

# EKSPRESIJA OPG/RANKL SUSTAVA U KRONIČNOJ BUBREŽNOJ BOLESTI I KOD PRIMATELJA TRANSPLANTIRANOG BUBREGA

---

Lončarić, Antun

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:972842>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-16**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U RIJECI**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI**

**SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE**

**Antun Lončarić**

**EKSPRESIJA OPG / RANKL SUSTAVA U KRONIČNOJ BUBREŽNOJ BOLESTI**

**I KOD PRIMATELJA TRANSPLANTIRANOG BUBREGA**

**Diplomski rad**

**Rijeka, 2019.**

**SVEUČILIŠTE U RIJECI**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI**

**SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE**

**Antun Lončarić**

**EKSPRESIJA OPG /RANKL SUSTAVA U KRONIČNOJ BUBREŽNOJ BOLESTI**

**I KOD PRIMATELJA TRANSPLANTIRANOG BUBREGA**

**Diplomski rad**

**Rijeka, 2019.**

Mentor rada: Doc. dr. sc. Tanja Čelić, dr. med.

Diplomski rad ocjenjen je dana 21. lipnja 2019. u Rijeci pred povjerenstvom u sastavu:

1. Izv. prof. dr. sc. Josip Španjol
2. Izv. prof. dr. sc. Hrvoje Jakovac
3. Izv. prof. dr. sc. Olga Cvijanović Pelosa

Rad sadrži 35 stranica, 6 slika, 3 tablice, 45 literaturnih navoda.

## ZAHVALA

Prvenstveno bih se želio zahvaliti svojoj mentorici doc. dr. sc. Tanji Čelić na ukazanom trudu, vremenu, strpljenju te na znanstvenim i stručnim savjetima, sugestijama i cjelokupnoj nesebičnoj pomoći pri izradi ovog diplomskog rada.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj djevojci, koja mi je bila potpora u svakom trenutku za vrijeme studija. Veliko hvala mojoj obitelji i roditeljima na pruženoj potpori.

Htio bih se zahvaliti svim kolegicama i kolegama, koji su mi uljepšali vrijeme provedeno na fakultetu. Na kraju, zahvaljujem se svim profesorima, docentima i asistentima koji su mi prenijeli potrebno znanje i vještine.

## POPIS SKRAĆENICA I AKRONIMA

1. AP- eng. *alkaline phosphatase*; alkalna fosfataza
2. BAP- eng. *bone alkaline phosphatase*; koštana alkalna fosfataza/koštano specifični izoenzim alkalne fosfataze
3. CaSR- eng. *calcium sensing receptor*; receptor osjetljiv na kalcij
4. HD- hemodijaliza
5. iPTH- eng. *intact parathyroid hormone*; netaknuti paratiroidni hormon
6. M-CSF- eng. *macrophage colony-stimulating factor*; čimbenik stimulacije kolonije makrofaga
7. NF- $\kappa$ B- eng. *nuclear factor kappa b*; nuklearni čimbenik kapa B
8. OPG- eng. *osteoprotegerin*; osteoprotegerin
9. PTH- eng. *parathyroid hormone*; paratiroidni hormon
10. RANK- eng. *receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B*; receptor aktivator nuklearnog čimbenika  $\kappa$ B
11. RANKL- eng. *receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand*; ligand za receptor aktivator nuklearnog čimbenika  $\kappa$ B
12. ROD- eng. *renal osteodystrophy*; renalna osteodistrofija
13. sRANKL- eng. *soluble receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand*; topljivi ligand za receptor aktivator nuklearnog čimbenika  $\kappa$ B
14. TNF- eng. *tumor necrosis factor*; čimbenik tumorske nekroze
15. TRAF6- eng. *TNF receptor associated factor 6*; čimbenik povezan s TNF receptorom 6
16. TRAP5b- eng. *tartrate-resistant acid phosphatase 5b*; tartarat rezistentna kisela fosfataza 5

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. Građa kosti .....	1
1.2. Koštana pregradnja .....	2
1.3. OPG / RANK / RANKL sustav .....	5
1.3.1. Ligand za receptor aktivator nuklearnog čimbenika $\kappa$ B- RANKL.....	5
1.3.2. Receptor aktivator nuklearnog čimbenika $\kappa$ B- RANK.....	6
1.3.3. Osteoprotegerin- OPG .....	7
1.4. Poremećaji koštano-mineralnog metabolizma i renalna osteodistrofija .....	9
<b>2. HIPOTEZA I SVRHA RADA .....</b>	<b>12</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>13</b>
3.1. Pacijenti i osnovni podaci.....	13
3.2. Uzimanje venske krvi .....	14
3.3. Laboratorijska mjerenja .....	14
3.4. Statistička analiza podataka .....	15
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>16</b>
4.1. Vrijednosti koštanih markera u ispitivanim skupinama .....	16
4.2. Razine iPTH u ispitivanim skupinama.....	17
4.3. OPG/RANKL u odnosu na normalni, srednje povišen i visoki PTH u hemodijaliziranih ispitanika, primatelja bubrežnog transplantata i zdravih kontrola	18

4.4. OPG/RANKL u odnosu na normalni, srednje povišen i visoki PTH u hemodijaliziranih ispitanika i primatelja bubrežnog transplantata.....	19
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>21</b>
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>26</b>
<b>7. SAŽETAK.....</b>	<b>27</b>
<b>8. SUMMARY.....</b>	<b>28</b>
<b>9. LITERATURA.....</b>	<b>29</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>35</b>



## 1. UVOD

### 1.1. Građa kosti

Kost je složeno, organizirano tkivo koje se sastoji od mineralne i organske tvari. Prema udjelu, mineralna tvar čini 70% koštane mase, dok na organsku tvar otpada 30% (1). Prosječna odrasla osoba u organizmu ima približno jedan kilogram kalcija, od čega 99% mase kalcija čini kalcij ugrađen u kost, stoga koštano tkivo predstavlja glavni rezervoar kalcija u tijelu. Ostalih 1% mase kalcija otpada na kalcij u mekim tkivima i izvanstaničnoj tekućini (2). Mineralna tvar pretežno se sastoji od kalcijevog hidoksiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), koji čini 95% mase mineralne tvari. Kalcijev hidroksiapatit je visokoorganizirana kristalna sol, u čiji sastav ulaze ioni kalcija i fosfora. U mineralnoj tvari su znatno manje zastupljeni drugi ioni poput natrija, magnezija, fluora i stroncija. Organska tvar (osteoid) građena je uglavnom od kolagenih vlakana, uz prisutnost osnovne tvari koji čine glikoproteini i proteoglikani (1). Premda u izgradnji organske tvari kosti sudjeluje više vrsta kolagena, najzastupljenija su vlakna kolagena tipa I. Ostatak organske tvari izgrađuju nekolagenski proteini i proteoglikani (3). Nekolagenski proteini su heterogena skupina različitih proteina koji su sastavni dio izvanstanične tvari (4). Među značajnije glikoproteine u koštanom tkivu ubrajamo osteopontin, osteonektin, fibronektin, fibrilin, osteoadherin, trombospondin, sijaloproteine i druge. Proteoglikani su makromolekule koje sadrže središnji proteinski dio i na njega priključene duge ugljikohidratne lance, odnosno glikozaminoglikane (heparan sulfat, hondroitin sulfat, keratan sulfat i hijaluronan). Najzastupljeniji proteoglikani u koštanom tkivu su biglikan i dekorin (5). Kost je mineralizirano vezivno tkivo organizirano u dva različita pojavna oblika; kortikalna kost i trabekularna kost.

Kortikalna kost (lat. *substantia compacta*) je kompaktna, debela, velike gustoće te nema šupljina ispunjenih koštanom srži (1, 5). Sudjeluje u izgradnji vanjskog sloja svih kostiju i dijafiza dugih kostiju. Zbog osobitosti svoje građe, kortikalna kost ima predominantno strukturalnu (mehaničku) funkciju te je 80%-90% volumena kortikalne kosti kalcificirano.

Trabekularna kost (lat. *substantia spongiosa*) ima spužvastu građu i ispunjava pločaste i kratke kosti te se nalazi u krajevima dugih kostiju (1). U spužvastoj koštanoj tvari koštano tkivo je raspoređeno tako da oblikuje koštane gredice različitih veličina. Prostore između gredica spužvaste tvari ispunjava koštana srž (lat. *medulla ossium*). Za razliku od kortikalne kosti, trabekularna kost ima predominantno metaboličku ulogu, a samo je 15%-25% volumena trabekularne kosti kalcificirano (1). Analizom kosti, uočeno je kako se gredice grupiraju u pravce koji se pružaju u smjeru djelovanja sila vlaka i tlaka na kost (5). Unatoč svom inertnom izgledu, kost je izrazito dinamično tkivo, što se očituje neprestanom koštanom pregradnjom.

## **1.2. Koštana pregradnja**

Koštana pregradnja je rezultat neprestanog djelovanja koštanih stanica. Osteociti su najbrojnije koštane stanice i čine preko 90% koštanih stanica. Ove stanice ne stvaraju kost, niti ju razgrađuju. Osteociti predstavljaju terminalno diferencirane stanice koje nastaju iz osteoblasta, nakon što se osteoblasti ukopaju u koštani matriks koji su odložili u svoju okolinu. Prilikom pretvorbe osteoblasta u osteocite, događaju se promjene morfoloških karakteristika i dolazi do smanjenja metaboličke aktivnosti (5). Osteoblasti su koštane stanice koje stvaraju novu kost tako da proizvode, odlažu i mineraliziraju koštani matriks. Ova vrsta koštanih stanica nastaje

iz pluripotentnih mezenhimalnih stanica (mezenhimalne matične stanice). Osteoblaste u organizmu nalazimo u periostu, endostu, perihondriju, sinovijalnoj membrani, ali i u krvi. Osteoklasti su koštane stanice odgovorne za razgradnju već stvorene kosti (6). To su multinuklearne stanice koje sadrže između pet i dvanaest jezgara (5, 7). Osteoklasti predstavljaju derivat hematopoetskih staničnih linija; potječu od stanica monocitno-makrofagne linije (5, 8, 9). Resorpcijska aktivnost osteoklasta regulirana je humoralnim čimbenicima (citokinima i čimbenicima rasta), ali je ovisna i o osteoblastičnoj aktivnosti (5). Kod zdravih osoba postoji ravnoteža između osteoblastične i osteoklastične aktivnosti. Koštana pregradnja je ključan proces za održavanje strukture i funkcije kostiju, kao i prilikom cijeljenja kostiju (1). Postojanje neravnoteže između stvaranja nove kosti i razgradnje postojeće, rezultira pojavom različitih koštanih oboljenja.

