

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Neda Milinković

**ZNAČAJ ODREĐIVANJA BIOMARKERA RESORPCIJE I
STVARANJA KOSTIJU KOD PACIJENATA SA
KRAJNJIM STADIJUMOM BOLESTI BUBREGA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2014. godine

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Neda Milinković

**SIGNIFICANCE OF THE DETERMINATION
OF BIOMARKERS OF BONE RESORPTION AND FORMATION
IN PATIENTS WITH END-STAGE RENAL DISEASE**

DOCTORAL DISSERTATION

Belgrade, 2014. godine

Eksperimentalni deo doktorske disertacije urađen je u Centru za medicinsku biohemiju, Kliničkog centra Srbije u Beogradu. Ispitivani su pacijenti koji su primljeni na Kliniku za nefrologiju, Kliničkog centra Srbije.

Članovi komisije:

Dr Svetlana Ignjatović, mentor
redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr Nada Majkić-Singh,
redovni profesor u penziji, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr Višnja Ležaić,
redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

ZNAČAJ ODREĐIVANJA BIOMARKERA RESORPCIJE I STVARANJA KOSTIJU KOD PACIJENATA SA KRAJNJIM STADIJUMOM BOLESTI BUBREGA

Izvod

Vodiči za poboljšanje kvaliteta života i edukaciju pacijenata sa krajnjim stadijumom bolesti bubrega (Kidney Disease Outcomes Quality Initiatives, KDOQI), objavljeni od strane američke Nacionalne Fondacije za bubreg (NKF) ukazuju na značaj biomarkera metabolizma kostiju koje bi trebalo određivati kod pacijenata sa krajnjim stadijumom bolesti bubrega (KSBB). Prema NKF pacijenti sa KSBB (stadijum 5) su oni čija je GFR ispod $15 \text{ mL/min/1,73 m}^2$. To su predijalizni pacijenti, pacijenti koji su na terapiji hemodijalizom (HD) ili kontinuiranom ambulatornom peritonealnom dijalizom (CAPD). Osnovni serumski biomarkeri koje bi trebalo određivati kod svih pacijenata sa petim stadijumom bolesti bubrega su joni kalcijuma (Ca), joni neorganskog fosfata (P), joni magnezijuma (Mg), ukupna alkalna fosfataza (ALP), intaktni paratiroidni hormon (iPTH) i 25-hidroksi vitamin D (25D).

Međutim, metabolizam kostiju najpouzdanije mogu da prikažu jedino biomarkeri koje stvaraju ćelije kostiju, osteoblasti i osteoklasti. Aktivnost osteoblasta, ćelija koje su odgovorne za stvaranje kostiju, najbolje odražavaju nivoi koštanog izoenzima alkalne fosfataze (BALP), koji je visoko specifičan za koštano tkivo. Aktivnost osteoklasta, ćelija koje su odgovorne za resorpciju kostiju, specifično odražavaju nivoi tartarat rezistentne kisele fosfataze (TRAP). Dobar marker resorpcije kostiju jeste i beta-karboksi terminalni deo ukrštenih veza kolagena I, beta-CrossLaps (beta-CTx). Specifični serumski biomarkeri kostiju predstavljaju "biohemijsku biopsiju" značajnu za lakšu procenu i praćenje metabolizma kostiju.

Cilj ovog rada bio je da se utvrdi značaj određivanja biomarkera resorpcije i stvaranja kostiju kod KSBB pacijenata.

Ispitivanjem je obuhvaćeno 40 predijaliznih pacijenata (18 žena i 22 muškarca) starosne dobi 25–79, 114 pacijenata na CAPD (49 žena i 65 muškaraca) starosne dobi 30–84 i 112 pacijenata na HD (53 žene i 59 muškaraca) starosne dobi 25–79. Prosek trajanja lečenja hemodijalizom bio je 76 meseci, dok su pacijenti na CAPD bili 35 meseci. Planirani biomarkeri formiranja i resorpcije kostiju su se određivali u serumu ispitivanih pacijenata na dan uzorkovanja i to kod predijaliznih i CAPD pacijenata kada su dolazili na rutinske kontrolne preglede, a kod pacijenata na HD neposredno pre terapije dijalizom. Radi određivanja referentnih intervala u serumu, analizirani biomarkeri su određivani i u grupi od 50 zdravih dobrovoljaca (25 žena i 25 muškaraca) starosne dobi od 20–70 godina.

ALP, TRAP, Ca, P i Mg su određeni fotometrijski (Olympus AU2700 ISE). BALP je određen zonskom elektroforezom (Sebia Hydrasis), beta-CTx i iPTH su određeni ECLIA metodom (Rosche Elecsys), a 25D HPLC-om reverznih faza (ChromLine^R Clinical HPLC software Version 4.20).

Određivanje analiziranih biomarkera u serumu se smatralo pouzdanim na osnovu koeficijenata varijacije dobijenih testiranjem preciznosti u seriji (Kv: 0,6%–3,3%) i iz dana u dan (Kv: 1,0%–3,6%).

Ustanovljena je normalna raspodela vrednosti za svaki od analiziranih biomarkera kod predijaliznih, HD i CAPD pacijenata. Kod sve tri ispitivane grupe pacijenata uočen je uticaj pola na vrednosti iPTH, kao i na vrednosti neorganskog fosfata kod HD pacijenata i na vrednosti CaxP kod CAPD pacijenata. Međutim, uticaj starosti je kod sve tri grupe pacijenata uočen jedino na vrednosti BALP. Takođe, dužina trajanja HD imala je uticaj na vrednosti ALP i BALP, a CAPD samo na vrednosti jona magnezijuma.

Kod predijaliznih i pacijenata na dijalizi vrednosti BALP su bile značajno niže ($p < 0,001$), a vrednosti TRAP i beta-CTx su bile značajno više u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,05$ i $p <$

0,01). Efekat dijalize nezavisno od tipa potvrđen je nižim vrednostima BALP kod dijaliznih u odnosu na predijalizne pacijente ($p < 0,05$). Međutim, u ovom ispitivanju dobijene su znatno niže vrednosti beta-CTx kod HD pacijenata u odnosu na predijalizne pacijente ($p < 0,05$). Dobijena je značajna korelacija BALP, TRAP i beta-CTx sa preporučenim biomarkerima metabolizma kostiju u sve tri analizirane grupe pacijenata, sa koeficijentima korelacije koji se kreću od -0,493 do 0,616.

Najznačajnija promena u odnosu na tri nivoa iPTH (< 150 pg/mL, $150-300$ pg/mL i > 300 pg/mL) uočena je u vrednostima BALP kod sve tri ispitivane grupe KSBB pacijenata, tj. jedino su se vrednosti BALP menjale paralelno sa promenom vrednosti iPTH kod sve tri grupe KSBB pacijenata. Najveća razlika u odnosu na nedovoljne i dovoljne količine 25D (< 50 nmol/L i > 50 nmol/L) dobijena je u vrednostima BALP kod CAPD pacijenata ($p < 0,05$). Uticaj terapije vitaminom D i njegovim analogima je bio zanemarljiv na specifične biomarkere metabolizma kostiju kod predijaliznih i HD pacijenata. Mada su vrednosti CaxP bile značajno više kod HD i CAPD pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu, vrednosti su bile ispod graničnih za ektopičnu kalcifikaciju ($4,6$ mmol²/L²) i nisu se značajno razlikovale u odnosu na ispitivane nivoe iPTH i u odnosu na nedovoljne i dovoljne količine 25D.

Da bi se odredila dijagnostička tačnost specifičnih i preporučenih biomarkera u odnosu na preporučenu vrednost iPTH (< 100 pg/mL) u detekciji adinamične bolesti kostiju kod predijaliznih i dijaliziranih pacijenata, urađena je ROC analiza. Kada su analizirane sve tri grupe KSBB pacijenata zajedno, kao i posebno grupa HD pacijenata, najveću dijagnostičku vrednost pokazao je kalcijum. Površine ispod krivih (AUC) su se statistički značajno razlikovale u odnosu na druge analizirane biomarkere ($0,701$, $p = 0,0001$ i $0,651$, $p = 0,007$, redom). U grupi predijaliznih i CAPD pacijenata najveću dijagnostičku vrednost imao je BALP (AUC = $0,688$ i AUC = $0,588$), mada je dobijena granična značajnost razlike sa drugim analiziranim biomarkerima ($p = 0,058$ i $p = 0,053$).

U skladu sa ciljem, rezultati iz ovog ispitivanja podržavaju druge objavljene podatke da ispitivani biomarkeri (BALP, TRAP i beta-CTx) imaju uporedivu dijagnostičku tačnost kao i preporučeni biomarkeri (Ca, P, Mg, ALP, iPTH i 25D) za procenu nivoa metabolizma kostiju kod KSBB pacijenata i da mogu biti adekvatna alternativa invazivnoj metodi biopsije kostiju.

Ključne reči: koštani izoenzim alkalne fosfataze, tartarat rezistentna kisela fosfataza, beta-CTx, vitamin D, krajnji stadijum bolesti bubrega

Šira naučna oblast: Medicinska biohemija

Uža naučna oblast: Medicinska biohemija

UDK broj: 612.466 : [612.753 : 543.9] (043.3)

SIGNIFICANCE OF THE DETERMINATION OF BIOMARKERS OF BONE RESORPTION AND FORMATION IN PATIENTS WITH END STAGE RENAL DISEASE

Abstract

Guidelines for improving the quality of life and education of patients with end-stage renal disease (Kidney Disease Outcomes Quality Initiatives, KDOQI), published by the U.S. National Kidney Foundation (NKF), indicate the importance of biomarkers of bone metabolism that should be determined in patients with end-stage renal disease (ESRD). According to the NKF, ESRD patients (stage 5) are those with a GFR below 15 ml/min/1.73 m². These are predialysis patients, patients who are treated with hemodialysis (HD) or continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD). The basic serum biomarkers that could be determined in all patients with the fifth stage renal disease are: calcium ions (Ca), inorganic phosphate ions (P), magnesium ions (Mg), the total alkaline phosphatase (ALP), an intact parathyroid hormone (iPTH) and 25-hydroxy vitamin D (25D).

However, the most reliable bone metabolism can be represented only by biomarker created by bone cells, osteoblasts and osteoclasts. The activity of osteoblasts, the cells responsible for bone formation, is well expressed by the levels of bone alkaline phosphatase isoenzymes (BALP), which is highly specific for bone tissue. The activity of osteoclasts, the cells responsible for bone resorption, specifically reflect levels of tartrate resistant acid phosphatase (TRAP). A good marker of bone resorption is the beta-carboxy terminal telopeptide of collagen type I, beta-CrossLaps (beta-CTx). Specific serum biomarkers of bone are "biochemical biopsy" important to facilitate the assessment and monitoring of bone metabolism.

The aim of this study was to assess the usefulness of biomarkers of bone resorption and bone formation in ESRD patients.

The study included 40 predialysis patients (18 women and 22 men) aged 25–79, 114 patients on CAPD (49 women and 65 men) aged 30–84 and 112 patients on HD (53 women and 59 men) aged 25–79. Average duration of the hemodialysis treatment was 76 months, while patients on CAPD treated 35 months. The analysed biomarkers of bone formation and resorption were determined in the serum of patients on the day of sampling and in predialysis patients and in patients on CAPD when they came to the routine check-ups, and in patients on HD immediately before dialysis therapy. To determine the reference intervals, analyzed biomarkers were measured in a group of 50 healthy volunteers (25 women and 25 men) aged 20–70 years.

ALP, TRAP, Ca, P and Mg were determined photometrically (Olympus AU2700 ISE). BALP values were determined with zone electrophoresis (SEBIA Hydrasis), beta-CTx and iPTH values were determined with ECLIA (Elecsys Roche) and 25D values were determined by HPLC with reversed phase detection (HPLC ChromLineR Clinical software Version 4:20).

Determination of the analysed biomarkers is considered reliable based on the coefficients of variation obtained by precision testing in the series (Cv: 0.6%–3.3%) and from day to day (Cv: 1.0%–3.6%).

We established the normal distribution of the values for each of the analysed biomarkers in predialysis and dialysed patients. There were different values of iPTH, P and CaxP levels in the all analysed groups according to gender. However, the effect of age was observed only on the values of BALP. Duration of the dialysis had impact only on the values of ALP and BALP in HD patients and on Mg levels in CAPD patients.

In predialysis and dialysis patients BALP values were significantly lower ($p < 0.001$), but beta-CTx and TRAP values were significantly higher ($p < 0.05$ and $p < 0.01$) compared to the control group. The effect of the dialysis, regardless of the type of dialysis, was confirmed with lower values of BALP in dialysis patients compared to the predialysis patients ($p < 0.05$).

However, in this study, we obtained much lower beta-CTx levels in HD patients as compared to predialysis patients ($p < 0.05$). We found significant correlation of BALP, TRAP and beta-CTx with the recommended biomarkers of bone metabolism in all three groups of patients, with a correlation coefficient of -0.493 to 0.616.

The most significant change in comparison to the three iPTH levels (< 150 pg/mL, 150–300 pg/mL and > 300 pg/mL) was observed in the BALP values in all three groups of ESRD patients. There were parallel changes in the values of BALP and iPTH in all three groups of the ESRD patients. With regard to the levels of 25D (< 50 nmol/L and > 50 nmol/L) in CAPD patients, there was significant difference in the BALP values ($p < 0.05$). Effect of treatment with vitamin D and its analogs was negligible on the specific biomarker of bone metabolism in the predialysis and HD patients. Although CaxP values were significantly higher in HD and CAPD patients compared to the control group, the values were below the limit of ectopic calcification ($4.6 \text{ mmol}^2/\text{L}^2$) and did not significantly differ with respect to the tested levels of iPTH and in relation to the insufficient and a sufficient amount of 25D.

In order to determine diagnostic accuracy of specific and recommended biomarkers in relation to the recommended value of the iPTH (< 100 pg/mL) for detection of adynamic bone disease in predialysis and dialysis patients, we performed ROC analysis. When we analyzed all three groups of ESRD patients and particular a group of HD patients, we found highest diagnostic value as calcium. The areas under the curves (AUC) were significantly different in comparison with other biomarkers analyzed (0.701 , $p = 0.0001$ and 0.651 , $p = 0.007$, respectively). In the group of predialysis and CAPD patients the highest diagnostic value had BALP (AUC = 0.688 and AUC = 0.588), although there was a marginal significant difference with other analyzed biomarkers ($p = 0.058$ and $p = 0.053$).

In accordance with the objectives, results from this study support other reported data that examined biomarkers (BALP, TRAP and beta-CTx) have comparable diagnostic accuracy as well as the recommended biomarkers (Ca, P, Mg, ALP, iPTH and 25D) to determine the level of bone metabolism in ESRD patients and may be an appropriate alternative to invasive method of bone biopsy.

Key words: bone isoenzyme of alkaline phosphatase, tartrate resistant acid phosphatase, beta-CTx, vitamin D, end stage renal disease

Skraćenice korišćene u tekstu:

- ACP ukupna kisela fosfataza
- ALP ukupna alkalna fosfataza
- BALP koštani izoenzim alkalne fosfataze
- beta-CTx beta-karboksi terminalni deo ukrštenih veza kolagena I
- CaxP proizvod kalcijuma i neorganskog fosfata
- CAPD kontinuirana ambulatorna peritonealna dijaliza
- KDOQI *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative*
- KSBB krajnji stadijum bolesti bubrega
- iPTH intaktni paratiroidni hormon
- TRAP tartarat rezistentna kisela fosfataza (koštani izoenzim)
- 1,25D 1,25-dihidroksi vitamin D
- 25D 25-hidroksi vitamin D

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. SPECIFIČNI BIOMARKERI METABOLIZMA KOSTIJU.....	1
1.1.1. KOŠTANI IZOENZIM ALKALNE FOSFATAZE.....	1
1.1.1.1. Klinički značaj koštanog izoenzima alkalne fosfataze.....	5
1.1.1.2. Određivanje koštanog izoenzima alkalne fosfataze.....	7
1.1.1.3. Referentni interval.....	8
1.1.2. TARTARAT REZISTENTNA KISELA FOSFATAZA.....	9
1.1.2.1. Klinički značaj tartarat rezistentne kisele fosfataze.....	13
1.1.2.2. Određivanje tartarat rezistentne kisele fosfataze.....	14
1.1.2.3. Referentni interval.....	15
1.1.3. BETA-KARBOKSI TERMINALNI DEO UKRŠTENIH VEZA KOLAGENA I.....	15
1.1.3.1. Klinički značaj beta-karboksi terminalnog dela ukrštenih veza kolagena I.....	16
1.1.3.2. Određivanje beta-karboksi terminalnog dela ukrštenih veza kolagena I.....	17
1.1.3.3. Referentni interval.....	18
1.2. PREPORUČENI BIOMARKERI METABOLIZMA KOSTIJU.....	19
1.2.1. UKUPAN KALCIJUM.....	19
1.2.1.1. Klinički značaj ukupnog kalcijuma.....	20
1.2.1.2. Određivanje ukupnog kalcijuma.....	23
1.2.1.3. Korigovanje koncentracije ukupnog kalcijuma.....	24
1.2.1.4. Referentni interval.....	24
1.2.1.5. Preporuke KDOQI vodiča.....	25
1.2.2. NEORGANSKI FOSFAT.....	25
1.2.2.1. Klinički značaj neorganskog fosfata.....	26
1.2.2.2. Određivanje neorganskog fosfata.....	27
1.2.2.3. Referentni interval	28
1.2.2.4. Preporuke KDOQI vodiča.....	28

1.2.3. PROIZVOD KALCIJUM-FOSFOR.....	29
1.2.4. MAGNEZIJUM.....	29
1.2.4.1. Klinički značaj magnezijuma.....	31
1.2.4.2. Određivanje magnezijuma.....	32
1.2.4.3. Referentni interval.....	33
1.2.5. INTAKTNI PARATIROIDNI HORMON.....	33
1.2.5.1. Klinički značaj intaktnog paratiroidnog hormona.....	37
1.2.5.2. Određivanje intaktnog paratiroidnog hormona.....	39
1.2.5.3. Referentni interval.....	41
1.2.5.4. Preporuke KDOQI vodiča.....	41
1.2.6. 25-HIDROKSI VITAMIN D.....	42
1.2.6.1. Klinički značaj 25-hidroksi vitamina D.....	44
1.2.6.2. Određivanje 25-hidroksi vitamina D.....	45
1.2.6.3. Referentni interval.....	46
1.2.6.4. Preporuke KDOQI vodiča.....	47
1.3. FUNKCIJA BUBREGA KOD PACIJENATA SA KRAJNJIM STADIJUMOM BOLESTI BUBREGA.....	48
1.4. METABOLIZAM KOŠTANOG TKIVA KOD PACIJENATA SA KRAJNJIM STADIJUMOM BOLESTI BUBREGA.....	51
1.4.1. Lezije koštanog tkiva zbog ubrzanog metabolizma kostiju kod pacijenata sa krajnjim stadijumom bolesti bubrega.....	53
1.4.2. Lezije koštanog tkiva zbog smanjene mineralizacije.....	54
1.4.3. Adinamična bolest kostiju.....	55
1.4.4. Preporuke KDOQI vodiča.....	57
2. CILJ RADA.....	58
3. MATERIJAL I METODE.....	61
3.1. KOMERCIJALNI REAGENSI I HEMIKALIJE.....	61
3.2. PRIBOR I APARATI.....	62
3.3. MATERIJAL.....	63
3.4. METODE.....	65
3.4.1. Određivanje aktivnosti ukupne alkalne fosfataze.....	65
3.4.2. Određivanje aktivnosti koštanog izoenzima alkalne fosfataze.....	66

3.4.3. Određivanje aktivnosti tartarat rezistentne kisele fosfataze.....	68
3.4.4. Određivanje koncentracije kalcijuma.....	70
3.4.5. Određivanje koncentracije magnezijuma.....	71
3.4.6. Određivanje koncentracije neorganskog fosfata.....	72
3.4.7. Određivanje koncentracije betaCTx.....	73
3.4.8. Određivanje koncentracije iPTH.....	74
3.4.9. Određivanje koncentracije 25-hidroksi vitamina D.....	76
3.5. ANALIZA PODATAKA.....	77
4. REZULTATI.....	79
4.1. ANALITIČKE KARAKTERISTIKE METODA ZA ODREĐIVANJE ISPITIVANIH BIOMARKERA.....	79
4.2. VREDNOSTI ISPITIVANIH BIOMARKERA U KONTROLNOJ GRUPL.....	82
4.2.1. Raspodela vrednosti ispitivanih biomarkera u kontrolnoj grupi u odnosu na pol.....	85
4.2.2. Raspodela vrednosti ispitivanih biomarkera u kontrolnoj grupi u odnosu na godine života.....	85
4.2.3. Referentni intervali ispitivanih biomarkera u kontrolnoj grupi.....	86
4.3. RASPODELA VREDNOSTI BIOMARKERA RESORPCIJE I STVARANJA KOSTIJU KOD PACIJENATA SA KRAJNJIM STADIJUMOM BOLESTI BUBREGA.....	88
4.3.1. Vrednosti ispitivanih biomarkera kod pacijenata sa krajnjim stadijumom bolesti bubrega u odnosu na pol.....	88
4.3.2. Vrednosti ispitivanih biomarkera kod pacijenata sa krajnjim stadijumom bolesti bubrega u odnosu na godine života.....	90
4.3.3. Vrednosti ispitivanih biomarkera u odnosu na trajanje dijalize.....	92
4.3.4. Raspodela vrednosti ispitivanih biomarkera kod predijaliznih pacijenata.....	94
4.3.5. Raspodela vrednosti ispitivanih biomarkera kod pacijenata na hemodijalizi.....	97
4.3.6. Raspodela vrednosti ispitivanih biomarkera kod pacijenata na kontinuiranoj ambulatornoj peritonealnoj dijalizi.....	100

4.4. POREĐENJE VREDNOSTI BALP, TRAP, BETA-CTx I PREPORUČENIH BIOMARKERA KOD PACIJENATA SA KRAJNJIM STADIJUMOM BOLESTI BUBREGA U ODNOSU NA KONTROLNU GRUPU.....	103
4.4.1. Raspodela vrednosti BALP, TRAP, beta-CTx i preporučenih biomarkera kod pacijenata sa krajnjim stadijumom bolesti bubrega u odnosu na vrednosti u kontrolnoj grupi.....	103
4.4.2. Korelacija vrednosti BALP, TRAP i beta-CTx sa vrednostima preporučenih biomarkera kod predijaliznih pacijenata.....	109
4.4.3. Korelacija vrednosti BALP, TRAP i beta-CTx sa vrednostima preporučenih biomarkera kod pacijenata na hemodijalizi.....	114
4.4.4. Korelacija vrednosti BALP, TRAP i beta-CTx sa vrednostima preporučenih biomarkera kod pacijenata na kontinuiranoj ambulatornoj peritonealnoj dijalizi.....	118
4.5. POREĐENJE BALP, TRAP, BETA-CTx I PREPORUČENIH BIOMARKERA U ODNOSU NA NIVOE iPTH, VREDNOSTI VITAMINA D I PROIZVODA KALCIJUMA I NEORGANSKOG FOSFATA.....	122
4.5.1. Raspodela vrednosti BALP, TRAP, beta-CTx i preporučenih biomarkera u odnosu na niske, preporučene i visoke nivoe iPTH.....	123
4.5.2. Raspodela vrednosti BALP, TRAP, beta-CTx i preporučenih biomarkera u odnosu na nedovoljne i dovoljne nivoe 25-hidroksi vitamina D.....	135
4.6. DIJAGNOSTIČKA VREDNOST BALP, TRAP, BETA-CTx I PREPORUČENIH BIOMARKERA ZA PROCENU ADINAMIČNE BOLESTI KOSTIJU.....	146
5. DISKUSIJA.....	153
5.1. ANALITIČKE KARAKTERISTIKE METODA ZA ODREĐIVANJE ISPITIVANIH BIOMARKERA.....	155
5.2. VREDNOSTI ISPITIVANIH BIOMARKERA U KONTROLNOJ GRUPI.....	156
5.2.1. Raspodela vrednosti ispitivanih biomarkera u kontrolnoj grupi u odnosu na pol.....	157
5.2.2. Raspodela vrednosti ispitivanih biomarkera u kontrolnoj grupi u odnosu na godine života.....	157

5.2.3. Referentni intervali ispitivanih biomarkera u kontrolnoj grupi.....	158
5.3. RASPODELA VREDNOSTI BIOMARKERA	
RESORPCIJE I STVARANJA KOSTIJU KOD PACIJENATA SA	
KRAJNJIM STADIJUMOM BOLESTI BUBREGA.....	158
5.3.1. Vrednosti ispitivanih biomarkera kod pacijenata	
sa krajnjim stadijumom bolesti bubrega u odnosu na pol.....	159
5.3.2. Vrednosti ispitivanih biomarkera kod pacijenata	
sa krajnjim stadijumom bolesti bubrega u odnosu na godine života.....	160
5.3.3. Vrednosti ispitivanih biomarkera kod pacijenata	
sa krajnjim stadijumom bolesti bubrega u odnosu na trajanje dijalize.....	161
5.3.4. Raspodela vrednosti ispitivanih biomarkera	
kod predijaliznih pacijenata.....	162
5.3.5. Raspodela vrednosti ispitivanih biomarkera	
kod pacijenata na hemodijalizi.....	162
5.3.6. Raspodela vrednosti ispitivanih biomarkera kod pacijenata na	
kontinuiranoj ambulatornoj peritonealnoj dijalizi.....	163
5.4. POREĐENJE VREDNOSTI BALP, TRAP, BETA-CTx I	
PREPORUČENIH BIOMARKERA KOD PACIJENATA	
SA KRAJNJIM STADIJUMOM BOLESTI BUBREGA	
U ODNOSU NA KONTROLNU GRUPU.....	163
5.4.1. Raspodela vrednosti BALP, TRAP, beta-CTx i preporučenih biomarkera	
kod pacijenata sa krajnjim stadijumom bolesti bubrega u odnosu na	
vrednosti u kontrolnoj grupi.....	164
5.4.2. Korelacija vrednosti BALP, TRAP, beta-CTx i preporučenih biomarkera	
kod predijaliznih pacijenata.....	167
5.4.3. Korelacija vrednosti BALP, TRAP, beta-CTx i preporučenih biomarkera	
kod pacijenata na hemodijalizi.....	168
5.4.4. Korelacija vrednosti BALP, TRAP, beta-CTx i preporučenih biomarkera	
kod pacijenata na kontinuiranoj ambulatornoj peritonealnoj dijalizi.....	168
5.5. POREĐENJE BALP, TRAP, BETA-CTx I PREPORUČENIH BIOMARKERA	
U ODNOSU NA NIVOE iPTH, VREDNOSTI VITAMINA D I PROIZVODA	
KALCIJUMA I NEORGANSKOG FOSFATA.....	169

5.5.1. Raspodela vrednosti BALP, TRAP, beta-CTx i preporučenih biomarkera u odnosu na niske, preporučene i visoke nivoe iPTH.....	170
5.5.2. Raspodela vrednosti BALP, TRAP, beta-CTx i preporučenih biomarkera u odnosu na nedovoljne i dovoljne nivoe 25-hidroksi vitamina D.....	172
5.6. DIJAGNOSTIČKA VREDNOST BALP, TRAP, BETA-CTx I PREPORUČENIH BIOMARKERA ZA PROCENU ADINAMIČNE BOLESTI KOSTIJU.....	174
6. ZAKLJUČCI.....	177
7. SUMARNI ZAKLJUČCI.....	183
8. LITERATURA.....	185

1. UVOD

1.1. SPECIFIČNI BIOMARKERI METABOLIZMA KOSTIJU

Kost je metabolički aktivno tkivo koje podleže stalnom remodelovanju kroz procese stvaranja i resorpcije. Masu kostiju je moguće proceniti denzitometrijskim tehnikama, ali jačinu i strukturu kostiju *in vivo* je teško izmeriti (1, 2). Histomorfološki parametri kostiju mogu da se utvrde nakon biopsije kostiju, mada za ovu invazivnu metodu retko postoji opravdana indikacija. Suprotno statičkim merenjima, pomoću biomarkera kostiju je moguće pratiti dinamiku metabolizma kostiju (3, 4).

Biomarkeri stvaranja i resorpcije kostiju su fiziološki povećani i u ravnoteži u detinjstvu, za vreme rasta, i zarastanja rana, pa imaju mali dijagnostički značaj. Kada postoji neravnoteža u procesu remodelovanja koštanog tkiva, dolazi do promene mase i oblika kostiju, tako da promene serumskih biomarkera koštanog prometa, mogu da ukažu u kom pravcu se menja metabolizam kostiju (ubrzan ili usporen).

Biomarkeri metabolizma kostiju su enzimi i ne-enzimski peptidi koji se oslobađaju iz ćelija i ne-ćelijskih struktura kostiju i klasifikuju se prema metaboličkom procesu koji oslikavaju. Klinički značajna je podela na biomarkere stvaranja i resorpcije kostiju. Biomarkeri stvaranja kostiju su proizvodi aktivnih osteoblasta i ukazuju na njihovu aktivnost i formiranje kostiju (5, 6). Biomarkeri resorpcije kostiju su proizvodi aktivnosti osteoklasta i proizvodi raspadanja kolagena kostiju (5, 6).

1.1.1. KOŠTANI IZOENZIM ALKALNE FOSFATAZE

Alkalna fosfataza (ALP) je glikoprotein koji se nalazi u većini tkiva i organa ljudskog organizma. Prema enzimskoj nomenklaturi je označen klasifikacionim brojem EC 3.1.3.1., sa sistematskim imenom ortofosfat-monoestar fosfohidrolaza koji je aktivan u alkalnoj sredini. U literaturi se može naći i pod sledećim nazivima: alkalna fosfomonoesteraza, glicerofosfataza, alkalna fosfohidrolaza, alkalna fenil fosfataza i dr. (7). Osnovna uloga je da katalizuje hidrolizu najrazličitijih monofosfatnih estara, R-O-PO₃, a R može da bude različita grupa što ne utiče na funkciju enzima (2,4-dinitrofenil,

4-nitrofenil, fenil, glukoza-1, glicerol-1, metil, etil i dodecil). Mehanizam katalize podrazumeva stvaranje serin-fosfata na aktivnom mestu enzima koji reaguje sa vodom u alkalnom pH (pH = 10), što uslovljava oslobađanje neorganskog fosfata iz enzima. U prisustvu visoke koncentracije organskog alkohola, dolazi do transfosforilacione reakcije u kojoj se oslobađanjem neorganskog fosfata koji je vezan za enzim, fosforiliše organski alkohol. Fosfatne grupe se u reakcionom medijumu prenose sa kompleksa enzim-fosfat i na druge fosfatne akceptore. Svoju ulogu glikoproteina ostvaruje vezujući se kao ektoenzim za ćelijsku membranu, pomoću karboksi terminalnog kraja sa glikozil fosfatidilinozitolom (GPI), čija struktura podseća na sidro. Aktivatori enzima su dvovalentni joni magnezijuma (Mg^{2+}), kobalta (Co^{2+}) i mangana (Mn^{2+}), kao i metalni dvovalentni jon zinka (Zn^{2+}). Za optimalnu aktivnost enzima neophodan je tačan odnos Mg^{2+} i Zn^{2+} . Joni Ca^{2+} , fosfata, borata, oksalata i cijanida su inhibitori aktivnosti ovog enzima (8).

Svoju ulogu u mineralizaciji ispoljava i u različitim vrstama (biljkama, bakterijama i životinjama). Kod kičmenjaka, alkalna fosfataza je ubikvitarni tetramerni enzim koji se nalazi na spoljnoj površini plazma-membrane ćelija i kovalentno je povezan karboksilnim krajem za fosfatidil inozitol-glikofosfolipidne ostatke na unutrašnjoj membrani ćelije. Kod ljudi četiri različita gena kodiraju stvaranje izoenzima alkalne fosfataze: tkivno-nespecifični, intestinalni, placentalni i izoenzim sličan placentalom, koga stvaraju embrionalne ćelije (9). Tkivno-nespecifični su izoenzimi jetre, kostiju i bubrega i nastaju ekspresijom istog gena kao posledica posttranslacionih promena (npr. glikozilacija) (9–11). Nastale tkivno-specifične varijante se razlikuju u sastavu karboksi-hidratnih ostataka, a posledično i u različitoj osetljivosti na toplotu i elektroforetskoj pokretljivosti (12, 13).

Kod zdravih osoba ukupna alkalna fosfataza potiče primarno iz jetre i kostiju i to oko 95% od ukupne ALP, a u odnosu 1:1 (14). Koštana i jetrena alkalne fosfataza (BALP i JALP) formiraju se procesom post-translacione modifikacije (diferencijalna glikozilacija i različito vezivanje ostataka sijalinske kiseline) tkivno nespecifičnog genskog produkta. Razlika između izoformi BALP i JALP je u načinu vezivanja

sijalinske kiseline i O-šećerne komponente, a male razlike potiču i od različitog broja ostataka sijalinske kiseline i N-acetil glukozamina.

Pre više od 80 godina, zapažena je povećana ekspresija ALP u kostima i postavljena prva hipoteza koja je imala za cilj da objasni značaj ALP za formiranje koštanog tkiva (15). Veliki broj podataka potvrđuje činjenicu da je ALP biomarker osteogene aktivnosti (16–19). Glavnu ulogu u mineralizaciji potvrđuje i podatak da bolest koja je poznata kao hipofosfatazija (OMIM:171760) rezultat mutacije u genu koji kodira sintezu tkivno-nespecifičnih izoenzima alkalne fosfataze, a vodi razvoju fenotipa kojeg karakteriše smanjena mineralizacija kostiju (17).

Osnovni regulatorni mehanizam koji kontroliše diferencijaciju osteoblasta, sazrevanje hrskavice i ekspresiju ALP je tzv. Osteriks sistem koji podrazumeva uzajamnu aktivnost velikog broja proteina koji su odgovorni za morfogenezu kostiju (*Bone morphogenetic protein family*, BMP), kao i RUNX2 (CBAf1, AML3) grupe transkripcionih faktora (*Runt-related transcription factor 2/core-binding factor subunit alpha-1*) (16). RUNX2 ekspresija u mezenhimalnim ćelijama podstiče diferencijaciju osteoblasta i formiranje kostiju. Skoriji radovi o BMP/RUNX2 sistemu ukazuju na veliki broj genskih proizvoda, koji nastaju ekspresijom HOX10A gena koji je značajan transkripcioni regulator embrionog razvoja. Oba sistema pored stimulacije osteogeneze imaju veliku ulogu i u ekspresiji gena za tkivno-nespecifične izoenzime ALP preko remodelovanja hromozoma (20). Posebna kontrola ekspresije izoenzima ALP je udruženo delovanje 1,25-dihidroksi vitamina D (1,25D), retinoične kiseline i paratiroidnog hormona (PTH), koji interaguju sa osnovnim regulatornim sistemima (20).

Koštani izoenzim alkalne fosfataze nađen u osteoblastima je specifičan biomarker formiranja kostiju, a glavna uloga BALP je kalcifikacija ekstraćelijskog matriksa kostiju formiranjem hidroksiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$ (10). Smatra se da je kalcifikacija jedan od prvih koraka u konačnom procesu mineralizacije kostiju (10). Ova teorija je objašnjena rezultatima velikog broja radova koji su proučavali pacijente sa hipofosfatazijom (21–23). Ova bolest nastaje kao ne-smisljena mutacija gena koji kodira tkivno-nespecifične izoenzime ALP i vodi smanjenju ili odsustvu aktivnosti ovih

enzima, što ima za posledicu povećane nivoe fosfoetanolamina, piridoksal-5'-fosfata i neorganskog fosfata u krvi i u urinu.

Posttranslacione modifikacije istog mesta u genu koji kodira sintezu koštanog, jetrenog i intestinalnog izoenzima ALP, dovode do stvaranja izoformi ovih izoenzima (10). Različiti sadržaj ugljenohidratnog lanca u pojedinačnoj izoformi izoenzima nakon glikozilacije ili različiti način vezivanja za membranski glikozil-fosfatidil inozitol vodi stvaranju različitih izoformi BALP. Do sada su otkrivene tri izoforme BALP (B/I, B1 i B2), a kod pacijenata kod kojih je počela da se razvija bubrežna slabost otkrivena je i B1x izoforma BALP (24, 25). Kod zdravih odraslih osoba u odnosu na ukupnu ALP aktivnost postoji oko 4% aktivnosti B/I, oko 16% aktivnosti B1 i oko 37% aktivnosti B2 izoforme. Smatra se da pojedinačne izoforme BALP ukazuju na različite stadijume osteoblastne diferencijacije u toku osteogeneze, tako da se nalaze u različitoj koncentraciji pre i posle faze sazrevanja ekstraćelijskog matriksa kostiju (26). Takođe, pretpostavlja se da razlika u izoformama BALP potiče i od toga da li se nalaze u kortikalnim ili trabekularnim kostima, iako još uvek nije jasno definisana funkcija i značaj pojedinačnih izoformi BALP.

Prednost BALP u odnosu na druge biomarkere metabolizma kostiju jeste u tome što ovaj izoenzim ALP ima relativno dugo poluvreme života *in vivo* (1 do 3 dana). Uticaj cirkadijalnog ritma na njegovu aktivnost je sveden na minimum, a potvrđena je velika *in vitro* stabilnost. Nije dokazan uticaj hrane na ovaj izoenzim, za razliku od ALP koji se značajno snižava kod osoba koje su na nisko ugljenohidratnoj/visoko proteinskoj dijeti (27). BALP se ne filtrira kroz glomerule, čime je izbegnut uticaj nivoa glomerularne filtracije na njegovu koncentraciju (aktivnost) u serumu, pa je izuzetno koristan biomarker kod osoba sa oslabljenom funkcijom bubrega (28).

1.1.1.1. Klinički značaj koštanog izoenzima alkalne fosfataze

Uzimajući u obzir da je eksprimiranje BALP specifično za aktivnost osteoblasta, povišene i snižene vrednosti se mogu naći u metaboličkim poremećajima kostiju (10). Pod metaboličkim bolestima kostiju podrazumeva se veliki broj poremećaja koji su direktno ili indirektno povezani sa izmenjenim metabolizmom kostiju: hiperparatiroidizam, hipertiroidizam, Paget-ovo oboljenje ili poremećaj stvaranja kostiju, osteoporoza, osteomalacija i rahitis, renalna osteodistrofija, tireotoksikoza, akromegalija, metastaze na kostima, multipli mijelom, malapsorptivni sindrom, kao i bolesti koje su posledica neadekvatne terapije (imunosupresivi, heparin, fenitoin, glukokortikoidi, aluminijumski antacidi). Povećani nivoi BALP se identifikuju u stanjima povećanog metabolizma kostiju, dokazana je i dobra korelacija sa rastom i razvojem kostiju kod dece, tako da nivoi BALP odražavaju promene metabolizma kostiju u pubertetu.

Važna uloga BALP kao biomarkera za procenu rizika od gubitka mase kostiju objašnjena je velikom havajskom studijom osteoporoze (Hawaii Osteoporosis Study cohort) još 1998. godine (29). Ispitanice sa visokim nivoima BALP imale su 80% veću verovatnoću da će brže gubiti masu kostiju, kao direktnu posledicu osteoporoze. Pokazano je da je veza kontinuirana, ekvivalentno vezi između gustine mase kostiju i fraktura. Veliki broj radova ukazuje na značaj BALP u proceni efekta terapije kod postmenopauzalnih osoba sa osteoporozom (30–32). Kratkotrajne promene BALP aktivnosti su u obrnutoj srazmeri sa dugotrajnim promenama u mineralnoj gustini kostiju. Rezultati studija ukazuju da je porast biomarkera formiranja kostiju uočljiv već u toku prvih mesec dana od početka terapije, dok biomarkeri resorpcije kostiju rastu nakon 6 meseci.

Kvantitativne i kvalitativne fluktuacije BALP imaju značaja i kod pacijenata sa malignim promenama. Uočeno je da BALP može da bude koristan biomarker za diferencijalnu dijagnozu malignih promena sa ili bez metastaza na kostima. Tako je jednom retrospektivnom studijom pokazana dobra međusobna povezanost između BALP i specifičnog prostatičnog antigena (PSA) (33). Ovim je potvrđen praktični značaj BALP kao biomarkera koji bi se koristio za praćenje pacijenata sa kancerom

prostate kod kojih su se razvile metastaze na kostima. Suprotno, kod pacijenata sa multiplim mijelomom dobijene su izrazito snižene vrednosti BALP. Grupa autora iz Danske je pokazala da je BALP koristan biomarker za otkrivanje metastaza na kostima kod pacijenata sa malignim promenama na dojčkama i na plućima, ali je najveći značaj do sada utvrđen kod pacijenata sa kancerom prostate (33).

Poremećaj metabolizma minerala i kostiju je glavna odlika pacijenata sa hroničnom bolesti bubrega. Renalna osteodistrofija je tradicionalni izraz kojim se definišu različite lezije na kostima koje su posledica hronične bolesti bubrega. Kod pacijenata sa krajnjim stadijumom bolesti bubrega (KSBB) se pored sekundarnog hiperparatiroidizma, osteomalacije i osteoporoze, često javljaju i bolest usporenog metabolizma kostiju, adinamična osteopatija i depoziti beta2-mikroglobulin amiloida na kostima. Jedan broj radova potvrđuje činjenicu da je BALP najosetljiviji i najspecifičniji biomarker u proceni stepena remodelovanja kostiju kod KSBB pacijenata (34–37).

Pokazano je da je BALP jedini biomarker čije vrednosti mogu da se koriste same po sebi da ukažu na prisustvo ili odsustvo adinamične bolesti kostiju (38). Mada su nivoi BALP povećani u slučajevima teške osteomalacije, koja predstavlja bolest usporenog metabolizma kostiju, ovakve vrednosti praktično isključuju prisustvo adinamične bolesti kostiju koja je takođe bolest usporenog metabolizma kostiju. Couttenye i sar. (39) su pokazali da je za postavljanje dijagnoze adinamične bolesti kostiju veoma specifičan i osetljiv biomarker BALP, u vrednostima ispod preporučene „cut-off“ vrednosti od 27 IU/L za ovaj biomarker. I pored ove činjenice, predlaže se kombinacija BALP sa intaktnim paratiroidnim hormonom (iPTH) za razlikovanje ubrzanog metabolizma kostiju od adinamične bolesti kostiju.

Kod primarnog hiperparatiroidizma, BALP je osetljiv biomarker promena na kostima i kod asimptomatskih stanja ove bolesti (40). Međutim, sekundarni hiperparatiroidizam je jedna od čestih poremećaja koje se razvijaju posledično kod KSBB pacijenata. Pokazano je da veliki značaj ima BALP, kao specifičan biomarker metabolizma kostiju, upravo u sekundarnom hiperparatiroidizmu zbog činjenice da se ne filtrira kroz bubrege

(41, 42). Nivoi BALP su i do tri puta povećani i koreliraju dobro sa nivoima iPTH. Ovo je od izuzetnog kliničkog značaja kod pacijenata koji su na dijalizi.

Mada je BALP specifičan biomarker metabolizma kostiju, njegova osetljivost se još uvek ispituje kod pacijenata kod kojih postoje izražene bolesti jetre (karcinom jetre i žučnih puteva, ciroza jetre, u kojima je povećan jetreni izoenzim ALP). Dosadašnje tehnike određivanja ovog izoenzima pokazuju da u 6–8% slučajeva postoji ukrštena reakcija antitela na BALP sa jetrenim izoenzimom alkalne fosfataze. U ovim slučajevima vrednosti BALP mogu da budu lažno povećane upravo zbog bolesti jetre.

1.1.1.2. Određivanje koštanog izoenzima alkalne fosfataze

Metode za određivanje BALP se zasnivaju na merenju koncentracije enzima kao proteina ($\mu\text{g/L}$) ili merenju enzimske aktivnosti (IU/L). Koriste se metode inaktivacije toplotom, hemijske inhibicije ureom, 1-fenilalaninom, 1-homoargininom i levamizolom. Takođe se primenjuju tehnike elektroforeze, izoelektričnog fokusiranja, precipitacije lektinom i hromatografija (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) kao pojedinačne tehnike ili u kombinaciji. Imunohemijska metoda kojom se meri enzimska aktivnost je ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), dok se koncentracija ovog izoenzima može odrediti IRMA metodom (*Immunoradiometric Assay*). Ove metode se zasnivaju na imunoreakciji između monoklonskih anti-BALP antitela i BALP iz uzorka, dok se kod IRMA određivanja koristi sendvič tehnika u kojoj se koriste dva monoklonska antitela koja mogu da detektuju dva različita epitopa na BALP. Anti-BALP antitela su dobijena imunizacijom životinja sa rekombinantnim humanim BALP (43). ELISA testovi za određivanje BALP koriste mišja i ovčja antitela na humani BALP.

BALP se može odrediti korišćenjem specifičnih monoklonskih ili poliklonskih antitela i tehnikama protočne citometrije (*flow cytometry*), kao i kombinacijom imunocitohemijskih i imunofluorimetrijskih metoda (44). Do sadašnji imunoeseji nisu potpuno specifični za BALP jer postoji 7–17% ukrštene reakcija antitela na BALP sa

jetrenim izoenzimom, što otežava određivanje niskih nivoa koštanog izoenzima ovim metodama. Međutim, većina ovih tehnika zahteva skupu opremu, vremenski je zahtevna i nije adekvatna za rutinsko određivanje BALP.

Kao rutinska tehnika za određivanje koristi se elektroforetsko razdvajanje izoenzima ALP kojom je moguće specifično identifikovati i kvantifikovati BALP (39, 41). Kao i afinitetna hromatografija i diferencijalna precipitacija izoformi izoenzima alkalne fosfataze, elektroforeza koristi lektin (aglutinin iz pšenice, *wheat germ agglutinin* (WGA)) da razdvoji koštani od jetrenog izoenzima. Za povećanje preciznosti testa koriste se komercijalni interni standardi ALP izoenzima.

1.1.1.3. Referentni interval

Koncentracije BALP određene IRMA metodom su oko 5 do 20 ng/mL, a imunoapsorpcionim testom su redom od 11,6 do 29,6 IU/L i od 15,0 do 41,3 IU/L kod premenopauzalnih žena i muškaraca (43, 45). Automatizovanim hemiluminiscentnim imunoenzimskim metodom dobijaju se vrednost od 14,3 i 20,1 ng/mL za premenopauzalne žene i muškarce, redom (46). Normalne vrednosti BALP određene agar gel elektroforezom su kod žena, muškaraca i dece, redom 20–74% ALP ili ≤ 44 IU/L, 23–75% ALP ili ≤ 73 IU/L i 62–100% ALP ili ≤ 370 IU/L (47). Serumske koncentracije BALP zavise od godina života, pola, hormonskog statusa (trudnoća, menopauza, pubertet). Koncentracije su veće kod muškaraca i rastu sa godinama života i kod žena i kod muškaraca, u skladu sa porastom koštanog prometa sa godinama života. Deca imaju znatno veće koncentracije, posebno na početku rasta i razvoja koštanog tkiva.

Klinički značajna „cut-off“ vrednost BALP određena elektroforetskom tehnikom je od 25 do 30 IU/L u proceni usporenog prometa koštanog tkiva kod KSBB pacijenata (predijalizni i pacijenti na dijalizi) (48, 49).

1.1.2. TARTARAT REZISTENTNA KISELA FOSFATAZA

Kisela fosfataza (ACP) je široko rasprostranjen enzim koji se nalazi u humanim i animalnim tkivima i biljkama. Prema enzimskoj nomenklaturi je označen klasifikacionim brojem EC 3.1.3.2. i sa sistematskim imenom ortofosfat-monoestar fosfohidrolaza koji je aktivan u kiseloj sredini. U literaturi se može naći i pod sledećim nazivima: kisela monofosfataza, glicerofosfataza, kisela fosfohidrolaza, uteroferin, kisela nukleozid difosfat fosfataza i dr. (50). Kisela fosfataza je enzim koji spada u grupu hidrolaza. Osnovna uloga je da katalizuje hidrolizu različitih prirodnih i sintetskih supstrata, ortofosfatnih monoestara i neorganskih pirofosfata u vodenoj sredini pri kiselom pH (optimum pH = 5), što uslovljava oslobađanje neorganskog fosfata iz enzima, nastanak alkohola i ortofosfata. U prisustvu visoke koncentracije organskog alkohola, dolazi do transfosforilacione reakcije u kojoj se oslobađanjem neorganskog fosfata koji je vezan za enzim, fosforiliše organski alkohol. Fosfatne grupe se u reakcionom medijumu prenose sa kompleksa enzim-fosfat i na druge fosfatne akceptore. Aktivatori enzima su dvovalentni joni magnezijuma (Mg^{2+}), kobalta (Co^{2+}) i mangana (Mn^{2+}), kao i metalni dvovalentni jon zinka (Zn^{2+}). Za optimalnu aktivnost enzima neophodan je tačan odnos Mg^{2+} i Zn^{2+} . Joni Ca^{2+} , fosfata, borata, oksalata i cijanida su inhibitori aktivnosti ovog enzima.

Različiti izoenzimi ACP nastaju kao posledica ekspresije nekoliko različitih gena. Iako imaju istu funkciju, različiti izoenzimi se razlikuju u zavisnosti od toga u kom tkivu se stvaraju, kao i na kom hromozomu se nalaze geni koji kodiraju sintezu različitih formi jednog enzima (51). Takođe je značajna razlika i u molekularnoj masi pojedinačnih izoenzima, istovetnosti u aminokiselinskoj sekvenci, u dužini sekvence, otpornosti na L(+) tartarat i fluorid (52). Elektroforetskim razdvajanjem na kiselom poliakrilamid gelu, kod čoveka je identifikovano pet izoenzima ACP: lizosomalni (LAP), prostatični (PAP), eritrocitni (EAP), makrofagni (MAP) i osteoklastni ili koštani (tartarat resistant acid phosphatase, TRAP) (53). Izoelektrična tačka koštanog izoenzima ACP je od 7,6 do 9,5. Izoenzim LAP se nalazi u velikom broju ćelija i relativno je nespecifičan, PAP se nalazi u prostati, mozgu, slezini, jetri i trombocitima, EAP se nalazi u eritrocitima, kao i drugim ćelijama, MAP se nalazi u makrofagama jetre, slezine i pluća, dok se TRAP nalazi kao specifičan izoenzim osteoklasta kostiju. Sintaza LAP, PAP, EAP,

MAP i TRAP nastaje kao ekspresija gena na sledećim hromozomima: 11, 3, 2, 19 i 19. Aminokiselinska sekvenca za LAP; PAP, EAP, MAP i TRAP je sledeća: 423, 345, 157, 325 i 325. Najveća sličnost u aminokiselinskoj sekvenci postoji između LAP i PAP (50%) i MAP i TRAP (visok stepen sličnosti) (53). Najveću molekulsku masu imaju LAP i PAP (100 kDa), najmanju ima EAP (18 kDa), a molekulska masa MAP i TRAP je 37 kDa. Otpornost na tartarat pokazuju EAP, MAP i TRAP, a na fluorid pokazuju LAP, PAP, EAP i MAP (54).

Humani gen za TRAP se nalazi na dužem kraku hromozoma 19 (19p13.2–13.3), dok je kod miša identifikovan na hromozomu 9 (51). Isti gen je kloniran i sekvenciran i kod svinja, miševa i ovaca. Kod čoveka ovce i svinje gen sadrži 5 egzona i ima ATG kodon na početku drugog egzona, jer prvi kodon ovoga gena nije kodiran. Unutar prvog egzona postoje tri tkivno specifična promotera 1A, 1B, and 1C. Ovo ukazuje da se sinteza TRAP strogo kontroliše. Transkripcijom dobijena mRNA sa ovog gena ima 969–975 baznih parova koji kodiraju TRAP (55). Kod miševa gen ima dužinu od 981 baznih parova, i sadrži 327 amino kiseline. Translacija TRAP kao posledicu ima stvaranje pojedinačnog polipeptida. Transkripcija gena je regulisana Mikroftalmia-udruženim transkripcionim faktorom (55).

Kod čoveka koncentracija ACP je relativno niska. Međutim, različiti patofiziološki procesi dovode do izrazitih promena ovog enzima. Veliki broj radova objašnjava klinički i laboratorijski značaj pojedinačnih izoenzima ACP kao specifičnih biomarkera. Nedostatak LAP je karakterističan za nasledno autozomalno recesivno oboljenje koje dovodi do promene opšteg metabolizma (56). Povećane vrednosti PAP su karakteristične za kancerogene promene na prostati (57). PAP se koristi i kao forenzični marker kod seksualnog napastvovanja. Kod sumnje na razvoj hemolitičkih poremećaja sa određenim alelima i testiranja očinstva koristan biomarker je EAP. Povećane vrednosti MAP nalaze se kod urođene greške metabolizma cerebrozida (Gaucher-ove bolesti). Na metastatske promene na kostima, kao i povećanu resorpciju kostiju specifično ukazuju povećane vrednosti TRAP (58).

Kada su osteoklasti aktivni, u normalnim ili patološkim stanjima, stvaraju velike količine TRAP. Ovaj izoenzim je glikoprotein koji u svom aktivnom mestu ima vezan dvovalentni fero jon (Fe^{2+}). Zajedno sa MAP se pri elektroforetskom razdvajanju nalazi u frakciji 5, pa su oba izoenzima označena kao 5TRAP. Da bi se napravila razlika između ova dva izoenzima slične pokretljivosti, u literaturi su definisani redom oznakama 5aTRAP i 5bTRAP, za izoenzim koji nije poreklom iz kostiju, kao i za izoenzim koji potiče specifično iz osteoklasta. Glavna razlika između MAP i TRAP je u strukturi; osteoklasni izoenzim ne sadrži ostatke sijalinske kiseline (51).

Kost je metabolički aktivno tkivo. Rast i remodelovanje je normalan fiziološki proces koji je ubrzan u periodu rasta i razvoja, u detinjstvu i periodu adolescencije, a znatno usporen u kasnijem periodu života. Remodelovanje kostiju je rezultat aktivnosti dve vrste ćelija kostiju, osteoblasta koje stvaraju novu strukturu kostiju, i osteoklasta koje su odgovorne za resorpciju i obnavljanje postojeće građe kostiju. Ubrzana resorpcija kostiju je u osnovi patofizioloških procesa velikog broja oboljenja kod čoveka (Paget-ovog oboljenja, maligne hiperkalcemije, renalne osteodistrofije, hipertiroidizma, hiperparatiroidizma i postmenopauzalne osteoporoze). U osnovi leži poremećena ravnoteža između sinteze i resorpcije kostiju. Posledica je smanjenje koštane mase i povećan rizik od fraktura (59).

Povećana osteoklastna aktivnost je udružena sa povećanom sintezom i sekrecijom 5bTRAP (60). Mada je ovaj izoenzim, slično 5aTRAP ili MAP izoenzimu, otporan na inhibitorno dejstvo L(+) tartarata na katalitičku aktivnost ACP, opšte prihvaćen naziv izoenzima specifičnog za aktivnost osteoklasta je tartarat rezistentna kisela fosfataza (TRAP). I histohemijskim tehnikama su pomoću TRAP identifikovani osteoklasti (61). Kultura osteoklasta iz uzorka kortikalne kosti ili dentina, pokazuje progresivnu akumulaciju TRAP u kulturnom medijumu. Na ovo ukazuje i stvaranje lezije na površini kostiju u toku procesa resorpcije. Takođe, antitela usmerena na aktivna mesta TRAP, znatno smanjuju njegovu normalnu katalitičku aktivnost, što uslovljava smanjenu resorpciju kostiju. Eksperimentalni miševi koji nisu nosioci gena za sintezu TRAP, razvijaju blagu osteopetrozu (ubrzan rast kostiju), kao posledicu poremećene ravnoteže remodelovanja kostiju, na račun osteoblastne aktivnosti (62). TRAP se nalazi

u visokim koncentracijama u serumu pacijenata kod kojih su dijagnostifikovana koštana oboljenja, u odnosu na kontrolnu grupu u kojoj postoji normalan stepen resorpcije kostiju (61). Postoji direktna veza između povećane resorpcije kostiju i povećane koncentracije TRAP u cirkulaciji. Shodno ovome, TRAP se koristi kao serumski biomarker za kliničku dijagnozu povećane resorpcije kostiju i za kvantitativno praćenje stepena i progresije metaboličkog oboljenja kostiju (63).

Osteoklasti sintetišu TRAP u obliku latentnog inaktivnog proenzima. U literaturi se objašnjava da je aktivirani TRAP u stvari okidač procesa resorpcije (64). TRAP svoju aktivnost može da ostvari kao ekstraćelijski i intraćelijski enzima. Uzimajući u obzir da TRAP ispoljava funkciju fosfoprotein fosfataze i da katalizuje oslobađanje fosfatnih grupa iz proteinskih molekula, ovo može da dovede i do promene strukture i funkcije samih supstrata ovog enzima. Fosfoproteini matriksa kostiju, osteopontin, koštani sijaloprotein i osteonektin su biološki supstrati za TRAP. Ovaj enzim uklanja fosfatne grupe sa nabrojanih fosfoproteina matriksa, tako da u krajnjem dovodi i do izmenjene adhezije osteoklasta za tkivo kostiju. Sposobnost degradacije fosfoproteina kostiju, procesom defosforilacije, omogućava specifičnim proteinazama da ostvare svoje dejstvo na organskim komponentama koštanog matriksa (61).

Literaturni podaci su još uvek kontraverzni o unutar ćelijskoj lokalizaciji TRAP (65, 66). Hallen i sar. (65) su korišćenjem fluorescentnog mikroskopa lokalizovali TRAP unutar transcitozolnih vezikula osteoklasta. Naučnici Reinholt (66) i Fukušima (67) su sa svojim saradnicima objasnili da se TRAP nalazi zajedno sa organskim proizvodima razgradnje koštanog matriksa, koji se oslobađaju za vreme resorpcije i endocitozom ulaze u osteoklaste. Bilo da se sintetiše unutar ćelije i ulazi u transcitozolne vezikule ili u ćeliju ulazi fuzijom sa raspadnim proizvodima kostiju, svoju katalitičku aktivnost ostvaruje zahvaljujući mogućstvu da vezuje dva oblika molekula gvožđa. U zavisnosti od toga u kom se obliku nalazi gvožđe, TRAP može da bude inaktivan, aktivan, u znatnoj meri deaktivisan i da ne sadrži jone gvožđa. U toku hidrolize fosfomonoestara, gvožđe omogućava vezivanje supstrata fosfata za aktivni centar enzima u kiseloj sredini (pH = 4–6) (67). Pretpostavlja se da se hidroliza ostvaruje snažnim otpuštanjem

elektrona iz molekula gvožđa. Takođe, literaturni podaci ukazuju da TRAP katalizuje i formiranje slobodnih radikala, kao fosfataza pri neutralnom pH (64).

Kada se nađe u cirkulaciji TRAP teži da se veže u kompleks sa serumskim proteinima velike molekulske mase, najčešće α 2-makroglobulin (68). Mada tačna uloga ovog kompleksa još nije utvrđena, zna se da α 2-makroglobulin ostvaruje funkciju nosioca i regulatora aktivnosti citokina. Shodno ovome, pretpostavlja se da sličnu ulogu ostvaruje i u kompleksu sa TRAP, pri čemu omogućava uklanjanje enzima sa mesta resorpcije kostiju, a zatim i iz cirkulacije. Pored ovoga, TRAP je enzim koji se kao i ostali katalizatori inaktivišu. Ovo se objašnjava gubitkom dvovalentnog gvožđa iz aktivnog centra enzima, koji se reciklira, a enzim se raspada dejstvom proteaza u plazmi i u jetri i ekstretuje urinom. Smatra se da se u cirkulaciju oslobodi 10% intaktnog, cirkulišućeg, aktivnog enzima, a da su 90% sekretovanog TRAP iz osteoklasta, neaktivni fragmenti (69).

Hallen i sar. (65) su objasnili vremenski zavisnu aktivnost TRAP. Za aktivaciju inaktivnih i novosintetisanih oblika TRAP potrebna je inkubacija od četiri sata na 37 °C, dok je za deaktivaciju potrebno 24 sata. Ovo ukazuje da je određivanje TRAP u uzorku seruma, u stvari dinamički test kojim se može pratiti resorpcija kostiju. Izmereni serumski nivoi TRAP ukazuju na količinu aktivnosti osteoklasta u periodu od 24 časova pre vađenja krvi.

1.1.2.1. Klinički značaj tartarat rezistentne kisele fosfataze

Klinički značaj TRAP se upravo zasniva na direktnom učešću ovog enzima u patološkim stanjima resorpcije kostiju. Nivo ovog biomarkera u serumu ima direktan kvantitativni i dinamički odnos sa količinom resorpcije koja se iz dana u dan menja. Ova činjenica je značajna za dijagnozu, praćenje i lečenje izrazitog gubitka koštanog tkiva u nekim bolestima. Takođe, određivanjem nivoa TRAP može da se kontroliše uticaj pojedinačnih hormona na povećanje ili supresiju resorpcije kostiju. Profilaktička hormonska terapija estrogenom u cilju sprečavanja postmenopauzalne osteoporoze,

suprimira resorpciju osteoklasta i aktivnost TRAP (60). Terapija interferonom γ sprečava diferencijaciju osteoklasta u aktivnu formu ćelija koje stvaraju TRAP. Upotreba bifosfonata, kao što je alendronat sprečava PTH posredovanu resorpciju kostiju (60). Neka istraživanja ukazuju da integrini koji su inhibitori osteoklasta, sprečavaju vezivanje osteoklasta za koštano tkivo pre nego što se TRAP sintetiše i oslobodi iz ovih ćelija (70, 71). Interesantno je da fluor, koji se trenutno koristi kao sastavni deo lečenja osteoporoze, poznat inhibitor aktivnosti TRAP (72). Uzimajući ovo u obzir, pozitivan efekat fluora na kosti se pored delovanja na hidroksiapatit ogleda i u inhibitornom delovanju na TRAP.

1.1.2.2. Određivanje tartarat rezistentne kisele fosfataze

Metode za određivanje TRAP se zasnivaju na merenju koncentracije enzima kao proteina ($\mu\text{g/L}$) ili merenju enzimske aktivnosti (IU/L). Prvobitno su enzimske aktivnosti TRAP određivane kinetičkim metodama (60). Specifičnost enzimskih određivanja usavršena je upotrebom selektivnih inhibitora kao što su fluor i heparin, ali i korišćenjem selektivnih supstrata kao što je α -naftil fosfat. Različita imunoodređivanja mere aktivnost enzima nakon vezivanja za specifično antitelo, korišćenjem supstarata para-nitrofenil fosfata (pNPP) na pH 5,5. Imunohemijska metoda kojom se meri enzimska aktivnost je ELISA, dok se koncentracija ovog izoenzima može odrediti IRMA metodom. Imunoodređivanja mogu da budu kompetitivna, u kojima se koriste poliklonska antitela i sendvič-eseji koji koriste dva monoklonska antitela (73, 74). Klinički značaj immunoeseja kojima se određuje celokupna TRAP, kao i nivoi kod pacijenata sa krajnjim stadijumom bolesti bubrega, ostaje da se potvrdi budućim istraživanjima (75, 76).

Takođe, aktivnost TRAP se može izračunati i računskim putem nakon spektrofotometrijskog određivanja aktivnosti ukupne kisele fosfataze (75). Kolorimetrijskom metodom se može odrediti aktivnost ACP i PAP, a iz razlike aktivnosti dobija se aktivnost ne-prostatične kisele fosfataze ili TRAP, uzimajući u

obzir da najveći procenat ACP čine upravo prostatični i tartarat rezistentni koštani izoenzim kisele fosfataze.

1.1.2.3. Referentni interval

Kada se TRAP određuje iz razlike ukupne ACP i PAP, referentne vrednosti zavise od metode kojom se određuju ukupni enzim i prostatični izoenzim. Aktivnost TRAP zavisi od starosti i pola. Referentne vrednosti za TRAP, određene spektrofotometrijskom metodom su za devojčice i dečake do 15 godina starosti redom 1,5–5,7 IU/L i 2,8–5,8 IU/L, za žene i muškarce do 50 godina starosti redom 0,8–2,8 IU/L i 1,2–2,8 IU/L, a za žene i muškarce preko 50 godina starosti redom 1,4–3,7 IU/L i 1,2–2,8 IU/L (60).

Vrednosti serumske TRAP su značajno više kod pacijenata na dijalizi sa sekundarnim hiperparatiroidizmom oboljenjem koštanog tkiva u odnosu na pacijente sa normalnim ili niskim metabolizmom kostiju (58). Serumski nivoi TRAP jako koreliraju sa aktivnošću osteoklasta kod pacijenata na dijalizi (77, 78). Za detekciju ubrzane resorpcije kostiju smatra se da je značajna granična vrednost aktivnosti TRAP > 6,5 IU/L (78).

1.1.3. BETA-KARBOKSI TERMINALNI DEO UKRŠTENIH VEZA KOLAGENA I

Manji deo koštanog tkiva se sastoji od ćelija, osteoblasta, osteocita i osteoklasta, jer u strukturi kosti dominira kalcifikovani matriks (79). Matriks se primarno sastoji od vlakana kolagena (uglavnom tip I). Ovaj tip kolagena sadrži u osnovi glikozaminoglikan i nekolagene proteine. Tip I kolagen je glavni kolagen, koji ima heliksnu strukturu, tako da se ukršteno vezuju amino- i karboksilni-krajevi molekula. U osnovi koštanog tkiva nalaze se kristali hidroksiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), koji je vretenastog oblika koji su u ravnoteži sa vlaknima kolagena. Kolagen tip I se taloži u obliku listića, a čvrstina je obezbeđena povezivanjem, tj. umrežavanjem ovih vlakana pomoću amino- i karboksi- kraja molekula. Ukrštene veze kolagena su piridinolini koji su otporni na degradaciju i oslobađaju se za vreme resorpcije kostiju. U literaturi se

često koriste dva naziva kao sinonimi za telopeptide kolagena: beta-CTx i beta-Crosslaps (80). Međutim, postoji mala razlika u testovima pomoću kojih se određuju ove molekule. Beta-CTx i beta-Crosslaps testovi prepoznaju fragmente kolagena 1 beta izomerizacije 8AA-oktapeptida (EKAHD-beta-GGR) koji je sastavni deo epitopa lociranih na karboksi-terminalnim telopeptidima (81). Beta-Crosslaps se odnosi na fragmente koji sadrže najmanje jedan 8AA peptid, dok se beta-CTx odnosi na fragmente koji sadrže najmanje dva 8AA peptida (82).

Za vreme resorpcije kostiju osteoklasti sekretuju smešu kiselih i neutralnih proteaza, koje razgrađuju filamente kolagena na fragmente, uključujući i amino- i karboksi-terminalne fragmente, tj. N- i C- terminalne telopeptide (NTx i CTx). Sa starenjem koštanog tkiva, alfa forma aspartata prisutna u CTx se prevodi u beta formu (beta-CTx). U toku resorpcije kostiju beta-CTx se oslobađa u cirkulaciju i predstavlja specifičan biomarker degradacije zrelog kolagena tipa I (83). Povećani nivoi beta-CTx su detektovani u serumu osoba sa povećanom resorpcijom kostiju (84).

Beta-CTx pokazuje značajnu dnevnu varijaciju, sa najvišim vrednostima u jutarnjim časovima. U literaturi se navodi pad jutarnjih vrednosti u odnosu na podnevne i do 38% (85).

1.1.3.1. Klinički značaj beta-karboksi terminalnog dela ukrštenih veza kolagena I

Određivanje beta-CTx u serumu ima klinički značaj kod pacijenata sa različitim metaboličkim oboljenjima koštanog tkiva. Najčešće se javlja kao posledica hipertiroidizma, hiperparatiroidizma, osteoporoze, osteopenije, Paget-ove bolesti, multiplih mijeloma, metastaza na kostima ili naslednih oboljenja formiranja i remodelovanja kostiju, koje za posledicu imaju izmenjenu ravnotežu stvaranja i resorpcije kostiju (86). Takođe, beta-CTx se koristi kao pomoćni serumski biomarker u cilju praćenja antiresorptivne terapije (bifosfonati i hormonska terapija) kod žena u postmenopauzi koje leče osteoporozu ili kod osoba kod kojih je dijagnostikovana osteopenija (87). U literaturi se navodi značaj određivanja kod peridontalne destrukcije

tkiva (88). Veliki klinički značaj ima i kao pomoćni biomarker u dijagnozi različitih stanja koja su udružena sa povećanim metabolizmom kostiju.

Kod pacijenata koji uzimaju antiresorptivne lekove, poželjno je da se detektuje smanjenje serumskih nivoa beta-CTx oko 25% ispod bazne linije, 3 do 6 meseci nakon početka terapije, što ukazuje na adekvatan terapijski odgovor koštanog tkiva (87). Kod pacijenata koji su na visokim dozama biotina (> 5 mg/dan), pravilno je uzeti uzorak za analizu 8h nakon davanja poslednje doze, da bi se izbegla interferencija. Smanjena funkcija bubrega dovodi do smanjenja urinarne ekskrecije i posledično povećanja nivoa beta-CTx u serumu (89). Povećani serumski nivoi beta-CTx posledično ukazuju na povećanu resorpciju kostiju.

1.1.3.2. Određivanje beta-karboksi terminalnog dela ukrštenih veza kolagena I

Metode za određivanje beta-CTx se zasnivaju na merenju koncentracije terminalnih fragmenata proteina kolagena tip I (pg/mL). Jedna grupa autora je objavila rezultate radioimuno određivanje (*Radio Immuno Assay*, RIA) za C-terminalni telopeptid kolagena tip I (ICTP) u serumu (90). U određivanju su korišćena zečja antitela usmerena protiv ukrštenih veza ICTP koji nastaju nakon delovanja kolagenaza na koštano tkivo. Međutim, ovaj metod određivanja ima malu osetljivost na promene koje nastaju u resorpciji kostiju kao posledica osteoporoze, ali detektuje povećanje koncentracije ICTP kod mijeloma i malignih promena sa metastazama na kostima. Smatra se da je mala osetljivost posledica detektovanja aktivnosti katepsina K, koji je odgovoran za resorpciju kolagena u osteoporozi, što uzrokuje lažno niže vrednosti ICTP.

Imunoodređivanja za CTx koriste antitelo usmereno protiv sintetskog fragmenta CTx koji odgovara ostatku $\alpha_1(I)$ lanca kolagena tip I u veličini od 15 do 22 ugljenikovih atoma (EKAHD- β -GGR) (82). Ovaj region sadrži ukrštene veze hidrosilizina na 16C ostatku. Najveći broj rutinskih metoda prepoznaje beta izomer, koji nastaje u toku starenja koštanog tkiva prelaskom peptida sa α -karboksil grupe na beta-karboksi grupu. Ovim se omogućava da se meri CTx koji potiče iz zrelog kolagena, ne iz prekursornog

proteina, tako da se specifično reflektuje nivo resorpcije kostiju. Za određivanje imunohemijskim metodama, neophodno je da C-terminalni deo ne sadrži arginin (91). Beta-CTx može da se meri i u 24-časovnom urinu ELISA metodom upotrebom poliklonalnih zečjih antitela. Mada određivanje beta-CTx u 24-časovnom urinu može da ima prednosti u odnosu na određivanje u serumu, jer se prevazilazi uticaj cirkadijalnih promena i ishrane, glavni problem je sakupljanje 24-časovnog urina. Takođe test koji određuje terminalne telopeptide kolagena 1 u urinu prepoznaje samo jedan epitop 8AA peptida (92). U serumu se za merenje CTx koriste dva monoklonska ovčja antitela (91). S obzirom da svaki molekul kolagena ima dva telopeptida sa $\alpha_1(I)$ lancem, upotrebom dva antitela koja su usmerena na beta izomer, obezbeđuje se da se meri samo beta/beta forma. Ova metoda je automatizovana, tako da se koncentracija beta-CTx može određivati na imunohemijskim analizatorima korišćenjem elektrohemiluminiscentne detekcije (93).

1.1.3.3. Referentni interval

Vrednosti beta-CTx zavise od pola i od starosti. U periodu rasta i razvoja tkiva kostiju, kada je povećano remodelovanje kostiju, povećano je stvaranje ali i resorpcija kostiju, pa su vrednosti beta-CTx blago povećane. Kod muške i ženske populacije od 14. do 17. godine starosti referentne vrednosti se kreću od: 0,435–2,924 ng/mL i 0,242–1,291 ng/mL, redom (94). Kod osoba od 30. do 50. godina starosti postoje definisane referentne vrednosti po dekadama i ne razlikuju se značajno u odnosu na dekadu: 0,060–0,700 ng/mL za muškarce i 0,040–0,465 ng/mL za žene (40–49 godina života) (94). Još uvek ne postoje definisane referentne vrednosti za žene preko 50 godina. Mada veliki broj radova ukazuje na povećane vrednosti beta-CTx kao biomarkera resorpcije kostiju kod KSBB pacijenata još uvek ne postoji jasno definisana granična vrednost koja bi ukazivala na ubrzan ili usporen metabolizam kostiju (86, 95–98).

1.2. PREPORUČENI BIOMARKERI METABOLIZMA KOSTIJU

Remodelovanje koštanog tkiva je pod stalnim uticajem metabolizma kalcijuma, fosfata, magnezijuma, kao i brojnih hormona, primarno hormona paratiroidne žlezde i 1,25D. Koštano tkivo se gotovo u celosti sastoji od jona kalcijuma (90%), jona fosfata (85%) i jona magnezijuma (55%). Koncentracije jona kalcijuma, neorganskog fosfata i magnezijuma u organizmu zavise od konačnog udruženog uticaja taloženja i resorpcije minerala kostiju, intestinalne apsorpcije i ekskrecije putem bubrega. Ova tri procesa su primarno regulisana sa PTH i 1,25D.

Medicina zasnovana na dokazima je bila osnov za definisanje vodiča „*Kidney Disease Outcomes Quality Initiative*“ (KDOQI) za praćenje metabolizma i bolesti kostiju kod KSBB pacijenata (99). Vodiči preporučuju da se metabolizam kostiju prati određivanjem četiri osnovna biomarkera: ALP, jona kalcijuma, neorganskog fosfata, iPTH i 25-hidroksi vitamina D (25D).

1.2.1. UKUPAN KALCIJUM

Kalcijum je jedan od pet najznačajnijih elemenata, kao i najrasprostranjeniji katjon u ljudskom organizmu (79). Nalazi se raspoređen u tri telesna prostora: skeletu, mekim tkivima i ekstraćelijskoj tečnosti. U mekim tkivima i ekstraćelijskoj tečnosti se nalazi svega 1% telesnog kalcijuma. U skeletu se uglavnom nalazi kao ekstraćelijski kristal, hidroksiapatit $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. Skelet je glavni rezervoar koji obezbeđuje intraćelijski i ekstraćelijski *pool* kalcijuma. Intraćelijski kalcijum ima ključne uloge u važnim fiziološkim procesima, kao što su mišićne kontrakcije, sekrecija hormona, metabolizam glikogena i deoba ćelija. Kalcijum se u ćeliji nalazi u citozolu, i kada je ćelija u stanju mirovanja koncentracija je manja od 10^{-6} , što je manje od količine kalcijuma u ekstraćelijskoj tečnosti koja je oko 10^{-3} mol/L (100). U plazmi se nalazi 50% kao slobodan (jonizovani), 40% vezan za plazma proteine i 10% kompleksiran sa malim anjonima: bikarbonat, laktat, fosfat i citrat (100). Ekstraćelijski kalcijum se koristi kao prekursor za intraćelijske potrebe za kalcijumom, za mineralizaciju koštanog tkiva, za procese koagulacije krvi i za aktiviranje potencijala plazma membrane.

