

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU
KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKU NASTAVU**

Na sednici Nastavno-naučnog veća Farmaceutskog fakulteta, održanoj 15.05.2014. godine, imenovana je Komisija u sastavu:

1. Dr Svetlana Ignjatović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, mentor
2. Dr Nada Majkić-Singh, redovni profesor u penziji, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
3. Dr Višnja Ležaić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

za ocenu završene doktorske disertacije pod nazivom „**Značaj određivanja biomarkera resorpcije i stvaranja kostiju kod pacijenata sa krajnjim stadijumom bolesti bubrega**” kandidata diplomiranog farmaceuta – medicinskog biohemičara Nede Milinković, zaposlene u Centru za medicinsku biohemiju Kliničkog centra Srbije u Beogradu. Komisija je pregledala priloženu disertaciju i podnosi Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

IZVEŠTAJ

A. Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacije diplomiranog farmaceuta – medicinskog biohemičara Nede Milinković pod nazivom „**Značaj određivanja biomarkera resorpcije i stvaranja kostiju kod pacijenata sa krajnjim stadijumom bolesti bubrega**” napisana je jasnim i preglednim stilom na 214 strana, ima 55 tabela, 51 sliku i 322 literaturna navoda. Sadržaj doktorske disertacije je izložen u sledećim poglavljima: Uvod, Cilj rada, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključci, Sumarni zaključci i Literatura.

Uvod se sastoji iz četiri dela. U prvom delu objašnjen je klinički značaj, metode određivanja i referentni interval specifičnih biomarkera metabolizma kostiju: koštanog izoenzima alkalne fosfataze (engl. bone isoenzyme of alkaline phosphatase, BALP), tartarat rezistentnog izoenzima kisele fosfataze (engl. tartrate resistant acid phosphatase, TRAP) i beta-karboksi terminalnog dela ukrštenih veza kolagena (engl. beta-carboxy terminal cross-linking telopeptide of type I collagen, beta CTx). Drugi deo objašnjava klinički značaj, metode određivanja i referentni interval preporučenih biomarkera metabolizma kostiju (ukupni kalcijum, neorganski fosfat, proizvod kalcijuma i fosfora, magnezijum, intaktni paratiroidni hormon (iPTH) i 25-hidroksi vitamin D (25D). U trećem delu objašnjena je funkcija bubrega kod pacijenata sa krajnjim stadijumom bolesti bubrega (KSBB). U četvrtom delu analizirani su različiti nivoi metabolizma koštanog tkiva kod KSBB pacijenata, tj. objašnjeno je do kojih promena na kostima može doći kao posledica hronične bolesti bubrega.

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. 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.

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 (ubrzani ili usporeni).

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. Biomarkeri resorpcije kostiju su proizvodi aktivnosti osteoklasta i proizvodi raspadanja kolagena 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 kalcijuma (90%), fosfata (85%) i magnezijuma (55%). Koncentracije kalcijuma, fosfora 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 Initiatives, KDOQI*) za praćenje metabolizma i bolesti kostiju kod KSBB pacijenata. Vodiči preporučuju da se metabolizam kostiju prati određivanjem četiri osnovna biomarkera: ALP, kalcijum, neorganski fosfat, iPTH i 25-hidroksi vitamina D (25D).

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. 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 m². 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 GFR < 15 mL/min/1,73 m². 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. U KSBB je svega 15% normalne aktivnosti, ali ne znači nužno i prestanak funkcije bubrega.

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).

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. Početak ovih promena se dešava u ranim stadijumima hronične bolesti bubrega i nastavlja smanjenjem bubrežne funkcije, ali i uticajem različitih terapijskih pristupa ovim pacijentima. 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. 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, nutricionisti nedostatak vitamin D, lekovi koji menjaju metabolizam vitamina D (antikonvulzivi), maligniteti sa ili bez metastaza i dugotrajna imobilizacija.