U praksi koštanu pregradnju možemo mjeriti i procjenjivati na nekoliko načina. Zlatni standard za procjenu koštane pregradnje je analiza uzorka biopsije grebena bočne kosti. Ova izravna metoda ima i brojna ograničenja; invazivna je, skupa, bolna, zahtjeva izvođenje i analizu od strane specijalista. Neizravna analiza koštane pregradnje putem serumskih biljega je jednostavnija za izvođenje, jeftinija, manje invazivna, lako ponovljiva te ne zahtjeva izvođenje i analizu od strane specijalista (10). Zbog svojih očitih prednosti, korištenje ove metode je danas široko rasprostranjeno te se rutinski provodi. Serumski biljezi poput paratiroidnog hormona (PTH), koštane alkalne fosfataze (eng. *bone alkaline phosphatase*, BAP), liganda za receptor aktivator nuklearnog čimbenika B (eng. *receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B*, RANKL), osteoprotegerina (OPG), tartarat rezistentne kisele fosfataze 5b (eng. *tartrate-resistant acid phosphatase 5b*, TRAP 5b), uz brojne druge ukazuju na stanje

koštane pregradnje (7, 9). Serumske koncentracije kalcija i fosfata, uz gore navedene biljege, pružaju uvid u stanje koštanog metabolizma.

PTH je najčešće korišteni biomarker za procjenu stanja koštane pregradnje. To je polipeptidni hormon koji se sintetizira u paratiroidnoj žlijezdi i u aktivnom se obliku hormon sastoji od 84 aminokiseline, dok potpunu aktivnost pokazuju i odsječci od 34 aminokiseline. Djelovanje PTH predstavlja moćan mehanizam za nadzor nad izvanstaničnom koncentracijom kalcija i fosfata. Primarni učinak PTH je sprječavanje nastanka hipokalcijemije (11). U fiziološkim uvjetima, lučenje PTH ovisno je o serumskoj koncentraciji kalcija. Za detekciju serumske razine kalcija odgovorni su receptori osjetljivi na kalcij (eng. *calcium sensing receptor*, CaSR) prisutni na stanicama paratiroidne žlijezde (12). Nadzor nad serumskom koncentracijom kalcija, PTH ostvaruje svojim djelovanjem na razini kostiju, bubrega i crijeva (13, 14). Za razliku od ostalih biljega koštane pregradnje, PTH se ne stvara u kosti te lučenje ovog hormona nije izravno regulirano lokalnim koštanim zahtjevima (14).

Alkalna fosfataza (eng. *alkaline phosphatase*, AP) je enzim koji se u ljudskom organizmu pojavljuje u više izoformi. Razlikujemo tako placentarnu, intestinalnu, AP zametnih stanica te tkivno nespecifičnu AP. U skupinu tkivno nespecifičnih AP spadaju jetrena, koštana i bubrežna (15). Malo manje od 50% ukupne cirkulirajuće AP odraslih, otpada na koštanu AP. BAP proizvode osteoblasti tijekom stvaranja kosti, a ima važnu ulogu u inaktivaciji pirofosfata koji inhibiraju mineralizaciju kosti. Smatra se kako ovaj enzim odražava koštanu pregradnju, odnosno stupanj stvaranja kosti (14).

TRAP 5b pripada heterogenoj grupi lizosomalnih enzima, a podrijetla je osteoklasta, makrofaga i dendritičkih stanica (16-18). Ovaj enzim potiče nastanak

reaktivnih kisikovih radikala, koji imaju važnu ulogu u razgradnji produkata koštane pregradnje u mikookolišu koštanog matriksa (16). TRAP 5b ima utjecaj i na funkciju proteina, odvajajući fosfat od molekule proteina. Aktivnost ovog enzima veća je u mediju s nižom pH vrijednošću, kao što je slučaj u resorpcijskim lakunama u kosti. Osteopontin, koštani sijaloprotein, ali i sam kolagen su pretpostavljena mjesta djelovanja ovog enzima. TRAP 5b i njegova koncentracija snažno koreliraju s brojem i veličinom stanica nalik osteoklastima (engl. *osteoclast-like cells*) (14).

### **1.3. OPG / RANK / RANKL sustav**

Ključnu ulogu u regulaciji koštane pregradnje ima RANKL / RANK / OPG sustav, koji se sastoji od glikoproteinske molekule RANKL, njezinog srodnog receptora aktivatora nuklearnog čimbenika  $\kappa$ B (eng. *receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B*, RANK) te „lažnog“ receptora OPG (8, 19).

#### **1.3.1. Ligand za receptor aktivator nuklearnog čimbenika $\kappa$ B- RANKL**

RANKL je jedan od proteina koji sudjeluje u signalnom putu osteoklastogeneze, a pripada obitelji TNF liganda (9). Po strukturi RANKL je glikoprotein homotrimerne građe, koji se sastoji od 316 aminokiselina. RANKL je eksprimiran na različitim stanicama kao što su osteociti, osteoblasti, stromalne stanice, T limfociti te u tkivima pluća, timusa i limfnih čvorova (19, 20). RANKL pokazuje komplementarno djelovanje s čimbenikom stimulacije kolonija makrofaga (M-CSF), zato što M-CSF povećava zalihe prekursora osteoklasta, na koje djeluje RANKL. RANKL se veže na svoj RANK receptor koji je eksprimiran na osteoklastnim prekursorima i zrelim osteoklastima.

Međusobno povezivanje molekula RANKL i RANK neophodno je za pokretanje procesa osteoklastogeneze. Povezivanjem ovih dviju molekula, dolazi do međudjelovanja s drugim molekulama koje svojim djelovanjem dovode do aktivacije nuklearnog čimbenika- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) te diferencijacije i aktivacije osteoklasta, uz inhibiciju njihove apoptoze (9, 19). Potpuni nedostatak RANKL proteina onemogućava diferencijaciju i aktivaciju osteoklasta, rezultirajući pojavom osteopetroze, bolesti obilježene povećanom količinom koštane mase (8). Pojačana aktivnost RANK-RANKL sustava dovodi do povećanog stvaranja osteoklasta i do nebalansirane, pojačane razgradnje kosti uz pojavu osteopenije i osteoporoze (8, 21).

### **1.3.2. Receptor aktivator nuklearnog čimbenika $\kappa$ B- RANK**

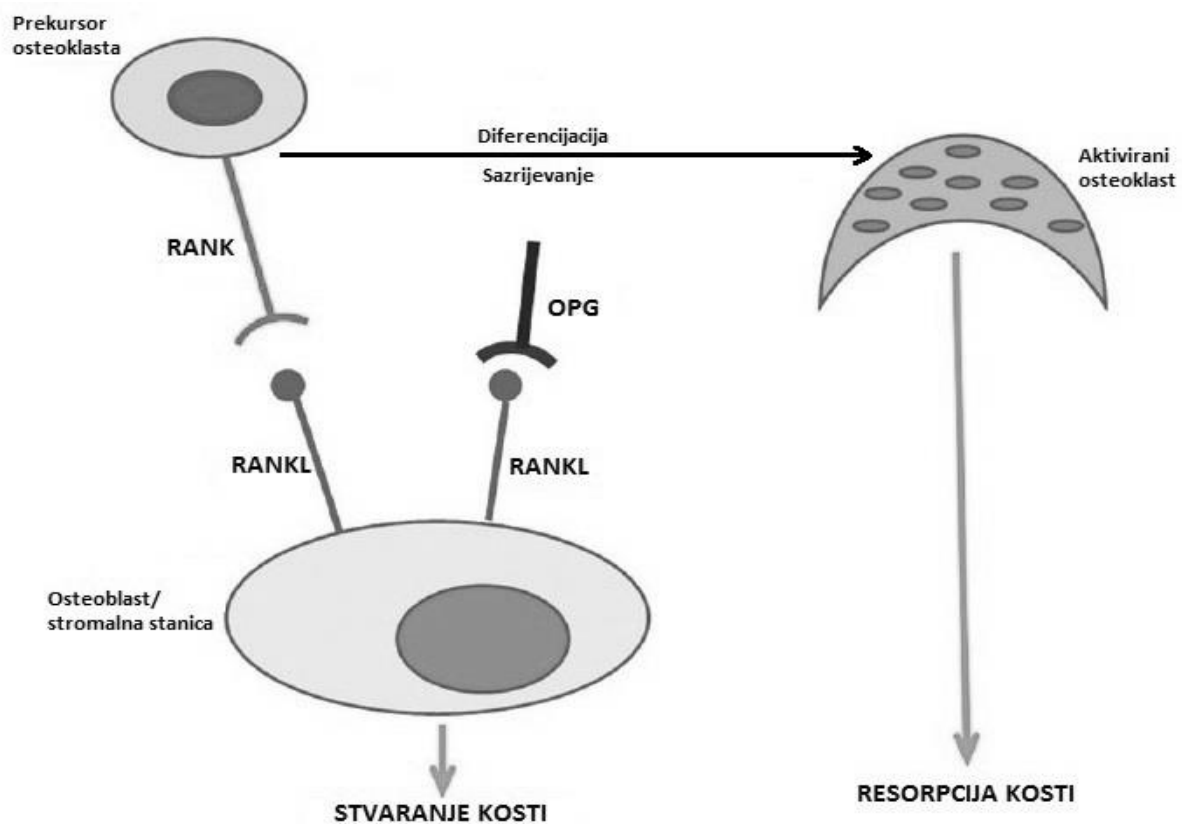
RANK je transmembranski protein homotrimerne građe, koji se sastoji od 616 aminokiselina (19). RANK je eksprimiran na površini monocita, dendritičkih stanica i osteoklasta, čija se ključna uloga u prijenosu RANKL signala u unutrašnjost stanice (9). Vezanjem RANKL-a za RANK protein, dolazi do oligomerizacije receptora i do pomaka nekoliko adaptorskih molekula, uključujući i faktor povezan s čimbenikom tumorske nekroze (eng. *tumor necrosis factor*, TNF) receptorom 6 (TRAF6) na membransko-proksimalni dio RANK receptora. TRAF6 je ključna komponenta u RANK-RANKL signaliziranju. Pomakom TRAF6 na dio RANK receptora dolazi do aktivacije nekoliko signalnih putova, uključujući NF-  $\kappa$ B signalni put, MAP-kinazni i c-Src signalni put. Aktivacija navedenih signalnih putova, nužna je za preživljenje osteoklasta i za poticanje njihovog resorptivnog djelovanja (20, 22). Stimulacijom RANK proteina na površini monocita, dolazi do njihove diferencijacije u osteoklaste,

dok stimulacijom RANK proteina na površini osteoklasta, dolazi do njihove aktivacije. Potpuni nedostatak RANK proteina, očituje se jednakim fenotipom kao i nedostatak RANKL-a, pojavom osteopetroze (9).