Kalcijum stabilise plazma-membranu ćelije kroz regulisanje procesa propustljivosti i nadražljivost. Smanjena koncentracija slobodnog kalcijuma dovodi do povećane neuromišićne nadražljivosti i tetanije, a povećana koncentracija redukuje neuromišićnu nadražljivost (100). Ukupna koncentracija u plazmi je pod kontrolom kalcijum-regulišućih hormona PTH i 1,25D.

1.2.1.1. Klinički značaj ukupnog kalcijuma

Poremećaj metabolizma kalcijuma se ogleda u smanjenju ili povećanju koncentracije ukupnog kalcijuma, što dovodi do hipokalcemije ili hiperkalcemije.

Nizak nivo ukupnog kalcijuma u serumu (hipokalcemija) je najčešće posledica smanjenja kalcijuma koji je vezan za albumin ili smanjenja slobodnog kalcijuma (101). Najčešći uzrok pseudohipokalcemije (smanjenje ukupnog kalcijuma, a nivo slobodnog je nepromenjena) je hipoalbuminemija, zato što 10 g/L albumina vezuje oko 0,2 mg/dL kalcijuma. Stanja udružena sa smanjenom koncentracijom albumina u serumu su hronična bolest jetre, nefrotski sindrom, kongestivna srčana slabost i malnutricija. Najčešći uzrok hipokalcemije je hronična bolest bubrega i hipomagnezijemija. U hroničnoj bolesti bubrega hipokalcemiji doprinose hipoproteinemija, hiperfosfatemija, nizak nivo 1,25D (smanjena sinteza zbog neadekvatne funkcionalne mase bubrega) i smanjen odgovor koštanog tkiva na dejstvo PTH. Smanjenje kalcijuma dovodi do smanjenja magnezijuma koji posredno smanjuje sekreciju ovog kalcijum-regulatornog hormona (102). Hipoparatiroidizam je najčešće posledica oštećenja paratiroidnih žlezda u toku hiruških zahvata na vratu (90%) ili ređe idiopatski. Pseudohipoparatiroidizam je biohemijski sličan hipoparatiroidizmu, ali pacijenti imaju nasledno povećane koncentracije PTH ali odsustvo odgovora na dejstvo ovog hormona (103). Za najčešći oblik, pseudohipoparatiroidizam tip I (Albrajt-ova nasledna osteodistrofija), molekularna osnova je smanjenje aktivnosti guanin nukleotid regulišućeg kompleksa, G_s , koji je usko povezan sa kompleksom adenilat ciklaze.

Kod hospitalizovanih pacijenata, akutna simptomatska hipokalcemija može da nastane iz više razloga. Brza remineralizacija koštanog tkiva nakon hiruškog zahvata zbog primarnog hiperparatiroidizma (sindrom gladnih kostiju), lečenje hipertiroidizma ili hematoloških maligniteta mogu dovesti do hipokalcemije. Hipokalcemija dodatno komplikuje akutne hemoragije ili edematozni pankreatitis. Takođe, hipokalcemija se javlja i u slučaju deficita vitamina D, zbog smanjene intestinalne apsorpcije kalcijuma i izostanka odgovora koštanog tkiva na dejstvo PTH (104).

Klinički se hipokalcemija ispoljava najčešće kao neuromuskularna hiperekscitabilnost, u obliku tetanije, paresteze i iznenadnog napada (100). Naglo smanjenje kalcijuma može biti udruženo sa hipotenzijom i elektrokardiografskim abnormalnostima. Kod simptomatske hipokalcemije, kalcijum se daje intravenski, a ako je hipokalcemija sekundarna kao posledica hipoparatiroidizma ili pseudohipoparatiroidizma, oralno se daju vitamin D i suplementi kalcijuma.

Određivanjem serumskog kalcijuma, albumina i magnezijuma procenjuje se funkcija bubrega. Pacijenti koji imaju hipoparatiroidizam imaju niske ili neodgovarajući normalne koncentracije iPTH, dok je vrednost ovog kalcijum-regulišućeg hormona povećana u slučaju pseudohipoparatiroidizma, ali i u slučaju sekundarnog hiperparatiroidizma, kojeg prati nizak nivo 25D i visok nivo ALP (103).

Hiperkalcemija nastaje kada je priliv kalcijuma u ekstraćelijsku tečnost iz koštanog tkiva, intestinalnog trakta ili bubrega veći od gubitka kalcijuma (105). Ovo se dešava kada povećana resorpcija koštanog tkiva kao posledica maligniteta dovodi do hiperkalciurije. Kada se prevaziđe kapacitet bubrega da sekretuje filtrirani kalcijum, razvija se hiperkalcemija. Hiperkalcemija nastaje i kada je povećana intestinalna apsorpcija kalcijuma kao posledica intoksikacije vitaminom D, kada je povećano zadržavanje kalcijuma na nivou bubrega kod terapije tiazidnim diureticima, kada je povećana resorpcija kostiju zbog imobilizacije, ili kombinovanim mehanizmima kod primarnog hiperparatiroidizma (106). Iako postoji veliki broj različitih etiologija hiperkalcemije, primarni hiperparatiroidizam je najčešći kod ambulantnih pacijenata, dok su kod hospitalizovanih pacijenata uzroci povećanju kalcijuma prisutni maligniteti.

Ova dva poremećaja čine 90% do 95% svih uzroka hiperkalcemije (107). Primarni hiperparatiroidizam se karakteriše povećanom sekrecijom PTH što rezultuje hiperkalcemijom. U 80% do 85% slučajeva posledica povećane sekrecije PTH su izolovani adenomi, oko 15% čini hiperplazija ćelija paratiroidne žlezde, a manje od 1% je zbog karcinoma paratiroidne žlezde. Takođe, preko 60% pacijenata sa primarnim hiperparatiroidizmom su žene u postmenopauzi.

Određivanjem kalcijuma otkriva se više od 80% pacijenata sa hiperparatiroidizmom detektuje u ranoj fazi bolesti, kada najčešće nisu prisutni simptomi, koji su uglavnom nespecifični i povezani sa neuromuskularnim sistemom. Karakterišu se zamorom, slabošću i malaksalošću sa blagom hiperkalcemijom. Kalcijum obično ne prelazi 3 mmol/L (105). Takođe se javlja depresija, apatija i gubitak koncentracije. Hiperkalcemija može da dovede do blagog nefrogenog dijabetes insipidusa sa povećanim osećajem žeđi, polidipsijom i poliurijom. Hronična hiperkalcemija i hiperkalciurija mogu da dovedu do stvaranja kamena u bubregu što je uzrok bubrežnih kolika. Nefrokalkuloze dovode do sporog razvoja slabosti bubrega, a često se javlja i osteoporoza.

Udruženo određivanje iPTH i ukupnog kalcijuma je najspecifičniji i najosetljiviji test za definisanje funkcije paratiroidne žlezde i diferencijalnu dijagnozu hiperkalcemije (108). Serumski nivo 1,25D je najčešće u gornjem opsegu referentnog intervala ili povećan u slučaju primarnog hiperparatiroidizma, zato što PTH stimuliše stvaranje 1,25D (106). Suprotno, u slučaju neparatiroidne hiperkalcemije, nivoi PTH i 1,25D su normalni ili niski. Kada su prisutna granulomatozna oboljenja kao sarkoidoza ili limfomi koncentracija 1,25D je povišena zato što obolela tkiva sadrže 25-hidroksivitamin D-1 α -hidroksilazu koja je neophodna za stvaranje 1,25D (109).

U hiperkalcemiji sa hiperparatiroidizmom javlja se blaga hiperhloremijska metabolička acidoza, a u slučaju neparatiroidne hiperkalcemije, dolazi do blage hipohloremijske metaboličke alkaloze (108). Mada se u hiperparatiroidizmu javlja često hipofosfatemija, određivanje fosfata u serumu ima ograničen dijagnostički značaj zbog hipofosfatemije koja postoji kod pacijenata sa kanceromatoznim promenama koje kao posledicu imaju

hiperkalcemiju. Hiperkalcemija postoji kod 10% do 20% pacijenata sa kancerima (110). Tumori dovode do hiperkalcemije stvarajući peptid koji je sličan sa PTH (PTHrP), koji se sekretuje u cirkulaciju i stimuliše resorpciju koštanog tkiva ili zbog fizičkog oštećenja koštanog tkiva usled pojave metastaza na kostima. PTHrP se vezuje za PTH receptore, imitira delovanje PTH i osnovni je posrednik hiperkalcemije u malignitetu. Citokini kao što su limfotoksin, interleukin-1, faktor nekroze tumora (TNF) i PTHrP su značajni medijatori hiperkalcemije u multiplim mijelomima i nekim hematološkim malignitetima. Neki limfomi udruženi sa stečenim sindromom imunodeficijencije uzrokuju hiperkalcemiju stvaranjem 1,25D. Literaturni podaci pokazuju da 5% pacijenata sa hiperkalcemijskim kancerom imaju udruženi primarni hiperparatiroidizam (111).

Pacijentima sa primarnim hiperparatiroidizmom, sa znacima i simptomima hiperkalcemije se hiruški uklanja paratiroidna žlezda. Ako je pacijent bez simptoma, prate se serumski nivoi kalcijuma, klirens kreatinina, kalcijum u urinu i gustina kostiju (112). Kod pacijenata sa malignitetima, znaci i simptomi hiperkalcemije su lako uočljivi, zato što su nivoi kalcijuma u brzom porastu i preko nivoa koji se očekuju kod primarnog hiperparatiroidizma (111). Kao dodatni simptomi, javljaju se i letargija, mučnina i povraćanje.

Lečenje je usmereno na smanjenje serumskog kalcijuma diureticima, smanjenje osteoklastne resorpcije ili na upotrebu steroida koji redukuju intestinalnu apsorpciju kalcijuma kod 1,25D-posredovane hiperkalcemije (112).

1.2.1.2. Određivanje ukupnog kalcijuma

Metode koje se koriste za kvantifikovanje kalcijuma mere slobodni (jonizovani) kalcijum ili ukupan kalcijum. Uzimajući u obzir da je kalcijum jonizovan bilo u slobodnoj formi bilo da je jonskim vezama spojen za proteine ili male anjone, odgovarajući naziv bi bio slobodan kalcijum, analogno slobodnim hormonima (npr. slobodnom tiroksinu ili slobodnom testosteronu) (113). Mada se slobodan kalcijum

smatra najboljim indikatorom statusa kalcijuma u organizmu, jer je biološki aktivan i dobro regulisan sa PTH i 1,25D, literaturni podaci pokazuju da ukupan kalcijum ima jako dobar klinički značaj i da ne može u potpunosti biti zamenjen određivanjem slobodnog kalcijuma (114).

U kliničkim laboratorijama se za merenje serumskog kalcijuma koriste fotometrijska metoda, metoda koja koristi jon selektivnu elektrodu (ISE) i po potrebi atomska apsorpciona spektrometrija (115). Spektrofotometrijsko merenje se izvodi uz upotrebu metalohromnih indikatora ili boja. Najčešće se koriste o-krezolftalein kompleksom ili arsenazo III koji selektivno vezuju kalcijum. Mada je atomska apsorpciona spektrofotometrija tačnija i preciznija, spektrometrija je automatizovana i praktičnija za rutinske potrebe.

1.2.1.3. Korigovanje koncentracije ukupnog kalcijuma

Činjenica da na koncentraciju ukupnog kalcijuma utiče nivo serumskih proteina, posebno albumina i organskih i neorganskih anjona, razvijen je koncept prilagođene ili korigovane koncentracije serumskog kalcijuma (116). Iako je predložen veliki broj jednačina za korigovanje ukupnog kalcijuma, u kliničkoj praksi se najčešće koriste one koje koriste koncentraciju albumina. Problem je da se usklade metode za određivanje albumina i kalcijuma, kao i populacione razlike pacijenata u nivoima ova dva biomarkera. Iako je korekcija ukupnog kalcijuma za vrednosti albumina našla klinički značaj kod pacijenata sa bolestima jetre i niskim nivoima ukupnih proteina, kod pacijenata sa hroničnom slabošću bubrega nije od velikog kliničkog značaja (117).

1.2.1.4. Referentni interval

Vrednosti kalcijuma u serumu zavise od unosa hranom, ali i od metode određivanja. Neki radovi pokazuju različite vrednosti serumskog kalcijuma u zavisnosti od pola i godina starosti (118). Referentni interval kalcijuma u serumu i plazmi je od 2,12–2,20

mmol/L do 2,54–2,57 mmol/L. Sadašnje metode su jako precizne, dostižu KV od 1,5% iz dana u dan, pa čak i manje.

1.2.1.5. Preporuke KDOQI vodiča

Kod KSBB pacijenata i pacijenata na dijalizi nivoi kalcijuma zavise od unosa soli kalcijuma (Ca-acetat, Ca-karbonat, Ca-citrat, Ca-acetat/Mg karbonat), koji vezuju fosfate, ali i od unosa oralnih vitamin D sterola. Takođe, kod pacijenata na dijalizi, serumski nivoi zavise i od nivoa kalcijuma u dijalizatu. Preporuke su da kod pacijenata koji primaju kalcijumske vezivače fosfata, ciljna vrednost koncentracije kalcijuma u dijalizatu bude 2,50 mEq/L (1,25 mmol/L) (119, 120). Takođe, kod pacijenata koji u terapiji koriste jedinjenja koja vezuju fosfate bez kalcijuma (aluminijum hidroksid, aluminijum karbonat, sevelamer HCl), ciljne vrednosti kalcijuma u dijalizatu treba da bude 2,50–3,00 mEq/L (1,25–3,00 mmol/L) na osnovu serumskih nivoa kalcijuma i potrebe za terapijom aktivnim vitamin D sterolima (119, 120). Preporuke su da se nivoi kalcijuma kod KSBB pacijenata i pacijenata na dijalizi održavaju u referentnom intervalu, a koncentracije kalcijuma određuju na svakih 1 do 3 meseca.

1.2.2. NEORGANSKI FOSFAT

Organizam odrasle osobe sadrži u proseku oko 600 g (19,4 mola) fosfora koji se nalazi u obliku neorganskih i organskih fosfata, od čega je 85% sastavni deo koštanog tkiva, dok se ostatak nalazi u sastavu mekih tkiva (121). Mada se u organizmu nalaze dva oblika fosfora, samo se neorganski fosfat može meriti. Neorganski fosfat se nalazi u obliku monovalentnih (H_2PO_4^-) i dvovalentnih (HPO_4^-) fosfatnih anjona. Odnos ova dva oblika anjona zavisi od pH i iznosi oko 1:1 u acidozi, 1:4 na pH = 7,4 i 1:9 u alkaloziji. Oko 10% fosfata u serumu je vezano za proteine; 35% u kompleksu sa kalcijumom, natrijumom, magnezijumom, a ostatak, što je oko 50% se nalazi u slobodnom obliku. Estri organskog fosfata se primarno nalaze u ćelijskim elementima krvi.

Neorganski fosfat je glavna komponenta hidroksiapatita u kostima, koji ima značajnu ulogu u održavanju ekstraćelijskog i intraćelijskog pool-a fosfata. U mekim tkivima se fosfat nalazi u ćeliji uglavnom kao organski fosfat koji ulazi u sastav nukleinskih kiselina, fosfolipida, fosfoproteina i visoko-energetskih jedinjenja koja učestvuju u metabolizmu. Adenozin trifosfat, kreatinin fosfat i drugi fosfati, učestvuju u fiziološkim procesima u organizmu koji su energetski-zavisni, kao što su kontrakcije mišića, neurološke funkcije i transport elektrolita. Fosfat je osnovni element cikličnih nukleotida, kao što je ciklični adenozin monofosfat i nikotinamid-adenin dinukleotid fosfat. Takođe, fosfor je važan za aktivaciju nekoliko enzima: adenilat ciklaza, 25-hidroksi-D-1 α -hidroksilaza i enzimi koji posreduju u sintezi 2,3-difosfoglicerata, koji reguliše afinitet hemoglobina prema kiseoniku. Intraćelijski fosfor posreduje u regulaciji intermedijarnog metabolizma proteina, masti i ugljenih hidrata, kao i u genskoj transkripciji i rastu ćelija (121).

1.2.2.1. Klinički značaj neorganskog fosfata

Poremećaj metabolizma fosfata se ogleda u smanjenju ili povećanju koncentracije fosfata, što dovodi do hipofosfatemije ili hiperfosfatemije. Hipofosfatemija predstavlja koncentraciju neorganskog fosfata u serumu ispod donje granice referentnog intervala, koja je obično $< 0,81$ mmol/L, a uobičajena je kod hospitalizovanih pacijenata (oko 2%) (122). Smanjenje neorganskog fosfata ne mora biti povezano sa gubitkom intraćelijskog fosfata, tako da može doći i do gubitka fosfata iz ćelija, a da koncentracije u serumu budu normalne ili blago povećane. Osnovni uzrok hipofosfatemije može biti prelazak ekstraćelijskog fosfata u ćeliju, gubitak fosfata putem bubrega, smanjena intestinalna absorpcija fosfata i gubitak intraćelijskog fosfata.

Kod pacijenata sa primarnim ili sekundarnim hiperparatiroidizmom, dolazi do izrazitog povećanja sekrecije PTH, što smanjuje sposobnost bubrega da zadržava fosfate i rezultuje gubitkom fosfata (123). Takođe, pacijenti koji su na terapiji antacidima koji sadrže aluminijum i magnezijum mogu da razviju hipofosfatemiju, zbog vezivanja fosfata u intestinalnom traktu i sprečavanja absorpcije fosfata (124).

Klinička manifestacija hipofosfatemije zavisi od stepena gubitka fosfata. Blaga hipofosfatemija (0,48 do 0,77 mmol/L) obično nije udružena sa kliničkim znacima i simptomima, izuzev kod pacijenata sa osteomalacijom i rahitisom koje su posledica hroničnog gubitka fosfata (122). Serumski fosfat manji od 0,48 mmol/L dovodi do mišićne slabosti, akutne respiratorne slabosti, smanjene sposobnosti srčanog mišića da izbacuje krv iz pretkomora. Pri jako niskim vrednostima fosfata ($< 0,32$ mmol/L) dolazi do rabdomiolize, povećanog afiniteta hemoglobina za kiseonik, tj. hipoksije, zbog smanjenog stvaranja 2,3-difosfoglicerata, a $< 0,16$ mmol/L fosfata dovodi do jake hemolize, mentalne konfuzije i kome (122).

Hiperfosfatemija se najčešće javlja sekundarno kao posledica nesposobnosti bubrega da ekskretuju fosfat. Kod akutne ili hronične slabosti bubrega, smanjenje brzine glomerularne filtracije redukuje ekskreciju fosfata bubregom, što dovodi do hiperfosfatemije. Brzo povećanje serumskog fosfata je udruženo sa hipokalcemijom. Posledično se javljaju tetanija, osećaj trnjenja i hipotenzija. Dugotrajna hiperfosfatemija je najčešće udružena sa sekundarnim hiperparatiroidizmom, osteitis fibrozom i kalcifikacijom mekih tkiva bubrega, krvnih sudova, kornee, kože i periartrikularnog tkiva. Kod KSBB pacijenata koji imaju hipoparatiroidizam terapijski pristup je prvenstveno usmeren na smanjenje unosa fosfata hranom, kao i vezivača fosfata (npr. kalcijum karbonata) (125, 126).

1.2.2.2. Određivanje neorganskog fosfata

Metoda koja se najčešće koristi zasniva se na reakciji jona fosfata sa amonijum molibdatom do stvaranja kompleksa fosfomolibdata čiji se intenzitet meri spektrofotometrijski na 340 nm (127). Za formiranje kompleksa neophodan je kiseli pH, kao i odgovarajuća koncentracija proteina, da ne bi došlo do precipitacije. Koristi se veliki broj redukujućih supstanci.

Druge metode koriste vanadat za spektrofotometrijsko merenje ili se zasnivaju na enzimskom određivanju na neutralnom pH čime se izbegava problem adekvatnog

stvaranja kompleksa fosfata i boje (128). U enzimskim metodama se kao enzimi koriste: glikogen fosforilaza, fosfoglukomutaza i glukoza-6-fosfat dehidrogenaza, a prati se formiranje redukovane forme nikotinamid-adenin dinukleotid fosfata (NADPH), purin nukleozid fosforilaza i ksantin oksidaza kojim se meri stvaranje vodonik peroksida i hromogeni supstrat i sukroza fosforilaza, fosfoglukomutaza i glukoza-6-fosfat dehidrogenaza, a meri se formiranje NADPH (129).

1.2.2.3. Referentni interval

Koncentracije serumskog fosfata zavise od starosti, pa su kod odraslih osoba od 0,81 do 1,45 mmol/L, a kod dece od 1,29 do 2,26 mmol/L (118). Za oko 50% su veće koncentracije fosfata kod novorođenčadi i opadaju u toku detinjstva, kao posledica efekta hormona rasta da poveća bubrežni prag za fosfate. Serumske koncentracije se starenjem kod osoba ženskog pola ne menjaju, dok se kod starijih muškaraca smanjuju. Zbog dnevne varijacije u nivoima serumskog fosfata, preporučeno je određivanje jutarnjih koncentracija. Koncentracije su više u popodnevnom i večernjim satima, a zavise od unosa hranom i od vežbanja.

1.2.2.4. Preporuke KDOQI vodiča

Kod predijaliznih pacijenata i pacijenata na dijalizi preporuka je da se serumski neorganski fosfat održava u uskom opsegu od 1,13 do 1,78 mmol/L (130, 131). Takođe, preporuke su da se povećani nivoi neorganskog fosfata kod ovih pacijenata, smanjuju do normalnih preporučenih vrednosti, upotrebom jedinjenja koja vezuju fosfate. Odabir jedinjenja koja vezuju fosfate zavisi od stadijuma bubrežne slabosti, dodatne terapije i eventualnih sporednih efekata, kao i prisustva drugih poremećaja u sklopu metaboličke bolesti bubrega. Takođe, preporuke su da se ograniči upotreba jedinjenja koja sadrže kalcijum, kao i upotreba kalcitriola i analoga vitamina D, a da se obezbedi povećano uklanjanje fosfata dijalizom, posebno kada su nivoi iPTH konstantno niski (< 150 pg/mL), a da se koncentracije neorganskog fosfata određuju na svaka 1 do 3 meseca.

1.2.3. PROIZVOD KALCIJUM-FOSFOR

Davne 1917. godine američki naučnik Karl Binger (132) je pokazao da infuzija fosfata kod pasa dovodi do tetanije, po prvi put pokazujući inverzan odnos cirkulišućeg fosfata i kalcijuma. Prvobitni radovi o formiranju koštanog tkiva su kao osnovnu pretpostavku koristili činjenicu da se kalcijum i fosfor talože (133–135). Nekoliko godina kasnije je objavljen rad koji ukazuje da je Ca-P proizvod (CaxP) manji od $2,8 \text{ mg}^2/\text{dL}^2$ udružen sa pojavom rahitisa kod dece i kod eksperimentalnih pacova, a da su ove promene na kostima potpuno odsutne ukoliko je CaxP veći od $3,2 \text{ mg}^2/\text{dL}^2$ (136). Ovo je očekivana sekundarna reakcija koštanog tkiva na promene odnosa kalcijuma i fosfora, što je u skladu sa formiranjem CaHPO_4 i regulisano stvaranjem rastvorljivih Ca^{2+} i HPO_4^- , što je nekoliko studija potvrdilo (137–139). Literaturni podaci u tom periodu ukazuju da dodatak fosfata u humani serum u *in vitro* uslovima, ili intravenska infuzija fosfata kod životinja, takođe održavaju nivoe CaxP stalnim, zbog rastvorljivosti CaHPO_4 (140, 141). Tek se u poslednjih dvadesetak godina razvio koncept o CaxP kao klinički značajnom biomarkeru, i prihvaćen je prvobitno od strane epidemiologa, koji su pokazali da postoji korelacija između CaxP i ishoda KSBB pacijenata (142–147). Mada neki radovi navode da vaskularna kalcifikacija postoji i u odsustvu hiperkalcemije i hiperfosfatemije, vodiči za ishod pacijenata sa bubrežnim bolestima zasnovani na dokazima su uveli CaxP kao biomarker koji može da pomogne u definisanju ektopične kalcifikacije kod predijaliznih pacijenata i pacijenata na dijalizi (98). Preporuke su da kod PreD pacijenta i pacijenata na dijalizi vrednosti CaxP treba održavati ispod $4,6 \text{ mmol}^2/\text{L}^2$, održavanjem nivoa kalcijuma i fosfata u serumu u granicama normale (98). Potrebno je da budući radovi objasne da li CaxP treba posmatrati kao nezavisan faktor rizika ili je pristup ektopičnoj kalcifikaciji pojednostavljen i naučno nedosledan.

1.2.4. MAGNEZIJUM

Magnezijum je četvrti po redu najzastupljeniji katjon u organizmu čoveka i drugi najznačajniji intraćelijski katjon. Ukupna količina magnezijuma je oko 25 g (1,03 mola), od koje se 55% nalazi u koštanom tkivu (148). Jedna trećina iz kostiju služi kao skladište za razmenjivi magnezijum pomoću kojeg se održava konstantna koncentracija

izvan ćelije. Oko 45% magnezijuma se nalazi unutar ćelije, što je oko 1–3 mmol/L. Povećanje koncentracije magnezijuma, prati povećanje metaboličke aktivnosti ćelije. Unutar ćelije većina magnezijuma je vezana za proteine i negativno naelektrisane molekule, 80% u citozolu je vezan za ATP, a Mg-ATP je supstrat za preko 300 enzima i enzimskih sistema (adenilat ciklaza, Na⁺-K⁺-adenozin trifosfat (ATP-aza), Ca²⁺-ATP-aza, fosfofruktokinaza i kreatin kinaza), kao i guanin nukleotid regulatornih proteina G_s i G_i (148). Magnezijum je važan u procesima oksidativne fosforilacije, glikolize, replikacije ćelije, metabolizma nukleotida i biosinteze proteina. Takođe se smatra prirodnim antagonistom kalcijuma jer antagonizuje dejstvo kalcijuma, vezujući se za ćelijske membrane i proteine, regulišući transport elektrolita (148).

Takođe se magnezijum nalazi u jedru, mitohondrijama i endoplazmatskom retikulumu u značajnom procentu. Oko 0,5–5,0% ukupnog magnezijuma cirkuliše slobodno (148). Transport kroz ćelijsku membranu je regulisan specifičnim Mg-transportnim sistemom. Vanćelijski magnezijum sadrži oko 1% ukupnog magnezijuma iz organizma. Oko 55% je slobodno, 30% vezano za proteine (primarno albumin), a oko 15% je kompleksirano sa fosfate, citrate i druge anjone. Jedna od najznačajnijih uloga je u regulaciji neuromuskularne ekscitabilnosti i regulaciji kontrakcije i relaksacije mišića. Važna uloga je regulacija vaskularnog tonusa, srčanog ritma, arterijskog pritiska i periferne cirkulacije, kao i regulacija funkcije trombocita. Takođe, posreduje u inhibiciji insulinske rezistencije, smanjenju aritmija i redukciji procesa osteoporoze (149, 150).

Homeostaza magnezijuma u organizmu zavisi od ravnoteže između apsorpcije GIT-om iz hrane, renalne ekskrecije i puferske funkcije koštanog tkiva. Centralni organ u regulaciji homeostaze magnezijuma je bubreg (148). Oko 80% se iz plazme filtrira kroz glomerul, 20% reapsorbuje u proksimalnom tubulu, a 70% se reapsorbuje u tankom ascedentnom delu tubula pasivnim paraćelijskim mehanizmom. Ostalih 10% se apsorbuje aktivnim transćelijskim mehanizmom u distalnom uvijenom delu tubula. Samo 3–5% se izlučuje urinom. Aktivna reapsorpcija zavisi od koncentracija unutar i van ćelije, acidobazne ravnoteže, korišćenja estradiola, ciklosporina i tiazidnih diuretika. Povećani unos žitarica iz hrane povećava pH urina, tj. smanjuje kiselost, ali dovodi do povećanog zadržavanja magnezijuma preko bubrega. Sa druge strane unos

mesa i mlečnih proizvoda povećava kiselost urina, ali povećava i apsorpciju magnezijuma iz intestinalnog trakta.

1.2.4.1. Klinički značaj magnezijuma

Poremećaj metabolizma podrazumeva nedostatak (hipomagnezijemiju) ili povećanu koncentraciju magnezijuma (hipermagnezijemiju). Hipomagnezijemija je česta u bolničkim uslovima (10% pacijenata na prijemu, kao i 65% pacijenata u jedinicama intenzivne nege) kao posledica gubitka putem GIT-a ili putem bubrega (152). Gubitak preko bubrega je udružen sa povećanim gubitkom kalcijuma. Nedostatak je obično sekundarna promena, pa može biti zamaskirana postojanjem primarne bolesti ili usled delovanja nekog leka. Usled ovoga javlja se povećana nadražljivosti mišića, tetanija ili osećaj oduzimanja. Međutim, ovi simptomi se javljaju i u slučaju hipokalcemije koju često prati hipomagnezijemija. Mada je hipomagnezijemija uglavnom prolazna, nedostatak magnezijuma slabi sekreciju PTH i dovodi do neosetljivosti bubrega i koštanog tkiva na dejstvo PTH (102).

Hipermagnezijemija retko postoji zbog intoksikacije, ali je čest poremećaj u bolničkim uslovima (153). Simptomatska hipermagnezijemija je najčešće posledica povećanog unosa antacida, sredstva za klistiranje ili parenteralnih tečnosti koje sadrže ovaj mineral. Kod pacijenata koji imaju istovremeno oslabljenu funkciju bubrega, a samim tim ograničenu sposobnost bubrega da izluče višak magnezijuma, dolazi do izražene hipermagnezijemije. Ako vrednosti prelaze 2–3 mmol/L mogu da se jave znaci, letargije, pospanosti i hiporefleksije (153). Kod trudnica sa hipertenzijom (preeklampsija i eklampsija) magnezijum se koristi kao standardna terapija što može uzrokovati intoksikaciju majke i ploda magnezijumom (154). Hipermagnezijemija uzrokuje smanjenje koncentracije kalcijuma u serumu, najverovatnije zbog inhibicije PTH sekrecije, ali i smanjenja dejstva PTH na ciljnim organima (102). Međusoban odnos kalcijuma, magnezijuma i PTH je kompleksan, ali još uvek nema dovoljno kliničkih studija koje bi jasno objasnile evidentan uticaj visokih koncentracija magnezijuma na supresiju PTH nivoa.

Kod KSBB pacijenata koji funkciju bubrega održavaju dijalizom zbog smanjenog uklanjanja fosfata javlja se hiperfosfatemija. Razvijen je veliki broj jedinjenja koja vezuju fosfate od kojih se u velikoj meri koristio magnezijum hidroksid (155, 156). Mada su prvobitna klinička ispitivanja ukazivala da kod pacijenata koji primaju magnezijum hidroksid dolazi do razvoja neželjenih efekata na GIT, utvrdilo se da je u odnosu na druga jedinjenja koja vezuju fosfate koji sadrže metale ili polimer, siguran, efikasan i jeftin, ali i da smanjuje pojavu kardiovaskularnih oboljenja. Kod pacijenata sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom hipermagnezijemija najčešće nastaje zbog intoksikacije terapijom, a blago povećanje koncentracije magnezijuma ukazuje da treba prekinuti terapiju. Smatra se da snižene koncentracije mogu biti faktor rizika za česte i jake glavobolje kod pacijenata na dijalizi (157, 158). Kod pacijenata na dijalizi nivo magnezijuma se može regulisati smanjenjem njegove koncentracije u dijalizatu. Jedna Japanska studija na velikom broju pacijenata sa KSBB na hemodijalizi je pokazala da je centralna vrednost magnezijuma bila u gornjem delu referentnog opsega, mada je dobijena normalna raspodela (159). Koncentracije magnezijuma u donjem delu referentnog intervala kod KSBB pacijenata i pacijenata na dijalizi su tesno povezane sa vaskularnom kalcifikacijom i kardiovaskularnom smrtnošću (159). Međutim, postoje literaturni podaci koji ukazuju na činjenicu da bi optimalne količine magnezijuma sprečile gubitak mineralne gustine koštanog tkiva (160).

1.2.4.2. Određivanje magnezijuma

Koncentracije magnezijuma u serumu su se određivale velikim brojem različitih tehnika (fluorimetrija, plamena emisiona spektroskopija, jon selektivna elektroda i atomska apsorpciona spektrometrija), ali se danas u kliničkim laboratorijama najčešće koriste fotometrijske metode, iako se smatra da je atomska apsorpciona spektrometrija referentna metoda. Za fotometrijsko određivanje koriste se metalohromni indikatori koji menjaju boju prilikom selektivnog vezivanja za magnezijum (161). Najčešće se koriste kalmagit (1-(1-hidroksi-4-metil-2-fenilazo)-2-naftol-4-sulfonska kiselina), formazan (1,5-bis(3,5-dihloro-2-hidroksifenil-3-formazan karbonitril), metiltimol plavo, magon i ksilidil plavo (1-azo-2-hidroksi-3-(2,4-dimetilkarboksanilido)-naftalen-1'-(2-hidroksibenzen), metalohromne boje koja formiraju obojen kompleks sa magnezijumom

u alkalnoj sredini, čija se apsorbanacija meri na različitim talasnim dužinama. Interferencu kalcijuma redukuje specifični kalcijum-helirajući agens EGTA (161). Takođe, stvaranje teških metalnih kompleksa se sprečava dodavanjem kalijum cijanida i polivinilpirolidona, a interferencija proteina i lipemije se uklanja dodavanjem polivinilpirolidona.

1.2.4.3. Referentni interval

Referentni interval za magnezijum zavisi od metode i aparata na kom se određuje, a serumske koncentracije se kreću u opsegu od 0,7 do 1,15 mmol/L (118). Sadržaj u eritrocitima je oko tri puta veći od serumskih vrednosti. Mada se dnevne potrebe razlikuju u odnosu na pol i godine starosti, još uvek su u upotrebi jedinstvene referentne vrednosti za koncentracije magnezijuma u serumu. Preporuka za KSBB pacijente je da se koncentracije magnezijuma održavaju u granicama normale (156).

1.2.5. INTAKTNI PARATIROIDNI HORMON

Paratiroidni hormon je pored 1,25-dihidroksi vitamin D (1,25D) primarni hormon koji reguliše metabolizam minerala i kostiju. PTH sintetišu i sekretuju paratiroidne žlezde, dve donje i dve gornje, locirane bilateralno na ili blizu kapsule tiroidne žlezde (162). PTH sekretuju glavne ćelije, koje pored oksifilnih ćelija ulaze u sastav paratiroidnih žlezda. Koncentracija PTH u plazmi zavisi od sinteze i sekrecije ovog hormona od strane paratiroidnih žlezda, kao i od metabolizma i izlučivanja putem jetre i bubrega. Svoje direktno dejstvo PTH ostvaruje na kosti i bubrege, dok indirektno deluje na nivou gastrointestinalnog trakta, reguliše nivo kalcijuma i fosfata u plazmi.

PTH se sintetiše kao prekursor, pre-pro-PTH, koji sadrži 115 aminokiselina. U transportu PTH iz endoplazmatskog retikuluma do mesta skladištenja u paratiroidnim žlezdama učestvuje amino(N)-terminalni hidrofobni kraj svojom "pre" ili vodećom sekvencom od 25 aminokiselina. "Pre" i "pro" N-terminalni kraj koji sadrži 6 aminokiselina se enzimskim putem odvajaju u toku intraćelijske obrade, a pre

pakovanja u Goldžijev aparat. Sve ovo kao posledicu ima formiranje iPTH koji sadrži 84 aminokiseline, molekulske mase od 9425 kD. Formirani iPTH se sekretuje, čuva ili razgrađuje unutar ćelija. Za razliku od proinsulina, proPTH se ne sekretuje i ne cirkuliše tako da se ne može izmeriti.

Za biološku aktivnost iPTH odgovorna je prva trećina N-terminalnog regiona aminokiselinskog lanca ove molekule (162). Sintetisan je PTH(1-34) koji je iste aktivnosti kao iPTH(1-84) u interakciji sa PTH/PTHrP receptorom (tip 1 PTH receptor). Kao posledica aktivnosti iPTH na nivou koštanog tkiva i bubrega dolazi do povećanja koncentracije kalcijuma u plazmi i do pojačanog izlučivanja fosfora urinom. Oksidacija ostataka aminokiseline metionin na poziciji 8 ili 18 dovodi do gubitka biološke aktivnosti. PTH sadrži veliki broj baznih aminokiselina. Središnji deo molekula PTH je imunogen zbog hidrofobnosti i specifičnosti.

Primarni akutni fiziološki regulator sinteze, metabolizma i sekrecije PTH je koncentracija slobodnog kalcijuma u krvi ili ekstraćelijskoj tečnosti (163). Kalcijum osetljivi receptori na plazma membrani paratiroidnih ćelija reaguju na promenu koncentracije kalcijuma ekstracelularno i aktiviraju intraćelijske procese koje vode oslobađanju slobodnog kalcijuma putem kalcijumskih kanala. Povećanje ekstraćelijskog kalcijuma inhibira PTH sintezu i sekreciju i povećava metabolizam PTH, dok smanjenje ima suprotan efekat. Posledica ovoga je inverzan sigmoidalan odnos između sekrecije PTH i slobodnog kalcijuma. Kod zdrave osobe maksimalna sekrecija i supresija PTH se postiže blagom hipokalcemijom, odnosno blagom hiperkalcemijom. U zavisnosti od fiziološkog ili patološkog procesa, kao i od individualnih karakteristika osobe, srednja vrednost sigmoidalnog odnosa kalcijuma i PTH je ona koncentracija kalcijuma pri kojoj se postiže polovina maksimalne sekrecije PTH (163).

Sinteza i sekrecija PTH zavisi i od 1,25D, fosfora i magnezijuma (162). 1,25D interaguje sa receptorima za vitamin D na paratiroidnim žlezdama u cilju hronične supresije PTH sinteze, tako što se sprečava transkripcija PTH gena, a posledično i sekrecija (164). Hiperfosfatemija i hipofosfatemija posledično povećavaju i smanjuju sintezu i sekreciju PTH. Literaturni podaci ukazuju na uticaj samo jako visokih ili

niskih koncentracija magnezijuma na sekreciju PTH, dok blage promene ovog minerala nemaju značajnu ulogu u metabolizmu PTH (102, 165). Hronične izrazite hipomagnezijemije, kao u slučaju alkoholizma, smanjuju sekreciju PTH, dok akutna hipomagnezijemija može stimulisati sekreciju PTH. Hiper­magnezijemija suprimira oslobađanje PTH preko kalcijum-osetljivih receptora, iako manje delotvorno nego sam kalcijum.

Regulacija hemostaze kalcijuma i fosfora od strane PTH odvija se direktnim delovanjem ovog hormona na bubrege i koštano tkivo, a indirektno regulacijom 1,25D na nivou intestinalnog trakta (164). PTH interaguje sa PTH/PTHrP receptorima koji se nalaze na plazma membrani ciljnih ćelija. Ova interakcija pokreće niz kaskadnih reakcija, od generisanja cikličnog adenozin monofosfata (cAMP), aktivacije kinaza, fosforilacije proteina, povećanog ulaska kalcijuma u ćeliju i posledično povećane intraćelijske koncentracije, stimulacije aktivnosti fosfolipaze C i stvaranja diacilglicerola i fosfoinozimid-aktivisanih enzima i transportnih sistema, kao i sekrecije lizozomalnih enzima (164).

U bubrezima, PTH svoju aktivnost ostvaruje kroz sledeća delovanja: 1) indukuje 25-hidroksivitamin D 1 α -hidroksilazu, povećavajući stvaranje 1,25D, što dovodi do stimulacije intestinalne apsorpcije i kalcijuma i fosfata, 2) povećava reapsorpciju kalcijuma u distalnom uvijenom delu tubula nefrona, 3) smanjuje reapsorpciju fosfata u proksimalnim tubulima i 4) inhibira aktivnost Na⁺-H⁺ antiportera, što podstiče blagu hiperhloremijsku metaboličku acidozu u stanjima hiperparatiroidizma (164).

Delovanje PTH na koštano tkivo se ogleda kroz stimulaciju resorpcije ili formiranja kostiju u zavisnosti od koncentracije ali i od dužine delovanja PTH. Dugotrajno dejstvo visokih koncentracija PTH vodi povećanoj resorpciji koštanog tkiva. Ovo je posledica direktne promene aktivnosti ili broja osteoblasta, a indirektno na osteoklastima. Prvobitan efekat resorpcije kostiju je važan za održavanje homeostaze kalcijuma, dok je dugotrajna resorpcija važna za krajnje sistemske potrebe i homeostazu koštanog tkiva.

Udruženo direktno delovanje PTH na kosti i bubrege i indirektno delovanje na intestinalni trakt preko 1,25D dovodi do promene koncentracije kalcijuma i fosfora u serumu i urinu. U serumu su povišene koncentracije ukupnog i slobodnog kalcijuma, dok su koncentracije fosfata smanjene. U urinu su povišene koncentracije neorganskog fosfata i cAMP, dok je koncentracija kalcijuma povišena jer povišena filtracija kalcijuma prevazilazi povišenu tubularnu reapsorpciju (kalcijum potiče od pojačane resorpcije kostiju i intestinalne apsorpcije kalcijuma). Kod zdrave osobe, povišen kalcijum u serumu redukuje sekreciju PTH preko negativne povratne sprege, čime se održava homeostaza.

PTH cirkuliše kao biološki aktivan intaktni hormon i u obliku karboksil (C)-terminalnih fragmenata koji sadrže srednji deo molekula i C-terminalne aminokiseline, ali bez biološki aktivnog amino(N)-terminalnog regiona. Heterogenost PTH je posledica: 1) sekrecije i intaktnog hormona i C-terminalnih fragmenata od strane paratiroidnih žlezda, 2) perifernog metabolizma intaktnog hormona u jetri i bubrežima do C-terminalnih fragmenata i 3) renalnog klirensa iPTH i C-terminalnih fragmenata (165). Hipokalcemija povećava sekreciju iPTH u paratiroidnim žlezdama, dok hiperkalcemija dovodi do jakog smanjenja ili potpunog odsustva sekrecije, dok se sekrecija C-terminalnih fragmenata i pored ovoga nastavlja. Biološki aktivan iPTH se brzo uklanja iz plazme (poluživot je < 5 minuta) razgrađujući se do C-terminalnih fragmenata u jetri i bubrežima ili klirensom kao iPTH putem bubrega (165). Perifernim metabolizmom iPTH se inaktiviše, ali se ne mogu detektovati biološki aktivne koncentracije N-terminalnih fragmenata (166).

Cirkulišući imunoreaktivni PTH je primarno sastavljen od "inaktivnih" C-terminalnih fragmenata, a sekundarno od intaktnog hormona (koji se meri kao iPTH drugom generacijom imunoseja). Ovi fragmenti ne sadrže N-terminalni region i klasičnu PTH biološku aktivnost, pa se smatraju inaktivnim degradacionim produktima. Nedavni radovi objašnjavaju da su identifikovani receptori za C-terminalni PTH na ćelijama koštanog tkiva, što ukazuje na mogući uticaj ovih fragmenata na sazrevanje i biološku aktivnost osteoblasta i osteoklasta (167, 168). C-terminalni fragmenti se filtriraju preko glomerula i imaju poluživot manji od 1 čas. Kod osoba sa oslabljenom funkcijom

bubrega, poluživot i cirkulišuće koncentracije značajno rastu. Ukupni imunoreaktivni PTH čine 5–25% intaktni hormon, a 75–95% C-terminalni fragmenti (169). Relativna koncentracija intaktnog hormona i fragmenata varira u zavisnosti od fizioloških i patoloških procesa.

1.2.5.1. Klinički značaj intaktnog paratiroidnog hormona

Određivanje PTH je značajno za diferencijalnu dijagnozu hiper- i hipokalcemije, što je osnova za procenu funkcije paratiroidnih žlezda kod osoba sa oslabljenom funkcijom bubrega, kao i kod poremećaja metabolizma minerala i koštanog tkiva.

Povišene vrednosti iPTH postoje kod pacijenata sa primarnim hiperparatiroidizmom, dok se kod bolesnika sa neparatiroidnom hiperkalcemijom, kao i hipokalcemijom koja je udružena sa malignitetima, vrednosti iPTH nalaze u donjem delu referentnog intervala, pa i ispod normale (110). Kod pacijenata sa stabilnom hiperkalcemijom iPTH je u gornjem delu referentnog intervala ili neočekivano visok i ukazuje na primarni hiperparatiroidizam. Preporuka je da se pre terapije hiperkalcemije odrede vrednosti iPTH, zato što sekrecija PTH može biti stimulirana opadanjem nivoa serumskog kalcijuma. Povećane vrednosti kod pacijenata sa hiperkalcemijom i malignitetima retko postoje zbog ektopičnog lučenja PTH (170). Hiperkalcemija u malignitetu je obično udružena sa metastazama na kostima i/ili produkcijom PTHrP. Međutim, PTHrP ne pokazuje ukrštenu reakciju sa PTH ni u jednom imunoheмиjskom testu kojim se određuje PTH. Nedavna studija ukazuje da je PTH(1-84) znatno osetljiviji u dijagnozi primarnog hiperparatiroidizma (171). Kod pacijenata sa primarnim hiperparatiroidizmom PTH(1-84) je povećan u 96% slučajeva, dok je u 73% bio povećan iPTH. Studija je analizirala mali broj pacijenata, tako da ostaje na budućim studijama da utvrde prednost PTH(1-84) nad iPTH.

Kod pacijenata sa hipoparatiroidizmom nivoi iPTH su subnormalni ili na donjoj granici referentnog intervala, a kod pacijenata sa hipokalcemijom neodgovarajuće niske. Problem u određivanju niskih koncentracija leži u činjenici da su testovi kojim se određuje iPTH neprecizni za ovaj opseg vrednosti, ali i u postojanju nespecifičnih

efekata samog seruma pacijenta, zbog matriksa testa koji ne sadrži ligande za određivanje celog molekula iPTH (postoji ukrštena reakcija sa N-terminalnim skraćenim fragmentima PTH molekula) (172).

Kod sekundarnog hiperparatiroidizma PTH je povećan pre nego što se detektuju abnormalno niski nivoi ukupnog ili slobodnog kalcijuma, kao parametar koji je osetljiviji za detekciju ovog oboljenja, a podstiče homeostatske mehanizme za održavanje serumskog kalcijuma u granicama referentnih vrednosti (173).

Kod KSBB pacijenata, merenje PTH je značajno u proceni funkcije paratiroidne žlezde, nivoa koštanog prometa i poboljšanju tretiranja ovih oboljenja. Status paratiroidnih žlezda se procenjuje određivanjem iPTH u uzorcima seruma kod bolesnika pre dijalize da bi se izbegao uticaj različitih faktora, kao što su serumski kalcijum posle dijalize i tip membrane za dijalizu, koji utiču na sekreciju i uklanjanje PTH (174, 175). Za procenu akutnog odgovora paratiroidnih žlezda na promene nivoa kalcijuma, predlaže se poređenje nivoa iPTH u predijaliznim i postdijaliznim uzorcima. Mada se PTH(1-84) može koristiti za tačniju procenu statusa paratiroidnih žlezda i prometa koštanog tkiva, kao i praćenje terapije kod KSBB pacijenata, problem su metode određivanja ovog molekula, kao i terapeutski ciljevi iPTH koji su utvrđeni vodičima (dva do četiri puta vrednosti gornje granice referentnog intervala) (99). Za razliku od visokih nivoa iPTH koji specifično ukazuju na sekundarni hiperparatiroidizam, često niski nivoi iPTH ne mogu biti pouzdani pokazatelj adinamične bolesti kostiju. Ostaje da dalji radovi pokažu njegovu efikasnost i efektivnost.

Koncentracije iPTH mogu biti izmenjene u hiper- i hipotiroidizmu, ali i u slučaju terapije litijum karbonatom. PTH se smanjuje i u inverznom je odnosu sa T3 koncentracijama hiperparatiroidnih pacijenata. Serumski PTH raste kod pacijenata koji postaju hipotiroidni nakon terapije radioaktivnim jodom, ali se smanjuje kod supstitucione terapije kao posledica promenjenih nivoa kalcijuma u serumu (176).

1.2.5.2. Određivanje intaktnog paratiroidnog hormona

Za određivanje iPTH su se uglavnom koristili kompetitivni imunoeseji, zbog mogućnosti da mere niske koncentracije ovog molekula, kao i visoke koncentracije C-terminalnih fragmenata. Međutim, kompetitivni testovi se više ne koriste jer imaju ograničenu specifičnost i/ili osetljivost (177). S druge strane, metode koje mogu da odrede srednji region molekule PTH i C-terminalne fragmente imaju takođe ograničenja: 1) mere primarno C-terminalne fragmente, koji su prisutni u mnogo većoj koncentraciji od biološki aktivnog intaktnog hormona, čije koncentracije regulišu nivoi kalcijuma, 2) slab su pokazatelj funkcije paratiroidnih žlezda jer izmerene koncentracije zavise od perifernog metabolizma i glomerularne filtracije parametara, 3) postoji problem u interpretaciji kod pacijenata sa oslabljenom funkcijom bubrega (PTH može biti lažno povećan, i do 30 puta od gornje granice referentnog intervala, kod pacijenata na dijalizi bez sekundarnog hiperparatiroidizma) i 4) kod neparatiroidne hiperkalcemije postoje često lažno blago povećane vrednosti C-terminalnih fragmenata (178, 179). Sve ovo je uslovalo potragu za specifičnijim i osetljivijim imunoesejima kakvi su nekompetitivne metode za određivanje iPTH koje su i aplikovane na imunoheмиjske analizatore. Ovim metodama se može odrediti aminokiselinska sekvenca humanog iPTH (hPTH), a samim tim i struktura fragmenata hPTH i analoga ovih fragmenata koji se mogu koristiti kao imunogeni, nosači i kalibratori, kao i za određivanje specifičnosti antiseruma i antitela. Znanat su doprinos dale razumevanju sekrecije, metabolizma i uklanjanja cirkulišućih formi PTH.

Pojedinačna antitela su najčešće obeležena radioaktivnim jodom (^{125}I) (IRMA) ili hemiluminiscentnom molekulom (ICMA) kao što je akridinijum estar, kao i ELISA ili EIA testom koji koristi ALP da prevodi supstrat (1,2-dioksetan fosfat) do hemiluminiscentnog proizvoda) (180). Škola Američkih Patologa koristeći rezultate interlaboratorijskih istraživanja navodi da se nekompetitivni imunotestovi prve generacije za iPTH mogu koristiti kao komercijalno dostupne metode i potpuno automatizovane (181). Prva generacija, nekompetitivnih metoda za iPTH pokazuje ukrštenu reakciju sa N-terminalnim skraćenim fragmentima, čime se precenjuje koncentracija i biološka aktivnost iPTH (180). Korišćenjem sintetskog PTH(7-84), pokazana je ukrštena reakcija od oko 40%. Ovo je dovelo do razvoja metoda druge

generacije za određivanje iPTH, koje koriste N-terminalna antitela i ne pokazuju ukrštenu reakciju sa sintetskim PTH(7-84), tj. ne prepoznaju N-terminalne skraćene fragmente PTH (182). U literaturi se navodi da se ovim metodama određuje "bio-intaktni PTH, PTH(1-84)" ili "ceo PTH" ili "CAP" (ciklaza-aktivisan PTH), kao i da N-terminalni skraćeni PTH molekul može biti biološki aktivan (182, 183). Sintetski PTH(7-84) koji se koristi kao dobar predstavnik N-terminalnog skraćenog PTH, smanjuje serumski kalcijum, antagonizuje kalcemijske, fosfatemijske i fosfaturične efekte iPTH kod tiroparatiroidektomičnih životinja i vezuje se za C-terminalni PTH receptor odvojen od PTH/PTHrP receptora (184).

Druga generacija metoda za određivanje iPTH koja meri N-terminalni skraćeni PTH, u određenom stepenu precenjuje koncentraciju biološki aktivnog intaktnog hormona. Step je metod-zavisan i 50% veći od proseka od PTH(1-84) kod pacijenata sa primarnim hiperparatiroidizmom ili krajnjim stadijumom bolesti bubrega (182).

Nemogućnost prve generacije metoda kojima se meri iPTH da tačno izmere biološki aktivan intaktni hormon, je objašnjenje za činjenicu da iPTH nije pouzdan pokazatelj koštanog prometa kod pacijenata na dijalizi (185, 186). Određivanjem PTH često ne može da se napravi razlika između pacijenata sa niskim, normalnim i visokim prometom koštanog tkiva. Takođe, lečenje pacijenata u cilju suprimiranja iPTH do normalne ili blizu normalne vrednosti često rezultuje pojavom adinamične bolesti kostiju. Za adekvatnu procenu prometa koštanog tkiva kod pacijenata sa renalnom osteodistrofijom preporučuje se računanje odnosa PTH(1-84)/N-terminalnog skraćenog fragmenta, zbog sposobnosti PTH(7-84) da antagonizuje biološku aktivnost iPTH (187, 188). Odnos se računa nakon merenja iPTH (testovima prve generacije) i PTH(1-84) (testovima druge generacije), nakon čega se nivo N-terminalnih skraćenih fragmenata određuje oduzimanjem vrednosti PTH(1-84) od vrednosti iPTH. Međutim, potrebno je da budući radovi dokažu klinički značaj merenja PTH(1-84) i iPTH i računanja odnosa u proceni koštanog prometa kod pacijenata sa renalnom osteodistrofijom.

Testovi druge generacije kojima se meri iPTH nisu apsolutno specifični za ovaj molekul, jer su nedavni radovi ukazali na postojanje amino-terminalne forme koja se razlikuje od iPTH molekula i N-terminalnih skraćenih fragmenata (182). Ova forma predstavlja oko 20% iPTH molekula koji se meri testovima druge generacije, tako da klinički značaj određivanja ove forme, ostaje da se potvrdi budućim istraživanjima.

1.2.5.3. Referentni interval

Referentni intervali PTH zavise od metode kojom se određuje molekul. Tipični referentni intervali su za iPTH (prva generacija testova) od 10–65 pg/mL, a za PTH(1-84) (druga generacija testova) od 6–40 pg/mL (189, 190). Za interpretaciju nivoa PTH uvek mora da se uzme u obzir nivo kalcijuma u trenutku uzorkovanja. Gornja granica referentnog intervala za PTH zavisi od nivoa vitamina D, pa se pri određivanju PTH dobijaju znatno niži nivoi isključivanjem osoba sa insuficijencijom vitamina D (191).

Koncentracije iPTH kod zdravih osoba rastu paralelno sa godinama života (192). Normalne su ili niske kod trudnica, niže kod fetusa, a rastu u toku prvih nekoliko dana života, kao odgovor na neonatalnu hipokalcemiju (193, 194).

1.2.5.4. Preporuke KDOQI vodiča

Pacijenti sa ubrzanim koštanim prometom imaju najveće koncentracije PTH zbog sekundarnog hiperparatiroidizma (posebno izraženo u osteitis fibrozi). Kod pacijenata sa usporenim koštanim prometom nivoi PTH su jako niski. Nivoi PTH koji se nalaze u srednjem delu referentnog opsega se mogu naći kod bolesnika sa adinamičnim (aplastičnim) usporenim koštanim prometom i kod rane osteitis fibroze (195). Značajno preklapanje koncentracija postoji između različitih formi renalne osteodistrofije. Kod pacijenata na dijalizi, preporučene „cut-off“ vrednosti (nivo kliničke odluke) su manji od 100 ili 150 pg/mL i veći od 250–300 pg/mL u razlikovanju usporenog i ubranog koštanog prometa (99, 195). Ukoliko su vrednosti iPTH < 150 pg/mL preporučuje se održavanje nivoa iPTH niskim dozama vitamina D, dok se u slučaju iPTH vrednosti > 300 pg/mL preporučuje povećanje doze vitamina D do postizanja preporučenih nivoa

iPTH od 150–300 pg/mL. Da bi se sprečila supresija paratiroidnih žlezda, ali i adinamična i hiperparatiroidna bolest kostiju poželjni terapijski nivoi iPTH (određivani prvom generacijom imunoeseja) bili bi dva do četiri puta vrednosti gornje granice referentnog intervala, a učestalost određivanja koncentracija iPTH je na svakih 3 do 6 meseci. Kod KSBB pacijenata vrednosti PTH ispod 65 pg/mL se gotovo u potpunosti podudaraju sa pojavom adinamične bolesti kostiju.

1.2.6. 25-HIDROKSI VITAMIN D

Vitamin D se stvara endogeno izlaganjem kože sunčevim zracima i apsorpcijom iz hrane koja sadrži ili je suplementirana vitaminom D. Metabolizmom se stvara biološki aktivna forma hormona (1,25D) koja reguliše metabolizam kalcijuma i fosfora, pa nedostatak vitamina D dovodi do defekta u mineralizaciji i izmenjenog formiranja koštanog tkiva. Metaboliti vitamina D su kao holekalciferol ili ergokalciferol (196–198). Holekalciferol (vitamin D₃) se stvara u koži iz 7-dihidroholesterola pri izlaganju ultravioletnim B sunčevim zracima. Količina zavisi od izloženosti kože suncu, godišnjeg doba, starenja. Ergokalciferol (vitamin D₂) se može dobiti zračenjem ergosterola koji se dobija iz kvasca. Vitamin D₂ se razlikuje od vitamina D₃ u postojanju dve C-C veze između 22 i 23 ugljenikovog atoma i metil grupe na 24 ugljenikovom atomu.

Značajne količine vitamina D se nalaze u malom broju namirnica: masnom tkivu i jetri ribe pogotovo ono iz jetre bakalara, žumancu jajeta i jetri životinja (199). Preporučeni dnevni unos za osobe preko 50 godina starosti je 400 IU (10 µg) (197).

Vitamin D₂ i vitamin D₃ se metabolišu u 25D pomoću D-25-hidroksilaze (CYP27B1) i citohrom P450 enzima u jetri (200). Koncentracija 25D u serumu je oko 10–65 ng/mL, a poluvreme života je 2–3 nedelje. Pri fiziološkim koncentracijama 25D je neaktivan. 25(OH)D₂ i 25(OH)D₃ se u bubrezima i placenti metaboliše u biološki aktivan hormon, 1,25D, dejstvom CYP27B1 i citohroma P450 (200). Cirkulišuće koncentracije su oko 15–60 pg/mL, što je oko 1/1000 koncentracije 25D, a poluživot 1,25D je 4–6 časova

(200). Takođe, cirkulišuće koncentracije 1,25D su strogo regulisane primarno dejstvom PTH, fosfora, kalcijuma i 25D kao supstrata (201). PTH i hipofosfatemija povećavaju sintezu 1,25D, povećavajući aktivnost CYP27B1, dok hipokalcemija deluje indirektno stimulišući sekreciju PTH (201). Hiperkalcemija i hiperfosfatemija redukuju CYP27B1 i koncentracije 1,25D. Sam 1,25D indukuje 25(OH)D-24-hidroksilazu, enzim koji dovodi do stvaranja 24,25-dihidroksivitamina D (24,25D) najzastupljenijeg dihidroksiliranog vitamina D u serumu. Aktivnost ovog enzima redukuje stvaranje biološki aktivne forme 1,25D.

Vitamin D, 25D i 1,25D se u cirkulaciji vezuju za vitamin D-vezujući protein (*Vitamin D binding protein*, DBP) specifični visoko afinitetni transportni protein poznat i pod nazivom grupno-specifična komponenta (202). Kod čoveka, DBP sadrži 458 aminokiselinskih ostataka i ima molekulsku masu od 51335. DBP se sintetiše u jetri i cirkuliše u višku (oko 400 mg/L), tako da je svega manje od 5% vezujućih mesta popunjeno. Afinitet vitamina D i metabolita za DBP je sledeći: 25D > 1,25D > vitamin D. Samo 0,03% 25D i 0,4% 1,25D se nalazi slobodno u plazmi kod zdrave osobe (202). Koncentracije DBP rastu u trudnoći i sa estrogenskom terapijom, a smanjuju se kod nefrotskog sindroma.

1,25D održava nivoe kalcijuma i fosfora konstantnim u serumu delujući na intestinalni trakt, koštano tkivo, bubrege i paratiroidne žlezde. U tankom crevu stimuliše apsorpciju kalcijuma, primarno u duodenumu, a apsorpciju fosfora u jejunumu i ileumu (203). U visokim koncentracijama 1,25D povećava resorpciju koštanog tkiva indukujući monocitne stem ćelije u kostnoj srži da se diferenciraju do osteoklasta i stimulišući osteoblaste, stvaraju se citokini i drugi faktori koji pojačavaju osteoklastnu aktivnost. Stimulišući osteoblaste povećavaju i cirkulišuće koncentracije ALP i nekolagenih proteina kostiju. U bubrezima 1,25D inhibira sopstvenu sintezu i stimuliše metabolizam, deluje direktno na paratiroidne žlezde i inhibira sintezu i sekreciju PTH. Takođe, ispoljava svoju funkciju vezujući se za specifične receptore jedra za vitamin D, koji su analozi steroidnih receptora za androgene, estrogene i kortikosteroide (204, 205).

1.2.6.1. Klinički značaj 25-hidroksi vitamina D

Određivanje vitamina D je korisno za diferencijalnu dijagnozu hipo-, hiperkalcemije ili hiperkalciurije, kao i za procenu statusa vitamin D kod zdravog čoveka, ali i kod osoba sa poremećajima metabolizma kostiju i minerala. Klinički značaj ima određivanje samo 25D i 1,25D, jer do danas nije utvrđen značaj određivanja ukupnog vitamina D, 24,25D ili drugih metabolita (206). Najbolja procena nutricionog statusa vitamina D određuje se merenjem 25D. Ovaj metabolit je glavna cirkulišuća forma vitamina D, a vrlo mali uticaj imaju dnevna varijacija, izlaganje svetlosti i unos hranom, zbog dugog poluvremena života. Uzimajući u obzir činjenicu da se 25D sintetiše u jetri i njegove koncentracije u serumu u manjem stepenu zavise od funkcije bubrega, veliki broj radova potvrđuje prednost ovog biomarkera nad 1,25D kod pacijenata sa krajnjim stadijumom bolesti bubrega (207–210).

Cirkulišuće koncentracije 25D se smanjuju zbog nedostatka vitamina D, neadekvatnim prevođenjem vitamina D u 25D, ubrzanim metabolizmom 25D i povećanim urinarnim gubitkom vezivanjem za transportni protein. Smanjene koncentracije vitamina D postoje zbog neadekvatnog izlaganja sunčevim zracima, nedovoljnog unosa hranom, malapsorpcionog sindroma ili resekcija na delovima gastrointestinalnog trakta. Teško hepatocelularno oboljenje je udruženo sa neadekvatnim prevođenjem vitamina D u 25D. Lekovi kao što su fenitoin, fenobarbital i rifampin podstiču enzime koji metabolišu lekove, a ovi ubrzavaju metabolizam vitamina D i njegovih metabolita. Koncentracije 25D u serumu su smanjene kod pacijenata sa nefrotskim sindromom zbog povećanog gubitka DBP i 25D urinom. Merenje 25D ima ograničenja u slučaju hiperkalcemije. Kod ovih pacijenata koncentracija vitamina D je obično veća od 250 nmol/L, u kom slučaju se mora potvrditi da li je reč o intoksikaciji zbog unošenja velikih količina vitamina D ili 25D (211).

Kod pacijenata sa oboljenjem bubrega dolazi do smanjenja aktivnosti CYP27B1 u bubrezima, pa se kod ovih osoba stvara manje biološki aktivne forme 1,25D, tako da se ovim pacijentima tradicionalno daje supstituciona terapija vitaminom D, 1,25D ili analogima. Mada kod ovih pacijenata postoji ekstrarenalna 1- α hidroksilacija, literaturni podaci još uvek razmatraju da li umesto inaktivne forme, ovim pacijentima treba davati

aktivnu formu vitamina D i analoga (212–214). Neki analozi vitamina D kao što je parakalcitol, zapravo snižavaju 1,25D, pa deluje kao mimetik vitamina D.

U jednoj placebo-kontrolisanoj studiji u kojoj su korišćeni kalcitriol, alfakalcidiol, parikalcitol i dokserkalciferol detektovano je povećanje nivoa fosfora, što je ukazivalo da ne postoji razlika između različitih sterola u njihovom efektu na fosfor (215). Lečenje sa vitaminom D treba da se prekine ako nivoi fosfora prevazilaze 2,08 mmol/L, zbog rizika od daljeg povećanja (215).

Slabljenjem funkcije bubrega, sniženi nivoi 1,25D i kalcijuma, a povećani nivoi fosfora vode razvoju sekundarnog hiperparatiroidizma i posledično smanjenju gustine koštanog tkiva. Sekundarni hiperparatiroidizam se karakteriše povećanim nivoom PTH i udružen je sa poremećajem koštanog prometa (renalnom osteodistrofijom) i lošim ishodom pacijenata na dijalizi. Pre uvođenja kalcitriola za lečenje sekundarnog hiperparatiroidizma, pacijentima sa KSBB su se prvobitno davale velike doze vitamina D hranom. Međutim, većina studija je ukazivala na mali efekat ovakvog lečenja, tako da se kalcitriol uvodi kao standardna terapija za sekundarni hiperparatiroidizam (216–220). I pored toga, KDOQI vodiči ukazuju na činjenicu da kod predijaliznih pacijenata i pacijenata na dijalizi još uvek nije utvrđen efekat "nutricione" supstitucije vitaminom D (ergokalciferolom i holekalciferolom) na regulisanje nivoa 1,25D, zato što su oni izrazito smanjeni (221). Problem kod predijaliznih pacijenata i pacijenata na dijalizi je nedovoljno literaturnih podataka, da bi blaga suplementacija ergokalciferolom koja povećava nivo 25D, povećala i 1,25D ili smanjila iPTH, u cilju homeostaze kalcijuma i fosfora, tj. regulisanja metabolizma kostiju.

1.2.6.2. Određivanje 25-hidroksi vitamina D

Iako se holekalciferol i 1,25D mogu određivati u serumu, najbolje je određivati 25D (99, 221). Prednost 25D je u dugom poluživotu, od oko 3 nedelje i činjenici da 25-hidroksilacija nije striktno regulisana, a samim tim ni transformacija u aktivni proizvod, 1,25D (222). Holekalciferol ima kratak poluživot, oko 24 časa, tako da nivoi u serumu zavise od trenutnog izlaganja suncu i unosa hranom. Određivanje je otežano zbog

izraženih lipofilnih osobina, te ne postoji komercijalni način određivanja (223). Nastanak aktivne forme 1,25D je regulisan koncentracijom 25D, a serumski poluživot 1,25D je samo 4–6 sati, te nivo u cirkulaciji daje podatak o trenutnom statusu hormona (224).

Prva rutinska metoda za određivanje 25D u humanom serumu se zasnivala na kompetitivnom proteinskom vezivanju (*Competitive Protein Binding Assay*, CBPA), koja je koristila DBP, kao primarni vezujući agens (225). Metoda koristi ekstrakciju organskim rastvaračem, sušenje u struji azota i prečišćavanje ekstrakta hromatografijom na koloni. Prinos značajno varira, te se mora određivati za svaki uzorak. Sledeća metoda koja se koristila je RIA tehnika, sa J^{132} , kao obeleživačem (226). Takođe se mogu koristiti i enzimski imuno esej (EIA). Danas se u rutinskoj praksi koristi elektrohemiluminiscentni imuno esej (*Electrochemiluminescence Immuno Assay*, ECLIA) (227). Međutim, ova metoda koristi DBP kao vezujući agens, što predstavlja problem u određivanju 25D, kao molekule koja je možda najhidrofobnija supstanca koja se određuje CBPA metodom. Lipofilna priroda dovodi do matriks efekta koji menja sposobnost vezujućeg agensa, antitela ili vezujućeg proteina, da se veže za analit od interesa u uzorku i standardu na isti način. Iako veliki broj laboratorija određuje vitamin D kompetitivnim imunoesejima, problem ovih metoda je određivanje niskih koncentracija 25D, koje su karakteristične za KSBB pacijente. Mada određivanje 25D nakon HPLC razdvajanja, i nakon odvajanja detekcijom metodom masene spektrometrije, zahteva specifičnu opremu, uvežbano osoblje, veliku zapreminu uzorka, još uvek se koristi za potvrđivanje tačnosti metoda koje se zasnivaju na kompetitivnim imunoesejima, tj. kao referentna metoda (228, 229).

1.2.6.3. Referentni interval

Referentni interval za vitamin D zavisi od metode, ali su okvirne vrednosti za 25D od 25–162 nmol/L (192, 230). Donja granica se smatra neodgovarajuće niska, tako da kritična vrednost za nedostatak vitamina D još uvek nije jasno definisana. Koncentracije manje od 50–75 nmol/L su udružene sa povećanim koncentracijama PTH i smanjenom apsorpcijom kalcijuma (231).

Nedavne studije potvrđuju značajan uticaj godišnjeg doba, rase, godina života, fizioloških i patoloških stanja na status vitamina D (232, 233). Cirkulišuće koncentracije 25D zavise od godina života pa su veće kod dece i toku puberteta (period rasta i razvoja), a opadaju sa godinama života. Takođe povećane koncentracije 25D se nalaze i u trudnoći. Postoji opšte slaganje da minimalne vrednosti 25D, potrebne za održavanje zdravog koštanog sistema iznose 50–80 nmol/L (192, 234). Ispod ovih vrednosti počinje da raste nivo PTH. Novija saznanja ukazuju da su vrednosti značajno više od 80 nmol/L, potrebne za opšte zdravlje (206, 234).

1.2.6.4. Preporuke KDOQI vodiča

KDOQI vodiči ukazuju na činjenicu da i kod zdravih osoba preko 60 godina starosti nivoi 25D ispod 25 nmol/L, pa čak i u opsegu 40–80 nmol/L, mogu biti udruženi sa povećanim nivoima PTH i smanjenjem koštane mase, kao i povećanim stepenom preloma (99, 222). Ove koncentracije 25D su česte kod predijaliziranih pacijenata i pacijenata na dijalizi. KDOQI vodiči predlažu da pacijenti na hemodijalizi i peritonealnoj dijalizi sa nivoima iPTH preko 300 pg/mL primaju terapiju aktivnim vitamin D sterolima (kalcitriol, alfakalcidol, parikalcitriol ili dokserkalciferol) u cilju smanjenja PTH do poželjnih vrednosti od 150–300 pg/mL, uz paralelno određivanje vrednosti 25D (222). Na osnovu podataka velikog broja studija KDOQI navodi „cut off,, vrednost za 25D od 37,5 nmol/L za procenu težine sekundarnog hiperparatiroidizma (222). Niže vrednosti 25D od naznačene su u direktnoj vezi sa težinom sekundarnog hiperparatiroidizma, čak i kod pacijenata na dijalizi, a posledično i sa nivoom koštanog metabolizma, tj. ukazuju na smanjen metabolizam kostiju.

1.3. FUNKCIJA BUBREGA KOD PACIJENATA SA KRAJNJIM STADIJUMOM BOLESTI BUBREGA

Bubrezi imaju centralnu ulogu u homeostatskim mehanizmima ljudskog organizma. Oni imaju ekskretornu, regulatornu i endokrinu funkciju. Pomoću ekskretorne funkcije bubrega organizam se oslobađa brojnih krajnjih proizvoda metabolizma, kao i viška neorganskih supstanci koje se unose hranom. Pomoću glomerularne filtracije i tubularne sekrecije, održava se konsantan optimalan sastav krvi, kao i drugih telesnih tečnosti. Mehanizmi diferencijalne reapsorpcije i sekrecije na nivou tubula nefrona su efektori regulatorne funkcije bubrega, kojom se reguliše i održava acidobazna homeostaza i homeostaza vode i elektrolita.

Oboljenje bubrega nastaje kao posledica velikog broja oboljenja i poremećaja koji slabe funkciju bubrega. Najpre slabi funkcija nefrona, filtrirajućih jedinica bubrega, što dovodi do nemogućnosti bubrega da ukloni otpad i višak tečnosti. Hronična bolest bubrega se definiše smanjenim stepenom funkcije bubrega ($< 60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$) u periodu od tri meseca ili više (235). Nacionalna američka društva (*National Kidney Foundation*, NKF) i KDOQI predložila su klasifikaciju hronične bolesti bubrega u 5 stadijuma u zavisnosti od težine oštećenja ili stepena smanjenja funkcije, a na osnovu nivoa glomerularne filtracije. Stadijum 1 se karakteriše blagim smanjenjem funkcije bubrega, u kome je GFR normalan (funkcionalno više od 90% bubrega ili $\text{GFR} > 90 \text{ mL/min/1,73 m}^2$), ali sa izmenjenim hemijskim i mikroskopskim karakteristikama urina. Stadijum 2 karakteriše blago smanjenje funkcije bubrega, sa GFR koja ukazuje na 60–89% funkcije bubrega ili $\text{GFR} 60\text{--}89 \text{ mL/min/1,73 m}^2$. Stadijum 3 karakteriše umerena hronična slabost bubrega u kome GFR ukazuje na 40–59% funkcije bubrega ili umerena do ozbiljno smanjena funkcija bubrega sa GFR od 30–44 mL/min/1,73 m^2 . Stadijum 4 karakteriše teška hronična slabost bubrega u kome GFR ukazuje na 15–29% funkcije bubrega. Stadijum 5 karakteriše poslednji stadijum slabosti bubrega u kome GFR ukazuje na manje od 15% funkcije bubrega ili $\text{GFR} < 15 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ (235). Obično bolest bubrega počinje sporo i neprimetno, a napreduje tokom godina. Slabljenje funkcije bubrega je individualno i ne smanjuje se svakom pacijentu sa hroničnom bolesti bubrega funkcija bubrega od stepena 1 do stepena 5. Stadijum 5 se naziva i krajnji stadijum slabosti bubrega (KSBB). U KSBB je svega 15% normalne

aktivnosti, ali ne znači nužno i prestanak funkcije bubrega. Postoje simptomi koji se javljaju kod KSBB pacijenata i pre stadijuma 5: anemija, glavobolja, mala krvarenja i modrice, čest umor i osećaj mamurluka, slabost, problem sa koncentracijom, konfuzija, napadi, mučnina i povraćanje, slab apetit, osećaj žeđi, grčevi u mišićima, noćno mokrenje, svrab, dijareja, promene boje kože, oticanje i nadutost, teškoće u disanju, visok krvni pritisak, izmenjen menstrualni ciklus, problem sa varenjem.