Prema KDOQI vodičima, preporuke su da se u odnosu na tri različita nivoa iPTH može proceniti ubrzan, normalan ili usporen metabolizam kostiju (< 150 pg/mL, 150–300 pg/mL, > 300 pg/mL). 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 preporuke (*Kidney Disease Improving Global Outcomes*, KDIGO) 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. Međutim, ne postoji univerzalni standard pomoću kojeg se mogu kalibrirati različiti testovi za iPTH. Iako je preporuka da se koristi 95/646 Internacionalni standard, još uvek se ispituje značaj etaloniranja različitih metoda ovim kalibratorom. 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.

Zlatni standard za definisanje tipa renalne osteodistrofije prema NKF i KDOQI vodičima je biopsija kostiju, tj. analiziranje histomorfoloških markera kostiju. Međutim za biopsiju kostiju retko postoji opravdana indikacija, a ova invazivna metoda se ne može često ponavljati. Mada do sada ni za jedan biomarker formiranja i resorpcije kostiju nije potvrđen dovoljan nivo dijagnostičke tačnosti, postoji veliki broj literaturnih podataka koji ukazuju na činjenicu da biomarkeri formiranja i resorpcije kostiju jako dobro koreliraju sa histomorfološkim markerima.

U skladu sa tim, **Cilj** doktorske disertacije 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 mereni 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), intaktni paratiroidni hormon (iPTH) i 25-hidroksi vitamin D (25D). Takođe, bilo je neophodno 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, hemodijaliziranih pacijenata (HD) i pacijenata na kontinuiranoj ambulatornoj peritonealnoj dijalizi (CAPD).

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.

U poglavlju **Materijal i metode** dati su podaci o učesnicima, načinu sakupljanja uzoraka i primenjenim metodama. 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.

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. 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. 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. Ispitivanje je odobreno od strane Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije u Beogradu.

Metode

Alkalna fosfataza, kiselna fosfataza, prostatična kiselna fosfataza, ukupan kalcijum, neorganski fosfat i magnezijum su određivani fotometrijskom metodom na Olympus AU2700 ISE analizatoru (Olympus Diagnostica GmbH, Hamburg, Germany). Proizvod kalcijuma i fosfora se izračunavao množenjem izmerenih vrednosti ova dva parametra za svakog pacijenta. Vrednosti za TRAP su preračunavane iz razlike ukupne kisele i prostatične kisele fosfataze za svakog pacijenta. Koštani izoenzim alkalne fosfataze je određivan tehnikom elektroforeze upotrebom komercijalnih agaroznih gelova na semi-automatizovanom aparatu Hydrasis (Sebia, Francuska). Uzorci su analizirani u duplikatu, tako da se lektin reagens koristio u jednoj traci da izdvoji jetrene i koštani izoenzim. Izdvojene frakcije alkalne fosfataze su kvantifikovane na GELSCAN denzitometru (Sebia, France) korišćenjem CCD tehnologije, zatim su se migracije izoenzima u parnim trakama poredile, a koncentracija BALP izračunavane su iz koncentracije ukupne alkalne fosfataze. Beta-CTx i iPTH su određivani metodom elektrohemiluminiscencije (ECLIA) na analizatoru Roche Elecsys 2010 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Koncentracije 25D su određivane hromatografskom tehnikom upotrebom obrnutih faza za razdvajanje, na HPLC sistemu

(Recipe, Munchen, Germany). Kvantitativna analiza se izvodila nakon UV detekcije na ChromLine^R softveru, verzija 4.20.

Procena dijagnostičke vrednosti ispitivanih biomarkera urađena je primenom ROC (*Receiver Operating Characteristic*) analize.

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).

Poglavlje **Rezultati** sastoji se iz šest delova. U prvom delu prikazane su analitičke karakteristike metoda za određivanje ispitivanih biomarkera (ALP, BALP, TRAP, beta-CTx, joni kalcijuma, neorganskog fosfata, magnezijuma, CaxP, iPTH i 25D). Pouzdanost korišćenih testova za sve biomarkere koji su mereni 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 su statistički parametri ispitivanja nepreciznosti (\bar{x} – srednja vrednost, Sd – standardna devijacija, Kv – koeficijent varijacije).

