupinu.

Tablica 5. Raspodjela laboratorijskih nalaza (kompletna krvna slika) dijalizirane i kontrolne skupine

Varijabla	Dijalizirana skupina (N=100)	Kontrolna skupina (N=30)	P-vrijednost
Leukociti ( $\times 10^9/L$ )	7,05 $\pm$ 1,98	6,3 $\pm$ 1,17	P=0,0663
Eritrociti ( $\times 10^{12}/L$ )	3,59 $\pm$ 0,49	4,51 $\pm$ 0,34	P<0,0001
Hemoglobin (g/L)	111,9 $\pm$ 16,4	139,5 $\pm$ 12,3	P<0,0001
Hematokrit (L/L)	0,34 $\pm$ 0,05	0,41 $\pm$ 0,03	P<0,0001
MCV (fL)	96 $\pm$ 5	92 $\pm$ 4	P=0,0013
RDW (Raspodjela eritrocita po volumenu, %)	15,9 $\pm$ 1,4	13,6 $\pm$ 0,7	P<0,0001
Eozinofili (N)	0,31 $\pm$ 0,53	0,16 $\pm$ 0,12	P=0,0194
Eozinofili (%)	3,6 $\pm$ 2,7	2,3 $\pm$ 1,6	P=0,0110

§ P<0,05 se smatra statistički značajnim

U nalazima kompletne krvne slike nalaze se statistički značajne razlike u crvenoj krvnoj slici (apsolutnom broju eritrocita, hemoglobinu i hematokritu), te u nalazu eozinofila (apsolutnom i relativnom). Ostali parametri diferencijalne krvne slike su bez statistički značajne razlike između dijalizirane i kontrolne skupine.

Tablica 6a. Raspodjela laboratorijskih nalaza (biokemijski) dijalizirane i kontrolne skupine

Varijabla	Dijalizirana skupina (N=100)	Kontrolna skupina (N=30)	P-vrijednost
Glukoza u krvi (mmol/L)	6,3±2,6	5,8±1,3	P=0,8541
Ureja (mmol/L)	25,6±6,6	6,3±1,7	P<0,0001
Kreatinin (μmol/L)	817±226	96±15	P<0,0001
Urična kiselina (μmol/L)	392±69	314±101	P=0,0082
Albumini (g/L)	37±4	43±2	P<0,0001
Ukupni protein (g/L)	66±5	75±3	P<0,0001

§ P<0,05 se smatra statistički značajnim

Tablica 6b. Raspodjela laboratorijskih nalaza (biokemijski) dijalizirane i kontrolne skupine

Varijabla	Dijalizirana skupina (N=100)	Kontrolna skupina (N=30)	P-vrijednost
Trigliceridi (mmol/L)	2,20±2,26	1,48±0,8	P=0,0205
Ukupni kolesterol (mmol/L)	4,39±1,18	5,99±0,75	P<0,0001
HDL (mmol/L)	1,13±0,33	1,64±0,32	P<0,0001
Bilirubin - ukupni ( $\mu$ mol/L)	8,4±3,2	14,3±5,6	P<0,0001
Aspartat-aminotransferaza (U/L)	14 (4 - 60)	22 (14 - 46)	P<0,0001
Alanin-aminotransferaza (U/L)	13 (2 - 118)	19 (5 - 48)	P=0,0030
Gama-glutamilttransferaza (U/L)	23 (8 - 245)	23 (13 - 65)	P=0,3010

§ P<0,05 se smatra statistički značajnim

Tablica 6c. Raspodjela laboratorijskih nalaza (biokemijski) dijalizirane i kontrolne skupine

Varijabla	Dijalizirana skupina (N=100)	Kontrolna skupina (N=30)	P-vrijednost
Željezo ( $\mu\text{mol/L}$ )	12,1 $\pm$ 4,8	18,2 $\pm$ 9,2	P=0,0002
UIBC ( $\mu\text{mol/L}$ )	22,8 $\pm$ 7,5	38,9 $\pm$ 9,2	P<0,0001
TIBC ( $\mu\text{mol/L}$ )	34,9 $\pm$ 6,6	56,2 $\pm$ 8	P<0,0001
Feritin (g/L)	1105 $\pm$ 666	229 $\pm$ 236	P<0,0001

§ P<0,05 se smatra statistički značajnim

Tablica 6d. Raspodjela laboratorijskih nalaza (biokemijski) dijalizirane i kontrolne skupine

Varijabla	Dijalizirana skupina (N=100)	Kontrolna skupina (N=30)	P-vrijednost
Visoko osjetljivi C-reaktivni protein (mg/L)	14,1±23,2	8,5±23,6	P=0,0016
NT-pro-BNP (pg/ml)	10560±10921	193±138	P<0,0001
Eozinofilni kationski protein (µg/L)	17,01±14,12	10,78±9,38	P=0,0012

§ P<0,05 se smatra statistički značajnim

Tablica 7. Raspodjela ultrazvučnih parametara ateroskleroze karotidne arterije dijalizirane i kontrolne skupine

Varijabla	Dijalizirana skupina (N=100)	Kontrolna skupina (N=30)	P-vrijednost
Srednja debljina intima- medie (mm)	0,68±0,19	0,50±0,12	P<0,0001
Maksimalna debljina intima- medie (mm)	0,75±0,2	0,57±0,13	P<0,0001
Težina aterosklerotskog plaka (mm)	14,75±14,85	6,57±3,75	P<0,0001

§ P<0,05 se smatra statistički značajnim



#### 4.2. Osnovne karakteristike dijalizirane skupine ovisno o medijanu ECP-a

Studijska populacija dijalizirane skupine podijeljena je u dvije skupine u ovisnosti o medijanu ECP-a. Vrijednost medijana ECP-a dijalizirane skupine iznosi 13,00  $\mu\text{g/L}$ , uz 95% interval pouzdanosti (11,00 – 14,12)  $\mu\text{g/L}$  za medijan.

Tablica 8. Raspodjela osnovnih demografskih karakteristika dijalizirane skupine u ovisnosti o medijanu ECP-a

Varijabla	ECP $\leq$ 13,00 (n=52)	ECP $>$ 13,00 (n=48)	P-vrijednost
Dob (godine, medijan (raspon))	72 (39 - 90)	71 (28 - 93)	P=0,6071
Spol (muškarci, N)	26	26	P=0,5458
Indeks tjelesne težine ( $\text{kg/m}^2$ )	25,84 $\pm$ 5,75	25,71 $\pm$ 4,34	P=0,7510

§ P<0,05 se smatra statistički značajnim

Tablica 9. Raspodjela osnovnih anamnestičkih podataka dijalizirane skupine u ovisnosti o medijanu ECP-a

Varijabla	ECP $\leq$ 13,00 (n=52)	ECP $>$ 13,00 (n=48)	P-vrijednost
Anamneza arterijske hipertenzije (N)	43	42	P=0,5582
Anamneza šećerne bolesti (N)	21	14	P=0,2478
Anamneza koronarne bolesti (N)	17	7	P=0,0382
Anamneza moždanog udara/TIA (N)	8	0	P=0,0076

§P<0,05 se smatra statistički značajnim

Tablica 10. Raspodjela osnovnih mjerila kvalitete i kvantitete dijaliziranog liječenja u ovisnosti o medijanu ECP-a

Varijabla	ECP $\leq$ 13,00 (n=52)	ECP >13,00 (n=48)	P-vrijednost
Terapija eritropoetinom (N)	45	45	P=0,2524
Ukupno trajanje dijaliziranog liječenja (mjeseci)	36 (6 - 360)	33 (6 - 252)	P=0,5343
Kt/V	1,37 $\pm$ 0,20	1,30 $\pm$ 0,26	P=0,0751

§ P<0,05 se smatra statistički značajnim

Tablica 11. Raspodjela medikamentne terapije dijalizirane skupine u ovisnosti o medijanu ECP-a u trenutku uključenja u studiju

Varijabla	ECP ≤13,00 (n=52)	ECP >13,00 (n=48)	P-vrijednost
ACE/AT II blokatori (N)	19	19	P=0,9900
Beta-blokatori (N)	22	14	P=0,1785
Blokatori utoka kalcija (N)	29	26	P=0,8740
Statini (N)	16	13	P=0,6905
Inhibitori protonske pumpe (N)	15	16	P=0,6340

§ P<0,05 se smatra statistički značajnim

Tablica 12. Mjerila fizikalne sposobnosti ispitanika dijalizirane skupine u ovisnosti o medijanu ECP-a u trenutku uključenja u studiju

Varijabla	ECP $\leq$ 13,00 (n=52)	ECP $>$ 13,00 (n=48)	P-vrijednost
ECOG status	2,5 (1-4)	2,0 (1-4)	P=0,2570
Fibrilacija atrija  (N)	13	8	P=0,3186

§ P<0,05 se smatra statistički značajnim

Tablica 13. Raspodjela laboratorijskih nalaza (kompletna krvna slika) dijalizirane skupine u ovisnosti o medijanu ECP-a

Varijabla	ECP ≤13,00 (n=52)	ECP >13,00 (n=48)	P-vrijednost
Leukociti (x10 <sup>9</sup> /L)	6,63±2,01	7,50±1,85	P=0,0319
Hemoglobin (g/L)	108±18	116±13	P=0,0297
MCV (fL)	95,6±5,4	96,6±5,1	P=0,2507
RDW (Raspodjela eritrocita po volumenu, %)	15,9±1,4	15,8±1,3	P=0,8360
Eozinofili (N)	0,2 (0,0 – 2,8)	0,3 (0,0 – 4,6)	P=0,0025
Eozinofili (%)	2,98±1,96	4,29±3,20	P=0,0119

§ P<0,05 se smatra statistički značajnim

Tablica 14. Raspodjela laboratorijskih nalaza (biokemijski) dijalizirane skupine u ovisnosti o medijanu ECP-a

Varijabla	ECP ≤13,00 (n=52)	ECP >13,00 (n=48)	P-vrijednost
Kreatinin (mmol/L)	776±241	861±202	P=0,2210
Visoko osjetljivi C-reaktivni protein (mg/L)	5,5 (0,7 – 154,2)	6,4 (0,4 – 86,9)	P=0,6538
NT-pro-BNP (pg/ml)	6829 (413 - 35000)	5783 (466 - 35000)	P=0,3220
Albumini (g/L)	37,5±4,2	38,1±4,3	P=0,3192
Ukupni kolesterol (mmol/L)	4,30±1,22	4,49±1,14	P=0,3481
Željezo (μmol/L)	11,94±5,02	12,38±4,65	P=0,4295
TIBC (μmol/L)	35,10±6,18	34,83±7,13	P=0,6941

§ P<0,05 se smatra statistički značajnim

Tablica 15. Raspodjela ultrazvučnih parametara ateroskleroze karotidne arterije dijalizirane skupine u ovisnosti o medijanu ECP-a

Varijabla	ECP $\leq$ 13,00 (n=52)	ECP >13,00 (n=48)	P-vrijednost
Srednja debljina intima - medie (mm)	0,66 $\pm$ 0,17	0,70 $\pm$ 0,20	P=0,2833
Maksimalna debljina intima-medie (mm)	0,73 $\pm$ 0,18	0,77 $\pm$ 0,21	P=0,2630
Težina aterosklerotskog plaka (mm)	12,68 $\pm$ 7,82	17,00 $\pm$ 19,70	P=0,1841

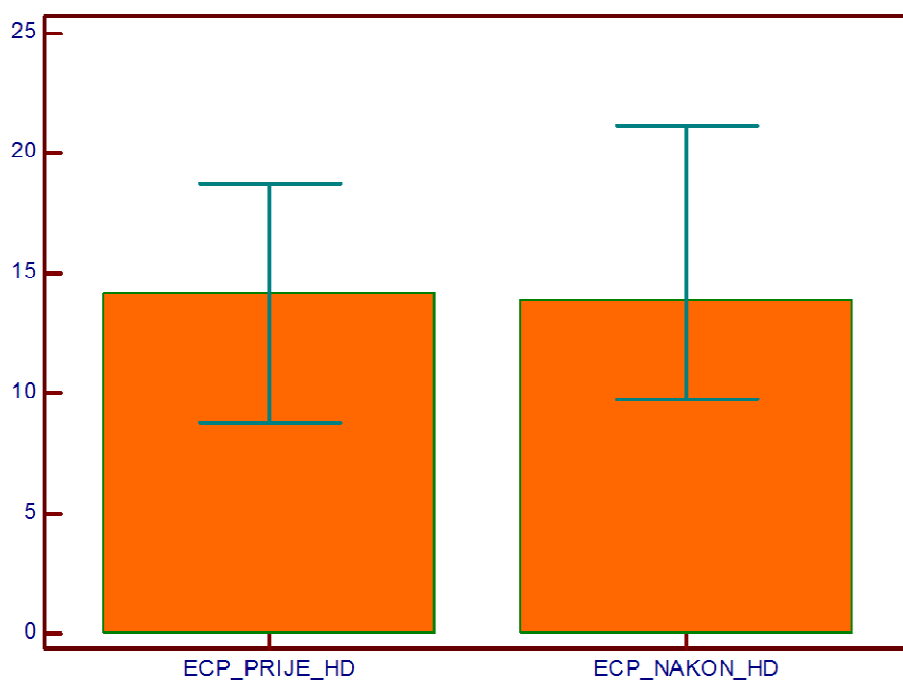
§ P<0,05 se smatra statistički značajnim



### 4.3. Utjecaj procesa hemodijalize na serumsku koncentraciju ECP-a

U ispitivanje utjecaja procesa hemodijalize uključeno je ukupno 15 ispitanika iz glavne dijalizirane skupine (sukladno preporukama Povjerenstva na obrani teme doktorske disertacije). Ispitanici su izabrani metodom slučajnog odabira uz preselekciju istog dijalizatora (FX 60). Medijan serumске koncentracije ECP-a prije dijalize je iznosila 14,2  $\mu\text{g/L}$  uz 95% interval pouzdanosti (8,76 - 18,72), a medijan ECP-a nakon dijalize je iznosio 13,9  $\mu\text{g/L}$  uz 95% interval pouzdanosti (9,72 - 21,14).