### **1.3.3. Osteoprotegerin- OPG**

OPG je glikoproteinska molekula građena od 380 aminokiselina. Pojavljuje se u monomernom i dimernom obliku. U krvi su prisutni i monomerni i dimerni oblik. Dimerni oblik OPG-a ima veću bioaktivnost od monomernog oblika. Zbog svoje veličine, u fiziološkim uvjetima, OPG se uglavnom ne izlučuje bubrezima (21). OPG se sintetizira u brojnim stanicama kao što su osteoblasti, endotelne stanice, vaskularne glatke mišićne stanice, T limfociti, B limfociti, a eksprimiran je i u tkivu reguliraju ekspresiju OPG-a. OPG se ponaša kao topljivi, nesignalizirajući, „lažni“ receptor (prijemnik) za RANKL. Blokirajući povezivanje između RANKL i RANK molekula, OPG inhibira aktivaciju osteoklasta i resorpciju kosti (Slika 1.)(9). RANK-RANKL sustav ima ulogu i u regulaciji međudjelovanja kosti i imunološkog sustava. Limfociti T mogu eksprimirati RANKL i poticati osteoklastogenezu, dok OPG podrijetla limfocita B može neutralizirati RANKL iz T limfocita tijekom imunološkog odgovora. OPG je uključen u regulaciju sazrijevanja limfocita B i učinkovitog imunološkog odgovora protutijelima. OPG pojačava i proangiogena svojstva endotelnih stanica te stanica koje stvaraju endotelne kolonije (eng. *endothelial colony forming cells*; E-CFCs), promovirajući vaskulogenezu *in vivo*. Pretjerana ekspresija OPG-a dovodi do pojave povećanja koštane gustoće (osteopetroze) (21). Nedostatak OPG proteina, rezultira pojačanom, nebalansiranom aktivacijom RANK-RANKL

sustava. Pojačana aktivnost RANK-RANKL sustava dovodi do povećanog stvaranja osteoklasta te pojačane razgradnje kosti uz pojavu osteopenije i osteoporoze (8, 21).



**Slika 1. OPG / RANK / RANKL sustav.** Međusobno povezivanje molekula RANKL i RANK neophodno je za pokretanje procesa osteoklastogeneze. Povezivanjem ovih dviju molekula dolazi do diferencijacije, sazrijevanja i aktivacije osteoklasta. OPG se ponaša kao topljivi, „lažni“ receptor za RANKL. Blokirajući povezivanje između RANKL i RANK molekula, OPG inhibira aktivaciju osteoklasta i resorpciju kosti

*Preuzeto i prilagođeno prema: Kohli SS, Kohli VS, Role of RANKL–RANK/osteoprotegerin molecular complex in bone remodeling and its immunopathologic implications. Indian J Endocrinol Metab. 2011;15:175–81. (22).*



#### 1.4. Poremećaji koštano-mineralnog metabolizma i renalna osteodistrofija

Koštani metabolizam može biti poremećen radi brojnih uzroka. Jedan od uzroka može biti i kronično bubrežno zatajivanje. Kronično bubrežno zatajivanje prisutno je u 8%-16% svjetskog stanovništva, a uključuje i završne stadije bubrežnog zatajivanja koji zahtijevaju ili nadomještaj bubrežne funkcije dijalizom, ili transplantaciju (21). Progresivna bubrežna bolest rezultira pojavom metaboličkih i hormonskih promjena koje narušavaju kvalitetu kosti (24).

Renalna osteodistrofija (eng. *renal osteodystrophy*, ROD) je naziv koji zajednički opisuje različita patofiziološka stanja i mehanizme koji pogađaju koštani sustav bolesnika s kroničnim bubrežnim zatajivanjem (25). Ovaj poremećaj obilježen je abnormalnom koštanom pregradnjom. Koštana pregradnja može biti usporena, normalna i ubrzana, s ili bez poremećaja mineralizacije (24). ROD je najizraženija kod bolesnika kojima se terapijski nadomještava bubrežna funkcija, ali obično započinje u ranijim fazama bubrežnog zatajivanja (25). ROD predstavlja dio šireg, sustavnog poremećaja, poremećaja koštano-mineralnog metabolizma u bolesnika s kroničnom bubrežnom bolesti. Ovaj poremećaj očituje se jednom, ili kombinacijom više navedenih abnormalnosti: 1) abnormalnosti razina kalcija, fosfata, PTH i metabolizma vitamina D, 2) abnormalnosti koštane pregradnje, mineralizacije, volumena, snage i rasta kostiju, 3) kalcificiranje krvnih žila i mekih tkiva (24). Klinički najvažnije značajke ROD su niska koštano-mineralna gustoća te smanjena mehanička snaga kosti, što povećava rizik za nastanak prijeloma uz posljedično povećanje stope morbiditeta i mortaliteta. Osobe u terminalnom stadiju kronične bubrežne bolesti imaju četiri puta veći rizik za nastanak prijeloma, nego što to imaju osobe u općoj populaciji (26).

Glavni patofiziološki mehanizmi koji su uključeni u pojavu ROD-a kod bolesnika s kroničnim bubrežnim zatajivanjem su pojava hiperfosfatemije, hipokalcijemije, uz poremećaj sinteze vitamina D. Hipokalcijemija izravno deaktivira CaSR receptor, što potiče otpuštanje PTH. Samo nekoliko minuta nakon pada koncentracije kalcija dolazi do povišenja plazmatske koncentracije PTH. Niska koncentracija kalcija koja traje tjednima i mjesecima dovodi do razvoja hiperplazije paratiroidne žlijezde, što je izražena značajka u hiperparatiroidizmu (25). U početnim stadijima bubrežnog zatajivanja ne dolazi do hiperfosfatemije, zato što kompenzatorni hiperparatiroidizam potiče ekskreciju fosfora i odražavanje razina serumskog fosfora unutar normalnih vrijednosti. Do hiperfosfatemije dolazi kada se bubrežna funkcija smanji za više od 25% do 40% u odnosu na normalne vrijednosti. Padom glomerularne filtracije dolazi do retencije fosfata, što dovodi vodi prema sniženju razine slobodnog serumskog kalcija. Niska razina kalcija predstavlja dodatni poticaj za lučenje PTH, uz kaskadno pokretanje procesa resorpcije kosti. Kako je bubreg glavno mjesto stvaranja kalcitriola, biološki najaktivnijeg oblika vitamina D, u kroničnoj bubrežnoj bolesti dolazi do smanjenog stvaranja ovog vitamina. Vitamin D ima nekoliko izravnih i neizravnih utjecaja na paratiroidnu žlijezdu. Vitamin D ima izravne učinke na paratiroidnu žlijezdu suprimirajući sintezu i sekreciju PTH, uz ograničavanje rasta paratiroidnih stanica. U kroničnoj bubrežnoj bolesti smanjen je i broj receptora za vitamin D u paratiroidnoj žlijezdi, što dovodi do povećane ekspresije i sekrecije PTH. Indirektno, niske koncentracije vitamina D mogu poticati proliferaciju stanica paratiroidne žlijezde, dovodeći do sekundarnog hiperparatiroidizma (25).

Vrste koštanih abnormalnosti kod ROD-a možemo razlikovati prema stanju kosti te prema stupnju koštane pregradnje. Visoka razina koštane pregradnje rezultira pojavom cistične bolesti kostiju (lat. *osteitis fibrosa cystica*). Nastanak cistične bolesti

kostiju odražava stanje hiperparatiroidizma. PTH potiče koštanu demineralizaciju i dovodi do visoke razine (ubrzane) koštane pregradnje. Cistična bolest kostiju očituje se povećanom aktivnošću i brojem osteoblasta, osteoklasta, uz visok stupanj stvaranja i razgradnje kosti. Važna značajka cistične bolesti kostiju je i prisutnost progresivne endostealne i peritrabekularne fibroze (25, 27). Niska razina koštane pregradnje rezultira pojavom osteomalacije i adinamične bolesti kostiju. Osteomalacija je oblik ROD-a koji proizlazi iz poremećaja koštane pregradnje, udruženog s poremećenom mineralizacijom novostvorenog osteoida. Osteomalacija se histološki očituje pojavom velike količine nemineraliziranog osteoida, u obliku širokih osteoidnih pukotina (25, 28). Osteomalacija je povezana s izlaganjem aluminiju, posebice pri dugotrajnom trajanju dijalize. Kasnije je otkriveno kako aluminij nakupljen u kosti čini kost otpornom na djelovanje vitamina D (27, 29). Pojam adinamične bolesti kostiju uključuje stanja kao što su osteopenija i osteoporoza. Osteopenija predstavlja smanjenu koštanu gustoću te često prethodi osteoporozi. Osteopenija nije bolest, nego predstavlja samo čimbenik rizika za prijelom što je i njezina glavna razlika u odnosu na osteoporozu. Osteoporoza je bolest obilježena smanjenom aktivnošću i brojem koštanih stanica, uz posljedično smanjenje stupnja koštane pregradnje. Histološki, osteoporoza nalikuje na osteomalaciju, dok glavnu razliku predstavlja odsutnost osteoidnih pukotina, prisutnih u osteomalaciji (27).