Da bi se održala funkcija bubrega i život pacijenta, neophodna je dijaliza ili transplantacija bubrega. Dijaliza i transplantacija bubrega su terapije zamene bubrega (replacement therapy) jer se sa njima pokušava zameniti normalno funkcionisanje bubrega. Predijalizni bolesnici koji su kandidati za donaciju bubrega, dok se ne obezbedi adekvatan transplant, moraju da budu određeno vreme na dijalizi, od nekoliko meseci do tri godine. Međutim, bolesnici koji nisu odgovarajući za transplantaciju bubrega, zbog ozbiljnih zdravstvenih problema kao što su kanceri i teška srčana oboljenja, moraju da budu na dijalizi do kraja života. Obično je ovo sigurnija opcija od transplantacije. Postoje dva tipa dijalize: hemodijaliza (HD) i peritonealna dijaliza (kontinuirana ambulatorna peritonealna dijaliza, CAPD).

Hemodijaliza je do skoro bila češći tip dijalize. Davne 1913. godine su američki naučnik John J Abel i saradnici su patentirali aparat za prečišćavanje krvi koji su nazvali "vividiffusion" (236). On se sastojao iz koloidnih čevčica kroz koje je proticala krv, a oko cevčica se nalazio slani rastvor tečnosti. Koristili su ga za lečenje uremičnih životinja. Prvi klinički koristan dijalizator je primenjen 1943. godine, a nekoliko godina kasnije i prototip moderne dijalize (237). Aparat za HD je sastavljen od krvne pumpe i pumpe za dijalizatoru tečnost, proporcionirajuće pumpe, heparinske pumpe, detektora za hemoglobin, vazdušnog detektora, elektronskog pokazatelja toka dijalize, elektronskog prekidača toka krvi itd. Krvna pumpa obezbeđuje protok krvi kroz linije i dijalizator, a pumpa za dijaliznu tečnost omogućava protok tečnosti za dijalizu u suprotnom pravcu od toka krvi. Tečnost za HD odnosi štetne materije iz krvi, a iz nje u krv ulaze jedinjenja koja će popraviti odnos između kiselina i baza i soli u organizmu. Aparat za HD meša dejonizovanu vodu, odgovarajući koncentrat soli, čime se stvara dijalizna tečnost i zagreva do telesne temperature. Heparinska pumpa tokom HD

ubrizgava heparin da krv ne koaguliše. Detektori na aparatu služe da obezbede maksimalnu sigurnost tokom HD, jer se hemodijaliza automatski prekida u slučaju aktivacije detektora da bi bile sprečene ozbiljne komplikacije, usled prskanja dijalizne membrane ili zbog vazdušne embolije. Hemodijaliza predstavlja razmenu jedinjenja kroz polupropustljivu membranu, koja se odvija procesima difuzije i ultrafiltracije. Hronični program HD podrazumeva lečenje KSBB bolesnika redovnim ponavljanim dijalizama. Najčešće se bolesnici dijaliziraju 3 puta nedeljno po 4 do 5 sati. U zavisnosti od potrebe dijaliza može da traje 2 ili 6 puta nedeljno (programi dnevne, noćne dijalize, spore dijalize, hemofiltracije itd).

Nemački naučnik Wegner je 1877. godine je u eksperimentu na životinjama prvi uočio proces transporta metabolita kroz peritoneum (238). Međutim, za razliku od hemodijalize, mogućnosti peritonealne dijalize se istražuju tek od 1920. godine, ali je trebalo da prođe nekoliko dekada da bi ovaj vid terapije bio klinički prihvaćen za veći broj pacijenata. Opna abdomena (peritoneum) je tanka, glatka membrana površine oko dva kvadratna metra i nalazi se oko čitave abdominalne šupljine. Zahvaljujući činjenici da je peritoneum dobro prokrvljen, predstavlja savršenu prirodnu filter membranu. U peritonealnoj dijalizi se peritoneum koristi za lečenje dijalizom. Preko katetera se u određenim vremenskim intervalima ubacuje specijalna tečnost, dijalizni rastvor. Ova tečnost okružuje peritoneum i omogućava da metaboliti migriraju kroz tanke krvne sudove u dijaliznu tečnost, koja se nakon nekoliko sati uklanja preko katetera. Takođe se uklanja i višak vode, principom osmoze, jer se u dijaliznu tečnost dodaje šećer, u većoj koncentraciji nego što je u krvi. Međutim, zbog pojave peritonitisa kod velikog broja ovih pacijenata, tečnost za peritonealnu dijalizu se prvobitno čuvala u velikim staklenim bocama koje su mogle da se povežu preko gumenih cevi sa kateterom. Pomoću katetera, posebnih plastičnih kesa za jednokratnu upotrebu i cevi je omogućen adekvatan i siguran protok tečnosti u peritonealnoj dijalizi. Klinički značaj CAPD omogućila su 1978. godine dva američka naučnika (239). Razmena tečnosti sa otpadom, sa čistom tečnosti za dijalizu traje 30 do 40 minuta, a koristi se pokretna oprema, tako da je postupak elegantniji.

Od stanja pacijenta zavisi koji će tip dijalize da koristi kao terapiju. Međutim, kod pacijenata koji su imali veće operacije na abdomenu, uvek se preporučuje HD. Moguće je da pacijent pređe sa jednog tipa dijalize na drugi. Sa oba tipa dijalize se postižu slični rezultati, mada uspeh zavisi od velikog broja faktora (godina, trajanja dijalize, primarnog uzroka same bolesti bubrega, kao i prisustva bolesti srca ili dijabetesa). Očekivani životni vek pacijenata na dijalizi je oko 20 godina ali i duže, a zavisi i od prisustva policistične bolesti bubrega, glomerulonefritisa, visokog krvnog pritiska, dijabetesa itd.

1.4. METABOLIZAM KOŠTANOG TKIVA KOD PACIJENATA SA KRAJNJIM STADIJUMOM BOLESTI BUBREGA

Poremećaj mineralnog i koštanog metabolizma je česta pojava kod KSBB pacijenata. U literaturi su ovi poremećaji bili sveobuhvatno definisani jednim imenom – renalna osteodistrofija. Međutim, vodiči KDOQI ukazuju da kliničke, biohemijske i promene snimaka nakon denzitometrije, mogu da se smatraju jednim kliničkim entitetom ili sindromom. Zato se predlaže nov naziv ovom poremećaju: mineralni i koštani poremećaji u hroničnoj bolesti bubrega (*Chronic Kidney Disease–Mineral and Bone Disorder, CKD-MBD*) Glavne karakteristike ovog poremećaja su: hipokalcemija, sekundarni hiperparatiroidizam, hiperfosfatemija, smanjena intestinalna apsorpcija kalcijuma, poremećen metabolizam vitamin D, poremećaj koštanog prometa, kalcifikacija mekih tkiva, najčešće koronarnih arterija i srčanih valvula, izmenjen metabolizam fosfata, kalcijuma i magnezijuma u bubrezima, periferna vazodilatacija (svrab), proksimalna miopatija, ulceracija kože i nekroza mekih tkiva (240, 241). Početak ovih promena se dešava u ranim stadijumima hronične bolesti bubrega i nastavlja smanjenjem bubrežne funkcije, ali i uticajem različitih terapijskih pristupa ovim pacijentima.

Kod KSBB pacijenata postoji sekundarna hiperplazija paratiroidnih žlezda, što dovodi do povećanih nivoa PTH u cirkulaciji. Ovo nastaje zbog hipokalcijemije koja se razvija u toku bolesti bubrega, ali i zbog nedovoljnih nivoa 1,25D koji direktno može da deluje na funkciju paratiroidnih žlezda. Sa progresivnim gubitkom funkcije bubrega, smanjuje

se broj receptora za vitamin D i kalcijum-oseitljive receptore na paratiroidnim žlezdama, što dovodi do neoseitljivosti žlezda na dejstvo vitamina D i kalcijuma. Dodatan razvoj hiperfosfatemije direktno deluje na funkciju i rast paratiroidnih žlezda, a sve ovo doprinosi pogoršanju sekundarnog hiperparatiroidizma. Postoje tri hipoteze kojima se pokušala objasniti patogeneza hipokalcemije: 1) zadržavanje fosfata, 2) neoseitljivost koštanog tkiva na efekte PTH na kalcijum i 3) izmenjen metabolizam vitamina D (242). Međutim u patogenezi hipokalcemije i sekundarnog hiperparatiroidizma ovi procesi se u znatnoj meri preklapaju, pa sva tri zajedno mogu da pomognu u objašnjenju, praćenju i lečenju izmenjenog metabolizma minerala i koštanog tkiva kod pacijenata sa KSBB.

Priroda i tip poremećaja kostiju zavisi o bolesnika, a histomorfološki parametri pomažu u klasifikaciji oboljenja koštanog tkiva u nekoliko dijagnostičkih kategorija: blago hiperparatiroidno oboljenje kostiju, srednje do teško hiperparatiroidno oboljenje kostiju, mešano oboljenje kostiju, osteomalacija i adinamična bolest kostiju (242). Neki pacijenti mogu da razviju samo jedan tip oboljenja, dok se kod nekih može javiti mešana bolest koštanog prometa. Takođe se mogu javiti osteoskleroza, osteoporoza i osteopenija. Blage promene metabolizma kostiju se mogu detektovati i u ranim stadijumima hronične bolesti bubrega (Stadijum 2), ali slabljenjem funkcije bubrega ovi poremećaji se jako pogoršavaju. Dodatni faktori koji mogu da menjaju metabolizam kostiju kod KSBB pacijenata su starost, postmenopauzalni status, rasa, nutritivni nedostatak vitamin D, lekovi koji menjaju metabolizam vitamina D (antikonvulzivi), maligniteti sa ili bez metastaza i dugotrajna imobilizacija.

Zlatni standard za definisanje tipa renalne osteodistrofije prema NKF i KDOQI vodičima je biopsija kostiju, tj. analiziranje histomorfoloških markera kostiju (241). Histomorfometrijom mogu da se razlikuju statički i dinamički biomarkeri kostiju. Statički histomorfometrijski parametri podrazumevaju: odnos volumena tkivo/kosti, debljina osteoida, odnos površine osteoida/kosti, odnos volumena fibroznog tkiva/kosti. Dinamički parametri su stepen formiranja kostiju, učestalost aktivacije i vreme kašnjenja mineralizacije. U proceni dinamike morfologije kostiju, neophodno je *in vivo* tetraciklinsko obeležavanje kostiju. Tetraciklini se vezuju za površine na kojima se karakteriše aktivno formiranje i fluoresciraju pri ultravioletnoj svetlosti. Postoji

nekoliko šema za tetraciklinsko obeležavanje, a kod pacijenata sa izrazito oštećenom funkcijom bubrega primenjuje se kombinacija različitih tetraciklina sa različitom fluorescencijom (243, 244). Potrebno je da između dva obeležavanja prođe dovoljno dug period od 4 do 6 dana da bi se tetraciklin vezao za osteoid. Međutim, postoje šeme i za kratkotrajno "hitno" obeležavanje, koje zavisi od kliničara. Ovo ukazuje na kompleksnost biopsije kostiju kao invazivne metode, a za koju retko postoji potpuno opravdana indikacija. Mada do sada ni za jedan biomarker formiranja i resorpcije kostiju nije potvrđen dovoljan nivo dijagnostičke tačnosti, postoji veliki broj literarnih podataka koji ukazuju na činjenicu da biomarkeri formiranja i resorpcije kostiju jako dobro koreliraju sa histomorfološkim markerima (3–5, 34, 35, 37–39, 47–49, 245, 246).

1.4.1. Lezije koštanog tkiva zbog ubrzanog metabolizma kostiju kod pacijenata sa krajnjim stadijumom bolesti bubrega

Ubrzan metabolizam kostiju se u literaturi može naći pod nazivom hiperparatiroidna bolest kostiju (89, 247). Povišeni nivoi PTH u krvi su odgovorni za povišen broj i aktivnost osteoklasta, što vodi povećanoj resorpciji kostiju. Step en resorpcije je u direktnoj vezi sa procesom fibroze u kostnoj srži, a histološkim nalazima se može potvrditi osteitis fibroza (248). Fibroza kostne srži je uzrokovana aktivacijom mezenhimalnih ćelija kostiju, koje sazrevaju u ćelije slične fibroblastima (fibroblast-like cells), što dovodi do fibroze tkiva kostiju. Ovi poremećaji su praćeni i procesima povećanog formiranja kostiju, što se objašnjava stvaranjem povišene količine osteoida. Hiperparatiroidna bolest kostiju koja dovodi do osteitis fibroze, predstavlja oboljenje povećanog metabolizma kostiju u kome je povišen broj i osteoklasta i osteoblasta, povećana osteoklastna resorpcija, endotelna fibroza i akumulacija fibroznih vlakana u koštano tkivo.

Literarni podaci su pokazali da su za bolest ubrzanog metabolizma kostiju karakteristični visoki nivoi fosfata, iPTH i ALP (249). Međutim, visoki nivoi iPTH ne moraju uvek da ukažu na ubrzan promet kostiju. Takođe, literarni podaci potvrđuju povećanu pozitivnu prediktivnu vrednost za ubrzan promet kostiju i negativnu

prediktivnu vrednost za usporen metabolizam kostiju, ako se uz iPTH određuje i BALP (34, 35, 37, 39, 41, 47, 250–254). Glavna prednost BALP je što koncentracije ne zavise od nivoa glomerularne filtracije i stepena bubrežne slabosti, tako da vrednosti u serumu u potpunosti odražavaju nivo metabolizma kostiju. Urena i sar. (41) navode da vrednosti BALP preko 20 ng/mL, same po sebi imaju 100% specifičnost i osetljivost za ubrzan metabolizam kostiju, dok u kombinaciji sa iPTH preko 200 pg/mL, specifičnost opada na 80%. Jarava i sar. (254) ukazuju na nešto više vrednosti BALP od oko 30 ng/mL kao pozitivne prediktivne vrednosti za ubrzan metabolizam kostiju, pogotovo kod pacijenata na dijalizi koji su i pri višim vrednostima BALP imali smanjenu mineralnu gustinu kostiju. Mada se u nekim radovima vrednosti BALP izražavaju kao koncentracije, a u drugim kao aktivnost, literaturni podaci ukazuju da ne postoji ni statistički, ni klinički značajna razlika u dobijenim vrednostima u proceni ubrzanog prometa kostiju (255).

1.4.2. Lezije koštanog tkiva zbog smanjene mineralizacije

Smanjena mineralizacija osteoida vodi stvaranju rahitisa kod dece i osteomalacije kod odraslih. Osteomalacija predstavlja sekundarno oboljenje kostiju i karakteriše se smanjenjem stepena mineralizacije i rezultuje nagomilavanjem viška nemineralizovanog osteoida (248, 256). Dijagnoza osteomalacije se može tačno utvrditi jedino histomorfološki, procenom smanjene dekalifikacije kostiju. Treba naglasiti da prisustvo viška osteoida ne znači nužno i osteomalaciju, a može biti i posledica povećane sinteze kolagena, koja prevazilazi normalnu mineralizaciju. Posledice osteomalacije su deformiteti kostiju, bol u kostima, prelomi i mišićno-koštane invalidnosti. Za tačnu dijagnozu koristi se dvostruko tetraciklinsko obeležavanje kostiju (257–259).

Kod pacijenata na dijalizi najčešće se kao razlog usporenog prometa kostiju navodilo preopterećenje aluminijumom, ali i relativan ili apsolutan nedostatak vitamina D i njegovih metabolita i/ili neosetljivost na njihovo dejstvo (260). Vitamin D deluje na sintezu i sazrevanje kolagena, direktno stimuliše mineralizaciju kostiju, i povećava nivo kalcijuma i fosfata u prostoru izvan ćelija kostiju. Kod KSBP pacijenata sa niskim nivoima 25D često dolazi do razvoja osteomalacije. Mada kod ovih pacijenata

postoji neosetljivost na terapiju vitaminom D, dugotrajna terapija vitaminom D poboljšava ishod pacijenata sa osteomalacijom i do izlječenja (220, 259). Kod eksperimentalnih životinja i pacijenata sa KSBB, dokazano je izmenjeno formiranje i sazrevanje kolagena, tj. ukršteno vezivanje kolagena, što utiče i na mineralizaciju kostiju (106, 260–262). Takođe, u osteomalaciji je inhibirano sazrevanje amorfnog kalcijumfosfata do kristala. Kod ovih pacijenata je povećan sadržaj magnezijuma, što remeti normalnu mineralizaciju. Magnezijum stabilizuje amorfnu kalcijumfosfat i inhibira njegovu transformaciju u hidroksiapatit. Paralelno raste i sadržaj pirofosfata, što dodatno inhibira mineralizaciju. Kod pacijenata na dijalizi, dolazi do razvoja osteomalacije i zbog toksičnosti aluminijuma koji se koristi kao vezivač fosfata u kontroli hiperfosfatemije (258).

Literaturni podaci pokazuju da niski nivoi iPTH i BALP gotovo uvek prate usporen metabolizam kostiju (34, 41, 47, 263, 264). Okuno i sar. (98) su pokazali da postoji značajna korelacija između povećanih koncentracija beta-CTx i rizika za smanjenje metabolizma kostiju i da beta-CTx ima sličnu prediktivnu vrednost kao i iPTH, kod pacijenata na hemodijalizi.

1.4.3. Adinamična bolest kostiju

Ranih osamdesetih godina prošlog veka uveden je termin "aplastično" ili "adinamično" oboljenje kostiju kojim je objašnjavan nizak metabolizam kostiju bez nagomilavanja osteoida, sa tankim osteoidnim rubom (38). Adinamična bolest kostiju karakteriše smanjeno stvaranje kolagena od strane osteoblasta, a posledično i smanjena mineralizacija kolagena. Kasniji radovi su prikazali razliku između dva oboljenja smanjenog prometa kostiju: adinamična bolest kostiju, kao oboljenja u kome dolazi do gubitka mase kostiju, i osteomalacije, kod koje ne postoji dobra mineralizacija, ali je prisutno osteoidno tkivo. U adinamičnoj bolesti kostiju postoji odsustvo ili vrlo malo osteoblasta, kao i odsustvo ili minimalna peritrabekularna fibroza (za razliku od osteitisa fibroze). Smanjenjem mesta za remodelovanje u kostima, smanjen je stepen formiranja kostiju.

Adinamična bolest kostiju se najčešće razvija kod KSBB pacijenata i pacijenata na dijalizi. Zbog terapije aluminijumom ovi pacijenti razviju vremenom adinamičnu bolest kostiju (265–270). Međutim i pored toga što je aluminijum izbačen iz upotrebe ne smanjuje se prevalencija adinamične bolesti kostiju kod ovih pacijenata (271). Ovo može da se objasni činjenicom da je sve veći broj starijih pacijenata, pacijenata sa dijabetes melitusom, kao i da su pacijenti izloženi relativno visokim dozama vitamina D i oralne terapije kalcijumom (272, 273). Takođe, terapija glukokortikoidima koja dovodi do osteoporoze i hipoparatiroidizam su značajan faktor rizika za adinamičnu bolest kostiju (274–276). Relativni hipoparatiroidizam se smatra najznačajnijim faktorom rizika za adinamičnu bolest kostiju (277–281). Kao glavni uzrok navode se niski nivoi iPTH(1-84) ili relativan višak antagonista PTH fragmenata (npr. PTH(7-84)) koji imaju negativan efekat na metabolizam kosti. U jednoj studiji u kojoj je rađena biopsija kostiju pacijentima na dijalizi vrednosti iPTH < 120 pg/mL, određene IRMA metodom su imale visoku prediktivnu vrednost za adinamičnu bolest kostiju, dok su vrednosti > 450 pg/mL praktično isključile adinamičnu bolest kostiju (282). Opseg vrednosti od 120–250 pg/mL je poželjan za optimalnu osteoplastnu aktivnost (1,5%) i odsustvo fibroze, kod pacijenata koji nisu na terapiji kalcitriolom (274). Prema ovim autorima, kod pacijenata na dijalizi sa konstantnim iPTH < 70 pg/mL, godinu dana nakon paratiroidektomije, biopsijom kostiju je potvrđen usporen metabolizam kostiju ili adinamična bolest kostiju. Adinamična bolest kostiju karakteriše neosetljivost kostiju na anaboličko dejstvo PTH na kosti, koje se ostvaruje nishodnom regulacijom PTH/PTHrP receptora na površini osteoblasta (283, 284). Takođe, dijabetes melitus deluje negativno na metabolizam kostiju smanjujući indekse formiranja i resorpcije kostiju (285). Neki radovi navode poveznost između adinamične bolesti kostiju i vaskularne kalcifikacije kod pacijenata na hemodijalizi (286, 287). Ovo može da se objasni činjenicom da je u adinamičnoj bolesti kostiju smanjena je sposobnost vezivanja kalcijuma u tkivo kostiju, što dovodi do povećanja koncentracija kalcijuma u serumu, a posledično i taloženja na mekim tkivima.

Smanjena sposobnost kostiju da popravi mikrooštećenja jako povećava rizik od preloma, a karakteriše se bolom u kostima. Kod dece pre puberteta adinamična bolest kostiju je povezana sa smanjenjem linearnog rasta i povećanom retardacijom u razvoju

(38, 288). Iz svega ovoga se zaključuje da je adinamična bolest kostiju jedna multifaktorska bolest, a budući radovi treba da objasne klinički značaj i ulogu dodatnih medijatora kao što su citokini i faktori rasta.

1.4.4. Preporuke KDOQI vodiča

Kod KSBB pacijenata KDOQI vodiči zasnovani na dokazima navode vrednosti iPTH manje od 50 pg/mL i vrednosti BALP manje od 27 IU/L kao pouzdane u proceni adinamične bolesti kostiju (39, 289). Pouzdanost iPTH kao pojedinačnog biomarkera zavisi od testa kojim se određuje, tj. razlike u odnosu agonista (PTH(1-84)) i antagonista PTH formi (PTH(7-84)). Sa druge strane, BALP se do sada smatra najkorisnijim kliničkim biomarkerom u proceni formiranja kostiju (34, 35, 37–39, 250–254). Povećani nivoi isključuju prisustvo adinamične bolesti kostiju, međutim povećane vrednosti zajedno sa ukupnom ALP mogu biti prisutne kod nekih pacijenata sa teškom osteomalacijom (34, 290). Kombinacija biomarkera iPTH i BALP može da pomogne razlikovanje ubrzanog i usporenog metabolizma kostiju. Takođe, značajno praćenje promene biomarkera u vremenskom periodu služi i kao odgovarajući pokazatelj efekata terapije koja ima za cilj da poveća nivo e iPTH, kako bi se povećao metabolizam kostiju.

2. CILJ RADA

Uzimajući u obzir da je "zlatni standard" za definisanje nivoa metabolizma kostiju biopsija kostiju, invazivna metoda, preporuke vodiča za poboljšanje kvaliteta života i edukaciju pacijenata sa bubrežnom bolesti (*Kidney Disease Outcomes Quality Initiative*, KDOQI) su da se metabolizam kostiju može proceniti određivanjem serumskih biomarkera. Međutim, preporučeni biomarkeri, kalcijum, neorganski fosfat, intaktni paratiroidni hormon (iPTH) i 25-hidroksi vitamin D (25D) nisu primarni biomarkeri kostiju, već indirektno ukazuju na nivo metabolizma koštanog tkiva. Izmenjen metabolizam kostiju kod pacijenata sa hroničnom bolesti bubrega može da počne i u ranim stadijumima bolesti, ali se otkriva tek u krajnjem stadijumu bolesti bubrega (KSBB) sa izraženim simptomima, kod predijaliznih pacijenata ili pacijenata na hemodijalizi (HD) i kontinuiranoj ambulatornoj peritonealnoj dijalizi (CAPD). Na osnovu nivoa serumskih biomarkera moguće je proceniti ubrzan ili usporen metabolizam kostiju, ali je njihovo određivanje korisno i za procenu efekta terapije (dijalize), kao i progresije bolesti u zavisnosti od trajanja terapije.

Cilj rada je bio da se utvrdi značaj određivanja biomarkera resorpcije i stvaranja kostiju kod KSBB pacijenata.

U tom smislu je prvo bilo potrebno da se utvrdi pouzdanost korišćenih testova za sve biomarkere koji su određivani u serumu: alkalna fosfataza (ALP), koštani izoenzim alkalne fosfataze (BALP), tartarat rezistentni izoenzim kisele fosfataze (TRAP), beta-karboksi terminalni deo ukrštenih veza kolagena I (beta-CTx), proizvod jona kalcijuma i neorganskog fosfata (CaxP), iPTH i 25D.

Takođe, bilo je neophodno ispitati raspodelu vrednosti ispitivanih biomarkera u kontrolnoj grupi u odnosu na pol i godine starosti i odrediti referentne vrednosti za sve analizirane biomarkere kod zdrave populacije, tj kontrolne grupe, koje su karakteristične za svaku medicinsku laboratoriju, kako bi se upoređivale sa vrednostima ALP, BALP, TRAP, beta-CTx, jona kalcijuma, magnezijuma i neorganskog fosfata, CaxP, iPTH i 25D kod predijaliznih pacijenata, HD i CAPD pacijenata.

Takođe, bilo je potrebno ispitati raspodelu vrednosti analiziranih biomarkera resorpcije i stvaranja kostiju kod KSBB pacijenata, kao i eventualni uticaj pola i godina starosti. Pošto je ispitivana populacija obuhvatala bolesnike koji su na terapiji različitim vrstama dijalize i različitog trajanja ove terapije planirano je da se ispita u kojoj meri su izmenjene vrednosti ispitivanih biomarkera u odnosu na trajanje dijalize, ali i u kojoj meri se razlikuju ispitivani biomarkeri u odnosu na vrstu dijalize (HD i CAPD).

Pošto su trenutne preporuke da se nivo metabolizma kostiju kod predijaliznih pacijenata i pacijenata na dijalizi procenjuje na osnovu nespecifičnih biomarkera za tkivo kostiju (ALP, jona kalcijuma, magnezijuma, neorganskog fosfata, iPTH i 25D), planirano je da se specifični biomarkeri osteoklasta, osteoblasta i kolagena kostiju, BALP, TRAP i beta-CTx uporede sa preporučenim biomarkerima kod KSBB pacijenata i u odnosu na kontrolnu grupu. U tom smislu, ispitana je korelacija koncentracija BALP, TRAP i beta-CTx sa vrednostima preporučenih biomarkera (ALP, joni kalcijuma, magnezijuma, neorganskog fosfata, CaxP, iPTH i 25D).

Preporuke su da se u odnosu na tri različita nivoa iPTH može proceniti ubrzan, normalan ili usporen metabolizam kostiju, pa je planirano da se ispita u kojoj su meri izmenjene vrednosti specifičnih biomarkera u odnosu na preporučene, u sva tri nivoa vrednosti iPTH (< 150 pg/mL, 150–300 pg/mL, > 300 pg/mL), odnosno koji biomarker najbolje prati niske, srednje i visoke nivoe iPTH, tj. pomoću koga biomarkera je moguće proceniti nizak, normalan ili ubrzan metabolizam kostiju. Takođe, kod KSBB pacijenata adekvatno dozirana terapija vitaminom D, može u velikoj meri sprečiti pogoršanje metabolizma kostiju upravo na osnovu vrednosti specifičnih biomarkera kostiju uz paralelno merenje nivoa 25D. U odnosu na ovu činjenicu, ispitivaće se u kojoj meri su izmenjeni analizirani biomarkeri kod nedovoljnih i dovoljnih nivoa 25D, tj. koji biomarker najbolje korelira sa nivoima 25D. Kao posledica dugotrajne bolesti bubrega i neadekvatnog regulisanja nivoa kalcijuma i fosfora, kod KSBB pacijenata može da se razvije kalcifikacija mekih tkiva, najčešće vaskularna kalcifikacija. Preporuke su da proizvod CaxP bude kontrolisan kako bi se izbegla ektopična kalcifikacija. Zato je bilo potrebno da se ispita kako nivo CaxP prati biomarkere

metabolizma kostiju u sva tri nivoa iPTH, kao i nedovoljne i dovoljne nivoe 25D (< 50 nmol/L i > 50 nmol/L).

Takođe, da bi se potvrdio značaj pojedinačnih biomarkera resorpcije i stvaranja kostiju kod KSBB pacijenata u detekciji smanjenog metabolizma kostiju, potrebno je bilo da se ispituju dijagnostičke vrednosti BALP, TRAP, beta-CTx, kao i preporučenih biomarkera za metabolizam kostiju kod KSBB pacijenata, u odnosu na preporučen granični nivo iPTH (< 100 pg/mL) za adinamičnu bolest kostiju.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. KOMERCIJALNI REAGENSI I HEMIKALIJE

U eksperimentalnom radu su korišćeni sledeći komercijalni test reagensi:

1. HYDRAGEL 7 ISO-PAL komplet reagenasa, PN 4112, Sebia, Evry, Pariz, Francuska
2. Rastvor za odbojavanje, PN 4540, Sebia, Evry, Pariz, Francuska
3. Rastvor za ispiranje, PN 4541, Sebia, Evry, Pariz, Francuska
4. ISO-PAL komercijalna liofilizovana kontrola, 4793, Sebia, Evry, Pariz, Francuska
5. Alkalna fosfataza, OSR6001, Beckman Coulter, Inc., Unated States
6. Kisela fosfataza, OSR6101, Beckman Coulter, Inc., Unated States
7. Kalcijum, OSR60117, Beckman Coulter, Inc., Unated States
8. Neorganski fosfat, OSR6122, Beckman Coulter, Inc., Unated States
9. Magnezijum, OSR6189, Beckman Coulter, Inc., Unated States
10. System Calibrator, 66300, Beckman Coulter, Inc., Unated States
11. Control Level 1, ODC0003, Beckman Coulter, Inc., Unated States
12. Control Level 2, ODC0004, Beckman Coulter, Inc., Unated States
13. Elecsys β -CrossLaps/serum komplet reagenasa, 11972308, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
14. Elecsys β -CrossLaps/serum CalSet (CROSSL Cal1 i CROSSL Cal2), 11972316, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
15. Parathyroid hormone (PTH, intact), 11972103, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
16. PTH CalSet (PTH Cal1 i PTH Cal2), 11972219 122, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
17. PreciControl Bone (PC BONE1, PC BONE2 i PC BONE3), 11972227 122, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
18. 25-OH-Vitamin D3 za HPLC, komplet reagenasa, 195-6530R, Bio-Rad Laboratories, Irvine, CA, Unated States
19. 25-OH-Vitamin D3 za HPLC, analitički kertridž, 195-6539, Bio-Rad Laboratories, Irvine, CA, Unated States

20. Mobile Phase, 195-6537G, 195-6537G, Bio-Rad Laboratories, Irvine, CA, Unated States
21. Reversed Phase Micro-Guard™ Refill Cartridges, 195-6003, Bio-Rad Laboratories, Irvine, CA, Unated States
22. Serum Calibrator Set za HPLC, 195-6536, Bio-Rad Laboratories, Irvine, CA, Unated States
23. Internal Standard Set za HPLC, 195-6545, Bio-Rad Laboratories, Irvine, CA, Unated States
24. Serum Control Set za HPLC (Control 1 i Control 2), 195-6540, Bio-Rad Laboratories, Irvine, CA, Unated States

U eksperimentalnom radu su korišćene sledeće hemikalije i rastvori:

1. Natrijum hlorid (NaCl, Merck, Darmstadt, Germany)
Fiziološki rastvor (0,9%, 0,154 mol/L NaCl) – pripremljen je rastvaranjem 9 g natrijum hlorida u 1L dejonizovane vode.
2. Koncentrovani etanol (96%)
3. Natrijum hidroksid (NaOH, Lachema, Neratovica, Czech Republic)
1 mol/L rastvor NaOH – propremljen je rastvaranjem 4 g natrijum hidroksida u 100 mL dejonizovane vode.
5. Metanol

3.2. PRIBOR I APARATI

U eksperimentalnom radu je korišćen sledeći pribor:

1. vakutajner epruvete za serum, BD Vacutainer ® System, 366430 (Becton and Dickinson Company, Franklin Lakes, NJ, USA)
2. plastične i staklene epruvete sa odgovarajućim stalkovima
3. ependorf i pool epruvete
4. automatske pipete firme "Oxford" sa odgovarajućim nastavcima
5. staklene obične i trbušaste pipete
6. stakleni normalni sudovi, erlenmajeri i menzure za pravljenje rastvora

U eksperimentalnom radu su korišćeni sledeći aparati:

1. Sebia Hydrasis, poluautomatski aparat za elektroforezu
2. Skener
3. Olympus AU2700 analizator, Olympus Diagnostica, Hamburg, Germany
4. Elecsys 2010 analizator, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
5. Bio-Rad HPLC sistem, Bio-Rad Laboratories, Irvine, CA, Unated States
6. digifuga GL centrifuga, Heraeus, Germany
7. mikser "Vortex Genie 2 TM", Lighting, Switzerland
8. analitičke vage, Sartorius, Wien, Austria
9. zamrzivač na -70 °C, SANYO Electic Co, Osaka, Japan

3.3. MATERIJAL

U ovom radu obuhvaćene su tri grupe bolesnika: populacija predijaliznih pacijenata koji imaju krajnji stadijum bolesti bubrega ali koji nisu još na dijalizi, prema klasifikaciji KDOQI vodiča. Predijalizni pacijenti su primljeni na Kliniku za nefrologiju, Kliničkog centra Srbije, radi njihove rutinske kontrole koja se sprovodi radi evaluacije bolesti. Druga grupa bolesnika su bili KSBB pacijenti koji su na hroničnom programu hemodijalize na Klinici za nefrologiju, Kliničkog centra Srbije. Treća grupa je obuhvatala bolesnike sa krajnjim stadijumom bolesti bubrega koji su na programu CAPD u dnevnoj bolnici polikliničkog odeljenja Klinike za nefrologiju, Kliničkog centra Srbije. Biohemijske analize za ove pacijente su određene u laboratoriji Službe za polikliničku laboratorijsku dijagnostiku, u Centru za medicinsku biohemiju, Kliničkog centra Srbije u Beogradu. Ispitivanje je odobreno od strane Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije u Beogradu, dana 13.12.2012. godine pod brojem 5030/9.

Obuhvaćeno je ukupno 266 pacijenata: 40 predijaliznih pacijenata koji imaju GFR < 15 mL/min/1,73 m² (18 žena i 22 muškarca), 114 CAPD pacijenata (49 žena i 65 muškaraca) i 112 pacijenata koji su na hroničnom programu hemodijalize tri puta nedeljno (53 žene i 59 muškaraca). Prosečno trajanje programa HD iznosi 76 meseci, a CAPD 25 meseci. Prosečne godine starosti predijaliznih bolesnika su od 20 do 82

godine, HD bolesnika od 25 do 79 godina, a CAPD bolesnika od 30 do 84 godine. Uzroci bolesti bubrega kod predijaliznih pacijenata bili su: hronični glomerulonefritis (N = 12), hipertenzivna nefropatija (N = 10), hronični pijelonefritis (N = 8), policistična bolest bubrega (N = 4), balkanska endemska nefropatija (N = 4) i drugi (N = 2). Uzroci bolesti bubrega kod HD pacijenata bili su: hronični glomerulonefritis (N = 21), vaskularni nefritis (N = 18), hipertenzivna nefropatija (N = 15), opstruktivna nefropatija (N = 13), dijabetična nefropatija (N = 12), kalkuloza bubrega (N = 10), tubulointersticijalni nefritis (N = 8), nefroangioskleroza (N = 7), policistična bolest bubrega (N = 5) i drugi (N = 3). Uzroci bolesti bubrega kod CAPD pacijenata bili su: hronični glomerulonefritis (N = 19), hipertenzivna nefropatija (N = 17), hronični pijelonefritis (N = 14), policistična bolest bubrega (N = 17), opstruktivna nefropatija (N = 12), dijabetična nefropatija (N = 16), tubulointersticijalni nefritis (N = 10) i drugi (N = 9).

Za određivanje referentnih intervala u ispitivanje je uključeno i 50 zdravih osoba (kontrolna grupa, KG), dobrovoljaca (27 žena i 23 muškarca) starosne dobi od 25 do 70 godina. Uzorci krvi od zdrave populacije su sakupljeni početkom 2010. godine. Osobe su odabrane na osnovu rezultata laboratorijskih testova (bili su u okviru referentnih intervala koji se koriste u Službi za polikliničku laboratorijsku dijagnostiku, Centra za medicinsku biohemiju, Kliničkog centra Srbije) i upitnika popunjenog pre vađenja krvi. Laboratorijski testovi su obuhvatali jetrene biomarkere (bilirubin i enzime), renalne biomarkere (urea, kreatinin, mokraćna kiselina), glukozu, ukupne proteine, laktat dehidrogenazu, C-reaktivni protein, krvnu sliku i nalaz jutarnjeg urina (negativan protein na test trakama i negativan nalaz eritrocita i leukocita u sedimentu urina). Na osnovu upitnika odabrane su osobe bez prisustva hroničnog ili akutnog oboljenja i koje nisu uzimale farmakološki aktivne supstance.

Uzorci krvi predijaliznih pacijenata su sakupljeni između 7 i 9 časova, posle perioda gladovanja, kada su pacijenti dolazili na redovne kontrole, a uzorci krvi HD i CAPD pacijenata su sakupljeni neposredno pre terapije dijalizom. Nakon venepunkcije venske krvi i perioda potrebnog za koagulaciju (oko 45 minuta), krv je centrifugirana 15 minuta na 3000 obrtaja/minuti na sobnoj temperaturi radi odvajanja seruma.

ALP, ACP, kalcijum, magnezijum, neorganski fosfat, beta-CTx, iPTH i BALP su određivani odmah po odvajanju seruma. Proizvod CaxP je izračunavan množenjem izmerenih vrednosti kalcijuma i neorganskog fosfata za svakog pacijenta. Vrednosti TRAP su izračunavane oduzimanjem vrednosti PAP od vrednosti ACP. Ostaci seruma su čuvani na -70 °C najduže 6 meseci po odvajanju seruma. 25D je određen u seriji zamrznutih uzoraka.

Za određivanje biohemijskih parametara korišćeni su komercijalni testovi i analizatori: Sebia Hydrasis, Roche Elecsys 2010, Olympus AU2700 i Bio-Rad HPLC sistem. Pouzdanost izmerenih vrednosti redovno je proveravana određivanjem odgovarajućih komercijalnih kontrola i primenom principa unutrašnje kontrole kvaliteta rada u biohemijskoj laboratoriji.

3.4. METODE

3.4.1. Određivanje aktivnosti ukupne alkalne fosfataze

Aktivnosti ALP u serumu određivane su spektrofotometrijskom metodom na automatskom biohemijskom analizatoru Olympus AU2700 (Olympus Diagnostica GmbH, Hamburg, Germany). Princip se zasniva na merenju brzine konverzije p-nitrofenilfosfata (pNPP) do p-nitrofenola (pNP) u prisustvu magnezijuma, zinka i 2-amino-2-metil-1-propanola (AMP) kao fosfatnog akceptora pri pH 10,4. Promena apsorbance zbog formiranja pNP se meri bihromatski na 410/480 nm i direktno je proporcionalna aktivnosti ALP u uzorku.

Za određivanje ALP korišćeni su komercijalni reagensi firme Beckman Coulter gotovi za upotrebu i direktno se stavljaju na aparat:

- Reagens (OSR6004) - finalna koncentracija reaktivnih sastojaka: 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP) pH 10,4, p-nitrofenil fosfat, HEDTA, cink sulfat, magnezijum acetat i konzervans

- Standard (System calibrator) (66300) – liofilizovan, rastvara se u dejonizovanoj vodi (0,5 mL), sastoji se od humanog seruma sa hemijskim aditivima i odgovarajućim enzimima humanog, životinjskog ili biljnog porekla, koristi se za kalibraciju
- Kontrolni uzorak 1 (QC1 ODC0003) – liofilizovan, rastvara se u dejonizovanoj vodi (5,0 mL), sadrži humani serum sa hemijskim aditivima i odgovarajućim enzimima humanog ili životinjskog porekla, konzervansima i stabilizatorima, koristi se za kontrolu kvaliteta zajedno sa kontrolnim uzorkom 2
- Kontrolni uzorak 2 (QC2 ODC0004) – liofilizovan, rastvara se u dejonizovanoj vodi (5,0 mL), sadrži humani serum sa hemijskim aditivima i odgovarajućim enzimima humanog ili životinjskog porekla, konzervansima i stabilizatorima, koristi se za kontrolu kvaliteta zajedno sa kontrolnim uzorkom 1

Prema uputstvu proizvođača, uzorak seruma stabilan je 7 dana ako se čuva na temperaturi od 2–25 °C; test je linearan u opsegu aktivnosti enzima od 5–1500 IU/L, donja granica detekcije je 1 IU/L, referentni interval za odrasle je 30–120 IU/L, značajne interference su manje od 10% pri koncentraciji bilirubina od 47,9 mmol/L, manje od 10% pri koncentraciji hemoglobina od 4,5 g/L i manje od 3% pri koncentraciji triglicerida od 10 mmol/L.

3.4.2. Određivanje aktivnosti koštanog izoenzima alkalne fosfataze

Aktivnosti BALP u serumu određivane su tehnikom zonske agar gel elektroforeze na poluautomatskom aparatu Hydrasis (Sebia, Francuska). Individualni izoenzimi ALP se razdvajaju tehnikom gel elektroforeze na osnovu razlike u naelektrisanju. Međutim, elektroforetska pokretljivost BALP i JALP je približno ista jer je uslovljena jedino glikolizacijom ili post-translacionim modifikacijama. Potreban je poseban postupak sa uzorkom zato što jetreni, koštani i placentalni izoenzim P1 (kada je prisutan), migriraju zajedno u jednoj širokoj frakciji. Od anode ka katodi, migracija izoenzima je sledeća: J1+BALP (+P1), J2 (makrohepatični ili brzi jetreni izoenzim) i I1, I2 i I3. Kada je prisutan P2 migrira između I1 i I2. U jako ikteričnim uzorcima kompleks alkalne fosfataze i lipoproteina (lipo frakcija) može da se vidi blizu mesta aplikacije. Izuzev

intestinalnih izoenzima, BALP i jetreni izoenzimi imaju na površini ostatke sijalinske kiseline. Razdvajanje L1 i BALP elektroforetskom tehnikom, omogućeno je puštanjem uzorka u duplikatu i nanošenjem reagensa lektina u jednoj traci. Izdvojene frakcije se kvantifikuju na GELSCAN denzitometru (Sebia, Francuska) korišćenjem CCD tehnologije (Coupled Charged Device) pomoću koje je omogućeno da se sa elektroforegrama sa ekrana definišu pojedinačne frakcije, ali i kvantifikuju kao relativna i apsolutna aktivnost pojedinačnog izoenzima u odnosu na poznatu aktivnost ALP. Vrednosti J1 i P1 izoenzima se očitavaju sa trake sa lektinom. Vrednost BALP se izračunava oduzimanjem procenta J1 i eventualno prisutne P1 frakcije od procenta J1+BALP (+P1) frakcije sa trake baz lektina. Druge frakcije, J2, I1, I2, I3, P2 i lipo frakcija se očitavaju sa trake bez lektina.

Za određivanje BALP korišćeni su komercijalni reagensi firme Sebia:

- Hydragel 7 ISO-PAL komplet (PN 4112) - uključuje:
 - agarozne gelove, spremne za upotrebu; svaki gel sadrži 10 g/L agaroze, alkalni pufer pH $9,1 \pm 0,05$, aditive, 0,1 % natrijum azid (nije otrovan u definisanim koncentracijama), a neophodan za optimalno izvođenje metode
 - puferovani trake-sunderi, spremni za upotrebu; svaka traka sadrži alkalni pufer pH $9,3 \pm 0,2$, aditive, 0,5% natrijum azid (nije otrovan u definisanim koncentracijama), koriste se da omoguće kontakt između gela i elektroda na aparatu
 - lektin, liofilizovan, rastvara se sa tačno 0,5 mL fiziološkog rastvora (9 g/L), sadrži aglutinin iz pšeničnih klica, koristi se da odvoji BALP od J1 izoenzima ALP.
 - supstrat, spreman za upotrebu; sadrži 5-bromo-4-hloro-3-indolil fosfat, BCIP) u AMP puferu pH 10,0 i aditive, koristi se za vizualizaciju odvojenih frakcija izoenzima ALP
 - hromogen, spreman za upotrebu; sadrži nitro plavi tetrazolijum (NBT) u vodi, koristi se za pripremu supstrata za vizualizaciju u odnosu (1:4)

- aplikatori, polugotovi, za nanošenje uzorka i lektina na tačno definisane pozicije na gel, potrebno je odvojiti plastični vrh aplikatora pre postavljanja na gel
 - tanki filter papiri, polugotovi, koriste se za upijanje viška vlage sa površine gela pre nanošenja uzorka
 - debeli filter papiri, polugotovi, koriste se za upijanje viška reagensa nakon enzimatske vizualizacije
 - plastična maska, za jednokratnu upotrebu, koristi se da zaštiti gel od sušenja za vreme elektroforetske migracije
- Rastvor za odbojavanje (PN 4540), razblažava se sa dejonizovanom vodom (5 mL rastvora u 5 L vode), sadrži limunsku kiselinu, koristi se za ispiranje gela nakon enzimatske vizualizacije i sušenja gela, kao i za ispiranje dela aparata gde se gel boji
 - Rastvor za ispiranje (PN 4541), razblažava se sa dejonizovanom vodom (cela bočica u 5 L vode), sadrži alkalni pufer pH 8,8 i natrijum azid (0,625%), služi za čišćenje dela aparata gde se gel boji
 - Kontrolni uzorak ISO-PAL (PN 4793) – liofilizovan, rastvara se u dejonizovanoj vodi (0,5 mL), sadrži pool humanih seruma sa izoenzimima alkalne fosfataze, koristi se kao normalni humani serum za kontrolu kvaliteta

Prema uputstvu proizvođača, uzorak seruma stabilan je 7 dana na 2–8 °C; donja granica detekcije je od 2 do 3 IU/L pojedinačnih izoenzima ALP, test je linearan do 600 IU/L ALP, a za vrednosti preko se preporučuje razblaženje uzorka seruma sa fiziološkim rastvorom; preporučene vrednosti BALP za žene su ≤ 44 IU/L, za muškarce ≤ 73 IU/L, a za decu ≤ 370 IU/L.

3.4.3. Određivanje aktivnosti tartarat rezistentne kisele fosfataze

Aktivnosti ACP u serumu određivane su spektrofotometrijskom metodom na automatskom biohemijском analizatoru Olympus AU2700 (Olympus Diagnostica GmbH, Hamburg, Germany). Princip se zasniva na Hilmanovoj reakciji u kojoj kiselna fosfataza katalizuje reakciju prevođenja 1 naftil fosfata u prisustvu vode u fosfat i 1-

naftol, a 1-naftol reaguje sa hromogenim supstratom Fast Red TR so i dovodi do stvaranja azo boje. Količina boje je direktno proporcionalna aktivnosti ACP. Za određivanje aktivnosti TRAP, po preporuci proizvođača, koristi se dodatno i neprostatična ACP metoda. Dodatkom tartarata inhibira se PAP, čija se aktivnost meri, a aktivnost TRAP se dobija oduzimanjem aktivnosti ACP i PAP, što može da se podese kao automatsko preračunavanje aktivnosti TRAP u softveru programa.

Za određivanje ACP korišćeni su komercijalni reagensi firme Beckman Coulter gotovi za upotrebu i direktno se stavljaju na aparat:

- Reagens (OSR6101) – finalna koncentracija reaktivnih sastojaka:
 - za ukupnu ACP metodu: citratni pufer (pH = 4,8), 1-naftil fosfat, Fast Red TR so, Pentandiol
 - za neprostatičnu ACP metodu: tartarat, citratni pufer (pH = 4,8), 1-naftil fosfat, Fast Red TR so, Pentandiol
- Standard (System calibrator) (66300) – liofilizovan, rastvara se u dejonizovanoj vodi (0,5 mL), sastoji se od humanog seruma sa hemijskim aditivima i odgovarajućim enzimima humanog, životinjskog ili biljnog porekla, koristi se za kalibraciju
- Kontrolni uzorak 1 (QC1 ODC0003) – liofilizovan, rastvara se u dejonizovanoj vodi (5,0 mL), sadrži humani serum sa hemijskim aditivima i odgovarajućim enzimima humanog ili životinjskog porekla, konzervansima i stabilizatorima, koristi se za kontrolu kvaliteta zajedno sa kontrolnim uzorkom 2
- Kontrolni uzorak 2 (QC2 ODC0004) – liofilizovan, rastvara se u dejonizovanoj vodi (5,0 mL), sadrži humani serum sa hemijskim aditivima i odgovarajućim enzimima humanog ili životinjskog porekla, konzervansima i stabilizatorima, koristi se za kontrolu kvaliteta zajedno sa kontrolnim uzorkom 1

Prema uputstvu proizvođača serum treba odvojiti odmah od ćelija i dodati 1 kap stabilizatora (ACP St) na 1 mL uzorka, dvojeni serum bez dodatka stabilizatora stabilan je 15 minuta ako se čuva na 15–25 °C; treba izbegavati ikterične, lipemične i hemolizovane uzorke; referentne vrednosti su < 7 IU/L, test je linearan u opsegu aktivnosti enzima 0–100 IU/L, najniži nivo detekcije iznosi 0,05 IU/L.

3.4.4. Određivanje koncentracije kalcijuma

Koncentracije kalcijuma određivane su spektrofotometrijskom metodom na automatskom biohemijском analizatoru Olympus AU2700 (Olympus Diagnostica GmbH, Hamburg, Germany). Princip se zasniva na reakciji kalcijum jona (Ca^{2+}) sa Arsenazo III (2,2'-[1,8-Dihidroksi-3,6-disulfonaftilen-2,7-bisazo]-bisbenzenearsonična kiselina) pri čemu se formira intenzivan ljubičast kompleks, bihromatski se meri apsorbanacija Ca-Arsenazo III kompleksa na 660/700 nm. Nastalo povećanje apsorbanacije u reakcionoj smeši je direktno proporcionalno koncentraciji kalcijuma u uzorku. Magnezijum ne utiče značajno na određivanje kalcijuma koje koristi Arsenazo III.

Za određivanje kalcijuma korišćeni su komercijalni reagensi firme Beckman Coulter gotovi za upotrebu i direktno se stavljaju na aparat:

- Reagens (OSR60117) – finalna koncentracija reaktivnih sastojaka:
 - Imidazol (pH 6,9), Arsenazo III (0,1–0,2%), Triton X-100, Konzervansi
- Standard (System calibrator) (66300) – liofilizovan, rastvara se u dejonizovanoj vodi (0,5 mL), sastoji se od humanog seruma sa hemijskim aditivima i odgovarajućim enzimima humanog, životinjskog ili biljnog porekla, koristi se za kalibraciju
- Kontrolni uzorak 1 (QC1 ODC0003) – liofilizovan, rastvara se u dejonizovanoj vodi (5,0 mL), sadrži humani serum sa hemijskim aditivima i odgovarajućim enzimima humanog ili životinjskog porekla, konzervansima i stabilizatorima, koristi se za kontrolu kvaliteta zajedno sa kontrolnim uzorkom 2
- Kontrolni uzorak 2 (QC2 ODC0004) – liofilizovan, rastvara se u dejonizovanoj vodi (5,0 mL), sadrži humani serum sa hemijskim aditivima i odgovarajućim enzimima humanog ili životinjskog porekla, konzervansima i stabilizatorima, koristi se za kontrolu kvaliteta zajedno sa kontrolnim uzorkom 1

Prema preporuci proizvođača uzorak seruma stabilan je 7 dana na 15–25 °C, a 3 nedelje na 2–8 °C, referentni interval za odrasle je 2,20–2,65 mmol/L, test je linearan u opsegu koncentracija od 1–5 mmol/L, najniži nivo detekcije je 0,01 mmol/L.

3.4.5. Određivanje koncentracije magnezijuma

Koncentracije magnezijuma u serumu su određivane spektrofotometrijskom metodom na automatskom biohemijском analizatoru Olympus AU2700 (Olympus Diagnostica GmbH, Hamburg, Germany). Princip se zasniva na direktnoj metodi u kojoj magnezijum joni reaguju u jako baznoj sredini pri čemu se stvara obojeni kompleks sa bojom ksilidil plavo. Meri se apsorbancija stvorene boje bihromatski na 520/800 nm i proporcionalna je koncentraciji magnezijuma u uzorku. Intreferencija koja potiče od prisustva kalcijuma se eliminiše dodatkom glikoletardiamin-N,N,N',N'- tetrasirćetne kiseline (GEDTA).

Za određivanje magnezijuma korišćeni su komercijalni reagensi firme Beckman Coulter gotovi za upotrebu i direktno se stavljaju na aparat:

- Reagens (OSR6189) – finalna koncentracija reaktivnih sastojaka:
-amino-n kaproinska kiselina, tris pufer, glikoletardiamin-N,N,N',N'- tetrasirćetne kiselina, ksilidil plavo
- Standard (System calibrator) (66300) – liofilizovan, rastvara se u dejonizovanoj vodi (0,5 mL), sastoji se od humanog seruma sa hemijskim aditivima i odgovarajućim enzimima humanog, životinjskog ili biljnog porekla, koristi se za kalibraciju
- Kontrolni uzorak 1 (QC1 ODC0003) – liofilizovan, rastvara se u dejonizovanoj vodi (5,0 mL), sadrži humani serum sa hemijskim aditivima i odgovarajućim enzimima humanog ili životinjskog porekla, konzervansima i stabilizatorima, koristi se za kontrolu kvaliteta zajedno sa kontrolnim uzorkom 2
- Kontrolni uzorak 2 (QC2 ODC0004) – liofilizovan, rastvara se u dejonizovanoj vodi (5,0 mL), sadrži humani serum sa hemijskim aditivima i odgovarajućim enzimima humanog ili životinjskog porekla, konzervansima i stabilizatorima, koristi se za kontrolu kvaliteta zajedno sa kontrolnim uzorkom 1

Prema uputstvu proizvođača uzorak seruma je stabilan 7 dana na 15–25 °C, referentni interval za muškarce je 0,73–1,06 mmol/L, a za žene 0,77–1,03 mmol/L, test je linearan u opsegu koncentracija od 0,2–3,3 mmol/L, a najniži nivo detekcije je 0,01 mmol/L.

3.4.6. Određivanje koncentracije neorganskog fosfata

Koncentracije neorganskog fosfata u serumu su određivane su spektrofotometrijskom metodom na automatskom biohemijskom analizatoru Olympus AU2700 (Olympus Diagnostica GmbH, Hamburg, Germany). Princip testa se zasniva na reakciji neorganskog fosfata sa molibdatom pri čemu se stvara heteropolikiseli kompleks. Korišćenjem surfaktanata eliminiše se potreba za pripremom filtrata bez proteina. Apsorbancija na 340/380 nm je direktno proporcionalna koncentraciji neorganskog fosfata u uzorku.

Za određivanje neorganskog fosfata korišćeni su komercijalni reagensi firme Beckman Coulter gotovi za upotrebu i direktno se stavljaju na aparat:

- Reagens (OSR6122) - finalna koncentracija reaktivnih sastojaka:
 - sumporna kiselina, amonijumheptamolibdat, glicin, konzervans
- Standard (System calibrator) (66300) – liofilizovan, rastvara se u dejonizovanoj vodi (0,5 mL), sastoji se od humanog seruma sa hemijskim aditivima i odgovarajućim enzimima humanog, životinjskog ili biljnog porekla, koristi se za kalibraciju
- Kontrolni uzorak 1 (QC1 ODC0003) – liofilizovan, rastvara se u dejonizovanoj vodi (5,0 mL), sadrži humani serum sa hemijskim aditivima i odgovarajućim enzimima humanog ili životinjskog porekla, konzervansima i stabilizatorima, koristi se za kontrolu kvaliteta zajedno sa kontrolnim uzorkom 2
- Kontrolni uzorak 2 (QC2 ODC0004) – liofilizovan, rastvara se u dejonizovanoj vodi (5,0 mL), sadrži humani serum sa hemijskim aditivima i odgovarajućim enzimima humanog ili životinjskog porekla, konzervansima i stabilizatorima, koristi se za kontrolu kvaliteta zajedno sa kontrolnim uzorkom 1

Prema uputstvu proizvođača uzorak seruma je stabilan 4 dana ukoliko se čuva na 2–8 °C i 1 dan ako se čuva na 15–25 °C, referentni interval je 0,81–1,45 mmol/L, test je linearan u opsegu koncentracija od 0,32–6,40 mmol/L, najniži nivo detekcije je 0,10 mmol/L.

3.4.7. Određivanje koncentracije betaCTx

Koncentracije beta-CTx su određivane ECLIA metodom na Roche Elecsys 2010 analizatoru (Roche Diagnostics GmbH). Princip je sendvič imunoesej koji koristi biotinom obložena monoklonska anti beta-CTx antitela, kao i mikropartikule obložene streptavidinom i monoklonsko anti beta-CTx specifično antitelo u kompleksu sa rutenijumom. Nakon dve inkubacije sa specifičnim antitelima reakciona smeša se aspirira u mernu ćeliju gde mikropartikule magnetski oblažu površinu elektrode. Nevezana supstanca se uklanja sa ProCell rastvorom, a napon na elektrodi dovodi do hemiluminiscentne emisije čiji se intenzitet meri fotomultiplikatorom. Rezultati se određuju iz kalibracione krive i automatski preračunavaju u koncentracije za svaki uzorak.

Za određivanje korišćeni su reagensi firme Roche gotovi za upotrebu i direktno se stavljaju na aparat:

- Elecsys β -CrossLaps kompleti reagenasa (11972308) – uključuje:
 - Streptavidinom obložene mikropartikule (0,72 mg/mL; vezujući kapacitet – 470 ng biotina/mg mikropartikula i konzervanse
 - Anti β -CrossLaps-antitelo~biotin (mišje monoklonsko anti β -CrossLaps antitelo obloženo biotinom (2,5 mg/L)), fosfatni pufer (100 mmol/L) pH 7,2 i konzervanse
 - Anti β -CrossLaps antitelo u kompleksu sa rutenijumom (mišje monoklonsko anti β -CrossLaps, 2,4 mg/L rutenijuma), fosfatni pufer (100 mmol/L, pH 7,2) i konzervanse
- Standardi β -CrossLaps CalSet (11972316), CROSS Cal1 i CROSS Cal2, spremni za upotrebu, sadrže matriks konjskog seruma sa sintetskim peptidom (β -

CTx) u dve merne koncentracije (0,05 ng/mL i 2,0 ng/mL), koristi se za kalibraciju

- Kontrolni uzorci (PC BONE 1-3, 11972227), liofilizovan, rastvara se u dejonizovanoj vodi (2,0 mL), sadrži sintetski peptid β -CTx u matriksu konjskog seruma, koristi se za kontrolu kvaliteta

Prema uputstvu proizvođača uzorak seruma stabilan je 8 sati na 20–25 °C ili 8 sati na 4–8 °C, 3 meseca na -20 °C ili duže na -70 °C, izbegavati ponovno zamrzavanje; merni opseg je 0,01–6,00 ng/mL, vrednosti ispod ili iznad donje ili gornje granice mernog opsega se izražavaju kao < 0,01 ng/mL ili > 6,00 ng/mL, proizvođač ne preporučuje razblaženje zbog širokog opsega merenja; očekivane vrednosti za muškarce 30–50 godina < 0,584 ng/mL, 50–70 godina < 0,704, > 70 godina < 0,854, za žene pre menopauze < 0,573, a za žene posle menopauze < 1,008; donja granica detekcije (analitička osetljivost) je 0,01 ng/mL, a funkcionalna osetljivost je 0,07 ng/mL.

3.4.8. Određivanje koncentracije iPTH

Koncentracije iPTH u serumu su određivane ECLIA metodom na Roche Elecsys 2010 analizatoru (Roche Diagnostics GmbH). Princip je sendvič imunoesej koji koristi biotinom obložena monoklonska anti PTH antitela, kao i mikropartikule obložene streptavidinom i monoklonsko anti PTH specifično antitelo u kompleksu sa rutenijumom. Nakon dve inkubacije sa specifičnim antitelima reakciona smeša se aspirira u mernu ćeliju gde mikropartikule magnetski oblažu površinu elektrode. Nevezana supstanca se uklanja sa ProCell rastvorom, a napon na elektrodi dovodi do hemiluminiscentne emisije čiji se intenzitet meri fotomultiplikatorom. Rezultati se određuju iz kalibracione krive i automatski preračunavaju u koncentracije za svaki uzorak.

Za određivanje korišćeni su reagensi firme Roche gotovi za upotrebu i direktno se stavljaju na aparat:

- Elecsys iPTH kompleti reagenasa (11972103) – uključuje:

- Streptavidinom obložene mikropartikule (0,72 mg/mL; vezujući kapacitet – 470 ng biotina/mg mikropartikula i konzervanse
- Anti-iPTH antitelo ~ biotin (mišje monoklonsko anti-iPTH antitelo obloženo biotinom (2,5 mg/L)), fosfatni pufer (100 mmol/L) pH 7,2 i konzervanse
- Anti-iPTH antitelo u kompleksu sa rutenijumom (mišje monoklonsko anti-iPTH, 2,4 mg/L rutenijuma), fosfatni pufer (100 mmol/L, pH 7,2) i konzervanse
- Standardi iPTH CalSet (11972219), PTH Cal1 i PTH Cal2, spremni za upotrebu, sadrže matriks humanog seruma sa sintetskim peptidom (PTH) u dve merne koncentracije (0,005 pg/mL i 4500 pg/mL), koristi se za kalibraciju
- Kontrolni uzorci (PC BONE 1-3, 11972227), liofilizovan, rastvara se u dejonizovanoj vodi (2,0 mL), sadrži sintetski peptid PTH u matriksu konjskog seruma, koristi se za kontrolu kvaliteta

Prema uputstvu proizvođača uzorak seruma je stabilan 8 sati na 15–25 °C, 2 dana na 2–8 °C ili 6 meseci na -20 °C; merni opseg je 1,20–5000 pg/mL, vrednosti ispod ili iznad donje ili gornje granice mernog opsega se izražavaju kao < 1,20 pg/mL ili > 5000 pg/mL, proizvođač ne preporučuje razblaženje zbog širokog opsega merenja; očekivane vrednosti su 15–65 pg/mL; donja granica detekcije (analitička osetljivost) je 1,20 pg/mL, a funkcionalna osetljivost je 6,0 pg/mL.

Mada su prvobitno koncentracije iPTH kod predijaliznih pacijenata i pacijenata na dijalizi određivane IRMA metodom (IRA, CIS Bio international, Saclay, France), zbog određivanja iPTH u serumima KG, metodom ECLIA, naknadno su određivane koncentracije iPTH metodom ECLIA i za predijalizne pacijente i pacijente na dijalizi. Vrednosti iPTH određene IRMA i ECLIA metodom su pokazivale dobru međusobnu korelaciju, tako da su u ovom doktorskom radu, statistički obrađene vrednosti iPTH koje su određene ECLIA metodom za sve analizirane grupe. Korelacija vrednosti iPTH za predijalizne, HD i CAPD pacijente određene sa dve navedene metode prikazana je u *Tabeli I.*

Tabela I Korelacija vrednosti iPTH određenih IRMA i ECLIA metodom u serumima predijaliznih (PreD), HD i CAPD pacijenata

Analizirane grupe	iPTH, pg/mL (IRMA) $\bar{x} \pm Sd$	iPTH, pg/mL (ECLIA) $\bar{x} \pm Sd$	r (p*)
PreD	351,0 ± 192,4	350,7 ± 197,8	0,9982
HD	142,4 ± 91,5	115,4 ± 82,2	0,9967
CAPD	128,0 ± 87,5	171,4 ± 138,4	0,9973

*p < 0,001

3.4.9. Određivanje koncentracije 25-hidroksi vitamina D

Koncentracije 25D u serumu određivane su HPLC metodom upotrebom reverznih faza za razdvajanje i UV detekcijom na 265 nm (ChromLine^R Clinical HPLC System software Version 4.20B). Za precipitaciju se koriste tri različita precipitaciona reagensa, a za analizu se koristi supernatant, paralelno uz interni standard. Za separaciju se koristi izokratski HPLC sistem, a nakon razdvajanja i UV detekcije sledi kvantitativna evaluacija.

Za određivanje 25D korišćeni su komercijalni reagensi firme Bio-Rad:

- Reagens komplet (195-6530R) - koji uključuje:
 - reagens A, spreman za upotrebu, sadrži acetonitril (50 mL)
 - reagens B, spreman za upotrebu, sadrži etanol (250 mL)
 - reagens 1, spreman za upotrebu, sadrži trihlor sirćetnu kiselinu (1,0 g), rastvara se u reagensu A (10 mL)
 - reagens 2, spreman za upotrebu, (40 mL)
 - reagens 3, spreman za upotrebu, sadrži kalijum fosfat (25 mL)
 - mobilnu fazu, spremna za upotrebu, sadrži metanol (2400 mL)
- Interni standard (195-6545), liofilizovan, rastvara se sa reagensom A (8 mL), koristi se za kalibraciju i preračunavanje koncentracije analize i kompenzaciju eventualnih gubitaka tokom pripreme uzoraka
- Set kalibratora (195-6536), liofilizovan, rastvara se u destilovanoj vodi (3 mL), koristi se za kalibraciju

- Set kontrolnih seruma (195–6540), (Kontrola 1 i 2), liofilizovani, rastvaraju se u destilovanoj vodi (3,0 mL)

Interni standard i reagensi 1, 2 i 3 se dodaju u svaku vrstu uzorka (kalibrator, kontrole i analizu) i nakon centrifugiranja analizira se supernatant sve tri vrste uzorka. Za izračunavanje koncentracije 25D u serumu potrebni su sledeći podaci: pik ili maksimum supstance A u hromatogramu uzorka (A uzorka), pik ili maksimum supstance A u hromatogramu kalibracionog standarda (A standarda), pik ili maksimum internog standarda u hromatogramu uzorka (IS uzorka), pik ili maksimum internog standarda u hromatogramu kalibracionog standarda (IS standarda) i koncentracija C supstance u kalibracionom standardu (C standard). Koncentracija 25D u uzorku (nmol/L) se izračunava iz količnika proizvoda A uzorka x IS standarda i A standarda x IS uzorka pomnoženo sa C standard.

Prema uputstvu proizvođača, uzorak seruma stabilan je 5 dana na 2–8 °C, a do 6 meseci na -20 °C, test je linearan do 250 ng/mL, donja granica detekcije je 5 ng/mL, rikaveri testa je 97,7%, normalan opseg u letnjem periodu je 20–120 ng/mL, blagi nedostatak zimi je 10–50 mg/mL, srednji nedostatak je 4–10 ng/mL, a teški nedostatak je < 4 ng/mL.

3.5. ANALIZA PODATAKA

U radu su izračunavani sledeći statistički parametri:

- srednja vrednost (\bar{x}), standardna devijacija (Sd) i koeficijent varijacije (Kv)
- medijana (Me) i percentilne vrednosti
- interval pouzdanosti (CI, Confidence Interval)
- Pearsonov koeficijent korelacije
- Spearmanov koeficijent korelacije
- Površina ispod ROC krive (AUC); standardna greška (SE), „cut-off“ vrednost.

U radu su primenjene sledeće statističke metode:

- Kolmogorov-Smirnov test
- parametarski Student t-test
- neparametarski t-test (Mann-Whitney U-test)
- parametarska korelaciona analiza (Pearsonov test)
- neparametarska korelaciona analiza (Spearmanov test)
- parametarska analiza varijanse (ANOVA test)
- neparametarska analiza varijanse (Kruskal-Wallisov test)
- Analiza ROC (*Receiver Operating Characteristic*) krive

Za statističku analizu i dobijanje dijagrama korišćeni su kompjuterski statistički programi SPSS Statistics for Windows, verzija 17.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois) i MedCalc software, 2008, Mariakerke, Belgium).

4. REZULTATI

4.1. ANALITIČKE KARAKTERISTIKE METODA ZA ODREĐIVANJE ISPITIVANIH BIOMARKERA

Pouzdanost korišćenih testova za sve biomarkere koji su određivani u serumu je ispitana određivanjem nepreciznosti u seriji i nepreciznosti iz dana u dan. Nepreciznost u seriji je ispitana 10 puta ponovljenim određivanjem u jednoj seriji u kontrolnim uzorcima i *pool*-ovima seruma. Nepreciznost iz dana u dan (između serija) je ispitivana određivanjem istih kontrolnih uzoraka seruma i *pool*-ova u toku uzastopnih 10 dana. Izračunati statistički parametri (\bar{x} – srednja vrednost, *Sd* – standardna devijacija, *Kv* – koeficijent varijacije) ispitivanja nepreciznosti prikazani su u *Tabelama II–X*. Vrednosti statističkih parametara prikazanih u *Tabelama II–X* ukazuju da se određivanje ispitivanih biomarkera može smatrati pouzdanim za ostvarivanje ciljeva ovog ispitivanja, s obzirom da su dobijene vrednosti *Kv* bile niže od 5%.

Tabela II Nepreciznost u seriji i iz dana u dan metode za određivanje ALP (IU/L)

Uzorak	Nepreciznost u seriji			Nepreciznost iz dana u dan		
	\bar{x}	<i>Sd</i>	<i>Kv</i> (%)	\bar{x}	<i>Sd</i>	<i>Kv</i> (%)
Pool serum 1	23	0,5	2,0	30	0,5	1,7
Pool serum 2	254	1,6	0,6	264	1,3	0,5
Kontrolni serum 1	64	1,1	1,7	66	1,1	1,6
Kontrolni serum 2	178	3,0	1,7	169	0,9	0,5

Tabela III Nepreciznost u seriji i iz dana u dan metode za određivanje BALP (IU/L)

Uzorak	Nepreciznost u seriji			Nepreciznost iz dana u dan		
	\bar{x}	<i>Sd</i>	<i>Kv</i> (%)	\bar{x}	<i>Sd</i>	<i>Kv</i> (%)
Pool serum 1	42	1,4	3,3	47	1,7	3,6
Pool serum 2	79	2,4	2,9	72	2,1	2,9
Kontrolni serum 1	56	1,9	3,4	52	2,3	4,2

Tabela IV Nepreciznost u seriji i iz dana u dan metode za određivanje TRAP (IU/L)

Uzorak	Nepreciznost u seriji			Nepreciznost iz dana u dan		
	\bar{x}	Sd	Kv (%)	\bar{x}	Sd	Kv (%)
Pool serum 1	6	0,1	0,6	6	0,1	1,2
Kontrolni serum 1	7	0,1	1,5	8	0,1	1,1
Kontrolni serum 2	15	0,2	0,9	17	0,2	0,7

Tabela V Nepreciznost u seriji i iz dana u dan metode za određivanje betaCTx (ng/mL)

Uzorak	Nepreciznost u seriji			Nepreciznost iz dana u dan		
	\bar{x}	Sd	Kv (%)	\bar{x}	Sd	Kv (%)
Pool serum 1	0,41	0,008	1,9	0,52	0,012	2,3
Pool serum 2	3,42	0,031	0,9	3,55	0,029	0,8
Kontrolni serum 1	0,82	0,017	2,1	0,89	0,021	2,4
Kontrolni serum 2	3,12	0,069	2,2	3,19	0,072	2,3

Tabela VI Nepreciznost u seriji i iz dana u dan metode za određivanje jona kalcijuma (mmol/L)

Uzorak	Nepreciznost u seriji			Nepreciznost iz dana u dan		
	\bar{x}	Sd	Kv (%)	\bar{x}	Sd	Kv (%)
Pool serum 1	1,72	0,031	1,7	1,84	0,041	2,1
Pool serum 2	3,31	0,034	0,9	3,25	0,032	0,9
Kontrolni serum 1	1,93	0,023	2,1	1,99	0,024	1,0
Kontrolni serum 2	3,42	0,032	0,9	3,51	0,045	1,1

Tabela VII Nepreciznost u seriji i iz dana u dan metode za određivanje jona magnezijuma (mmol/L)

Uzorak	Nepreciznost u seriji			Nepreciznost iz dana u dan		
	\bar{x}	Sd	Kv (%)	\bar{x}	Sd	Kv (%)
Pool serum 1	0,82	0,011	1,2	0,81	0,013	1,2
Pool serum 2	3,25	0,024	0,6	3,05	0,021	0,7
Kontrolni serum 1	1,09	0,026	1,8	1,19	0,016	0,8
Kontrolni serum 2	3,45	0,035	0,9	3,56	0,024	0,6

Tabela VIII Nepreciznost u seriji i iz dana u dan metode za određivanje neorganskog fosfata (mmol/L)

Uzorak	Nepreciznost u seriji			Nepreciznost iz dana u dan		
	\bar{x}	Sd	Kv (%)	\bar{x}	Sd	Kv (%)
Pool serum 1	1,05	0,013	0,9	0,98	0,017	1,0
Pool serum 2	2,11	0,024	0,9	2,99	0,026	0,7
Kontrolni serum 1	1,12	0,023	1,8	1,21	0,015	0,8
Kontrolni serum 2	2,01	0,022	0,9	3,36	0,023	0,6

Tabela IX Nepreciznost u seriji i iz dana u dan metode za određivanje iPTH (pg/mL)

Uzorak	Nepreciznost u seriji			Nepreciznost iz dana u dan		
	\bar{x}	Sd	Kv (%)	\bar{x}	Sd	Kv (%)
Pool serum 1	26,5	0,47	1,8	27,4	0,52	1,9
Pool serum 2	527,4	10,03	1,9	515,7	11,03	2,1
Kontrolni serum 1	57,9	0,82	1,4	61,2	1,08	1,7
Kontrolni serum 2	654,3	11,27	1,7	679,5	12,20	1,8

Tabela X Nepreciznost u seriji i iz dana u dan metode za određivanje 25D (nmol/L)

Uzorak	Nepreciznost u seriji			Nepreciznost iz dana u dan		
	\bar{x}	Sd	Kv (%)	\bar{x}	Sd	Kv (%)
Pool serum 1	64,2	1,86	2,9	58,3	1,75	3,0
Kontrolni serum 1	23,5	0,87	3,7	24,9	1,14	4,6
Kontrolni serum 2	91,7	2,11	2,3	92,7	1,76	1,9

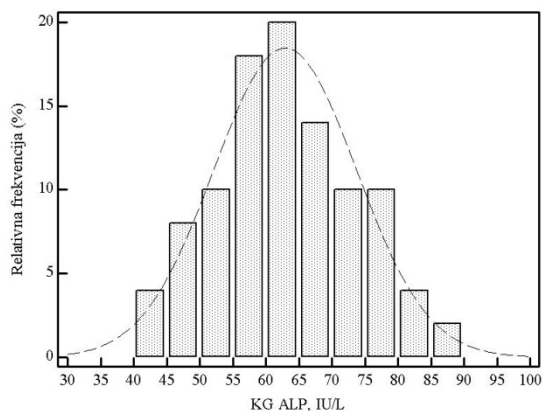
4.2. VREDNOSTI ISPITIVANIH BIOMARKERA U KONTROLNOJ GRUPI

Radi dobijanja referentnih vrednosti parametara određivanih u ovom ispitivanju, određene su aktivnosti, odnosno koncentracije ALP, BALP, TRAP, beta-CTx, kalcijuma, neorganskog fosfata, magnezijuma, CaxP, iPTH i 25D u serumima kontrolne grupe (zdrave osobe, dobrovoljaci). Kontrolnu grupu je činilo 50 zdravih osoba, 23 muškarca (46%) i 27 žena (54%), starosne dobi od 25 do 70 godina, koji su odabrani direktnom metodom. Pri uključivanju osoba u kontrolnu grupu primenjeni su neophodni kriterijumi kao što su odsustvo bolesti, neunošenje farmakološki aktivnih supstanci i normalno fiziološko stanje. U *Tabeli XI* prikazani su dobijeni statistički podaci za kontrolnu grupu.