U drugom delu su prikazane vrednosti ispitivanih biomarkera u kontrolnoj grupi. Radi dobijanja referentnih vrednosti određivanih parametara, određene su aktivnosti, odnosno koncentracije ALP, BALP, TRAP, beta-CTx, 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. Takođe, 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 kod ispitanika zdrave populacije. Upotrebom Student t-testa za biomarkere koji su imali normalnu raspodelu i Mann-Whitney U testa za biomarkere koji nisu imali normalnu raspodelu ispitano je da li postoji statistički značajna razlika u vrednostima u odnosu na pol i godine života u kontrolnoj grupi.

U trećem delu prikazana je raspodela vrednosti biomarkera resorpcije i stvaranja kostiju kod KSBB pacijenata, kao i statistički parametri ispitivanih biomarkera u odnosu na pol i godine života posebno za predijalizne pacijente, HD i CAPD pacijente, kao i u odnosu na trajanje dijalize za pacijente na dijalizi (HD i CAPD). Za svaki parametar Student t-testom ispitano je da li postoji statistički značajna razlika u dobijenim vrednostima biomarkera, a primenom Kolmogorov-Smirnov testa ispitano je da li raspodela analiziranih biomarkera kod ispitivanih KSBB pacijenata prate Gauss-ovu raspodelu. Karakteristike raspodele za svaki ispitivani biomarker za predijalizne pacijente, prikazane su tabelarno i grafički.

U četvrtom delu prikazano je poređenje vrednosti BALP, TRAP i beta-CTx sa preporučenim biomarkerima (ALP, joni kalcijuma, neorganskog fosfata, magnezijuma, CaxP, iPTH i 25D) kod KSBB pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu. Radi procene u kojoj su meri izmenjene vrednosti analiziranih biomarkera kod predijaliznih, HD i CAPD 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. Takođe, prikazane su korelacije vrednosti BALP, TRAP i beta-CTx sa vrednostima preporučenih biomarkera posebno za svaku analiziranu grupu KSBB pacijenata. Rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

U petom delu prikazano je poređenje ispitivanih specifičnih biomarkera metabolizma kostiju (BALP, TRAP i beta-CTx) sa preporučenim biomarkerima resorpcije i stvaranja kostiju (ALP, jona kalcijuma, magnezijuma, neorganskog fosfata, CaxP, iPTH i 25D) kod KSBB pacijenata u odnosu na nivoe iPTH, vrednosti 25D i CaxP.

U šestom delu prikazana je dijagnostička vrednosti BALP, TRAP, beta-CTx i preporučenih biomarkera za procenu adinamične bolesti kostiju. Procena dijagnostičke vrednosti ispitivanih biomarkera urađena je primenom ROC analize. Konstruisane su ROC krive i izračunate AUC za sledeće parametre: BALP, TRAP, beta-CTx, ALP, jone kalcijuma, magnezijuma, neorganskog fosfata i CaxP. Prikazani su ROC grafici za razlikovanje zdravih osoba i bolesnika sa sumnjom na adinamičnu bolest kostiju kod svih KSBB pacijenata zajedno, kao i posebno za predijalizne, HD i CAPD pacijente. Za sva četiri grafika, za sve ispitivane parametre izračunate su vrednosti dijagnostičke osetljivosti i specifičnosti za optimalne „cutt-off“ vrednosti, što je prikazano u vidu tabela.

B. Opis postignutih rezultata

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%).