U protekla dva desetljeća, bilježi se pad prevalencije ROD-a s visokim stupnjem koštane pregradnje, dok se ROD s niskom koštanom pregradnjom pojačano prepoznaje (25). Ovi trendovi vjerojatno odražavaju promjene u liječenju ROD-a, kao i promjene u tehnici dijalize.

## 2. HIPOTEZA I SVRHA RADA

Hipoteza ovog diplomskog rada je da omjer serumske vrijednosti RANKL/OPG sustava bolje korelira s PTH vrijednostima, nego li zasebno mjerenje tih čimbenika te da bi takva analiza bila precizniji prediktori stanja koštanog sustava. Nadalje, hipoteza ovog istraživanja je da serumske vrijednosti OPG i sRANKL ovise o terapiji vitaminom D u bubrežnih bolesnika i primatelja bubrežnog transplantata.

Kako bismo ostvarili ovu hipotezu postavljena su dva cilja:

1. Istražiti da li omjer serumskih vrijednosti RANKL/OPG korelira sa serumskim vrijednostima PTH u ispitanika s kroničnom bubrežnom bolesti stadij 5 (hemodijalizirani) te u transplantiranih ispitanika.
2. Istražiti da li serumske vrijednosti OPG i sRANKL ovise o terapiji vitaminom D ispitanika s kroničnom bubrežnom bolesti stadij 5 (hemodijalizirani) te u transplantiranih ispitanika.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Ispitanici i osnovni podaci

U ovo istraživanje je bilo uključeno ukupno 120 pacijenata liječenih u Kliničkom bolničkom centru Rijeka. Pacijenti su prema stanju bubrežne funkcije bili podijeljeni u dvije skupine; skupinu pacijenata na hemodijalizi (HD) te skupinu primatelja bubrega. U skupinu pacijenata na HD su bili uključeni svi pacijenti koji redovno bili hemodijalizirani tri puta tjedno u ukupnom trajanju od 12 sati. Pacijenti su bili dijalizirani ili visokoprotlačnom HD s polisulfonskim membranama, ili su bili podvrgnuti *on-line* hemodijafiltraciji s bikarbonatnim dijalizatom. Svi pacijenti na HD su primali popratnu terapiju. Jedan dio pacijenata je bio na popratnoj terapiji kalcijevim karbonatom, dok su drugi dobivali kalцитriol, ili kombinaciju kalcijevog karbonata i kalцитriola.

Primatelji bubrega su u istraživanje bili uključeni u trenutku transplantacije te su bili praćeni 12 mjeseci nakon transplantacije. Prije operativnog zahvata pacijenti iz grupe transplantiranih su bili hemodijalizirani, ali su bili isključeni iz skupine HD pacijenata. Razlozi za isključivanje ovih pacijenata iz HD skupine su razlika u trajanju HD, dob te vrijednosti PTH. Svi pacijenti su imali stabilnu funkciju presatka (vrijednost serumskog kreatinina-  $1,5 \pm 0,3$  mg/dl). Imunosupresivna terapija je uključivala prednizon, mikofenolat-mofetil i takrolimus. U isto vrijeme je bila proučavana i skupina zdravih pojedinaca koji su odgovarali prema dobi i spolu. Uključni kriteriji za ovu skupinu su bili odsutnost koštane i bubrežne bolesti te neuzimanje lijekova koji utječu na normalno stvaranje kostiju i na vrijednosti PTH (Tablica 1.).

Isključni kriteriji za pristupanje istraživanju su bili: akutna infekcija, maligna bolest, peritonejska dijaliza, paraplegija, izloženost aluminiju, hipoalbuminemija, akutno bubrežno zatajenje, poremećaj jetrene funkcije, paratiroidektomija i transplantacija

bubrega (za skupine pacijenata s kroničnim bubrežnim zatajivanjem). Pacijenti nisu primali kortikosteroide (osim transplantiranih), nesteroidne antireumatike, antikoagulate, estrogene ili androgene. Istraživanje je odobreno od strane etičkog povjerenstva i pismeni informirani pristanak je dobiven od svih sudionika.

**Tablica 1.** Osnovne karakteristike pacijenata po skupinama

<b>Karakteristike pacijenata</b>	<b>kontrola (N=40)</b>	<b>HD (N=90)</b>	<b>Tx12 (N=30)</b>
<b>muškarci/žene</b>	20/20	45/45	14/16
<b>dob (godine)</b>	55 (32-70)	64 (38-89)	49 (28-67)
<b>trajanje dijalize (mjeseci)</b>	-	69±57	94±86,6

### 3.2. Uzimanje venske krvi

Sudionicima istraživanja je uzimana venska krv ujutro, nakon što su preko noći bili natašte. Pacijentima na hemodijalizi je krv uzeta prilikom uključivanja u istraživanje te 12 mjeseci nakon. Grupi transplantiranih je krv uzeta 12 mjeseci nakon transplantacije, i u daljnjem tekstu je ova skupina označena s Tx12. Uzorci su bili centrifugirani kako bi se odvojila plazma od stanica i pohranjeni na -80°C. Nije bilo ciklusa ponovnih otapanja i zamrzavanja.

### 3.3. Laboratorijska mjerenja

Mjerenje razina kreatinina, ukupnog kalcija, ioniziranog kalcija, fosfata i albumina je odrađeno u Kliničkom bolničkom centru Rijeka, koristeći automatski analizator (Olympus Apparatus, Rungis, France). iPTH je mjeren uz pomoć

IMMULITE/IMMULITE 1000 Intact PTH (Siemens Medical Solution Diagnostics, Deerfield, USA). Serumski OPG i sRANKL su bili mjereni komercijalno dostupnim kitovima Biomedica (Biomedica Gruppe, Wien, Austria).

### **3.4. Statistička analiza podataka**

Kako bismo istražili omjer serumske vrijednosti RANKL/OPG u odnosu na visinu iPTH podijelili smo serumske razine iPTH na normalni (<11 pmol/l), srednje povišen (11-33 pmol/l) i visoki (>33 pmol/l) iPTH.

Dobiveni podaci izraženi su kao median i raspon, te aritmetička sredina i standardna devijacija. Pri statističkoj obradi podataka korištena je analiza varijance (ANOVA) te Kruskal-Wallis test. Razina od  $P < 0,05$  smatra se statistički značajnom. Postupci statističke raščlambe učinjeni su pomoću računalnog programa STATISTICA® 8 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Vrijednosti koštanih markera u ispitivanim skupinama

Osnovne karakteristike ispitanika i vrijednosti koštanih markera prikazane su u Tablici 2. Skupina ispitanika na HD imala je statistički značajno više vrijednosti AP, OPG, sRANKL i iPTH u usporedbi s kontrolnom i Tx12 skupinom ( $P < 0,05$ ).

**Tablica 2.** Karakteristike ispitanika i vrijednosti koštanih markera

Karakteristike pacijenata	kontrola (N=40)	HD (N=90)	Tx12 (N=30)
muškarci/žene	20/20	45/45	14/16
dob (godine)	55 (32-70)	64 (38-89)	49 (28-67)
trajanje dijalize (mjeseci)	-	69±57	94±86,6
terapija vitaminom D	-	90 (100%)	-
CaxPO4 (mmol/l)	5.48	4.38	4.82
ukupna AP (IU/ml)	58.29 (28.12-86.04)	97.94* (49.09-492.11)	49.54 (29.32-87.07)
OPG (pmol/l)	4.78 (1.71-9.09)	13.88* (4.33-26.68)	5.22 (2.87-14.26)
sRANKL (pmol/l)	0.41 (0.13-2.21)	2.83* (0.14-6.85)	0.35 (0.11-3.22)
iPTH (pmol/l)	5.2 (2.89-14.07)	33.85* (8.24-263.41)	11.96 (2.39-49.6)
Uzrok bubrežnog zatajenja:			
kronični		42 (47%)	15 (50%)



<b>glomerulonefritis</b>			
<b>kronični intersticijski nefritis</b>		21 (23%)	6 (20%)
<b>policistična bolest bubrega</b>		10 (11%)	6 (20%)
<b>dijabetička nefropatija</b>		8 (9%)	-
<b>ostalo ili nepoznato</b>		9 (10%)	3 (10%)

#### 4.2. Razine iPTH u ispitivanim skupinama

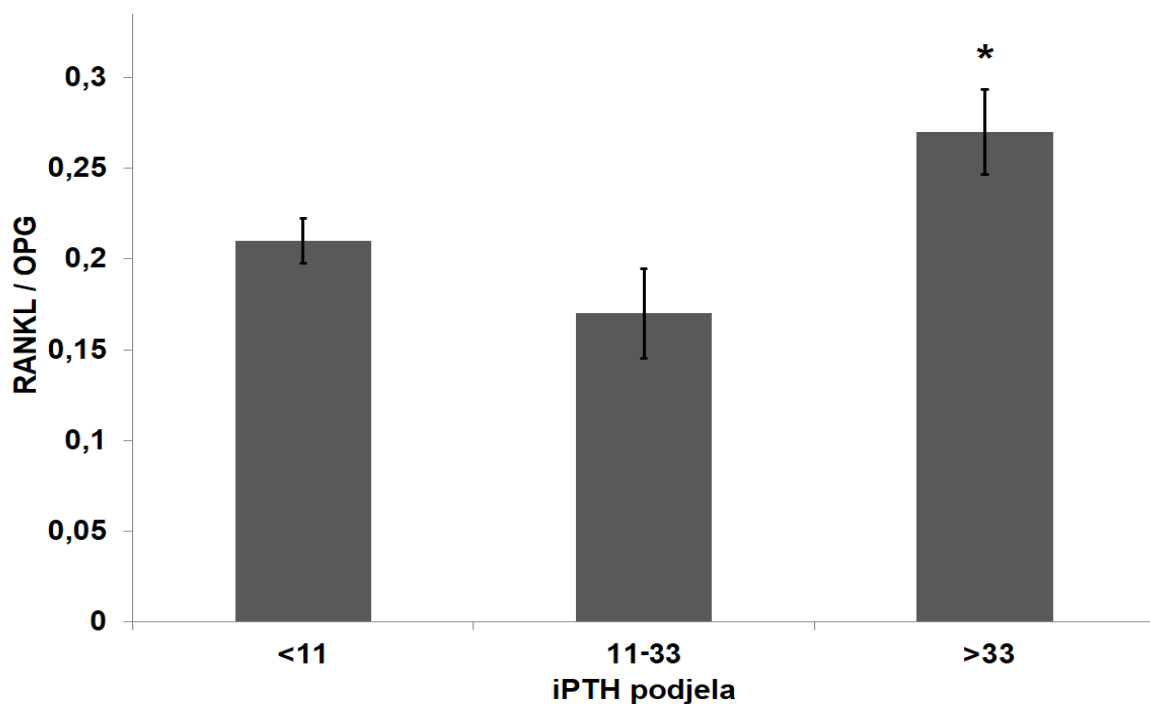
Podijelili smo pacijente svake skupine prema izmjerenim vrijednostima iPTH na niži, srednji i viši tercil (<11, 11 - 33, >33 pmol/l). Kod skupine pacijenata na HD, 16% pacijenata je bilo unutar nižeg, 40% unutar srednjeg i 44% unutar višeg tercila. U Tx12 skupini, 20% pacijenata je bilo unutar nižeg, dok je ostalih 80% bilo unutar srednjeg tercila. Kod kontrolne skupine su svi bili unutar nižeg tercila (Tablica 3.).