Slika 2. Serumске koncentracije ECP-a prije i nakon hemodijalize (Wilcoxon test: total of ranks = 55,00;  $P=0,8040$ ).



#### 4.4. Osnovne karakteristike dijalizirane skupine ovisno o medijanu RDW-a

Studijska populacija dijalizirane skupine podijeljena je u dvije skupine u ovisnosti medijana RDW-a. Vrijednost medijana RDW-a dijalizirane skupine iznosi 15,75  $\mu\text{g/L}$ , uz 95% interval pouzdanosti (15,47 – 16,00)  $\mu\text{g/L}$  za medijan.

Tablica 16. Raspodjela osnovnih demografskih karakteristika dijalizirane skupine u ovisnosti o medijanu RDW-a

Varijabla	RDW $\leq$ 15,75 (n=50)	RDW $>$ 15,75 (n=50)	P-vrijednost
Dob (godine, medijan (raspon))	66,4 $\pm$ 14,2	67,7 $\pm$ 14	P=0,4840
Spol (muškarci, N)	23	29	P=0,9267
Indeks tjelesne težine (kg/m <sup>2</sup> )	25,9 $\pm$ 4,8	25,5 $\pm$ 5,3	P=0,5395

§ P<0,05 se smatra statistički značajnim

Tablica 17. Raspodjela osnovnih anamnestičkih podataka dijalizirane skupine u ovisnosti o medijanu RDW-a

Varijabla	RDW $\leq 15,75$ (n=50)	RDW $>15,75$ (n=50)	P-vrijednost
Anamneza arterijske hipertenzije (N)	41	44	P=0,4163
Anamneza šećerne bolesti (N)	14	21	P=0,1489
Anamneza koronarne bolesti (N)	14	10	P=0,3595
Anamneza moždanog udara/TIA (N)	1	7	P=0,0371

§ P<0,05 se smatra statistički značajnim

Tablica 18. Raspodjela osnovnih mjerila kvalitete i kvantitete liječenja dijalizom u ovisnosti o medijanu RDW-a

Varijabla	RDW $\leq$ 15,75 (n=50)	RDW >15,75 (n=50)	P-vrijednost
Terapija eritropoetinom (N)	46	44	P=0,5252
Ukupno trajanje liječenja dijalizom (mjeseci)	36 (6-180)	29 (6-360)	P=0,3904
KT/V	1,37 $\pm$ 0,21	1,3 $\pm$ 0,24	P=0,0682

§ P<0,05 se smatra statistički značajnim

Tablica 19. Raspodjela medikamentne terapije dijalizirane skupine u ovisnosti o medijanu RDW-a u trenutku uključenja u studiju

Varijabla	RDW $\leq$ 15,75 (n=50)	RDW $>$ 15,75 (n=50)	P-vrijednost
ACE/AT II blokatori (N)	18	20	P=0,6851
Beta-blokatori (N)	17	19	P=0,6819
Blokatori utoka kalcija (N)	23	32	P=0,0747
Statini (N)	12	17	P=0,2796
Inhibitori protonske pumpe (N)	12	19	P=0,1371

§ P<0,05 se smatra statistički značajnim

Tablica 20. Mjerila fizikalne sposobnosti dijalizirane skupine u ovisnosti o medijanu RDW-a u trenutku uključenja u studiju

Varijabla	RDW $\leq$ 15,75 (n=50)	RDW $>$ 15,75 (n=50)	P-vrijednost
ECOG status	2 (1-4)	2,5 (1-4)	P=0,1051
Fibrilacija atrija (N)	7	14	P=0,0935

§ P<0,05 se smatra statistički značajnim

Tablica 21. Raspodjela laboratorijskih nalaza (kompletna krvna slika) dijalizirane skupine u ovisnosti o medijanu RDW-a

Varijabla	RDW $\leq$ 15,75 (n=50)	RDW $>$ 15,75 (n=50)	P-vrijednost
Leukociti ( $\times 10^9/L$ )	7,02 $\pm$ 2,04	7,08 $\pm$ 1,93	P=0,7960
Hemoglobin (g/L)	114 $\pm$ 15	109 $\pm$ 17	P=0,1961
MCV (fL)	96 $\pm$ 4	96 $\pm$ 6	P=0,8903
Eozinofili (N)	0,2 (0,0 – 2,8)	0,2 (0,0 – 4,6)	P=0,6071
Eozinofili (%)	3,86 $\pm$ 3,25	3,37 $\pm$ 2,00	P=0,8281

§ P<0,05 se smatra statistički značajnim

Tablica 22. Raspodjela laboratorijskih nalaza (biokemijski) dijalizirane skupine u ovisnosti o medijanu RDW-a

Varijabla	RDW $\leq$ 15,75 (n=50)	RDW $>$ 15,75 (n=50)	P-vrijednost
Kreatinin (mmol/L)	825 $\pm$ 196	809 $\pm$ 254	P=0,5908
Visoko osjetljivi C-reaktivni protein (mg/L)	5,725 (0,6 - 92,9)	7,850 (0,4 - 154,2)	P=0,1251
NT-pro-BNP (pg/ml)	4671 (413-35000)	6633 (466-35000)	P=0,1310
Albumini (g/L)	38 $\pm$ 3	36 $\pm$ 4	P=0,1476
Ukupni kolesterol (mmol/L)	4,33 $\pm$ 1,01	4,45 $\pm$ 1,34	P=0,9204
Željezo ( $\mu$ mol/L)	12,6 $\pm$ 4,5	11,6 $\pm$ 5,1	P=0,3592
TIBC ( $\mu$ mol/L)	35,1 $\pm$ 5,6	34,8 $\pm$ 7,9	P=0,7933
Eozinofilni kationski protein ( $\mu$ g/L)	15,69 $\pm$ 10,06	18,33 $\pm$ 17,26	P=0,9122

$\S$ P<0,05 se smatra statistički značajnim



Tablica 23. Raspodjela ultrazvučnih parametara ateroskleroze karotidne arterije u ovisnosti o medijanu RDW-a

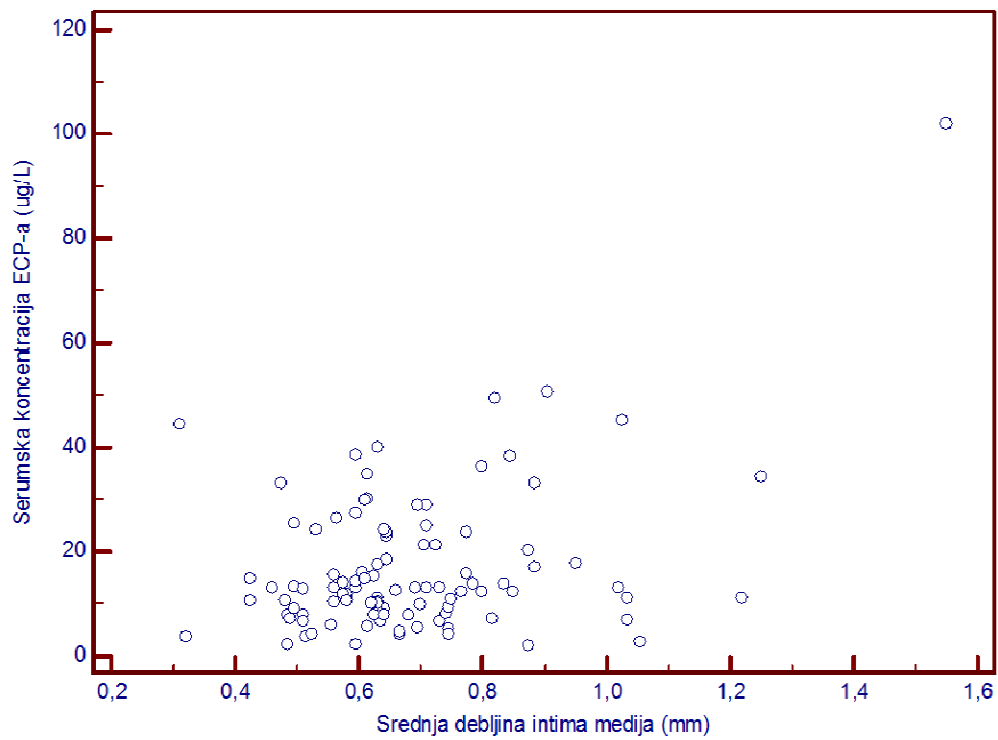
Varijabla	RDW $\leq$ 15,75 (n=50)	RDW $>$ 15,75 (n=50)	P-vrijednost
Srednja debljina intima- medie (mm)	0,65 $\pm$ 0,17	0,71 $\pm$ 0,20	P=0,1486
Maksimalna debljina intima- medie (mm)	0,72 $\pm$ 0,17	0,78 $\pm$ 0,22	P=0,2244
Težina aterosklerotskog plaka (mm)	13,22 $\pm$ 7,86	16,29 $\pm$ 19,47	P=0,7459

§ P<0,05 se smatra statistički značajnim

#### **4.5. Korelacije ECP-a s biokemijskim i ultrazvučnim parametrima kod bolesnika na hemodijalizi**

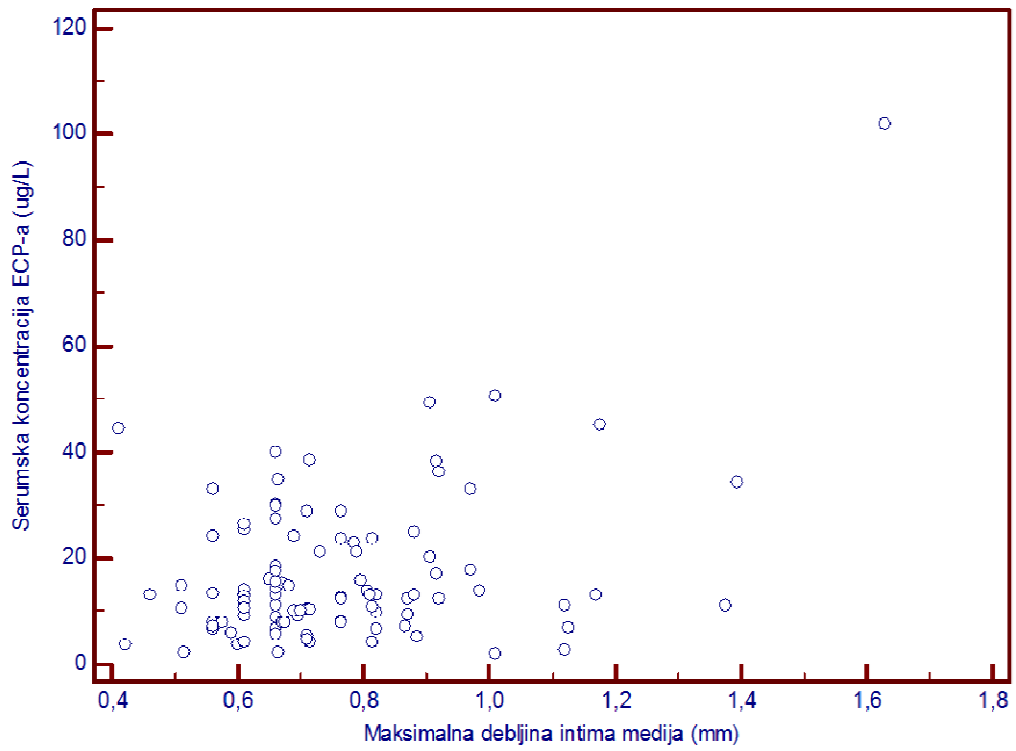
Analizom distribucije podataka u dijaliziranoj skupini identificiran je jedan „outlayer“ – kod kojega se mjeri serumska koncentraciju ECP-a 102 µg/L (aritmetička sredina dijalizirane skupine iznosi 17,01±14,12 µg/L) uz visoke vrijednosti srednje debljine intima-medie 1,55mm (aritmetička sredina dijalizirane skupine iznosi 0,68±0,19mm) i maksimalne debljine intima-medie 1,63mm (aritmetička sredina dijalizirane skupine iznosi 0,75±0,2mm), te ukupne težine aterosklerotskog plaka od 136,45mm (aritmetička sredina dijalizirane skupine iznosi 14,75±14,85mm), te je zbog reprezentativnosti uzorka isključen iz daljnje analize Pearsonove korelacije i regresije. Iz Spearmanove rank korelacije isti nije isključen obzirom na činjenicu da isto nije metodološki potrebno. U analizi Pearsonove korelacije između serumske koncentracije ECP-a i srednje debljine intima-medie izračunati koeficijent korelacije iznosi  $r=0,155$ ,  $P=0,1249$ ; analizom Spearman korelacije izračunati  $\rho=0,160$ ,  $P=0,1124$  (Sl. 3.).