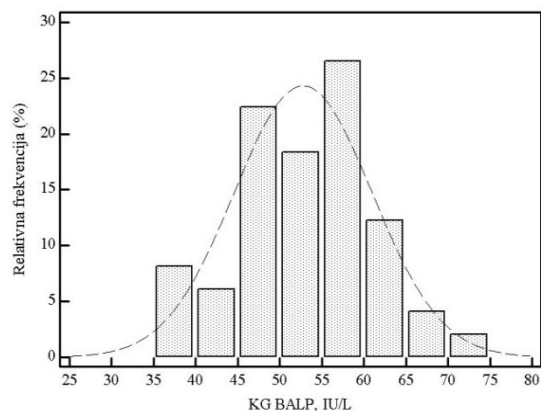
Tabela XI Statistički parametri određivanja ispitivanih biomarkera u kontrolnoj grupi

Biomarkeri	$\bar{x} \pm Sd$	Medijana (opseg)
ALP (IU/L)	63 ± 10,8	69 (43–87)
BALP (IU/L)	53 ± 8,1	53 (36–70)
TRAP (IU/L)	5 ± 1,2	5 (3–6)
Beta-CTx (ng/mL)	1,43 ± 0,653	1,35 (0,37–3,01)
Kalcijum (mmol/L)	2,52 ± 0,091	2,53 (2,31–2,73)
Magnezijum (mmol/L)	0,99 ± 0,064	0,99 (0,87–1,10)
Neorganski fosfat (mmol/L)	1,25 ± 0,135	1,25 (1,00–1,56)
CaxP (mmol²/L²)	2,9 ± 0,56	2,90 (1,72–4,30)
iPTH (pg/mL)	40,1 ± 9,69	38 (23–61)
25D (nmol/L)	74,7 ± 10,47	73,5 (52–97)

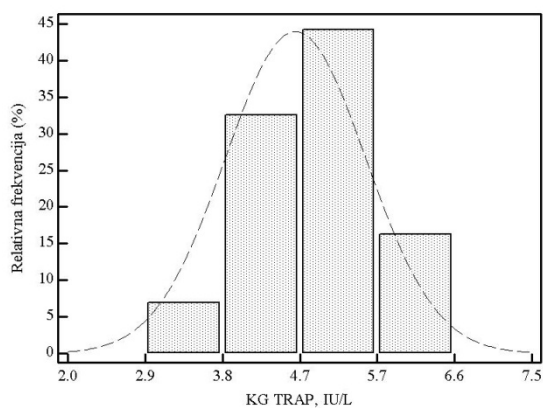
Primenom Kolmogorov-Smirnov testa ispitano je da li vrednosti određivanih biomarkera (ALP, BALP, TRAP, beta-CTx, kalcijuma, neorganskog fosfata, magnezijuma, CaxP, iPTH i 25D) u serumu prate Gauss-ovu raspodelu u kontrolnoj grupi. Histogrami frekvencija vrednosti biomarkera u kontrolnoj grupi prikazani su na *Slici 1* i *Slici 2*.



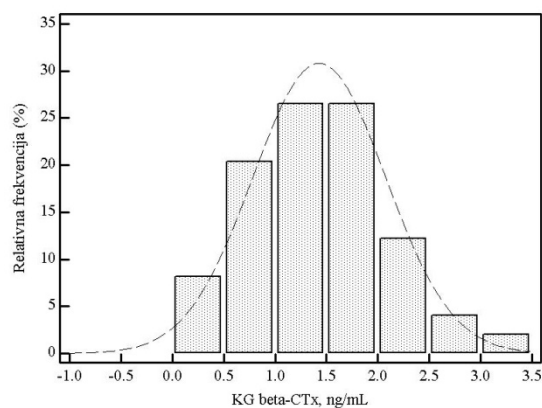
a)



b)

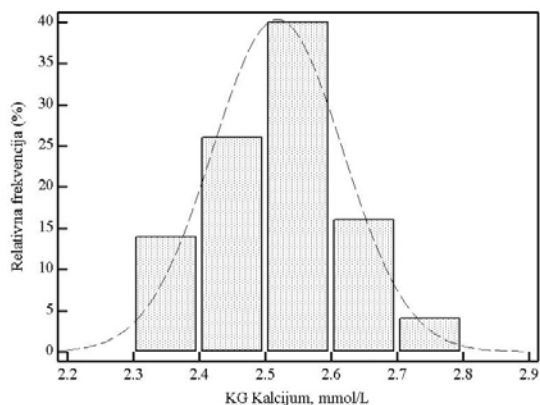


v)

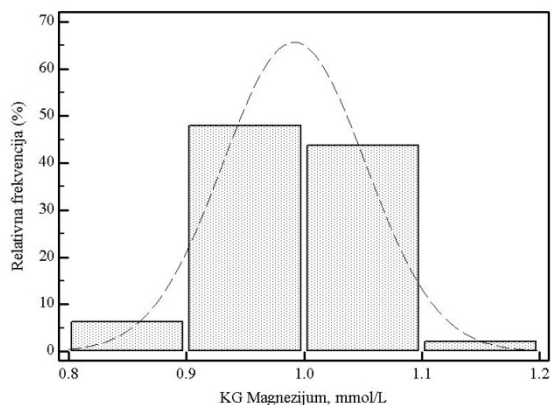


g)

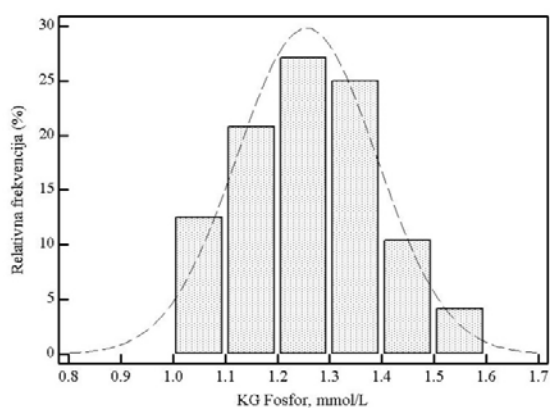
Slika 1. Distribucija relativnih frekvencija a) aktivnosti ukupne alkalne fosfataze (ALP), b) aktivnosti koštanog izoenzima alkalne fosfataze (BALP), v) aktivnosti tartarat rezistentne kisele fosfataze (TRAP) i g) koncentracija beta-karboksi terminalnog dela ukrštenih veza kolagena I (beta-CTx) u kontrolnoj grupi (KG)



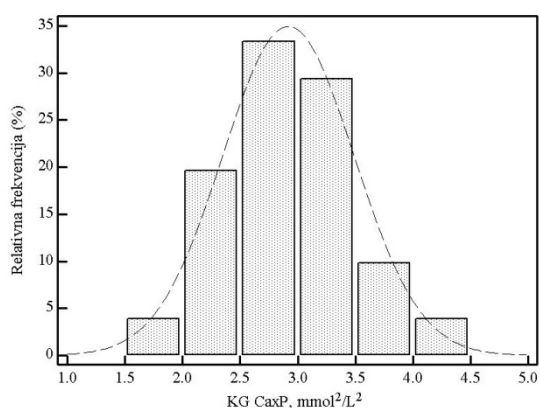
a)



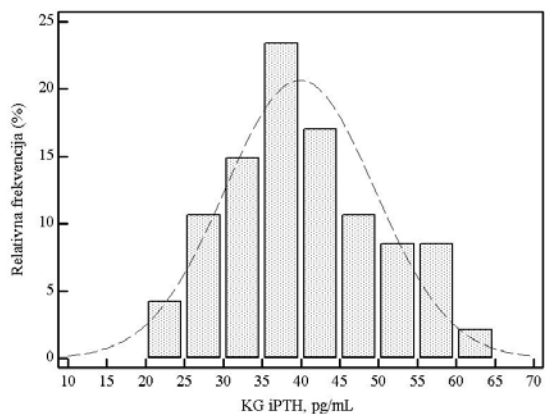
b)



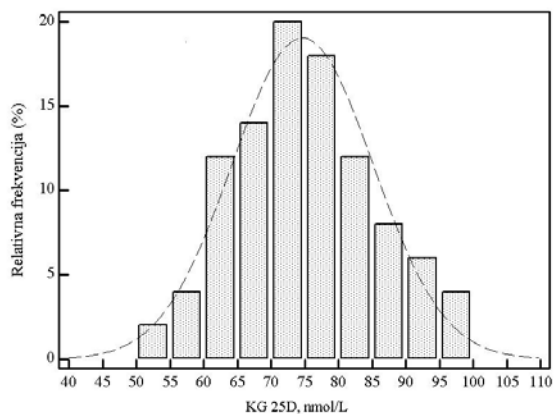
v)



g)



d)



đ)

Slika 2. Distribucija relativnih frekvencija koncentracija a) kalcijuma, b) magnezijuma, v) neorganskog fosfata, g) proizvoda kalcijuma i neorganskog fosfata (Ca x P), d) intaktnog paratiroidnog hormona (iPTH) i đ) 25-hidroksi vitamina D (25D) u kontrolnoj grupi (KG)

4.2.1. Raspodela vrednosti ispitivanih biomarkera u kontrolnoj grupi u odnosu na pol

Za svaki biomarker koji je imao normalnu raspodelu vrednosti primenom Student t-testa, odnosno primenom Mann-Whitney U testa za biomarkere koji nisu imali normalnu raspodelu vrednosti, ispitano je da li postoji statistički značajna razlika u vrednostima u kontrolnoj grupi u odnosu na pol. Statistički značajno više vrednosti za BALP, beta-CTx i magnezijum su dobijene kod žena (*Tabela XII*).

Tabela XII Poređenje vrednosti određivanih biomarkera u kontrolnoj grupi u odnosu na pol

Biomarker	Žene	Muškarci	p*
ALP, IU/L	62 ± 9,3	64 ± 10,7	0,701
BALP, IU/L	56 ± 7,1	49 ± 7,4	< 0,05
TRAP, IU/L	5 ± 1,3	5 ± 1,8	0,809
Beta-CTx, ng/mL	1,59 ± 0,743	1,21 ± 0,472	< 0,05
Kalcijum, mmol/L	2,51 ± 0,075	2,52 ± 0,126	0,730
Magnezijum, mmol/L	1,01 ± 0,062	0,97 ± 0,065	< 0,05
Neorganski fosfat, mmol/L	1,27 ± 0,124	1,23 ± 0,153	0,332
CaxP, mmol ² /L ²	2,83 ± 0,52	2,98 ± 0,61	0,366
iPTH, pg/mL	38,9 ± 8,72	41,7 ± 10,68	0,314
25D, nmol/L	76,7 ± 12,01	72,3 ± 7,94	0,133

*p < 0,05, statistički značajna razlika

4.2.2. Raspodela vrednosti ispitivanih biomarkera u kontrolnoj grupi u odnosu na godine života

Za svaki biomarker koji je imao normalnu raspodelu vrednosti primenom Student t-testa, odnosno primenom Mann-Whitney U testa za biomarkere koji nisu imali normalnu raspodelu vrednosti, ispitano je da li postoji statistički značajna razlika u vrednostima u kontrolnoj grupi u odnosu na godine života (*Tabela XIII*). Nije dobijena

statistički značajna razlika u vrednostima ispitivanih biomarkera u odnosu na godine života, izuzev za vrednosti BALP, koje su bile nešto niže kod osoba koje su imale preko 60 godina života, mada je dobijena granična značajnost ($p = 0,052$), s obzirom da se smatra da zdrave osobe preko 60 godina starosti, koje imaju niske nivoe 25D i/ili visoke nivoe iPTH, imaju smanjenu mineralnu gustinu kostiju i povećan stepen od preloma kostiju (223).

Tabela XIII Poređenje vrednosti određivanih biomarkera u kontrolnoj grupi u odnosu na godine života

Biomarker	< 60 godina	> 60 godina	p*
ALP, IU/L	62 ± 11,1	63 ± 10,3	0,995
BALP, IU/L	54 ± 8,3	51 ± 8,2	0,052
TRAP, IU/L	5 ± 1,2	5 ± 1,4	0,267
Beta-CTx, ng/mL	1,42 ± 0,661	1,41 ± 0,662	0,967
Kalcijum, mmol/L	2,53 ± 0,084	2,50 ± 0,112	0,266
Magnezijum, mmol/L	0,99 ± 0,073	0,99 ± 0,058	0,747
Neorganski fosfat, mmol/L	1,24 ± 0,154	1,26 ± 0,121	0,555
CaxP, mmol²/L²	2,9 ± 0,43	2,9 ± 0,69	0,655
iPTH, pg/mL	40,8 ± 9,92	39,3 ± 9,64	0,600
25D, nmol/L	75,3 ± 11,82	73,9 ± 8,72	0,630

* $p < 0,05$, statistički značajna razlika

4.2.3. Referentni intervali ispitivanih biomarkera u kontrolnoj grupi

Za analizirane vrednosti ispitivanih biomarkera u kontrolnoj grupi izračunati su referentni intervali neparametarskom metodom, kao unutarpercentilni intervali. Određivanje unutarpercentilnih intervala se najčešće koristi i preporučeno je od strane međunarodnog udruženja za kliničku hemiju (*International Federation for Clinical Chemistry, IFCC*) (291). Definiše se kao interval koji je ograničen sa dva percentila referentne raspodele. Percentil je vrednost koja deli referentnu raspodelu na takav način da određeni procenat njenih vrednosti ima vrednost koja je veća ili jednaka graničnoj donjoj vrednosti i manja ili jednaka graničnoj gornjoj vrednosti. Uobičajeno je da se

referentni interval definiše kao centralni 95% interval ograničen sa 2,5 i 97,5 percentilom. Iako su preporuke da se za određivanje referentnih intervala analizira optimalan broj podataka od 120 uzoraka po parametru, alternativno se može koristiti najmanje 20 uzoraka od adekvatno odabranih referentnih individua (291, 292). Na ovaj način su izračunati 2,5 i 97,5 percentil, primenom statističkog programa. Različite vrednosti 2,5 i 97,5 percentila su izračunate za pol tamo gde je postojala statistički značajna razlika.

Dobijene su sledeće vrednosti 2,5 i 97,5 percentila za analizirane biomarkere u kontrolnoj grupi:

- **ALP:** 43–89 IU/L
- **BALP:** 36–70 IU/L
 - žene: 38–69 IU/L
 - muškarci: 37–63 IU/L
- **TRAP:** 3–6 IU/L
- **betaCTx:** 0,41–2,83 ng/mL
 - žene: 0,40–2,85 ng/mL
 - muškarci: 0,50–1,98 ng/mL
- **Kalcijum:** 2,32–2,72 mmol/L
- **Magnezijum:** 0,88–1,09 mmol/L
 - žene: 0,91–1,09 mmol/L
 - muškarci: 0,88–1,05 mmol/L
- **Neorganski fosfat:** 1,02–1,54 mmol/L
- **CaxP:** 1,87–4,15 mmol²/L²
- **iPTH:** 23,7–57,6 pg/mL
- **25-hidroksi vitamin D:** 54,8–95,5 nmol/L

Podaci dobijeni za 2,5 i 97,5 percentil za vrednosti BALP, TRAP i CaxP se ne slažu sa literaturnim podacima, jer se za ova tri biomarkera koriste preporučene „cut off“ vrednosti za BALP (≤ 44 IU/L za žene i ≤ 73 IU/L za muškarce), za TRAP ($< 6,5$ IU/L) i za CaxP ($4,6$ mmol²/L²), u odnosu na preporuke proizvođača (47, 78).

4.3. RASPODELA VREDNOSTI BIOMARKERA RESORPCIJE I STVARANJA KOSTIJU KOD PACIJENATA SA KRAJNJIM STADIJUMOM BOLESTI BUBREGA

4.3.1. Vrednosti ispitivanih biomarkera kod pacijenata sa krajnjim stadijumom bolesti bubrega u odnosu na pol

Za svaki parametar Student t-testom ispitano je da li postoji statistički značajna razlika u vrednostima kod predijaliznih, HD i CAPD pacijenata u odnosu na pol. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm Sd, a statistička značajnost (p) je predstavljena kao vrednost dvostranog testa (*Tabele XIV–XVI*).

Tabela XIV Poređenje vrednosti određivanih biomarkera kod predijaliznih pacijenata u odnosu na pol

Biomarker	Žene	Muškarci	p*
ALP, IU/L	82 \pm 63,1	80 \pm 32,3	0,169
BALP, IU/L	38 \pm 17,3	32 \pm 15,2	0,706
TRAP, IU/L	7 \pm 1,4	8 \pm 1,1	0,178
Beta-CTx, ng/mL	3,51 \pm 0,803	3,74 \pm 0,872	0,852
Kalcijum, mmol/L	2,13 \pm 0,244	2,06 \pm 0,166	0,077
Magnezijum, mmol/L	0,86 \pm 0,132	0,84 \pm 0,153	0,604
Neorganski fosfat, mmol/L	1,44 \pm 0,271	1,67 \pm 0,367	0,275
CaxP, mmol ² /L ²	3,5 \pm 0,63	3,7 \pm 0,65	0,762
iPTH, pg/mL	408,5 \pm 211,62	348,8 \pm 173,72	< 0,05
25D, nmol/L	30,7 \pm 12,31	31,7 \pm 9,39	0,101

*p < 0,05, statistički značajna razlika

Tabela XV Poređenje vrednosti određivanih biomarkera kod HD pacijenata u odnosu na pol

Biomarker	Žene	Muškarci	p*
ALP, IU/L	57 ± 17,4	58 ± 18,2	0,796
BALP, IU/L	21 ± 12,1	22 ± 11,7	0,607
TRAP, IU/L	8 ± 1,6	8 ± 1,4	0,495
Beta-CTx, ng/mL	4,03 ± 1,184	3,90 ± 1,073	0,560
Kalcijum, mmol/L	2,38 ± 0,132	2,38 ± 0,151	0,963
Magnezijum, mmol/L	0,98 ± 0,117	1,01 ± 0,126	0,157
Neorganski fosfat, mmol/L	2,03 ± 0,274	1,40 ± 0,221	< 0,05
CaxP, mmol ² /L ²	4,1 ± 1,15	3,8 ± 1,04	0,240
iPTH, pg/mL	88,6 ± 71,97	136,7 ± 86,64	< 0,05
25D, nmol/L	30,9 ± 20,48	31,6 ± 21,62	0,866

*p < 0,05, statistički značajna razlika

Tabela XVI Poređenje vrednosti određivanih biomarkera kod CAPD pacijenata u odnosu na pol

Biomarker	Žene	Muškarci	p*
ALP, IU/L	53 ± 16,1	57 ± 16,4	0,239
BALP, IU/L	20 ± 11,3	23 ± 10,2	0,140
TRAP, IU/L	6 ± 1,7	6 ± 2,6	0,660
Beta-CTx, ng/mL	3,47 ± 0,680	3,56 ± 0,831	0,574
Kalcijum, mmol/L	2,29 ± 0,192	2,26 ± 0,154	0,426
Magnezijum, mmol/L	0,93 ± 0,186	0,93 ± 0,147	0,967
Neorganski fosfat, mmol/L	1,60 ± 0,424	1,49 ± 0,309	0,099
CaxP, mmol ² /L ²	3,7 ± 0,85	3,4 ± 0,69	< 0,05
iPTH, pg/mL	167,2 ± 132,44	174,5 ± 143,37	< 0,05
25D, nmol/L	46,2 ± 10,64	47,6 ± 12,76	0,540

* p < 0,05, statistički značajna razlika

Kod predijaliznih pacijenata dobijene su statistički značajno više vrednosti iPTH kod žena ($p < 0,05$). Kod HD pacijenata dobijene su statistički značajno više vrednosti neorganskog fosfata, odnosno statistički značajno niže vrednosti iPTH ($p < 0,05$) kod žena, dok su kod CAPD pacijenata dobijene statistički značajno više vrednosti CaxP i statistički značajno niže vrednosti iPTH ($p < 0,05$) kod žena.

4.3.2. Vrednosti ispitivanih biomarkera kod pacijenata sa krajnjim stadijumom bolesti bubrega u odnosu na godine života

Za svaki parametar Student t-testom ispitano je da li postoji statistički značajna razlika u vrednostima u odnosu na godine života (< 60 godina i > 60 godina) predijaliznih, HD i CAPD pacijenata. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm Sd, a statistička značajnost (p) je predstavljena kao vrednost dvostranog testa (*Tabele XVII–XIX*).

Tabela XVII Poređenje vrednosti određivanih biomarkera kod predijaliznih pacijenata u odnosu na godine života

Biomarker	< 60 godina	> 60 godina	p*
ALP, IU/L	72 \pm 30,2	84 \pm 59,4	0,353
BALP, IU/L	34 \pm 17,5	32 \pm 14,7	< 0,05
TRAP, IU/L	7 \pm 1,1	7 \pm 1,8	0,555
Beta-CTx, ng/mL	3,49 \pm 0,835	3,81 \pm 0,844	0,282
Kalcijum, mmol/L	2,16 \pm 0,247	2,13 \pm 0,188	0,696
Magnezijum, mmol/L	0,88 \pm 0,151	0,86 \pm 0,142	0,635
Neorganski fosfat, mmol/L	1,52 \pm 0,334	1,52 \pm 0,347	0,985
CaxP, mmol²/L²	3,1 \pm 0,61	3,1 \pm 0,63	0,974
iPTH, pg/mL	337,3 \pm 233,91	367,8 \pm 140,61	0,627
25D, nmol/L	30,3 \pm 8,85	32,6 \pm 12,67	0,507

* $p < 0,05$, statistički značajna razlika

Tabela XVIII Poređenje vrednosti određivanih biomarkera kod HD pacijenata u odnosu na godine života

Biomarker	< 60 godina	> 60 godina	p*
ALP, IU/L	59 ± 18,3	55 ± 17,5	0,226
BALP, IU/L	23 ± 11,3	20 ± 12,7	< 0,05
TRAP, IU/L	8 ± 1,1	8 ± 1,4	0,310
Beta-CTx, ng/mL	4,03 ± 1,145	3,91 ± 1,108	0,595
Kalcijum, mmol/L	2,38 ± 0,151	2,38 ± 0,143	0,770
Magnezijum, mmol/L	1,02 ± 0,122	0,98 ± 0,117	0,071
Neorganski fosfat, mmol/L	1,63 ± 0,404	1,70 ± 0,398	0,357
CaxP, mmol ² /L ²	4,0 ± 0,98	3,9 ± 1,20	0,686
iPTH, pg/mL	116,1 ± 80,33	113,8 ± 85,76	0,900
25D, nmol/L	32,6 ± 21,522	29,4 ± 20,31	0,441

*p < 0,05, statistički značajna razlika

Tabela XIX Poređenje vrednosti određivanih biomarkera kod CAPD pacijenata u odnosu na godine života

Biomarker	< 60 godina	> 60 godina	p*
ALP, IU/L	55 ± 15,4	55 ± 17,2	0,816
BALP, IU/L	23 ± 11,5	19 ± 9,8	p < 0,05
TRAP, IU/L	6 ± 2,1	6 ± 1,7	0,866
Beta-CTx, ng/mL	3,55 ± 0,753	3,51 ± 0,824	0,819
Kalcijum, mmol/L	2,29 ± 0,177	2,26 ± 0,168	0,220
Magnezijum, mmol/L	0,96 ± 0,154	0,90 ± 0,171	0,066
Neorganski fosfat, mmol/L	1,55 ± 0,344	1,54 ± 0,375	0,944
CaxP, mmol ² /L ²	3,5 ± 0,78	3,6 ± 0,77	0,350
iPTH, pg/mL	173,9 ± 125,72	163,1 ± 147,34	0,691
25D, nmol/L	47,4 ± 12,22	46,4 ± 10,76	0,647

*p < 0,05, statistički značajna razlika

U ovom ispitivanju nije postojala statistički značajna razlika u vrednostima ispitivanih biomarkera kod predijaliznih pacijenata i pacijenata na dijalizi, koji su bili mlađi i stariji od 60 godina života, izuzev vrednosti BALP koje su bile statistički značajno više kod pacijenata mlađih od 60 godina ($p < 0,05$).

4.3.3. Vrednosti ispitivanih biomarkera u odnosu na trajanje dijalize

Za svaki parametar Student t-testom ispitano je da li postoji statistički značajna razlika u vrednostima u odnosu na dužinu trajanja dijalize (< 30 meseci i > 30 meseci) kod HD i CAPD pacijenata. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm Sd, a statistička značajnost (p) je predstavljena kao vrednost dvostranog testa (*Tabele XX–XXI*).

Tabela XX Poređenje vrednosti određivanih biomarkera kod HD pacijenata u odnosu na trajanje dijalize

Biomarker	< 30 meseci	> 30 meseci	p*
ALP, IU/L	64 \pm 17,4	55 \pm 17,3	< 0,05
BALP, IU/L	26 \pm 14,2	20 \pm 11,6	< 0,05
TRAP, IU/L	8 \pm 1,1	7 \pm 1,4	0,682
Beta-CTx, ng/mL	4,16 \pm 0,916	3,92 \pm 1,174	0,395
Kalcijum, mmol/L	2,40 \pm 0,123	2,37 \pm 0,156	0,350
Magnezijum, mmol/L	0,99 \pm 0,114	1,00 \pm 0,122	0,694
Neorganski fosfat, mmol/L	1,65 \pm 0,461	1,67 \pm 0,383	0,787
CaxP, mmol²/L²	4,2 \pm 1,15	3,9 \pm 1,08	0,208
iPTH, pg/mL	127,4 \pm 60,75	111,7 \pm 88,96	0,497
25D, nmol/L	33,7 \pm 23,24	30,7 \pm 20,47	0,540

* $p < 0,05$, statistički značajna razlika

Tabela XXI Poređenje vrednosti određivanih biomarkera kod CAPD pacijenata u odnosu na trajanje dijalize

Biomarker	< 30 meseci	> 30 meseci	p*
ALP, IU/L	54 ± 17,4	57 ± 14,7	0,399
BALP, IU/L	21 ± 10,2	22 ± 10,6	0,476
TRAP, IU/L	6 ± 1,6	6 ± 1,1	0,320
Beta-CTx, ng/mL	3,58 ± 0,797	3,43 ± 0,755	0,389
Kalcijum, mmol/L	2,29 ± 0,167	2,26 ± 0,193	0,383
Magnezijum, mmol/L	0,95 ± 0,156	0,88 ± 0,167	< 0,05
Neorganski fosfat, mmol/L	1,55 ± 0,355	1,53 ± 0,377	0,810
CaxP, mmol²/L²	3,5 ± 0,82	3,5 ± 0,66	0,963
iPTH, pg/mL	174,9 ± 144,75	154,8 ± 116,12	0,493
25D, nmol/L	46,5 ± 11,71	47,6 ± 11,23	0,657

*p < 0,05, statistički značajna razlika

U ovom ispitivanju dobijene su statistički značajno niže vrednosti ALP i BALP kod HD pacijenata koji su bili na dijalizi duže od 30 meseci (p < 0,05) i statistički značajno niže vrednosti magnezijuma kod CAPD pacijenata koji su bili na dijalizi duže od 30 meseci (p < 0,05).

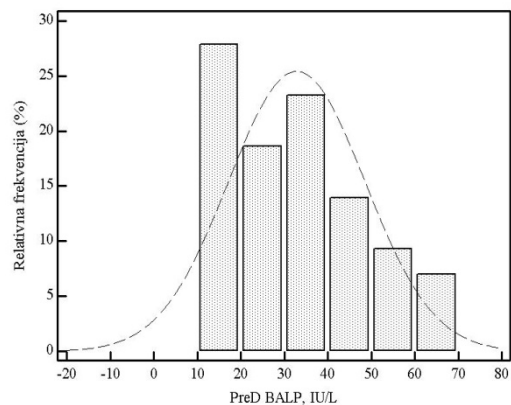
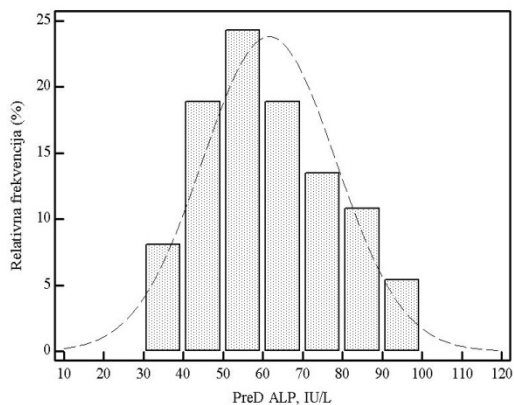
4.3.4. Raspodela vrednosti ispitivanih biomarkera kod predijaliznih pacijenata

Primenom Kolmogorov-Smirnov testa ispitano je da li raspodela vrednosti analiziranih biomarkera kod predijaliznih pacijenata prati Gauss-ovu raspodelu. Karakteristike raspodele za svaki ispitivani biomarker za predijalizne pacijente, prikazane su tabelarno (*Tabela XXII*) i grafički (*Slika 3* i *Slika 4*). Ustanovljena je normalna raspodela vrednosti za svaki od analiziranih biomarkera kod predijaliznih pacijenata.

Tabela XXII Raspodela vrednosti određivanih biomarkera kod predijaliznih pacijenata

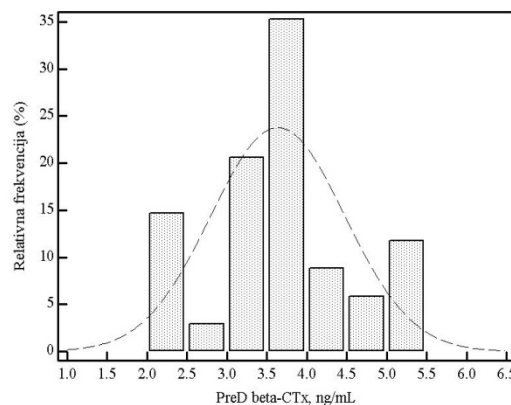
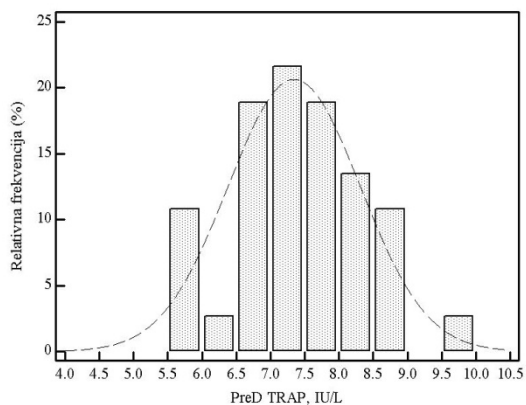
Biomarker	\bar{x}	Sd	Me	Min	Max	5–95 percentil	p*
ALP, IU/L	77	44,2	64	30	98	37–93	0,989
BALP, IU/L	32	16,4	23	11	63	14–62	0,779
TRAP, IU/L	7	1,3	8	6	12	6–9	0,829
Beta-CTx, ng/mL	3,54	0,844	3,85	2,0	5,0	2,42–5,0	0,053
Kalcijum, mmol/L	2,14	0,213	2,12	1,63	2,64	1,83–2,57	0,700
Magnezijum, mmol/L	0,86	0,146	0,84	0,57	1,17	0,64–1,09	0,788
Neorganski fosfor, mmol/L	1,49	0,308	1,55	0,96	2,26	1,11–2,15	0,739
CaxP, mmol²/L²	3,1	0,60	3,12	2,13	4,43	2,28–4,23	0,863
iPTH, pg/mL	350,7	197,84	343,9	56,6	964,0	58,9–644,1	0,165
25D, nmol/L	29,4	10,46	30,0	12,0	52,0	14,3–48,4	0,688

*p > 0,05 – normalna raspodela (Kolmogorov-Smirnov test)



a)

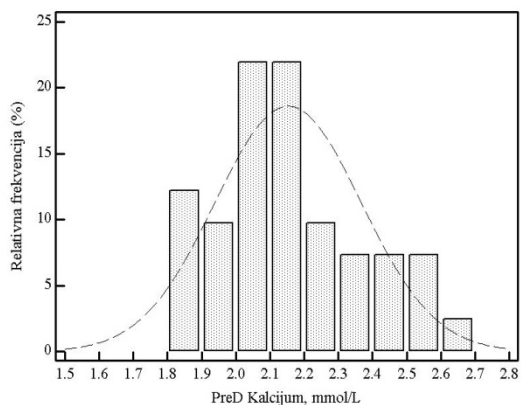
b)



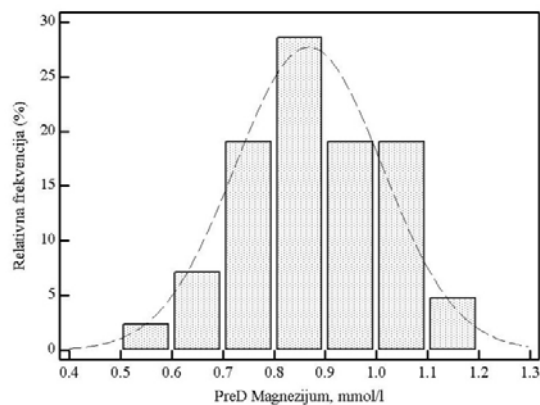
v)

g)

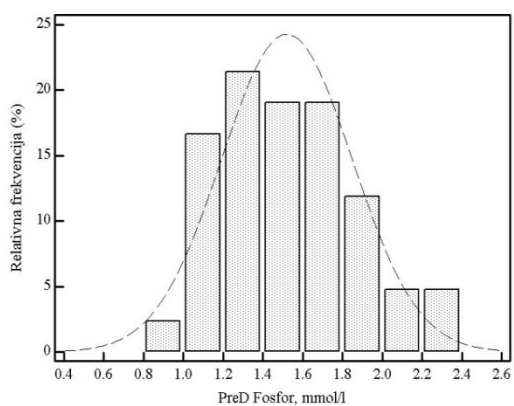
Slika 3. Distribucija relativnih frekvencija a) aktivnosti ukupne alkalne fosfataze (ALP), b) aktivnosti koštanog izoenzima alkalne fosfataze (BALP), v) aktivnosti tartarat rezistentne kisele fosfataze (TRAP) i g) koncentracija beta-karboksi terminalnog dela ukrštenih veza kolagena I (beta-CTx) kod predijaliznih pacijenata (PreD)



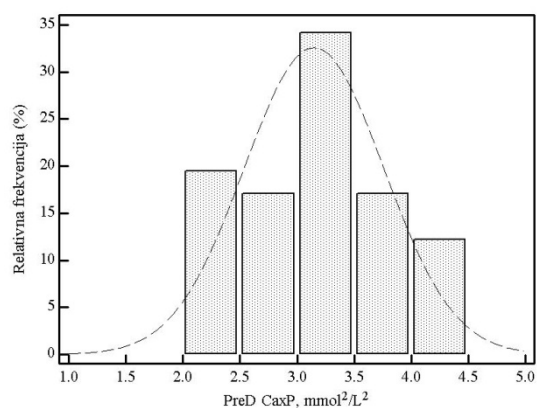
a)



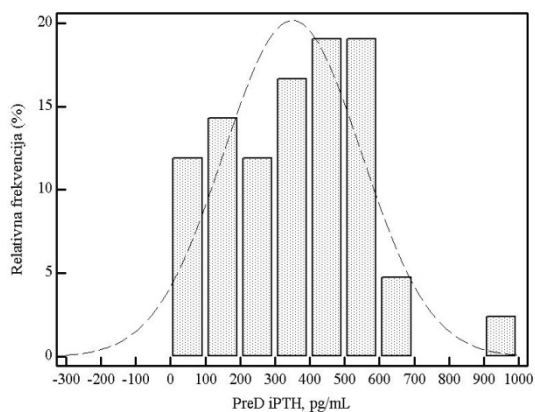
b)



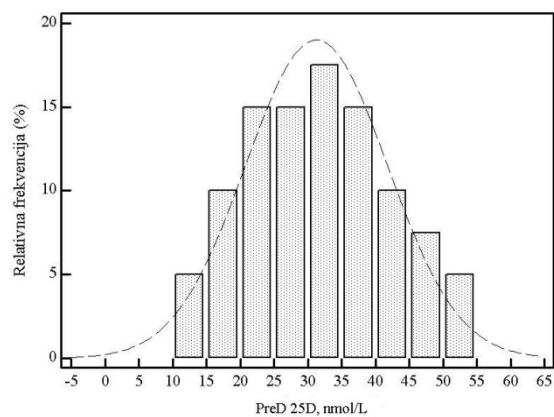
v)



g)



d)



đ)

Slika 4. Distribucija relativnih frekvencija koncentracija a) kalcijuma, b) magnezijuma, v) neorganskog fosfata, g) proizvoda kalcijuma i neorganskog fosfata (CaxP), d) intaktnog paratiroidnog hormona (iPTH) i đ) 25-hidroksi vitamina D (25D) kod predijaliznih pacijenata (PreD)

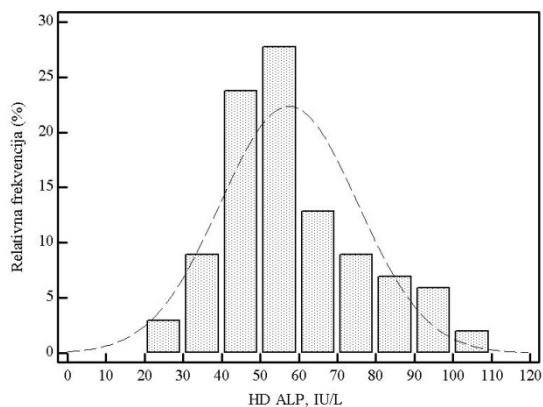
4.3.5. Raspodela vrednosti ispitivanih biomarkera kod pacijenata na hemodijalizi

Primenom Kolmogorov-Smirnov testa ispitano je da li raspodela vrednosti analiziranih biomarkera kod ispitivanih hemodijaliziranih pacijenata prati Gauss-ovu raspodelu. Karakteristike raspodele za svaki ispitivani biomarker za pacijente na hemodijalizi, prikazane su tabelarno (*Tabela XXIII*) i grafički (*Slika 5* i *Slika 6*). U ovom ispitivanju ustanovljena je normalna raspodela vrednosti za svaki od analiziranih biomarkera kod pacijenata na hemodijalizi.

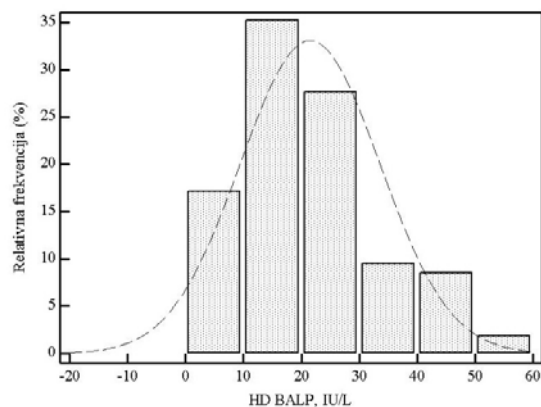
Tabela XXIII Raspodela vrednosti određivanih biomarkera kod HD pacijenata

Biomarker	\bar{x}	Sd	Me	Min	Max	5-95 percentil	p*
ALP, IU/L	58	18,5	56	21	100	31–95	0,869
BALP, IU/L	27	26,3	20	4	54	5–45	0,672
TRAP, IU/L	8	1,4	8	5	19	6–10	0,569
Beta-CTx, ng/mL	2,21	1,52	1,76	0,53	7,00	0,61–6,75	0,064
Kalcijum, mmol/L	2,37	0,146	2,39	1,63	2,71	2,12–2,60	0,310
Magnezijum, mmol/L	1,00	0,117	1,01	0,06	1,63	0,83–1,20	0,568
Neorganski fosfor, mmol/L	1,66	0,396	1,63	0,61	6,92	1,06–2,44	0,984
CaxP, mmol²/L²	3,9	1,09	3,90	1,14	9,44	2,20–5,88	0,561
iPTH, pg/mL	115,4	82,21	99,4	10,1	326,6	13,9–289,4	0,281
25D, nmol/L	39,5	41,42	23,4	6,0	267,0	10,0–70,5	0,210

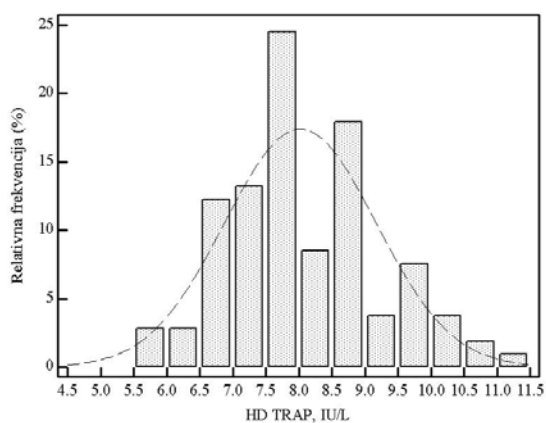
*p > 0,05 – normalna raspodela (Kolmogorov-Smirnov test)



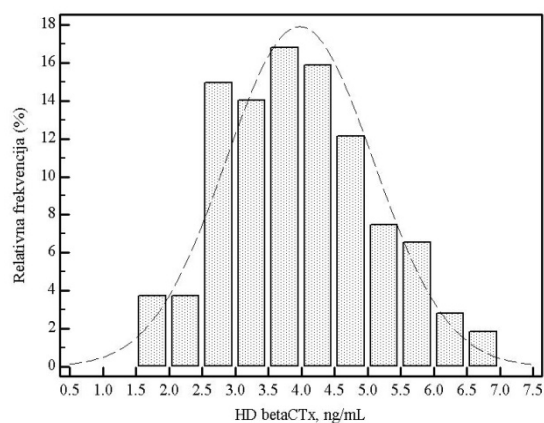
a)



b)

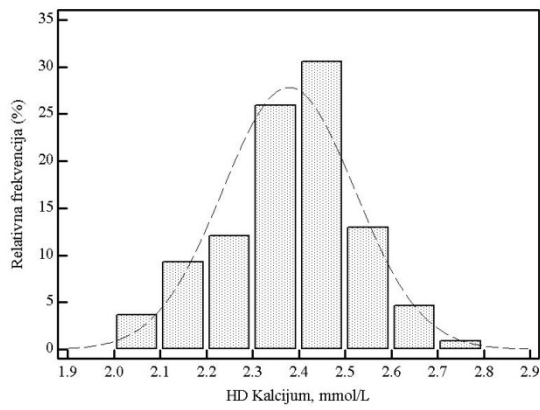


v)

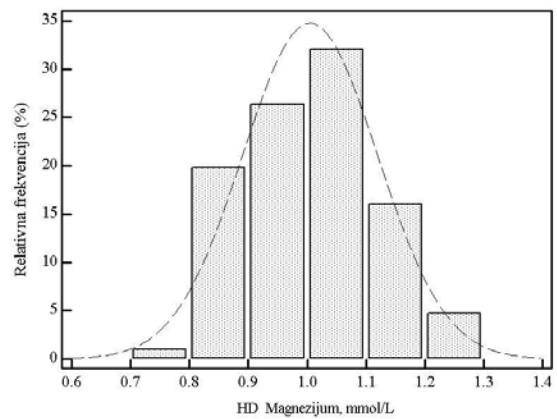


g)

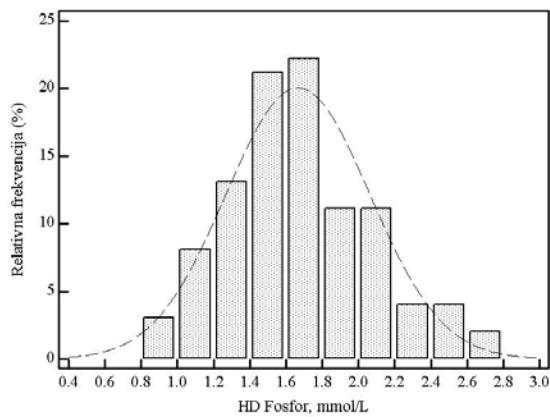
Slika 5. Distribucija relativnih frekvencija a) aktivnosti ukupne alkalne fosfataze (ALP), b) aktivnosti koštanog izoenzima alkalne fosfataze (BALP), v) aktivnosti tartarat rezistentne kisele fosfataze (TRAP) i g) koncentracija beta-karboksi terminalnog dela ukrštenih veza kolagena I (beta-CTx) kod pacijenata na hemodijalizi (HD)



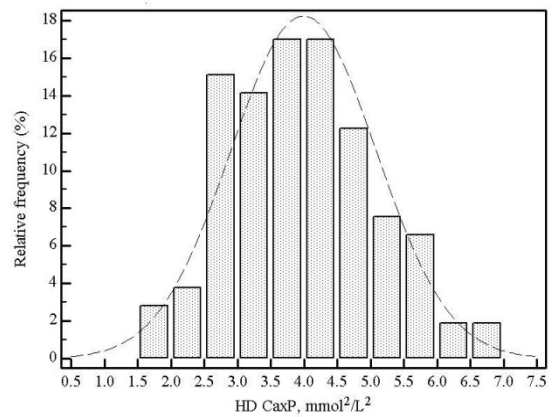
a)



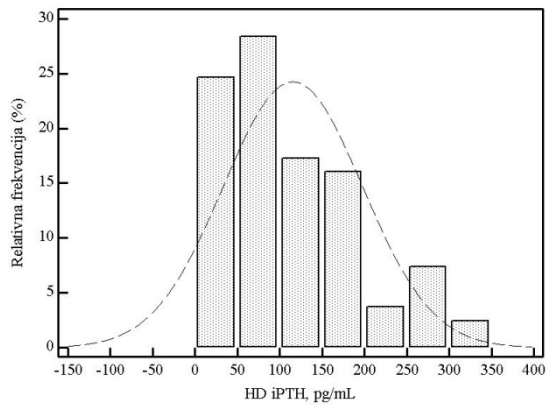
b)



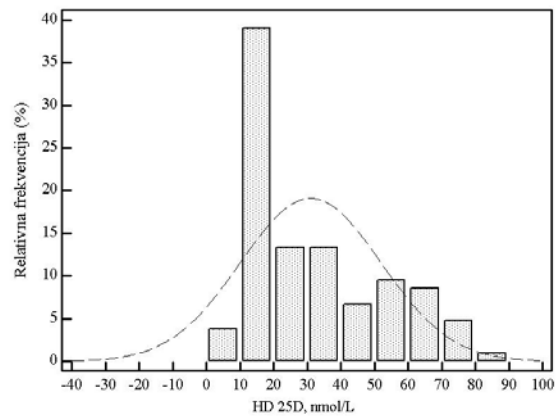
v)



g)



d)



đ)

Slika 6. Distribucija relativnih frekvencija koncentracija a) kalcijuma, b) magnezijuma, v) neorganskog fosfata, g) proizvoda kalcijuma i neorganskog fosfata (CaxP), d) intaktnog paratiroidnog hormona (iPTH) i đ) 25-hidroksi vitamina D (25D) kod pacijenata na hemodijalizi (HD)

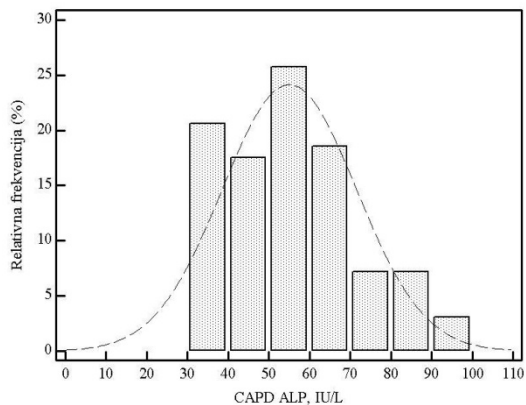
4.3.6. Raspodela vrednosti ispitivanih biomarkera kod pacijenata na kontinuiranoj ambulatornoj peritonealnoj dijalizi

Primenom Kolmogorov-Smirnov testa ispitano je da li raspodela analiziranih biomarkera kod ispitivanih pacijenata na kontinuiranoj ambulatornoj peritonealnoj dijalizi prate Gauss-ovu raspodelu. Karakteristike raspodele za svaki ispitivani biomarker za ispitivane pacijente na kontinuiranoj ambulatornoj peritonealnoj dijalizi, prikazane su tabelarno (*Tabela XXIV*) i grafički (*Slika 7* i *Slika 8*). U ovom ispitivanju ustanovljena je normalna raspodela vrednosti za svaki od analiziranih biomarkera kod pacijenata na kontinuiranoj ambulatornoj peritonealnoj dijalizi.

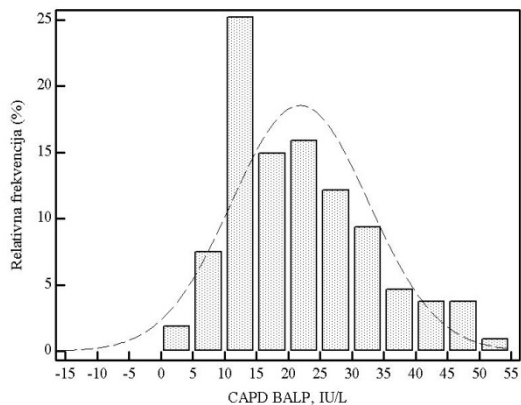
Tabela XXIV Raspodela vrednosti određivanih biomarkera kod CAPD pacijenata

Biomarker	\bar{x}	Sd	Me	Min	Max	5–95 percentil	p*
ALP, IU/L	55	16,5	57	30	98	30–86	0,483
BALP, IU/L	22	11,4	20	4	50	7–43	0,708
TRAP, IU/L	6	2,7	6	2	14	4–9	0,214
Beta-CTx, ng/mL	3,43	0,773	3,42	1,97	5,28	2,44–5,01	0,630
Kalcijum, mmol/L	2,27	0,176	2,25	1,74	2,96	1,98–2,55	0,363
Magnezijum, mmol/L	0,91	0,151	0,93	0,58	1,85	0,67–1,19	0,841
Neorganski fosfat, mmol/L	1,53	0,357	1,52	0,79	2,94	1,00–2,22	0,587
CaxP, mmol²/L²	3,5	0,77	3,40	1,74	7,32	2,44–5,01	0,640
iPTH, pg/mL	171,4	138,47	124,2	5,2	515,1	18,8–457,4	0,397
25D, nmol/L	47,0	11,83	45,0	27,0	76,0	29,0–67,0	0,500

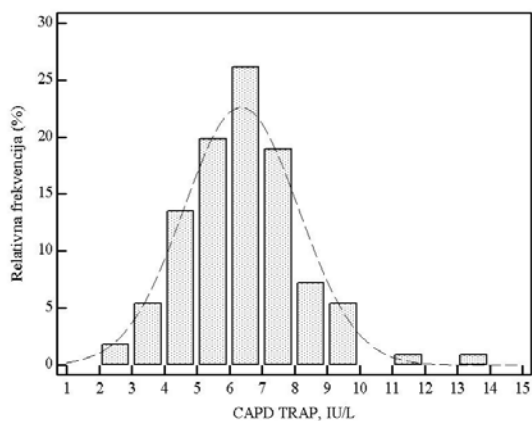
*p > 0,05 – normalna raspodela (Kolmogorov-Smirnov test)



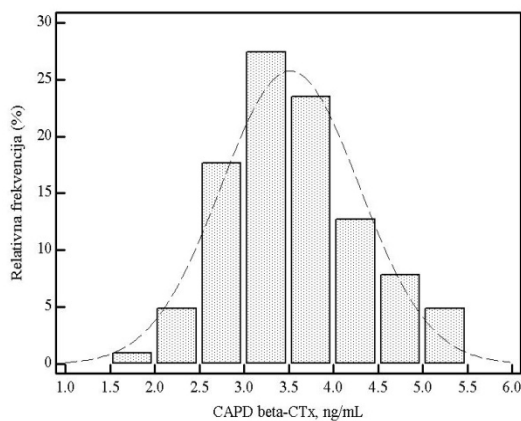
a)



b)

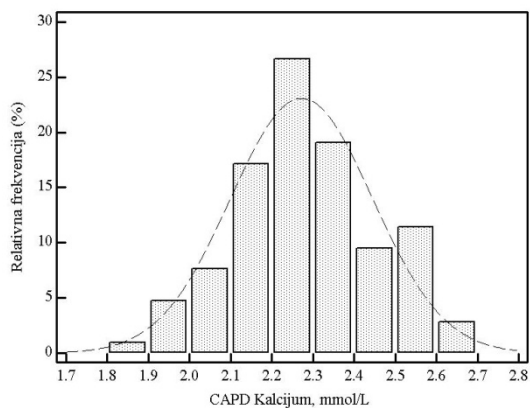


v)

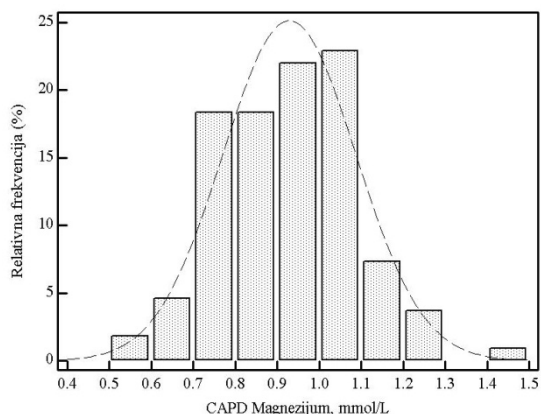


g)

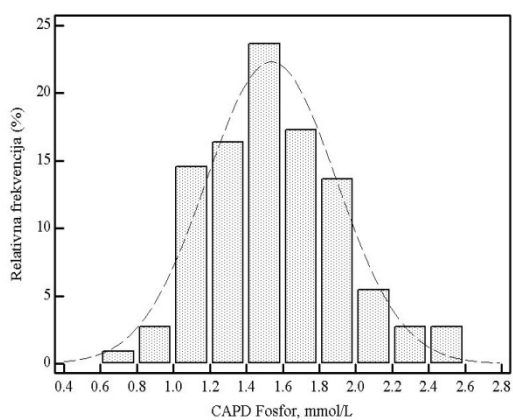
Slika 7. Distribucija relativnih frekvencija a) aktivnosti ukupne alkalne fosfataze (ALP), b) aktivnosti koštanog izoenzima alkalne fosfataze (BALP), v) aktivnosti tartarat rezistentne kisele fosfataze (TRAP) i g) koncentracija beta-karboksi terminalnog dela ukrštenih veza kolagena I (beta-CTx) kod pacijenata na kontinuiranoj ambulatornoj peritonealnoj dijalizi (CAPD)



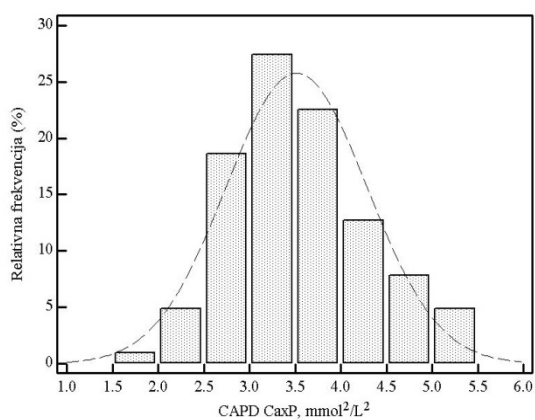
a)



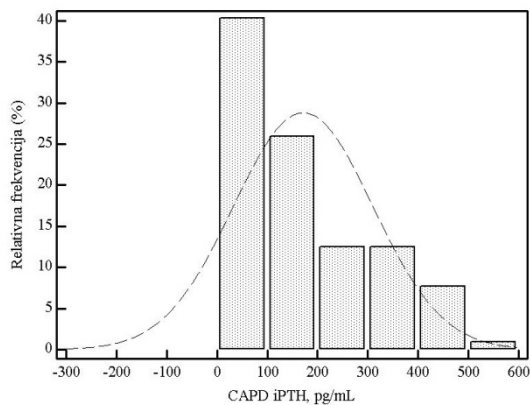
b)



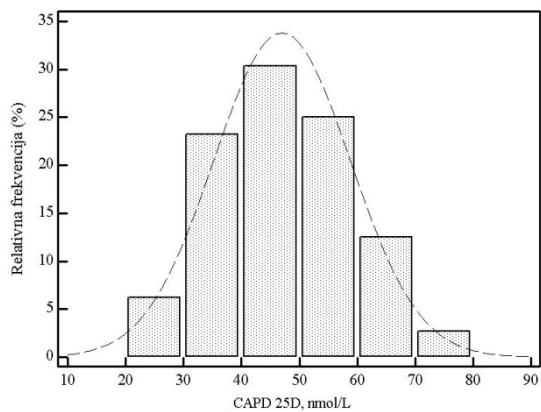
v)



g)



d)



đ)

Slika 8. Distribucija relativnih frekvencija koncentracija a) kalcijuma, b) magnezijuma, v) neorganskog fosfata, g) proizvoda kalcijuma i neorganskog fosfata (CaxP), d) intaktnog paratiroidnog hormona (iPTH) i đ) 25-hidroksi vitamina D (25D) kod pacijenata na kontinuiranoj ambulatornoj peritonealnoj dijalizi (CAPD)

4.4. POREĐENJE VREDNOSTI BALP, TRAP, BETA-CTx I PREPORUČENIH BIOMARKERA KOD PACIJENATA SA KRAJNJIM STADIJUMOM BOLESTI BUBREGA U ODNOSU NA KONTROLNU GRUPU

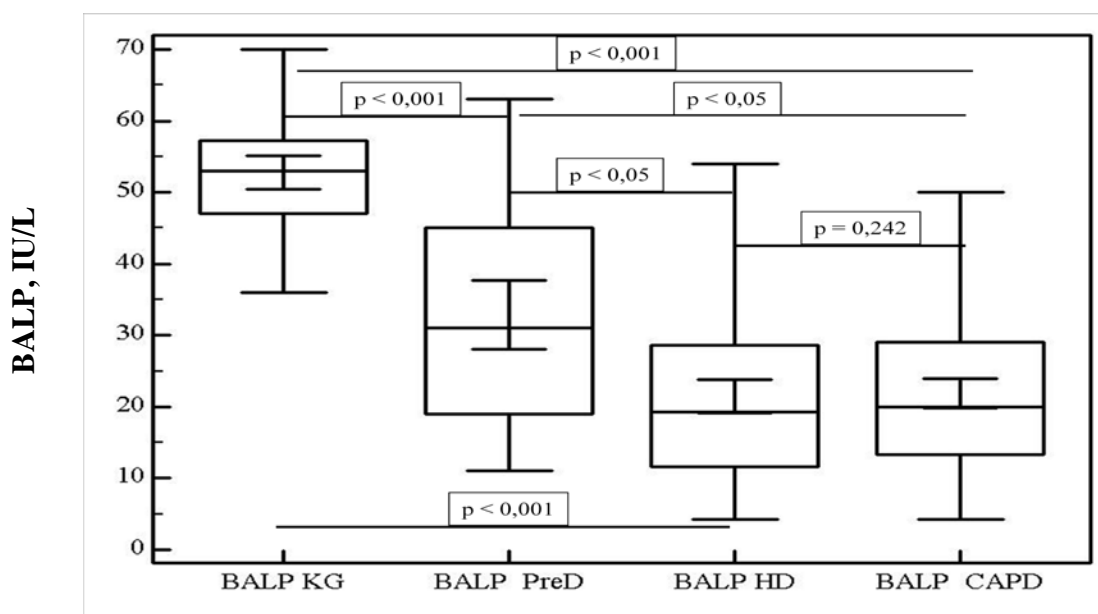
Pošto su trenutne preporuke da se nivo metabolizma kostiju kod predijaliznih pacijenata i pacijenata na dijalizi procenjuje na osnovu nespecifičnih biomarkera za tkivo kostiju (ALP, jona kalcijuma, magnezijuma, neorganskog fosfata, CaxP, iPTH i 25D), planirano je da se specifični biomarkeri osteoklasta, osteoblasta i kolagena kostiju, BALP, TRAP i beta-CTx uporede sa preporučenim biomarkerima kod KSBB pacijenata i u odnosu na kontrolnu grupu. U tom smislu, ispitana je korelacija koncentracija BALP, TRAP i beta-CTx sa vrednostima preporučenih biomarkera (ALP, joni kalcijuma, magnezijuma, neorganskog fosfata, CaxP, iPTH i 25D).

4.4.1. Raspodela vrednosti BALP, TRAP, beta-CTx i preporučenih biomarkera kod pacijenata sa krajnjim stadijumom bolesti bubrega u odnosu na vrednosti u kontrolnoj grupi

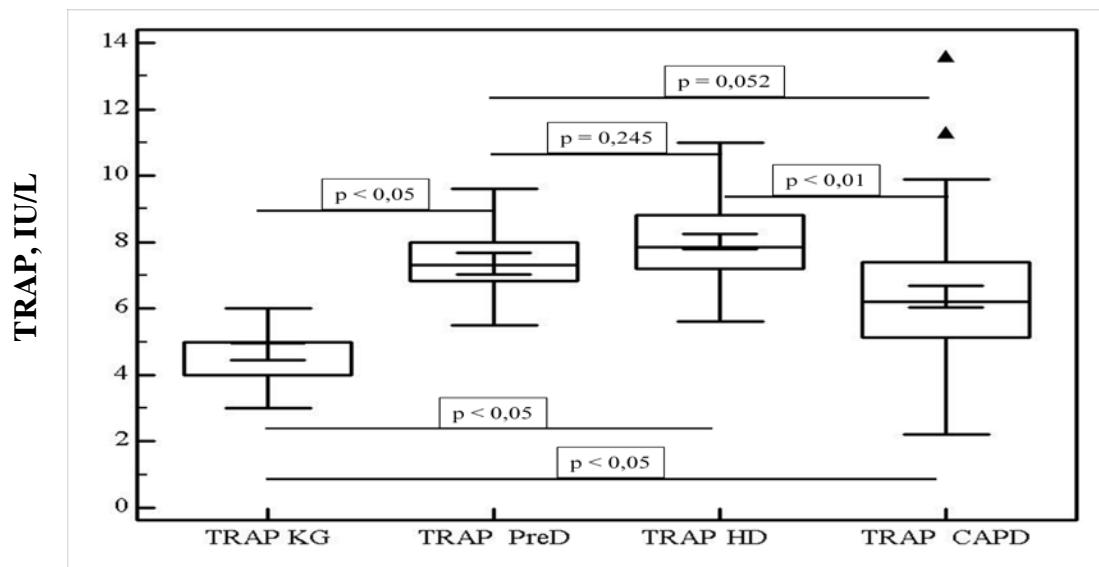
Radi procene u kojoj su meri izmenjene vrednosti analiziranih biomarkera kod KSBB pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu, primenjen je ANOVA test da bi se ustanovilo da li postoji statistički značajna razlika u vrednostima ispitivanih parametara između analiziranih grupa, što je prikazano grafički za BALP, TRAP i beta-CTx i preporučene biomarkere (*Slike 9–18*). Rezultati su prikazani kao *boks-plots* grafici koji pokazuju 10, 50, 75 i 90 percentil, kao i statističku značajnost (*p*).

Rezultati poređenja ukazuju da su koncentracije BALP i kalcijuma bile značajno niže kod predijaliznih pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu: BALP (Me: 23 vs. 53 IU/L, $p < 0,001$) i kalcijum (Me: 2,12 vs. 2,53 mmol/L, $p < 0,01$), dok su koncentracije neorganskog fosfata i iPTH bile značajno više kod predijaliznih pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu: 1,55 vs. 1,25 mmol/L, $p < 0,05$ i 343,9 vs. 38,0 pg/mL, $p < 0,01$, redom. Kod HD pacijenata dobijene značajno niže vrednosti ALP (Me: 56 vs. 69 IU/L, $p < 0,001$) i 25D (Me: 23,4 vs. 73,5 nmol/L, $p < 0,01$), kao i BALP (Me: 20 vs. 53 IU/L, $p < 0,001$) i kalcijuma (Me: 2,39 vs. 2,53 mmol/L, $p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu

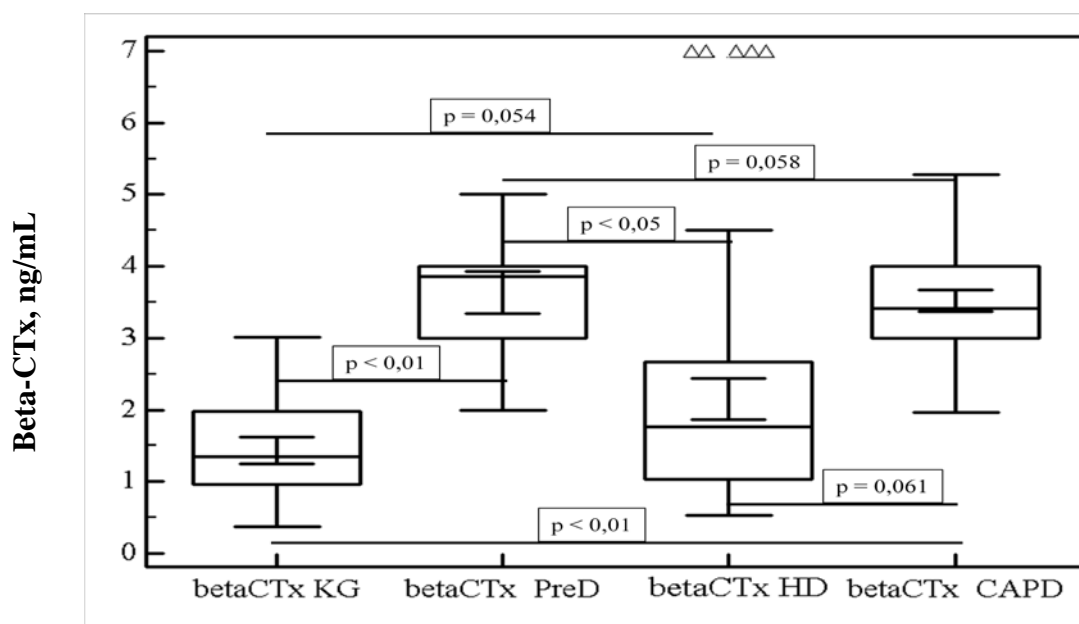
grupu. Vrednosti ostalih analiziranih biomarkera bile su značajno različite kod HD pacijenata u odnosu na predijaliznu grupu: neorganski fosfat (Me: 1,63 vs. 1,55 mmol/L, $p < 0,05$), CaxP (Me: 3,90 vs. 3,12 mmol²/L², $p < 0,05$), iPTH (Me: 99,4 vs. 343,9 pg/mL, $p < 0,05$) i beta-CTx (Me: 1,76 ng/mL vs. 3,85 ng/mL, $p < 0,05$). U odnosu na kontrolnu grupu, CAPD pacijenti su imali značajno više vrednosti (Student t-test, $p < 0,05$): TRAP (Me: 6 vs. 5 IU/L), neorganskog fosfata (Me: 1,52 vs. 1,25 mmol/L), CaxP (Me: 3,40 vs. 2,9 mmol²/L²) i iPTH (Me: 124,2 vs. 38,0 pg/mL). Vrednosti ALP, BALP i kalcijuma kod CAPD pacijenata su bile značajno niže u odnosu na kontrolnu grupu: ALP (Me: 57 vs. 69 IU/L, $p < 0,05$) i BALP (Me: 20 vs. 53 IU/L, $p < 0,001$) i kalcijum (Me: 2,25 vs. 2,53 mmol/L, $p < 0,01$), dok je za magnezijum dobijena granična statistička značajnost ($p = 0,057$). Vrednosti BALP i iPTH kod CAPD pacijenata su bile značajno niže ($p < 0,05$) u odnosu na predijalizne pacijente (Me: 20 IU/L vs. 23 IU/L i 124,2 pg/mL vs. 343,9 pg/mL). Takođe, dobijene su značajno niže vrednosti 25D kod predijaliznih i HD pacijenata u odnosu na CAPD (Me: 30,0 nmol/L i Me: 23,4 nmol/L vs. Me: 45,0 nmol/L).