**Tablica 3.** Razine iPTH u ispitivanim skupinama

	<b>iPTH &lt;11pmol/l</b>	<b>iPTH 11-33pmol/l</b>	<b>iPTH &gt;33pmol/l</b>
<b>kontrola</b>	100%	-	-
<b>HD</b>	16%	40%	44%
<b>Tx12</b>	20%	80%	-

#### 4.3. OPG/RANKL u odnosu na normalni, srednje povišen i visoki PTH u hemodijaliziranih ispitanika, primatelja bubrežnog transplantata i zdravih kontrola

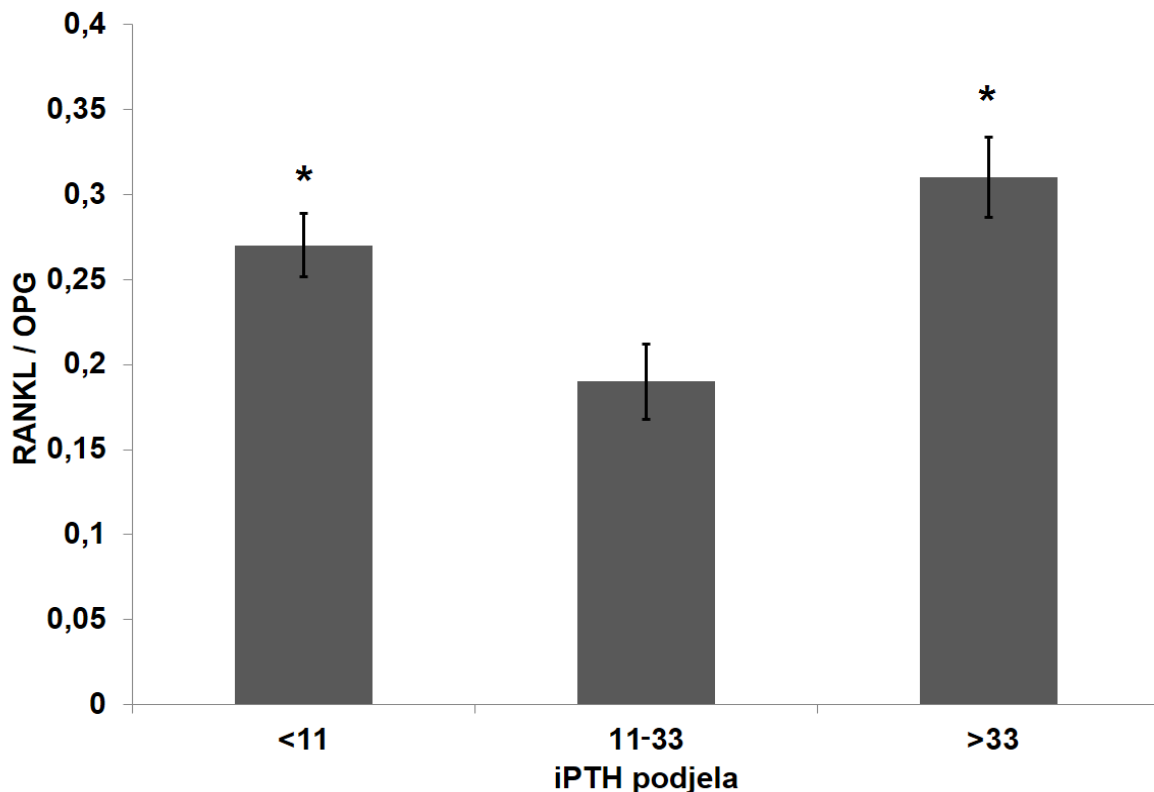
Slika 2. pokazuje serumske vrijednosti omjera RANKL/OPG u ispitanika s kroničnom bubrežnom bolesti stadij 5 (hemodijalizirani), primatelja bubrežnog transplantata i zdravih kontrola u odnosu na serumske vrijednosti iPTH. Razina serumske vrijednosti omjera RANKL/OPG statistički je značajno viša u ispitanika s iPTH >33 pmol/l u odnosu na ispitanike sa srednjim vrijednostima iPTH, 11-33 pmol/l ( $P < 0.05$ ). U ispitanika s normalnim vrijednostima iPTH (<11 pmol/l), nema značajne razlike u vrijednosti RANKL/OPG, u odnosu na srednje povišen i visok iPTH.



Slika 2. Serumska razina omjera RANKL/OPG (pmol/l) u ispitanika s kroničnom bubrežnom bolesti stadija 5 (hemodijalizirani), primatelja bubrežnog transplantata i zdravih kontrola u ovisnosti o razini iPTH (pmol/l). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$  značajno više razine, u odnosu na skupinu s iPTH 11-33pmol/l.

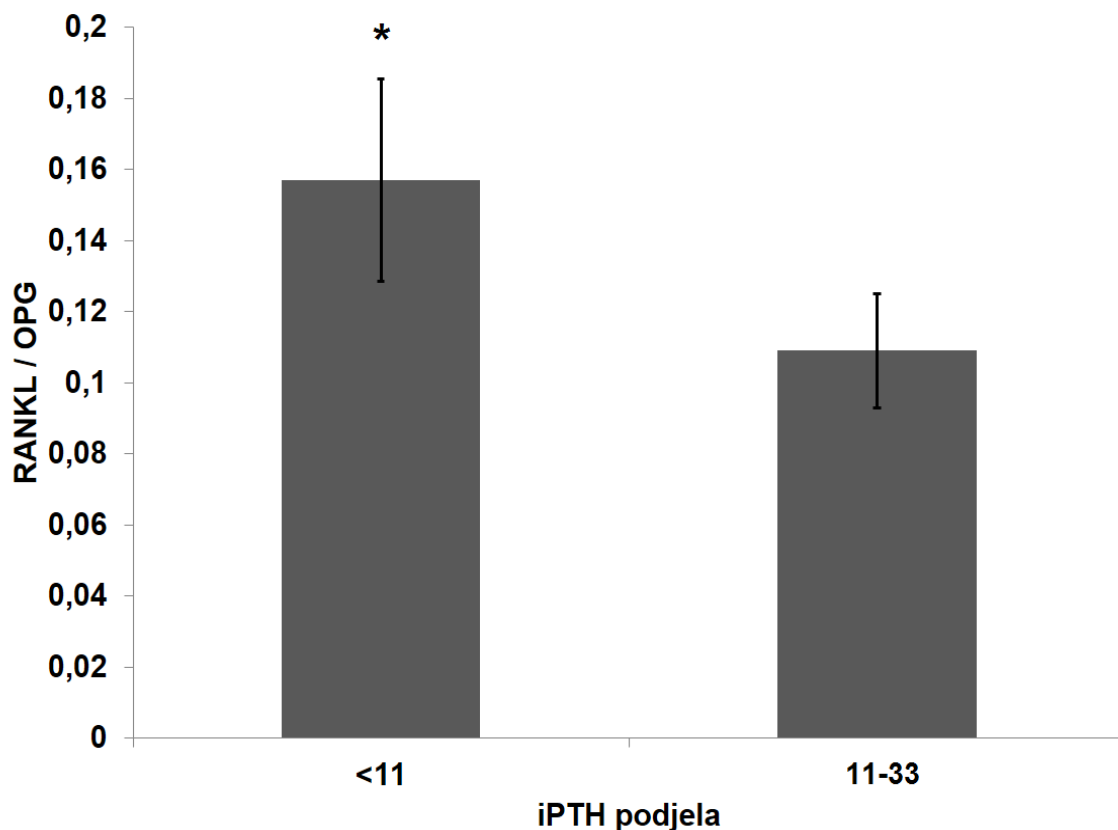
#### 4.4. OPG/RANKL u odnosu na normalni, srednje povišen i visoki PTH u hemodijaliziranih ispitanika i primatelja bubrežnog transplantata

Slika 3. pokazuje serumske vrijednosti RANKL/OPG u ispitanika s kroničnom bubrežnom bolesti stadij 5 (hemodijalizirani), u odnosu na serumske vrijednosti iPTH. Razina serumske vrijednosti omjera RANKL/OPG statistički je značajno viša u ispitanika s iPTH <11pmol/l te u ispitanika s iPTH >33 pmol/l, u odnosu na ispitanike sa srednjim vrijednostima iPTH, 11-33 pmol/l ( $P < 0.05$ ). U ispitanika s normalnim vrijednostima iPTH, <11pmol/l nije nađena značajna razlika u serumskoj vrijednosti RANKL/OPG, u odnosu na srednje povišen i visok iPTH.