Slika 3. Korelacija ECP-a i srednje debljine intima-medie – Spearman rank korelacija



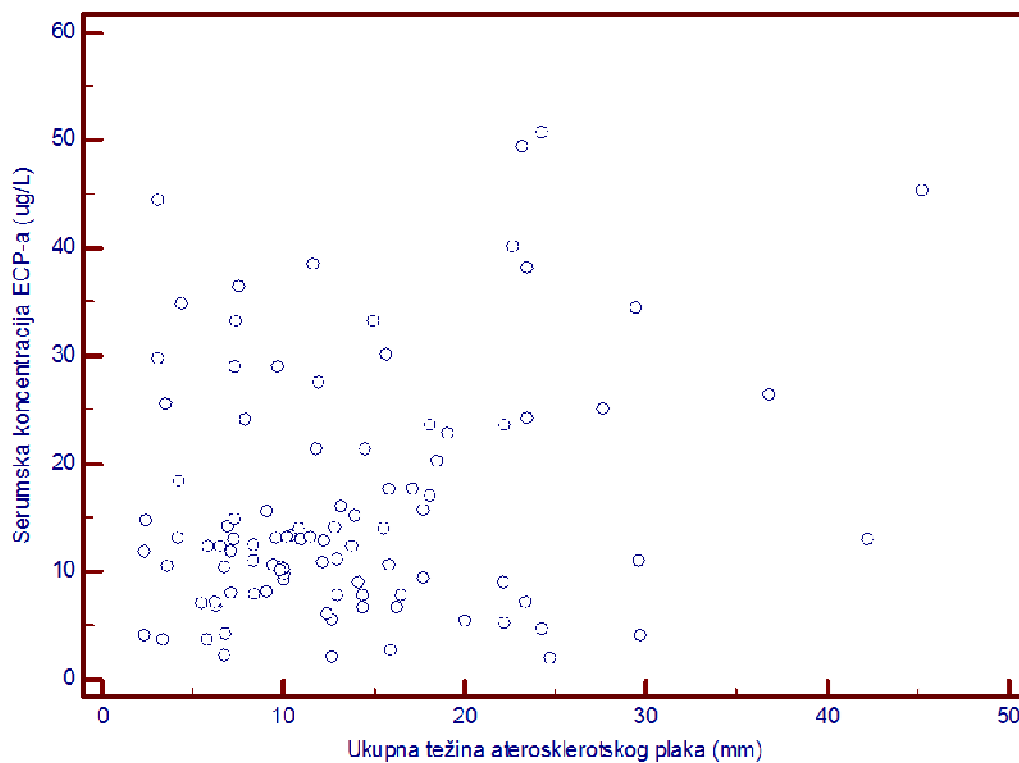
U analizi Pearsonove korelacije između serumske koncentracije ECP-a i maksimalne debljine intima-medie izračunati koeficijent korelacije iznosi  $r=0,174$ ,  $P=0,0843$ ; analizom Spearman korelacije izračunati  $\rho=0,168$ ,  $P=0,0938$  (slika 4.)

Slika 4. Korelacija ECP-a i maksimalne debljine intima-medie - Spearman rank korelacija



U analizi Pearsonove korelacije između serumske koncentracije ECP-a i ukupne težine aterosklerotskog plaka izračunati koeficijent korelacije iznosi  $r=0,234$ ,  $P=0,0193$  (Slika 5.). Spearman rank korelacija je statistički neznačajna ( $Rho=0,148$ ,  $P=0,1418$ ).

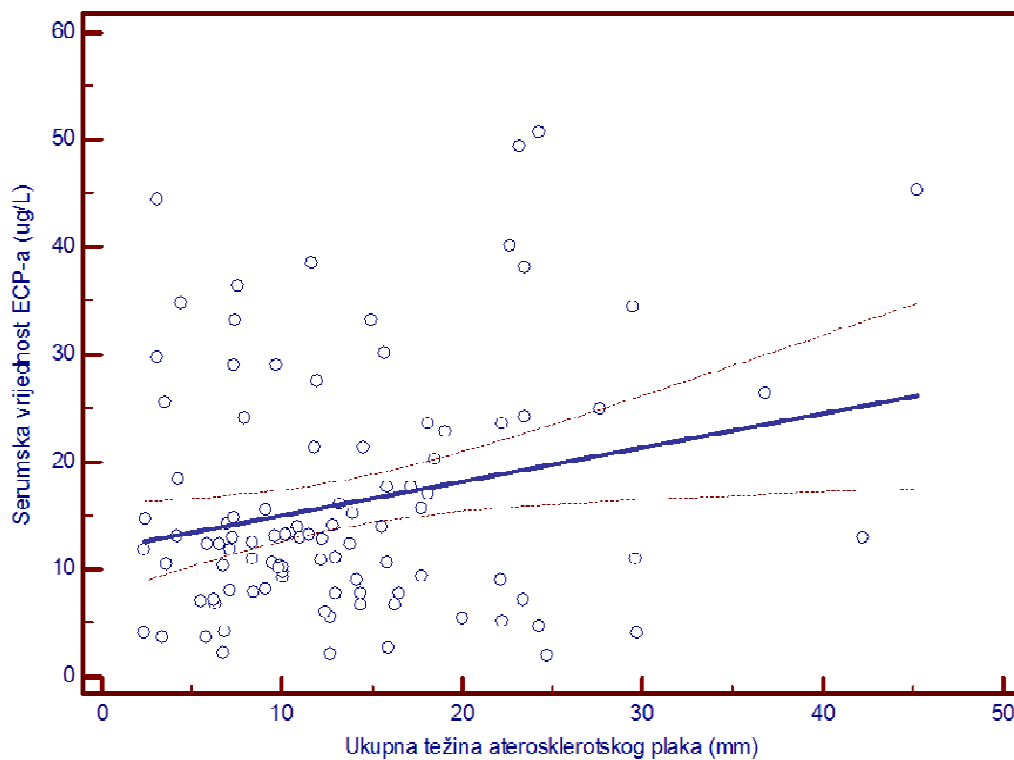
Slika 5. Korelacija ECP-a i ukupne težine aterosklerotskog plaka – Pearsonova korelacija



Učinjena je regresijska analiza serumske koncentracije ECP-a i ukupne težine aterosklerotskog plaka uz sljedeće rezultate.  $\hat{\alpha}$  (Intercept) = 5,6325;  $P < 0,0001$ ,

$\hat{\beta}$  (Slope) = 2,3803;  $p < 0,0193$ , te analiza varijance uz F-vrijednost = 5,6660;  $P = 0,019$  (Slika 6.).

Slika 6. Regresijska analiza serumske koncentracije ECP-a i ukupne težine aterosklerotskog plaka (pravac regresije uz 95% CI)



Tablica 24. Korelacija između ECP-a i ključnih biokemijskih parametara ( $P < 0,05$  se smatra statistički značajnim)

	Parametar	NT- pro- BNP	hs C- reaktivni protein	Ukupni kolesterol	KT/V	Eozinofili (%)
ECP	Koeficijent korelacije (r)	-0,030	0,102	0,176	-0,132	0,160
	P- vrijednost	0,7684	0,3142	0,0803	0,1913	0,1112
	n	100	100	100	100	100

#### 4.6. Analiza rizika za sveukupno preživljenje bolesnika na programu kronične hemodijalize u ovisnosti od ispitivanih biomarkera

Bolesnici iz dijalizirane skupine su praćeni kroz razdoblje od godinu dana. Sukladno tome, praćeno je preživljenje ispitanika u tom razdoblju. Ukupno je umrlo 25 ispitanika.

Tablica 25. Raspodjela preživjelih i umrlih osoba po spolu (uključeni i transplantirani bolesnici)

Spol	Živi	Mrtvi	Ukupno
Žene	37	11	48
Muškarci	38	14	52
Svi	75 (75%)	25 (25%)	100

Statistički nema značajne razlike u mortalitetu u odnosu na spol ispitanika ( $Z=0,564$ ,  $P=0,5727$ ) u obje skupine.

Tablica 26. Cox proporcijski hazardni model za sveukupni mortalitet nakon 12 mjeseci praćenja – univarijatna analiza



	Univarijatna analiza	
	HR (95% CI)	P-vrijednost
Dob	1,0560 (1,0190 to 1,0945)	P=0,0011
ECOG status	3,5347 (2,1569 to 5,7927)	P<0,0001
KT/V	0,0454 (0,0065 to 0,3177)	P=0,0013
Atrijska fibrilacija	0,2640 (0,1201 to 0,5804)	P=0,0018
Srednja debljina intima medija (mm)	21,2398 (2,9253 to 154,2142)	P=0,0045
Šećerna bolest	2,2056 (1,0100 to 4,8165)	P=0,0490
Hemoglobin (g/L)	0,9734 (0,9522 to 0,9951)	P=0,0221
Visoko osjetljivi C-reaktivni protein (mg/L)	1,0177 (1,0076 to 1,0278)	P=0,0052
NT-pro-BNP (pg/ml)	1 (1,0000 to 1,0001)	P=0,0197
Eozinofilni kationski protein (µg/L)	1,0322 (1,0005 to 1,0648)	P=0,049

RDW (Raspodjela eritrocita po volumenu, %)	1,5409 (1,2181 to 1,9493)	P=0,0007
Duljina trajanja dijalize (mjeseci)	0,9943 (0,9849 to 1,0038)	P=0,2379

§ p<0,05 se smatra statistički značajnim, HR – omjer rizika; 95% CI – interval pouzdanosti

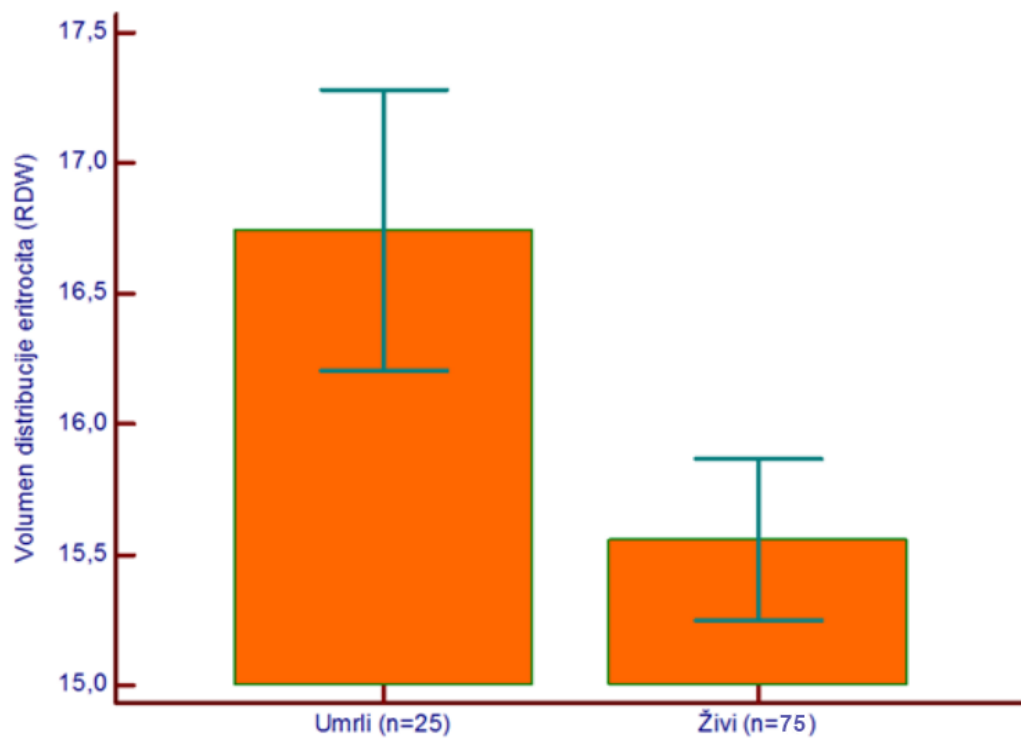
HR koji su statistički neznačajni nisu uključeni u multivarijatnu analizu te sukladno tome nisu ni prikazani u tablicama.