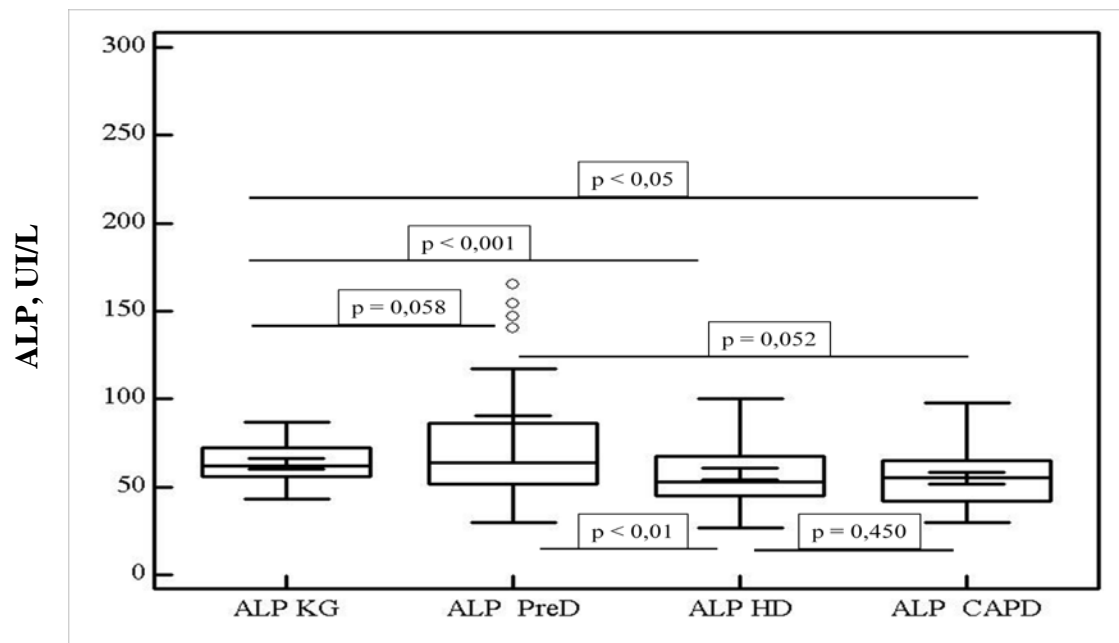
Slika 9. Koncentracije koštanog izoenzima alkalne fosfataze (BALP) kod predijaliznih pacijenata (PreD), pacijenata na hemodijalizi (HD) i pacijenata na kontinuiranoj ambulatornoj peritonealnoj dijalizi (CAPD) u odnosu na vrednosti u kontrolnoj grupi (KG)



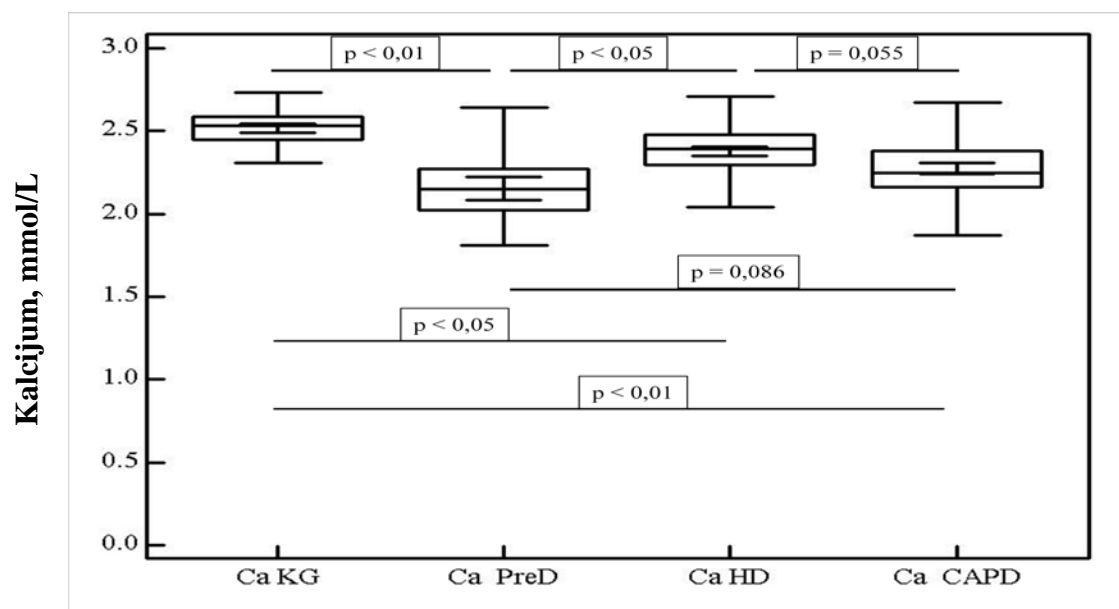
Slika 10. Koncentracije tartarat rezistentne kisele fosfataze (TRAP) kod predijaliznih pacijenata (PreD), pacijenata na hemodijalizi (HD) i pacijenata na kontinuiranoj ambulatornoj peritonealnoj dijalizi (CAPD) u odnosu na vrednosti u kontrolnoj grupi (KG)



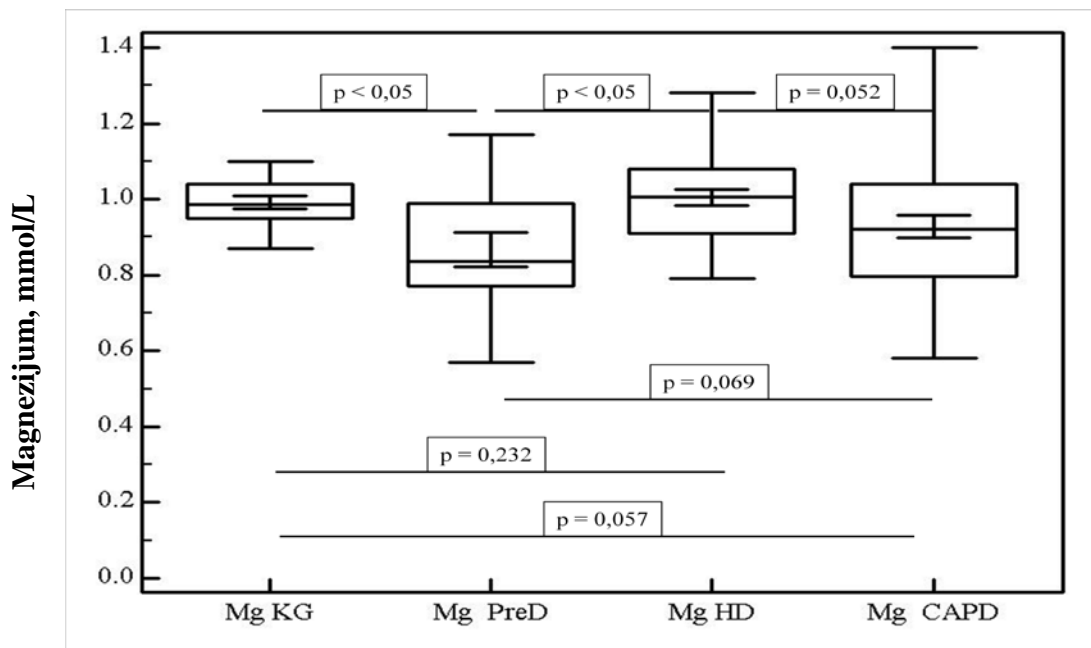
Slika 11. Koncentracije beta-karboksi terminalog dela ukrštenih veza kolagena I (beta-CTx) kod predijaliznih pacijenata (PreD), pacijenata na hemodijalizi (HD) i pacijenata na kontinuiranoj ambulatornoj peritonealnoj dijalizi (CAPD) u odnosu na vrednosti u kontrolnoj grupi (KG)



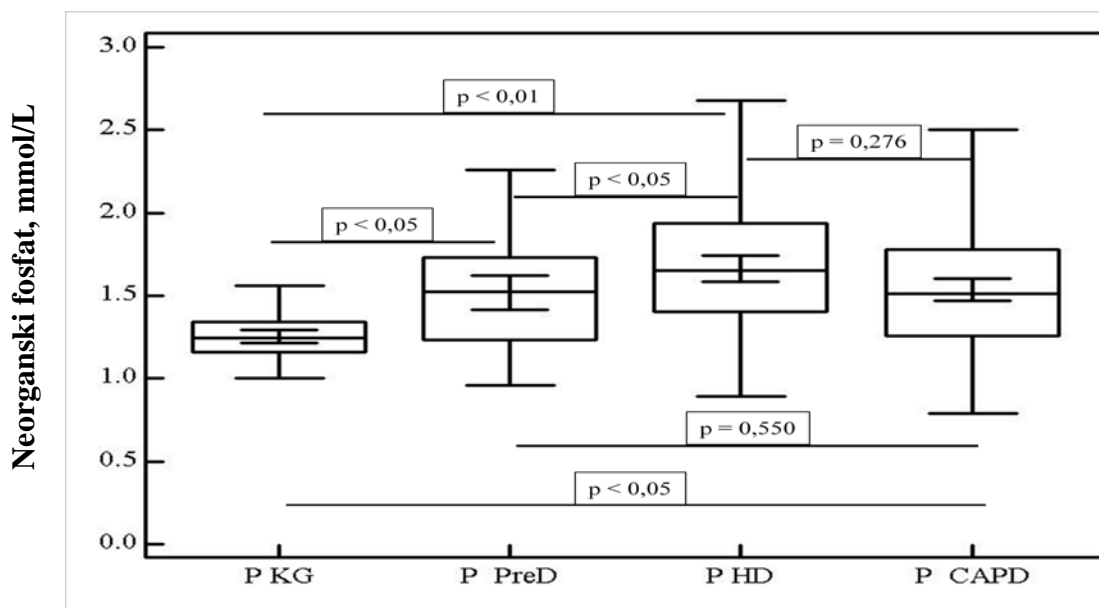
Slika 12. Koncentracije alkalne fosfataze (ALP) kod predijaliznih pacijenata (PreD), pacijenata na hemodijalizi (HD) i pacijenata na kontinuiranoj ambulatornoj peritonealnoj dijalizi (CAPD) u odnosu na vrednosti u kontrolnoj grupi (KG)



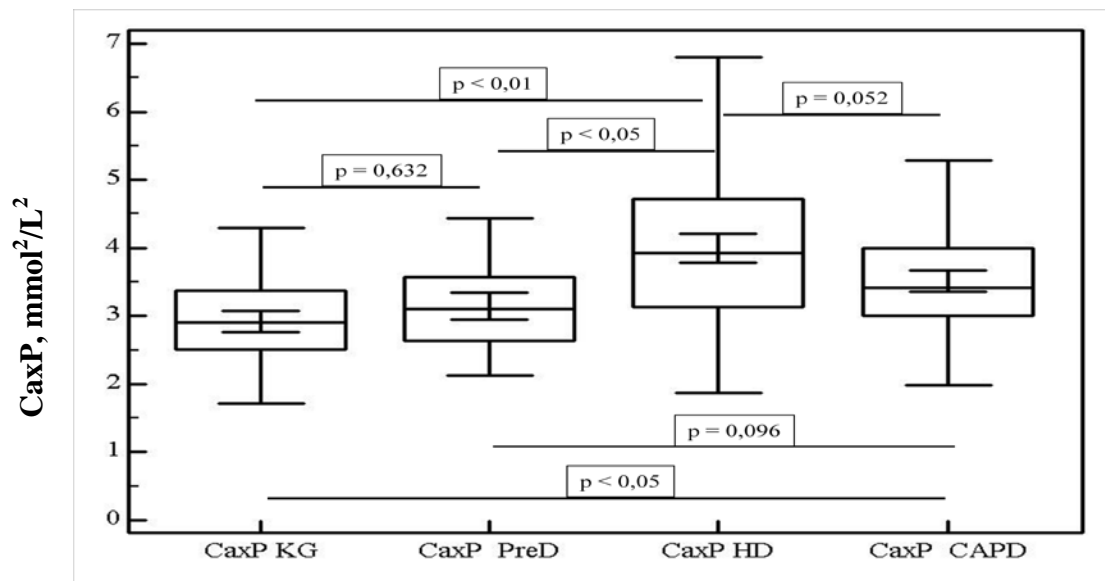
Slika 13. Koncentracije kalcijuma (Ca) kod predijaliznih pacijenata (PreD), pacijenata na hemodijalizi (HD) i pacijenata na kontinuiranoj ambulatornoj peritonealnoj dijalizi (CAPD) u odnosu na vrednosti u kontrolnoj grupi (KG)



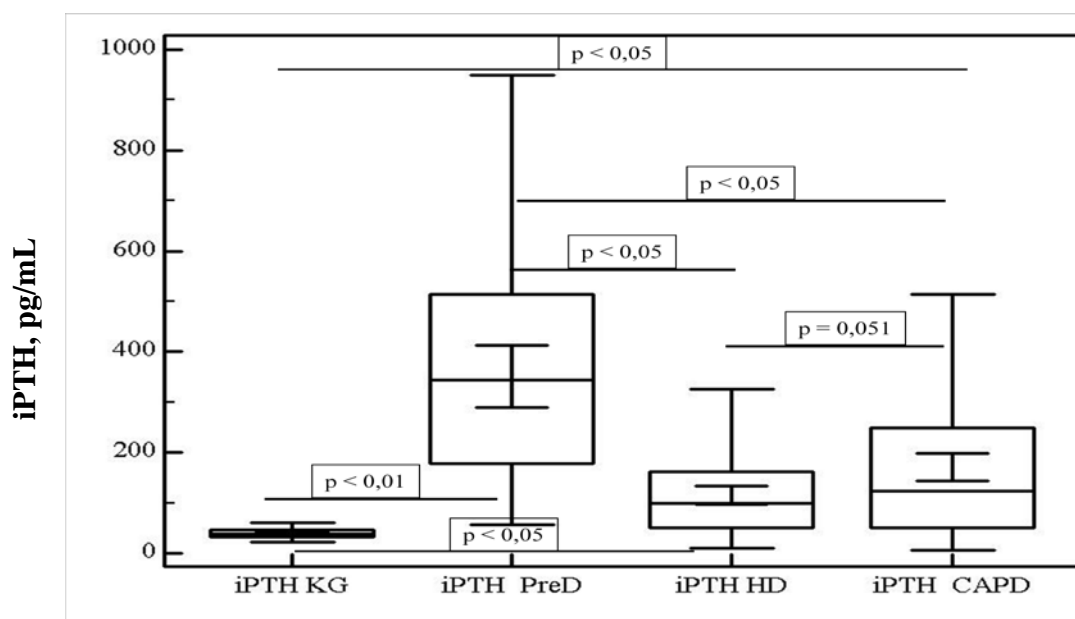
Slika 14. Koncentracije magnezijuma (Mg) kod predijaliznih pacijenata (PreD), pacijenata na hemodijalizi (HD) i pacijenata na kontinuiranoj ambulatornoj peritonealnoj dijalizi (CAPD) u odnosu na vrednosti u kontrolnoj grupi (KG)



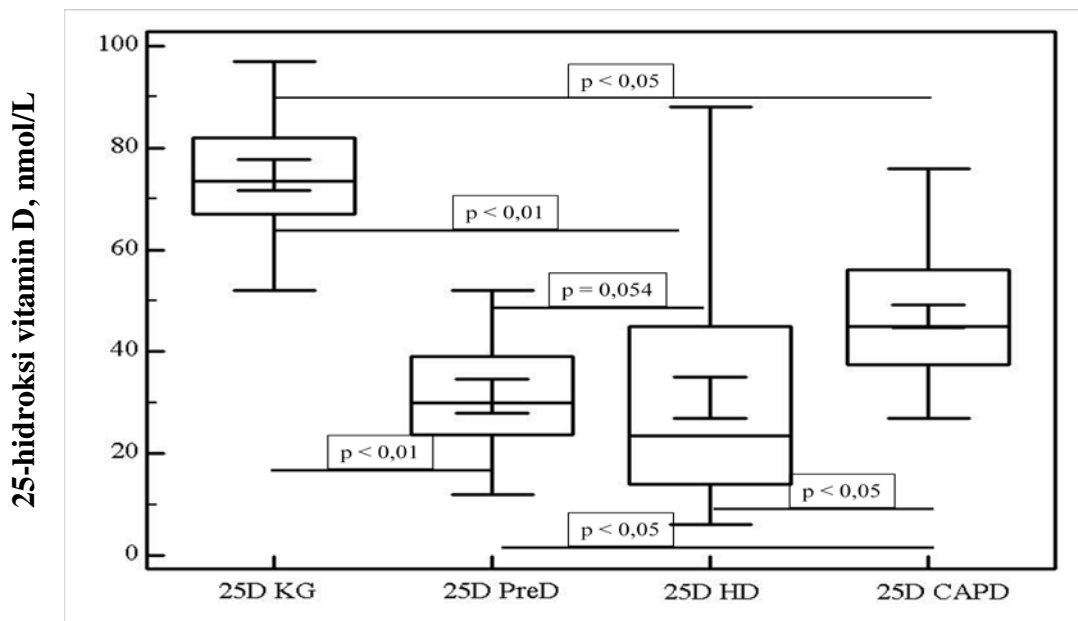
Slika 15. Koncentracije neorganskog fosfata (P) kod predijaliznih pacijenata (PreD), pacijenata na hemodijalizi (HD) i pacijenata na kontinuiranoj ambulatornoj peritonealnoj dijalizi (CAPD) u odnosu na vrednosti u kontrolnoj grupi (KG)



Slika 16. Koncentracije proizvoda kalcijuma i neorganskog fosfata (CaxP) kod predijaliznih pacijenata (PreD), pacijenata na hemodijalizi (HD) i pacijenata na kontinuiranoj ambulatornoj peritonealnoj dijalizi (CAPD) u odnosu na vrednosti u kontrolnoj grupi (KG)



Slika 17. Koncentracije intaktnog paratiroidnog hormona (iPTH) kod predijaliznih pacijenata (PreD), pacijenata na hemodijalizi (HD) i pacijenata na kontinuiranoj ambulatornoj peritonealnoj dijalizi (CAPD) u odnosu na vrednosti u kontrolnoj grupi (KG)



Slika 18. Koncentracije 25-hidroksi vitamina D (25D) kod predijaliznih pacijenata (PreD), pacijenata na hemodijalizi (HD) i pacijenata na kontinuiranoj ambulatornoj peritonealnoj dijalizi (CAPD) u odnosu na vrednosti u kontrolnoj grupi (KG)

4.4.2. Korelacija vrednosti BALP, TRAP i beta-CTx sa vrednostima preporučenih biomarkera kod predijaliznih pacijenata

Da bi se ustanovila povezanost nivoa BALP, TRAP i beta-CTx sa nivoima preporučenih biomarkera (ALP, jona kalcijuma, magnezijuma, neorganskog fosfata, CaxP, iPTH i 25D) za praćenje metabolizma kostiju određen je Spearmanov koeficijent korelacije koncentracija specifičnih sa preporučenim analiziranim biomarkerima kod predijaliznih pacijenata (*Tabela XXV–XXVII*). Mada koeficijenti korelacije između specifičnih biomarkera nisu bili visoki, korelacija je bila statistički značajna.

Tabela XXV Korelacija vrednosti BALP sa vrednostima TRAP, beta-CTx, ALP, kalcijuma, magnezijuma, neorganskog fosfata, CaxP, iPTH i 25D kod predijaliznih pacijenata

Biomarker	BALP (IU/L)		
	r	95% CI	p*
TRAP (IU/L)	0,321	0,146–0,496	p < 0,05
Beta-CTx (ng/mL)	-0,315	-0,788–0,392	p < 0,05
ALP (IU/L)	0,616	0,388–0,773	p < 0,001
Kalcijum (mmol/L)	-0,288	-0,405 do -0,171	p < 0,05
Magnezijum (mmol/L)	-0,136	-0,426–0,179	p = 0,396
Neorganski fosfat (mmol/L)	-0,177	-0,460–0,138	p = 0,268
CaxP (mmol ² /L ²)	0,240	-0,272–0,646	p = 0,353
iPTH (pg/mL)	-0,019	-0,321–0,287	p = 0,905
25D (nmol/L)	-0,113	-0,625–0,467	p = 0,114

*p < 0,05 – postoji značajna korelacija između biomarkera

Tabela XXVI Korelacija vrednosti TRAP sa vrednostima beta-CTx, ALP, kalcijuma, magnezijuma, neorganskog fosfata, CaxP, iPTH i 25D kod predijaliznih pacijenata

Biomarker	TRAP (IU/L)		
	r	95% CI	p*
Beta-CTx (ng/mL)	0,280	-0,529–0,823	p = 0,501
ALP (IU/L)	0,112	-0,220–0,421	p = 0,508
Kalcijum (mmol/L)	-0,149	-0,459–0,194	p = 0,395
Magnezijum (mmol/L)	-0,463	-0,582 do -0,344	p < 0,01
Neorganski fosfat (mmol/L)	-0,301	-0,426 do -0,176	p < 0,05
CaxP (mmol ² /L ²)	-0,099	-0,598–0,455	p = 0,736
iPTH (pg/mL)	-0,044	-0,368–0,288	p = 0,796
25D (nmol/L)	-0,214	-0,743–0,480	p = 0,552

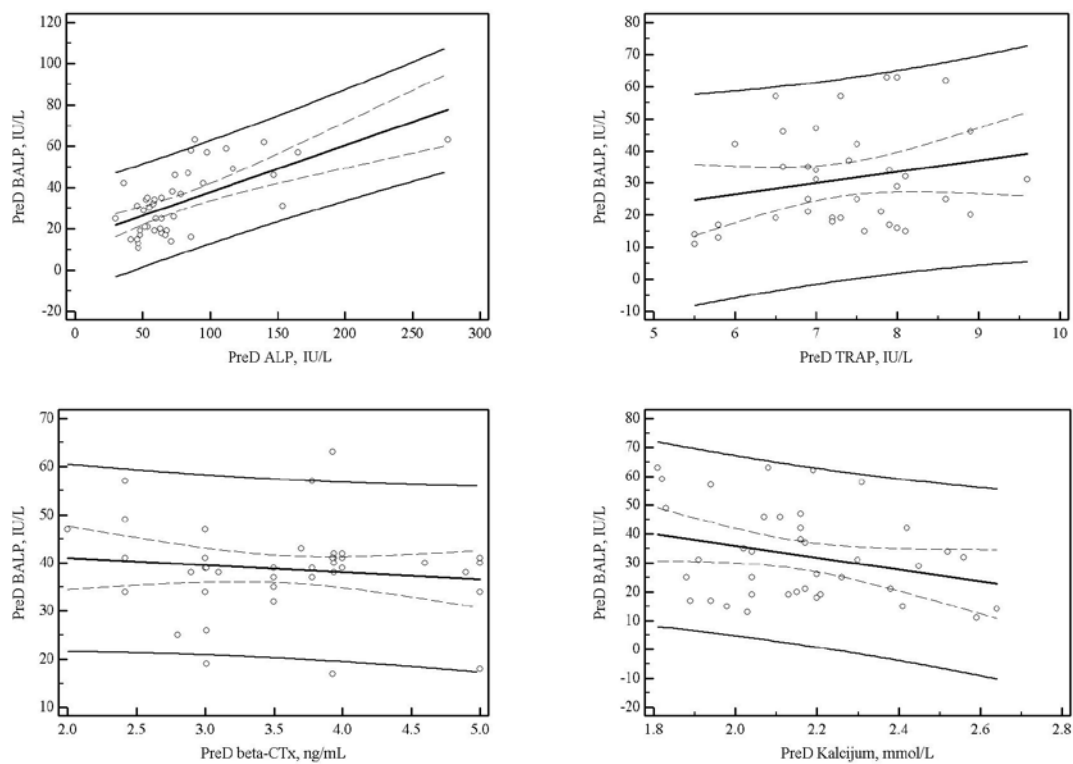
*p < 0,05 – postoji značajna korelacija između biomarkera

Tabela XXVII Korelacija vrednosti beta-CTx sa vrednostima ALP, kalcijuma, magnezijuma, neorganskog fosfata, CaxP, iPTH i 25D kod predijaliznih pacijenata

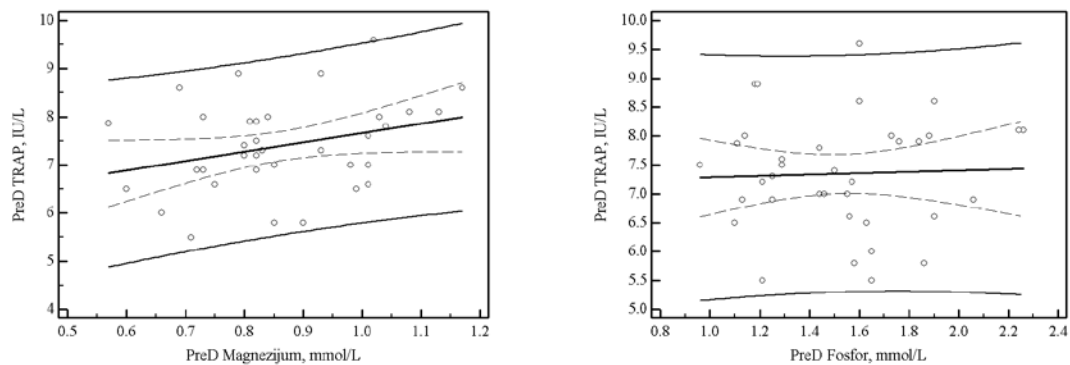
Biomarker	Beta-CTx (ng/mL)		
	r	95% CI	p*
ALP (IU/L)	-0,142	-0,708–0,536	p = 0,695
Kalcijuma (mmol/L)	0,597	-0,111–0,903	p < 0,05
Magnezijuma (mmol/L)	-0,013	-0,637–0,622	p = 0,973
Neorganskog fosfata (mmol/L)	-0,333	-0,796–0,375	p = 0,347
CaxP (mmol ² /L ²)	-0,178	-0,703–0,472	p = 0,599
iPTH (pg/mL)	0,012	-0,622–0,637	p = 0,973
25D (nmol/L)	-0,411	-0,658 do -0,084	p < 0,05

*p < 0,05 – postoji značajna korelacija između biomarkera

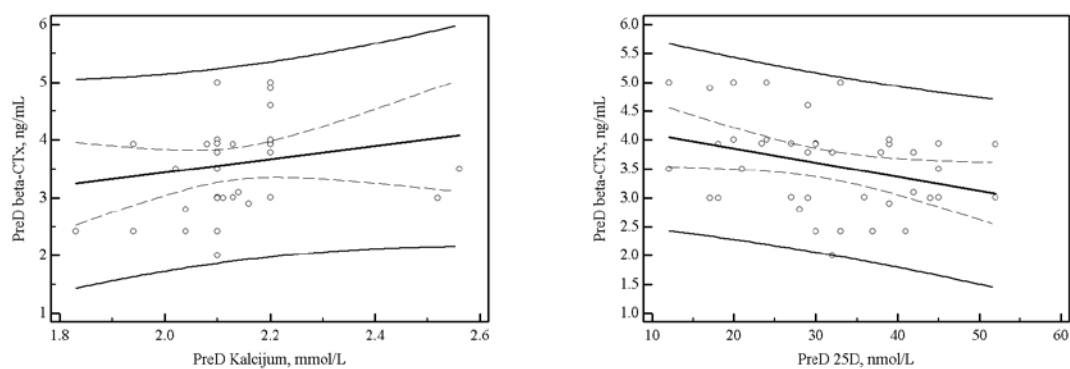
Za biomarkere između kojih je postojala statistički značajna korelacija, linearnom regresionom analizom grafički je prikazana povezanost u okviru 95% CI i 95% predikcionog intervala (*Slike 19–21*).



Slika 19. Korelacija vrednosti koštanog izoenzima alkalne fosfataze (BALP) sa vrednostima ukupne alkalne fosfataze (ALP), tartarat rezistentne kisele fosfataze (TRAP), beta-karboksi terminalnog dela ukrštenih veza kolagena I (beta-CTX) i kalcijuma kod predijaliznih pacijenata; grafici prikazuju korelaciju u okviru 95% CI i 95% predikcionog intervala



Slika 20. Korelacija vrednosti tartarat rezistentne kisele fosfataze (TRAP) sa vrednostima magnezijuma i fosfora kod predijaliznih pacijenata; grafici prikazuju korelaciju u okviru 95% CI i 95% predikcionog intervala



Slika 21. Korelacija vrednosti beta-karboksi terminalnog dela ukrštenih veza kolagena I (beta-CTX) sa vrednostima kalcijuma i 25-hidroksi vitamina D (25D) kod predijaliznih pacijenata; grafici prikazuju korelaciju u okviru 95% CI i 95% predikcionog intervala

4.4.3. Korelacija vrednosti BALP, TRAP i beta-CTx sa vrednostima preporučenih biomarkera kod pacijenata na hemodijalizi

Da bi se ustanovila povezanost nivoa BALP, TRAP i beta-CTx sa nivoima preporučenih biomarkera (ALP, kalcijuma, magnezijuma, fosfora, CaxP, iPTH i 25D) za praćenje metabolizma kostiju određen je Spearmanov koeficijent korelacije koncentracija ispitivanih sa preporučenim analiziranim biomarkerima kod pacijenata na hemodijalizi (Tabela XXVIII–XXX). Mada koeficijenti korelacije između ispitivanih biomarkera nisu bili visoki, korelacija je bila statistički značajna.

Tabela XXVIII Korelacija vrednosti BALP sa vrednostima TRAP, beta-CTx, ALP, kalcijuma, magnezijuma, neorganskog fosfata, CaxP, iPTH i 25D kod HD pacijenata

Biomarker	BALP (IU/L)		
	r	95% CI	p*
TRAP (IU/L)	0,297	0,011–0,583	p < 0,05
Beta-CTx (ng/mL)	0,504	0,121–0,887	p < 0,01
ALP (IU/L)	0,353	0,291–0,415	p < 0,001
Kalcijum (mmol/L)	-0,242	-0,421–0,063	p < 0,05
Magnezijum (mmol/L)	0,086	-0,113–0,279	p = 0,394
Neorganski fosfat (mmol/L)	-0,493	-0,964 do -0,022	p < 0,05
CaxP (mmol ² /L ²)	-0,289	-0,372 do -0,206	p < 0,05
iPTH (pg/mL)	0,540	0,402–0,560	p < 0,01
25D (nmol/L)	-0,225	-0,442–0,008	p < 0,05

*p < 0,05 – postoji značajna korelacija između biomarkera

Tabela XXIX Korelacija vrednosti TRAP sa vrednostima beta-CTx, ALP, kalcijuma, magnezijuma, neorganskog fosfata, CaxP, iPTH i 25D kod HD pacijenata

Biomarker	TRAP (IU/L)		
	r	95% CI	p*
Beta-CTx (ng/mL)	-0,217	-0,314 do -0,120	p < 0,05
ALP (IU/L)	0,026	-0,176–0,226	p = 0,802
Kalcijum (mmol/L)	-0,079	-0,269–0,115	p = 0,422
Magnezijum (mmol/L)	-0,214	-0,335 do -0,093	p < 0,05
Neorganski fosfat (mmol/L)	0,039	-0,165–0,240	p = 0,707
CaxP (mmol ² /L ²)	-0,065	-0,259–0,133	p = 0,517
iPTH (pg/mL)	0,368	0,246–0,490	p < 0,05
25D (nmol/L)	0,278	0,198–0,358	p < 0,05

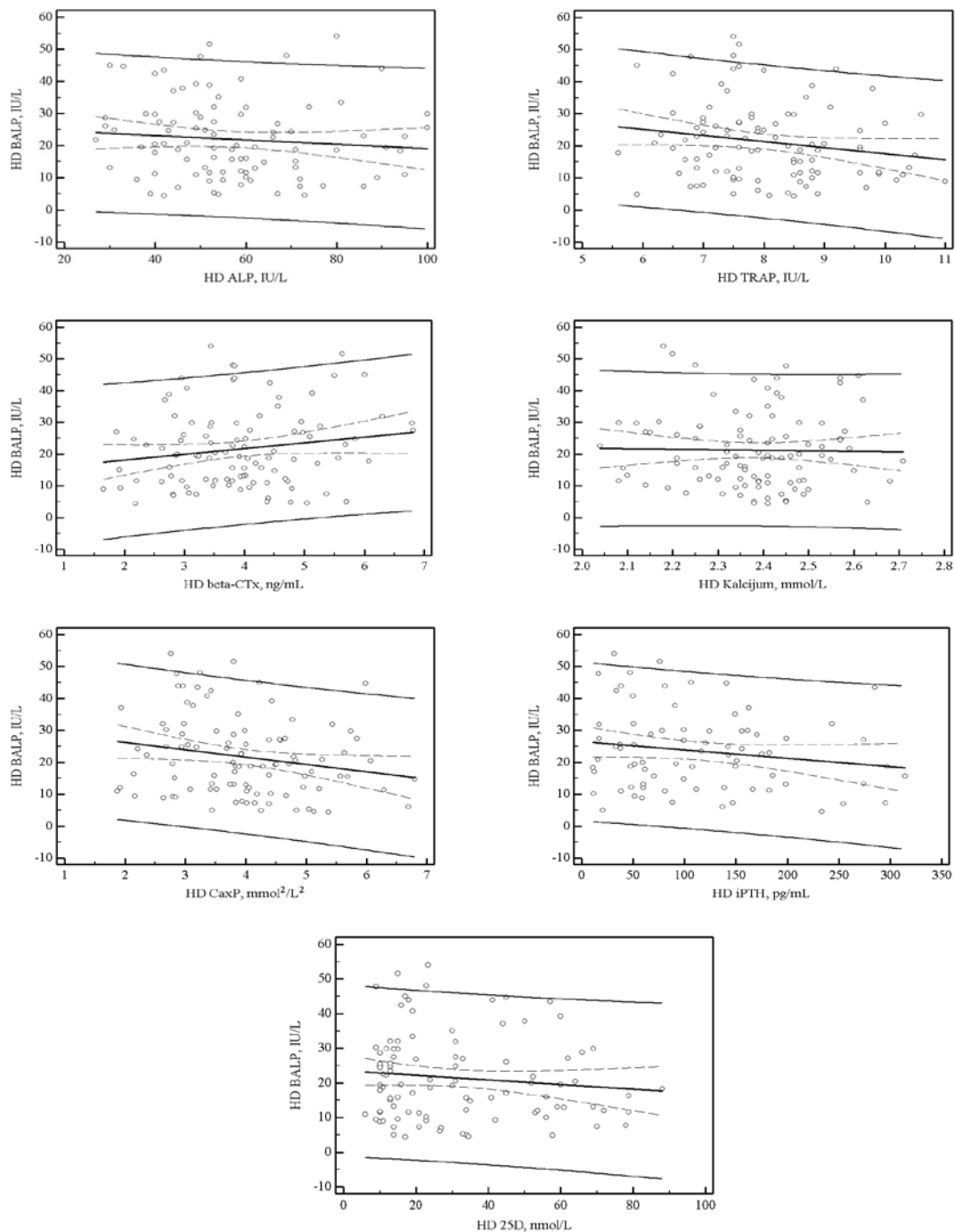
*p < 0,05 – postoji značajna korelacija između biomarkera

Tabela XXX Korelacija vrednosti beta-CTx sa vrednostima ALP, kalcijuma, magnezijuma, neorganskog fosfata, CaxP, iPTH i 25D kod HD pacijenata

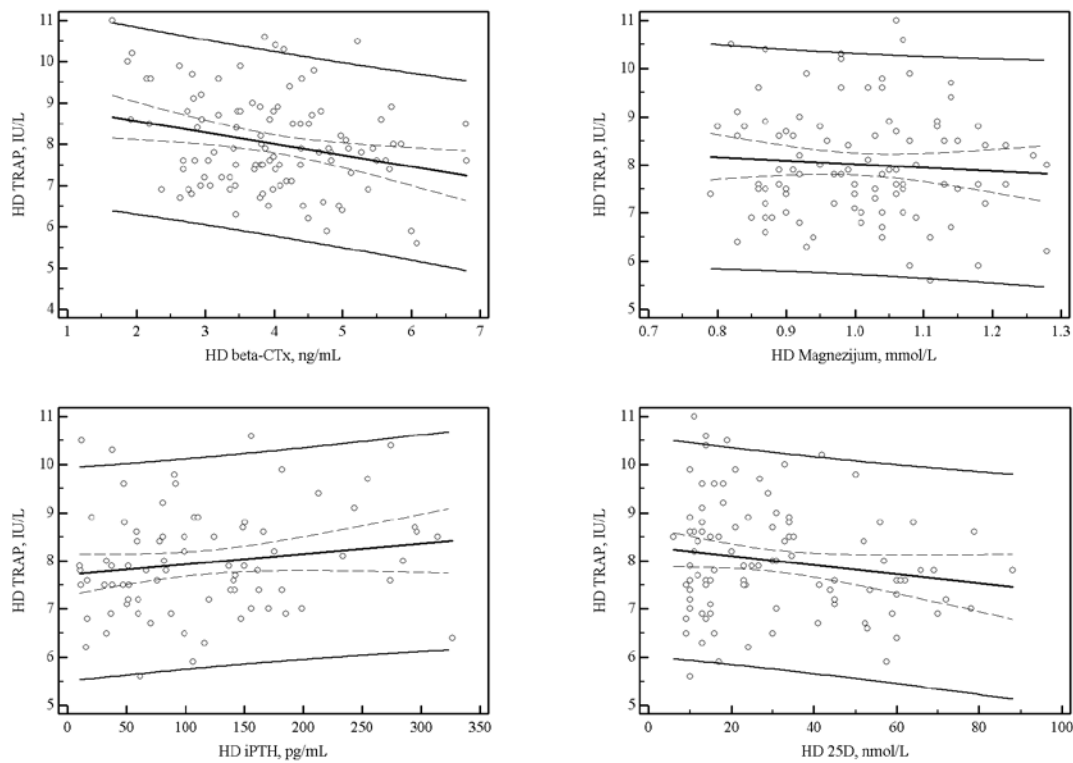
Biomarker	Beta-CTx (ng/mL)		
	r	95% CI	p*
ALP (IU/L)	-0,036	-0,235–0,165	p = 0,725
Kalcijum (mmol/L)	0,127	-0,068–0,313	p = 0,202
Magnezijum (mmol/L)	0,011	-0,185–0,206	p = 0,911
Neorganski fosfat (mmol/L)	-0,043	-0,242–0,160	p = 0,681
CaxP (mmol ² /L ²)	0,217	0,023–0,396	p < 0,05
iPTH (pg/mL)	0,516	0,461–0,541	p < 0,01
25D (nmol/L)	0,028	-0,153–0,239	p = 0,656

*p < 0,05 – postoji značajna korelacija između biomarkera

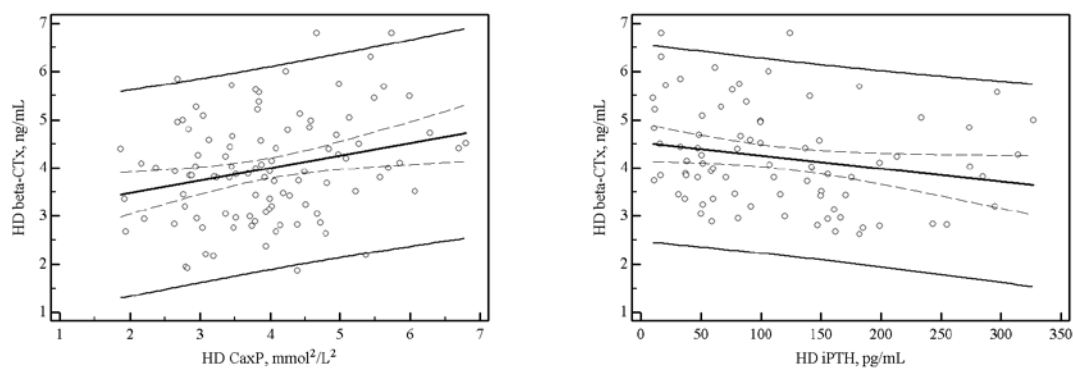
Za biomarkere između kojih je postojala statistički značajna korelacija, linearnom regresionom analizom grafički je prikazana povezanost u okviru 95% CI i 95% predikcionog intervala (*Slike 22–24*).



Slika 22. Korelacija vrednosti koštanog izoenzima alkalne fosfataze (BALP) sa vrednostima ukupne alkalne fosfataze (ALP), tartarat rezistentne kisele fosfataze (TRAP), beta-karboksi terminalnog dela ukrštenih veza kolagena I (beta-CTX), kalcijuma, proizvoda kalcijuma i fosfora (CaxP), iPTH i 25-hidroksi vitamina D (25D) kod HD pacijenata; grafici prikazuju korelaciju u okviru 95% CI i 95% predikcionog intervala



Slika 23. Korelacija vrednosti tartarat rezistentne kisele fosfataze (TRAP) sa vrednostima beta-karboksi terminalnog dela ukrštenih veza kolagena I (beta-CTX), magnezijuma, iPTH i 25-hidroksi vitamina D (25D) kod HD pacijenata; grafici prikazuju korelaciju u okviru 95% CI i 95% predikcionog intervala



Slika 24. Korelacija vrednosti beta-karboksi terminalnog dela ukrštenih veza kolagena I (beta-CTX) sa vrednostima proizvoda kalcijuma i neorganskog fosfata (CaxP) i iPTH kod HD pacijenata; grafici prikazuju korelaciju u okviru 95% CI i 95% predikcionog intervala

4.4.4. Korelacija vrednosti BALP, TRAP i beta-CTx sa vrednostima preporučenih biomarkera kod pacijenata na kontinuiranoj ambulatornoj peritonealnoj dijalizi

Da bi se ustanovila povezanost nivoa BALP, TRAP i beta-CTx sa nivoima preporučenih biomarkera (ALP, kalcijuma, magnezijuma, neorganskog fosfata, CaxP, iPTH i 25D) za praćenje metabolizma kostiju određen je Spearmanov koeficijent korelacije koncentracija ispitivanih sa preporučenim analiziranim biomarkerima kod pacijenata na kontinuiranoj ambulatornoj peritonealnoj dijalizi (*Tabela XXXI–XXXIII*). Mada koeficijenti korelacije između ispitivanih biomarkera nisu bili visoki, korelacija je bila statistički značajna.

Tabela XXXI Korelacija vrednosti BALP sa vrednostima TRAP, beta-CTx, ALP, kalcijuma, magnezijuma, neorganskog fosfata, CaxP, iPTH i 25D kod CAPD pacijenata

Biomarker	BALP (IU/L)		
	r	95% CI	p*
TRAP (IU/L)	0,321	0,287–0,355	p < 0,05
Beta-CTx (ng/mL)	0,427	0,291–0,563	p < 0,05
ALP (IU/L)	0,406	0,222–0,561	p < 0,0001
Kalcijum (mmol/L)	-0,287	-0,456 do -0,096	p < 0,05
Magnezijum (mmol/L)	-0,029	-0,220–0,162	p = 0,761
Neorganski fosfat (mmol/L)	-0,200	-0,377 do -0,010	p < 0,05
CaxP (mmol ² /L ²)	-0,294	-0,465 do -0,103	p < 0,05
iPTH (pg/mL)	0,320	0,217–0,423	p < 0,05
25D (nmol/L)	0,318	0,136–0,479	p < 0,001

*p < 0,05 – postoji značajna korelacija između biomarkera

Tabela XXXII Korelacija vrednosti TRAP sa vrednostima beta-CTx, ALP, kalcijuma, magnezijuma, neorganskog fosfata, CaxP, iPTH i 25D kod CAPD pacijenata

Biomarker	TRAP (IU/L)		
	r	95% CI	p*
Beta-CTx (ng/mL)	-0,211	-0,326–0,096	p < 0,05
ALP (IU/L)	0,086	-0,116–0,280	p = 0,404
Kalcijum (mmol/L)	-0,011	-0,202–0,182	p = 0,916
Magnezijum (mmol/L)	-0,312	-0,422 do -0,202	p < 0,05
Neorganski fosfat (mmol/L)	0,221	0,042–0,400	p < 0,05
CaxP (mmol ² /L ²)	0,203	0,010–0,383	p = 0,040
iPTH (pg/mL)	0,341	0,212–0,470	p < 0,05
25D (nmol/L)	0,215	0,030–0,386	p < 0,05

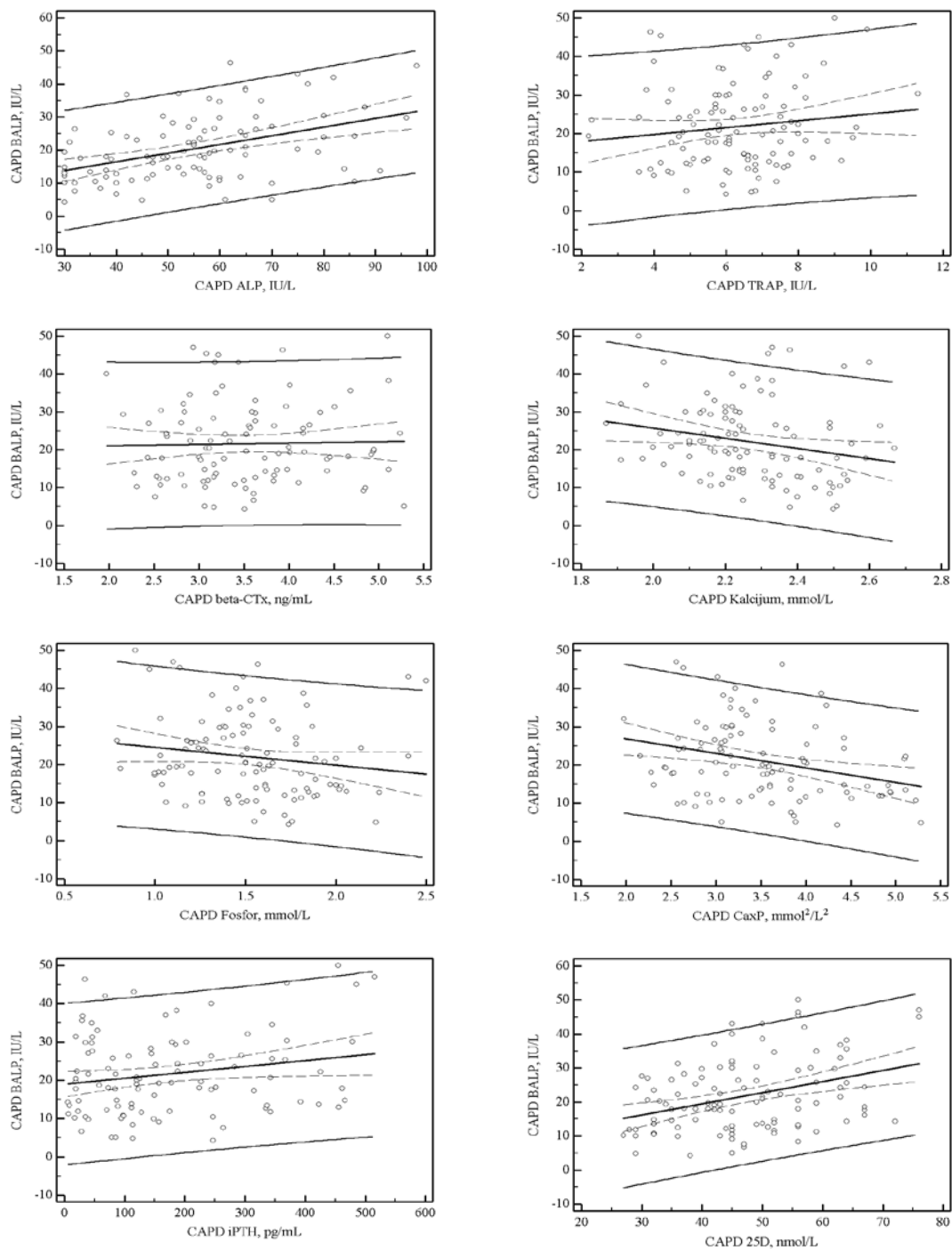
*p < 0,05 – postoji značajna korelacija između biomarkera

Tabela XXXIII Korelacija vrednosti beta-CTx sa vrednostima ALP, kalcijuma, magnezijuma, neorganskog fosfata, CaxP, iPTH i 25D kod CAPD pacijenata

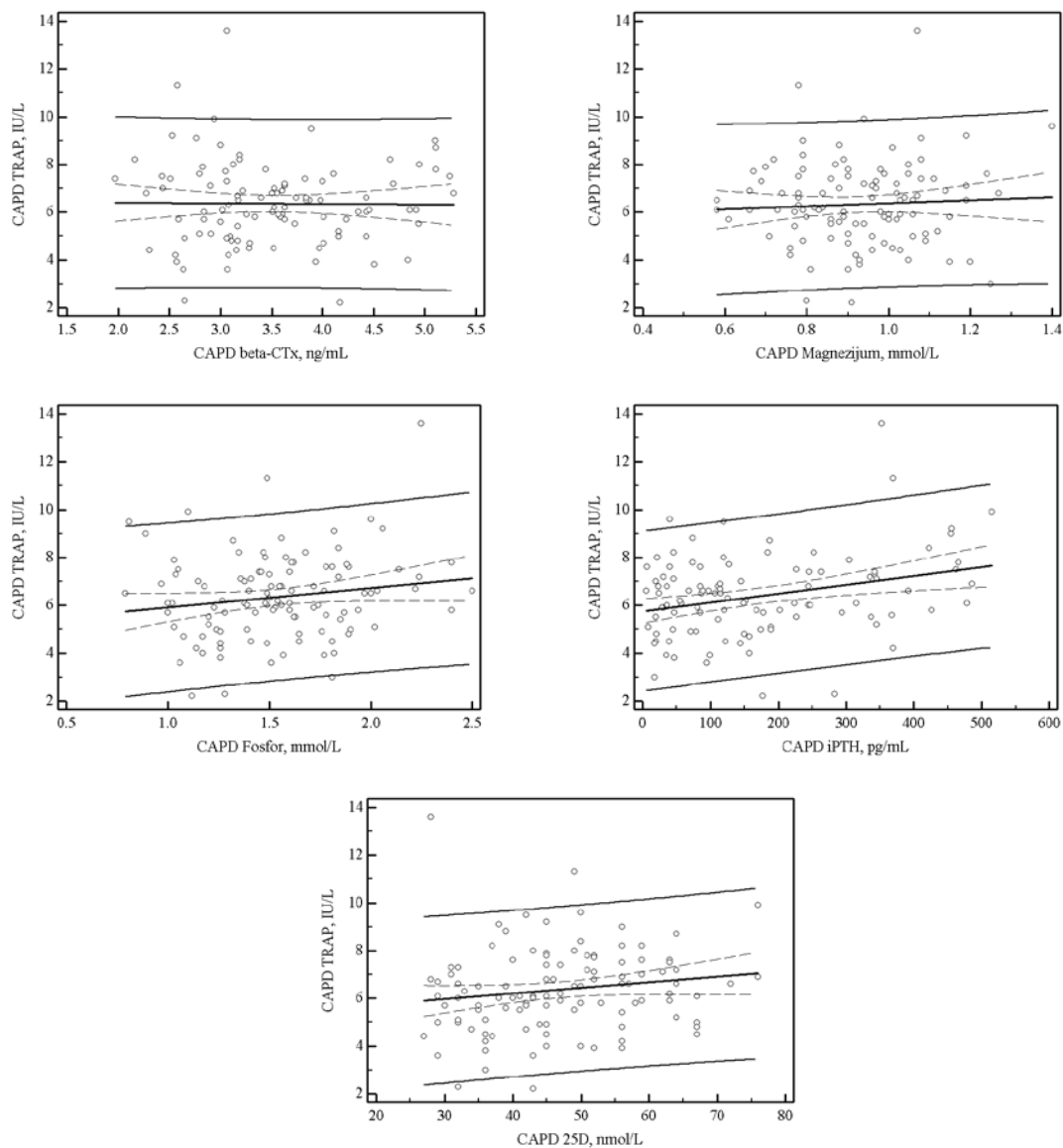
Biomarker	Beta-CTx (ng/mL)		
	r	95% CI	p*
ALP (IU/L)	0,250	0,043–0,437	p < 0,05
Kalcijum (mmol/L)	-0,049	-0,240–0,154	p = 0,637
Magnezijum (mmol/L)	-0,059	-0,253–0,139	p = 0,556
Neorganski fosfat (mmol/L)	-0,035	-0,230–0,162	p = 0,728
CaxP (mmol ² /L ²)	0,017	-0,187–0,220	p = 0,870
iPTH (pg/mL)	-0,079	-0,277–0,124	p = 0,443
25D (nmol/L)	0,274	0,128–0,420	p < 0,05

*p < 0,05 – postoji značajna korelacija između biomarkera

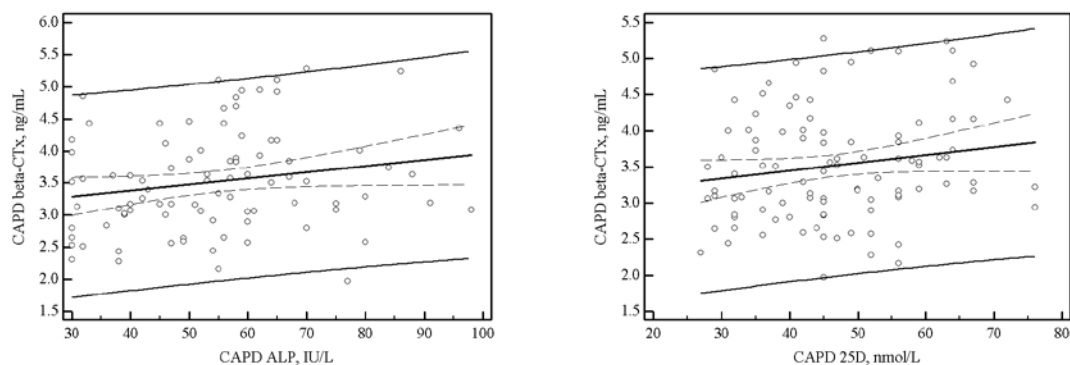
Za biomarkere između kojih je postojala statistički značajna korelacija, linearnom regresionom analizom grafički je prikazana povezanost u okviru 95% CI i 95% predikcionog intervala (*Slike 25–27*).



Slika 25. Korelacija vrednosti koštanog izoenzima alkalne fosfataze (BALP) sa vrednostima ukupne alkalne fosfataze (ALP), tartarat rezistentne kisele fosfataze (TRAP), beta-karboksi terminalnog dela ukrštenih veza kolagena I (beta-CTX), kalcijuma, fosfora, proizvoda kalcijuma i fosfora (CaxP), iPTH i 25-hidroksi vitamina D (25D) kod CAPD pacijenata; grafici prikazuju korelaciju u okviru 95% CI i 95% predikcionog intervala



Slika 26. Korelacija vrednosti tartarat rezistentne kisele fosfataze (TRAP) sa vrednostima beta-karboksi terminalnog dela ukrštenih veza kolagena I (beta-CTX), magnezijuma, fosfora, iPTH i 25-hidroksi vitamina D (25D) kod CAPD pacijenata; grafici prikazuju korelaciju u okviru 95% CI i 95% predikcionog intervala



Slika 27. Korelacija vrednosti beta-karboksi terminalnog dela ukrštenih veza kolagena I (beta-CTx) sa vrednostima ukupne alkalne fosfataze (ALP) i 25-hidroksi vitamina D (25D) kod CAPD pacijenata; grafici prikazuju korelaciju u okviru 95% CI i 95% predikcionog intervala

4.5. POREĐENJE BALP, TRAP, BETA-CTx I PREPORUČENIH BIOMARKERA U ODNOSU NA NIVOE iPTH, VREDNOSTI VITAMINA D I PROIZVODA KALCIJUMA I NEORGANSKOG FOSFATA

Preporuke su da se u odnosu na tri različita nivoa iPTH može proceniti ubrzan, normalan ili usporen metabolizam kostiju, pa je planirano da se ispita u kojoj su meri izmenjene vrednosti specifičnih biomarkera u odnosu na preporučene, u sva tri nivoa vrednosti iPTH (< 150 pg/mL, 150–300 pg/mL, > 300 pg/mL), odnosno koji biomarker najbolje prati niske, srednje i visoke nivoe iPTH, tj. pomoću koga biomarkera je moguće proceniti nizak, normalan ili ubrzan metabolizam kostiju. Takođe, kod KSBB pacijenata adekvatno dozirana terapija vitaminom D, može u velikoj meri sprečiti pogoršanje metabolizma kostiju upravo na osnovu vrednosti specifičnih biomarkera kostiju uz paralelno merenje nivoa 25D. U odnosu na ovu činjenicu, ispitivaće se u kojoj meri su izmenjeni analizirani biomarkeri kod nedovoljnih i dovoljnih nivoa 25D, tj. koji biomarker najbolje korelira sa nivoima 25D.

Kao posledica dugotrajne bolesti bubrega i neadekvatnog regulisanja nivoa kalcijuma i fosfora, kod KSBB pacijenata može da se razvije kalcifikacija mekih tkiva, najčešće vaskularna kalcifikacija. Preporuke su da proizvod CaxP bude kontrolisan kako bi se izbegla ektopična kalcifikacija. Zato je bilo potrebno da se ispita kako nivo CaxP prati biomarkere metabolizma kostiju u sva tri nivoa iPTH, kao i nedovoljne i dovoljne nivoe 25D.

4.5.1. Raspodela vrednosti BALP, TRAP, beta-CTx i preporučenih biomarkera u odnosu na niske, preporučene i visoke nivoe iPTH

Da bi se procenilo u kojoj meri BALP, TRAP, beta-CTx i preporučeni biomarkeri prate nivoe iPTH, ispitana je raspodela vrednosti analiziranih biomarkera u odnosu na nivoe iPTH: < 150 pg/mL, 150–300 pg/mL i > 300 pg/mL kod predijaliznih i dijaliziranih pacijenata, posebno. U odnosu na nivoe iPTH američka organizacija NKF i KDOQI je klasifikovala nivo metabolizma kostiju na usporen i ubrzan metabolizam kostiju (< 150 pg/mL i > 300 pg/mL). Vrednosti iPTH 150–300 pg/mL ukazuju na normalan metabolizam kostiju.

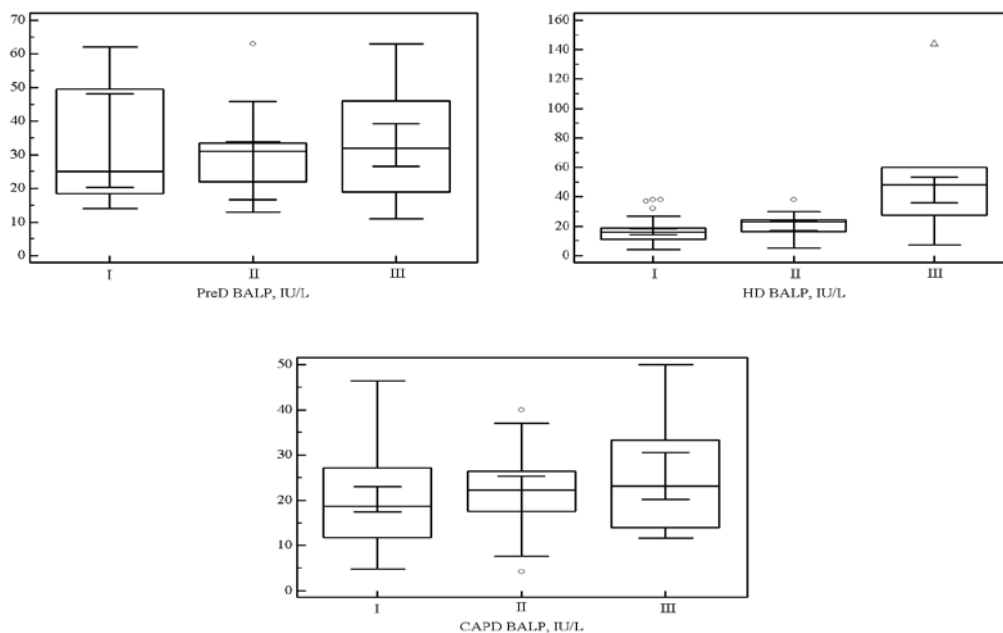
U *Tabelama XXXIV–XLIII* je prikazana raspodela vrednosti BALP, TRAP, beta-CTx i preporučenih biomarkera u odnosu na tri različita nivoa iPTH, posebno za predijalizne i dijalizirane pacijente. Grupe predijaliznih, HD i CAPD pacijenata su predstavljene rimskim brojevima I, II i III u odnosu na nivoe iPTH: < 150 pg/mL, 150–300 pg/mL i > 300 pg/mL, redom. Kolmogorov-Smirnov testom utvrđena je normalna raspodela vrednosti analiziranih parametara kod predijaliznih, HD i CAPD pacijenata, podeljenih u grupe u odnosu na nivoe iPTH, izuzev vrednosti BALP kod pacijenata na hemodijalizi koji su imali iPTH nivoe > 300 pg/mL i vrednosti 25D kod pacijenata na hemodijalizi koji su imali iPTH < 150 pg/mL. Primenom Wilcoxonovog testa za parametre koji nisu imali normalnu raspodelu i parametarskog ANOVA testa za parametre sa normalnom raspodelom ustanovljeno je da su postojale statistički značajne razlike između pojedinih grupa pacijenata (*Slike 28–37*). Student t-test je pokazao da su kod predijaliznih pacijenata značajno niže vrednosti beta-CTx u grupi II ($p < 0,01$), kao i vrednosti kalcijuma i 25D ($p < 0,05$), dok su nivoi ostalih parametara značajno više ($p < 0,05$).

Kod HD pacijenata vrednosti BALP su bili značajno viši u grupi III (Wilcoxonov test, $p < 0,05$), dok su vrednosti TRAP bili značajno viši u grupi I (Student t-test, $p < 0,05$); koncentracije beta-CTx su bile značajno niže u grupi I (Student t-test, $p < 0,01$) u odnosu na II i III, kao i značajno niže u grupi II u odnosu na grupu III (Student t-test, $p < 0,01$); koncentracije kalcijuma su bile značajno niže u grupi III, a fosfora i CaxP u grupi II u odnosu na ostale grupe. Kod CAPD pacijenata nivoi TRAP su bili značajno viši u III grupi (Student t-test, $p < 0,05$), a koncentracije fosfora i CaxP značajno niže u grupi II (Student t-test, $p < 0,05$).

Tabela XXXIV Raspodela vrednosti BALP u odnosu na različite nivoe iPTH kod predijaliznih (PreD), HD i CAPD pacijenata (I < 150 pg/mL; II 150–300 pg/mL; III > 300 pg/mL)

Nivo iPTH		N	BALP (IU/L)					p*
			\bar{x}	Sd	Me	Min	Max	
PreD	I	9	34	18,2	25	14	62	0,560
	II	8	31	16,4	31	13	63	0,526
	III	23	33	16,1	32	11	63	0,485
HD	I	57	16	7,2	16	3	38	0,197
	II	25	20	7,2	24	7	48	0,588
	III	30	50	24,4	60	10	145	0,040
CAPD	I	54	20	10,7	18	5	46	0,489
	II	23	21	9,3	22	4	40	0,914
	III	37	25	12,1	22	12	50	0,583

*p > 0,05 – normalna raspodela (Kolmogorov-Smirnov test)

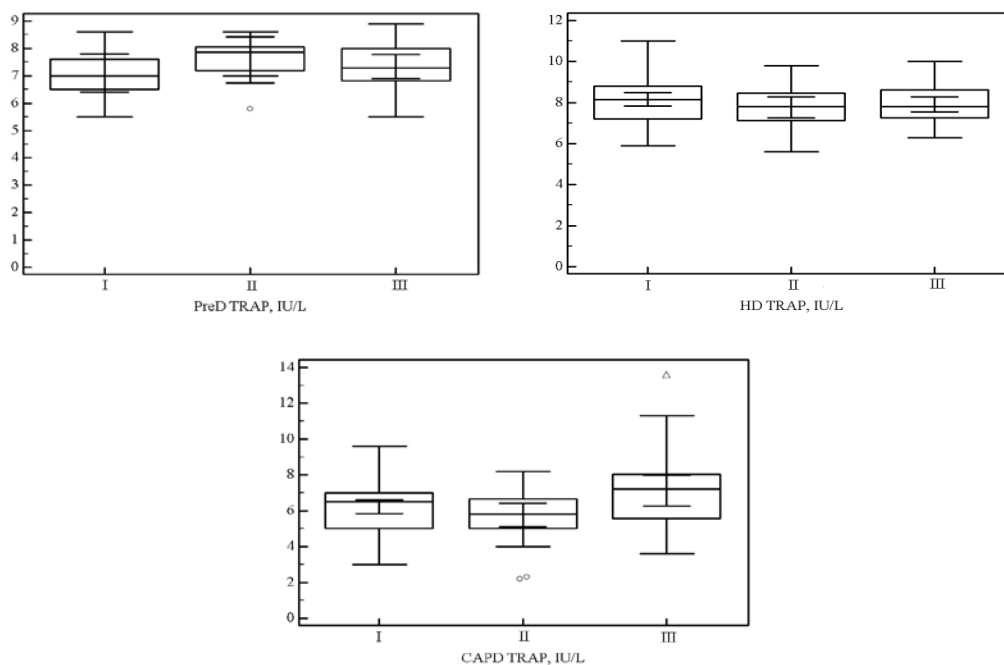


Slika 28. Koncentracije koštanog izoenzima alkalne fosfataze (BALP) u odnosu na niske, preporučene i visoke nivoe iPTH kod predijaliznih (PreD), HD i CAPD pacijenata. Podaci su predstavljeni kao *box-plots* grafici koji pokazuju 10, 50, 75 i 90 percentil.

Tabela XXXV Raspodela vrednosti TRAP u odnosu na različite nivoe iPTH kod predijaliznih (PreD), HD i CAPD pacijenata (I < 150 pg/mL; II 150–300 pg/mL; III > 300 pg/mL)

Nivo iPTH		N	TRAP (IU/L)					
			\bar{x}	Sd	Me	Min	Max	p*
PreD	I	9	7	1,1	7	5	9	0,987
	II	8	7	1,4	8	6	9	0,442
	III	23	7	1,3	7	6	9	0,989
HD	I	57	8	1,1	8	6	11	0,553
	II	25	8	1,2	8	5	10	0,843
	III	30	8	1,3	7	6	10	0,255
CAPD	I	54	6	2,1	6	3	9	0,782
	II	23	6	2,2	5	2	8	0,757
	III	37	7	2,4	7	3	13	0,760

*p > 0,05 – normalna raspodela (Kolmogorov-Smirnov test)

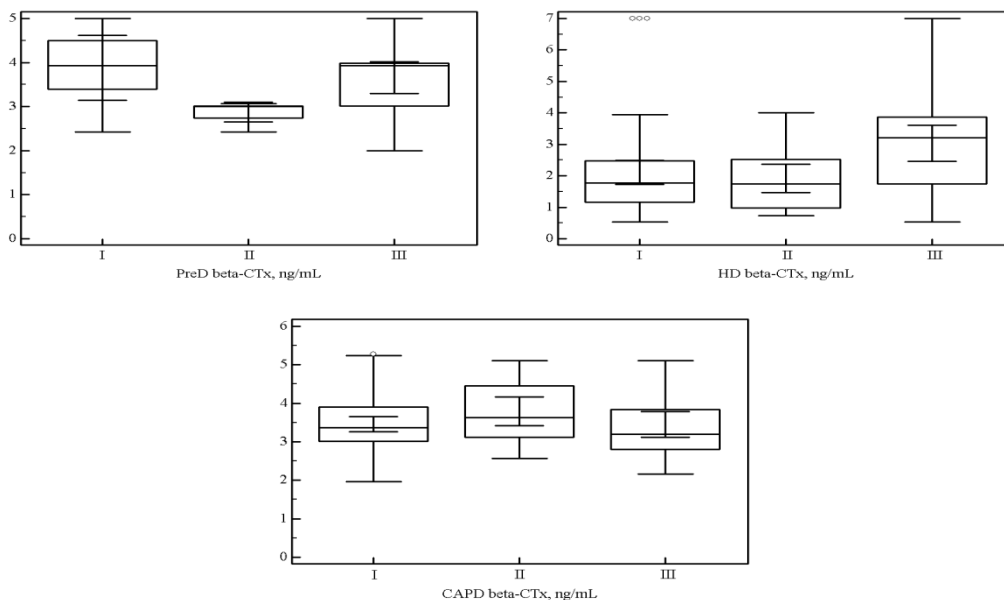


Slika 29. Koncentracije tartarat rezistentne kisele fosfataze (TRAP) u odnosu na niske, preporučene i visoke nivoe iPTH kod predijaliznih (PreD), HD i CAPD pacijenata. Podaci su predstavljeni kao *box-plots* grafici koji pokazuju 10, 50, 75 i 90 percentil.

Tabela XXXVI Raspodela vrednosti beta-CTx u odnosu na različite nivoe iPTH kod predijaliznih (PreD), HD i CAPD pacijenata (I < 150 pg/mL; II 150–300 pg/mL; III > 300 pg/mL)

Nivo iPTH		N	beta-CTx (ng/mL)					p*
			\bar{x}	Sd	Me	Min	Max	
PreD	I	9	3,88	0,882	3,94	2,42	5,00	0,855
	II	8	2,87	0,343	3,00	2,42	3,07	0,183
	III	23	3,66	0,836	3,93	2,01	5,05	0,227
HD	I	57	1,93	1,031	1,53	0,54	3,93	0,266
	II	25	2,07	1,373	2,31	0,54	7,00	0,256
	III	30	3,03	1,705	3,21	0,54	7,00	0,298
CAPD	I	54	3,45	0,734	3,37	1,97	5,28	0,819
	II	23	3,79	0,774	3,63	2,57	5,11	0,654
	III	37	3,45	0,861	3,19	2,16	5,11	0,643

*p > 0,05 – normalna raspodela (Kolmogorov-Smirnov test)

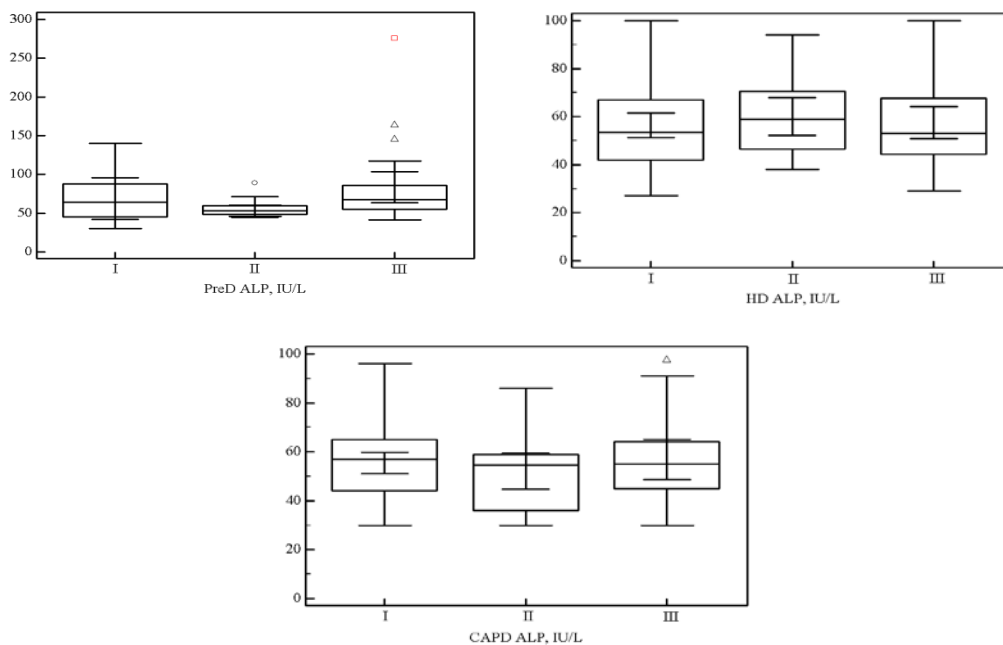


Slika 30. Koncentracije beta-karboksi terminalnog dela ukrštenih veza kolagena I (beta-CTx) u odnosu na niske, preporučene i visoke nivoe iPTH kod predijaliznih (PreD), HD i CAPD pacijenata. Podaci su predstavljeni kao *box-plots* grafici koji pokazuju 10, 50, 75 i 90 percentil.

Tabela XXXVII Raspodela vrednosti ALP u odnosu na različite nivoe iPTH kod predijaliznih (PreD), HD i CAPD pacijenata (I < 150 pg/mL; II 150–300 pg/mL; III > 300 pg/mL)

Nivo iPTH		N	ALP (IU/L)					p*
			\bar{x}	Sd	Me	Min	Max	
PreD	I	9	69	35,1	64	30	140	0,936
	II	8	58	15,2	53	46	89	0,481
	III	23	84	50,3	68	41	276	0,065
HD	I	57	57	18,4	54	27	100	0,406
	II	25	60	17,2	59	38	94	0,851
	III	30	57	18,4	53	29	100	0,339
CAPD	I	54	56	16,2	57	30	96	0,926
	II	23	52	17,1	55	30	86	0,886
	III	37	57	18,1	55	30	98	0,742

*p > 0,05 – normalna raspodela (Kolmogorov-Smirnov test)

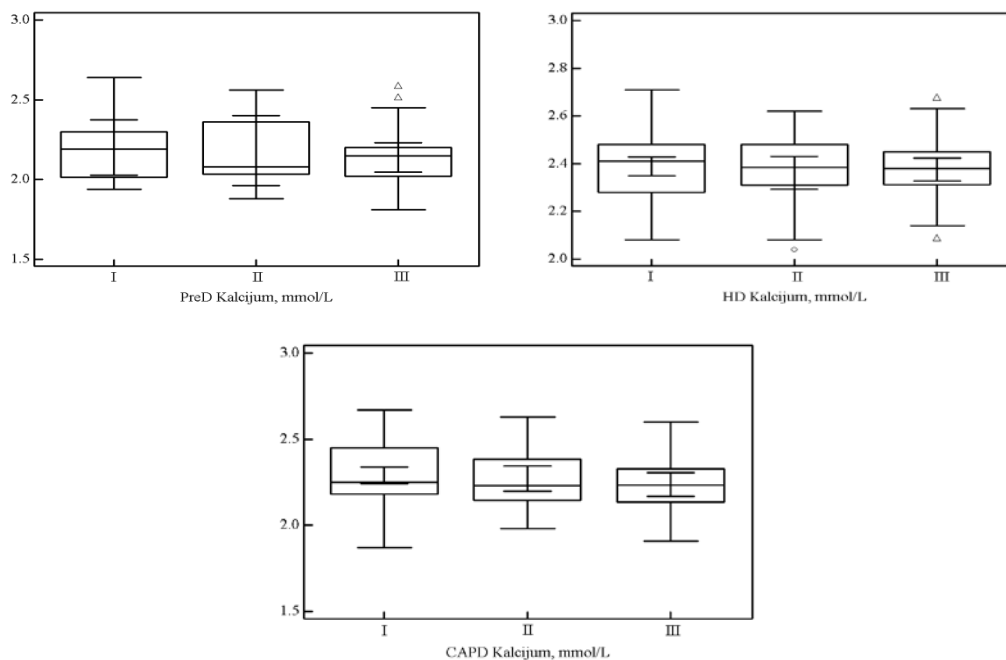


Slika 31. Koncentracije ALP u odnosu na niske, preporučene i visoke nivoe iPTH kod predijaliznih (PreD) HD i CAPD pacijenata. Podaci su predstavljeni kao *box-plots* grafici koji pokazuju 10, 50, 75 i 90 percentil.

Tabela XXXVIII Raspodela vrednosti kalcijuma u odnosu na različite nivoe iPTH kod predijaliznih (PreD), HD i CAPD pacijenata (I < 150 pg/mL; II 150–300 pg/mL; III > 300 pg/mL)

Nivo iPTH		N	Kalcijum (mmol/L)					
			\bar{x}	Sd	Me	Min	Max	p*
PreD	I	9	2,20	0,232	2,19	1,94	2,64	0,927
	II	8	2,18	0,242	2,08	1,88	2,56	0,771
	III	23	2,14	0,211	2,15	1,81	2,59	0,475
HD	I	57	2,39	0,143	2,41	2,08	2,71	0,440
	II	25	2,36	0,163	2,39	2,04	2,62	0,316
	III	30	2,37	0,144	2,38	2,09	2,68	0,885
CAPD	I	54	2,29	0,172	2,25	1,87	2,67	0,278
	II	23	2,27	0,171	2,23	1,98	2,63	0,758
	III	37	2,24	0,174	2,24	1,91	2,60	0,807

*p > 0,05 – normalna raspodela (Kolmogorov-Smirnov test)

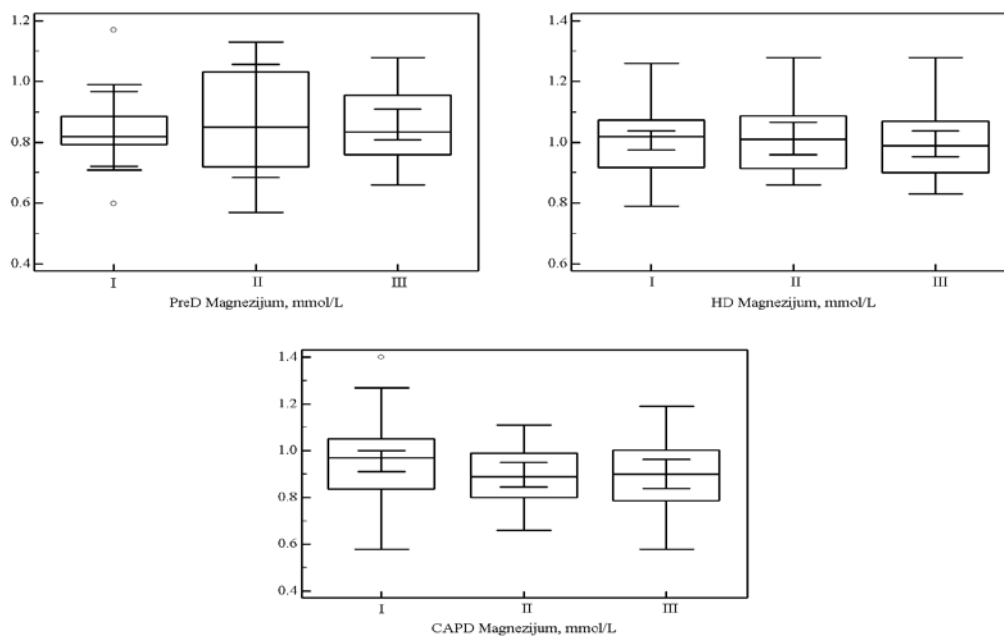


Slika 32. Koncentracije kalcijuma u odnosu na niske, preporučene i visoke nivoe iPTH kod predijaliznih (PreD), HD i CAPD pacijenata. Podaci su predstavljeni kao *box-plots* grafici koji pokazuju 10, 50, 75 i 90 percentil.

Tabela XXXIX Raspodela vrednosti magnezijuma u odnosu na različite nivoe iPTH kod predijaliznih (PreD), HD i CAPD pacijenata (I < 150 pg/mL; II 150–300 pg/mL; III > 300 pg/mL)

Nivo iPTH		N	Magnezijum (mmol/L)					
			\bar{x}	Sd	Me	Min	Max	p*
PreD	I	9	0,84	0,164	0,82	0,60	1,17	0,490
	II	8	0,87	0,204	0,85	0,57	1,13	0,953
	III	23	0,85	0,122	0,84	0,66	1,08	0,924
HD	I	57	1,00	0,111	1,02	0,79	1,26	0,881
	II	25	1,01	0,115	1,01	0,86	1,28	0,989
	III	30	0,99	0,123	0,99	0,83	1,28	0,811
CAPD	I	54	0,96	0,173	0,97	0,58	1,40	0,906
	II	23	0,90	0,122	0,89	0,66	1,11	0,980
	III	37	0,90	0,161	0,90	0,58	1,19	0,924

*p > 0,05 – normalna raspodela (Kolmogorov-Smirnov test)

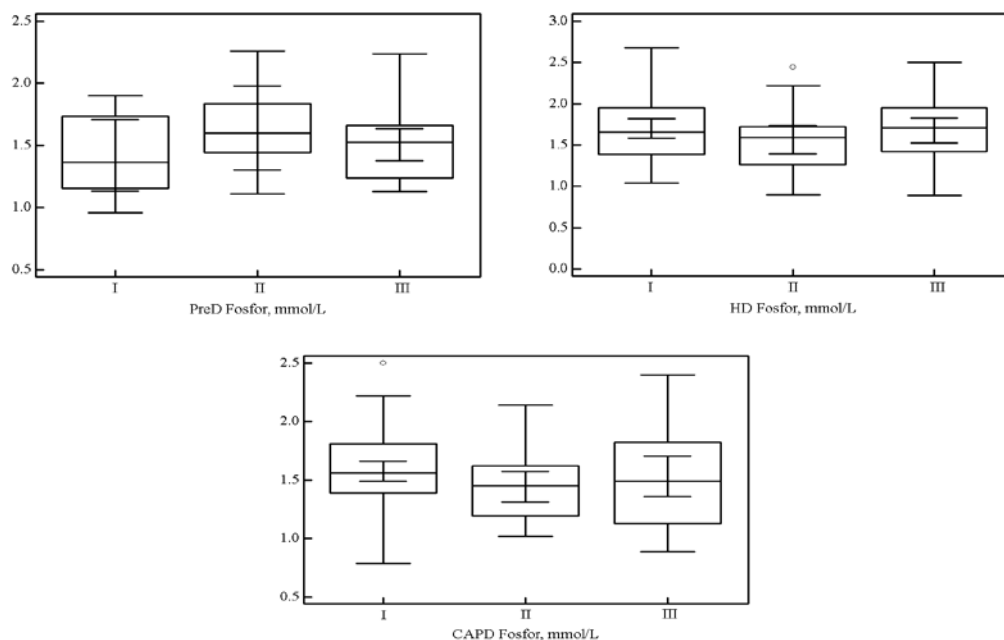


Slika 33. Koncentracije magnezijuma u odnosu na niske, preporučene i visoke nivoe iPTH kod predijaliznih (PreD), HD i CAPD pacijenata. Podaci su predstavljeni kao *box-plots* grafici koji pokazuju 10, 50, 75 i 90 percentil.