Za većinu biomarkera izračunati 2,5 i 97,5 percentili se nisu statistički značajno razlikovali od preporučenih referentnih intervala od strane proizvođača, koji se rutinski koriste u medicinsko-biohemijskoj laboratoriji, Polikliničke laboratorijske dijagnostike, Centra za medicinsku biohemiju, Kliničkog Centra Srbije u Beogradu. Referentni intervali za ALP, BALP, TRAP, beta-CTx, ukupan kalcijum, magnezijum, neorganski fosfat, CaxP, iPTH i 25D bili su redom: 43–89 IU/L, 36–70 IU/L, 3–6 IU/L, 0,41–2,83 ng/mL, 2,32–2,72 mmol/L, 0,88–1,09 mmol/L, 1,02–1,54 mmol/L, 1,87–4,15 mmol²/L², 23,7–57,6 pg/mL i 54,8–95,5 nmol/L. Takođe, dobijene su statistički značajno različite 2,5 i 97,5 percentilne vrednosti za BALP, beta-CTx i magnezijum u odnosu na pol zdravih pojedinaca. 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

Kada su analizirane raspodele vrednosti ispitivanih biomarkera metabolizma kostiju kod predijaliznih pacijenata i pacijenata na dijalizi, Kolmogorov-Smirnov test je pokazao da dobijene koncentracije nisu statistički značajno odstupale od normalne (Gaus-ove) raspodele. Kod predijaliznih pacijenata dobijene su značajno više vrednosti iPTH kod žena (408,5 pg/mL vs. 348,8 pg/mL, $p < 0,05$). Kod HD pacijenata dobijena je statistički značajna razlika između muškaraca i žena u vrednostima neorganskog fosfata i iPTH (2,03 mmol/L vs. 1,40 mmol/L i 88,6 pg/mL vs. 136,7 pg/mL, $p < 0,05$), dok je kod CAPD pacijenata dobijena statistički značajna razlika u vrednostima CaxP i iPTH (3,73 vs. 3,37 mmol²/L², 167,2 vs. 174,5 pg/mL, $p < 0,05$). 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 značajno više kod mladih pacijenata (34 IU/L, 23 IU/L i 23 IU/L vs. 32 IU/L, 20 IU/L i 19 IU/L, $p < 0,05$), redom za predijaliznu, HD i CAPD grupu pacijenata. Značajno niže vrednosti ALP i BALP su dobijene kod HD pacijenata koji su bili na dijalizi duže od 30 meseci (64 IU/L vs. 55 IU/L i 26 IU/L vs. 20 IU/L, $p < 0,05$), takođe su dobijene značajno niže vrednosti magnezijuma kod CAPD pacijenata koji su bili na dijalizi duže od 30 meseci (0,95 mmol/L vs. 0,88 mmol/L, $p < 0,05$).

Kada je ispitivano da li postoji statistički značajna razlika u vrednostima specifičnih biomarkera (BALP, TRAP i beta-CTx) u odnosu na preporučene biomarkere kod KSBB pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu, rezultati poređenja ukazuju da su koncentracije BALP i kalcijuma bile značajno niže kod predijaliznih pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu: BALP (Me: 23 IU/L vs. 53 IU/L, $p < 0,001$) i kalcijum (Me: 2,12 mmol/L 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: neorganski fosfat (1,55 mmol/L vs. 1,25 mmol/L, $p < 0,05$) i iPTH (343,9 pg/mL vs. 38,0 pg/mL, $p < 0,01$). Kod pacijenata na hemodijalizi dobijene značajno niže vrednosti ALP (Me: 56 IU/L vs. 69 IU/L, $p < 0,001$) i 25D (Me: 23,4 nmol/L vs. 73,5 nmol/L, $p < 0,01$), kao i BALP (Me: 20 IU/L vs. 53 IU/L, $p < 0,001$) i kalcijuma (Me: 2,39 mmol/L 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 mmol/L vs. 1,55 mmol/L, $p < 0,05$), CaxP (Me: 3,90 mmol²/L² vs. 3,12 mmol²/L², $p < 0,05$), iPTH (Me: 99,4 pg/mL 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 IU/L vs. 5 IU/L), neorganskog fosfata (Me: 1,52 mmol/L vs. 1,25 mmol/L), CaxP (Me: 3,40 mmol²/L² vs. 2,9 mmol²/L²) i iPTH (Me: 124,2 pg/mL 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 IU/L vs. 69 IU/L, $p < 0,05$) i BALP (Me: 20 IU/L vs. 53 IU/L, $p < 0,001$) i kalcijum (Me: 2,25 mmol/L 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).