Tablica 27. Cox proporcijnski hazardni model za sveukupni mortalitet nakon 12 mjeseci praćenja – multivarijatna analiza

	Multivarijatna analiza	
	HR (95% CI)	P-vrijednost
Dob		NS
ECOG status	3,8624 (2,2769 to 6,5521)	P<0,0001
KT/V	0,0189 (0,0023 to 0,1580)	P=0,0003
Fibrilacija atrijska		NS
Srednja debljina intima- media (mm)		NS
Šećerna bolest		NS
Hemoglobin (g/L)		NS
Visoko osjetljivi C-reaktivni protein (mg/L)	1,0255 (1,0119 to 1,0392)	P=0,0002
NT-pro-BNP (pg/ml)		NS
Eozinofilni kationski protein (µg/L)		NS
RDW (Raspodjela eritrocita po volumenu, %)	1,5346 (1,1607 to 2,0290)	P=0,0028

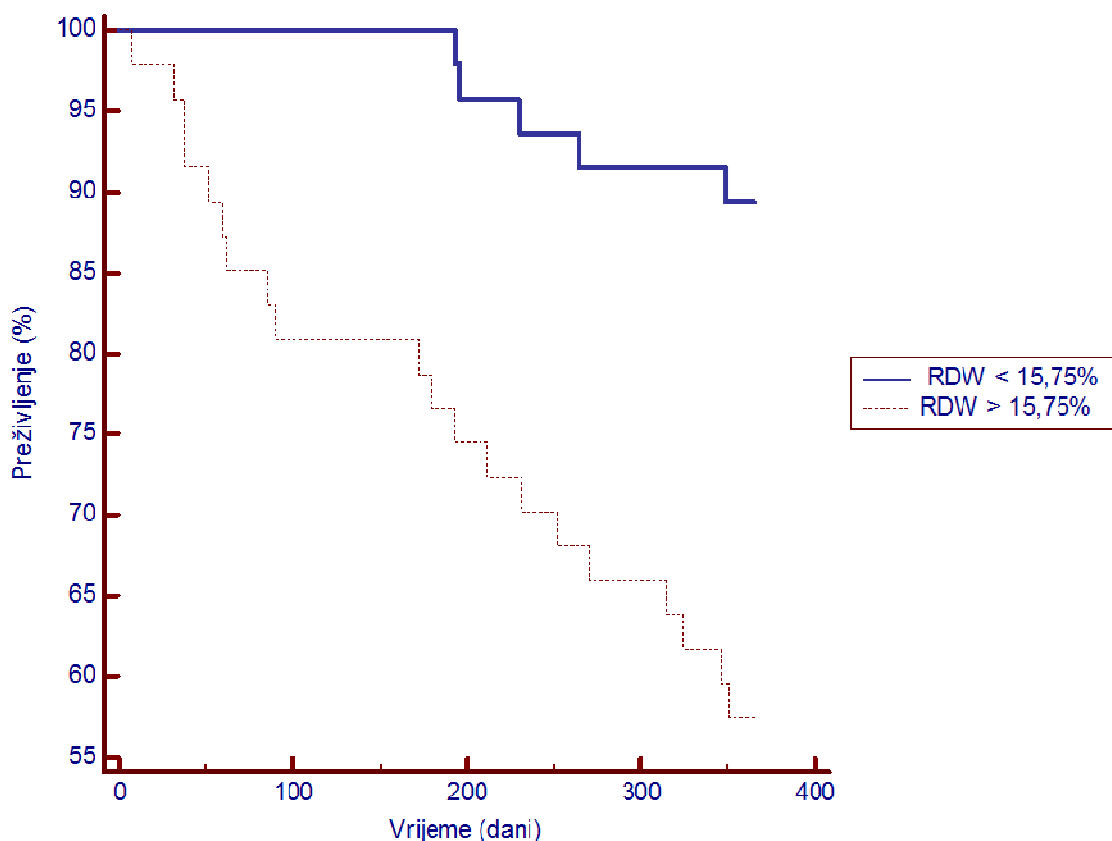
§ p<0,05 se smatra statistički značajnim, HR – omjer rizika; 95% CI – interval pouzdanosti;

Slika 7. Raspodjela eritrocita po volumenu (RDW) kao funkcija mortaliteta nakon praćenja od jedne godine (aritmetička sredina RDW sa 95% intervalom pouzdanosti)



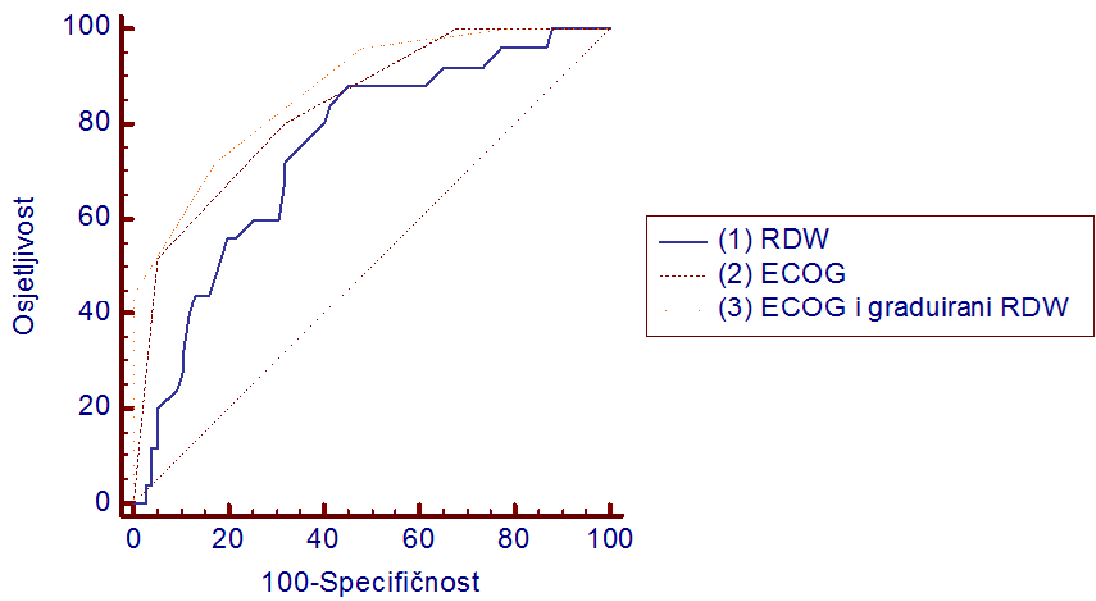
Statističkom analizom ispitanika koji su umrli i onih koji su živi nakon godine dana nađe se statistički značajna razlika u odnosu na volumen distribucije eritrocita (RDW) ( $Z=3,818$ ;  $P<0,001$ ).

Slika 8. Kaplan-Meier krivulja preživljenja u odnosu na volumen distribucije eritrocita – RDW medijan (15,75%).



Analizom Kaplan-Meier krivulja preživljenja u odnosu na medijan volumena distribucije eritrocita (RDW) dobije se statistički značajna razlika u preživljenju uz Logrankov test Chi-square = 12,91, DF 1, P=0,0003, HR 5,0223 uz 95% CI 2,2771 – 11,0330).

Slika 9. Dodatna prognostička vrijednost volumena distribucije eritrocita (RDW) u bolesnika na programu kronične dijalize mjereno usporedbom površine ispod ROC krivulje za: (1) RDW samostalno, (2) ECOG samostalno, i (3) ECOG plus graduirani RDW.



Statističkom analizom ROC krivulja za volumen distribucije eritrocita (RDW) dobije se površina ispod krivulje (AUC) 0,745, uz SE 0,0553, sa 95% CI 0,648 – 0,827). Za ECOG skor dobije se površina ispod krivulje (AUC) 0,834, uz SE 0,0429, sa 95% CI 0,746 – 0,901). Za kombinirani parametar koji se sastoji od ECOG skora i graduiranog RDW dobije se površina ispod krivulje (AUC) 0,872, uz SE 0,0381, sa 95% CI 0,790 – 0,930).

Nakon što se učini kombinirani prikaz ROC krivulja za navedene parametre (Sl. 7.) statističkom analizom dobije se RDW vs. ECOG skor 95% CI (-0,0496 – 0,228); zatim RDW vs. ECOG skor i graduirani RDW 95% CI (0,0176 – 0,237) i ECOG skor vs ECOG skor i graduirani RDW 95% CI (-0,0060 – 0,0818). Zamjećuje se statistički značajna razlika između samostalne RDW vrijednosti i kombiniranog parametra ECOG i graduirani RDW (P=0,0229).

## 5. RASPRAVA

Sukladno rezultatima ovoga istraživanja, uloga eozinofilnog kationskog proteina kao biomarkera karotidne ateroskleroze u bolesnika koji se liječe metodom kronične hemodijalize marginalna je. Iako rezultati talijanske istraživačke skupine na čelu s prof. Niccolijem identificiraju ECP kao novi biomarker koronarne ateroskleroze u općoj populaciji,<sup>58</sup> naši rezultati također ne potvrđuju u skupini uremičnih bolesnika za segment karotidne ateroskleroze. Naime, analizom korelacije između serumskih koncentracija ECP-a i debljine intima-medie karotidne arterije ne postiže se statistički značajna korelacija (Sl. 2.), dok u analizi korelacije između ECP-a i ukupne težine aterosklerotskog plaka rezultati su granično značajni za biološke sustave u smislu povezanosti dva parametra, ovisno o metodi koja se koristi pri analizi korelacije, kao i isključenju identificiranih „outlayera“. Kao ilustraciju navodim rezultat korelacije između ECP-a i surogata ateroskleroze, IMT i PS. Naime, ako bismo u statističku analizu uvrstili „outlayer“ kojega smo isključili iz analize korelacije između ECP-a i ultrazvučnih parametara ateroskleroze, dobivena vrijednost Personovog koeficijenta korelacije značajno bi se mijenjala. Konkretno, za korelaciju između ECP-a i ukupne težine aterosklerotskog plaka uključivanjem „outlayera“ koeficijent Pearsonove korelacije iznosi  $r=0,6077$  uz vrijednost  $P<0,0001$  što predstavlja nalaz značajan za biološke sustave. Isključivanjem „outlayera“ iz statističke analize vrijednosti primaju drugačiju vrijednost  $r=0,2349$ ;  $P=0,0193$ , doduše još uvijek statistički značajnu, ali s manjom r-vrijednošću koja eliminira navedeni biomarker kao ključan u biološkim sustavima. Obzirom na navedeno, ne može se u potpunosti isključiti uloga ECP-a u određenom segmentu patogenetskog procesa aterogeneze, no nije vjerojatno je li presudna što naši rezultati isto pokazuju. Navedeni zaključak podržavaju i rezultati linearne



regresije između serumske koncentracije ECP-a i ukupne težine aterosklerotskog plaka. Naime, ako se težina aterosklerotskog plaka promijeni za 1 jedinicu, predviđena promjena u prosječnoj vrijednosti ECP-a biti će 2,3803. Na tragu istoga zaključka su i radovi koji su inicijalno identificirali eozinofile, odnosno ECP kao element u procesu ateroskleroze i nastanku vaskularnih bolesti.<sup>85</sup> Obzirom da ne postoji povezanost ECP-a s IMT-om već sa PS-om, nameće se ideja da je ECP bitniji u procesu nastanka aterosklerotskog plaka odnosno njegovoga povećanja nego u inicijalnom zadebljanju IMT karotidne arterije. No, navedeno ostaje tek na razini hipoteze i zahtijeva daljnja istraživanja.

Nakon detaljne analize rezultata talijanske skupine dolazi se do jasnog zaključka - iako je dokazana povezanost serumske koncentracije ECP-a s težinom ateroskleroze u koronarnim arterijama, njihovi podaci također pokazuju da nema povezanosti između serumskog ECP-a i destabilizacije aterosklerotskog plaka. Također nisu nađene statistički značajne razlike između specifične populacije bolesnika sa stabilnom anginom pectoris i infarktom miokarda bez ST elevacije.<sup>58</sup> Temeljem navedenih rezultata zaključak talijanske skupine istraživača je bio da ECP nema ulogu u destabilizaciji aterosklerotskog plaka, već se isto pripisuje C-reaktivnom proteinu kao mjeri sustavne upalne aktivnosti koja je glavni pokretač klinički značajnih sindroma koji nastaju kao posljedica destabilizacije aterosklerotskog plaka.<sup>58</sup> Isto je ključno jer definira prognostičku značajnost CRP-a kao zajedničkog nazivnika sveobuhvatnog, ali nespecifičnog procesa upale. Sukladno navedenom, nameće se logični zaključak da je preživljenje bolesnika definirano stupnjem stabilnosti aterosklerotske bolesti a ne njezinom proširenošću. Prema našim rezultatima, ispitna skupina dijaliziranih bolesnika ima značajno više vrijednosti C-reaktivnog proteina u odnosu na opću populaciju, što je sukladno trenutno općoj prihvaćenoj teoriji perzistentne upale

koja je nazočna u populaciji dijaliziranih bolesnika i publiciranim rezultatima.<sup>86,87</sup> U našoj studiji, u univarijantnoj i multivarijantnoj Cox-proporcijalnoj analizi C-reaktivni protein je potvrđen kao statistički značajan prognostički biomarker koji jasno identificira bolesnike s povišenim rizikom što je također sukladno ranije publiciranim studijama.<sup>32,87</sup> Stanje kronično izražene upale mjerene serumskom koncentracijom C-reaktivnog proteina i interleukina 6 indentificirano je u 50% bolesnika na hemodijalizi, te se pripisuje kroničnoj bubrežnoj insuficijenciji.<sup>88</sup> Istraživanja su povezala stupanj glomerularne filtracije (GFR) sa stupnjem upalnog odgovora, sugerirajući da je smanjena bubrežna eliminacija proinflamacijskih citokina, a zatim njihova povećana produkcija u uremiji ključni uzrok navedenoga stanja.<sup>89</sup> Identificirani su i drugi uzroci povišenoga upalnog odgovora u uremičnog bolesnika o čemu je bilo govora u uvodnom dijelu disertacije (*vidi: Uvod*). Glede ECP-a dokazali smo prognostičku značajnost u univarijantnoj analizi. No, nakon učinjene korekcije za poznate čimbenike rizika, isto je postalo statistički neznačajno. Navedeni rezultati uklapaju se u teoriju destabilizacije plaka i ranije publicirane studije.<sup>58</sup> Naime, ECP je marker eozinofilne aktivnosti, odnosno aktivnosti eozinofila u upali.<sup>51</sup> Uzroci kronične upale kao markera destabilizacije aterosklerotske bolesti kod bolesnika na hemodijalizi su brojni i opsežno elaborirani u literaturi.<sup>90</sup> Nekoliko studija su indentificirali eozinofile i ECP kao element aterosklerotskog plaka,<sup>42-44</sup> ali nakon analize svih rezultata našega istraživanja, čini se da serumska koncentracija ECP-a ne predstavlja ključni biomarker koji bi poslužio kao korelat karotidne ateroskleroze, pogotovo obzirom na očitu činjenicu da je uključen samo u dijelu upalne reakcije i kaskadne aktivacije aterogeneze.<sup>58</sup>

Načelno, proces upale je promoviran od strane nekoliko čimbenika koji mogu, ali i ne moraju biti povezani s procesom dijalize. To je svojevrsna

kombinacija poremećenoga imunog odgovora, odnosno određenoga stupnja imunodeficijencije karakterističnoga za uremične bolesnike i perzistirajućega upalnog podražaja (kontakta krvi s membranom, kontinuiranoga vaskularnog pristupa, kvalitete vode, itd.).<sup>88,90</sup> No, činjenica na koju naši rezultati nedvojbeno ukazuju je, da u uremičnih bolesnika serumska koncentracija ECP-a značajno viša u odnosu na opću populaciju (Tablica 6d.). Isto je sukladno ranije publiciranim istraživanjima<sup>55</sup>, a pripisuje se abnormalnoj homeostazi eozinofila u uremičnih bolesnika. Naime, poznata je eozinofilna predominacija u koštanoj srži uremičnih bolesnika koja je nazočna čak i uz normalan broj eozinofila u perifernoj krvi što za posljedicu ima povišene serumske koncentracije ECP-a.<sup>91,92</sup> No usprkos navedenome, ne treba zanemariti činjenicu da sam proces hemodijalize i peritonejske dijalize nema velikoga utjecaja na klirens upalnih medijatora (IL-6, CRP, TNF- $\alpha$ ),<sup>93</sup> što ostavlja mogućnost perzistirajućeg podražaja za sekreciju ECP-a i njegove konstantno povišene vrijednosti.