Tabela XXXL Raspodela vrednosti neorganskog fosfata u odnosu na različite nivoe iPTH kod predijaliznih (PreD), HD i CAPD pacijenata (I < 150 pg/mL; II 150–300 pg/mL; III > 300 pg/mL)

Nivo iPTH		N	Neorganski fosfat (mmol/L)					
			\bar{x}	Sd	Me	Min	Max	p*
PreD	I	9	1,42	0,343	1,37	0,96	1,90	0,989
	II	8	1,64	0,372	1,60	1,11	2,26	0,995
	III	23	1,51	0,312	1,53	1,13	2,24	0,753
HD	I	57	1,70	0,405	1,66	1,04	2,68	0,964
	II	25	1,56	0,384	1,59	0,90	2,44	0,890
	III	30	1,68	0,411	1,71	0,89	2,50	0,986
CAPD	I	54	1,58	0,321	1,56	0,79	2,50	0,977
	II	23	1,44	0,303	1,45	1,02	2,14	0,714
	III	37	1,53	0,462	1,49	0,89	2,40	0,835

*p > 0,05 – normalna raspodela (Kolmogorov-Smirnov test)

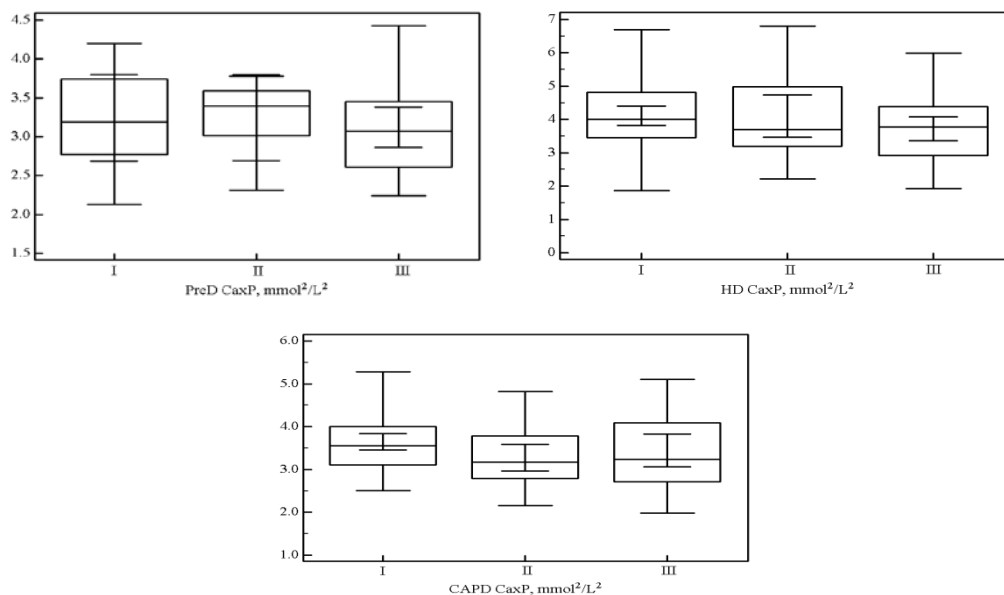


Slika 34. Koncentracije fosfora u odnosu na niske, preporučene i visoke nivoe iPTH kod predijaliznih (PreD), HD i CAPD pacijenata. Podaci su predstavljeni kao *box-plots* grafici koji pokazuju 10, 50, 75 i 90 percentil.

Tabela XLI Raspodela vrednosti proizvoda kalcijuma i neorganskog fosfata (CaxP) u odnosu na različite nivoe iPTH kod predijaliznih (PreD), HD i CAPD pacijenata (I < 150 pg/mL; II 150–300 pg/mL; III > 300 pg/mL)

Nivo iPTH		N	CaxP (mmol ² /L ²)					p*
			\bar{x}	Sd	Me	Min	Max	
PreD	I	9	3,2	0,73	3,2	2,1	4,2	0,998
	II	8	3,3	0,53	3,4	2,3	3,7	0,778
	III	23	3,1	0,62	3,1	2,2	4,4	0,636
HD	I	57	4,1	1,07	4,0	1,8	6,6	0,968
	II	25	4,1	1,27	3,7	2,2	6,8	0,461
	III	30	3,7	1,01	3,8	1,9	5,9	0,981
CAPD	I	54	3,6	0,71	3,6	2,5	5,2	0,507
	II	23	3,2	0,72	3,2	2,1	4,8	0,728
	III	37	3,4	0,91	3,2	1,9	5,1	0,878

*p > 0,05 – normalna raspodela (Kolmogorov-Smirnov test)

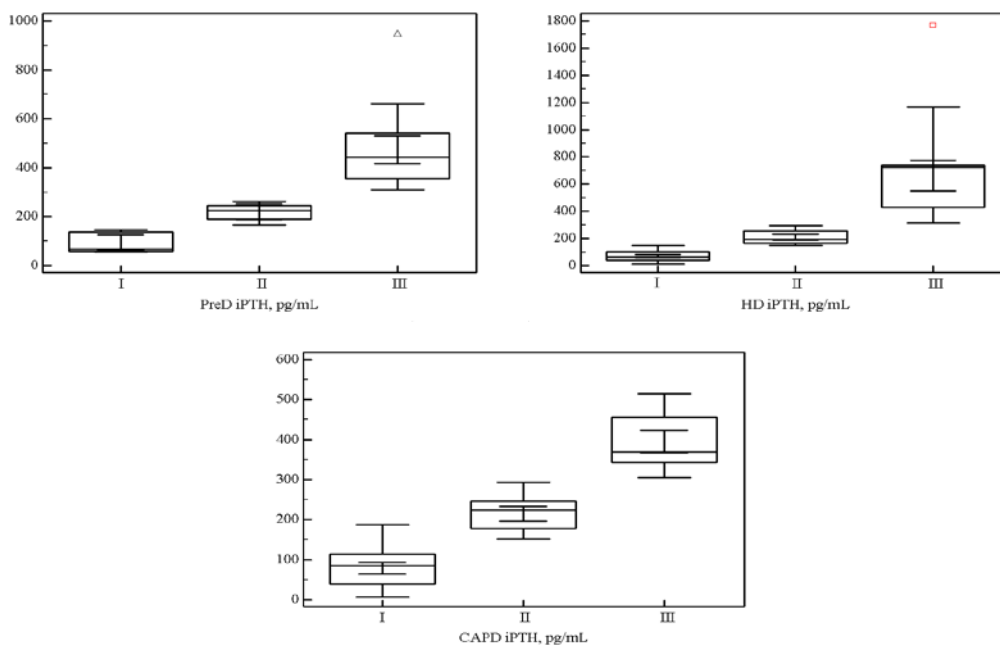


Slika 35. Koncentracije proizvoda kalcijuma i neorganskog fosfata (CaxP) u odnosu na niske, preporučene i visoke nivoe iPTH kod predijaliznih (PreD), HD i CAPD pacijenata. Podaci su predstavljeni kao *box-plots* grafici koji pokazuju 10, 50, 75 i 90 percentil.

Tabela XLII Raspodela vrednosti iPTH u odnosu na različite nivoe iPTH kod predijaliznih (PreD), HD i CAPD pacijenata (I < 150 pg/mL; II 150–300 pg/mL; III > 300 pg/mL)

Nivo iPTH		N	iPTH (pg/mL)					p*
			\bar{x}	Sd	Me	Min	Max	
PreD	I	9	95,9	41,12	68,0	56,6	140,6	0,305
	II	8	220,3	35,63	224,0	166,0	263,0	0,682
	III	23	473,4	139,73	443,0	311,0	950,0	0,804
HD	I	57	71,9	42,21	64,1	0,10	149,1	0,511
	II	25	209,7	50,41	201,9	140,5	296,7	0,397
	III	30	662,5	296,22	658,5	309,3	1150,0	0,125
CAPD	I	54	79,0	46,21	85,0	6,2	180,7	0,512
	II	23	214,4	42,34	224,0	151,7	293,6	0,577
	III	37	394,9	63,23	369,8	304,9	515,1	0,310

*p > 0,05 – normalna raspodela (Kolmogorov-Smirnov test)

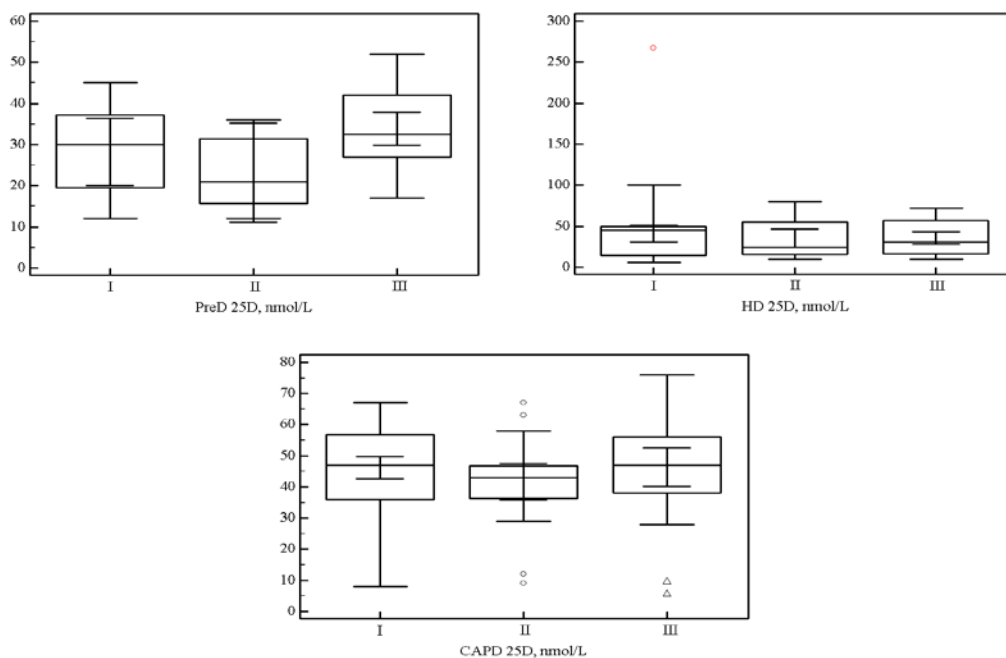


Slika 36. Koncentracije iPTH u odnosu na niske, preporučene i visoke nivoe iPTH kod predijaliznih (PreD), HD i CAPD pacijenata. Podaci su predstavljeni kao *box-plots* grafici koji pokazuju 10, 50, 75 i 90 percentil.

Tabela XLIII Raspodela vrednosti 25-hidroksi vitamina D u odnosu na različite nivoe iPTH kod predijaliznih (PreD), HD i CAPD pacijenata (I < 150 pg/mL; II 150–300 pg/mL; III > 300 pg/mL)

Nivo iPTH		N	25-hidroksi vitamina D (nmol/L)					p*
			\bar{x}	Sd	Me	Min	Max	
PreD	I	9	28,2	10,72	30,0	12,0	45,0	0,997
	II	8	23,2	9,72	21,0	12,0	36,0	0,986
	III	23	33,9	9,81	32,5	17,0	52,0	0,815
HD	I	57	40,9	36,92	47,8	9,0	267,0	0,004
	II	25	35,5	24,51	28,3	9,0	78,7	0,162
	III	30	35,7	21,04	33,1	6,0	64,0	0,486
CAPD	I	54	46,2	13,84	47,0	8,0	67,0	0,561
	II	23	41,3	14,33	43,0	10,0	67,0	0,478
	III	37	46,4	16,52	47,0	6,0	76,0	0,807

*p > 0,05 – normalna raspodela (Kolmogorov-Smirnov test)



Slika 37. Koncentracije 25-hidroksi vitamina D u odnosu na niske, preporučene i visoke nivoe iPTH kod predijaliznih (PreD), HD i CAPD pacijenata. Podaci su predstavljeni kao *box-plots* grafici koji pokazuju 10, 50, 75 i 90 percentil.

4.5.2. Raspodela vrednosti BALP, TRAP, beta-CTx i preporučenih biomarkera u odnosu na nedovoljne i dovoljne nivoe 25-hidroksi vitamina D

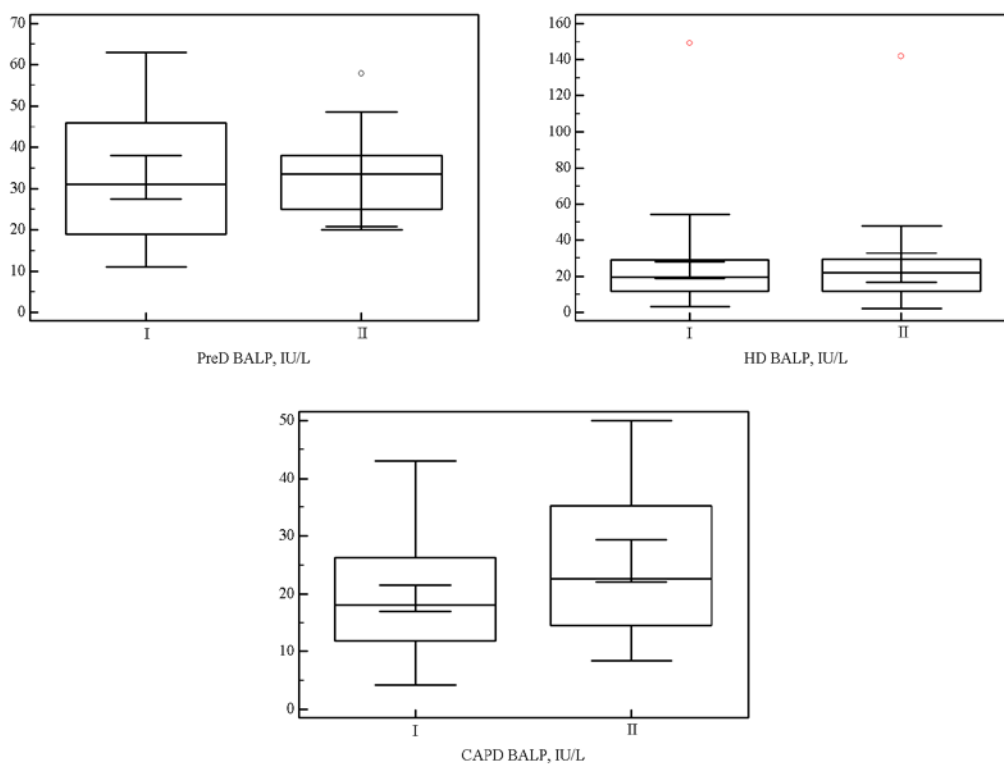
Da bi se procenilo u kojoj meri terapija vitaminom D i njegovim analogima utiče na vrednosti ispitivanih biomarkera BALP, TRAP, beta-CTx, kao i preporučenih biomarkera za praćenje metabolizma kostiju, ispitana je raspodela ovih parametara u odnosu na nedovoljne i dovoljne nivoe 25D. Američke organizacije (NKF i KDOQI) i nacionalno udruženje za edukaciju pacijenata sa bolestima bubrega (*National Kidney Disease Education Program*, NKDEP) su dale preporuke za nivoe vitamina D koje bi trebalo održavati kod KSBB pacijenata u odnosu na nivoe iPTH. Smatra se da su niski nivoi 25D udruženi sa smanjenim metabolizmom kostiju, a tačno definisana „cut-off“ vrednost još nije utvrđena kod predijaliznih, HD i CAPD pacijenata. U radu su predijalizni, HD i CAPD pacijenti podeljeni u dve grupe I i II u zavisnosti od vrednosti 25D: < 50 nmol/L i > 50 nmol/L, redom. Koncentracije 25D < 50 nmol/L ukazuju na nedostatak vitamina D, a samim tim i povećanu verovatnoću od usporenog metabolizma kostiju.

U *Tabelama XLIV–LIII* je prikazana raspodela BALP, TRAP, beta-CTx i preporučenih biomarkera za procenu metabolizma kostiju u odnosu na nedovoljne i dovoljne nivoe 25D za KSBB pacijente. Primenom Kolmogorov-Smirnov testa utvrđeno je da su vrednosti ispitivanih biomarkera u I i II grupi predijaliznih, HD i CAPD pacijenata pokazivale normalnu raspodelu, izuzev vrednosti iPTH kod CAPD pacijenata koji su imali nivoe 25D > 50 nmol/L i vrednosti 25D kod HD pacijenata koje su < 50 nmol/L. Primenom Kruskal-Wallisovog testa nije utvrđena statistički značajna razlika između vrednosti ispitivanih biomarkera u analiziranim subgrupama (*Slike 38–47*).

Tabela XLIV Raspodela vrednosti BALP u odnosu na nivoe 25D (I < 50 nmoL/L; II > 50 nmol/L)

Nivo 25D		N	BALP (IU/L)					p*
			\bar{x}	Sd	Me	Min	Max	
PreD	I	34	33	16,2	31	11	63	0,428
	II	6	34	13,3	28	20	58	0,848
HD	I	80	23	19,1	19	4	145	0,054
	II	32	25	23,1	23	3	142	0,062
CAPD	I	63	19	9,2	18	4	43	0,698
	II	51	26	12,4	23	8	50	0,583

*p > 0,05 – normalna raspodela (Kolmogorov-Smirnov test)

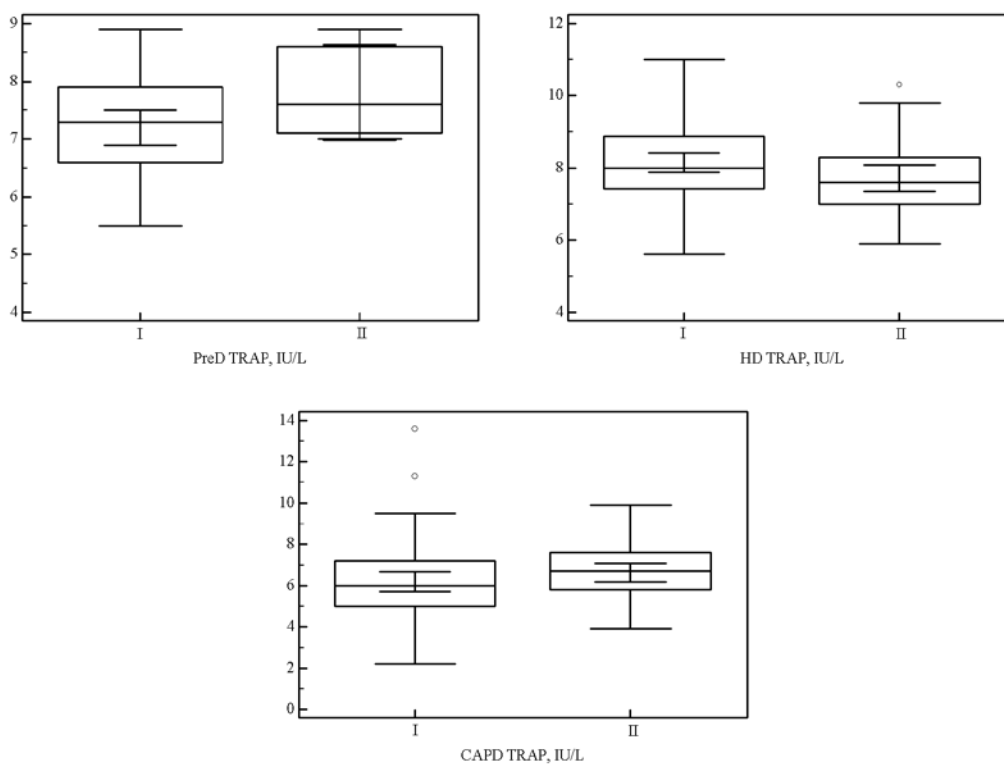


Slika 38. Koncentracije BALP u odnosu na nivoe 25-hidroksi vitamina D (I < 50 nmol/L; II > 50 nmol/L) kod predijalzičnih (PreD), HD i CAPD pacijenata. Podaci su predstavljeni kao *box-plots* grafici koji pokazuju 10, 50, 75 i 90 percentil.

Tabela XLV Raspodela vrednosti TRAP u odnosu na nivoe 25D (I < 50 nmol/L; II > 50 nmol/L)

Nivo 25D		N	TRAP (IU/L)					p*
			\bar{x}	Sd	Me	Min	Max	
PreD	I	34	7	1,4	7	5	9	0,941
	II	6	8	1,3	7	7	9	0,903
HD	I	80	8	1,7	8	5	11	0,721
	II	32	8	1,3	7	6	10	0,493
CAPD	I	63	6	2,5	6	2	14	0,434
	II	51	6	1,3	6	4	10	0,915

*p > 0,05 – normalna raspodela (Kolmogorov-Smirnov test)

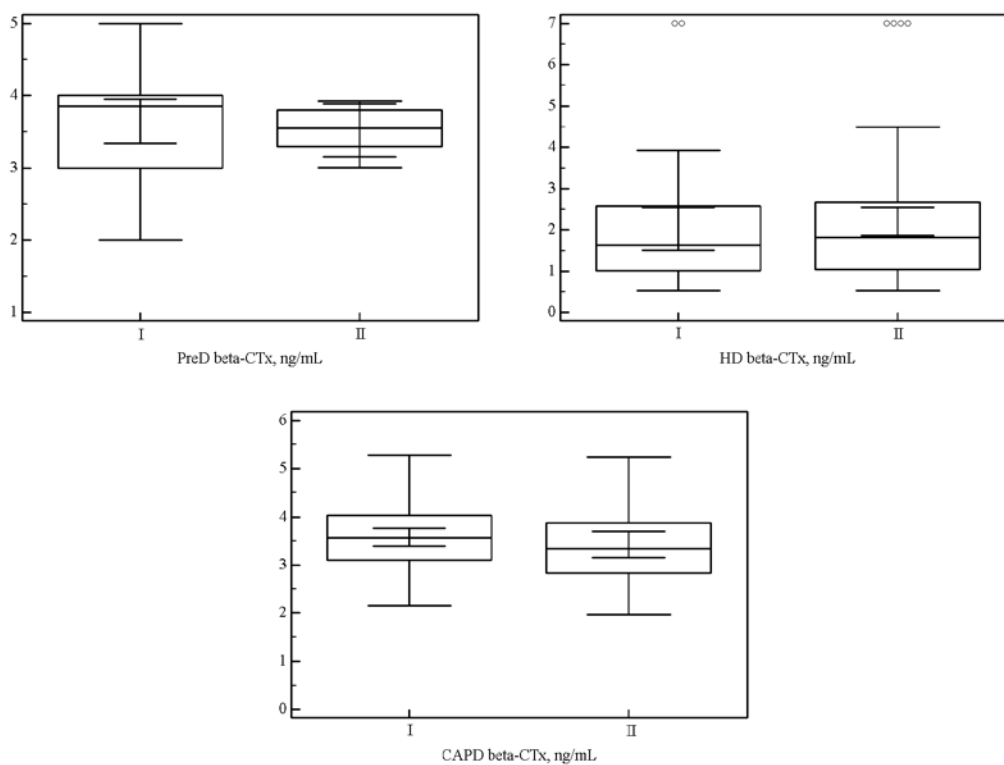


Slika 39. Koncentracije TRAP u odnosu na nivoe 25-hidroksi vitamina D (I < 50 nmol/L; II > 50 nmol/L) kod predijalzičnih (PreD), HD i CAPD pacijenata. Podaci su predstavljeni kao *box-plots* grafici koji pokazuju 10, 50, 75 i 90 percentil.

Tabela XLVI Raspodela vrednosti beta-CTx u odnosu niveoe 25D (I < 50 nmoL/L; II > 50 nmol/L)

Nivo 25D		N	beta-CTx (ng/mL)					p*
			\bar{x}	Sd	Me	Min	Max	
PreD	I	34	3,65	0,864	3,86	2,00	5,00	0,191
	II	6	3,52	0,355	3,55	3,01	3,93	0,958
HD	I	80	2,21	1,532	1,63	0,54	7,00	0,067
	II	32	2,04	1,527	1,85	0,54	7,00	0,061
CAPD	I	63	3,57	0,733	3,56	2,16	5,28	0,245
	II	51	3,42	0,844	3,34	1,97	5,24	0,308

*p > 0,05 – normalna raspodela (Kolmogorov-Smirnov test)

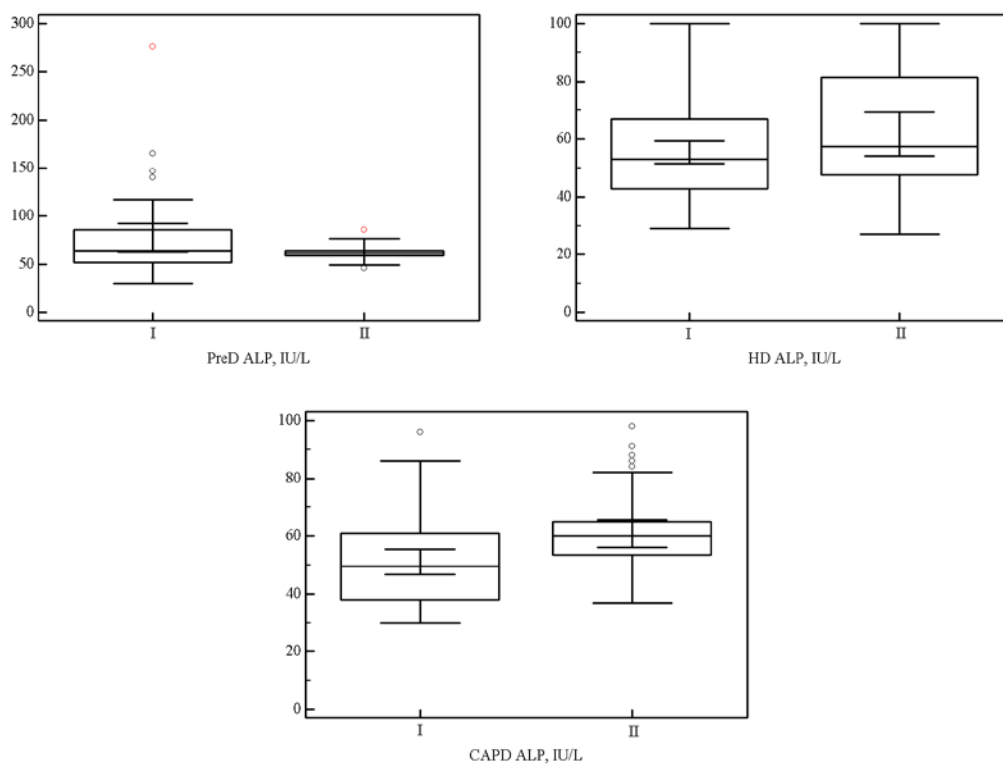


Slika 40. Koncentracije beta-karboksi terminalnog dela ukrštenih veza kolagena I (beta-CTx) u odnosu na niveoe 25-hidroksi vitamina D (I < 50 nmoL/L; II > 50 nmol/L) kod predijaliznih (PreD), HD i CAPD pacijenata. Podaci su predstavljeni kao *box-plots* grafici koji pokazuju 10, 50, 75 i 90 percentil.

Tabela XLVII Raspodela vrednosti ALP u odnosu nivoa 25D (I < 50 nmol/L; II > 50 nmol/L)

Nivo 25D		N	ALP (IU/L)					p*
			\bar{x}	Sd	Me	Min	Max	
PreD	I	34	77	45,4	64	30	276	0,052
	II	6	63	13,6	62	46	86	0,558
HD	I	80	56	16,1	53	29	100	0,506
	II	32	62	21,2	58	27	100	0,176
CAPD	I	63	51	17,7	50	30	96	0,581
	II	51	61	15,1	60	37	98	0,250

*p > 0,05 – normalna raspodela (Kolmogorov-Smirnov test)

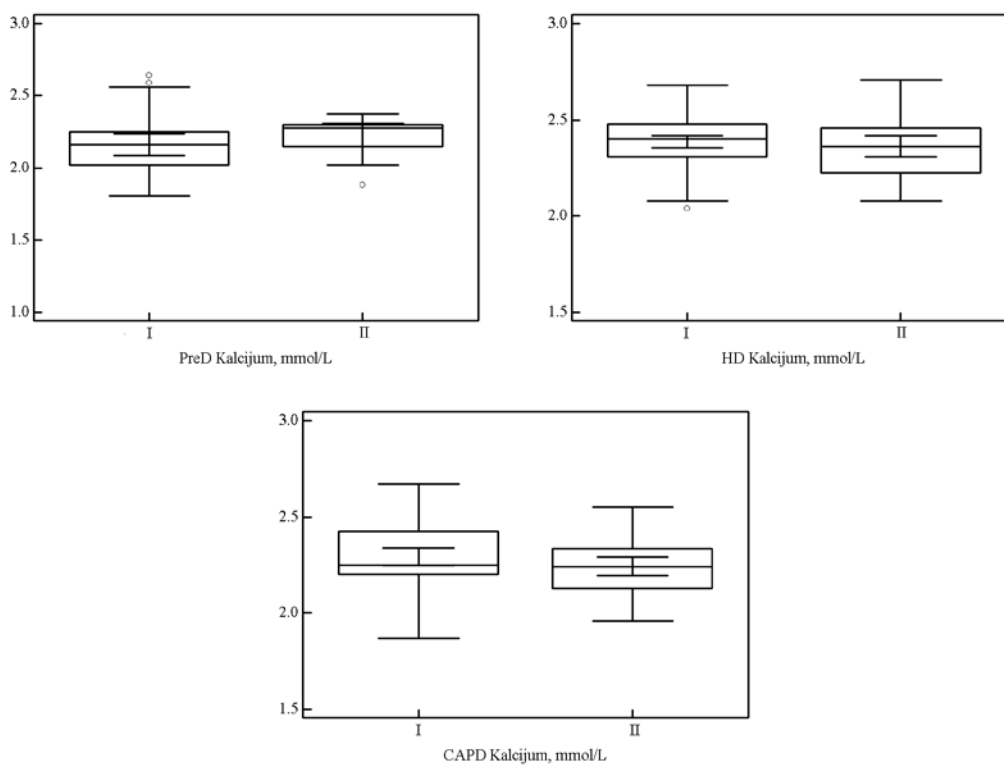


Slika 41. Koncentracije ALP u odnosu na nivoa 25-hidroksi vitamina D (I < 50 nmol/L; II > 50 nmol/L) kod predijalzičnih (PreD), HD i CAPD pacijenata. Podaci su predstavljeni kao *box-plots* grafici koji pokazuju 10, 50, 75 i 90 percentil.

Tabela XLVIII Raspodela vrednosti kalcijuma u odnosu na nivoe 25D (I < 50 nmol/L; II > 50 nmol/L)

Nivo 25D		N	Kalcijum (mmol/L)					
			\bar{x}	Sd	Me	Min	Max	p*
PreD	I	34	2,16	0,224	2,16	1,81	2,64	0,341
	II	6	2,20	0,172	2,28	1,88	2,31	0,622
HD	I	80	2,39	0,147	2,40	2,04	2,68	0,654
	II	32	2,36	0,166	2,36	2,08	2,71	0,833
CAPD	I	63	2,29	0,182	2,25	1,87	2,67	0,164
	II	51	2,24	0,161	2,24	1,96	2,55	0,844

*p > 0,05 – normalna raspodela (Kolmogorov-Smirnov test)

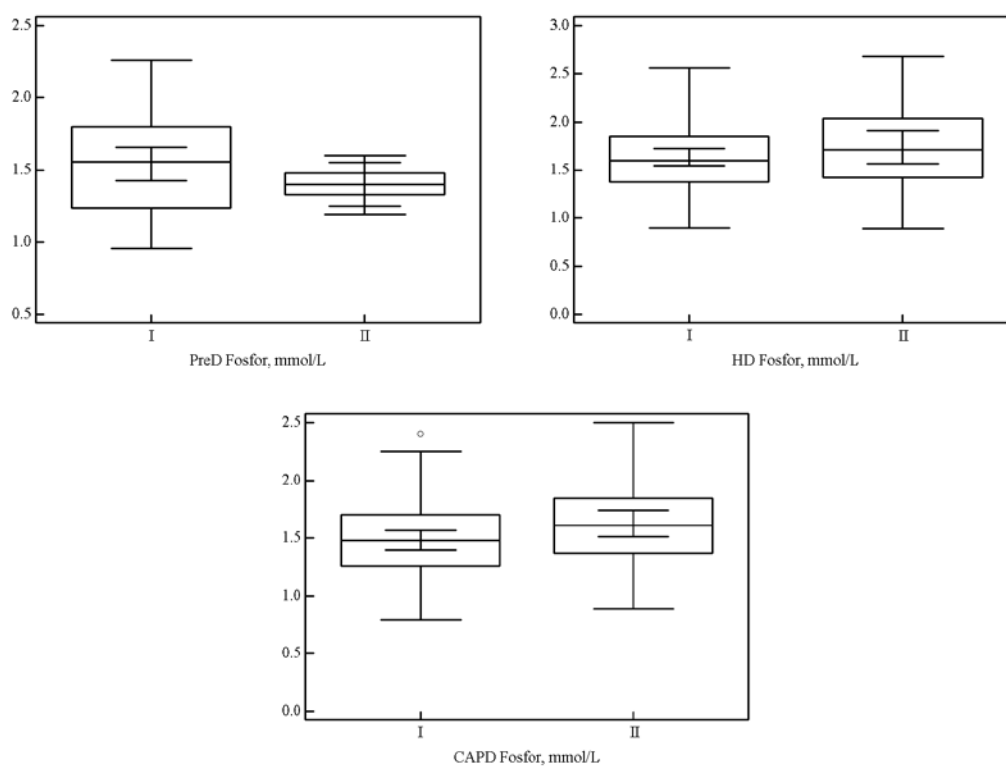


Slika 42. Koncentracije kalcijum u odnosu na nivoe 25-hidroksi vitamina D (I < 50 nmol/L; II > 50 nmol/L) kod predijaliznih (PreD), HD i CAPD pacijenata. Podaci su predstavljeni kao *box-plots* grafici koji pokazuju 10, 50, 75 i 90 percentil.

Tabela XLIX Raspodela vrednosti neorganskog fosfata u odnosu na nivoe 25D (I < 50 nmol/L; II > 50 nmol/L)

Nivo 25D		N	Neorganski fosfat (mmol/L)					
			\bar{x}	Sd	Me	Min	Max	p*
PreD	I	34	1,54	0,343	1,56	0,96	2,26	0,553
	II	6	1,40	0,141	1,40	1,19	1,60	0,994
HD	I	80	1,63	0,371	1,60	0,90	2,56	0,977
	II	32	1,73	0,462	1,71	0,89	2,68	0,904
CAPD	I	63	1,48	0,346	1,48	0,79	2,40	0,793
	II	51	1,63	0,374	1,61	0,89	2,50	0,964

*p > 0,05 – normalna raspodela (Kolmogorov-Smirnov test)

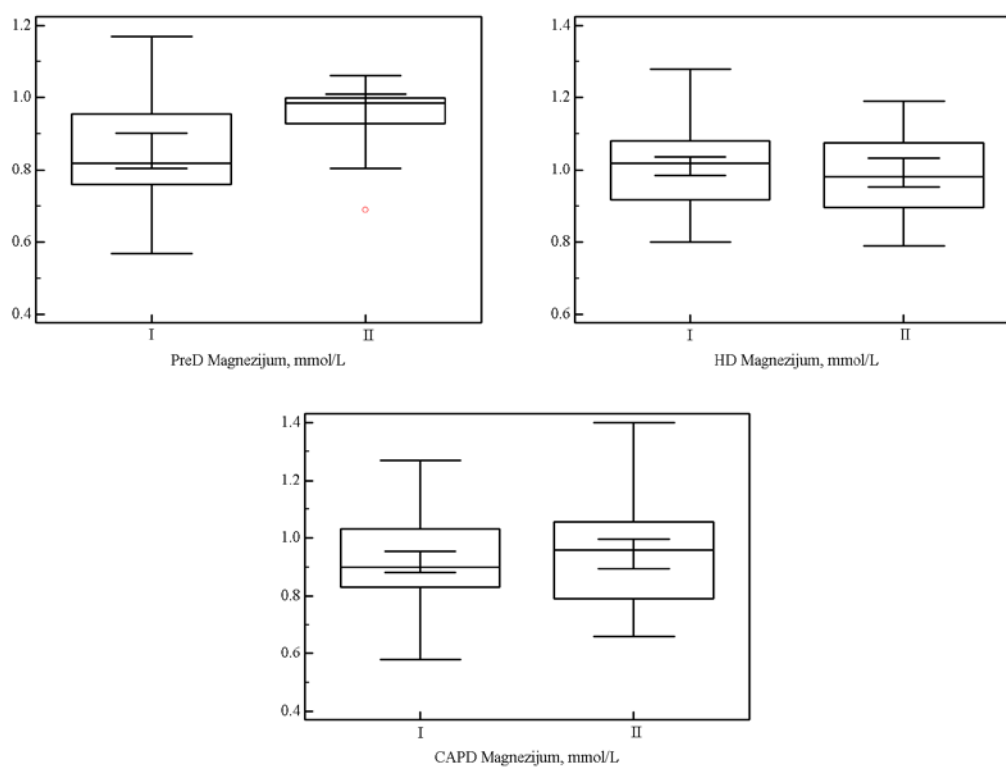


Slika 43. Koncentracije neorganskog fosfata u odnosu na nivoe 25-hidroksi vitamina D (I < 50 nmol/L; II > 50 nmol/L) kod predijaliznih (PreD), HD i CAPD pacijenata. Podaci su predstavljeni kao *box-plots* grafici koji pokazuju 10, 50, 75 i 90 percentil.

Tabela L Raspodela vrednosti magnezijuma u odnosu na niveoe 25D (I < 50 nmol/L; II > 50 nmol/L)

Nivo 25D		N	Magnezijum (mmol/L)					
			\bar{x}	Sd	Me	Min	Max	p*
PreD	I	34	0,85	0,143	0,82	0,57	1,17	0,379
	II	6	0,93	0,122	0,99	0,69	1,01	0,476
HD	I	80	1,01	0,122	1,02	0,80	1,28	0,822
	II	32	0,99	0,112	0,98	0,79	1,19	0,877
CAPD	I	63	0,92	0,155	0,90	0,58	1,27	0,930
	II	51	0,95	0,171	0,96	0,66	1,40	0,405

*p > 0,05 – normalna raspodela (Kolmogorov-Smirnov test)

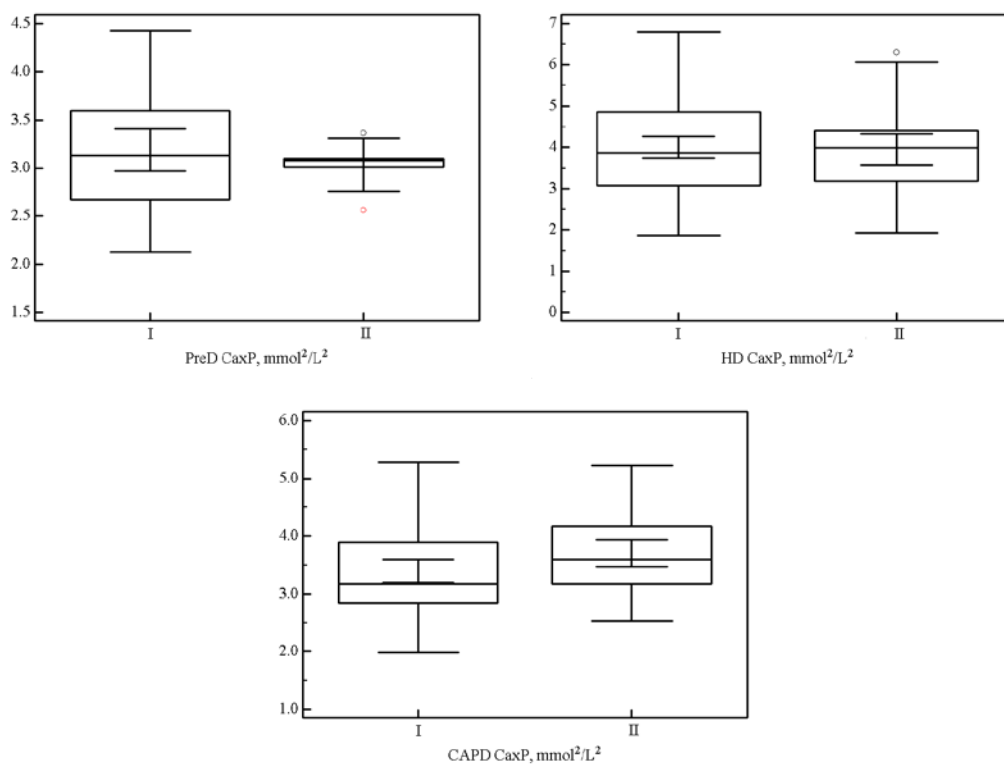


Slika 44. Koncentracije magnezijum u odnosu na niveoe 25-hidroksi vitamina D (I < 50 nmol/L; II > 50 nmol/L) kod predijaliznih (PreD), HD i CAPD pacijenata. Podaci su predstavljeni kao *box-plots* grafici koji pokazuju 10, 50, 75 i 90 percentil.

Tabela LI Raspodela vrednosti proizvoda kalcijuma i neorganskog fosfata (CaxP) u odnosu na nivoe 25D (I < 50 nmol/L; II > 50 nmol/L)

Nivo 25D		N	CaxP (mmol ² /L ²)					p*
			\bar{x}	Sd	Me	Min	Max	
PreD	I	34	3,2	0,64	3,13	2,13	4,43	0,974
	II	6	3,0	0,26	3,08	2,56	3,36	0,569
HD	I	80	4,0	1,12	3,87	1,87	6,80	0,717
	II	32	3,9	1,05	3,99	1,92	6,29	0,734
CAPD	I	63	3,4	0,79	3,17	1,98	5,28	0,158
	II	51	3,4	0,72	3,60	2,53	5,23	0,900

*p > 0,05 – normalna raspodela (Kolmogorov-Smirnov test)

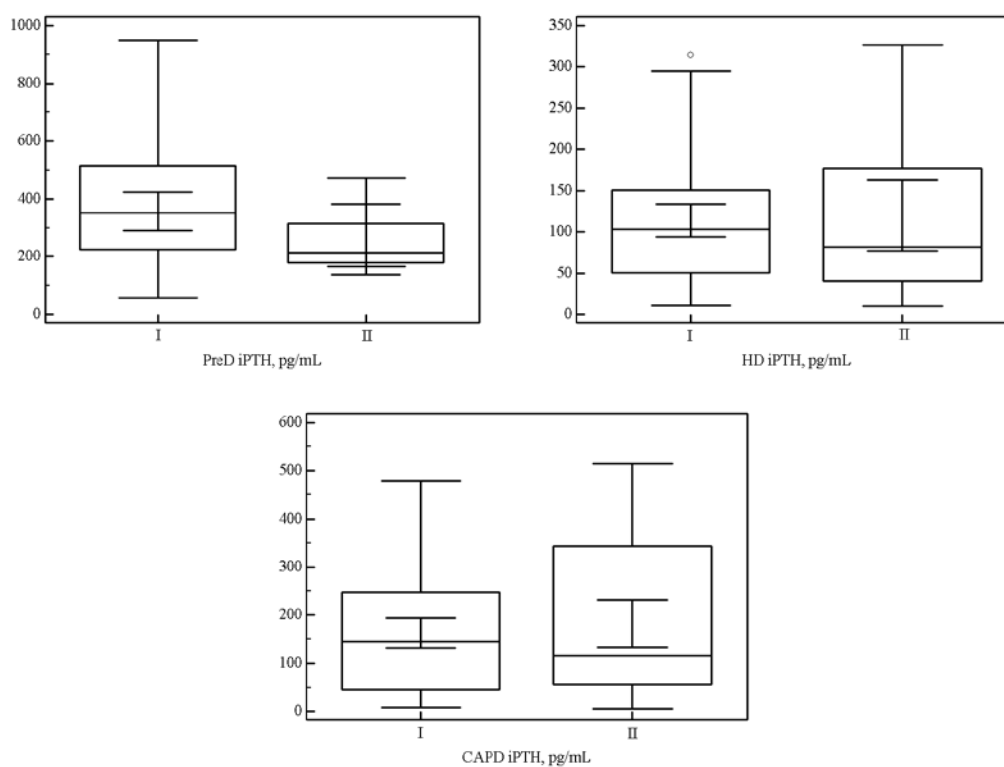


Slika 45. Koncentracije proizvoda kalcijuma i neorganskog fosfata (CaxP) u odnosu na nivoe 25-hidroksi vitamina D (I < 50 nmol/L; II > 50 nmol/L) kod predijaliznih (PreD), HD i CAPD pacijenata. Podaci su predstavljeni kao *box-plots* grafici koji pokazuju 10, 50, 75 i 90 percentil.

Tabela LII Raspodela vrednosti iPTH u odnosu na nivoe 25D (I < 50 nmol/L; II > 50 nmol/L)

Nivo 25D		N	iPTH (pg/mL)					p*
			\bar{x}	Sd	Me	Min	Max	
PreD	I	34	357,5	202,92	351,0	56,6	950,0	0,917
	II	6	259,3	116,51	213,0	166,0	472,0	0,494
HD	I	80	120,6	75,71	143,2	10,8	314,3	0,618
	II	32	113,1	98,05	122,5	10,1	326,6	0,329
CAPD	I	63	163,0	121,65	145,0	8,1	479,0	0,540
	II	51	183,0	159,93	109,0	5,2	515,1	0,031

*p > 0,05 – normalna raspodela (Kolmogorov-Smirnov test)

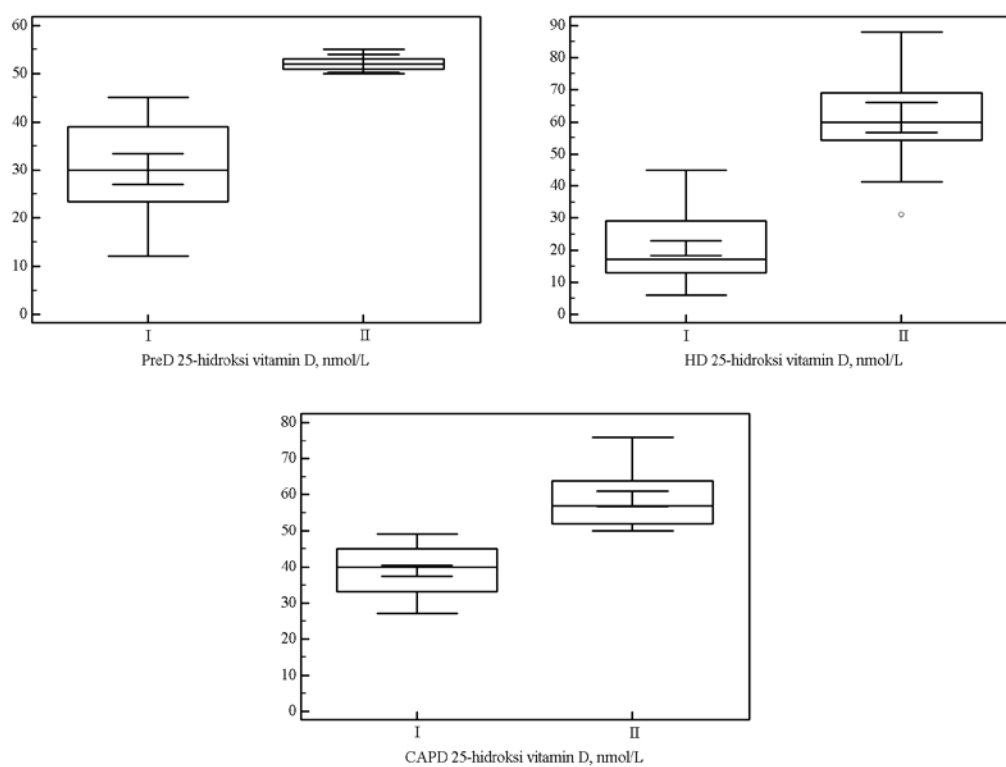


Slika 46. Koncentracije iPTH u odnosu na nivoe 25 hidroksi vitamina D (I < 50 nmol/L; II > 50 nmol/L) kod predijaliznih (PreD), HD i CAPD pacijenata. Podaci su predstavljeni kao *box-plots* grafici koji pokazuju 10, 50, 75 i 90 percentil.

Tabela LIII Raspodela vrednosti 25D u odnosu na nivoe 25D (I < 50 nmol/L; II > 50 nmol/L)

Nivo 25D		N	25D (nmol/L)					p*
			\bar{x}	Sd	Me	Min	Max	
PreD	I	34	30,2	9,62	30,0	12,0	45,0	0,941
	II	6	52,2	1,72	52,0	50,0	55,0	0,936
HD	I	80	20,6	10,41	17,5	6,0	45,0	0,038
	II	32	61,0	12,04	64,9	50,0	267,0	0,888
CAPD	I	63	39,0	6,74	40,1	27,0	49,0	0,206
	II	51	58,9	7,07	57,0	50,0	76,0	0,250

*p > 0,05 – normalna raspodela (Kolmogorov-Smirnov test)



Slika 47. Koncentracije 25D u odnosu na nivoe vitamina D kod predijaliznih (PreD), HD i CAPD pacijenata. Podaci su predstavljeni kao *box-plots* grafici koji pokazuju 10, 50, 75 i 90 percentil.

4.6. DIJAGNOSTIČKA VREDNOST BALP, TRAP, BETA-CTx I PREPORUČENIH BIOMARKERA ZA PROCENU ADINAMIČNE BOLESTI KOSTIJU

Dijagnostička vrednost koncentracija BALP, TRAP i beta-CTx, kao i preporučenih biomarkera ALP, kalcijuma, magnezijuma, fosfora i CaxP za procenu adinamične bolestikostiju kod KSBB pacijenata, procenjena je primenom analize ROC (*receiver operating characteristic*) krive. Podaci su prikazani kao površina ispod ROC krive (AUC), 95% interval pouzdanosti (95% CI) i standardna greška (SE).

Izračunati su ROC grafici posebno za predijalizne, hemodijalizirane pacijente i pacijente na kontinuiranoj ambulatornoj peritonealnoj dijalizi sa granicom odluke koje odgovaraju vrednostima iPTH ispod 100 pg/mL, odnosno koje odgovaraju granici između adinamičnog metabolizma kostiju i normalnog koštanog prometa. Podaci iz ROC analize su prikazani u *Tabeli LIV* i *Tabeli LV*. Izračunati intervali pouzdanosti za analizirane biomarkere koji ne uključuju vrednost 0,500 ukazuju da biomarker ima sposobnost da razlikuje dve grupe pacijenata. Poređenjem površina ispod ROC krivih za ispitivane biomarkere metabolizma kostiju sve tri grupe KSBB bolesnika zajedno, za BALP i kalcijum se dobija $p < 0,05$, što znači da postoji statistički značajna razlika u osetljivosti i specifičnosti ovih biomarkera u odnosu na druge ispitivane biomarkere za razlikovanje adinamične bolesti kostiju od normalnog metabolizma kostiju (*Slike 48–51*).

Vrednosti „cut-off“ koje su date u *Tabelama LIV* i *LV* su vrednosti koje su u statističkom programu označene kao optimalne, odnosno to su vrednosti koje odgovaraju najvećoj tačnosti – vrednosti sa minimalno lažno negativnih i minimalno lažno pozitivnih vrednosti. Kao što je poznato, osetljivost je verovatnoća da će rezultat testa biti pozitivan kada je bolest prisutna, a specifičnost je verovatnoća da će rezultat testa biti negativan kada bolest nije prisutna (293). U ovom slučaju, gde su pacijenti podeljeni prema granici između adinamične kosti i normalno metabolišuće kosti, osetljivost označava procenat pacijenata, koji imaju koncentraciju određenog biomarkera (npr. BALP) iznad „cut-off“ vrednosti, od ukupnog broja pacijenata koji imaju vrednosti iPTH manju od granične ($iPTH < 100$ pg/mL). Specifičnost označava

procenat pacijenata sa npr. BALP manjim od „cut-off“ vrednosti, od ukupnog broja pacijenata koji imaju vrednost iPTH veću od granične (iPTH > 100 pg/mL).

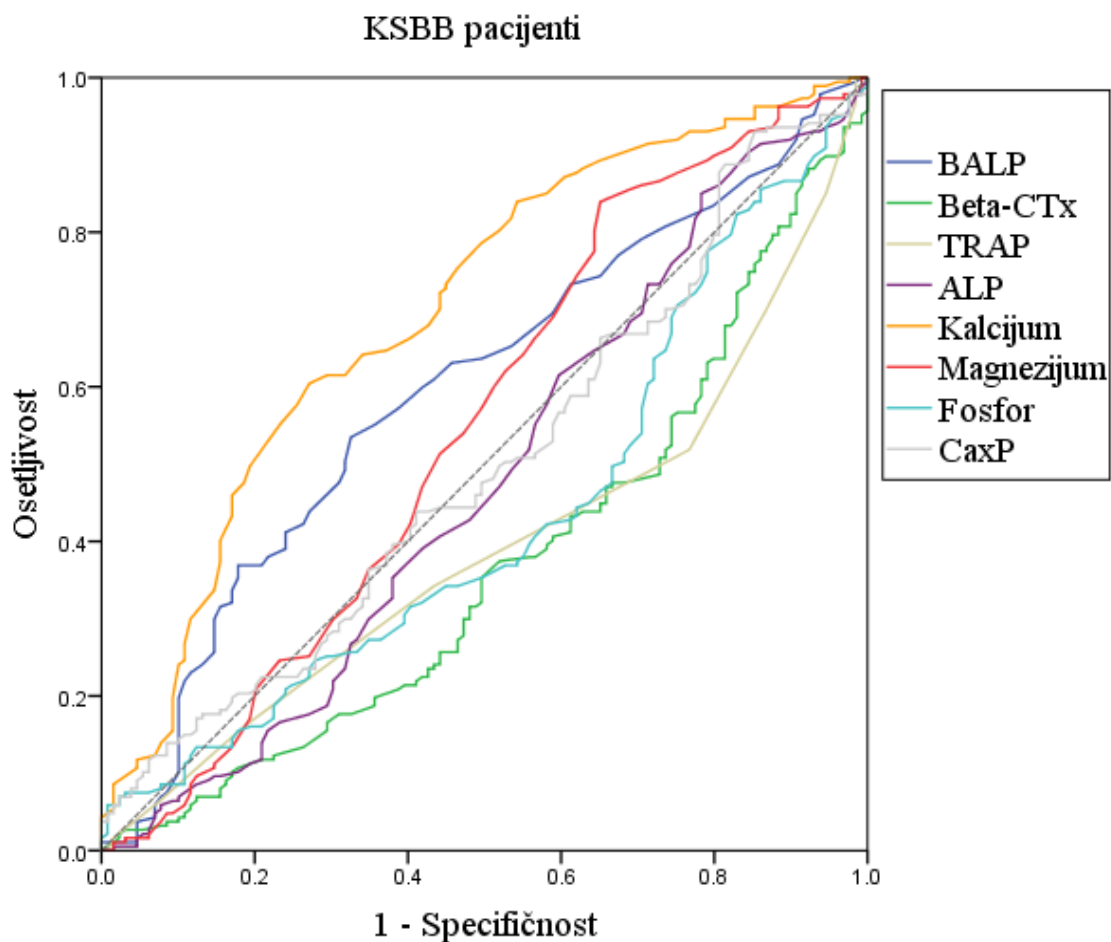
Tabela LIV Podaci iz ROC analize za BALP, kalcijum i magnezijum za pacijente sa krajnjim stadijumom bolesti bubrega („cut-off“ vrednosti predstavljaju optimalne koncentracije biomarkera za identifikovanje adinamične bolesti kostiju).

Biomarker iz ROC analize						
AUC	SE	p*	95% CI	Osetljivost	Specifičnost	<i>Cut-off</i>
BALP						
0,597	0,036	0,003	0,534–0,661	57,2%	58,1%	24 IU/L
Kalcijum						
0,701	0,030	0,0001	0,642–0,760	67,9%	73,8%	2,34 mmol/L
Magnezijum						
0,548	0,034	0,411	0,489–0,599	57,0%	51,4%	0,96 mmol/L

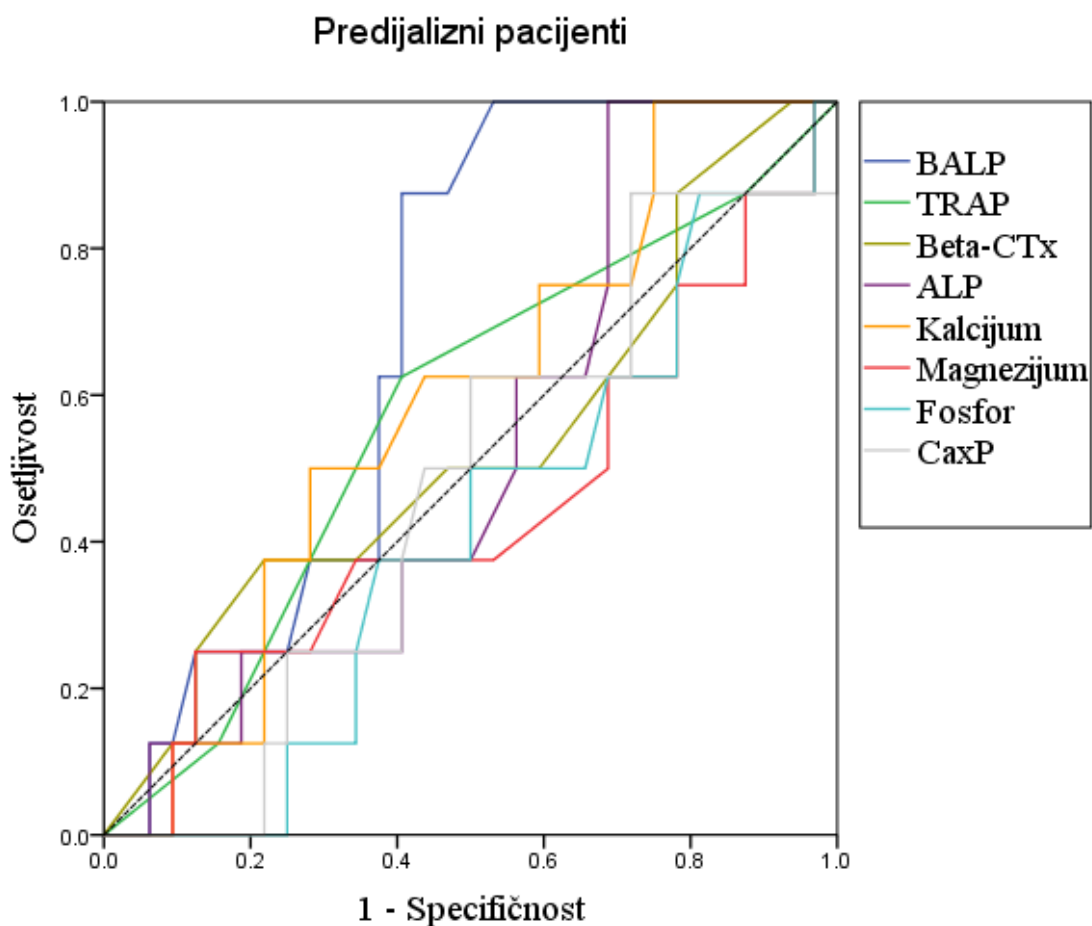
*p < 0,05 – postoji statistički značajna razlika

Tabela LV Podaci iz ROC analize za BALP, TRAP, beta-CTx, kalcijum, magnezijum, neorganski fosfat i CaxP posebno za predijalizne pacijenate (PreD), pacijenate na hemodijalizi (HD) i kontinuiranoj ambulatornoj peritonealnoj dijalizi (CAPD) („cut-off“ vrednosti predstavljaju optimalne koncentracije biomarkera za identifikovanje adinamične bolesti kostiju) (*p < 0,05 – postoji statistički značajna razlika)

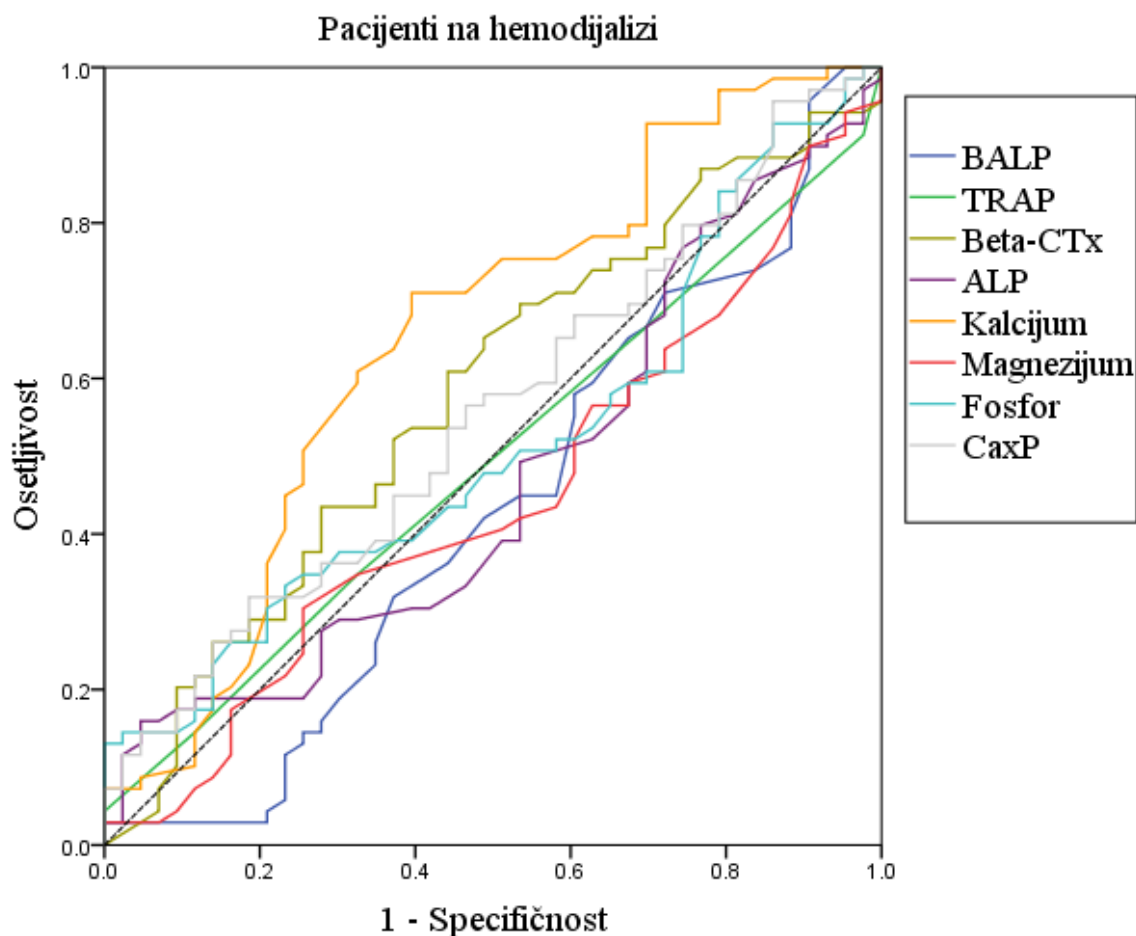
Biomarker iz ROC analize							
	AUC	SE	p*	95% CI	Osetljivost	Specifičnost	<i>Cut-off</i>
BALP							
PreD	0,688	0,049	0,058	0,522–0,853	84,4%	58,2%	27 IU/L
CAPD	0,588	0,048	0,053	0,483–0,693	64,1%	62,6%	25 IU/L
TRAP							
PreD	0,572	0,113	0,532	0,351–0,794	50,2%	49,8%	7 IU/L
Beta-CTx							
PreD	0,529	0,120	0,800	0,294–0,764	45,3%	49,2%	2,98 ng/mL
HD	0,579	0,056	0,163	0,470–0,688	57,8%	56,4%	3,01 ng/mL
ALP							
PreD	0,525	0,103	0,826	0,324–0,726	52,4%	53,7%	55 IU/L
Kalcijum							
PreD	0,588	0,103	0,447	0,385–0,791	68,1%	75,2%	2,32 mmol/L
HD	0,651	0,055	0,007	0,543–0,759	69,2%	73,4%	2,33 mmol/L
CAPD	0,538	0,054	0,490	0,431–0,644	62,3%	63,1%	2,31 mmol/L
Magnezijum							
CAPD	0,504	0,055	0,939	0,396–0,612	56,4%	51,2%	0,95 mmol/L
Neorganski fosfat							
HD	0,514	0,056	0,809	0,405–0,623	42,5%	57,9%	1,49 mmol/L
CaxP							
HD	0,555	0,055	0,329	0,447–0,663	48,7%	50,9%	3,5 mmol ² /L ²



Slika 48. ROC grafik za graničnu vrednost iPTH < 100 pg/mL za adinamičnu bolest kostiju za koštani izoenzim alkalne fosfataze (BALP), tartarat rezistentan izoenzim kisele fosfataze (TRAP), beta-karboksi terminalni deo ukrštenih veza kolagena I (beta-CTx), ALP, kalcijum, magnezijum, neorganski fosfat i proizvod kalcijuma i neorganskog fosfata (CaxP) kod pacijenata sa krajnjim stadijumom bolesti bubrega (KSBB: predijalizni pacijenti i pacijenti koji su na terapiji hemodijalizom i kontinuiranom ambulatornom peritonealnom dijalizom). Površine ispod ROC krivih (AUC) se nisu statistički značajno razlikovale za sve parametre ($p > 0,05$), osim što je AUC za kalcijum bila značajno viša od AUC za ostale analize ($p = 0,0001$).

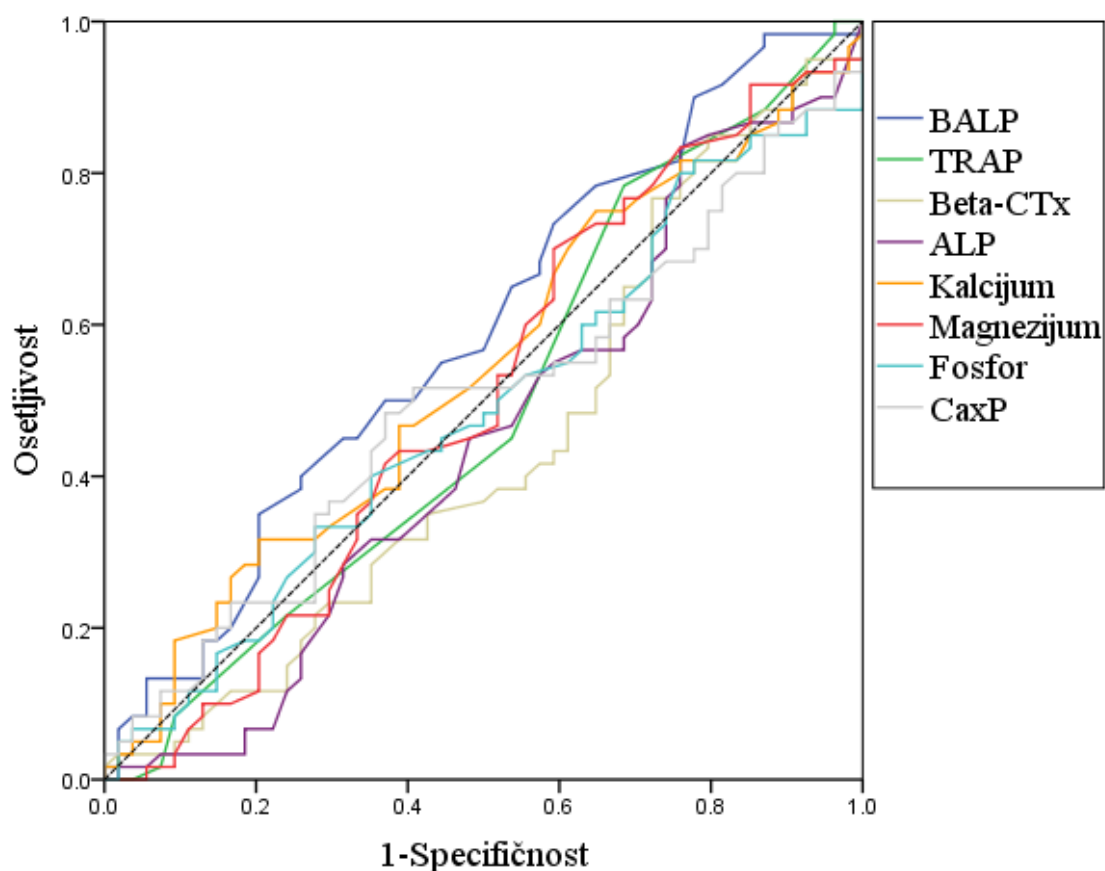


Slika 49. ROC grafik za graničnu vrednost iPTH < 100 pg/mL za adinamičnu bolest kostiju za koštani izoenzim alkalne fosfataze (BALP), tartarat rezistentan izoenzim kisele fosfataze (TRAP), beta-karboksi terminalni deo ukrštenih veza kolagena I (beta-CTx), ALP, kalcijum, magnezijum, neorganski fosfat i proizvod kalcijuma i neorganskog fosfata (CaxP) kod predijaliznih pacijenata. Površine ispod ROC krivih (AUC) se nisu statistički značajno razlikovale za sve parametre ($p > 0,05$), osim što je AUC za BALP bila značajno viša od AUC za ostale analize ($p = 0,0001$).



Slika 50. ROC grafik za graničnu vrednost iPTH < 100 pg/mL za adinamičnu bolest kostiju za koštani izoenzim alkalne fosfataze (BALP), tartarat rezistentan izoenzim kisele fosfataze (TRAP), beta-karboksi terminalni deo ukrštenih veza kolagena I (beta-CTx), ALP, kalcijum, magnezijum, neorganski fosfat i proizvod kalcijuma i neorganskog fosfata (CaxP) kod pacijenata na hemodijalizi. Površine ispod ROC krivih (AUC) se nisu statistički značajno razlikovale za sve parametre ($p > 0,05$), osim što je AUC za kalcijum bila značajno niža od AUC za ostale analize ($p = 0,0001$).

Pacijenti na kontinuiranoj ambulatornoj peritonealnoj dijalizi



Slika 51. ROC grafik za graničnu vrednost iPTH < 100 pg/mL za adinamičnu bolest kostiju za koštani izoenzim alkalne fosfataze (BALP), tartarat rezistentan izoenzim kisele fosfataze (TRAP), beta-karboksi terminalni deo ukrštenih veza kolagena I (beta-CTx), ALP, kalcijum, magnezijum, neorganski fosfat i proizvod kalcijuma i neorganskog fosfata (CaxP) kod pacijenata na kontinuiranoj ambulatornoj peritonealnoj dijalizi. Površine ispod ROC krivih (AUC) se nisu statistički značajno razlikovale za sve parametre ($p > 0,05$), osim što je AUC za BALP bila značajno viša od AUC za ostale analize ($p = 0,0001$).

5. DISKUSIJA

Pravovremeno otkrivanje ubrzanog ili usporenog metabolizma kostiju kod KSBB pacijenata (predijaliznih i pacijenata na dijalizi), kao i adekvatna primena terapije može da smanji progresiju bolesti kostiju, ali i eventualne komplikacije. Mada do poremećaja metabolizma kostiju može doći i u ranim fazama hronične bolesti bubrega, subjektivni simptomi mogu biti potpuno odsutni. S obzirom da su klinički simptomi najčešće neprimetni, „screening“ za ubrzan ili usporen metabolizam kostiju zasniva se na laboratorijskim nalazima. Kod KSBB pacijenata nivo metabolizma kostiju neophodno je pratiti određivanjem ALP, kalcijuma, neorganskog fosfata, magnezijuma, iPTH i 25D (99, 221, 222, 235, 241, 242). Iako su ovo preporučeni biomarkeri, njihove koncentracije su indirektni pokazatelji metabolizma kostiju.

Specifični proizvodi ćelija kostiju, osteoblasta i osteoklasta, koštani izoenzim alkalne fosfataze, tartarat rezistentna kisela fosfataza i beta-karboksiterminalni delovi ukrštenih veza kolagena direktno ukazuju na procese formiranja i resorpcije kostiju. Međutim, objavljena su neka istraživanja koja nisu potvrdila superiornost specifičnih biomarkera kostiju u odnosu na preporučene (97, 246, 264, 294). Naime, potrebno je da budući radovi proučavaju dugotrajne promene biomarkera metabolizma kostiju i time potvrde klinički značaj ili pak prednost u odnosu na invazivnu metodu biopsije kostiju. Takođe, neophodno je standardizovati metode koje se koriste za njihovo određivanje. Koštani izoenzim alkalne fosfataze i tartarat rezistentna kisela fosfataza mogu da se određuju ELISA tehnikom ali i spektrofotometrijski, dok se BALP može kvantifikovati i elektroforetskom tehnikom. U odnosu na njih osnovna prednost određivanja preporučenih biomarkera kostiju u serumu je dostupnost standardizovanih metoda.

Koštani izoenzim alkalne fosfataze je glikoprotein nađen do sada samo u osteoblastima i specifičan je biomarker formiranja kostiju. Glavna uloga BALP je kalcifikacija ekstraćelijskog matriksa kostiju formiranjem hidroksiapatita. Povećane vrednosti se mogu naći kod povećanog rasta tkiva kostiju (rast koštanog tkiva u adolescentnom periodu, kanceri kostiju ili metastaze na kostima, hiperparatiroidizam), dok se niske vrednosti ovog biomarkera nalaze kod usporenog metabolizma kostiju (adinamične

bolesti kostiju). Značajno smanjene vrednosti BALP su pronađene kod pacijenata na dijalizi kod kojih je došlo do razvoja adinamične bolesti kostiju (34, 35, 36–39).

Tartarat rezistentna kisela fosfataza je glikozilirani monomerni metaloenzim nađen na površini osteoklasta i direktan je pokazatelj ubrzanog metabolizma osteoklasta, tj. povećano se oslobađa sa površine osteoklasta u slučaju ubrzane resorpcije kostiju. Kod KSBB pacijenata povećane koncentracije ukazuju najčešće na povećanu resorpciju kostiju usled sekundarni hiperparatiroidizam (78). Međutim, smanjene koncentracije mogu da budu posledica adinamične bolesti kostiju (294).