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 predijaliziranih i CAPD pacijenata posebno, kao i Pearsonov koeficijent korelacije za HD pacijenata. Mada koeficijenti korelacije između ispitivanih biomarkera nisu bili visoki, korelacija je bila statistički značajna. Koeficijenti korelacije BALP sa ostalim biomarkerima kod predijaliziranih 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). Kod hemodijaliziranih i CAPD pacijenata, vrednosti BALP nisu bile u korelaciji jedino sa magnezijumom. Koncentracije TRAP su bile u negativnoj korelaciji sa magnezijumom (-0,463, $p < 0,01$) i fosforom (-0,301, $p < 0,05$) kod predijaliziranih 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). Kod predijaliziranih 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 hemodijaliziranih 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).

U grupi predijaliziranih 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 hemodijaliziranih 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. U grupi sa preporučenim vrednostima iPTH, kod predijaliziranih pacijenata dobijene su niže vrednosti beta-CTx (3,00 ng/mL), dok su vrednosti 25D bile niže i kod predijaliziranih i hemodijaliziranih pacijenata (21,0 nmol/L i 28,3 nmol/L). Kod pacijenata sa iPTH $> 300,0$ pg/mL, dobijene su značajno više vrednosti BALP i beta-CTx za hemodijalizne pacijente (60 IU/L i 3,21 ng/mL, $p < 0,05$), međutim nije dobijena značajna razlika u vrednostima TRAP između ispitivanih grupa. Kod predijaliziranih 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. Kod hemodijaliziranih 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, $p < 0,05$). 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.

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 ($p = 0,0001$). 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. Mada se dijagnostička vrednost nije razlikovala od drugih analiziranih biomarkera, za BALP je dobijena granična značajnost ($p = 0,058$). 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 ($p = 0,007$). Kod pacijenata koji su bili na terapiji kontinuiranom ambulatornom peritonealnom dijalizom najveća dijagnostička vrednost u proceni smanjenog metabolizma kostiju dobijena je za BALP. Mada se površina ispod ROC krive (0,588) nije značajno razlikovala od AUC drugih analiziranih biomarkera, za BALP je dobijena granična značajnost ($p = 0,053$).

C. Uporedna analiza rezultata kandidata sa podacima iz literature

U doktorskoj disertaciji je pokazano da se određivanje specifičnih biomarkera (BALP, TRAP i beta-CTx), koji direktno ukazuju na procese formiranja i resorpcije kostiju, kao i preporučenih biomarkera metabolizma kostiju (ALP, joni kalcijuma, neorganskog fosfata, magnezijuma, iPTH i 25D) može smatrati pouzdanim na osnovu dobijenih vrednosti Kv koje su bile niže od 5%. 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 (Yamada S, et al. Clin Endocrinol 2008; Halleen JM, et al. J Bone Miner Res 2000; Haima P, et al. Tecomedical Group 2009; Minkin C, et al. Calcif Tissue Int 1982). 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 (Rauch F, et al. Acta Paediatr 1997; Gomez BJ, et al. Clin Chem 1995). Pored toga, KDOQI vodiči zasnivaju svoje preporuke za određivanje BALP u proceni i praćenju metabolizma kostiju na radovima koji su koristili metodu zonske elektroforeze (Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group., Kidney Int Suppl 2009). 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. 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 ($p < 0,001$) (Beko G, et al. Clin Chem Lab Med 2012). Koncentracije 25D su određivane HPLC metodom koja se smatra referentnom metodom (Gomez FP, et al. Bioanalysis 2013).