Iako su ranije publikacije identificirale sam proces dijalize također kao uzrok povišenja serumske koncentracije ECP-a,<sup>56</sup> naši rezultati to opovrgavaju. Objašnjenje za navedeno nalazimo u činjenici da su ranija istraživanja provedena u 80-im godinama prošloga stoljeća kada su u uporabi bili dijalizatori koji su se temeljili na celulozi. Danas se u suvremenim centrima za dijalizu kao što je naš, koriste biokompatibilne membrane za dijalizu s visokim protokom koje sa sobom nose mali broj nuspojava i interakcija s krvlju bolesnika i značajno smanjuju srčano-žilni mortalitet.<sup>94</sup> Svakako su potrebna daljnja istraživanja koja bi uključila više centara uz jasno predefiniране dijalizatore i višestruka mjerenja tijekom procesa dijalize. U ovome istraživanju to nije bilo moguće postići obzirom na osnovni koncept studije i realne mogućnosti istraživačkoga rada u okvirima doktorskoga studija.

Kada smo za potrebe analize podijelili ispitnu, dijaliziranu skupinu u ovisnosti o medijanu ECP-a značajna razlika se pojavila u incidenciji moždanoga udara/TIA. No, obzirom na mali broj moždanih udara, na temelju istoga ne bismo donosili konkretne zaključke već preporučujemo daljnja istraživanja.

Za očekivati je da dijalizirana skupina ima značajno izraženije procese ateroskleroze karotidne arterije mjerene surogatima ateroskleroze – IMT i PS a u odnosu na opću populaciju. Isto se pripisuje hipotezi akcelerirane ateroskleroze i detaljno je elaborirano u uvodu ove disertacije (*vidi: Uvod*) i potvrđeno mnogobrojnim istraživanjima.<sup>1-3,6,7</sup> Također, dijalizirana skupina bolesnika imala je niže vrijednosti parametara crvene krvne slike u odnosu na opću populaciju uz više apsolutne i relativne vrijednosti eozinofila u perifernoj krvi. Navedeni rezultati su sukladni ranije publiciranim istraživanjima i ne zahtijevaju daljnju raspravu obzirom da su navedene činjenice već duže vrijeme opće poznate u internoj medicini.<sup>22,23</sup> I u našoj ispitnoj skupini jasno je vidljiva niža koncentracija ukupnoga kolesterola uz više vrijednosti triglicerida u odnosu na opću populaciju. To potvrđuje postojanje tzv. „dijaliznog paradoksa“ i ograničava uporabu lipidograma kao bitnog čimbenika stratifikacije rizika, odnosno isključuje dijalizirane bolesnike iz potencijalne skupine za terapiju statinima. Isto je dokazano u randomiziranim, kontroliranim istraživanjima.<sup>25,26</sup> Niže vrijednosti aspartat-aminotransferaze i alanin-aminotransferaze objašnjavamo hipervolemijom koja je nazočna u bolesnika koji se liječe hemodijalizom, a navedeno je potvrđeno u recentnim istraživanjima vezanim uz problematiku hipoaminotransferasemije u populaciji dijaliziranih bolesnika.<sup>95</sup>

Tijekom jednogodišnjega praćenja ukupno je preminulo 25 bolesnika. Navedeni rezultati su sukladni rezultatima registara iz zapadno europskih

zemalja,<sup>96</sup> no ipak su nešto lošiji u odnosu na publicirani nacionalni hrvatski prosjek.<sup>97</sup> Navedeno objašnjavamo činjenicom da se radi o tercijskom centru za dijalizu koji rješava najkompleksnije bolesnike iz čitave Hrvatske, te uz ključnu činjenicu da je medijan dobi u našoj skupini bolesnika bio 4,5 godine viši u odnosu na medijan dobi nacionalnoga registra.<sup>97</sup> Prema publiciranim podacima *Hrvatskog registra nadomještanja bubrežne funkcije* bolesnici koji su započeli s nadomještanjem bubrežne funkcije tijekom 2010. godine imali su medijan dobi 67 godina s rasponom od 0 do 91 godine.<sup>97</sup>

Potvrđeni su ranije identificirani biomarkeri u literaturi kao klinički relevantni (dob, ECOG status, Kt/V, IMT, AF, šećerna bolest, stupanj anemije, hs-CRP, NT-pro-BNP).<sup>62,64</sup> Od analiziranih biomarkera, volumen distribucije eritrocita (RDW) pokazao se kao najpouzdaniji, poglavito kada se kombinira s kliničkom procjenom bolesnika – ECOG statusom (Tablica 28., Sl. 9.). RDW je nezavisan prediktor sveukupnog preživljenja u bolesnika na kroničnoj dijalizi. Štoviše, njegova značajnost ostaje signifikantna i nakon korekcije za validirane i poznate biomarkere preživljenja na hemodijalizi kao što su NT-pro BNP i visoko osjetljivi CRP odnosno IMT. Kada smo zbog potrebe analize podijelili bolesnike u dvije skupine u ovisnosti o medijanu RDW-a od 15,75%, stopa preživljenja je bila značajno niža u skupini s višim RDW-om. Nije bilo statistički značajnih razlika između navedenih skupina u ostalim testiranim varijablama što potvrđuje nezavisnost RDW-a. Naši podaci po prvi puta pokazuju nezavisan i aditivan učinak RDW-a na prognozu bolesnika koji se liječe kroničnom dijalizom. Prethodne studije u općoj populaciji i specifičnim populacijama bolesnika identificirali su značajnu korelaciju između RDW-a i koncentracije hemoglobina, MCV-a, hs CRP-a i leukocita.<sup>98-100</sup>

U našoj skupini bolesnika nije bilo korelacije između parametara crvene krvne slike i vrijednosti RDW-a što govori u prilog da je patogeneza povišenog RDW-a u uremičnih bolesnika još kompleksnija u odnosu na onu u općoj populaciji. Kod nekih studija provedenih na dijaliziranim bolesnicima, pokazano je da je RDW udružen sa stanjem snižene koncentracije željeza. No, mi to nismo potvrdili. Zanimljivi nalaz čini povišena incidencija moždanog udara/tranzitorne ishemijske atake u skupini s višim RDW-om. Kada to usporedimo s nalazima Ani i suradnika<sup>101</sup>, može se zaključiti da postoji moguća povezanost između RDW-a i moždano-žilne tromboze.

Kada se RDW kombinira s kliničkom procjenom bolesnika primarno temeljenoj na ECOG statusu, značajno se unaprjeđuje prognostički model RDW-a (Sl. 9.). Navedeni rezultati su na tragu istraživanja profesora Hunzikera koji je dokazao da kombiniranje RDW-a i SAPS (*Simplified Acute Physiology Score*)-a u jedinicama intenzivnog liječenja značajno unaprjeđuje mogućnost SAPS-a da identificira kritično bolesne osobe.<sup>74</sup>

Korelacija između RDW-a i albumina, atrijske fibrilacije, anamneze moždanog udara, željeza i uporabe beta-blokatora je bila statistički značajna (marginalna), ali bez stvarne korisnosti u biološkim sustavima obzirom da je vrijednost parametra korelacije  $r$  bila manja od 0,5. Isto preporučujemo kao predmet daljnjih istraživanja.

Ako se osvrnemo na literaturu koja se bavi mehanizmom temeljem koje se povišene vrijednosti RDW-a povezuju s povišenim mortalitetom, može se zaključiti da se malo toga konkretno zna. Do nedavno, smatralo se da povišene vrijednosti RDW-a znače da je povećana destrukcija eritrocita, ili što je češće, da imaju značenje inefektivne i povećane eritrocitne produkcije koje su izražene kod

bolesnika na dijalizi.<sup>102</sup> RDW može predstavljati stanje malnutricije, supresije koštane srži ili kronične upale.<sup>103</sup> Iako je temelj patogeneze ateroskleroze upalno zbivanje, nije vjerojatno da je jedina relacija RDW-a i ukupnog mortaliteta vezana uz upalni mehanizam. U prilog tome govore studije temeljem kojih je dokazano da je rizik udružen sa RDW-om u općoj populaciji nezavisan od vrijednosti CRP-a.<sup>74,103</sup> Naši rezultati to potvrđuju i za skupinu uremičnih bolesnika. Trenutno prihvaćena hipoteza temelji se na povezanosti RDW-a i oksidacijskog stresa.<sup>74</sup>

Oksidacijski stres povećava stupanj anizocitoze na način da uzrokuje disrupciju eritropoeze, poremećaj strukture membrane eritrocita, što posljedično smanjuje poluvrijeme života cirkulirajućih eritrocita i uzrokuje povišenje RDW-a.<sup>74</sup> Predloženi mehanizam također u obzir uzima ishemiju kao pokretačku snagu eritrocitopoeze i otpuštanja nezrelih oblika eritrocita u perifernu cirkulaciju, što indicira suboptimalan odgovor na oksidacijski stres.<sup>74</sup> Navedena hipoteza još nije validirana u istraživanjima ali predstavlja zanimljiv patofiziološki mehanizam temeljen na dosadašnjim spoznajama. Ono što čini RDW zanimljivim biomarkerom je činjenica da je klinički koristan, reproducibilan i standardiziran u svim kliničkim laboratorijima.

U ovome istraživanju ima nekoliko ograničenja. Prvo, nismo bili u mogućnosti ispitivati fluktuacije ispitivanih biomarkera tijekom vremena obzirom na objektivni nedostatak financijskih sredstava za takvo istraživanje. Također, bez obzira na činjenicu da je ovo prospektivno, longitudinalno istraživanje koje je dizajnirano sukladno trenutno važećim smjernicama, s dobrim praćenjem i obuhvatom ispitne populacije koja predstavlja svakodnevnne bolesnike u tercijskom centru za dijalizu, multicentrična studija s većim uključenjem

bolesnika dala bi dodatne odgovore, pogotovo u području sekundarnih i *post hoc* analiza.



## 6. ZAKLJUČAK

1. Bolesnici koji se liječe metodom kronične hemodijalize imaju značajno izraženije aterosklerotske promjene na karotidnim arterijama u odnosu na opću populaciju, te se mogu shvatiti kao model ubrzane ateroskleroze.
2. U skupini bolesnika koji su liječeni metodom kronične hemodijalize serumska koncentracija eozinofilnog kationskog proteina značajno je viša u odnosu na opću populaciju, no ne predstavlja ključan biomarker karotidne arteroskleroze.
3. U specifičnoj populaciji uremičnih bolesnika serumska koncentracija eozinofilnog kationskog proteina nema prognostičku značajnost u smislu biomarkera koji bi značajno pridonosio identifikaciji bolesnika s povišenim sveukupnim rizikom za smrtni ishod.
4. Potvrđene su uloge C-reaktivnog proteina i NT-pro-BNP-a kao aditivnih i nezavisnih prediktora sveukupnog mortaliteta kod bolesnika na hemodijalizi.

5. Identificiran je volumen distribucije eritrocita (RDW) kao snažan dodatni i nezavisni prediktor sveukupnog mortaliteta u skupini bolesnika koji se liječe metodom kronične hemodijalize.
  
6. Kada se RDW kombinira s kliničkom procjenom stanja bolesnika značajno se bolje identificiraju bolesnici s povišenim rizikom za smrtni ishod koji se liječe nadomjesnim bubrežnim liječenjem.

## 7. SAŽETAK

Prevalencija srčano-žilnih bolesti u bolesnika s bubrežnom insuficijencijom na programu kronične hemodijalize je visoka. Smatra se da je povećana prevalencija srčano-žilnih bolesti u tih bolesnika uzrokovana ubrzanom aterosklerozom koja se povezuje s tzv. „novim“ čimbenicima rizika kao što su visoko osjetljivi C-reaktivni protein (hsCRP), proband moždanog natrijuretskog peptida (NT-pro-BNP), homocistein, lipoprotein (a), upala i oksidacijski stres. Eozinofilni kationski protein (ECP) je cink-kationski upalni protein koji se u ljudskom organizmu nalazi uskladišten u granulama eozinofila. Prema rezultatima nedavnih studija serumska koncentracija ECP-a proporcionalna je proširenosti aterosklerotske bolesti na koronarnim arterijama te se smatra biomarkerom koronarne ateroskleroze.

Cilj ovoga rada je istražiti povezanost eozinofilnog kationskog proteina sa surogatima proširenosti ateroskleroze, ispitati ECP-a kao biomarker karotidne ateroskleroze te istražiti postoji li prognostička značajnost biomarkera kao što su ECP, hsCRP, volumen distribucije eritrocita (RDW)-a u odnosu na sveukupno preživljenje bolesnika na programu kronične hemodijalize.