Beta-CTx je protein koji je sastavni deo kolagena kostiju, a formira se kao posledica sazrevanja kostiju. Nakon aktivacije osteoklasta i resorbovanja tkiva kostiju, tokom procesa remodelovanja kostiju, beta-CTx se oslobađa u cirkulaciju. Povećane vrednosti ovog biomarkera ukazuju na ubranu resorpciju kostiju, a za sada potvrđen klinički značaj ovog biomarkera je u praćenju antiresorptivne terapije (87). Jedan broj literaturnih podataka ukazuje na značaj beta-CTx u proceni nivoa metabolizma kostiju kod KSBB pacijenata, ali još uvek nema podataka o graničnim nivoima ovog biomarkera kod ubrzanog ili usporenog metabolizma kostiju (86).

Pošto su trenutne preporuke da se nivo metabolizma kostiju kod predijaliznih pacijenata i pacijenata na dijalizi procenjuje na osnovu nespecifičnih biomarkera za tkivo kostiju (ALP, jona kalcijuma, magnezijuma, neorganskog fosfata, iPTH i 25D), planirano je da se specifični biomarkeri osteoklasta, osteoblasta i kolagena kostiju, BALP, TRAP i beta-CTx uporede sa preporučenim biomarkerima kod KSBB pacijenata i u odnosu na kontrolnu grupu. U tom smislu, ispitana je korelacija koncentracija BALP, TRAP i beta-CTx sa vrednostima preporučenih biomarkera (ALP, joni kalcijuma, magnezijuma, neorganskog fosfata, iPTH i 25D).

Preporuke su da se u odnosu na tri različita nivoa iPTH može proceniti ubran, normalan ili usporen metabolizam kostiju, pa je planirano da se ispita u kojoj su meri izmenjene vrednosti specifičnih biomarkera u odnosu na preporučene, u sva tri nivoa vrednosti iPTH (< 150 pg/mL, 150–300 pg/mL, > 300 pg/mL), odnosno koji biomarker

najbolje prati niske, srednje i visoke nivoe iPTH, tj. pomoću koga biomarkera je moguće proceniti nizak, normalan ili ubrzan metabolizam kostiju. Takođe, kod KSBB pacijenata adekvatno dozirana terapija vitaminom D, može u velikoj meri sprečiti pogoršanje metabolizma kostiju upravo na osnovu vrednosti specifičnih biomarkera kostiju uz paralelno merenje nivoa 25D. U odnosu na ovu činjenicu, ispitiivaće se u kojoj meri su izmenjeni analizirani biomarkeri kod nedovoljnih i dovoljnih nivoa 25D, tj. koji biomarker najbolje korelira sa nivoima 25D. Kao posledica dugotrajne bolesti bubrega i neadekvatnog regulisanja nivoa kalcijuma i fosfora, kod KSBB pacijenata može da se razvije kalcifikacija mekih tkiva, najčešće vaskularna kalcifikacija. Preporuke su da proizvod CaxP bude kontrolisan kako bi se izbegla ektopična kalcifikacija. Zato je bilo potrebno da se ispita kako nivo CaxP prati biomarkere metabolizma kostiju u sva tri nivoa iPTH, kao i nedovoljne i dovoljne nivoe 25D.

Takođe, da bi se potvrdio značaj pojedinačnih biomarkera resorpcije i stvaranja kostiju kod KSBB pacijenata u detekciji smanjenog metabolizma kostiju, potrebno je bilo da se ispituju dijagnostičke vrednosti BALP, TRAP, beta-CTx, kao i preporučenih biomarkera za metabolizam kostiju kod KSBB pacijenata, u odnosu na preporučen granični nivo iPTH (< 100 pg/mL) za adinamičnu bolest kostiju.

5.1. ANALITIČKE KARAKTERISTIKE METODA ZA ODREĐIVANJE ISPITIVANIH BIOMARKERA

Za biomarkere koji su određivani u ovom ispitivanju korišćeni su komercijalni testovi. Koncentracije ALP, TRAP, jona kalcijuma, neorganskog fosfata i magnezijuma određeni su fotometrijski. Mada se u literaturi navodi da TRAP5b ima zadovoljavajuće dijagnostičke karakteristike za procenu metabolizma kostiju kod KSBB pacijenata, metode za određivanje ovog biomarkera nisu automatizovane i najčešće se ne određuje u rutinskoj praksi (58–61). Iz ovog razloga su u doktorskoj disertaciji ispitane vrednosti TRAP, koje se jednostavno mogu preračunati iz izmerenih aktivnosti ukupne ACP i prostatične kisele fosfataze. Takođe, vrednosti BALP su određivane metodom zonske agar-gel elektroforeze. Mada se u literaturi navode imunohemijske metode za određivanje koncentracija BALP, ove metode nisu apsolutno specifične za koštani

izoenzim alkalne fosfataze (36, 43). Pored toga, KDOQI vodiči zasnivaju svoje preporuke za određivanje BALP u proceni i praćenju metabolizma kostiju na radovima koji su koristili metodu zonske elektroforeze (99). Takođe, koncentracije beta-CTx i iPTH su određivane ECLIA metodom. Mada su prvobitno koncentracije iPTH kod predijaliznih i pacijenata na dijalizi određivane IRMA metodom (IRA, CIS Bio International, Saclay, France), zbog određivanja iPTH u serumima kontrolne grupe, metodom ECLIA, naknadno su određivane koncentracije iPTH metodom ECLIA i za predijalizne i pacijente na dijalizi. Vrednosti iPTH određene IRMA i ECLIA metodom su pokazivale dobru međusobnu korelaciju, tako da su u ovom doktorskom radu, statistički obrađene vrednosti iPTH koje su određene ECLIA metodom za sve analizirane grupe. Korelacija vrednosti iPTH za predijalizne, HD i CAPD pacijente određene sa dve navedene metode prikazana je u *Tabeli I*. Mada se u literaturi navodi da određivanje PTH različitim metodama može imati uticaj na dijagnozu renalne osteodistrofije, u ovom radu su dobijeni visoki koeficijenti korelacije u sve tri grupe KSBB pacijenata ($p < 0,001$) (*Tabela I*) (178). Koncentracije 25D su određivane HPLC metodom koja se smatra referentnom metodom (224). Pouzdanost korišćenih testova za sve parametre ispitana je određivanjem nepreciznosti u seriji i nepreciznosti iz dana u dan. Vrednosti koeficijenta varijacije prikazanih u *Tabelama II-X* ukazuju da se ispitivani biomarkeri mogu smatrati pouzdanim za ostvarivanje ciljeva ovog ispitivanja, s obzirom da su dobijene vrednosti Kv bile niže od 5%. Određivanje analiziranih biomarkera u serumu se smatralo pouzdanim na osnovu koeficijenta varijacije dobijenih testiranjem preciznosti u seriji (Kv: 0,6%–3,3%) i iz dana u dan (Kv: 1,0%–3,6%) posebno za svaki analizirani biomarker (*Tabela II-X*).

5.2. VREDNOSTI ISPITIVANIH BIOMARKERA U KONTROLNOJ GRUPI

Radi dobijanja referentnih vrednosti parametara određivanih u ovom ispitivanju, određene su vrednosti BALP, TRAP, beta-CTx, ALP, kalcijuma, neorganskog fosfata, magnezijuma, CaxP, iPTH i 25D u serumima zdravih osoba, dobrovoljaca (kontrolna grupa). Kontrolnu grupu je činilo 50 zdravih osoba, 23 muškarca (46%) i 27 žena (54%), starosne dobi od 25 do 70 godina, koji su odabrani direktnom metodom. Pri uključivanju osoba u kontrolnu grupu primenjeni su neophodni kriterijumi kao što su

odsustvo bolesti, neunošenje farmakološki aktivnih supstanci i normalno fiziološko stanje. Dobijeni podaci za kontrolnu grupu prikazani su u *Tabeli XI*. Primenom Kolmogorov-Smirnov testa potvrđeno je da vrednosti određivanih biomarkera (ALP, BALP, TRAP, beta-CTx, kalcijuma, neorganskog fosfata, magnezijuma, CaxP, iPTH i 25D) u serumu prate Gauss-ovu raspodelu kod ispitanika zdrave populacije, što je prikazano grafički pomoću histograma frekvencija vrednosti biomarkera kontrolne grupe (*Slika 1 i 2*).

5.2.1. Raspodela vrednosti ispitivanih biomarkera u kontrolnoj grupi u odnosu na pol

U ovom radu kod ispitivane zdrave populacije dobijene su statistički značajno različite vrednosti BALP, beta-CTx i magnezijuma između žena i muškaraca ($p < 0,05$) (*Tabela XII*). Ovo je u slaganju sa literaturnim podacima, mada su za beta-CTx i magnezijum još uvek u upotrebi jedinstvene referentne vrednosti (118, 148). Takođe, podaci dobijeni u ovom radu za 2,5 i 97,5 percentil za vrednosti BALP, TRAP i CaxP se ne slažu sa preporukama proizvođača, jer se za ova tri biomarkera u kliničkoj praksi koriste preporučene „cut off“ vrednosti za BALP (≤ 44 IU/L za žene i ≤ 73 IU/L za muškarce), za TRAP ($< 6,5$ IU/L) i za CaxP ($4,6 \text{ mmol}^2/\text{L}^2$), a ne referentni interval (47, 78).

5.2.2. Raspodela vrednosti ispitivanih biomarkera u kontrolnoj grupi u odnosu na godine života

U ovom radu kod ispitivane zdrave populacije nije dobijena statistički značajna razlika u vrednostima ispitivanih biomarkera u odnosu na godine života, izuzev za vrednosti BALP, koje su bile nešto niže kod osoba koje su imale preko 60 godina života, mada je dobijena granična značajnost ($p = 0,052$) (*Tabela XIII*). Vrednost od 60 godina navedena je kao granična, s obzirom da se smatra da zdrave osobe preko 60 godina starosti, koje imaju niske nivoe 25D i/ili visoke nivoe iPTH, imaju smanjenu mineralnu gustinu kostiju i povećan stepen od preloma kostiju (223). Međutim, ovo su očekivano izmenjene vrednosti 25D i iPTH, koje dovode do promenjenih nivoa jona kalcijuma, neorganskog fosfata i magnezijuma, kod predijaliznih pacijenata i pacijenata koji su na

terapiji dijalizom. Iako se u literaturi navode različite vrednosti ispitivanih biomarkera u odnosu na godine starosti, preporuke proizvođača su jedinstveni referentni intervali za TRAP, beta-CTx, jone kalcijuma, neorganskog fosfata, magnezijuma, iPTH i 25D.

5.2.3. Referentni intervali ispitivanih biomarkera u kontrolnoj grupi

Za analizirane vrednosti ispitivanih biomarkera u kontrolnoj grupi izračunati su referentni intervali neparametarskom metodom, kao unutarpercentilni intervali. Uobičajeno je da se referentni interval definiše kao centralni 95% interval ograničen sa 2,5 i 97,5 percentilom. Iako su preporuke da se za određivanje referentnih intervala analizira optimalan broj podataka od 120 uzoraka po parametru, alternativno se može koristiti najmanje 20 uzoraka od adekvatno odabranih referentnih individua (291, 292). Različite vrednosti 2,5 i 97,5 percentila su izračunate za pol tamo gde je postojala statistički značajna razlika. Podaci dobijeni za 2,5 i 97,5 percentil za vrednosti BALP, TRAP i CaxP se ne slažu sa literaturnim podacima, jer se za ova tri biomarkera koriste preporučene „cut off“ vrednosti za BALP (≤ 44 IU/L za žene i ≤ 73 IU/L za muškarce), za TRAP ($< 6,5$ IU/L) i za CaxP ($4,6 \text{ mmol}^2/\text{L}^2$), u odnosu na preporuke proizvođača (47, 78).

5.3. RASPODELA VREDNOSTI BALP, TRAP, BETA-CTx I PREPORUČENIH BIOMARKERA METABOLIZMA KOSTIJU KOD PACIJENATA SA KRAJNJIM STADIJUMOM BOLESTI BUBREGA

Adekvatna procena nivoa metabolizma kostiju je ključno dijagnostičko sredstvo za globalni menadžment poremećaja metabolizma minerala i kostiju kod pacijenata sa hroničnom bolesti bubrega. Mada se za procenu metabolizma kostiju kao zlatni standard koristi biopsija kostiju, ovo je invazivna metoda i u kliničkoj praksi se ne može ponavljati, jer su za histomorfometriju kostiju neophodne specijalizovane laboratorije. Biomarkeri metabolizma kostiju predstavljaju "biohemijsku biopsiju", pomoću kojih je znatno lakše proceniti koštano oboljenje, primeniti odgovarajuću terapiju, pratiti nivo

koštanog prometa i sprovoditi prevenciju progresije bolesti i eventualnih komplikacija (37, 78, 241, 295–297).

5.3.1. Vrednosti ispitivanih biomarkera kod pacijenata sa krajnjim stadijumom bolesti bubrega u odnosu na pol

Ispitivanjem vrednosti biomarkera u odnosu na pol predijaliznih pacijenata dobijene su jedino statistički značajno više koncentracije iPTH kod žena, u odnosu na mušku populaciju ($p < 0,05$), dok se vrednosti ostalih analiziranih biomarkera nisu razlikovale u odnosu na pol pacijenta (*Tabela XIV*). Mada se u literaturi navodi uticaj hormonskog statusa žene na vrednosti iPTH, preporučeni referentni opseg iPTH se ne razlikuje u odnosu na pol pacijenta (298, 299). Iako se analizirane vrednosti BALP ne razlikuju u odnosu na pol, u preporuci proizvođača testa za ovaj biomarker se navode različite referentne vrednosti za žene i muškarce, dok literaturni podaci ne ukazuju na uticaj pola na ovaj biomarker formiranja kostiju kod predijaliznih pacijenata (282, 299). Takođe, u literaturi se ne navodi razlika u vrednostima TRAP u odnosu na pol, sa čim se slažu i naši podaci (58, 282, 295). Vrednosti beta-CTx kod analiziranih predijaliznih pacijenata se ne razlikuju u odnosu na pol pacijenata, mada literaturni podaci ukazuju na uticaj pola kod zdrave populacije, na vrednost ovog biomarkera razgradnje kolagena, kao i na uticaj hormonskog statusa kod žena i različite vrednosti kod žena pre i posle menopauze (300).

U ovom ispitivanju analizirane su vrednosti biomarkera metabolizma kostiju u odnosu na pol hemodijaliznih pacijenata (*Tabela XV*). Dobijena je statistički značajna razlika između muškaraca i žena za vrednosti fosfora i iPTH, mada se u literaturi navodi da ne postoji uticaj pola na vrednosti analiziranih biomarkera kod pacijenata na hemodijalizi (301).

U ovom ispitivanju analizirane su vrednosti biomarkera u odnosu na pol CAPD pacijenata. Dobijena je statistički značajna razlika između muškaraca i žena ($p < 0,05$) samo u vrednostima CaxP i iPTH (*Tabela XVI*). Literaturni podaci ukazuju na pozitivnu korelaciju CaxP sa ekstravaskularnim komplikacijama kod pacijenata na dijalizi (131,

142, 302). Jedna multicentrična longitudinalna studija potvrđuje pozitivan efekat održavanja nižih vrednosti iPTH i CaxP kod dijaliziranih pacijenata, stabilizovanje i smanjenje progresije bolesti, sprečavanje progresije poremećaja metabolizma minerala i kostiju, kardiovaskularnih poremećaja i smrtnosti (303). Međutim, do sada nema objavljenih literaturnih podataka koji ukazuju na značaj uticaja pola na CaxP.

5.3.2. Vrednosti ispitivanih biomarkera kod pacijenata sa krajnjim stadijumom bolesti bubrega u odnosu na godine života

U odnosu na starost predijaliznih pacijenata, statistički značajna razlika je postojala samo u koncentracijama BALP ($p < 0,05$), dok se vrednosti ostalih specifičnih i preporučenih biomarkera nisu razlikovale kod analiziranih grupa ispod i iznad 60 godina starosti (*Tabela XVII*). Međutim, s obzirom da se sve veći broj predijaliznih pacijenata odlučuje na transplantaciju, a ne na dijalizu, mali je broj literaturnih podataka o vrednostima biomarkera stvaranja i resorpcije kostiju kod starije populacije KSBB pacijenata koji nisu na dijalizi (304).

Kada se analizirao uticaj starosti na vrednosti ispitivanih biomarkera kod pacijenata koji su na terapiji hemodijalizom (*Tabela XVIII*), jedino su dobijene statistički značajno više vrednosti BALP kod pacijenata ispod 60 godina starosti ($p < 0,05$) što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (305, 306). Međutim, u ovom ispitivanju nije potvrđen uticaj starosti na vrednosti TRAP, beta-CTx i na vrednosti preporučenih biomarkera. Mada literaturni podaci ukazuju na efekat starosti na vrednosti biomarkera metabolizma kostiju, posebno kod KSBB pacijenata, u upotrebi su jedinstvene preporučene vrednosti od strane proizvođača u odnosu na koje se posmatra promena ovih biomarkera (TRAP, beta-CTx, joni kalcijuma, neorganskog fosfata, magnezijuma, CaxP, iPTH i 25D) (79, 80, 81).

U odnosu na godine života CAPD pacijenata, u ovom ispitivanju je dobijena statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u vrednostima BALP između pacijenata koji imaju ispod i iznad 60 godina života (*Tabela XIX*), iako su vrednosti bile značajno niže u odnosu na preporučene ($\bar{x} = 23$ IU/L i $\bar{x} = 19$ IU/L, redom). Mada je broj literaturnih podataka koji

objašnjavaju efekat godina starosti na biomarkere resorpcije i stvaranja kostiju kod CAPD pacijenata nedovoljan, godine starosti se smatraju nezavisnim faktorom za razvoj i progresiju renalne osteodistrofije kod KSBB pacijenata (254).

5.3.3. Vrednosti ispitivanih biomarkera kod pacijenata sa krajnjim stadijumom bolesti bubrega u odnosu na trajanje dijalize

U ovom radu analizirane su vrednosti ispitivanih biomarkera (ALP, BALP, TRAP, beta-CTx, joni kalcijuma, neorganskog fosfata, magnezijuma, CaxP, iPTH i 25D) kod pacijenata koji su na terapiji različitim vrstama dijalize (hemodijaliza i kontinuirana ambulatorna peritonealna dijaliza), da bi se procenio eventualni efekat tipa dijalize na metabolizam kostiju (*Tabela XX i XXI*). U skladu sa literaturnim podacima, odabrana je granica od 30 meseci, u odnosu na koju je analizirana razlika biomarkera resorpcije i stvaranja kostiju kod HD i CAPD pacijenata (99, 174, 306).

Dobijene su statistički značajno niže vrednosti ALP i BALP ($p < 0,05$) kod pacijenata koji su na terapiji hemodijalizom duže od 30 meseci (*Tabela XX*). Mada duže trajanje terapije hemodijalizom nije imalo značajan uticaj na promenu TRAP, beta-CTx i preporučenih biomarkera (kalcijuma, neorganskog fosfata, magnezijuma, iPTH i 25D), kao i na vrednosti CaxP, smanjenje aktivnosti specifičnih biomarkera za osteoplastnu aktivnost ukazuje na direktan efekat na osteoplastnu aktivnost, što je u slaganju sa literaturnim podacima (174, 257, 306).

Takođe, u odnosu na trajanje kontinuirane ambulatorne peritonealne dijalize dobijene su statistički značajno niže vrednosti magnezijuma ($p < 0,05$) kod CAPD pacijenata koji su bili na terapiji ovom dijalizom preko 30 meseci, iako su vrednosti bile u granicama referentnih vrednosti (*Tabela XXI*). Ovi podaci su u skladu sa literaturnim podacima koji ukazuju na značajan efekat sadržaja magnezijuma u peritonealnom dijalizatu na iPTH i 25D, a samim tim i na kalcijum i neorganski fosfat (157, 307–310).

5.3.4. Raspodela vrednosti ispitivanih biomarkera kod predijaliznih pacijenata

U ovom ispitivanju je ustanovljena normalna raspodela za svaki od analiziranih biomarkera kod predijaliznih pacijenata (*Tabela XXII*). Mada raspodela vrednosti ispitivanih biomarkera nije odstupala od Gauss-ove raspodele, najveća učestalost dobijena je za ALP, BALP, TRAP i beta-CTx redom: 50–60 IU/L, 10–20 IU/L, 7–7,5 IU/L i 3,5–4,0 ng/L (*Slika 3*). Takođe, najveća učestalost za kalcijum, magnezijum, neorganski fosfat, CaxP, iPTH i 25D dobijena je za sledeće vrednosti: 2,0–2,2 mmol/L, 0,8–0,9 mmol/L, 1,2–1,4 mmol/L, 3,0–3,5 mmol²/L², 400,0–600,0 pg/mL i 30–35 nmol/L (*Slika 4*). Podaci iz ovog rada ukazuju da najveći broj predijaliznih pacijenata ima niže vrednosti BALP i više vrednosti iPTH u odnosu na medijanu, što je u skladu sa literaturnim navodima da kod ovih pacijenata postoji izmenjen koštani promet, ali i da ova dva biomarkera (BALP i iPTH) imaju veliki značaj u dijagnozi, praćenju i prognozi metabolizma kostiju kod KSBB pacijenata (281, 283). Najveći procenat predijaliznih pacijenata imao je vrednosti CaxP u okviru preporučenih vrednosti za ektopičnu kalcifikaciju (98).

5.3.5. Raspodela vrednosti ispitivanih biomarkera kod pacijenata na hemodijalizi

U ovom radu je kod pacijenata koji su bili na terapiji hemodijalizom ustanovljena normalna raspodela za svaki od analiziranih biomarkera (*Tabela XXIII*). Mada raspodela vrednosti ispitivanih biomarkera nije odstupala od Gauss-ove raspodele, najveća učestalost dobijena je za ALP, BALP, TRAP i beta-CTx redom: 50–60 IU/L, 10–20 IU/L, 7,5–8 IU/L i 3,5–4,0 ng/L (*Slika 5*). Takođe, najveća učestalost za kalcijum, magnezijum, neorganski fosfat, CaxP, iPTH i 25D dobijena je za sledeće vrednosti: 2,4–2,5 mmol/L, 1,0–1,1 mmol/L, 1,6–1,8 mmol/L, 3,5–4,5 mmol²/L², 50,0–100,0 pg/mL i 10–20 nmol/L (*Slika 6*). U ovom radu, kod HD pacijenata, uočava se efekat dijalize na veću učestalost niskih vrednosti BALP i viših vrednosti TRAP, ali i nižih vrednosti iPTH i 25D u odnosu na preporučene (> 30 IU/L, < 6,5 IU/L, 150–300 pg/mL i > 50 nmol/L, redom) (48, 49, 78, 99). Takođe, uočava se efekat dijalize na stabilizovanje nivoa kalcijuma, neorganskog fosfata i magnezijuma u odnosu na predijalizne pacijente. Međutim, kod HD pacijenata veći procenat vrednosti CaxP bio je

malo ispod graničnih vrednosti koje ukazuju na eventualne komplikacije (ektopična, vaskularna kalcifikacija), što je u slaganju sa literaturnim podacima (98, 142).

5.3.6. Raspodela vrednosti ispitivanih biomarkera kod pacijenata na kontinuiranoj ambulatornoj peritonealnoj dijalizi

U ovom radu je kod pacijenata koji su bili na terapiji kontinuiranom ambulatornom peritonealnom dijalizom ustanovljena normalna raspodela za svaki od analiziranih biomarkera (*Tabela XXIV*). Mada raspodela vrednosti ispitivanih biomarkera nije odstupala od Gauss-ove raspodele, najveća učestalost dobijena je za ALP, BALP, TRAP i beta-CTx redom: 50–60 IU/L, 10–15 IU/L, 6–7 IU/L i 3,0–3,5 ng/L (*Slika 7*). Takođe, najveća učestalost za kalcijum, magnezijum, neorganski fosfat, CaxP, iPTH i 25D dobijena je za sledeće vrednosti: 2,2–2,3 mmol/L, 1,0–1,1 mmol/L, 1,4–1,6 mmol/L, 3,0–3,5 mmol²/L², 1,0–100,0 pg/mL i 40–50 nmol/L (*Slika 8*). Pored niskih vrednosti BALP i iPTH, efekat peritonealne dijalize ogleda se i u povišenim vrednostima magnezijuma, što je u slaganju sa literaturnim podacima, koji ukazuju da je hipermagnezijemija udružena sa renalnom osteodistrofijom i niskim vrednostima iPTH, ali da dovodi do manje učestalih vaskularnih komplikacija kod CAPD pacijenata (155, 157). Najveća učestalost vrednosti 25D kod CAPD pacijenata je bila oko preporučenih za pacijente na dijalizi (< 50 nmol/L). Međutim, HD pacijenti su imali najmanju učestalost istih vrednosti (40–50 nmol/L), što je u skladu sa literaturnim podacima o različitom efektu tipa dijalize na biomarkere metabolizma kostiju (311).

5.4. POREĐENJE VREDNOSTI BALP, TRAP, BETA-CTx I PREPORUČENIH BIOMARKERA KOD PACIJENATA SA KRAJNJIM STADIJUMOM BOLESTI BUBREGA U ODNOSU NA KONTROLNU GRUPU

Pošto su trenutne preporuke da se nivo metabolizma kostiju kod predijaliznih pacijenata i pacijenata na dijalizi procenjuje na osnovu nespecifičnih biomarkera za tkivo kostiju (ALP, jona kalcijuma, magnezijuma, neorganskog fosfata, iPTH i 25D), planirano je da se specifični biomarkeri osteoklasta, osteoblasta i kolagena kostiju, BALP, TRAP i

beta-CTx uporede sa preporučenim biomarkerima kod KSBB pacijenata i u odnosu na kontrolnu grupu. U tom smislu, ispitana je korelacija koncentracija BALP, TRAP i beta-CTx sa vrednostima preporučenih biomarkera (ALP, joni kalcijuma, magnezijuma, neorganskog fosfata, iPTH i 25D).

5.4.1. Raspodela vrednosti BALP, TRAP, beta-CTx i preporučenih biomarkera kod pacijenata sa krajnjim stadijumom bolesti bubrega u odnosu na vrednosti u kontrolnoj grupi

U ovom ispitivanju vrednosti ispitivanih specifičnih biomarkera (BALP, TRAP i beta-CTx) kod predijaliznih pacijenata nisu bile u granicama dobijenih referentnih vrednosti kontrolne grupe (*Slika 10–12*). Koncentracije BALP su bile statistički značajno niže u odnosu na zdravu populaciju ($\bar{x} = 32$ IU/L, $p < 0,001$), dok su koncentracije TRAP i beta-CTx bile statistički značajno više u odnosu na kontrolnu grupu ($\bar{x} = 7$ IU/L, $p < 0,05$ i $\bar{x} = 3,54$, $p < 0,01$ ng/mL). Dobijene vrednosti specifičnih biomarkera osteoblasta, osteoklasta i kolagena kostiju ukazuju na usporen rad osteoblasta i blago povećan rad osteoklasta, tj. povećanu resorpciju kostiju i razgradnju kolagena. Od preporučenih biomarkera metabolizma kostiju vrednosti ALP, fosfora i CaxP su bile u granicama referentnih vrednosti, dok su koncentracije kalcijuma, magnezijuma i 25D bile statistički značajno niže u odnosu na vrednosti kontrolne grupe ($\bar{x} = 2,14$ mmol/L, $p < 0,01$, $\bar{x} = 0,86$ mmol/L, $p < 0,05$ i $29,4$ nmol/L, $p < 0,01$) (*Slika 9, 13–16 i 18*). Vrednosti iPTH predijaliznih pacijenata su bile statistički značajno više u odnosu na vrednosti zdravih osoba ($\bar{x} = 350,7$ pg/mL, $p < 0,01$) (*Slika 17*). Mada povećane vrednosti iPTH ukazuju na hiperparatiroidizam, u literaturi se navodi činjenica da hiperparatiroidizam može biti udružen sa povećanim rizikom od fraktura kod KSBB pacijenata, uzimajući u obzir povećanu resorpciju kostiju, a smanjeno stvaranje (282, 297). Međutim, na činjenicu da prisustvo visokih vrednosti iPTH može biti udruženo sa smanjenim stvaranjem kostiju kod analiziranih predijaliznih pacijenata, pokazuju dobijene niske vrednosti BALP, a visoke vrednosti TRAP i beta-CTx, koje ukazuju na povećanu resorpciju tkiva kostiju.

Kod pacijenata koji su bili na hemodijalizi vrednosti BALP su bile statistički značajno niže u odnosu na kontrolnu grupu ($\bar{x} = 27$ IU/L, $p < 0,001$), dok su vrednosti TRAP bile značajno više ($\bar{x} = 8$ IU/L, $p < 0,05$) (*Slika 10 i 11*). Mada su koncentracije beta-CTx bile u referentnom opsegu, bile su nešto više u odnosu na zdravu populaciju, ali razlika nije bila statistički značajna ($\bar{x} = 2,21$ ng/mL, $p = 0,054$) (*Slika 12*). U literaturi se na osnovu vrednosti biomarkera metabolizma kostiju uglavnom istražuje smanjenje metabolizma i otkrivanje adinamične bolesti kostiju ili definisanje ubrzanog metabolizam kostiju, a sve u cilju davanja pravovremene terapije, kao i praćenja delovanja terapije ili otkrivanja eventualnih komplikacija, najčešće ekstrasvaskularnih kalcifikacija (99, 312). Vrednosti analiziranih biomarkera metabolizma kostiju u ovom ispitivanju ukazuju na smanjenu aktivnost osteoblasta kod pacijenata na hemodijalizi, a ukoliko se ne prati i ne održava koštani promet najčešće dolazi do razvoja adinamične bolesti kostiju kod ovih pacijenata, potpunog odsustva osteoblasta i smanjenog formiranja tkiva kostiju.

Vrednosti ALP, kalcijuma, magnezijuma i CaxP su bile u granicama referentnih vrednosti, i nisu se značajno razlikovale u odnosu na vrednosti zdrave populacije, ali su koncentracije neorganskog fosfata i iPTH bile značajno više u odnosu na zdravu populaciju ($\bar{x} = 1,66$ mmol/L, $p < 0,01$ i $\bar{x} = 115,4$ pg/mL, $p < 0,05$, redom) (*Slika 9, 13–17*). Međutim, ukoliko se uzme u obzir preporučeni opseg za pacijente na dijalizi za iPTH (150–300 pg/mL), dobijene vrednosti kod analizirane populacije su bile značajno niže ($\bar{x} = 115,4$, $p < 0,05$). Skoriji literaturni podaci ukazuju da niže vrednosti iPTH od preporučenih za pacijente na dijalizi mogu da ukažu na veći stepen preživljavanja hemodijalizirane populacije (313). Takođe, neki literaturni podaci ukazuju da niske vrednosti iPTH ne moraju nužno da ukazuju na hipodinamične procese koštanog tkiva (263, 301, 313). Više vrednosti fosfora od preporučenih mogu da ukažu na neadekvatnu primenu lekova koji vezuju fosfate. Dobijene koncentracije 25D su bile značajno niže u odnosu na vrednosti zdrave populacije ($\bar{x} = 39,5$ nmol/L, $p < 0,01$), što je u saglasnosti sa literaturnim podacima koji ukazuju na učestalost deficita vitamina D kod HD pacijenata (*Slika 18*) (222, 314).

U ovom ispitivanju su, kod CAPD pacijenata, vrednosti BALP bile statistički značajno niže ($\bar{x} = 22$ IU/L, $p < 0,001$), dok su vrednosti TRAP i beta-CTx bile značajno više u odnosu na kontrolnu grupu ($\bar{x} = 6$ IU/L, $p < 0,05$ i $\bar{x} = 3,43$ ng/mL, $p < 0,01$, redom) (*Slika 10–12*). Literaturni podaci ukazuju na povećane vrednosti intestinalnog izoenzima ALP kod CAPD pacijenata, ali i na sekundarni hiperparatiroidizam kojeg prate više vrednosti BALP, tako da ostaje da se daljim istraživanjima objasni mogući smanjen metabolizam kostiju kod ove populacije i dobijene snižene vrednosti BALP (315). Dobijene vrednosti TRAP i beta-CTx su u saglasnosti sa literaturnim podacima, što može da ukaže na povećanu resorpciju kostiju kod CAPD pacijenata (316, 317). Vrednosti magnezijuma, fosfora i CaxP su bile u granicama referentnih vrednosti kontrolne grupe, ali su vrednosti kalcijuma bile statistički značajno niže ($\bar{x} = 2,27$ mmol/L, $p < 0,01$) (*Slika 13–16*). Mada su koncentracije iPTH bile značajno više u odnosu na gornju granicu referentnog opsega kontrolne grupe, nalazile su se u preporučenom opsegu za iPTH za pacijente na dijalizi ($\bar{x} = 171,4$ pg/mL, $p < 0,05$) (*Slika 17*). Kod KSBB pacijenata na dijalizi najčešće dolazi do sekundarnog hiperparatiroidizma i povećanih nivoa iPTH iznad preporučenog opsega (150–300 pg/mL). Međutim, održavanjem niskih koncentracija kalcijuma i magnezijuma u dijalizatu može da se reguliše sekrecija iPTH, ali više koncentracije kalcijuma i magnezijuma mogu da dovedu do smanjene produkcije iPTH i posledično do adinamične bolesti kostiju (308). Jedna koreanska grupa autora potvrđuje da niži serumski nivoi magnezijuma imaju značajan povoljan efekat na preživljavanje i na kardiovaskularne komplikacije pacijenata na dijalizi, a preduslov konstantnih nivoa magnezijuma u serumu je i održavanje nivoa magnezijuma u dijalizatu (309). Nivoi 25D su bili značajno niži u odnosu na referentni opseg kontrolne grupe ($\bar{x} = 47,0$ nmol/L, $p < 0,05$) što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (*Slika 13*) (318). Korigovanjem deficita vitamina D kod CAPD pacijenata, koriguju se ne samo nivoi iPTH i kalcijuma, već se omogućava adekvatnije lečenje dijalizom i lakše podnošenje njenih posledica.

5.4.2. Korelacija vrednosti BALP, TRAP, beta-CTx i preporučenih biomarkera kod predijaliznih pacijenata

Nacionalni vodiči za praćenje ishoda hronične bolesti bubrega i KSBB pacijenata (KDIGO) ukazuju na važnost analitičkog koncepta kada se uzimaju u obzir biomarkeri metabolizma kostiju (99, 229, 246, 296). Ove preporuke predlažu da bi određivanje koncentracija iPTH i BALP trebalo da se koristi za procenu oboljenja kostiju zato što su jako visoke ili niske vrednosti pouzdan pokazatelj osnovnog oboljenja kostiju. U literaturi se kao obećavajući biomarker metabolizma kolagena kostiju opisuje beta-CTx (37, 99). Međutim, najnoviji literaturni podaci Delanaye i saradnika (37) ukazuju na prednost dugoročnog (longitudinalnog) praćenja pacijenata u odnosu na striktno dijagnostičke (transverzalne) studije. Takođe, terapijski pristup KSBB pacijenata ne treba da se zasniva na pojedinačnim vrednostima iPTH, već na dinamici sekrecije PTH, tj. dinamici promene specifičnih biomarkera metabolizma kostiju (37). Očekuje se da budući radovi na ovu temu doprinesu daljim preporukama o frekvenciji merenja iPTH i BALP kod KSBB pacijenata, na osnovu koje bi moglo da se govori o kritičnoj razlici ili najmanje značajnoj promeni analiziranog biomarkera u dijagnozi i prognozi oboljenja kostiju.

U ovom ispitivanju dobijena je statistički značajna pozitivna korelacija BALP sa ALP ($p < 0,001$) i sa TRAP ($p < 0,05$), kao i statistički negativna korelacija sa beta-CTx i kalcijumom ($p < 0,05$) (*Tabela XXV, Slika 19*). Uzimajući u obzir niske nivoe BALP kod analizirane grupe pacijenata, negativna korelacija koncentracije BALP sa nivoima beta-CTx i kalcijuma ($r = -0,315$ i $r = -0,288$, redom) može da ukaže na smanjenu aktivnost osteoblasta, uz istovremeno povećano raspadanje kolagena kostiju. Međutim, dobijene korelacije nisu u saglasnosti sa literaturnim podacima, koji navode pozitivnu korelaciju BALP i beta-CTx (86). Ostaje da budući radovi objasne odnos specifičnog biomarkera stvaranja kostiju, sa raspadnim produktom kolagena, kao i da li postoji značajna razlika u metabolizmu kostiju predijaliznih pacijenata u odnosu na pacijente na dijalizi. U ovom ispitivanju, dobijena je statistički značajna negativna korelacija između TRAP i magnezijuma ($r = -0,463$, $p < 0,01$) i fosfora ($r = -0,301$, $p < 0,05$) (*Tabela XXVI, Slika 20*). Takođe, dobijena je statistički značajna ($p < 0,05$) pozitivna korelacija

beta-CTx sa izmerenim vrednostima kalcijuma ($r = 0,597$) i negativna korelacija sa 25D ($r = -0,411$) (*Tabela XXVII, Slika 20*).

5.4.3. Korelacija vrednosti BALP, TRAP, beta-CTx i preporučenih biomarkera kod pacijenata na hemodijalizi

Kada su analizirane korelacije biomarkera kod HD pacijenata dobijena je statistički značajna pozitivna korelacija BALP sa ALP ($p < 0,001$), sa TRAP ($p < 0,05$), i PTH i beta-CTx ($p < 0,01$), ali i negativna korelacija sa kalcijumom, fosforom, CaxP i 25D ($p < 0,05$) (*Tabela XXVIII, Slika 22*). Kada se analizirala korelacija između TRAP, beta-CTx i magnezijuma, mada su dobijeni niži koeficijenti korelacije, ona je bila statistički značajna ($r = -0,217$ i $r = -0,214$, $p < 0,05$, redom). Takođe, postojala je statistički značajna pozitivna korelacija TRAP i iPTH i 25D ($p < 0,05$) (*Tabela XXIX, Slika 23*). Kod HD pacijenata dobijena je statistički značajna pozitivna korelacija beta-CTx sa CaxP ($p < 0,05$) i sa iPTH ($p < 0,01$) (*Tabela XXX, Slika 24*). Mada još uvek postoji mali broj radova koji objašnjavaju značaj određivanja beta-CTx kod HD pacijenata, korelacije u ovom ispitivanju se slažu sa postojećim literaturnim podacima, a dobijene povećane vrednosti mogu da ukazuju na povećanu razgradnju kolagena, tj. na povećane procese resorpcije i ubrzan metabolizam kostiju (99).

5.4.4. Korelacija vrednosti BALP, TRAP, beta-CTx i preporučenih biomarkera kod pacijenata na kontinuiranoj ambulatornoj peritonealnoj dijalizi

U ovom ispitivanju dobijene su statistički značajna pozitivna korelacija BALP sa ALP ($r = 0,406$, $p < 0,0001$), sa 25D ($r = 0,318$, $p < 0,001$), ali i sa TRAP, beta-CTx i iPTH ($p < 0,05$). Takođe, dobijena je statistički značajna negativna korelacija ($p < 0,05$) sa kalcijumom, magnezijumom, fosforom i CaxP (*Tabela XXXI, Slika 25*). Vrednosti TRAP su bile u pozitivnoj korelaciji ($p < 0,05$) sa fosforom, iPTH i 25D, kao i u negativnoj korelaciji ($p < 0,05$) sa beta-CTx i magnezijumom (*Tabela XXXII, Slika 26*). U literaturi se inverzna korelacija iPTH i magnezijuma kod CAPD pacijenata navodi kao faktor koji doprinosi razvoju adinamične bolesti kostiju (308, 309). Kod CAPD

pacijenata vrednosti beta-CTx su bile u pozitivnoj korelaciji ($p < 0,05$) sa ALP i 25D (Tabela XXXIII, Slika 27).

5.5. POREĐENJE BALP, TRAP, BETA-CT_x I PREPORUČENIH BIOMARKERA U ODNOSU NA NIVOE iPTH, VREDNOSTI VITAMINA D I PROIZVODA KALCIJUMA I NEORGANSKOG FOSFATA

Preporuke su da se u odnosu na tri različita nivoa iPTH može proceniti ubrzan, normalan ili usporen metabolizam kostiju, pa je planirano da se ispita u kojoj su meri izmenjene vrednosti specifičnih biomarkera u odnosu na preporučene, u sva tri nivoa vrednosti iPTH (< 150 pg/mL, $150-300$ pg/mL, > 300 pg/mL), odnosno koji biomarker najbolje prati niske, srednje i visoke nivoe iPTH, tj. pomoću koga biomarkera je moguće proceniti nizak, normalan ili ubrzan metabolizam kostiju (99). Uzimajući u obzir da granične vrednosti iPTH koje se koriste u proceni nivoa metabolizma kostiju zavise od metode kojom se ovaj biomarker određuje, objavljene su nove KDIGO preporuke o značaju dvostruke i devetostruke vrednosti gornje granice referentnog intervala za iPTH ($130-585$ pg/mL), pošto se smatra da su vrednosti iPTH $> 400-600$ pg/mL usko povezane sa morbiditetom i mortalitetom kod pacijenata na dijalizi (236). Međutim, ne postoji univerzalni standard pomoću kojeg se mogu kalibrisati različiti testovi za iPTH. Iako je preporuka da se koristi 95/646 Internacionalni standard, još uvek se ispituje značaj etaloniranja različitih metoda ovim kalibratorom (318). Prema tome, promena prvobitno preporučenih opsega za vrednosti iPTH prema KDOQI, u širi opseg vrednosti prema KDIGO je samo elegantan način da se prevaziđu problemi varijabilnosti između metoda, biološka varijacija PTH i mogući uticaj različite terapije na dijagnostički zaključak. Takođe, vrednosti iPTH u ovom ispitivanju su određivane u periodu pre objavljivanja KDIGO preporuka, zbog čega su u radu korišćene KDOQI preporuke (99, 263).

Takođe, kod KSBB pacijenata adekvatno dozirana terapija vitaminom D, može u velikoj meri sprečiti pogoršanje metabolizma kostiju upravo na osnovu vrednosti specifičnih biomarkera kostiju uz paralelno merenje nivoa 25D. U odnosu na ovu činjenicu, ispitivaće se u kojoj meri su izmenjeni analizirani biomarkeri kod

nedovoljnih i dovoljnih nivoa 25D, tj. koji biomarker najbolje korelira sa nivoima 25D. Kao posledica dugotrajne bolesti bubrega i neadekvatnog regulisanja nivoa kalcijuma i fosfora, kod KSBB pacijenata može da se razvije kalcifikacija mekih tkiva, najčešće vaskularna kalcifikacija. Preporuke su da proizvod CaxP bude kontrolisan kako bi se izbegla ektopična kalcifikacija. Zato je bilo potrebno da se ispita kako nivo CaxP prati biomarkere metabolizma kostiju u sva tri nivoa iPTH, kao i nedovoljne i dovoljne nivoe 25D.

5.5.1. Raspodela vrednosti BALP, TRAP, beta-CTx i preporučenih biomarkera u odnosu na niske, preporučene i visoke nivoe iPTH

U zavisnosti od različitih nivoa iPTH, preporučeni su različiti terapijski pristupi metabolitima vitamina D u lečenju bolesti kostiju kod KSBB pacijenata. Terapija ima za cilj da održi nivoe PTH u granicama od 150–300 pg/mL (99, 220, 319). U literaturi se navodi da niže vrednosti iPTH mogu dovesti do usporenog metabolizma kostiju, a ukoliko su vrednosti ispod 100 pg/mL iPTH mogu da ukažu na adinamičnu bolest kostiju (99). Veća osetljivost se postiže kombinacijom sa vrednostima BALP, pa se smatra da su ova dva biomarkera najbolji pokazatelj u diferencijalnoj dijagnozi usporenog i ubrzanog metabolizma kostiju (39, 78, 287). U ovom ispitivanju su analizirani specifični i preporučeni biomarkeri metabolizma kostiju u zavisnosti od različitih opsega iPTH posebno kod predijaliznih i dijaliziranih pacijenata.

Kod sve tri grupe pacijenata uočava se da vrednosti BALP prate nivoe iPTH: najniže su kod pacijenata sa vrednostima iPTH ispod 150 pg/mL, a najviše u grupi preko 300 pg/mL iPTH za sve tri grupe pacijenata, što može da ukaže na moguće smanjenje metabolizma kostiju kod pacijenata sa vrednostima iPTH manjim od 150 pg/mL i kod predijaliznih pacijenata i kod pacijenata na dijalizi nezavisno od tipa dijalize (*Tabela XXXIV, Slika 28*). Međutim, najveća razlika u vrednostima BALP dobijena je kod HD pacijenata sa vrednostima iPTH ispod i iznad preporučenih vrednosti (16 IU/L vs. 60 IU/L) (*Tabela XXXIV*). Literaturni podaci potvrđuju razliku u vrednostima preporučenih i specifičnih biomarkera metabolizma kostiju predijaliznih pacijenata u odnosu na one koji su na terapiji dijalizom, pa čak i na znatan uticaj tipa dijalize u odnosu na nivoe

iPTH koji mogu ukazati na usporen, normalan ili uvećan metabolizam kostiju (49, 300, 303).

U ovom ispitivanju su dobijene niže vrednosti TRAP kod dijaliziranih pacijenata kod kojih se terapijom postiže preporučeni nivo iPTH, što ukazuje na pozitivan efekat dijalize na resorpciju kostiju, koja uz adekvatnu terapiju dovodi do normalizovane aktivnosti osteoklasta i smanjenja vrednosti TRAP (*Tabela XXXV, Slika 29*). Suprotno ovome, kod predijaliziranih pacijenata vrednosti TRAP su više kod pacijenata sa preporučenim nivoima iPTH, u odnosu na niže ili više nivoe iPTH. Mada se u literaturi TRAP navodi kao dobar pokazatelj resorpcije kostiju kod analiziranih grupa pacijenata vrednosti ovog biomarkera ne prate nivoe iPTH, a takođe dobijaju se male promene TRAP u odnosu na niske, preporučene i visoke vrednosti iPTH. Ovo može da se prevaziđe određivanjem koncentracija TRAP5b molekule kao mnogo specifičnije za osteoklastnu aktivnost. Međutim, za određivanje ovog biomarkera ne postoje automatizovane metode, što je glavni problem za uvođenje u rutinsku laboratorijsku dijagnostiku.

U literaturi se navodi da je beta-CTx dobar pokazatelj metabolizma kolagena I, koji je glavni sastojak matriksa kostiju, ali su uglavnom analizirani pacijenti sa osteoporozom, mada jedan broj radova ukazuje na beta-CTx kao pouzdan marker razgradnje kolagena i kod KSBB pacijenata (37, 86–88). U ovom ispitivanju su dobijene više vrednosti beta-CTx kod predijaliziranih, a niže vrednosti kod CAPD pacijenata koji nisu imali regulisane nivoe iPTH (*Tabela XXXVI, Slika 30*), što je u saglasnosti sa jednim brojem radova koji ukazuju na povišene vrednosti beta-CTx kod nereguliranih nivoe iPTH, i pozitivan efekat dijalize i medikamentozne terapije na smanjenje nivoe beta-CTx, postizanjem preporučenog opsega iPTH (96, 317).

U ovom ispitivanju vrednosti preporučenih biomarkera, ALP, kalcijuma, magnezijuma, neorganskog fosfata i CaxP, nisu bile značajno različite u odnosu na različite nivoe iPTH kod sve tri grupe analiziranih pacijenata (*Tabela XXXVII–Tabela XLI, Slika 31–35*). Mada se u literaturi navodi da viši nivoe CaxP mogu da ukažu na ekstrakoštane kalcifikacije, postoji jedan broj radova koji ukazuje na pozitivan efekat ovog proizvoda

na prevenciju smanjenog metabolizma kostiju (222, 302). Kod sve tri grupe pacijenata dobijeni niži nivoi 25D u odnosu na preporučene, nezavisno od nivoa iPTH (*Tabela XLIII, Slika 37*). Po najnovijim preporukama KDIGO vodiča, terapija vitaminom D i analogima u cilju supresije povišenih nivoa PTH, nije indikovana kod predijaliznih pacijenata ukoliko nije prisutna sumnja ili potvrda deficita vitamina D (235). Međutim, u ovom ispitivanju su dobijene niže vrednosti 25D u odnosu na tri nivoa iPTH, kod sve tri grupe analiziranih pacijenata, što ukazuje na potrebu terapije vitaminom D ili analogima i kod KSBB pacijenata koji nisu na terapiji dijalizom.

5.5.2. Raspodela vrednosti BALP, TRAP, beta-CTx i preporučenih biomarkera u odnosu na nedovoljne i dovoljne nivoe 25-hidroksi vitamina D

Međunarodno prihvaćena definicija nedostatka vitamina D je koncentracija u krvi < 50 nmol/L (207, 231). Smatra se da je u najvećem procentu zastupljena kod predijaliznih pacijenata, a kod KSBB pacijenata terapija vitaminom D i analogima ima za cilj da poveća nivoe iPTH. U prisustvu dovoljnih količina vitamina D, smatra se da dalja terapija nema efekat na poboljšanje kardiovaskularnih komplikacija ili na smanjenje rizika od smrtnosti, ali i na metabolizam kostiju (320).

Poređenjem vrednosti BALP kod predijaliznih pacijenata u odnosu na pacijente na dijalizi, dobijene su statistički značajno različite vrednosti, ne uzimajući u obzir status vitamina D (nedostatak i dovoljna količina vitamina D) ($p < 0,05$) (*Tabela XLIV, Slika 38*). Takođe, nivoi BALP su bili viši kod grupa sa dovoljnom količinom vitamina D, što je u slaganju sa literaturnim podacima, koji ukazuju na povoljan efekat dovoljne količine vitamina D na metabolizam kostiju, a posredno i na koncentracije specifičnih biomarkera kostiju (42, 89, 209, 213, 216–218). Međutim, nedavno je francuska grupa autora objavila rad u kome su pokazali da je terapija 25-hidroksiholekalciferolom imala za posledicu blago sniženje nivoa BALP (320). U predijaliznoj i CAPD grupi pacijenata sa nivoima 25D > 50 nmol/L, vrednosti TRAP su bile više, a beta-CTx niže u odnosu na grupu sa nedovoljno vitamina D (*Tabela XLV i XLVI, Slika 39 i 40*). Mada su u ovom ispitivanju vrednosti TRAP bile nešto niže u grupi HD pacijenata sa dovoljnim nivoima 25D, one su ukazivale na povećanu aktivnost osteoklasta (*Tabela XLV*). Takođe, nivoi

beta-CTx su bili nešto viši u grupi HD pacijenata sa nižim vrednostima 25D, što može da ukaže na povećane procese razgradnje kolagena, a smanjenje stvaranja kostiju kod pacijenata sa nedovoljno vitamina D (*Tabela XLVI*). Do sada nema puno literaturnih podataka o efektima terapije vitaminom D i analogima na TRAP i beta-CTx kod KSBB pacijenata.

Za razliku od pacijenata na dijalizi, predijalizni pacijenti su imali nešto više vrednosti ALP u grupi sa nedovoljnom količinom vitamina D, ali razlika nije bila značajna (*Tabela XLVII, Slika 41*). Primarni cilj terapije vitaminom D i analogima jeste snižavanje nivoa iPTH i regulisanje sekundarnog hiperparatiroidizma kod pacijenata na dijalizi. Kao posledica nekontrolisane terapije može doći do snižavanja nivoa ALP i razvoja adinamične bolesti kostiju kod ovih pacijenata. Više vrednosti ALP kod pacijenata na dijalizi sa dovoljnom količinom vitamina D, ukazuju na dobro kontrolisanu terapiju i uspešno regulisanje sekundarnog hiperparatiroidizma. U ovom ispitivanju su dobijene očekivano niže vrednosti kalcijuma kod predijaliznih pacijenata, nezavisno od statusa vitamina D (*Tabela XLVIII, Slika 42*). Vrednosti kalcijuma kod pacijenata na dijalizi su bile u preporučenom opsegu, mada su vrednosti bile niže u grupama sa dovoljno vitamina D. Ovo nije u slaganju sa literaturnim podacima da terapija vitaminom D povećava apsorpciju kalcijuma i može dovesti do hiperkalcemije (187, 201). Za razliku od kalcijuma, vrednosti neorganskog fosfata su u grupi sa dovoljno vitamina D kod predijaliznih pacijenata bile niže, a kod dijaliznih pacijenata bile više u odnosu na grupu sa nedovoljno vitamina D (*Tabela XLIX, Slika 43*). Međutim, nedavno je francuska grupa naučnika ukazala na potrebu da se primena terapije vitaminom D i analogima još jednom preispita, zbog povećanja metabolizam kostiju kao posledice terapije (320). Koncentracije magnezijuma i CaxP se nisu značajno razlikovale između analiziranih grupa predijaliznih i dijaliznih pacijenata (*Tabela L i LI, Slika 44 i 45*). U grupi predijaliznih pacijenata sa nedovoljno vitamina D, vrednosti magnezijuma su bile niže od donje granice referentnih vrednosti, što je u slaganju sa literaturnim podacima da vitamin D povećava apsorpciju i vrednosti magnezijuma kod KSBB pacijenata, mada sam mehanizam nije objašnjen (321). Takođe, mali je broj radova koji ukazuju na direktan efekat vitamina D na CaxP (216, 217). Niže vrednosti iPTH u sve tri grupe pacijenata sa 25D > 50 nmol/L mogu ukazati

na pozitivan efekat terapije vitaminom D i analogima, što je u slaganju sa literaturnim podacima (*Tabela LII, Slika 46*) (207, 212–214, 218).

5.6. DIJAGNOSTIČKA VREDNOST BALP, TRAP, BETA-CTx I PREPORUČENIH BIOMARKERA ZA PROCENU ADINAMIČNE BOLESTI KOSTIJU

Za postavljanje konačne dijagnoze bolesti kostiju kod KSBB pacijenata sve se ređe preporučuje biopsija kostiju kao invazivna, neprijatna metoda. Iako se smatra da je biopsija kostiju "zlatni standard" za definisanje nivoa metabolizma kostiju, veliki broj radova ukazuje na klinički značaj biomarkera (99, 222, 223, 236, 242, 243). Na osnovu vrednosti preporučenih biomarkera može se sa velikim stepenom pouzdanosti definisati ubrzan ili usporen metabolizam kostiju. Najveći problem je što nijedan biomarker ne može predvideti mešanu uremijsku bolest kostiju, mada su ove bolesti i retke kod KSBB pacijenata. Poslednji literaturni podaci ukazuju na značaj udruženih vrednosti iPTH i BALP za definisanje adinamične bolesti kostiju kod pacijenata na dijalizi (37). KDOQI vodiči ukazuju da najveći broj pacijenata koji ima vrednosti iPTH < 100 pg/mL razvije adinamičnu bolest kostiju, ali Coen i sar. su dobili najveći Younden-ov indeks (0,93) za BALP u odnosu na ostale analizirane biomarkere (iPTH, ALP, osteokalcin, TRAP i deokspiridinijum) u dijagnozi usporenog metabolizma kostiju (78). Jedna studija koja je ispitivala prediktivne vrednosti BALP i iPTH u dijagnozi adinamične bolesti kostiju, pokazala je da su vrednosti < 27 IU/L i < 150 pg/mL pouzdan pokazatelj adinamične bolesti kostiju kod dijaliziranih pacijenata sa visokom osetljivošću (78,1% i 80,6%) i specifičnošću (86,4% i 76,2%) (39). Nema puno podataka o dijagnostičkoj vrednosti TRAP za otkrivanje adinamične bolesti kostiju. Međutim, postoje literaturni podaci koji ukazuju da povećane vrednosti beta-CTx imaju bolji Younden-ov indeks (0,24) u odnosu na iPTH (0,12) u definisanju povećanog gubitka mase kostiju, a samim tim i u razvoju adinamične bolesti kostiju (98). Takođe, postoji mali broj literaturnih podataka o prediktivnim vrednostima biomarkera kostiju kod predijaliznih pacijenata za adinamičnu bolest kostiju, mada je usporen metabolizam i kod ove grupe pacijenata detaljno opisan u literaturi (49, 282, 322).

U ovom ispitivanju su analizirane dijagnostičke vrednosti BALP, TRAP, beta-CTx i preporučenih biomarkera metabolizma kostiju u odnosu na preporučene granične vrednosti iPTH za usporen metabolizam kostiju (< 100 pg/mL). Kada su analizirane vrednosti svih KSBB pacijenata zajedno, ROC analiza je pokazala da je AUC za kalcijum bila najveća (0,701), tj. za kalcijum je u ovom ispitivanju dobijena najbolja prediktivna vrednost za detekciju usporenog metabolizma kostiju (osetljivosti i specifičnosti su 67,9% i 73,8%, redom) (*Tabela LIV, Slika 48*). Takođe, ROC analiza je pokazala da je AUC za BALP (0,597) bila nešto manja od AUC za kalcijum, ali da je postojala statistički značajna razlika ($p < 0,05$). U ovom ispitivanju optimalna „cut off“ vrednost BALP za detekciju usporenog metabolizma kostiju kod KSBB pacijenata bila je 24 IU/L, što je u slaganju sa literaturnim podacima (47–49). Međutim dobijena je nešto niža osetljivost i specifičnost (57,2% i 58,1%).

Takođe, analizirane su vrednosti biomarkera posebno za predijalizne pacijente, pacijente na hemodijalizi i CAPD pacijente. Površina ispod ROC krive za BALP za predijalizne pacijente nije se značajno razlikovala od AUC za druge analizirane biomarkere metabolizma kostiju (TRAP, beta-CTx, ALP i kalcijum), ali je bila najviša (0,688) (*Tabela LV, Slika 49*). Osetljivost i specifičnost BALP za optimalnu „cut off“ vrednost (27 IU/L) su bile nešto veće u odnosu na osetljivost i specifičnost drugih analiziranih biomarkera u predijaliznoj grupi pacijenata (84,4% i 58,2%). Dobijena „cut off“ vrednost je u slaganju sa literaturnim podacima u kojima se opisuje ista metoda određivanja ovog biomarkera, mada su osetljivost i specifičnost nešto manje (35, 39, 281, 300, 304). U literaturi je klinički značaj potencijalnih biomarkera metabolizma kostiju ispitan poređenjem sa "zlatnim standardom" za određivanje nivoa metabolizma kostiju, tj. histomorfološkim analizama (34, 35, 37, 38, 47, 49, 179, 252, 294, 295, 322).

Ispitivanjem vrednosti biomarkera posebno za pacijente na hemodijalizi, ROC analizom je dobijena najveća statistička značajnost za vrednosti kalcijuma ($p = 0,007$) (*Tabela LV, Slika 50*). Površina ispod ROC krive za kalcijum je bila 0,651. Takođe, značajne vrednosti AUC dobijene su i za vrednosti neorganskog fosfata i CaxP (0,514 i 0,555). Vrednost AUC za beta-CTx, kao specifičnog biomarkera metabolizma kostiju kod pacijenata na hemodijalizi je bila 0,579. Iako je kalcijum preporučen biomarker za

praćenje metabolizma kostiju, nema puno literaturnih podataka za njegovu dijagnostičku vrednost. Međutim, literaturni podaci ukazuju da kada se porede performanse BALP, TRAP i beta-CTx sa iPTH, kao preporučenog biomarkera, kod pacijenata na hemodijalizi, postoji slična klinička vrednost ispitivanih biomarkera za dijagnozu, određivanje nivoa metabolizma kostiju i predviđanje progresije bolesti (34, 37, 41, 76, 98, 294).

U ovom radu, ROC analiza je pokazala najveću površinu ispod krive kada su ispitivane vrednosti BALP kod CAPD pacijenata. Dobijena AUC za BALP u ovoj grupi bila je 0,588 (*Tabela LV, Slika 51*). Takođe, vrednosti BALP ispod „cut off“ od 25 IU/L, mogu sa 64,1% osetljivosti i 62,6% specifičnosti ukazati na usporen metabolizam kostiju kod CAPD pacijenata. Najveći broj literaturnih podataka ukazuje da BALP ima bolje performanse u odnosu na ALP za detekciju sniženja ili povećanja metabolizma kostiju, i to uglavnom kod pacijenata na hemodijalizi (28, 36, 39, 41). Međutim i za CAPD pacijente, u ovom radu su dobijene bolja osetljivost i specifičnost BALP u odnosu na vrednosti preporučenog biomarkera ALP (*Tabela LV, Slika 51*). Rezultati ovog istraživanja podržavaju postojeće literaturne podatke u konstataciji da postoji dobro slaganje BALP, TRAP i beta-CTx sa preporučenim biomarkerima, ali i da postoji bolja korelacija vrednosti ispitivanih biomarkera sa vrednostima iPTH u odnosu na ostale preporučene biomarkere (ALP, joni kalcijuma, neorganskog fosfata, magnezijuma, CaxP i 25D). Takođe, kod pacijenata kod kojih postoje niske vrednosti iPTH, niske vrednosti BALP, blago povišene TRAP i beta-CTx mogu da ukažu na smanjenje metabolizma kostiju. Vrednosti ispitivanih specifičnih biomarkera resorpcije i stvaranja kostiju mogu pomoći u proceni i praćenju nivoa metabolizma kostiju, kao i u proceni i praćenju eventualnih komplikacija, ali i korigovanju odgovarajuće terapije.

Na osnovu rezultata ovog ispitivanja može se zaključiti da ispitivani biomarkeri imaju uporedivu dijagnostičku tačnost kao i preporučeni biomarkeri za procenu nivoa metabolizma kostiju kod KSBB pacijenata. Ovi rezultati podržavaju postojeće literaturne podatke u konstataciji da biomarkeri metabolizma kostiju kao „biohemijska biopsija“, mogu biti adekvatna alternativa invazivnoj metodi biopsije kostiju kao „zlatnom standardu“.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu svega izloženog može se zaključiti sledeće:

1. Određivanje BALP, TRAP i beta-CTx, kao i preporučenih biomarkera za ispitivanje metabolizma kostiju kod KSBB pacijenata može se smatrati pouzdanim na osnovu dobijenih vrednosti koeficijenta varijacije za nepreciznost u seriji (Kv: 0,6–3,3%) i nepreciznosti iz dana u dan (Kv: 1,0–3,6%).
2. Referentni opseg za BALP, beta-CTx i magnezijum kod žena bile su: 38–69 IU/L, 0,40–2,85 ng/mL i 0,91–1,09 mmol/L, redom, a za muškarce: 37–63 IU/L, 0,50–1,98 ng/mL i 0,88–1,05 mmol/L, redom.
3. Kod zdrave populacije žene su imale statistički značajano više vrednosti BALP, beta-CTx i magnezijuma u odnosu na muškarce ($p < 0,05$).
4. Kod ispitivane zdrave populacije uticaj godina nije bio statistički značajan na vrednosti analiziranih biomarkera, izuzev za vrednosti BALP, koje su bile nešto niže kod osoba koje su imale preko 60 godina života, mada je dobijena granična značajnost ($p = 0,052$).
5. Dobijeni referentni intervali za ALP, jone kalcijuma, neorganskog fosfata, iPTH i 25D su se slagali sa intervalima koje preporučuju proizvođači testova sa kojima su biomarkeri određivani. Dobijene vrednosti za beta-CTx i jone magnezijuma su u slaganju sa literaturnim podacima, mada su za ova dva biomarkera još uvek u upotrebi jedinstvene referentne vrednosti.
6. Podaci dobijeni u ovom radu za 2,5 i 97,5 percentil za vrednosti BALP, TRAP i CaxP nisu u slaganju sa preporukama proizvođača, jer se za ova tri biomarkera u kliničkoj praksi koriste preporučene „cut off“ vrednosti.
7. Kod predijaliznih pacijenata nije postojala statistički značajna razlika u vrednostima ispitivanih biomarkera u odnosu na pol pacijenata, izuzev vrednosti iPTH koje su se značajno razlikovale između žena i muškaraca: 408,5 vs. 348,8 pg/mL, $p < 0,05$.
8. Kod HD pacijenata postojala je statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u vrednostima fosfora i iPTH u odnosu na pol pacijenata: kod žena su dobijene vrednosti 2,03 mmol/L i 88,6 pg/mL, a kod muškaraca 1,40 mmol/L i 136,7 pg/mL, redom. Na vrednosti ostalih ispitivanih biomarkera pol nije imao značajan uticaj.

9. Kod CAPD pacijenata, pol je imao značajan uticaj na vrednosti CaxP i iPTH ($p < 0,05$). Vrednosti CaxP i iPTH bile su redom kod žena i muškaraca: 3,73 i 3,37 mmol^2/L^2 , 167,2 i 174,5 pg/mL .
10. Kada je ispitivan uticaj starosti na vrednosti ispitivanih biomarkera kod KSBB pacijenata, dobijena je statistički značajna razlika između pacijenata mlađih i starijih od 60 godina života, jedino u vrednostima BALP. Vrednosti BALP predijaliznih, HD i CAPD pacijenata su bile za pacijente mlađe od 60 godina: 34 IU/L, 23 IU/L i 23 IU/L, a za pacijente starije od 60 godina: 32 IU/L, 20 IU/L i 19 IU/L, redom.
11. Dužina trajanja hemodijalize imala je značajan uticaj na vrednosti ALP i BALP; kod pacijenata koji su bili duže od 30 meseci na dijalizi vrednosti (medijane) ovih biomarkera su bile značajno niže ($p < 0,05$): 64 IU/L vs. 55 IU/L za ALP i 26 IU/L vs. 20 IU/L za BALP. Dužina trajanja kontinuirane ambulatorne peritonealne dijalize imala je uticaj samo na vrednosti magnezijuma ($p < 0,05$). Vrednosti magnezijuma kod pacijenata koji su bili na ovoj dijalizi ispod 30 meseci bila je 0,95 mmol/L , a vrednost kod pacijenata koji su bili preko 30 meseci na ovoj dijalizi bila je 0,88 mmol/L .
12. Ustanovljena je normalna raspodela vrednosti za svaki od analiziranih biomarkera kod predijaliznih pacijenata i pacijenata na dijalizi.
13. Vrednosti BALP su kod predijaliznih, HD i CAPD pacijenata bile značajno niže u odnosu na kontrolnu grupu (Me: 23 IU/L, 20 IU/L i 20 IU/L vs. 53 IU/L, $p < 0,001$). Vrednosti TRAP su kod predijaliznih, HD i CAPD pacijenata bile značajno više u odnosu na kontrolnu grupu (Me: 8 IU/L, 8 IU/L i 6 IU/L vs. 5 IU/L, $p < 0,05$). Vrednosti beta-CTx kod predijaliznih i CAPD pacijenata su bile značajno više u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,01$), sa medijanama od 3,85 ng/mL i 3,42 ng/mL u odnosu na 1,35 ng/mL , dok su vrednosti HD pacijenata bile više u odnosu na kontrolnu grupu, ali razlika nije bila statistički značajna (Me: 1,76 ng/mL , $p = 0,054$).
14. Vrednosti ALP su bile značajno niže kod HD i CAPD pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu (Me: 56 vs. 69 IU/L, $p < 0,001$ i Me: 57 vs. 69 IU/L, $p < 0,05$). Mada su vrednosti ALP predijaliznih pacijenata bile nešto niže u odnosu na

kontrolnu grupu, razlika je bila na granici statističke značajnosti (Me: 64 vs. 69 IU/L, $p = 0,058$).

15. Kada su analizirane vrednosti kalcijuma, dobijena je statistički značajna razlika između predijaliznih i CAPD pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu (Me: 2,12 mmol/L i 2,25 mmol/L vs. 2,53 mmol/L, $p < 0,01$). Takođe i vrednosti hemodijaliznih pacijenata su bile značajno niže u odnosu na kontrolnu grupu (Me: 2,39 mmol/L vs. 2,53 mmol/L, $p < 0,05$).
16. Vrednosti magnezijuma predijaliznih pacijenata bile su značajno niže u odnosu na kontrolnu grupu (0,84 mmol/L vs. 0,99 mmol/L, $p < 0,05$). Koncentracije magnezijuma HD i CAPD pacijenata nisu bile značajno različite u odnosu na kontrolnu grupu ($p = 0,232$ i $p = 0,057$).
17. Kada su analizirane vrednosti neorganskog fosfata, dobijene su značajno veće koncentracije predijaliznih i CAPD pacijenata ($p < 0,05$) kao i HD pacijenata ($p < 0,01$) u odnosu na kontrolnu grupu (1,55 mmol/L, 1,63 mmol/L i 1,52 mmol/L vs. 1,25 mmol/L, redom).
18. U ovom ispitivanju analizirane su vrednosti CaxP predijaliznih pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu, i nije dobijena značajna razlika (3,12 mmol²/L² vs. 2,89 mmol²/L², $p = 0,632$). Vrednosti kod dijaliziranih pacijenata su bile značajno više u odnosu na kontrolnu grupu: 3,90 mmol²/L², $p < 0,01$ za hemodijalizu i 3,40 mmol²/L², $p < 0,05$ za CAPD.
19. Vrednosti iPTH predijaliznih (343,9 pg/mL, $p < 0,01$), HD pacijenata (99,4 pg/mL, $p < 0,05$) i CAPD pacijenata (124,2 pg/mL, $p < 0,05$) su bile očekivano značajno veće u odnosu na kontrolnu grupu (Me: 38 pg/mL). Vrednosti 25D predijaliznih i HD pacijenata (30,0 nmol/L i 23,4 nmol/L) su bile značajno niže ($p < 0,01$) u odnosu na vrednost kontrolne grupe (73,5 nmol/L). Vrednosti CAPD pacijenata su se takođe razlikovale od kontrolne grupe (45,0 nmol/L vs. 73,5 nmol/L, $p < 0,05$).
20. Takođe, vrednosti BALP kod pacijenata na dijalizi, nezavisno od tipa dijalize su bile statistički značajno niže u odnosu na predijalizne pacijente ($p < 0,05$). Na vrednosti TRAP kod dijaliziranih pacijenata imao je uticaj tip dijalize; vrednosti CAPD pacijenata su bile značajno niže u odnosu na HD pacijente ($p < 0,01$). Vrednosti beta-CTx kod HD pacijenata bile su niže u odnosu na predijalizne pacijente ($p < 0,05$).

21. Vrednosti ALP kod HD pacijenata su bile značajno niže u odnosu na predijalizne pacijente ($p < 0,01$). Koncentracije kalcijuma HD pacijenata su bile značajno više u odnosu na predijalizne ($p < 0,05$).
22. Međutim, vrednosti magnezijuma HD pacijenata su bile značajno više u odnosu na predijaliznu grupu (1,01 mmol/L vs. 0,84 mmol/L, $p < 0,05$). Vrednosti neorganskog fosfata kod HD pacijenata su bile značajno više u odnosu na predijalizne pacijente ($p < 0,05$). Takođe, vrednosti CaxP kod HD pacijenata bile su značajno više od predijaliznih pacijenata ($p < 0,05$). Takođe, vrednosti iPTH dijaliziranih pacijenata su bile značajno manje ($p < 0,05$) u odnosu na predijalizne pacijente, nezavisno od tipa dijalize. Vrednosti 25D CAPD grupe bile značajno više od predijaliznih i HD pacijenata ($p < 0,05$).
23. Koeficijenti korelacije BALP sa ostalim biomarkerima kod predijaliznih pacijenata od -0,315 do 0,616, bili su statistički značajni ($p < 0,001$ sa ALP i $p < 0,05$ sa TRAP, beta-CTx i kalcijumom).
24. Koncentracije TRAP su bile u negativnoj korelaciji sa magnezijumom (-0,463, $p < 0,01$) i fosforom (-0,301, $p < 0,05$) kod predijaliznih pacijenata. Kod pacijenata na hemodijalizi, dobijena je statistički značajna ($p < 0,05$) pozitivna korelacija TRAP sa iPTH i 25D (0,368 i 0,278), a negativna korelacija ($p < 0,05$) sa beta-CTx i magnezijumom (-0,217 i -0,214). Kod CAPD pacijenata dobijena je značajna pozitivna korelacija ($p < 0,05$) sa fosforom, iPTH i 25D (0,221, 0,341 i 0,215), a negativna korelacija ($p < 0,05$) sa beta-CTx i magnezijumom (-0,211 i -0,312).
25. Kod predijaliznih pacijenata, beta-CTx je bio u pozitivnoj korelaciji sa kalcijumom (0,597, $p < 0,05$) i negativnoj korelaciji sa 25D (-0,411, $p < 0,05$). Kod HD pacijenata beta-CTx je imao značajnu pozitivnu korelaciju sa CaxP (0,217, $p < 0,05$) i sa iPTH (0,516, $p < 0,01$). Kod CAPD pacijenata, beta-CTx je bio u pozitivnoj korelaciji sa ALP i 25D (0,250 i 0,274).
26. U grupi predijaliznih pacijenata sa iPTH $< 150,0$ pg/mL, dobijene su značajno niže vrednosti BALP i neorganskog fosfata (25 IU/L i 1,37 mmol/L, $p < 0,05$) u odnosu na grupe sa iPTH od 150,0–300,0 pg/mL i iPTH $> 300,0$ pg/mL. Kod HD pacijenata jedino su vrednosti BALP bile značajno niže (16 IU/L, $p < 0,05$) u grupi iPTH $< 150,0$ pg/mL, dok se vrednosti ispitivanih biomarkera CAPD pacijenata nisu značajno razlikovale.

27. U grupi sa preporučenim vrednostima iPTH, kod predijaliznih pacijenata dobijene su niže vrednosti beta-CTx (3,00 ng/mL), dok su vrednosti 25D bile niže i kod predijaliznih i HD pacijenata (21,0 nmol/L i 28,3 nmol/L).
28. Kod pacijenata sa iPTH > 300,0 pg/mL, dobijene su značajno više vrednosti BALP i beta-CTx za HD pacijente (60 IU/L i 3,21 ng/mL, $p < 0,05$), međutim nije dobijena značajna razlika u vrednostima TRAP između ispitivanih grupa.
29. Kod predijaliznih pacijenata koji su imali nedostatak vitamina D, kod kojih su vrednosti 25D bile manje od 50 nmol/L, dobijene su značajno više vrednosti fosfora i iPTH (1,54 mmol/L vs. 1,40 mmol/L i 351,0 pg/mL vs. 213,0 pg/mL, $p < 0,05$), a niže vrednosti magnezijuma (0,82 mmol/L vs. 0,99 mmol/L, $p < 0,05$), u odnosu na pacijente sa dovoljnom količinom vitamina D.
30. Kod HD pacijenata koji su imali nedostatak vitamina D, kod kojih su vrednosti 25D bile manje od 50 nmol/L, dobijene su značajno više vrednosti jedino iPTH, u odnosu na pacijente sa dovoljnom količinom vitamina D (143,2 pg/mL vs. 122,5 pg/mL, $p < 0,05$).
31. Kod CAPD pacijenata koji su imali nedostatak vitamina D, kod kojih su vrednosti 25D bile manje od 50 nmol/L, dobijene su značajno niže vrednosti BALP (18 IU/L vs. 23 IU/L, $p < 0,05$), ALP (50 IU/L vs. 60 IU/L, $p < 0,05$) i CaxP (3,17 mmol²/L² vs. 3,60 mmol²/L², $p < 0,05$) u odnosu na pacijente sa dovoljnom količinom vitamina D.
32. Da bi se procenila dijagnostička tačnost specifičnih ispitivanih i preporučenih biomarkera za detekciju smanjenog nivoa metabolizma kostiju urađena je ROC analiza. Kada su analizirani biomarkeri sve tri grupe KSBB pacijenata zajedno najveća dijagnostička vrednost dobijena je za kalcijum. Površina ispod ROC krive bila je 0,701 i značajno se razlikovala od AUC za druge koštane biomarkere. Dobijena osetljivost i specifičnost (67,9% i 73,8%) za optimalnu „cut-off“ vrednost za kalcijum (2,34 mmol/L) je bila značajno viša u odnosu na druge analizirane biomarkere ($p = 0,0001$).
33. U ovom ispitivanju u grupi predijaliznih pacijenata, najveća osetljivost (84,4%) je dobijena za detekciju smanjenog metabolizma kostiju za vrednost BALP od 27 IU/L, sa najvećom AUC od 0,688.