**Slika 3. Serumna razina omjera RANKL/OPG (pmol/l) u ispitanika s kroničnom bubrežnom bolesti stadija 5 (hemodijalizirani) u ovisnosti o razini iPTH. Stupci predstavljaju srednje vrijednosti  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$  značajno više razine, u odnosu na skupinu s iPTH 11-33pmol/l.**

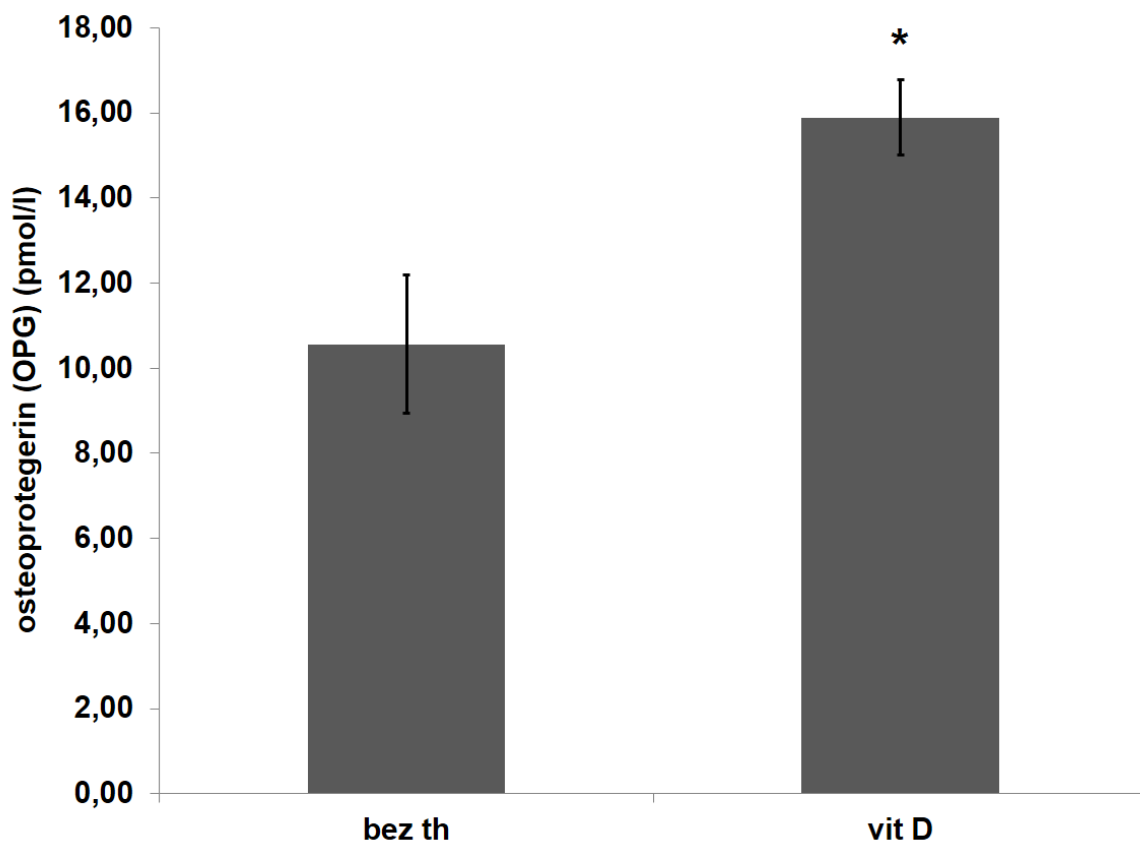
Slika 4. pokazuje serumske vrijednosti omjera RANKL/OPG u primatelja bubrežnog transplantata, u odnosu na serumske vrijednosti iPTH. Razina serumske vrijednosti omjera RANKL/OPG statistički je značajno viša u ispitanika s iPTH <11pmol/l, u odnosu na ispitanike sa srednjim vrijednostima iPTH, 11-33 pmol/l ( $P < 0.05$ ).



**Slika 4. Serumska razina omjera RANKL/OPG (pmol/l) u primatelja bubrežnog transplantata u ovisnosti o razini iPTH. Stupci predstavljaju srednje vrijednosti  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$  značajno više razine, u odnosu na skupinu sa iPTH 11-33pmol/l.**

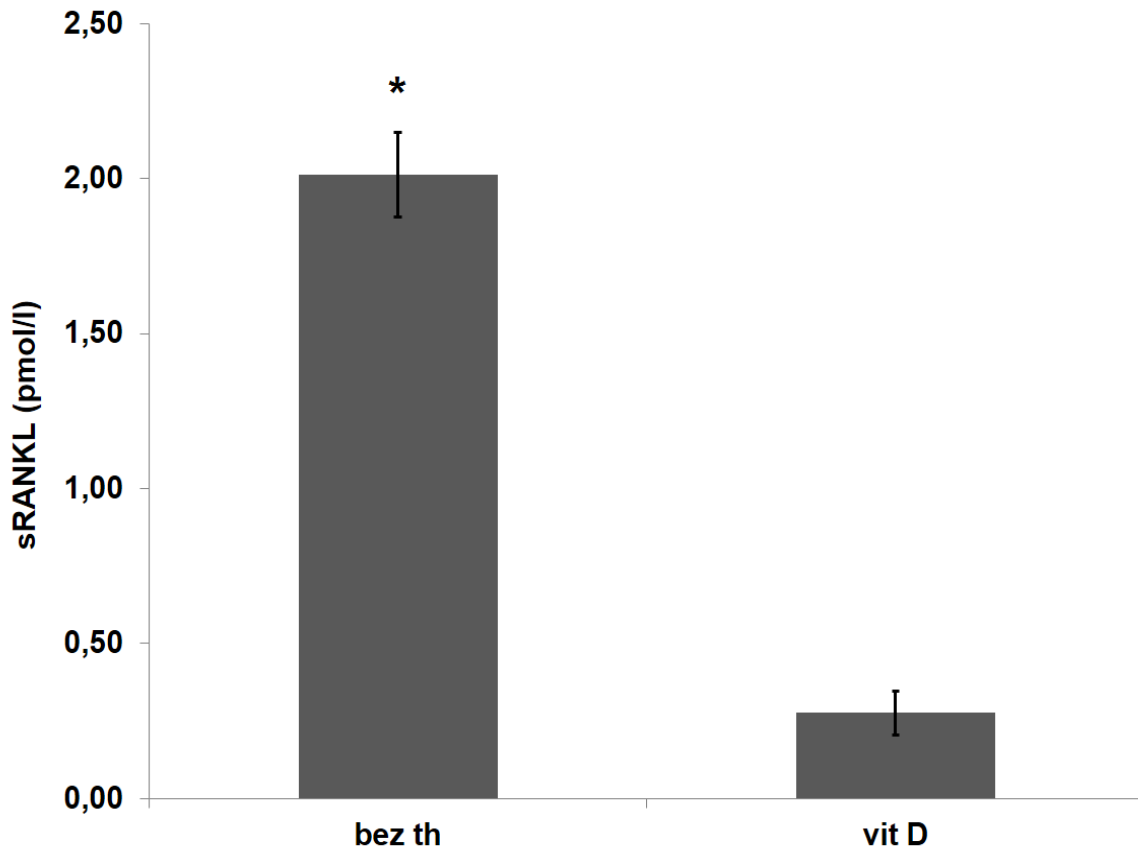
#### 4.5. Serumske razine OPG i RANKL u odnosu na terapiju vitaminom D u hemodijaliziranih ispitanika i primatelja bubrežnog transplantata

Slika 5. prikazuje razine osteoprotegerina u ispitanika s kroničnom bubrežnom bolesti stadij 5 (hemodijalizirani) i primatelja bubrežnog transplantata bez terapije vitaminom D, u odnosu na terapiju vitaminom D. Razina serumske vrijednosti osteoprotegerina je statistički značajno viša u ispitanika na terapiji vitaminom D, u odnosu na skupinu bez terapije ( $P < 0.05$ ).



**Slika 5. Serumska razina osteoprotegerina (OPG) (pmol/l) u odnosu na terapiju vitaminom D u hemodijaliziranih ispitanika i primatelja bubrežnog transplantata.** Stupci predstavljaju srednje vrijednosti  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$  značajno više razine, u odnosu na skupinu bez terapije vitaminom D.

Slika 6. prikazuje razine sRANKL-a u ispitanika s kroničnom bubrežnom bolesti stadij 5 (hemodijalizirani) i primatelja bubrežnog transplantata bez terapije vitaminom D, u odnosu na terapiju vitaminom D. Razina serumske vrijednosti sRANKL-a je statistički značajno viša u ispitanika bez terapije vitaminom D, u odnosu na ispitanike na terapiji vitaminom D ( $P < 0.05$ ).



**Slika 6. Serumska razina sRANKL-a (pmol/l) u odnosu na terapiju vitaminom D u hemodijaliziranih ispitanika i primatelja bubrežnog transplantata. Stupci predstavljaju srednje vrijednosti  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$  značajno više razine, u odnosu na skupinu na terapiji vitaminom D.**

## 5. RASPRAVA

U ovom radu istraživana je utjecaj serumskih vrijednosti iPTH na vrijednost omjera RANKL/OPG u ispitanika s kroničnom bubrežnom bolesti stadij 5 (hemodijalizirani) i u transplantiranih ispitanika, kao i da li serumske vrijednosti OPG i sRANKL-a ovise o terapiji vitaminom D kod ispitanika s kroničnom bubrežnom bolesti stadija 5 (hemodijalizirani) te u transplantiranih ispitanika. Pregledom literature, uočeno je kako se tek mali broj radova odnosi na istraživanje omjera RANKL/OPG uopće, dok za utjecaj istog ovog omjera na ispitanike s kroničnom bubrežnom bolesti stadij 5 (hemodijalizirani) i na transplantirane nije pronađeno sličnih istraživanja. Omjer RANKL/OPG se kroz literaturu spominje kao biljeg koji dobro korelira sa stupnjem kalcifikacije koronarnih arterija, sa stanjem koštanog metabolizma kod terapije kortikosteroidima, ili kao biljeg stanja cijeljenja koštanih prijeloma (31-33).

Naši rezultati pokazuju kako je omjer RANKL/OPG značajno viši kod vrijednosti iPTH >33 pmol/l, kada analiziramo sve ispitivane skupine zajedno (skupina na HD, Tx12 i kontrola), što je očekivano s obzirom na djelovanje iPTH. iPTH povećava ekspresiju RANKL-a i smanjuje ekspresiju OPG-a, dovodeći tako do kataboličkog/osteklastičnog učinka na kost (34, 35).