Rezultati našega istraživanja pokazuju da bolesnici na dijalizi imaju uznapredovale aterosklerotske promjene karotidne arterije (debljina intima-medie - IMT  $0,68 \pm 0,19$ ; ukupna težina aterosklerotskog plaka - PS  $14,75 \pm 14,85$ ) i značajno više koncentracije serumskog ECP-a (ECP  $17,01 \pm 14,12$ ) u odnosu na opću populaciju (IMT  $0,50 \pm 0,12$ , PS  $6,57 \pm 3,75$ , ECP  $10,78 \pm 9,38$ ) ( $P < 0,0001$ ;  $p < 0,0001$ ;  $P = 0,0012$ ). Temeljem našega istraživanja ne nalaze se statistički značajne povezanosti između ECP-a i debljine intima-medie karotidne arterije ( $\rho = 0,168$ ,  $P = 0,0938$ ). Između ECP-a i ukupne težine aterosklerotskog plaka

karotidne arterije nalazi se statistički značajna, no marginalna povezanost ( $r=0,234$ ,  $P=0,0193$ ). Potvrđena je prognostička značajnost ranije validiranih biomarkera kao što su hsCRP, NT-pro-BNP. U univarijantnoj analizi ECP je identificiran kao prognostički značajan parametar (HR 1,0322,  $P=0,049$ ), no nakon korekcije za ranije poznate čimbenike rizika za aterosklerotsku bolest, isti je postao statistički nesignifikantan. Identificiran je RDW kao snažan nezavisni i dodatni prognostički biomarker ukupnog preživljenja bolesnika na programu kronične dijalize (HR 1,5346;  $P=0,0028$ ) koji je ostao statistički značajan i nakon korekcije za ranije poznate čimbenike rizika.

U populaciji bolesnika koji se liječe metodom kronične hemodijalize ECP ne predstavlja značajan biomarker karotidne ateroskleroze, te kao takav nema klinički primjenjivu prognostičku značajnost u navedenoj populaciji bolesnika. Identificiran je volumen distribucije eritrocita (RDW) kao snažan dodatni i nezavisni prediktor sveukupnog mortaliteta u skupini bolesnika koji se liječe metodom kronične hemodijalize.

Ključne riječi: eozinofilni kationski protein, hemodijaliza, preživljenje, volumen distribucije eritrocita

## 8. SUMMARY

### **Correlation of eosinophil cationic protein with severity of carotid atherosclerosis and all-cause mortality in patients on hemodialysis**

The prevalence of cardiovascular diseases in patients with renal insufficiency treated with chronic dialysis is high. It is considered that increased prevalence of cardiovascular diseases in this population is a result of accelerated atherosclerosis which is associated with “new” risk factors such as highly sensitive protein C (hs CRP), pro-brain natriuretic peptide (NT-pro-BNP), homocysteine, lipoprotein (a), inflammation and oxidative stress. Eosinophil cationic protein (ECP) is a zinc cationic protein which is stored in human organism in the eosinophiles’ granolas. According to the recent studies serum concentration of ECP is proportional to severity of coronary atherosclerosis, and it is considered as biomarker of coronary atherosclerosis.

The aim of this study is to investigate the correlation between ECP and surrogates of atherosclerosis and to investigate whether there is prognostic significance of biomarkers such as ECP, hsCRP, red cell distribution width (RDW) in regard to overall survival of patients on chronic hemodialysis.

Results of our research show that patients on chronic dialysis have advanced atherosclerotic changes on carotid arteries (intima media thickness – IMT  $0,68\pm 0,19$ ; overall severity of plaque burden – PS  $14,75\pm 14,85$ ) and significantly higher serum concentrations of ECP (ECP  $17,01\pm 14,12$ ) in regard to general population (IMT  $0,50\pm 0,12$ , PS  $6,57\pm 3,75$ , ECP  $10,78\pm 9,38$ ) ( $P < 0,0001$ ;

p<0,0001; P=0,0012, respectively). According to our results there is no statistically significant correlation between ECP and IMT ( $\rho$  0,168, P=0,0938). Between ECP and overall severity of plaque burden of carotid arteries there is statistically significant, but marginal correlation ( $r$ =0,234, P=0,0193). We have validated prognostic significance of previously known important biomarkers such as hsCRP. In univariate Cox proportional analysis ECP is identified as statistically significant prognostic marker (HR 1,0322, P=0,049), but after correction for known risk factors for atherosclerosis, it became insignificant. We have identified RDW as strong independent and additive prognostic biomarker of overall survival of patients on chronic dialysis (HR 1,5346; P=0,0028) which remained significant even after correction for known atherosclerotic risk factors.

In the population of patients treated with chronic dialysis ECP does not represent significant biomarker of carotid atherosclerosis, and as such it does not have clinical applicable value. RDW seems as an independent and additive prognostic biomarker for overall survival of patients on chronic dialysis.

Zagreb, 2013.

Mario Sičaja, MD

## 9. LITERATURA

1. *Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ.* Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 1998;32:112-9.
2. *Linder A, Charra B, Sherrard DJ, Schribner BH.* Accelerated atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis. *N Engl J Med* 1974;290:697-701.
3. *Locatelli F, Marcelli D, Conte F i sur.* Cardiovascular disease in chronic renal failure: the challenge continues. *Registro Lombardo Dialisi e Trapianto. Nephrol Dial Transplant* 2000; 15 (Suppl 5):69-80.
4. *Brunet P, Gondouin B, Duval-Sabatier A i sur.* Does Uremia Cause Vascular Dysfunction? *Kidney Blood Press Res* 2011;34:284-90.
5. *Nakano T, Ninomiya T, Sumiyoshi S i sur.* Association of kidney function with coronary atherosclerosis and calcification in autopsy samples from Japanese elders: the Hisayama study. *Am J Kidney Dis* 2012; 55:21-30.
6. *Oh J, Wunsch R, Turzer M i sur.* Advanced coronary and carotid arteriopathy in young adults with childhood onset chronic renal failure. *Circulation* 2002;106:100-5.
7. *Massy ZA, Ivanovski O, Nguyen-Khoa T i sur.* Uremia accelerates both atherosclerosis and arterial calcification in apolipoprotein E knockout mice. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:109-16.

8. *Ross R.* Atherosclerosis an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.
9. *Frostegard J, Lemne C, Andersson B, Van der Zee R, Kiessling R, De Faire U.* Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with borderline hypertension. *Hypertensio* 1997; 29: 40-4.
10. *Schepers E, Glorieux G, Dou L i sur.* European Uremic Toxin Work Group (EUTox): Guanidino compounds as cause of cardiovascular damage in chronic kidney disease: an in vitro evaluation. *Blood Purif* 2010;30:277-87.
11. *Hou FF, Ren H, Owen WF Jr i sur.* Enhanced expression of receptor for advanced glycation end products in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:1889-96.
12. *Schepers E, Meert N, Glorieux G, Goeman J, Van der Eycken J, Vanholder R.* P-cresylsulphate, the main in vivo metabolite of p-cresol, activates leukocyte free radical production. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22:592-6.
13. *Dou L, Jourde-Chiche N, Faure V i sur.* The uremic solute indoxyl sulfate induces oxidative stress in endothelial cells. *J Thromb Haemost* 2007;5:1302-8.
14. *Bro S, Bentzon JF, Falk E, Andersen CO, Olgaard K, Nielsen LB.* Chronic renal failure accelerates atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14:2466-74.



15. *Stam F, van Guldner C, Schalwijk CG, Wee PM, Donker AJ, Stehouwer CD.* Impaired renal function is associated with markers of endothelial dysfunction and increased inflammatory activity. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18:892-8.
16. *Chung AW, Yang HH, Kim JM i sur.* Upregulation of matrix metalloproteinase-2 in the arterial vasculature contributes to stiffening and vasomotor dysfunction in patients with chronic kidney disease. *Circulation* 2009; 120:792-801.
17. *Passauer J, Bussemaker E, Range U, Plug M, Gross P.* Evidence in vivo showing increase of baseline nitric oxide generation and impairment of endothelium-dependent vasodilatation in normotensive patients on chronic hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:1726-34.
18. *Amabile N, Guerin AP, Leroyer A i sur.* Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:3381-8.
19. *Locatelli F, Pozzoni P, Tentori F, del Vecchio L.* Epidemiology of cardiovascular risk in patients with chronic kidney disease; *Nephrol Dial Transplant* 2003;18 (Suppl 7): VII2-VII9.
20. *Shulman NB, Ford CE, Hall WD i sur.* Prognostic value of serum creatinine and effect of treatment of hypertension on renal function. Results from the Hypertension Detection and Follow-up Program. *Hypertension* 1989;13 (Supp 5): 1180-93.

21. *Ruilope LM, Salvetti A, Jamerson K i sur.* Renal function and intensive lowering of blood pressure in hypertensive participants of the Hypertension Optimal Treatment (HOT) Study. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:218-25.
22. *Port FK, Hulbert-Shearon Te, Wolfe RA i sur.* Predialysis blood pressure and mortality risk in a national sample of maintenance hemodialysis patients . *Am J Kidney Dis* 1999; 33: 507-27.
23. *Levin A, Thompson CR, Ethier J i sur.* Left ventricular mass index increase in early renal disease: impact of decline in hemoglobin. *Am J Kidney Dis* 1999; 34:125-34.
24. *Kasiske BL.* Hyperlipidaemia in patients with chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 1998; 32 (Suppl 3): S142-S156.
25. *Leavy SF, McCullough, Hecking E, Goodkin D, Port FK, Young EW.* Body mass index and mortality in „healthier“ as compared with „sicker“ hemodialysis patients: Results from the Dialysis Outcome and Practice Patterns Study (DOPPS). *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:2386-94.
26. *Wanner C, Krane V, Marz W i sur.* German Diabetes and Dialysis Study Investigators: Atorvastatin in patients with type 2 diabetes mellitus undergoing hemodialysis. *N Engl J Med* 2005;353:238-48.
27. *O'Neill WC, Lomashvili KA.* Recent progress in the treatment of vascular calcification. *Kidney Int* 2010; 78: 1232-9.
28. *Moe SM, Chen NX.* Pathophysiology of vascular calcification in chronic kidney disease. *Circ Res* 2004; 95:560-7.

29. *Chen NX, O'Neill KD, Duan D, Moe SM.* Phosphorus and uremic serum up-regulate osteopontin expression in vascular smooth muscle cells. *Kidney Int* 2002; 62: 1724-31.
30. *Mizobuchi M, Towler D, Slatopolsky E.* Vascular calcification: the killer of patients with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20:1453-64.
31. *Packard RR, Libby P.* Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem* 2008;54(1):24-38.
32. *Koenig W, Khuseyinova N, Baumert J, Meisinger C.* Prospective study of high-sensitivity C-reactive protein as a determinant of mortality: results from the MONICA/KORA Augsburg Cohort Study, 1984-1998. *Clin Chem* 2008;54(2):335-42.
33. *Yilmaz FM, Akay H, Duranay M i sur.* Carotid atherosclerosis and cardiovascular risk factors in hemodialysis and peritoneal dialysis patients. *Clinical Biochemistry* 2007; 40:1361-6.
34. *Bayés B, Pastor MC, Bonal J i sur.* Homocysteine, C-reactive protein, lipid peroxidation and mortality in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18(1):106-12.
35. *Lee CD, Folsom AR, Nieto FJ i sur.* White blood cell count and incidence of coronary heart disease and ischemic stroke and mortality from cardiovascular disease in African-American and White men and women: atherosclerosis risk in communities study. *Am J Epidemiol* 2001;154:758-64.

36. *Laine P, Kaartinen M, Penttila A, Panula P, Paavonen T, Kovanen PT.* Association between myocardial infarction and the mast cells in the adventitia of the infarct-related coronary artery. *Circulation* 1999;99:361–9.
37. *Moreno PR, Falk E, Palacios IF, Newell JB, Fuster V, Fallon JT.* Macrophage infiltration in acute coronary syndromes: implications for plaque rupture. *Circulation* 1994;90:775–8.
38. *Libby P.* Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 1995;91:2844–50.
39. *Lee E, Grodzinsky AJ, Libby P, Clinton SK, Lark MW, Lee RT.* Human vascular smooth muscle cell-monocyte interactions and metalloproteinase secretion in culture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:2284–9.
40. *Shah PK, Falk E, Badimon JJ i sur.* Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques: potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation* 1995;92:1565–9.
41. *Barath P, Fishbein MC, Cao J, Berenson J, Helfant RH, Forrester JS.* Tumor necrosis factor gene expression in human vascular intimal smooth muscle cells detected by in situ hybridization. *Am J Pathol* 1990;137:503–9.
42. *Libby P, Sukhova G, Lee RT, Galis ZS.* Cytokines regulate vascular functions related to stability of the atherosclerotic plaque. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995;25(Suppl 2):S9–S12.

43. *Graziano FM, Cook EB, Stahl JL.* Cytokines, chemokines, RANTES, and eotaxin. *Allergy Asthma Proc* 1999;20:141–6.
44. *Van Coillie E, Van Damme J, Opdenakker G.* The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines. *Cytokine Growth Factor Rev* 1999;10:61–86.
45. *Haley KJ, Lilly CM, Yang JH i sur.* Overexpression of eotaxin and the CCR3 receptor in human atherosclerosis: using genomic technology to identify a potential novel pathway of vascular inflammation. *Circulation* 2000;102(18):2185-9.
46. *Venge P, Bystrom J.* Molecules in focus: Eosinophil cationic protein (ECP). *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30:433-7.
47. *Koh GC, Shek LP, Goh DY, Van Bever H, Koh DS.* Eosinophil cationic protein: is it useful in asthma? A systematic review. *Respir Med* 2007;101(4):696-705.
48. *Rosenberg HF, Dyer KD.* Eosinophil cationic protein and eosinophil-derived neurotoxin. Evolution of novel function in primate ribonuclease gene family. *J Biol Chem* 1995;270:30234.
49. *Rosenberg HF, Dyer KD, Li F.* Characterization of eosinophils generated in vitro from CD34+ peripheral blood progenitor cells. *Exp Hematol* 1996;24:888-93.
50. *Young JD, Peterson CG, Venge P, Cohn ZA.* Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein. *Nature* 1986;321:613-6.