34. Kod pacijenata koji su bili na terapiji hemodijalizom najveća dijagnostička vrednost u proceni smanjenog metabolizma kostiju dobijena je za kalcijum. Površina ispod ROC krive bila je 0,651 i značajno se razlikovala od AUC za druge koštane biomarkere. Dobijena osetljivost i specifičnost (69,2% i 73,4%) za optimalnu „cut-off“ vrednost za kalcijum (2,33 mmol/L) je bila značajno viša u odnosu na druge analizirane biomarkere ($p = 0,007$).
35. Kod pacijenata koji su bili na terapiji kontinuiranom ambulatornom peritonealnom dijalizom najveća dijagnostička vrednost u proceni smanjenog metabolizma kostiju dobijena je za BALP (AUC = 0,588), mada je značajnost razlike sa drugim analiziranim biomarkerima bila granična ($p = 0,053$).

7. SUMARNI ZAKLJUČCI

Na osnovu svega izloženog može se zaključiti sledeće:

1. Određivanje BALP, TRAP i beta-CTx, kao i preporučenih biomarkera za ispitivanje metabolizma kostiju kod KSBB pacijenata može se smatrati pouzdanim na osnovu dobijenih vrednosti koeficijenta varijacije za nepreciznost u seriji (Kv: 0,6–3,3%) i nepreciznosti iz dana u dan (Kv: 1,0–3,6%).
2. Dobijeni referentni intervali u ovom ispitivanju za ALP, jone kalcijuma, neorganskog fosfata, iPTH i 25D su se slagali sa intervalima koje preporučuju proizvođači testova sa kojima su biomarkeri određivani i nije uočen uticaj pola i starosti na analizirane vrednosti u kontrolnoj grupi. Međutim, dobijeni referentni intervali za beta-CTx i jone magnezijuma su bili različiti u odnosu na pol zdrave populacije, što je u slaganju sa literaturnim podacima, mada su još uvek u upotrebi jedinstvene referentne vrednosti. Takođe, podaci dobijeni za 2,5 i 97,5 percentil za vrednosti BALP, TRAP i CaxP se ne slažu sa preporukama proizvođača, jer se za ova tri biomarkera u kliničkoj praksi koriste preporučene „cut off“ vrednosti.
3. Ustanovljena je normalna raspodela vrednosti za svaki od analiziranih biomarkera kod predijaliznih, HD i CAPD pacijenata. Kod sve tri ispitivane grupe pacijenata uočen je uticaj pola na vrednosti iPTH, kao i na vrednosti neorganskog fosfata kod HD pacijenata i na vrednosti CaxP kod CAPD pacijenata. Međutim, uticaj starosti je kod sve tri grupe pacijenata uočen jedino na vrednosti BALP. Takođe, dužina trajanja HD imala je uticaj na vrednosti ALP i BALP, a CAPD samo na vrednosti jona magnezijuma.
4. Kod predijaliznih i pacijenata na dijalizi vrednosti BALP su bile značajno niže ($p < 0,001$), a vrednosti TRAP i beta-CTx su bile značajno više ($p < 0,05$ i $p < 0,01$) u odnosu na kontrolnu grupu. Efekat dijalize nezavisno od tipa potvrđen je nižim vrednostima BALP kod dijaliznih u odnosu na predijalizne pacijente. Međutim, u ovom ispitivanju dobijene su značajno niže vrednosti beta-CTx kod HD pacijenata u odnosu na predijalizne pacijente ($p < 0,05$). Dobijena je dobra korelacija BALP, TRAP i beta-CTx sa preporučenim biomarkerima metabolizma kostiju u sve tri analizirane grupe pacijenata, sa koeficijentima korelacije od $-0,493$ do $0,616$.

5. Najznačajnija promena u odnosu na tri nivoa iPTH (< 150 pg/mL, 150–300 pg/mL i > 300 pg/mL) uočena je u vrednostima BALP kod sve tri ispitivane grupe KSBB pacijenata, tj. jedino su se vrednosti BALP menjale paralelno sa promenom vrednosti iPTH kod sve tri grupe KSBB pacijenata. Najveća razlika u odnosu na nedovoljne i dovoljne količine 25D (< 50 nmol/L i > 50 nmol/L) dobijena je u vrednostima BALP kod CAPD pacijenata. Uticaj terapije vitaminom D i njegovim analogima je bio zanemarljiv na specifične biomarkere metabolizma kostiju kod predijaliznih i HD pacijenata. Mada su vrednosti CaxP bile značajno više kod HD i CAPD pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu, vrednosti su bile ispod graničnih za ektopičnu kalcifikaciju ($4,6 \text{ mmol}^2/\text{L}^2$) i nisu se značajno razlikovale u odnosu na ispitivane nivoe iPTH i u odnosu na nedovoljne i dovoljne količine 25D.
6. Najveća dijagnostička vrednost za sve tri grupe KSBB pacijenata zajedno, kao i posebno za HD pacijente dobijena je za kalcijum. Površine ispod krivih (AUC) su se statistički značajno razlikovale u odnosu na druge analizirane biomarkere (0,701, $p = 0,0001$ i 0,651, $p = 0,007$, redom). Međutim, u grupi predijaliznih i CAPD pacijenata najveća dijagnostička vrednost dobijena je za BALP (AUC = 0,688 i AUC = 0,588), mada je značajnost razlike sa drugim analiziranim biomarkerima bila granična ($p = 0,058$ i $p = 0,053$).

Na osnovu rezultata ovog ispitivanja može se zaključiti da ispitivani biomarkeri imaju uporedivu dijagnostičku tačnost kao i preporučeni biomarkeri za procenu nivoa metabolizma kostiju kod KSBB pacijenata. Ovi rezultati podržavaju dosadašnje literaturne podatke u konstataciji da biomarkeri metabolizma kostiju kao „biohemijska biopsija“, mogu biti adekvatna alternativa invazivnoj metodi biopsije kostiju kao „zlatnom standardu“.

8. LITERATURA

1. Malluche HH, Mawad HW, Monier-Faugere MC. Renal osteodystrophy in the first decade of the new millennium: analysis of 630 bone biopsies in black and white patients. *J Bone Miner Res* 2011;26:1368–76.
2. Ott SM. Histomorphometric analysis of bone remodeling. in: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. *Principles of bone biology*. Academic Press, San Diego, CA. 2002:303–20.
3. Lehmann G, Ott U, Kaemmerer D, Schuetze J, Wolf G. Bone histomorphometry and biochemical markers of bone turnover in patients with chronic kidney disease Stages 3 - 5. *Clin Nephrol* 2008;70:296–305.
4. Moore C, Yee J, Malluche H, Rao DS, Monier-Faugere MC, Adams E, Daramola-Ogunwuyi O, Fehmi H, Bhat S, Osman-Malik Y. Relationship between bone histology and markers of bone and mineral metabolism in african-american hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4:1484–93.
5. Seibel MJ. Biochemical markers of bone turnover part I : biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev* 2005;26:97–122.
6. Lian JB and Stein GS. The cells of bone. In: *Dynamics of bone and cartilage metabolism*. Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP (eds), Academic Press, San Diego; 1999, 165–86.
7. Stadtman TC. Alkaline phosphatases. In: Boyer PD, Lardy H and Myrbäck K ed. *The Enzymes*, 2nd ed. vol. 5, Academic Press, New York, 1961, 55–71.
8. Eunice E. Kim, Harold W. Wyckoff. Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures: Two-metal ion catalysis. *J Molecul Biology* 1991;218:449–64.
9. Beckman G, Beckman L, Sikstrom C, Millint JL. DNA polymorphism of alkaline phosphatase isozyme genes: linkage disequilibria between placental and germ-cell alkaline phosphatase alleles. *Am J Hum Genet* 1992;51:1066–70.

10. Mornet E, Stura E, Lia-Baldini AS, Stigbrand T, Ménez A, Le Du MH. Structural evidence for a functional role of human tissue nonspecific alkaline phosphatase in bone mineralization. *J Biol Chem* 2001;276:31171–8.
11. Mornet E. Hypophosphatasia: the mutations in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene. *Hum Mutat* 2000;15:309–15.
12. Schreiber W, Lynda W. Alkaline Phosphatase Isoenzymes resolved by electrophoresis on lectin-containing agarose gel. *Clin Chem* 1986;32:1570–3.
13. Moss DW. Alkaline phosphatase isoenzymes. *Clin Chem* 1982;28:2007–16.
14. Majkić-Singh N. *Klinička enzimologija*, Drugo izdanje, DMBS, Beograd, 2012.
15. Kay HD. Phosphatase in growth and disease of bone. *Physiol Rev* 1932;12:384-422.
16. Ellis E, Boesze-Battaglia G, Boesze-Battaglia K. The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Current Opinion in Orthopaedics* 2007;18:444–8.
17. Weiss MJ, Cole DEC, Ray K, Whyte MP, Lafferty MA, Mulivor RA, Harris HA. Missense mutation in the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene causing a lethal form of hypophosphatasia. *Proc Nat Acad Sci* 1988;85:7666–9.
18. Weiss MJ, Ray K, Henthorn PS, Lamb B, Kadesch T, Harris H. Structure of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene. *J Biol Chem* 1988;263:12002–10.
19. Peter H. Clinical and technical review. Bone alkaline phosphatase (BAP)-a biochemical marker of bone turnover. 2011 Teco medical group.
20. Holtz KM, Kantrowitz ER. The mechanism of the alkaline phosphatase reaction: insights from NMR, crystallography and site-specific mutagenesis. *FEBS Lett* 1999;462:7–11.
21. Whyte MP. Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocr Rev* 1994;15:439–61.
22. Fraser D. Hypophosphatasia. *Am J Med* 1957;22:730–46.

23. Zurutuza L, Muller F, Gibrat JF, Simon-Bouy B, Serre JL, Mornet E. Correlations of genotype and phenotype in hypophosphatasia. *Hum Mol Genet* 1999;8(6):1039–46.
24. Magnusson P, Larsson L, Magnusson M, Davie M, Sharp CA. Isoforms of bone alkaline phosphatase: characterization and origin in human trabecular and cortical bone. *J Bone Miner Res* 1999;14:1926–33.
25. Haarhaus M, Fernstrom A, Magnusson M, Magnusson P. Clinical significance of bone alkaline phosphatase isoforms, including the novel B1x isoform, in mild to moderate chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:3382–9.
26. Magnusson P, Sharp CA, Farley JR. Different distributions of human bone alkaline phosphatase isoforms in serum and bone tissue extracts. *Clin Chim Acta* 2002;325:59–70.
27. Reddy ST, Wang CY, Sakhaee K, Brinkley L, Pak CYC. Effect of low-carbohydrate high-protein diets on acid-base balance, stone-forming propensity, and calcium metabolism. *Am J Kid Dis* 2002;40:265–74.
28. Magnusson P, Sharp CA, Magnusson M et al. Effect of chronic renal failure on bone turnover and bone alkaline phosphatase isoforms. *Kidney Int* 2001;60:257–65.
29. Ross PD, Knowlton W. Rapid bone loss is associated with increased levels of biochemical markers. *J Bone Miner Res* 1998;13:297–302.
30. Caulfield MP, Reitz RE. Biochemical markers of bone turnover and their utility in osteoporosis. *MLO-online* April 2004.
31. Pedrazzoni M, Alfano FS, Girasole G, et al. Clinical observations with a new specific assay for bone alkaline phosphatase: A cross-sectional study in osteoporotic and pagetic subjects and longitudinal evaluation of the response to ovariectomy, estrogens, and bisphosphonates. *Calcif Tissue Int* 1996;59:334–8.
32. Bettica P, Bevilacqua M, Vago T, et al. Short-term variations in bone remodeling biochemical markers: cyclical etidronate and alendronate effects compared. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3034–9.

33. Cooper EH et al. Bone Alkaline phosphatase and prostate specific antigen in the monitoring of prostate cancer. *The Prostate* 1994;25:236–42.
34. Urena P, De Vernejoul MC. Circulating biochemical markers of bone remodeling in uremic patients. *Kidney Int* 1999;55:2141–56.
35. Iimori S, Mori Y, Akita W, Kuyama T, Takada S, Asai T, Kuwahara M, Sasaki S, Tsukamoto Y. Diagnostic usefulness of bone mineral density and biochemical markers of bone turnover in predicting fracture in CKD stage 5D patients—a single-center cohort study. *Nephrol Dial Transplant* 2012;27:345–51.
36. Rauch F, Middelmann B, Cagnoli M, Keller KM, Schonau E. Comparison of total alkaline phosphatase and three assays for bone-specific alkaline phosphatase in childhood and adolescence. *Acta Paediatr* 1997;86:583–7.
37. Delanaye P, Souberbielle JC, Lafage-Proust MH, Jean G, Cavalier E. Can we use circulating biomarkers to monitor bone turnover in CKD haemodialysis patients? Hypotheses and facts. *Nephrol Dial Transplant* 2013;0:1–9. [Epub ahead of print]
38. Brandenburg VM, Floege J. Adynamic bone disease—bone and beyond. *NDT Plus* 2008;3:135–147.
39. Couttenye MM, D'Haese PC, Van Hoof VO, Lemoniatou E, Goodman W, Verpooten GA, De Broe ME. Low serum levels of alkaline phosphatase of bone origin: a good marker of adynamic bone disease in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:1065–72.
40. Loke SC, Wai Kit Tan A, Dalan R, Khee-Shing Leow M. Pre-operative serum alkaline phosphatase as a predictor for hypocalcemia post-parathyroid adenectomy. *Int J Med Sci* 2012;9:611–6.
41. Urena P, Hruby M, Ferreira MA, Ang KS, de Vernejoul MC. Plasma total *versus* bone alkaline phosphatase as markers of bone turnover in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 1996;7:500–12.
42. Block GA, Martin KJ, de Francisco ALM, Turner SA, Avram MM, Suranyi MG, Hercz G, Cunningham J, Abu-Alfa AK, Messa P, Coyne DW, Locatelli F, Cohen RM, Evenepoel P, Moe SM, Fournier A, Braun J, McCary LC, Zani VJ, Olson KA, Drueke TB, Goodman WG. Cinacalcet for secondary

- hyperparathyroidism in patients receiving hemodialysis. *N Engl J Med* 2004;350:1516–25.
43. Gomez BJ, Ardakani S, Ju J, Jenkins D, Cerelli MJ, Daniloff GY, Kung VT. Monoclonal antibody assay for measuring bone-specific alkaline phosphatase activity in serum. *Clin Chem* 1995;41:1560–6.
 44. Kim SJ, Shin YW, Yang KH, Kim SB, Yoo MJ, Han SK, Im SA, Won YD, Sung YB, Jeon TS, Chang CH, Jang JD, Lee SB, Kim HY, Lee SY. A multi-center, randomized, clinical study to compare the effect and safety of autologous cultured osteoblast(Ossron™) injection to treat fractures. *BMC Musculoskeletal Disorders* Open Access, 2009 (<http://www.biomedcentral.com/1471-2474/10/20>).
 45. Woitge HW, Seibel MJ and Ziegler R. Comparison of total and bone-specific alkaline phosphatase in patients with nonskeletal disorder or metabolic bone diseases. *Clinical Chemistry* 1996;42:1796–1804.
 46. Haima P. Clinical and technical review: bone alkaline phosphatase (BAP)-a biochemical marker of bone turnover. 2011 Tecomedical Group.
 47. Urena P, Bernard-Poenaru O, Ostertag A, Baudoin C, Cohen-Solal M, Cantor T, de Vernejoul MC. Bone mineral density, biochemical markers and skeletal fractures in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:2325–31.
 48. Negri A, Alvarez-Quiroga M, Bravo M et al. Bone mineral density (BMD), biochemical markers and fractures in peritoneal dialysis. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:746A.
 49. Rix M, Andreassen H, Eskildsen P, Langdahl B, Olgaard K. Bone mineral density and biochemical markers of bone turnover in patients with predialysis chronic renal failure. *Kidney Int* 1999;56:1084–93.
 50. Bull H, Murray PG, Thomas D, Fraser AM, Nelson PN. Acid phosphatases. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2002;55:65–72.
 51. Pohlmann R, Krentler C, Schmidt B. Human lysosomal acid phosphatase: cloning, expression and chromosomal assignment. *EMBO Journal* 1998;7:2343–50.

52. Waymack PP, Van Etenl RL. Isolation and characterization of a homogeneous isoenzyme of wheat germ acid phosphatase. *Arch Biochem Biophys* 1991;288:621–33.
53. Lam WK, Eastlund DT, Li CY, Yam LT. Biochemical properties of tartrate-resistant acid phosphatase in serum of adults and children. *Clin Chem* 1978;24:1105–108.
54. Alison R, Hayman S, Cox TM, Purple acid phosphatase of the human macrophage and osteoclast. *J Biol Chem* 1994;269:1294–300.
55. Sharief FS, Lee H, Lauderman MM, et al. Human prostatic acid phosphatase: cDNA cloning gene mapping and protein sequence homology with lysosomal acid phosphatase. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;160:79–86.
56. Bottini E, Gloria-Bottinin F, Borgiani P, et al. ACP1 and human adaptability. Association with common diseases: a case-control study. *Hum Genet* 1995;96:629–37.
57. Yam LT. Clinical significance of human acid phosphatases. *Am J Med* 1974;56:604–16.
58. Yamada S, Inaba M, Kurajoh M, Shidara K, Imanishi Y, Ishimura E, Nishizawa Y. Utility of serum tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP5b) as a bone resorption marker in patients with chronic kidney disease: independence from renal dysfunction. *Clin Endocrinol* 2008;69:189–96.
59. Halleen JM, Alatalo SL, Suominen H, et al. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption. *J Bone Miner Res* 2000;15:1337–45.
60. Haima P. Clinical and technical review (TRAP5b); Tartrate-resistant acid phosphatase active isoform 5b-a biomarker for osteoclastic bone-resorption activity. 2009 Tecomedical Group.
61. Minkin C. Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int* 1982;34:285–90.
62. Kaye M. When is it an osteoclast? *J Clin Pathol* 1984;37:398–400.
63. Zaidi M, Moonga B, Moss DW, et al. Inhibition of osteoclastic acid phosphatase abolishes bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;159:68–71.

64. Ljusberg J, Ek-Rylander B, Andersson G. Tartrate-resistant purple acid phosphatase is synthesised as a latent proenzyme and activated by cysteine proteinases. *Biochem J* 1999;343:63–9.
65. Halleen JM, Saisanen S, Salo J, et al. Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. *J Biol Chem* 1999;274:22907–10.
66. Reinholt FP, Mengarelli-Widholm S, Ek-Rylander B, et al. Ultrastructural localisation of tartrate-resistant acid ATPase in bone. *J Bone Miner Res* 1990;5:1055–61.
67. Fukushima O, Bekker PJ, Gay CV. Ultrastructural localisation of tartrate-resistant acid phosphatase (purple acid phosphatase) activity in chicken cartilage and bone. *Am J Anat* 1991;191:228–36.
68. Halleen JM, Jaija H, Stepan JJ, et al. Studies on the protein tyrosine phosphatase activity of tartrate-resistant acid phosphatase. *Arch Biochem Biophys* 1998;352:97–102.
69. Brehme CS, Roman S, Shaffer J, et al. Tartrate-resistant acid phosphatase forms complexes with α -macroglobulin in serum. *J Bone Miner Res* 1999;14:311–18.
70. Henle ES, Luo Y, Lin S. Fe^{2+} , Fe^{3+} and oxygen react with DNA-derived radicals formed during iron-mediated Fenton reaction. *Biochem* 1996;35:12212–19.
71. Hartman GD, Duggan ME. Alpha (v)beta(3) integrin antagonists as inhibitors of bone resorption. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 2000;9:1281–91.
72. Duursma SA, Raymakers JA. Fluoride treatment: a good choice in osteoporosis. *Ned Tijdschr Geneesk* 1998;142:1902–3.
73. Nelson PN, Chambers T. Generation and characterisation of putative monoclonal and polyclonal antibodies against tartrate-resistant acid phosphatase. *Hybridoma* 1995;14:91–4.
74. Nelson PN, Reynolds GM, Waldron EE, et al. Monoclonal antibodies. *J Clin Pathol Mol Pathol* 2000;53:111–17.
75. Scarnecchia L, Minisola S, Pacitti MT, Carnevale V, Romagnoli E, Rosso R, Mazzuoli GF. Clinical usefulness of serum tartrate-resistant acid phosphatase

- activity determination to evaluate bone turnover. *Scand J Clin Lab Invest* 1991;51:517–24.
76. Shidara K, Inaba M, Okuno S, Yamada S, Kumeda Y, Imanishi Y, Yamakawa T, Ishimura E, Nishizawa Y. Serum levels of TRAP5b, a new bone resorption marker unaffected by renal dysfunction, as a useful marker of cortical bone loss in hemodialysis patients. *Calcif Tissue Int* 2008;82:278–87.
 77. Gumus B, Lekili M, Uyanik BS et al. Serum levels of total acid phosphatase, prostatic acid phosphatase, total and free prostatic-specific antigen in patient within chronic hemodialysis program. *Brasilian Journal of Urology* 2001;27:133–5.
 78. Coen G, Ballanti P, Bonucci E, Calabria S, Centorrino M, Fassino V, Manni M, Mantella D, Mazzaferro S, Napoletano I, Sardella D, Taggi F. Bone markers in the diagnosis of low turnover osteodystrophy in hemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:2294–302.
 79. Majkić-Singh N. Biohemijski pokazatelji oboljenja kostiju. *Medicinska Biohemija, Drugo izdanje, DMBS, SPRINT Beograd*; 2006:545–61.
 80. Terreni A, Pezzati P. Biochemical markers in the follow-up of the osteoporotic patients. *Clin Cas Miner Bone Metab* 2012;9:80–4.
 81. Theis M. Bone markers – their nature and clinical use. *J Med Biochem* 2008;27:117–22.
 82. Traba ML, Calero JA, Méndez-Dávila C, et al. Different behaviors of serum and urinary CrossLaps ELISA in the assessment of bone resorption in healthy girls. *Clin Chem* 1999;45:682–3.
 83. Ivaska KK, Lenora J, Gerdhem P, et al. Serial assessment of serum bone metabolism markers identifies women with the highest rate of bone loss and osteoporosis risk. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:2622–32.
 84. Risteli J, Risteli L. Products of bone collagen metabolism. In: Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP, eds. *Dynamics of bone and cartilage metabolism*. 2nd edition, San Diego, USA: Academic press; 1999:275–87.
 85. Qvist P, Christgau S, Pedersen BJ, et al. Circadian variation in the serum concentration of C-terminal telopeptide of type I collagen (serum CTx): effects

- of gender, age, menopausal status, posture, daylight, serum cortisol, and fasting. *Bone* 2002;31:57–61.
86. Reichel H, Roth HJ, Schmidt-Gayk H. Evaluation of serum β -carboxy-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen as marker of bone resorption in chronic hemodialysis patients. *Nephron Clin Pract* 2004;98:112–3.
 87. Christgau S, Bitsch-Jensen O, Hanover Bjarnason N, et al. Serum CrossLaps for monitoring the response in individuals undergoing antiresorptive therapy. *Bone* 2000;26:505–11.
 88. Fleisher EK, Welch G, Kottal S, Craig RG, Saxena D, Glickman RS. Predicting risk for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: CTX versus radiographic markers. *Oral Maxillo Radiol* 2010;110:509–16.
 89. Martin KJ, Gonzalez EA. Metabolic bone disease in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:875–85.
 90. Hassager C, Jensen LT, Podenphant J, Thomsen K, Christiansen C. The carboxy-terminal pyridinoline cross-linked telopeptide of type I collagen in serum as a marker of bone resorption: The effect of nandrolone decanoate and hormone replacement therapy. *Calcif Tissue Int* 1994;54:30–33.
 91. Bonde M, Garnero P, Fledelius C, Quist P, Delmas PD, Christiansen C. Measurement of bone degradation products in serum using antibodies reactive with an isomerized form of an 8 amino acid sequence of the C-telopeptide of type I collagen. *J Bone Miner Res* 1997;12:1028–34.
 92. Bonde M, Qvist P, Fledelius C, Riis BJ, Christiansen C. Immunoassay for quantifying type I collagen degradation products in urine evaluated. *Clin Chem* 1994;40:2022–5.
 93. Chubb P. Measurement of C-terminal telopeptide of type I collagen (CTX) in serum. *Clin Biochem* 2012;45:928–35.
 94. Glover SJ, Gall M, Schoenborn-Kellenberger O, Wagener M, Garnero P, Boonen S, Cauley JA, Black DM, Delmas PD, Eastell R. Establishing a reference interval for bone turnover markers in 637 healthy, young, premenopausal women from the United Kingdom, France, Belgium, and the United States. *JBMR* 2009;24:389–97.

95. Oliveri B, Wittich AC, Nadal MA, Zeni SN. Serum beta-type I collagen carboxyterminal telopeptide (beta-CTXs) and bone involvement in chronic renal failure. *Med (B Aires)* 2005;65:321–8.
96. Alvarez L, Torregrosa JV, Peris P, Monegal A, Bedini JL, Martinez De Osaba MJ, Filella X, Martin G, Ricos C, Oppenheimer F, Ballesta AM. Effect of hemodialysis and renal failure on serum biochemical markers of bone turnover. *J Bone Miner Metab* 2004;22:254–9.
97. Čepelak I, Čvorišćec D. Biochemical markers of bone remodeling – review. *Biochemia Medica* 2009;19:17–35.
98. Okuno S, Inaba M, Kitatani K, Ishimura E, Yamakawa T, Nishizawa Y. Serum levels of C-terminal telopeptide of type I collagen: a useful new marker of cortical bone loss in hemodialysis patients. *Osteoporos Int* 2005;16:501–9.
99. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for the Diagnosis, Evaluation, Prevention, and Treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl* 2009;76:S1–S130.
100. Bilezikian JP. Calcium and bone metabolism. In: Becker KL, ed. *Principles and practice of endocrinology and metabolism*. Philadelphia: JB Lippincott, 1990:398–569.
101. Baldwin TE, Chernow B. Hypocalcemia in the ICU: coping with the causes and consequences. *J Crit Illness* 1987;2:9–16.
102. Ferment O, Garnier PE, Touitou Y. Comparison of the feedback effect of magnesium and calcium on parathyroid hormone secretion in man. *J Endocrinol* 1987;113:117–22.
103. Gough IR, Balderson GA, Lloyd HM, et al., The effect of intravenous magnesium sulphate on parathyroid function in primary hyperparathyroidism, *World J Surg* 1988;12:463–9.
104. Ashby JP, Wright DJ, Rinsler MG. The adjusted serum calcium concept: a reappraisal. *Ann Clin Biochem* 1986;23:533–7.
105. Bringhurst FR. Calcium and phosphate distribution, turnover and metabolic actions. In DeGroot LJ, ed. *Endocrinology*, 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1995;2:1015–43.

106. Bilezikian JP, Potts JT Jr, Fuleihan Gel-H, Kleerekoper M, Neer R, Peacock M, et al. Summary statement from a workshop on asymptomatic primary hyperparathyroidism: a prospective for the 21st century. *J Bone Miner Res* 2002;17 Suppl 2:N2–11.
107. Blind E. Humoral hypercalcemia of malignancy: role of parathyroid hormone-related protein. *Recent Results Cancer Res* 1994;137:20–43.
108. Klein R. Hypercalcemia. In: Loriaux L ed. *Endocrine Emergencies, Contemporary Endocrinology*. Philadelphia: WB Saunders, 2014;74:161–74.
109. Fontan D, Liz G. Non-parathyroid hypercalcemia. In: Bandeira F, Gharib H, Golbert A, Griz L, Faria M ed. *Endocrinology and Diabetes*, Springer Science, Business Media New York. 2014;253–64.
110. Reagan P, Pani A, Rosner MH. Approach to diagnosis and treatment of hypercalcemia in a patient with malignancy. *Am J Kid Dis* 2014;63:141–7.
111. Doyle MA, Malcolm JC. An unusual case of malignancy-related hypercalcemia. *Int J Gen Med* 2014;7:21–7.
112. Bandeira F, Amaral L, Aragao P. Primary hyperparathyroidism. In: Bandeira F, Gharib H, Golbert A, Griz L, Faria M ed. *Endocrinology and Diabetes*, Springer Science, Business Media New York. 2014;279–91.
113. Toffaletti JG. Ionized Calcium. In *clinical chemistry: theory, analysis, correlation*, 2010, 5th ed. Kaplan LA, Pesce AJ. Mosby Elsevier, St. Louis, Mo.
114. Calvi LM, Bushinsky LA. When is it appropriate to order an ionized calcium? *J Am Soc Nephrol* 2008;19:1257–60.
115. Goldenstein DA. Serum calcium. In Walker Hk, Hall WD, Hurst JW ed. *Clinical methods: the history, physical and laboratory examinations*. 3rd edition. Boston, Butterworths 1990:677–9.
116. Clase CM, Norman GL, Beecroft LM, Churchil DN. Albumin–corrected calcium and ionized calcium in stable haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:1841–6.
117. Burritt MF, Pierides AM, Offord KP: Comparative studies of total and ionized serum calcium values in normal subjects and patients with renal disorders. *Mayo Clin Proc* 1980;55:606–13.

118. www.globalrph.com
119. Palmer SC, Hayen A, Macaskill P et al. Serum levels of phosphorus, parathyroid hormone, and calcium and risks of death and cardiovascular disease in individuals with chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2011;305:1119–27.
120. Bro S, Brandi L, Olgaard K. High-normal calcium (1.35 mmol/l) dialysate in patients on CAPD: efficient and safe long-term control of plasma calcium, phosphate, and parathyroid hormone. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:1586–91.
121. Bansal VK. Serum inorganic phosphorus. In: Walker HK, Hall WD, Hurst JW. *Clinical methods: the history, physical and laboratory examinations*. 3rd ed. Boston: Butterworths; 1990;198:895–9.
122. Brunelli SM, Goldfarb S. Hypophosphatemia: clinical consequences and management. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:1999–2003.
123. Moe SM. Disorders involving calcium, phosphorus and magnesium. *Prim Care*. 2008;35:215–34.
124. Prie D, Torres PU, Friedlander G. Latest findings in phosphate homeostasis. *Kid Internat*. 2009;75:882–9.
125. Isakova T, Gutiérrez OM, Chang Y et al. Phosphorus binders and survival on hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:388–96.
126. Kalantar-Zadeh K, Gutekunst L, Mehrotra R et al. Understanding sources of dietary phosphorus in the treatment of patients with chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5:519–30.
127. Munoz MA, Balon M, Fernandez C. Direct determination of inorganic phosphorus in serum with a single reagent. *Clin Chem* 1983;372–4.
128. Schultz DW, Passonneau JV, Lowry OH. An enzymatic method for the measurement of inorganic phosphate. *Anal Biochem* 1967;19:300–14.
129. Berti G, Fossati P, Tarengi G, Musitelli C, Melzi d'Eril GV. Enzymatic colorimetric method for the determination of inorganic phosphorus in serum and urine. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988;26:399–404.
130. Lertdumrongluk P, Rhee CM, Park J, Lau WL, Moradi H, Jing J, Molnar MZ, Brunelli SM, Nissenson AR, Kovesdy CP, Kalantar-Zadeh K. Association of

- serum phosphorus concentration with mortality in elderly and nonelderly hemodialysis patients. *Journal of Renal Nutrition* 2013;23:411–21.
131. Natoli JL, Boer R, Nathanson BH, Miller RM, Chiroli S, Goodman WG, Belozeroff V. Is there an association between elevated or low serum levels of phosphorus, parathyroid hormone, and calcium and mortality in patients with end stage renal disease? A meta-analysis. *BMC Nephrology* 2013;14:88–104.
 132. Binger C. Toxicity of phosphates in relation to blood calcium and tetany. *J Pharmacol exp Ther* 1917;10:105–20.
 133. Shear MJ, Kramer B. Composition of the bone: III. Physicochemical mechanism. *J Biol Chem* 1928;79:125–45.
 134. McLean FC, Hinrichs MA. The formation and behavior of colloidal calcium phosphate in the blood. *Amer J Physiol* 1938;121:580–88.
 135. Gersh I. Histochemical studies on the fate of colloidal calcium phosphate in the rat. *Anat Rec* 1937;70:331–49.
 136. Logan, M. A. Recent advances in the chemistry of calcification. *Physiol Rev* 1940;20:522–60.
 137. Hiatt HH, Thompson DD. Some effects of intravenously administered calcium on inorganic phosphate metabolism. *J Clin Invest* 1957;36:573–80.
 138. Eanes ED, Meyer JL. The maturation of crystalline calcium phosphates in aqueous suspension at physiologic pH. *Calcif Tissue Res* 1977;23:259–69.
 139. Thompson DD, Hiatt HH. Renal reabsorption of phosphate in normal human subjects and in patients with parathyroid disease. *J Clin Invest* 1957;36:550–6.
 140. Hebert LA, Lemann J, Petersen JR, Lennon EJ. Studies of the mechanism by which phosphate infusion lowers serum calcium concentration. *J Clin Invest* 1966;45:1886–93.
 141. Ellsworth R. Studies on the physiology of the parathyroid glands: V. Action of parathyroid extract on the renal threshold for phosphorus. *J Clin Invest* 1932;11:1011–17.
 142. Block GA, Hulbert-Shearon TE, Levin NW, Port FK. Association of serum phosphorus and calcium \times phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients. A national study. *Am J Kidney Dis* 1998;31:607–17.

143. Kimura K, Saika Y, Otani H, Fujii R, Mune M, Yukawa S. Factors associated with calcification of the abdominal aorta in hemodialysis patients. *Kidney Int Suppl* 1999;71:S238–41.
144. Maher ER, Young G, Smyth-Walsh B, Pugh S, Curtis JR. Aortic and mitral valve calcification in patients with end-stage renal disease. *Lancet* 1987;2:875–7.
145. Fernandez-Reyes MJ, Auxiliadora Bajo M, Robles P, Selgas R, Oliver J, Del Peso G, Garcia G, Jimenez C, Garcia-Gallego F. Mitral annular calcification in CAPD patients with a low degree of hyperparathyroidism. An analysis of other possible risk factors. *Nephrol Dial Transplant* 1995;10:2090–5.
146. Valentzas C, Meindok H, Oreopoulos DG, Meema HK, Rabinovich S, Jones M, Sutton D, Rapaport A, deVeber GA. Visceral calcification and Ca-P product. *Adv Exp Med Biol* 1978;103:187–93.
147. Ribeiro S, Ramos A, Brandao A, Rebelo JR, Guerra A, Resina C, Vila-Lobos A, Carvalho F, Remedio F, Ribeiro F: Cardiac valve calcification in haemodialysis patients: Role of calcium-phosphate metabolism. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:2037–40.
148. Swaminathan R. Magnesium metabolism and its disorders. *Clin Biochem Rev* 2003;24: 47–66.
149. Kim YH, Jung KI, Song CH. Effects of serum calcium and magnesium on heart rate variability in adult women. *Biol Trace Elem Res* 2012;150:116–22.
150. Hruby A, O'Donnell CJ, Jacques PF, Meigs JB, Hoffmann U, McKeown NM. Magnesium intake is inversely associated with coronary artery calcification. The Framingham Heart Study. *J Am Coll Cardiol Img* 2014;7:59–69.
151. Belluci MM, Schoenmaker T, Rossa-Junior C, Orrico SR, de Vries TJ, Everts V. Magnesium deficiency results in an increased formation of osteoclasts. *J Nutr Biochem* 2013;24:1488–98.
152. Alves SC, Tomasi CD, Constantino L, Giombelli V, Candal R, Bristot ML, Topanotti MF, Burdmann E, Dal-Pizzol F, Fraga CM, Ritter C. Hypomagnesemia as a risk factor for the non-recovery of the renal function in critically ill patients with acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant* 2012;28:910–6.

153. Hashizume N, Mori M. An analysis of hypermagnesemia and hypomagnesemia. *Jpn J Med* 1990;29:368–72.
154. Boriboonhirunsarn D, Lertbunnaphong T, Suwanwanich M. Correlation of magnesium levels in cord blood and maternal serum among pre-eclamptic pregnant women treated with magnesium sulfate. *J Obst Gyn Res* 2011;38:247–52.
155. Navaro-Gonzales JF, Mora-Fernandez C, Garcia-Perez J. Reviews: Clinical implications of disordered magnesium homeostasis in chronic renal failure and dialysis. *Semin Dial* 2009;22:37–44.
156. Francisco ALM, Rodriguez M. Magnesium - its role in CKD. *Nefrologia* 2013;33:389–99.
157. Katopodis KP, Koliouisi EL, Andrikos EK, Pappas MV, Elisaf MS, Siamopoulos KC. Magnesium homeostasis in patients undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis: role of the dialysate magnesium concentration. *Artif Organs* 2003;27:853–7.
158. Hotchkiss JR, Palevsky PM. Care of the critically ill patient with advanced chronic kidney disease or end-stage renal disease. *Curr Opin Critic Care* 2012;18:599–606.
159. Ishimura E, Okuno S, Yamakawa T, Inaba M, Nishizawa Y. Serum magnesium concentration is a significant predictor of mortality in maintenance hemodialysis patients. *Magnes Res* 2007;20:237–44.
160. Sonikian M, Papachristou E, Goumenos DS. Optimal use of phosphate binders in chronic kidney disease. *Expert Opin Pharmacother* 2013;14:2521–32.
161. Gitelmann HJ, Hurt C, Lutwak L. An automated spectrophotometric method for magnesium analysis. *Analytic Biochem.* 1966;14:106–20.
162. Wolfe HJ. The anatomy of the parathyroids. In: DeGroot LJ, ed. *Endocrinology*, 2nd ed, Vol 2, Philadelphia: WB Saunders, 1989:844–7.
163. Brown EM. Extracellular Ca²⁺ sensing regulation of parathyroid cell function, and role of Ca²⁺ and other ions as extracellular (first) messengers. *Physiol Rev* 1991;71:371–411.

164. Bergwitz C, Juppner H. Regulation of phosphate homeostasis by PTH, vitamin D, and FGF23. *Ann Rev Med* 2010;61:91–104.
165. Hammerstad SS, Norheim I, Paulsen T, Amlie LM, Eriksen EF. Excessive decrease in serum magnesium after total thyroidectomy for Graves' disease is related to development of permanent hypocalcemia. *World J Surg* 2013;37:369–75.
166. Potts JT Jr, Bringham FR, Gardella T, Nussbaum SR, Segre GV, Kronenberg HM. Parathyroid hormone: physiology, chemistry, biosynthesis, secretion, metabolism and mode of action. In: DeGroot LJ, ed. *Endocrinology*, 3rd ed, Vol 2. Philadelphia: WB Saunders, 1995:920–66.
167. Scillitani A, Guarnieri V, Battista C, Chiodini I, Salcuni AS, Minisola S, Francucci CM, Carnevale V. Carboxyl-terminal parathyroid hormone fragments: biologic effects. *J Endocrinol Invest* 2011;34:23–6.
168. D'Amour P, Brossard JH. Carboxyl-terminal parathyroid hormone fragments: role in parathyroid hormone physiopathology. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005;14:330–6.
169. Endres DB, Villanueva R, Sharp CF Jr, Singer FR. Measurement of parathyroid hormone. *Endocrinol, Metab Clin North Am* 1989;18:611–29.
170. Nissenson RA. Parathyroid hormone-related protein. *Rev End Met Dis* 2000;1:343–52.
171. Cusano NE, Silverberg SJ, Bilezikian JP. Normocalcemic primary hyperparathyroidism. *J Clin Densit* 2013;16:33–9.
172. Lepage R, Roy L, Brossard JH, Rousseau L, Dorais C, Lazure C, D'Amour P. A non-(1–84) circulating parathyroid hormone (PTH) fragment interferes significantly with intact PTH commercial assay measurements in uremic samples. *Clin Chem* 1998;44:805–9.
173. Torres PU. Cinacalcet HCl: A novel treatment for secondary hyperparathyroidism caused by chronic kidney disease. *J Ren Nutrit* 2006;16:253–8.
174. Stevens LA, Djurdjev O, Cardew S et al. Calcium, phosphate, and parathyroid hormone levels in combination and as a function of dialysis duration predict

- mortality: evidence for the complexity of the association between mineral metabolism and outcomes. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 770–79.
175. Rodriguez M, Ureña-Torres P, Pétavy F, Cooper K, Farouk M, Goodman WG. Calcium-mediated parathyroid hormone suppression to assess progression of secondary hyperparathyroidism during treatment among incident dialysis patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:618–25.
 176. Yano Y, Masaki C, Sugino K, Nagahama M, Kitagawa W, Sibuya H, Ito K. Serum intact parathyroid hormone level after total thyroidectomy or total thyroidectomy plus lymph node dissection for thyroid nodules: report from 296 surgical cases. *Int J Endocrinol Metab* 2012;10:594–8.
 177. Endres DB. Which parathyrin assay is really best for clinical use? *Clin Chem* 1991;37:1466–7.
 178. Beko G, Butz H, Berta K, Tisler A, Olajos F, Vasarhelyi B, Patocs A. Switching between parathormone (PTH) assays: the impact on the diagnosis of renal osteodystrophy. *Clin Chem Lab Med* 2012;51:1251–6.
 179. Andress DL, Endres DB, Maloney NA. Comparison of parathyroid hormone assays with bone histomorphometry in renal osteodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;63:1163–9.
 180. Tan K, Ong L, Sethi SK, Saw S. Comparison of the Elecsys PTH(1–84) assay with four contemporary second generation intact PTH assays and association with other biomarkers in chronic kidney disease patients. *Clin Biochem* 2013;46:781–6.
 181. Gao P, Scheibel S, D'Amour P, John MR, Rao SD, Schmidt-Gayk H, Cantor TL. Development of a novel immunoradiometric assay exclusively for biologically active whole parathyroid hormone 1-84: implications for improvement of accurate assessment of parathyroid function. *J Bone Miner Res* 2001;16:605–14.
 182. Souberbielle JC, Boutten A, Carlier MC, Chevenne D, Coumaros G, Lawson-Body E, Massart C, Monge M, Mayara J, Parent X, Plouvier E, Houillier P. Working group on PTH and vitamin D, Societe Francaise de Biologie Clinique (SFBC). Inter-method variability in PTH measurement: implication for the care of CKD patients. *Kid Inter* 2006;70:345–50.

183. Garret G, Sardiwal S, Lamb EJ, Goldsmith DJA. PTH—a particularly tricky hormone: why measure it at all in kidney patients? *Clin J Am Soc Nephrol* 2013;8:299–312.
184. Tanaguchi M, Tanaka M, Hamano T, Nakanishi S, Fujii H, Kato H, Koiwa F, Ando R, Kimata N, Akiba T, Kono T, Yokoyama K, Shigematsu T, Kakuta T, Kazama JJ, Tominaga Y, Fukagawa M. Comparison between whole and intact parathyroid hormone assays. *Therap Apher Dial* 2011;15:42–9.
185. O'Flaherty D, Sankaralingam A, Scully P, Manghat P, Goldsmith D, Hampson G. The relationship between intact PTH and bioactive PTH (1–84) with bone and mineral metabolism in pre-dialysis chronic kidney disease (CKD). *Clin Biochem* 2013;46:1405–9.
186. Wesseling-Perry K, Harkins GC, Wang H, Elashoff R, Gales B, Horwitz MJ, Stewart AF, Juppner H, Salusky IB. The calcemic response to continuous parathyroid hormone (PTH)(1-34) infusion in end-stage kidney disease varies according to bone turnover: a potential role for PTH(7-84). *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:2772–80.
187. Bellorin-Font E, Ambrosoni P, Carlini RG, Carvalho AB, Correa-Rotter R, Cueto-Manzano A, Jara A, Jorgetti V, Negri A, Olaizola I, Salusky I, Slatopolsky E, Weisinger JR. Clinical practice guidelines for the prevention, diagnosis, evaluation and treatment of mineral and bone disorders in chronic kidney disease (CKD-MBD) in adults. *Nefrologia* 2013;33:1–36.
188. Amerling R. Guideline bone disease. *Blood Purif* 2013;36:132–5.
189. Aloia JF, Feuerman M, Yeh JK. Reference range for serum parathyroid hormone. *Endocr Pract* 2006;12:137–44.
190. Elder G. The CARI Guidelines – caring for australasians with renal impairment. Parathyroid hormone. *Biochem Haematol Targets* 2006;1–17.
191. Nuti R, Merlotti D, Gennari L. Vitamin D deficiency and primary hyperparathyroidism. *J Endocrinol Invest* 2011;34:45–9.
192. Souberbielle JC, Cormier C, Kindermans C, Gao P, Cantor T, Forette F, Baulieu EE. Vitamin D status and redefining serum parathyroid hormone reference range in the elderly. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3086–90.

193. Kovacs CS, Fulethan G. Calcium and bone disorders during pregnancy and lactation. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2006;35:21–29.
194. Grant CC, Stewart AW, Scragg R, Milne T, Rowden J, Ekeroma A, Wall C, Mitchell EA, Crengle S, Trenholme A, Crane J, Camargo CA. Vitamin D during pregnancy and infancy and infant serum 25-hydroxyvitamin D concentration. *Pediatrics* 2014;133:e143–53.
195. Barreto FC, Barreto DV, Mayses RMA, Neves KR, Canziani MEF, Draibe SA, Jorgetti V, Carvalho AB. K/DOQI-recommended intact PTH levels do not prevent low-turnover bone disease in hemodialysis patients. *Kidney International* 2008;73:771–7.
196. Lips P. Vitamin D physiology. *Prog Biophys Molecul Biol* 2006;92:4–8.
197. Medical Advisory Secretariat. Clinical utility of vitamin D testing: an evidence-based analysis. *Ont Health Technol Assess Ser* [Internet]. 2010;10:1–95.
198. http://www.health.gov.on.ca/english/providers/program/mas/tech/reviews/pdf/rev_vitamin_d_201002.pdf
199. Holick MF, Adams JS. Vitamin D metabolism and biological function. In: Avioli LV, Krane SM, eds. *Metabolic bone disease*, 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1990:155–95.
200. Moore C, Murphy MM, Keast DR, Holick MF. Vitamin D intake in the United States. *J J Am Diet Ass* 2004;980–3.
201. Haussler MR, Whitfield GK, Kaneko I, Haussler HA, Hsieh D, Hsieh JC, Jurutka PW. Molecular mechanisms of vitamin D action. *Calc Tiss Inter* 2013;92:77–98.
202. Christakos S, Ajibade DV, Dhawan P, Fechner AJ, Mady LJ. Vitamin D: metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2010;39:243–53.
203. Verboven C, Rabijns A, De Maeyer M, Van Baelen H, Bouillon R, De Ranter C. A structural basis for the unique binding features of the human vitamin D-binding protein. *Nat Struct Biol* 2002;9:131–6.
204. Fleet JC, Schoch RD. Molecular mechanisms for regulation of intestinal calcium and phosphate absorption by vitamin D. In: David F, Pike JW, John SA eds. *Vitamin D*, 3rd ed. Academic Press, San Diego, 2011:349–62.

205. Ebert R, Schütze N, Adamski J, Jakob F. Vitamin D signaling is modulated on multiple levels in health and disease. *Mol Cell Endocrinol* 2006;248:149–59.
206. Hanley DA, Cranney A, Jones G, Whiting SJ, Leslie WD. Vitamin D in adult health and disease: a review and guideline statement from Osteoporosis Canada (summary). *Canad Med Ass J* 2010;182:1315–19.
207. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, Murad MH, Weaver CM; Endocrine Society. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:1911–30.
208. Kennel KA, Drake MT, Hurley DL. Vitamin D deficiency in adults: when to test and how to treat. *Mayo Clin Proc* 2010;85:752–8.
209. Lu CM. Pathology Consultation on vitamin D testing: clinical indications for 25(OH) vitamin D measurement. *Am J Clin Pathol* 2012;137:831–5.
210. González EA, Sachdeva A, Oliver DA, Martin KJ. Vitamin D insufficiency and deficiency in chronic kidney disease. *Am J Nephrol* 2004;24:503–10.
211. Ott C, Raff U, Schneider MP, Titze SI, Schmieder RE. 25-Hydroxyvitamin D insufficiency is associated with impaired renal endothelial function and both are improved with rosuvastatin treatment. *Clin Res Card* 2013;102:299–304.
212. Ross AC, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, Durazo-Arvizu RA, Gallagher JC, Gallo RL, Jones G, Kovacs CS, Mayne ST, Rosen CJ, Shapses SA. The 2011 dietary reference intakes for calcium and vitamin D: what dietetics practitioners need to know. *J Am Diet Ass* 2011;111:524–7.
213. Ross EA, Tian J, Abboud H et al. Oral paricalcitol for the treatment of secondary hyperparathyroidism in patients on hemodialysis or peritoneal dialysis. *Am J Nephrol* 2008;28:97–106.
214. Ketteler M, Martin KJ, Cozzolino M, Goldsmith D, Sharma A, Khan S, Dumas E, Amdahl M, Marx S, Audhya P. Paricalcitol versus cinacalcet plus low-dose vitamin D for the treatment of secondary hyperparathyroidism in patients receiving haemodialysis: study design and baseline characteristics of the IMPACT SHPT study. *Nephrol Dial Transplant* 2012;27:1942–9.

215. Tanaka H, Komaba H, Fukagawa M. Frontiers in vitamin D; basic research and clinical application. Vitamin D and secondary hyperparathyroidism. *Clin Calc* 2011;21:27–34.
216. Wu-Wong JR, William N, Ma J, Dixon D, Nakane M, Bolin AL, Koch KA, Postl S, Morgan SJ, Reinhart GA. Role of phosphorus and vitamin D analogs in the pathogenesis of vascular calcification. *J Pharm Exper Therap* 2006;318:90–8.
217. Martin KJ, Gonzalez EA. Vitamin D analogs: Actions and role in the treatment of secondary hyperparathyroidism. *Semin Nephrol* 2004;24:456–9.
218. Li D, Shao L, Zhou H, Jiang W, Zhang W, Xu Y. The efficacy of cinacalcet combined with conventional therapy on bone and mineral metabolism in dialysis patients with secondary hyperparathyroidism: a meta-analysis. *Endocrine* 2013;43:68–77.
219. Lucchi L, Carboni C, Stipo L, Malaguti V, Ferrari F, Graziani K et al. Early initiation of cinacalcet for the treatment of secondary hyperparathyroidism in hemodialysis patients: a three-year clinical experience. *Artif Organs* 2011;35:1186–93.
220. Kandula P, Dobre M, Schold JD, Shreiber MJ, Mehrotra R, Navaneethan SD. Vitamin D supplementation in chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies and randomized controlled trials. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011;6:50–62.
221. Melamed ML, Thadhani RI. Vitamin D therapy in chronic kidney disease and end stage renal disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2012;7:358–65.
222. http://www.kidney.org/Professionals/Kdoqi/guidelines_bone/Guide8B.htm
223. http://www.kidney.org/professionals/kdoqi/guidelines_bone/guide7.htm
224. Gomes FP, Shaw PN, Whitfield K, Koorts P, Hewavitharana AK. Recent trends in the determination of vitamin D. *Bioanalysis* 2013;5:3063–78.
225. Kendrick J, Cheung AK, Kaufman JS, Greene T, Roberts WL, Smits G, Chonchol M. Associations of plasma 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D concentrations with death and progression to maintenance dialysis in patients with advanced kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2012;60:567–75.

226. Haddad JC, Chyu KJ. Competitive protein-binding radioassay for 25-hydroxycholecalciferol. *J Clin Endocrinol Metab* 1971;33:992–5.
227. Hollis BW, Napoli JL. Improved radioimmunoassay for vitamin D and its use in assessing vitamin D status. *Clin Chem* 1985;31:1815–9.
228. Connell AB, Jenkins N, Black M, Pasco JA, Kotowicz MA, Schneider HG. Overreporting of vitamin D deficiency with the Roche Elecsys Vitamin D3 (25-OH) method. *Pathology* 2011;43:368–71.
229. Wallace AM, Gibson S, de la Hunty A, Lamberg-Allardt C, Ashwell M. Measurement of 25-hydroxyvitamin D in the clinical laboratory: current procedures, performance characteristics and limitations. *Steroids* 2010;75:477–88.
230. Roth HJ, Schmidt-Gayk H, Weber H, Niederau C. Accuracy and clinical implications of seven 25-hydroxyvitamin D methods compared with liquid chromatography-tandem mass spectrometry as a reference. *Ann Clin Biochem* 2008;45:153–9.
231. Malabanan A, Veronikis IE, Holick MF. Redefining vitamin D deficiency. *Lancet* 1998;351:805–6.
232. Heaney RP, Dowell S, Hale C, Benedich A. Calcium absorption varies within the reference range for serum 25-hydroxyvitamin D. *J Am Coll Nutr* 2003;22:142–6.
233. Ashwell M, Stone EM, Stolte H, Cashman KD, Macdonald H, Lanham-New S, Hiom S, Webb A, Fraser D. UK Food Standards Agency Workshop Report: an investigation of the relative contributions of diet and sunlight to vitamin D status. *Brit J Nutrit* 2010;104:603–11.
234. Dong Y, Pollock N, Stallmann-Jorgensen IS, Gutin B, Lan Ling, Chen TC, Keeton D, Petty K, Holick MF, Zhu H. Low 25-Hydroxyvitamin D levels in adolescents: race, season, adiposity, physical activity and fitness. *Pediatr* 2010;125:1104–11.
235. Institute of Medicine (US) Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium; Edited by AC Ross, CL Taylor, AL Yaktine, HB Del Valle. Dietary reference intakes for calcium and vitamin D. Washington, DC.

- National Academies Press (US) 2011, Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK56070>.
236. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Inter., Suppl.* 2013;3:1–150.
 237. Eknoyan G. The wonderful apparatus of John Jacob Abel called the "artificial kidney". *Semin Dial* 2009;22:287–96.
 238. http://www.fmc-ag.com/files/Dialysis_Compact_2004_HD_History_english.pdf
 239. http://www.fmc-ag.com/files/Dialysis_Compact_2005_PD_Geschichte_englisch.pdf
 240. Nolph KD, Popovich RP, Moncrief JW. Theoretical and practical implications of continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephron* 1978;21:117–22.
 241. Hruska KA, Teitelbaum ST. Mechanisms of disease: renal osteodystrophy. *New Eng J Med* 1995;333:166–74.
 242. Moe S, Drueke T, Cunningham J, Goodman W, Martin K, Ott S, Sprague S, Lameire N, Eknoyan G. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: A position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Inter* 2006;69:1945–53.
 243. http://www.kidney.org/professionals/kdoqi/guidelines_bone/background.htm
 244. Tam CS, Anderson W. Tetracycline labeling of bone in vivo. *Calcif Tissue Int* 1980;30:121–5.
 245. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR, Parfitt AM. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: A 2012 Update of the Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2013;28:2–17.
 246. Biochemical serum markers of bone turnover in renal osteodystrophy, available at: <http://www.ifcc.org/ejifcc/vol15no2/150206200402n.htm>
 247. Ferreira MA. Diagnosis of renal osteodystrophy: when and how to use biochemical markers and non-invasive methods; when bone biopsy is needed. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:8–14.

248. Mosekilde L. Primary hyperparathyroidism and the skeleton. *Clin Endocrinol* 2008;69:1–19.
249. Parfitt AM. Renal bone disease: a new conceptual framework for the interpretation of bone histomorphometry. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003;12:387–403.
250. Naveh-Many T, Rahamimov R, Livni N, Silver J. Parathyroid cell proliferation in normal and chronic renal failure rats. The effects of calcium, phosphate, and vitamin D. *J Clin Invest* 1995;96:1786–93.
251. Jabbar Z, Aggarwal PK, Chandel N, Khandelwal N, Kohli HS, Sakhuja V, Jha V. Noninvasive assessment of bone health in Indian patients with chronic kidney disease. *Indian J Nephrol* 2013;23:161–7.
252. Jorge C, Gil C, Possante M, Silva E, Andrade R, Santos N, Cruz A, Teixeira R, Ferreira A. Bone alkaline phosphatase besides intact parathyroid hormone in hemodialysis patients – any advantage? *Nephron Clin Pract* 2005;101:122–7.
253. Fetcher S, Jones RG, Rayner HC, Harnden P, Hordon LD, Aaron JE, Oldroyd B, Brownjohn AM, Turney JH, Smith MA. Assessment of renal osteodystrophy in dialysis patients: use of bone alkaline phosphatase, bone mineral density and parathyroid ultrasound in comparison with bone histology. *Nephron* 1997;75:412–9.
254. Jarava C, Armas JR, Palma A. Study of renal osteodystrophy by bone biopsy. Age as an independent factor. Diagnostic value of bone remodeling markers. *Nefrologia*. 2000;20:362–72.
255. Jarava C, Armas JR, Salgueira M, Palma A. Bone alkaline phosphatase isoenzyme in renal osteodystrophy. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:43–6.
256. Avbersek-Luznik I, Stopar TG, Marc J. Activity or mass concentration of bone-specific alkaline phosphatase as a marker of bone formation. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1014–8.
257. Novikov AI, Ivanov AE, Golovniak IE, Baeva LB, Levitski ER. The general principles of the diagnosis of dialysis osteomalacia by the results of the histomorphology of spongy bone. *Ter Arkg* 1991;63:107–10.
258. Hernandez JD, Wesseling K, Pereira R, Galez B, Harrison R, Salusky IB. Technical approach to iliac crest biopsy. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3:164–9.

259. Cannata-Andia J. Pathogenesis, prevention and management of low-bone turnover. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:15–7.
260. Moorthi RN, Kandula P, Moe SM. Optimal vitamin D, calcitriol, and vitamin D analog replacement in chronic kidney disease: to D or not to D: that is the question. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2011;20:354–9.
261. Finch JL, Tokumoto M, Nakamura H, Yao W, Shahnazari M, Lane N, Slatopolsky E. Effect of paracalcitriol and cinacalcet on serum phosphate, FGF-23, and bone in rats with chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010;298:1315–22.
262. Yayima A, Akizawa T, Tsukamoto Y, Kurihara S, Ito A. Impact of cinacalcet hydrochloride on bone histology in patients with secondary hyperparathyroidism. *Ther Apher Dial* 2008;1:38–43.
263. Ichii M, Ishimura E, Okuno S, Chou H, Kato Y, Tsuboniwa N, Nagasue K, Maekawa K, Yamakawa T, Inaba M, Nishizawa Y. Decreases in parathyroid gland volume after cinacalcet treatment in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *Nephron Clin Pract* 2010;115:195–202.
264. Sardiwal S, Magnusson P, Goldsmith DJ, Lamb EJ. Bone alkaline phosphatase in CKD-mineral bone disorder. *Am J Kidney Dis* 2013;62:810–22.
265. Nebeker HG, Coburn JW. Aluminium and renal osteodystrophy. *Ann Rev Med* 1986;37:79–95.
266. Cannata-Andia JB. Hypokinetic azotemic osteodystrophy. *Kidney Int* 1998;54:1000–16.
267. Haris A, Sherrard DJ, Hercz G. Reversal of adynamic bone disease by lowering of dialysate calcium. *Kidney Int* 2006;70:931–7.
268. Andress DL, Nebeker HG, Ott SM, et al. Bone histologic response to deferoxamine in aluminium-related bone disease. *Kidney Int* 1987;31:1344–50.
269. Morrissey J, Slatopolsky E. Effect of aluminium on parathyroid hormone secretion. *Kidney Int Suppl* 1986;18:41–4.
270. Diaz-Corte C, Fernandez-Martin JL, Barreto S et al. Effect of aluminium load on parathyroid hormone synthesis. *Nephrol Dial transplant* 2001;16:742–5.

271. Gonzales-Suarez I, Naves M, Diaz-Corte C et al. Effect of aluminium on calcium-sensing receptor expression, proliferation, and apoptosis of parathyroid glands from rats with chronic renal failure. *Kidney Int Suppl* 2003;63:39–43.
272. Rocha LA, Higa A, Barreto FC et al. Variant of adynamic bone disease in hemodialysis patients: fact or fiction? *Am J Kidney Dis* 2006;48:430–6.
273. Goodman WG, Ramirez JA, Belin TR et al. Development of adynamic bone in patients with secondary hyperparathyroidism after intermittent calcitriol therapy. *Kidney Int* 1995;46:1160–6.
274. Hendy GN, Hruska KA, Mathew S et al. New insights into mineral and skeletal regulation by active forms of vitamin D. *Kidney Int* 2006;69:218–23.
275. Yajima A, Ogawa Y, Ikehara A et al. Development of low-turnover bone diseases after parathyroidectomy and autotransplantation. *Int J Urol* 2001;8:76–9.
276. Cannata-Andia JB, Rodriguez García M, Gómez Alonso C. Osteoporosis and adynamic bone in chronic kidney disease. *J Nephrol* 2013;26:73–80.
277. Langub MC, Monier-Faugere MC, Wang G et al. Administration of PTH-(7–84) antagonizes the effects of PTH-(1–84) on bone in rats with moderate renal failure. *Endocrinol* 2003;144:1135–8.
278. Al Helal B, Su WS, Churchill DN, Gangji AS. Relative hypoparathyroidism and hypoalbuminemia are associated with hip fracture in hemodialysis patients. *Clin Nephrol* 2010;73:88–93.
279. Monier-Faugere MC, Malluche HH. Trends in renal osteodystrophy: a survey from 1983 to 1995 in a total of 2248 patients. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:111–20.
280. Sherrard DJ, Hercz G, Pei Y et al. The spectrum of bone disease in end-stage renal failure—an evolving disorder. *Kidney Int* 1993;43:436–42.
281. Coen G, Mazzaferro S, Ballanti P et al. Renal bone disease in 76 patients with varying degrees of predialysis chronic renal failure: a cross-sectional study. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:813–9.
282. Hutchison AJ, Moore PR. Low turnover bone disease. *Perit Dial Int* 1996;16:295–9.

283. Torres A, Lorenzo V, Hernandez D et al. Bone disease in predialysis, hemodialysis, and CAPD patients: evidence of a better bone response to PTH. *Kidney Int* 1995;47:1434–42.
284. Picton ML, Moore PR, Mawer EB et al. Down-regulation of human osteoblast PTH/PTHrP receptor mRNA in end-stage renal failure. *Kidney Int* 2000;58:1440–9.
285. Iwasaki-Ishizuka Y, Yamato H, Nii-Kono T et al. Downregulation of parathyroid hormone receptor gene expression and osteoblastic dysfunction associated with skeletal resistance to parathyroid hormone in a rat model of renal failure with low turnover bone. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:1904–11.
286. Vahl P, Xie H, Scialla J, Anderson CAM, Bellovich K, Brecklin C, Chen J, Feldman H, Gutierrez OM, Lash J, Leonard MB, Negrea L, Rosas SE, Anderson AH, Townsend RR, Wolf M, Isakova T. Earlier onset and greater severity of disordered mineral metabolism in diabetic patients with chronic kidney disease. *Diabetes Care* 2012;35:994–1001.
287. Frazao JM, Martins P. Adynamic bone disease: clinical and therapeutic implications. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2009;18:303–7.
288. Mathew S, Lund RJ, Strebeck F, Tustison KS, Geurs T, Hruska KA. Reversal of the adynamic bone disorder and decreased vascular calcification in chronic kidney disease by sevelamer carbonate therapy. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:122–30.
289. Wesseling-Perry K, Salusky IB. Chronic kidney disease: mineral and bone disorder in children. *Semin Nephrol* 2013;33:169–79.
290. http://www.kidney.org/Professionals/Kdoqi/guidelines_bone/Guide13C.htm
291. Clinical Laboratory Standards Institute: Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory, Approved Guideline, ed 3. Villanova, PA, 2008, CLSI.
292. Solberg HE. Establishment and use of reference values. In: Burts CA, Ashwood ER, Bruns DE eds. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. 4th ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2006:425–49.

293. Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem* 1993;39:561–77.
294. Withold W. Monitoring of bone turnover biological, preanalytical and technical criteria in assessment of biochemical markers. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996;34:785–99.
295. Maruyama Y, Arai K, Yoshida K, Motomiya Y, Kaneko Y, Hirao Y, Okajima E. Study of tartrate resistant acid phosphatase in patients with chronic renal failure on maintenance hemodialysis. *Nihon Jinzo Gakkai Shi* 1991;33:397–402.
296. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for bone metabolism and disease in chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2003;42:S1–S202.
297. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3:S131–9.
298. Nikodimopoulou M, Liakos S. Secondary hyperparathyroidism and target organs in chronic kidney disease. *Hippokratia* 2011;15:33–8.
299. Vincent A, Riggs BL, Atkinson EJ, Oberg AL, Khosla S. Effect of estrogen replacement therapy on parathyroid hormone secretion in elderly postmenopausal women. *Menopause* 2003;10:165–71.
300. Ha SK, Park CH, Seo JK, Park SH, Kang SW, Choi KH, Lee HY, Han DS. Studies on bone markers and bone mineral density in patients with chronic renal failure. *Yonsei Med J* 1996;37:350–6.
301. Gal-Moscovici A, Popovtzer MM. New worldwide trends in presentation of renal osteodystrophy and its relationship to parathyroid hormone levels. *Clin Nephrol* 2005;63:284–9.
302. Hawley C. The CARI Guidelines: Calcium x phosphate product. *Biochem Hematol Targ* 2006;1–7.
303. Diaz Corte C, Rodríguez A, Naves ML, Fernández Martín JL, Cannata JB. Bone metabolic markers and use of vitamin D in dialysis. Multicenter survey. (II). Collaborative Centers of the Multicenter Study on Renal Osteodystrophy. *Nefrologia* 2000;20:244–53.

304. Bervoets AR, Spasovski GB, Behets GJ et al. Useful biochemical markers for diagnosing renal osteodystrophy in predialysis end-stage renal failure patients. *Am J Kidney Dis* 2003;41:997–1007.
305. Block GA, Klassen PS, Lazarus JM, Ofsthun N, Lowrie EG, Chertow GM. Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:2208–18.
306. Grzegorzewska AE, Mlot M. Serum markers of bone turnover in dialysed patients separated according to age. *Int Urol Nephrol* 2006;38:311–6.
307. Eddington H, Hurst H, Ramli MT, Speake M, Hutchison AJ. Calcium and magnesium flux in automated peritoneal dialysis. *Periton Dial Internat* 2009;29:536–41.
308. Wei M, Esbaei K, Bargman JM, Oreopoulos DG. Inverse correlation between serum magnesium and parathyroid hormone in peritoneal dialysis patients: a contributing factor to adynamic bone disease? *Int Urol Nephrol* 2006;38:317–22.
309. Cho MS, Lee KS, Lee YK, Ma SK, Ko JH, Kim SW, Kim NH, Choi KC. Relationship between the serum parathyroid hormone and magnesium levels in continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) patients using low-magnesium peritoneal dialysate. *Korean J Inter Med* 2002;17:114–21.
310. Shah N, Bernardini J, Piraino B. Prevalence and correction of 25(OH) vitamin D deficiency in peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int* 2005;25:362–6.
311. Yonoa D, Dukova P. Changes of serum bone markers in CAPD and hemodialysis patients. *Hippokratia* 2007;11:199–201.
312. Sprague SM, Evenepoel P, Curzi MP, Gonzalez MT, Husserl FE, Kopyt N, Sterling LR, Mix C, Wong G. Simultaneous control of PTH and CaxP is sustained over three years of treatment with cinacalcet HCl. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4:1465–76.
313. Veerappan I, Arvind RM, Ilayabharthi V. Predictors of quality of life of hemodialysis patients in India. *Indian J Nephrol* 2012;22:18–25.
314. Jean G, Terrat JC, Vanel T, Hurot JM, Lorriaux C, Mayor B, Chazot C. Daily oral 25-hydroxycholecalciferol supplementation for vitamin D deficiency in

- haemodialysis patients: effects on mineral metabolism and bone markers. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:3670–6.
315. Zetterberg H. Increased serum concentrations of intestinal alkaline phosphatase in peritoneal dialysis. *Clin Chem* 2005;51:675–6.
316. Yamada S, Tsuruya K, Yoshida H, Taniguchi M, Haruyama N, Tanaka S, Eriguchi M, Nakano T, Kitazono T. The clinical utility of serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b in the assessment of bone resorption in patients on peritoneal dialysis. *Clin Endocrinol* 2013;78:844–51.
317. Coen G, Mazzaferro S, Ballanti P, Bonucci E, Bondatti F, Manni M, Pasquali M, Perruzza I, Sardella D, Spurio A. Procollagen type I C-terminal extension peptide in predialysis chronic renal failure. *Am J Nephrol* 1992;12:246–51.
318. Cavalier E, Delaney P, Vranken L, Bekaert AC, Carlisi A, Chapelle JP, Souberbielle JC. Interpretation of serum PTH concentrations with different kits in dialysis patients according to the KDIGO guidelines: importance of the reference (normal) values. *Nephrol Dial Transplant* 2012;27:1950–1956.
319. Shahapuni I, Mansour J, Harbouche L, Maouad B, Benyahia M, Rahmouni K, Oprisiu R, Bonne JF, Monge M, El Esper N, Presne C, Moriniere P, Choukroun G, Fournier A. viewpoint: how do calcimimetics fit into the management of parathyroid hormone, calcium, and phosphate disturbances in dialysis patients? *Seminars in Dialysis* 2005;18:226–38.
320. Levin A, Li YC. Vitamin D and its analogues: do they protect against cardiovascular disease in patients with kidney disease? *Kidney Int* 2005;68:1973–81.
321. Hardwick LL, Jones MR, Brautbar N, Lee DB. Magnesium absorption: mechanisms and the influence of vitamin D, calcium and phosphate. *J Nutrit* 1991;121:13–23.
322. Hernandez D, Concepcion MT, Lorenzo V, Martinez MT, Rodriguez A, De Bonis E, Gonzales-Posada JM, Felsenfeld AJ, Rodriguez M. Adynamic bone disease with negative aluminium staining in predialysis patients: prevalence and evolution after maintenance dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 1994;9:517–23.

BIOGRAFIJA DOKTORANDA:

Neda Milinković je upisala diplomatske osnovne studije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, profil diplomirani farmaceut – medicinski biohemičar, školske 1996/97 godine, a diplomirala 30.09.2002. godine. Od 20.10.2002. godine zaposlena je u Centru za polikliničku laboratorijsku dijagnostiku Instituta za medicinsku biohemiju, Kliničkog Centra Srbije.

Upisala je specijalističke studije za potrebe zdravstva, studijski program medicinska biohemija, na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu školske 2007/2008. godine i položila specijalistički ispit 11.04.2012. godine sa odličnim uspehom. Na doktorske studije iz medicinske biohemije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu prebačena je sa magistarskih poslediplomskih studija školske 2006/2007. godine. Dana 17.10.2012. godine prezentovala je predlog teme za doktorsku disertaciju pod nazivom „Značaj određivanja biomarkera resorpcije i stvaranja kostiju kod pacijenata sa krajnjim stadijumom bolesti bubrega”, pred Komisijom za doktorske studije Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Na sednici održanoj 19.06.2014. godine Nastavno-naučno veće Farmaceutskog fakulteta je prihvatilo pozitivnu ocenu doktorske disertacije pod istim nazivom, od strane imenovane Komisije, koja je predložila da se kandidatu omogući da pristupi javnoj odbrani iste.

Od školske 2011/2012. do 2012/2013. godine angažovana je kao honorarni saradnik u nastavi na Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu. Na redovnoj sednici Izbornog veća Farmaceutskog fakulteta održanoj 20.06.2013. godine izabrana je u zvanje Asistenta za užu naučnu oblast Medicinska biohemija. Angažovana je u praktičnoj nastavi na Integriranim akademskim studijama na predmetima Klinička hemija sa molekularnom dijagnostikom, Laboratorijska medicina zasnovana na dokazima, Biohemijske metode u prenatalnom skriningu, Laboratorijski menadžment i upravljanje kvalitetom, Laboratorijska dijagnostika poremećaja hemostaze i Laboratorijska hematologija. Član je Komisija za odbranu završnih radova.

Član je Društva medicinskih biohemičara Srbije (DMBS), gde učestvuje u izvođenju programa kontinuirane medicinske edukacije i član je Komore biohemičara Srbije od njenog osnivanja. Autor i koautor je jednog broja naučnih i stručnih radova saopštenih ili objavljenih u domaćim i stranim zbornicima i časopisima.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а НЕДА МИЛИНКОВИЋ

број уписа 74/06

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

ЗНАЧАЈ ОДРЕЂИВАЊА БИОМАРКЕРА РЕСОРПЦИЈЕ И СТВАРАЊА КОСТИ У КОЛ
ПАЦИЈЕНТА СА КРАЉИМ СТАДИЈУМ ОМ БОЛЕСИ БУБРЕГА

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

Потпис докторанда

У Београду, 22.07.2014.

Неда Милинковић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора НЕДА МИЛИНКОВИЋ

Број уписа 74/06

Студијски програм ФАРМАЦИЈА - МЕДИЦИНСКА БИОХЕМИЈА

Наслов рада ЗНАЧАЈ ОПРЕЂИВАЊА БИОМАРИМЕРА РЕСОРПЦИЈЕ И СТВАРАЊА
КОСТИЈУ КОД ПАЦИЈЕНАТА СА КРАЈЊИМ СТАДИЈУМОМ БОЛЕСТИ БУБРЕГА

Ментор ПРОФ ДР СВЕТАНА ИЛЊАТОВИЋ

Потписани Неда Милинковић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 22.07.2014.

Неда Милинковић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

ЗНАЧАЈ ОДРЕЂИВАЊА БИОМАРИМЕРА РЕСОРПЦИЈЕ И СТВАРАЊА КОСТИ У
МОДПАЦИЈЕТАТА СА КРАЈЊИМ СТАДИЈУМОМ БОЛЕСТИ БИДРЕГА

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 22.07.2014.

Нега Милинковић