Analizom ispitanika s kroničnom bubrežnom bolesti stadij 5 (HD), u odnosu na serumske vrijednosti iPTH, uočeno je kako je razina serumske vrijednosti RANKL/OPG statistički je značajno povišena u ispitanika s iPTH <11pmol/l te u ispitanika s iPTH >33 pmol/l, u odnosu na ispitanike sa srednjim vrijednostima iPTH, 11-33 pmol/l. Očekivano je da pri višim vrijednostima iPTH, dolazi do porasta vrijednosti omjera RANKL/OPG pa ostaje nejasno zašto kod ispitanika sa srednjim vrijednostima iPTH, 11-33pmol/l, imamo niže vrijednosti RANKL/OPG omjera.

Nadalje, rezultati su pokazali kako su kod primatelja bubrežnog transplantata (Tx12), razine serumske vrijednosti RANKL/OPG značajno povišene u ispitanika s iPTH <11pmol/l, u odnosu na ispitanike sa srednjim vrijednostima iPTH, 11-33 pmol/l. Ovakva obrnuta povezanost razine iPTH i omjera RANKL/OPG, mogla bi biti objašnjena PTH-ovisnom aktivacijom anaboličkog puta, ili intermitentnom sekrecijom iPTH, koja dovodi do smanjenja koštane resorpcije, vidljive iz sniženih vrijednosti omjera RANKL/OPG (36). Naime, poznato je kako egzogeno uneseni PTH može imati osteoblastični i osteoklastični učinak, ovisno o načinu i duljini trajanja primjene PTH (34, 37). Osim navedenog, umjereno kronično povećanje razine PTH povećava broj osteoblasta i formiranje kostiju. To se djelom događa indirektno, putem stimulacije resorpcije kosti, kada dolazi do oslobađanja čimbenika rasta ugrađenih u koštani matriks, uz posljedičnu promociju osteoblastogeneze (38).

Analizom serumske razine OPG-a u hemodijaliziranih ispitanika i primatelja bubrežnog transplantata u odnosu na terapiju vitaminom D, uočena je statistički značajno viša razina OPG-a u ispitanika na terapiji vitaminom D, u odnosu na skupinu bez terapije. Lipe B et al. navode slične rezultate u svojoj studiji te su takvi rezultati očekivani i u skladu s dosadašnjim spoznajama o utjecaju vitamina D na koštani metabolizam (39, 40).

Uz analizu serumske razine OPG-a, u ovisnosti o terapiji vitaminom D, analizirali smo i serumske razine sRANKL-a u hemodijaliziranih ispitanika i primatelja bubrežnog transplantata u odnosu na terapiju vitaminom D. Uočena je statistički značajno viša razina serumske vrijednosti sRANKL-a u ispitanika koji nisu primali terapiju vitaminom D, nego li je slučaj s ispitanicima na terapiji vitaminom D. Luo J et al. su istraživali utjecaj vitamina D na RANKL signalni put. Prema njihovim rezultatima, RANKL je bio značajno snižen u skupini koja je primala vitamin D, u



odnosu na ostale skupine bez terapije vitaminom D (41). S obzirom na utjecaj vitamina D na koštani metabolizam, ali i antagonistički učinak OPG-a i sRANKL-a, bilo je očekivano, kako će oni ispitanici, koji nisu primali terapiju vitaminom D imati značajno više vrijednosti sRANKL-a zbog veće resorpcije kosti (42-45).

## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata ovog istraživanja, utvrđeno je nekoliko činjenica:

1. Osobe na hemodijalizi imaju značajno više razine AP, OPG, sRANKL i iPTH, u odnosu na osobe s transplantiranim bubregom (Tx12) i na osobe bez bubrežne bolesti. Prema navedenom, osobe s kroničnom bubrežnom bolesti imaju poremećaj koštano-mineralnog metabolizma, koji se ispravlja nakon što transplantirani bubreg nadomjesti poremećenu funkciju bubrega na koštano-mineralni metabolizam.

2. Hemodijalizirani ispitanici i primatelji bubrežnog transplantata na terapiji vitaminom D imaju značajno više razine OPG-a, uz značajno niže razine sRANKL-a, u odnosu na ispitanike bez terapije vitaminom D. Ovi rezultati govore u prilog povoljnog učinka vitamina D na koštano-mineralni metabolizam i na očuvanje koštane mase u ispitanika na HD i primatelja bubrežnog transplantata.

3. Omjer razina serumskih vrijednosti RANKL/OPG, mogao bi bolje korelirati s PTH vrijednostima, nego li zasebno mjerenje tih čimbenika. Ostaje nejasno zašto je omjer RANKL/OPG bio najniži u umjereno povišenim vrijednostima iPTH (11-33 pmol/l) kod hemodijaliziranih ispitanika i primatelja bubrežnog transplantata. Prema navedenom, potrebno je provesti dodatna istraživanja, kako bismo dobili odgovor na ovo pitanje.

## 7. SAŽETAK

Kost je složeno, organizirano tkivo koje se sastoji od mineralne i organske tvari. To je i izrazito dinamično tkivo, što se očituje neprestanom pregradnjom. Osteoblasti su koštane stanice koje stvaraju novu kost, dok su osteoklasti koštane stanice odgovorne za razgradnju već stvorene kosti. Ključnu ulogu u regulaciji koštane pregradnje ima OPG/RANKL/RANK sustav, koji se sastoji od glikoproteinske molekule RANKL, njezinog srodnog receptora RANK te „lažnog“ receptora OPG. Renalna osteodistrofija je naziv za različita patofiziološka stanja koja pogađaju koštani sustav bolesnika s kroničnim bubrežnim zatajivanjem. Glavni patofiziološki mehanizmi koji su uključeni u pojavu renalne osteodistrofije su pojava hiperfosfatemije, hipokalcijemije, uz poremećaj sinteze vitamina D. Prema rezultatima ovog istraživanja, osobe na hemodijalizi imaju značajno više razine AP, OPG, sRANKL i iPTH, u odnosu na osobe s transplantiranim bubregom (Tx12) i na osobe bez bubrežne bolesti. Hemodijalizirani ispitanici i primatelji bubrežnog transplantata na terapiji vitaminom D imaju značajno više razine OPG-a, uz značajno niže razine sRANKL-a. Ovi rezultati govore u prilog povoljnog učinka vitamina D na očuvanje koštane mase u ispitanika na HD i primatelja bubrežnog transplantata. Omjer razina serumskih vrijednosti RANKL/OPG, mogao bi bolje korelirati s PTH vrijednostima, nego li zasebno mjerenje tih čimbenika, ali ostaje nejasno zašto je omjer RANKL/OPG najniži u umjereno povišenim vrijednostima iPTH pa je potrebno je provesti dodatna istraživanja, kako bismo dobili odgovor na ovo pitanje.

Ključne riječi: Hemodijaliza; Kronična bubrežna bolest; Renalna osteodistrofija; Transplantacija bubrega; Vitamin D

## 8. SUMMARY

Bone is a complex, organized tissue that consists of both, mineral and organic substances. It is also a highly dynamic tissue that is manifested by continuous bone remodeling. Osteoblasts are bone cells that create new bone, while osteoclastic bone cells are responsible for the resorption of the already created bone. OPG/RANKL/RANK system plays a key role in bone remodeling regulation. This system is consisting of the RANKL glycoprotein molecule, its related RANK receptor, and OPG as the "decoy receptor". Renal osteodystrophy is a name for various pathophysiological conditions affecting the bone of patients with chronic renal failure. The main pathophysiological mechanisms present in renal osteodystrophy are hyperphosphatemia, hypocalcemia, with vitamin D synthesis disorders. According to the results of this study, patients on hemodialysis had significantly higher levels of AP, OPG, sRANKL and iPTH compared to transplanted kidney recipients (Tx12) and those with no renal disease. Patients on hemodialysis and transplanted kidney recipients on vitamin D therapy had significantly higher levels of OPG, with significantly lower sRANKL levels. These results suggest the beneficial effect of vitamin D on bone mass loss prevention in patients on hemodialysis and in kidney transplant recipients. The RANKL/OPG serum level ratio could be better correlated with iPTH values than a separate measurement of these factors, but it remains unclear why the RANKL/OPG ratio is low in moderately elevated iPTH values and further research is needed in order to get the answer to this question.

Keywords: Chronic Renal Insufficiency; Hemodialysis; Kidney Transplantation; Renal Osteodystrophy; Vitamin D

## 9. LITERATURA

1. Vannucci L, Fossi C, Quattrini S, Guasti L, Pampaloni B, Gronchi G et al. Calcium Intake in Bone Health: A Focus on Calcium-Rich Mineral Waters. *Nutrients* 2018;10:1930. doi:10.3390/nu10121930
2. Goltzman D, Mannstadt M, Marcocci C. Physiology of the Calcium-Parathyroid Hormone-Vitamin D Axis. *Front Horm Res.* 2018;50:1-13. doi: 10.1159/000486060
3. Young MF. Skeletal Biology: Where Matrix meets Mineral. *Matrix Biol.* 2016;52-54:1-6. doi:10.1016/j.matbio.2016.04.003
4. Wang X, Xu H, Huang Y, Gu S, Jiang JX. Coupling Effect of Water and Proteoglycans on the in situ Toughness of Bone. *J Bone Miner Res.* 2016; 31:1026-9. doi:10.1002/jbmr.2774
5. Đudarić L, Zoričić Cvek S, Cvijanović O, Fužinac-Smojver A, Čelić T, Martinović D. Osnove biologije koštanog tkiva/The basics of bone biology. *Med. Flum.* 2014;50:21-38.
6. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell Biology of bone Metabolism. *J Clin Pathol.* 2008;61:577-87. doi:10.1136/jcp.2007.048868
7. Gršković A, Čelić T, Fučkar D, Markić D, Trošelj M, Bobinac D. Increased Bone Turnover Markers after Renal Transplantation. *Coll. Antropol.* 2010;34:145-8.
8. Kiechl S, Werner P, Knoflach M, Furtner M, Willeit J, Schett G. The osteoprotegerin/RANK/RANKL system: a bone key to vascular disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2006;4:801-11. doi: 10.1586/14779072.4.6.801