51. *Venge P, Bysgtrom J, Carlson M i sur.* Eosinophil cationic protein (ECP): molecular and biological properties and the use of ECP as a marker of eosinophil activation in disease. *Clin and Exp Allergy* 1999; (29):1172-86.
52. *Brizzi MF, Formato L, Dentelli P i sur.* Interleukin-3 stimulates migration and proliferation of vascular smooth muscle cells: a potential role in atherogenesis. *Circulation* 2001;103(4):549-54.
53. *Chihara J, Yamamoto T, Kurachi D, Kakazu T, Higashimoto I, Nakajima S.* Possible release of eosinophil granule proteins in response to signaling from intercellular adhesion molecule 1 and its ligands. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 108 (suppl.1):52-4.
54. *Peterson CG, Enander I, Nystrand J, Anderson AS, Nilsson L, Venge P.* Radioimmunoassay of human eosinophil cationic protein (ECP) by improved method. Establishment of normal levels in serum and turnover in vivo. *Clin Exp Allergy* 1991; 21:561-7.
55. *Hallgren R, Venge P.* The eosinophil in inflammation. In: *Matsson P, Ahlstedt S, Venge P, Thorell J.* editors. *Clinical impact of the monitoring of Allergic Inflammation.* London/San Diego: Academic Press 1991; 119-40.
56. *Hallgren R, Grefberg N, Venge P.* Elevated Circulation Levels of Eosinophil Cationic Protein in Uremia as Signs of Abnormal Eosinophil Homeostasis. *Nephron* 1984; 36:10-4.
57. *Hällgren R, Venge P, Wikström B.* Hemodialysis-induced increase in serum lactoferrin and serum eosinophil cationic protein as signs of local neutrophil and eosinophil degranulation. *Nephron* 1981;29(5-6):233-8.

58. *Niccoli G, Ferrante G, Cosentino N i sur.* Eosinophil cationic protein: A new biomarker of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2010;211(2):606-11.
59. *Emmuele E, Falcone C, D'Angelo i sur.* Association of plasma eotaxin levels with the presence and extent of angiographic coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2006; 186:140-5.
60. *Longenecker JC, Coresh J, Powe NR i sur.* Traditional cardiovascular disease risk factors in dialysis patients compared with the general population: the CHOICE Study. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:1918-27.
61. *Apple FS, Murakami MM, Pearce LA, Herzog CA.* Multi-Biomarker Risk Stratification of N-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide, High-Sensitivity C-Reactive Protein, and Cardiac Troponin T and I in End-Stage Renal Disease for All-Cause Death. *Clin Chemistry* 2004; 50 (12): 2279-85.
62. *Ikonomidis I, Stamatelopoulos K, Lekakis J, Vamvakou GD, Kremastinos DT.* Inflammatory and non-invasive vascular markers: The multimarker approach for risk stratification in coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2008; 199:3-11.
63. *Zhang W, He J, Zhang F i sur.* Prognostic role of C-reactive protein and Interleukin-6 in dialysis patients: a systematic review and meta-analysis. *J Nephrol* 2012 Jun 8:0. doi: 10.5301/jn.5000169.
64. *Mueller C, Broidthardt T, Laule-Kilian K, Christ M, Perruchoud AP.* The intergration of BNP and NT-proBNP into clinical medicine. *Swiss Med Wkly* 2007;137:4-12.

65. *Breidthardt T, Kalbermatter S, Socrates T i sur.* Increasing B-type natriuretic peptide levels predict mortality in unselected haemodialysis patients. *Eur J Heart Fail* 2011;13(8):860-7.
66. *Niccoli G, Schiavino D, Belloni F i sur.* Pre-intervention eosinophil cationic protein serum levels predict clinical outcomes following implantation of drug-eluting stents. *Euro Heart J* 2009; 30:1340-7.
67. *Perlstein TS, Weuve J, Pfeffer MA, Beckman JA.* Red blood cell distribution width and mortality risk in a community-based prospective cohort. *Arch Intern Med* 2009; 169(6):588-94.
68. *Patel KV, Semba RD, Ferrucci L i sur.* Red cell distribution width and mortality in older adults: a meta-analysis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2010; 65(3):258-65.
69. *Felker GM, Allen LA, Pocock SJ i sur.* Red cell distribution width as a novel prognostic marker in heart failure: data from CHARM Program and the Duke Databank. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50(1):40-7.
70. *van Kimmenade RR, Mohammed AA, Uthamalingam S, van der Meer P, Felker GM, Januzzi JL Jr.* Red blood cell distribution width and 1-year mortality in acute heart failure. *Eur J Heart Fail* 2010;12(2):129-36.
71. *Kim J, Kim K, Lee JH i sur.* Red blood cell distribution width as an independent predictor of all-cause mortality in out of hospital cardiac arrest. *Resuscitation* 2012 Feb 6. [Epub ahead of print]



72. *Zorlu A, Bektasoglu G, Guven FM i sur.* Usefulness of admission red cell distribution width as a predictor of early mortality in patients with acute pulmonary embolism. *Am J Cardiol* 2012;109(1):128-34.
73. *Uyarel H, Ergelen M, Cicek G i sur.* Red cell distribution width as a novel prognostic marker in patients undergoing primary angioplasty for acute myocardial infarction. *Coron Artery Dis* 2011;22(3):138-44.
74. *Hunziker S, Celi LA, Lee J, Howell MD.* Red cell distribution width improves the simplified acute physiology score for risk prediction in unselected critically ill patients. *Crit Care* 2012;16(3):R89. [Epub ahead of print]
75. *Evans TC, Jehle D.* The red blood cell distribution width. *J Emerg Med* 1991;9 Suppl 1:71-4.
76. *Oh HJ, Park JT, Kim JK i sur.* Red blood cell distribution width is an independent predictor of mortality in acute kidney injury patients treated with continuous renal replacement therapy. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27(2):589-94.
77. *Daugirdas JT.* Second generation logarithmimic estimates of single pool variable volume Kt/V: An analysis of error. *J Am Soc Nephrol* 1993; 4:1205-13.
78. *Oken MM, Creech RH, Tormey DC i sur.* Toxicity and Response Criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol* 1982; 5:649-55.

79. *Rubira N, Rodrigo MJ, Pena M, Nogueiras C, Cruz MJ, Cadahia A.* Blood sample processing effect on eosinophil cationic protein concentration. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1997;78(4):394-8.
80. *Zugck C, Nelles M, Katus HA i sur.* Multicentre evaluation of a new point-of-care test for the determination of NT-proBNP in whole blood. *Clin Chem Lab Med* 2006;44(10):1269-77.
81. *Dati F, Schumann G, Thomas L i sur.* Consensus of a group of professional societies and diagnostic companies on guidelines for interim reference ranges for 14 proteins in serum based on the standardization against the IFCC/BCR/CAP Reference Material (CRM 470). International Federation of Clinical Chemistry. Community Bureau of Reference of the Commission of the European Communities. College of American Pathologists. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996; 34(6):517-20.
82. *Thomas L.* Creatinine. In: Thomas Limited. Clinical laboratory diagnostic. Use and assessment of clinical laboratory results. Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft 1998: 366-71.
83. *Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S i sur.* Mannheim Carotid Intima-Media Thickness Consensus (2004–2006). *Cerebrovasc Dis* 2007;23:75–80.
84. *Handa N, Matsumoto M, Maeda H i sur.* Ultrasonic evaluation of early carotid atherosclerosis. *Stroke* 1990;21:1567-72.
85. *Diskin CJ, Stokes TJ, Dansby LM, Radcliff L, Carter TB.* The prevalence and meaning of eosinophilia in renal diseases on a nephrology consultation service *Nephrol Dial Transplant* 2011;26(8):2549-58.
86. *Lyngbæk S, Marott JL, Sehestedt T i sur.* Cardiovascular risk prediction in the general population with use of suPAR, CRP, and Framingham Risk

Score. *Int J Cardiol* 2012; [Epub ahead of print]  
doi:10.1016/j.ijcard.2012.07.018.

87. *Takahashi R, Ito Y, Takahashi H i sur.* Combined values of serum albumin, C-reactive protein and body mass index at dialysis initiation accurately predicts long-term mortality. *Am J Nephrol* 2012; 36(2):136-43.
88. *Stenvinkel P.* Interactions between inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction in end-stage renal disease. *J Ren Nutr* 2003; 23:1295-301.
89. *Pecoits-Filho R.* Associations between circulating inflammatory markers and residual renal function in CRF patients. *Am J Kidney Dis* 2003; 42:1212-8.
90. *Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ i sur.* IL-10, IL-6 and TNF- $\alpha$ : central factors in the altered cytokine network of uremia – the good, the bad, and the ugly. *Kidney Int* 2005;67:1216-33.
91. *Gabizon D, Kaufman S, Shaked U, Yaroni Evans S, Modai D.* Eosinophilia in uremia. *Nephron* 1981; 29:36-9;
92. *Diskin CJ, Stokes TJ, Dansby LM, Radcliff L, Carter TB.* The prevalence and meaning of eosinophilia in renal diseases on a nephrology consultation service. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26(8):2549-58.
93. *Papayianni A, Alexopoulos E, Giamalis P i sur.* Circulating levels of ICAM-1, VCAM-1, and MCP-1 are increased in haemodialysis patients:association with inflammation, dyslipidaemia, and vascular events. *Nephrol Dial Transplant* 17 (2002):435-41.
94. *Palmer SC, Rabindranath KS, Craig JC, Roderick PJ, Locatelli F, Strippoli GF.* High-flux versus low-flux membranes for end-stage kidney disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;9:CD005016.

95. *Liberato IR, Lopes EP, Cavalcante MA, Pinto TC, Moura IF, Loureiro Júnior L.* Liver enzymes in patients with chronic kidney disease undergoing peritoneal dialysis and hemodialysis. *Clinics (Sao Paulo)* 2012;67(2):131-4.
96. *Sorensen J, Kondrup J, Prokopowicz J i sur.* EuroOOPS: an international, multicentre study to implement nutritional risk screening and evaluate clinical outcome. *Clin Nutr* 2008;27(3):340-9.
97. <http://www.hdnndt.org/registar-forward.htm>
98. *Perlstein TS, Weuve J, Pfeffer MA, Beckman JA.* Red blood cell distribution width and mortality risk in a community-based prospective cohort. *Arch Intern Med* 2009;169(6):588-94.
99. *van Kimmenade RR, Mohammed AA, Uthamalingam S, van der Meer P, Felker GM, Januzzi JL Jr.* Red blood cell distribution width and 1-year mortality in acute heart failure. *Eur J Heart Fail* 2010;12(2):129-36.
100. *Pascual-Figal DA, Bonaque JC, Redondo B i sur.* Red blood cell distribution width predicts long-term outcome regardless of anaemia status in acute heart failure patients. *Eur J Heart Fail* 2009;11(9):840-6.
101. *Ani C, Ovbiagele B.* Elevated red blood cell distribution width predicts mortality in persons with known stroke. *J Neurol Sci* 2009; 277(1-2):103-8.
102. *Bowry SK, Gatti E.* Impact of hemodialysis therapy on anemia of chronic kidney disease: the potential mechanisms. *Blood Purif* 2011;32(3):210-9.
103. *Oh HJ, Park JT, Kim JK i sur.* Red blood cell distribution width is an independent predictor of mortality in acute kidney injury patients

treated with continuous renal replacement therapy. *Nephrol Dial Transplant* 2012;27(2):589-94.

## 10. ŽIVOTOPIS

### Osnovni podaci:

Mario Sičaja, dr.med.

Datum i mjesto rođenja: 23. kolovoza 1981.godine, Zagreb

Obiteljski status: oženjen, otac jednog djeteta (kćerka Klara Marie)

### Edukacija:

- 15.2.2012. god.položio **specijalistički ispit iz interne medicine**
- **Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu** – poslijediplomski studij „Biomedicina i zdravstvo“ u razdoblju od 2007.-2013.god.
- **Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu** – diplomski studij doktora medicine u razdoblju od 2000.-2006. god. (diplomirao 2006.god. sa srednjim prosjekom položenih ispita **4.7** - odličan )
- **II.gimnazija** u Zagrebu – 1996.-2000.god. (maturirao s odličnim uspjehom)
- **OŠ Ivana Gorana Kovačića**, Zagreb

### Radno iskustvo:

- trenutno na subspecijalizaciji iz kardiologije
- od 16.2.2012. god. radim kao **specijalist interne medicine** na Zavodu za bolesti srca i krvnih žila, Klinika za unutarnje bolesti, KB Dubrava, Zagreb
- 19.11.2007.-15.2.2012.god. **specijalizant interne medicine**, KB Dubrava, Zagreb
- 20.7.2006.-19.7.2007.god. **doktor medicine - pripravnik**, KB Dubrava, Zagreb

### Nagrade i stipendije:

- 2012.god.: **Stipendija Grada Zagreba** – za poslijediplomski studij
- 2006.god.: **Rektorova nagrada** za najbolji znanstveni rad ak.god. 2005/2006.
- 2003.god.: **Stipendija Grada Zagreba** – za diplomski studij
- 2002.god.: **Dekanova nagrada** za najboljeg studenta generacije ak.god. 2001/2002.
- 2002.god.: **Zlatna uljanica** za najbolji rad u kategoriji članak u novinama «Genetski modificirana hrana» u časopisu «Medicinar», izdavač Medicinski fakultet na EMC festivalu u organizaciji ŠNZ «Andrija Štampar».

### Članstvo u udrugama i stručnim društvima:

- 2008.god. - član European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (**EAPCI**)
- 2006.god. - član Europskog kardiološkog društva (**ESC**)
- 2006.god. - član Hrvatskog liječničkog zbora (**HLZ**)
- 2006. god.- član Hrvatske liječničke komore (**HLK**)
- 2006.god. - član Hrvatskog kardiološkog društva (**HKD**)
- 2001.-2006.god. član Studentske sekcije Hrvatskog liječničkog zbora (**SSHLZ**).
- 2001.-2006.god. član European Medical Student Association (**EMSA**).

#### **Strani jezici:**

- Aktivno govorim engleski jezik, pasivno znanje njemačkog jezika.

#### **Sudjelovanje u znanstvenim projektima:**

- 2012.-2013. god. aktivno sudjelujem u znanstvenoj studiji **EUROASPIRE IV**
- 2011.god. aktivno sudjelovao u znanstvenoj studiji **TAO-study (Study No.EFC6204;Sanofi Aventis)**
- 2005.god. aktivno sudjelovao u prikupljanju i obradi podataka za potrebe znanstvenog projekta «**CD43-prognostički biljeg za predviđanje ishoda oboljelih od limfoma**» prof.dr.sc Marina Nole, Klinički zavod za patologiju, KBC Zagreb.

#### **Sudjelovanje u nastavi:**

- od 2012. god. sudjelujem u nastavi poslijediplomskog studija iz Epidemiologije: Odabrana poglavlja iz interne medicine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

#### **Poglavlja u sveučilišnim udžbenicima i priručnicima:**

- Koautor poglavlja 8. „Bolesti krvnih žila“ (Mario Sičaja, Marin Nola) u sveučilišnom udžbeniku „**PATOLOGIJA – priručnik za pripremu ispita**“; ISBN 978-953-176-400-1, Izdavač: Medicinska naklada, Zagreb, 2009.
- „**Atlasa neuropatologije**“ – web-izdanje, urednici: prof.dr.sc. Kamelija Žarković, Mario Sičaja, Krešimir Radić, Zagreb, 2005.

#### **Stručna izdavačka djelatnost:**

- Izabran na mjesto glavnog i odgovornog urednika u studentskom časopisu «**Medicinar**» za ak.god. 2005/2006. - *on-line* verzija «Medicinar» dostupna je na <http://medicinar.mef.hr>

## ZNANSTVENA DIJELATNOST

Kvalifikacijski rad za pristup obrani doktorske disertacije:

1. **Sicaja M**, Pehar M, Derek L, Starcevic B, Vuletic V, Romić Z, Božikov Z. Red blood cell distribution width (RDW) as a prognostic marker of mortality in patients on chronic dialysis. *Croatian Medical Journal. Article in press!*

Izabrani originalni znanstveni radovi indeksirani u prestižnim međunarodnim indeksnim publikacijama (CC, SCI, MedLine):

1. Starčević B, Hadzibegović I, **Sičaja M**, Šikić J. Acute coronary syndrome: monitoring and invasive treatment. *Lijec Vjesn.* 2010;132 Suppl 1:19-22.
2. Petlevski R, Zuntar I, Dodig S, Turkalj M, Cepelak I, Vojvodić J, **Sičaja M**, Missoni S. Malonaldehyde and erythrocyte antioxidant status in children with controlled asthma. *Coll Antropol.* 2009;33(4):1251-4.
3. Kirin I, Kirin M, **Sičaja M**, Missoni S, Pehar M, Prka Ž, Špoljarić M, Božikov V. Carotid endarterectomy unexpectedly resulted in optimal blood pressure control. *Coll Antropol.* 2009; 33(4):1229-31.
4. Starčević B, Šikić J, **Sičaja M**, Udovičić M, Stipčević M, Bergovec M. Invasive approach to patients with acute coronary syndrome. *Acta Med Croatica.* 2009; 63(1):59-62.
5. Šikić J, Starčević B, Ivković M, **Sičaja M**, Manojlović S. Thrombosis of bare metal and patent drug eluting stent in patient operated for colorectal carcinoma: The utility of new guidelines in patients with malignancy. *Int J Cardiol.* 2010;142(2):e17-9
6. Puljević M, Nevajda B, **Sičaja M**, Puljević D, Miličić D. Influence of electrical cardioversion on troponine I and brain natriuretic peptide (NT-proBNP) levels in patients with persistent atrial fibrillation/flutter. *Lijec Vjesn.* 2008;130(7-8):175-8.
7. Marušić S, **Sičaja M**, Kujundžić M, Banić M, Jakšić O, Vražić H. The utilization of antibiotics in the management of acute pancreatitis--experience from one transitional country university hospital. *Coll Antropol.* 2008; 32(4):1189-94.
8. Damjanov I, Dusing RW, **Sičaja M**. Solitary Pulmonary Nodule in an 84-Year-Old Man. *American Family Physician.* 2007; 75(5): 707-8.
9. Starcevic B, **Sičaja M**. Dual intoxication with diazepam and amphetamine: This drug interaction probably potentiates myocardial ischemia. *Medical Hypotheses.* 2007; 69: 377-80.
10. **Sičaja M**, Namiq A, Forester J, Damjanov I. Myxoid leiomyosarcoma of the liver. *Pathology Research and Practice.* 2006; 202:43-6.
11. **Sičaja M**, Romić D, Prka Ž. Medical Students' Clinical Skills Do Not Match Their Teachers' Expectations: Survey at Zagreb University School of Medicine, Croatia. *Croatian Medical Journal.* 2006; 47:169-75.



## INFORMIRANI PRISTANAK

### **Naziv projekta: Povezanost eozinofilnoga kationskoga proteina s uznapredovalošću ateroskleroze karotidne arterije i sveukupnim preživljenjem bolesnika na programu kronične hemodijalize**

**OSOBA ZA KONTAKT:**

Glavni istraživač: Mario Sičaja dr.med.

Klinika za unutarnje bolesti

Klinička bolnica Dubrava

Av.Gojka Šuška 6

10 000 Zagreb, Hrvatska

Kontakt telefon: 091/ 40 60 989

Pozivamo Vas da sudjelujete u znanstvenom istraživanju u kojem će se istraživati povezanost biokemijskog parametra – eozinofilnog kationskog serumskog proteina sa parametrima aterosklerotske bolesti kod bolesnika na liječenju dijalizom. Ova obavijest sadrži bitne podatke čija je svrha pomoći Vam da odlučite želite li sudjelovati u navedenom istraživanju. Prije pristanka važno je pažljivo pročitati ovaj Informirani pristanak. Ukoliko imate bilo kakvo pitanje nakon što pročitate ovaj dokument postavite pitanja liječniku ili osoblju koje sudjeluje u istraživanju. Nemojte potpisivati Informirani pristanak dok ne razumijete ovaj dokument u cijelosti.

**Dosadašnje spoznaje o ovom problemu:** Prevalencija srčano-žilnih bolesti kod bolesnika na hemodijalizi je visoka. Smatra se da uzrok akceleriranoj aterosklerozi kod bolesnika na hemodijalizi leži u tzv. „novim“ čimbenicima rizika kao što su hsCRP, homocistein, lipoprotein (a), upala i oksidativni stres. Eozinofilni kationski protein (ECP) je cink-kationski upalni protein koji se normalno nalazi uskladišten u granulama eozinofila. Po istraživanju Niccoli i sur. koncentracija ECP-a je proporcionalna rastu aterosklerotskog plaka na koronarnim krvnim žilama, te pokazuje da je ECP biomarker koronarne ateroskleroze.

**Svrha istraživanja i hipoteza:** Cilj ovoga istraživanja je istražiti povezanost eozinofilnog kationskog proteina s debljinom intima-medie karotidne arterije kao surogatima težine i proširenosti ateroskleroze, ispitati ulogu ECP-a kao biomarkera karotidne ateroskleroze, odnosno istražiti ECP kao nezavisan prognostički čimbenik kod bolesnika na hemodijalizi.

**Vaša uloga kao ispitanika:** Sudjelovanje u istraživanju je dragovoljno i ovisi isključivo o Vama. Ovo istraživanje je poprečno-presječno istraživanje s longitudinalnim prospektivnim dijelom kod bolesnika koji se liječe na dijalizi, a ukoliko se odlučite sudjelovati u njemu Vaš tijekom hospitalizacije zbog bolesti kao i način liječenja neće ni na koji način biti drugačiji od onoga kojega biste imali da ne sudjelujete u istraživanju osim što će po uključivanju u istraživanje biti izuzeta Vaša rutinski vađena krv za dodatne analize, a liječnik-istraživač će napraviti ultrazvučni pregled karotidnih krvnih žila. Ukupno trajanje istraživanja bit će do godine dana od trenutka uključivanja u studiju. Po isteku godine dana moguće je da ćete biti telefonski kontaktirani glede Vašega zdravstvenog stanja.

**Moguća korist za Vas kao ispitanika:** Vi možda nećete imati izravne koristi od sudjelovanja u istraživanju. Međutim, moguće je da će se rezultati koristiti u planiranju preventivnih mjera koje indirektno mogu biti korisne za bolesnike koji se liječe metodom dijalize, no također je moguće da će se ultrazvučnim pregledom karotidnih krvnih žila na vrijeme prikazati stanje koje zahtjeva daljnje medicinsko liječenje od kojega ćete imati koristi.

**Moguća šteta za Vas kao ispitanika:** O ovome istraživanju ne postoje dodatni rizici za ispitanike osim uobičajenih rizika kojima su izloženi bolesnici tijekom dijalize. Istraživanje ne uključuje dodatne terapijske intervencije koje bi odudarale od uobičajenih dijagnostičkih i terapijskih postupaka.

**Nadoknade:** Za sudjelovanje u istraživanju nemate pravo na nadoknadu.

**Tajnost podataka i privatnost:** Rezultati svih testova bit će čuvani u tajnosti. Pristup medicinskoj dokumentaciji imat će samo liječnici koji sudjeluju u istraživanju, te Etičko povjerenstvo KB Dubrava i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta. Podatci će bit obrađivani elektronski, uz proceduru za zaštitu osobnih podataka. Vaše ime nikada neće biti otkriveno. Druge osobe neće imati pristupa podacima osim u slučaju zakonske obveze.

**Publiciranje rezultata:** Rezultati će biti prikazani na javnim skupovima, a mogli bi biti publicirani u znanstvenim časopisima. U svakom slučaju Vaš identitet će biti zadržan u tajnosti.

**Sudjelovanje:** Na Vama je odluka želite li sudjelovati ili ne. Ako odlučite sudjelovati dobit ćete na potpis ovu obavijest. Vaše sudjelovanje je dragovoljno i možete se slobodno i bez ikakvih posljedica povući u bilo koje vrijeme, bez navođenja razloga. Nastavit ćete se dalje liječiti na način koji je uobičajen za Vašu bolest.

Ovo ispitivanje je pregledalo Etičko povjerenstvo KB Dubrava i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Zagrebu, koje je nakon uvida u određenu dokumentaciju odobrilo istraživanje. Ispitivanje se provodi sukladno svim primjenjivim smjernicama, uključujući Osnove dobre kliničke prakse i Helsinšku deklaraciju. Presliku dokumenta koji ćete potpisati ako želite sudjelovati u istraživanju, dobit ćete Vi i Glavni istraživač.

Hvala što ste pročitali ovaj dokument i razmotrili sudjelovanje u ovom znanstvenom istraživanju.

Napomena: ova obavijest je sastavljena sukladno Zakonu o zdravstvenoj zaštiti RH (NN 121/03) i Zakonu o pravima pacijenata RH (NN 169/04).

# SUGLASNOST ZA SUDJELOVANJE

## ISPITANIK/STARATELJ:

Potpisivanjem ove stranice potvrđujem sljedeće:

Potvrđujem da sam na meni razumljiv način, dostatno i prikladno informiran/informirana o prirodi, svrsi, trajanju i rizicima ovoga istraživanja, zajedno s činjenicom što se od mene očekuje. Imao/imala sam priliku postavljati pitanja, te razumijem da je moje sudjelovanje dragovoljno, te se mogu povući u bilo koje vrijeme, bez navođenja razloga, bez ikakvih posljedica po zdravstvenom ili pravnom pitanju. Razumijem da mojoj medicinskoj dokumentaciji imaju pristup odgovorni pojedinci, tj. glavni istraživač i njegovi suradnici, članovi Etičkog povjerenstva ustanove u kojoj se istraživanje obavlja, te Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta. Dajem dozvolu tim pojedincima za pristup mojoj medicinskoj dokumentaciji.

Želim sudjelovati (suglasan/a sam sudjelovati) u navedenom znanstvenom istraživanju.

IME I PREZIME ISPITANIKA/STARATELJA:

\_\_\_\_\_ (velika tiskana slova)

DATUM: \_\_\_\_\_

POTPIS: \_\_\_\_\_

Osoba koja je vodila postupak obavijesti za ispitanika i suglasnost za sudjelovanje:

IME I PREZIME (velika tiskana slova):

POTPIS: \_\_\_\_\_

DATUM: \_\_\_\_\_

GLAVNI ISTRAŽIVAČ NA PROJEKTU

Mario Sičaja dr.med. v.r.