9. Trouvin A-P, Goëb V. Receptor Activator of Nuclear Factor- $\kappa$ B Ligand and Osteoprotegerin: Maintaining the Balance to prevent bone loss. *Clin Interv Aging*. 2010;5:345-54. doi: 10.2147/CIA.S10153
10. Chiang C. The use of bone Turnover Markers in Chronic Kidney Disease-mineral and bone Disorders. *Nephrology* 2017;22:11-3. doi: 10.1111/nep.13014
11. Kazama JJ, Wakasugi M. Parathyroid Hormone and Bone in Dialysis Patients. *Ther Apher Dial*. 2018;22:229-35. doi: 10.1111/1744-9987.12678
12. Kumar R, Thompson JR. The Regulation of Parathyroid Hormone Secretion and Synthesis. *Am Soc Nephrol*. 2011;22:216–224. doi: 10.1681/ASN.2010020186
13. Guyton, Arthur C., Hall, John E. *Medicinska fiziologija: udžbenik*. 12. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada, 2012.
14. Vervloet MG, Brandenburg VM. Circulating markers of bone turnover. *J Nephrol*. 2017;30:663-70. doi: 10.1007/s40620-017-0408-8
15. Sharma U, Pal D, Prasad R. Alkaline Phosphatase: An Overview. *Ind J Clin Biochem*. 2014;29:269-78. doi: 10.1007/s12291-013-0408-y
16. Hlaing TT, Compston JE. Biochemical Markers of bone Turnover – uses and Limitations. *Ann Clin Biochem*. 2014;51:189-202. doi: 10.1177/0004563213515190
17. Mokhtar GM, Gawad Tantawy AA, Al-Saeed Hamed A, Moneam Adly AA, RahmanIsmail EA, Makkeyah SM. Tartrate-Resistant Acid Phosphatase 5b in Young Patients With Sickle Cell Disease and Trait Siblings: Relation to Vasculopathy and Bone Mineral Density. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2017;23:64-71. doi: 10.1177/1076029615594001

18. Morisawa T, Nakagomi A, Kohashi K, Kusama Y, Shimizu W. Serum Tartrate-resistant Acid Phosphatase-5b Levels are Associated with the Severity and Extent of Coronary Atherosclerosis in Patients with Coronary Artery Disease. *J Atheroscler Thromb*. 2017;24:1058-68. doi: 10.5551/jat.39339
19. Znorko B, Oksztulska-Kolanek E, Michałowska M, Kaminski T, Pawlak K. Does the OPG/RANKL System contribute to the bone-vascular axis in Chronic Kidney Disease? A Systematic Review. *Adv Med Sci*. 2017;62:52-64. doi: 10.1016/j.advms.2016.08.001
20. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther*. 2007;9:S1. doi:10.1186/ar2165
21. Barragan AM, Barrera IG, Sanchez-Nino MD, Ucerro AC, Gonzalez-Espinoza L, Ortiz A. Osteoprotegerin and kidney disease. *J Nephrol*. 2014;27:607-17. doi: 10.1007/s40620-014-0092-x
22. Kohli SS, Kohli VS, Role of RANKL–RANK/osteoprotegerin molecular complex in bone remodeling and its immunopathologic implications. *Indian J Endocrinol Metab*. 2011;15:175–81.
23. Nagy V, Penninger JM. The RANKL-RANK Story. *Gerontology* 2015;61:534-42. doi: 10.1159/000371845
24. Damasiewicz MJ, Nickolas TL. Rethinking Bone Disease in Kidney Disease. *JBMR* 2018;2:309-22. doi: 10.1002/jbm4.10117
25. El-Kishawi AMW, El-Nahas AM. Renal Osteodystrophy: Review of the Disease and its Treatment. *Saudi J Kidney Dis Transplant* 2006;17(3):373-382.
26. Covic A, Vervloet M, Massy ZA, Torres PU, Goldsmith D, Brandenburg V et al. Bone and Mineral Disorders in Chronic Kidney Disease: Implications for

- Cardiovascular Health and Ageing in the General Population. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2018;6:319-31. doi: 10.1016/S2213-8587(17)30310-8
27. Slatopolsky E, Gonzalez E, Martin K. Pathogenesis and Treatment of Renal Osteodystrophy. *Blood Purif* 2003;21:318-26. doi: 10.1159/000072552
28. Joy MS, Karagiannis PC, Peyerl FW. Outcomes of Secondary Hyperparathyroidism in Chronic Kidney Disease and the Direct Costs of Treatment. *JMCP* 2007;13:397-411.
29. Hruska KA, Saab G, Mathew S, Lund R. Renal Osteodystrophy, Phosphate Homeostasis, and Vascular Calcification. *Semin Dial.* 2007;20:309-15.
30. Kato A, Takita T, Maruyama Y, Kumagai H, Hishida A. Impact of Carotid Atherosclerosis on long-term Mortality in Chronic Hemodialysis Patients. *Kidney Int.* 2003;64:1472-9.
31. Mohammadpour HA, Shamsara J, Nazemi S, Ghadirzadeh S, Shahsavand S, Ramezani M. Evaluation of RANKL/OPG Serum Concentration Ratio as a New Biomarker for Coronary Artery Calcification: A Pilot Study. *Thrombosis.* 2012;2012:306263. doi: 10.1155/2012/306263
32. Wasilewska A, Rybi-Szuminska A, Zoch-Zwierz W. Serum RANKL, osteoprotegerin (OPG), and RANKL/OPG ratio in nephrotic children. *Pediatr Nephrol.* 2010;25:2067–75. doi: 10.1007/s00467-010-1583-1
33. Wang XF, Zhang YK, Yu ZS, Zhou JL. The role of the serum RANKL/OPG ratio in the healing of intertrochanteric fractures in elderly patients. *Mol Med Rep.* 2013;7:1169-72. doi: 10.3892/mmr.2013.1335
34. Huang JC, Sakata T, Pflieger LL, Bencsik M, Halloran BP, Bikle DD et al. PTH Differentially Regulates Expression of RANKL and OPG. *J Bone Miner Res.* 2004;19:235-44. doi: 10.1359/JBMR.0301226



35. Khosla S. Minireview: The OPG/RANKL/RANK System. *Endocrinology* 2001;142:5050–5.
36. Znorkoa B, Pawlakb D, Oksztulska-Kolaneka E, Domaniewskia T, Pryczynicz A, Roszczenko A et al. RANKL/OPG system regulation by endogenous PTH and PTH1R/ATF4 axis in bone: Implications for bone accrual and strength in growing rats with mild uremia. *Cytokine*. 2018;106:19-28. doi: 10.1016/j.cyto.2018.03.002
37. Doumouchtsis K, Perrea D, Doumouchtsis S, Tziamalis M, Poulakou M, Vlachos I et al. Regulatory Effect of Parathyroid Hormone on sRANKL-Osteoprotegerin in Hemodialysis Patients With Renal Bone Disease. *Ther Apher Dial*. 2009; 13:49–55. doi: 10.1111/j.1744-9987.2009.00653.x
38. Yavropoulou MP, Michopoulos A, Yovos JG. PTH and PTHR1 in osteocytes. New insights into old partners. *Hormones (Athens)*. 2017;16:150-60. doi: 10.14310/horm.2002.1730
39. Lipe B, Kambhampati S, Van Veldhuizen P, Yacoub A, Aljitawi O, Mikhael J. Correlation between markers of bone metabolism and vitamin D levels in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS). *Blood Cancer J*. 2017;7:646. doi: 10.1038/s41408-017-0015-x
40. Baldock PA, Thomas GP, Hodge JM, Baker UKS, Dressel U, O'Loughlin DP. Vitamin D Action and Regulation of Bone Remodeling: Suppression of Osteoclastogenesis by the Mature Osteoblast. *J Bone Miner Res*. 2006;21:1618-26. doi: 10.1359/JBMR.060714
41. Luo J, Wen H, Guo H, Cai Q, Li S, Li X. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Inhibits the RANKL Pathway and Impacts on the Production of Pathway-Associated

Cytokines in Early Rheumatoid Arthritis. *Biomed Res Int.* 2013;2013:101805.

doi: 10.1155/2013/101805

42. Bikle DD. Vitamin D and Bone. *Curr Osteoporos Rep.* 2012;10:151–59.

doi:10.1007/s11914-012-0098-z

43. Van Driel M, Van Leeuwen JPTM. Vitamin D endocrine system and osteoblasts. *Bonekey Rep.* 2014;3:493. doi: 10.1038/bonekey.2013.227

44. Gil A, Plaza-Diaz J, Mesa MD. Vitamin D: Classic and Novel Actions. *Ann Nutr Metab.* 2018;72:87–95. doi: 10.1159/000486536

45. Anderson PH, Sawyer RK, Moore AJ, May BK, O'Loughlin PD, Morris HA. Vitamin D Depletion Induces RANKL-Mediated Osteoclastogenesis and Bone Loss in a Rodent Model. *J Bone Miner Res.* 2008;23:1789-97. doi: 10.1359/jbmr.080616

## 10. ŽIVOTOPIS

Antun Lončarić, rođen je u Sisku 14. prosinca 1994. godine. Osnovnu školu „Braća Ribar” u Sisku upisuje 2001. godine, koju završava 2009. godine. Iste godine završava i Glazbenu školu Frana Lhotke (instrument gitara) te upisuje Gimnaziju Sisak, koju završava 2013. godine. Tijekom osnovnoškolskog i srednjoškolskog obrazovanja sudjeluje na brojnim natjecanjima iz biologije i kemije na kojima postiže zapažene rezultate.

Upisom na Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci sudjeluje u nastavi kao demonstrator na Zavodu za anatomiju, Zavodu za patologiju i patološku anatomiju te na Katedri za internu medicinu. Na petoj godini studija postaje voditeljem demonstratora na Zavodu za anatomiju. Dobitnik je Dekanove nagrade za izvrsnost za akademsku godinu 2017./2018. Aktivno je sudjelovao na brojnim studentskim kongresima i ostalim skupovima. Sudjelovao je u izradi nekoliko znanstvenih radova i sažetaka.