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. 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 (CLSI, Defining, establishing and verifying reference intervals in clinical laboratory, Approved Guideline 2008; Solberg HE, Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics 2006). 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 (Urena P, et al. Nephrol Dial Transplant 2003, Coen G, et al. Nephrol Dial Transplant 1998).

Kada su analizirane vrednosti biomarkera kod pacijenata sa krajnjim stadijumom bolesti bubrega u odnosu na pol, dobijene su statistički značajno više vrednosti iPTH žena kod predijaliznih pacijenata, ali su kod pacijenata na dijalizi vrednosti iPTH bile statistički značajno više kod muškaraca ($p < 0,05$). Mada literaturni podaci ukazuju da postoji značajan efekat hormonskog statusa kod žena na vrednosti iPTH, još uvek nema konačnih zaključaka o promenama vrednosti iPTH kod KSBB pacijenata u odnosu na pol (Nikodimopoulou M, et al. Hippokratia 2011; Vincent A, et al. Menopause 2003; Gal-Moscovici A, et al. Clin Nephrol 2005). Kod HD pacijenata uočava se razlika u vrednostima neorganskog fosfata, a kod CAPD pacijenata u vrednostima CaxP u odnosu na pol, mada literaturni podaci ne ukazuju na veliki značaj uticaja pola na vrednosti biomarkera metabolizma kostiju (Hutchison AJ, et al. Perit Dial Int 1996; Maruyama Y, et al. Nihon Jinzo Gakkai Shi 1991; Ha SK, et al. Yonsei Med J 1996). Iako se godine starosti smatraju nezavisnim faktorom za razvoj i progresiju renalne osteodistrofije kod KSBB pacijenata, u ovom radu su dobijene statistički značajno više vrednosti jedino za vrednosti BALP, što je u slaganju sa literaturnim podacima (Block Ga, et

al. J Am Soc Nephrol 2004; Grzegorzewska AE, et al. Int Urol Nephrol 2006; Bervoets AR, et al. Am J Kidney Dis 2003). Rezultati ovog rada ukazuju na značajan efekat dužine trajanja dijalize kao i efekat tipa dijalize, što je u skladu sa postojećim literaturnim podacima o direktnoj promeni ne samo minerala, već i biomarkera kostiju kod pacijenata koji su na terapiji dijalizom duže od 30 meseci (Stevens LA, et al. J Am Soc Nephrol 2004; Novikov AI, et al. Ter Arkg 1991; Katopodis KP, et al. Arif Organs 2003). Ovo može da objasni činjenicu da se sve veći broj pacijenata odlučuje na transplantaciju bubrega, a ne za program hronične hemodijalize ili CAPD terapiju.

U ovom ispitivanju vrednosti ispitivanih specifičnih biomarkera (BALP, TRAP i beta-CTx) kod predijaliznih pacijenata nisu bile u granicama dobijenih referentnih vrednosti kontrolne grupe. Koncentracije BALP su bile statistički značajno niže u odnosu na kontrolnu grupu ($\boxtimes = 32$ IU/L, $p < 0,001$), dok su koncentracije TRAP i beta-CTx bile statistički značajno više u odnosu na kontrolnu grupu ($\boxtimes = 7$ IU/L, $p < 0,05$ i $\boxtimes = 3,54$, $p < 0,01$ 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. Vrednosti iPTH predijaliznih pacijenata su bile statistički značajno više u odnosu na vrednosti kontrolne grupe ($\boxtimes = 350,7$ pg/mL, $p < 0,01$). Mada povećane vrednosti iPTH ukazuju na hiperparatiroidizam, u literaturi se navodi činjenica da hiperparatiroidizam može biti udružen sa povećanim rizikom od fraktura kod KSBP pacijenata, uzimajući u obzir povećanu resorpciju kostiju, a smanjeno stvaranje (Hutchison AJ, et al. Perit Dial Int 1996; Clarke B, et al. Clin J Am Soc Nephrol 2008). 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.

U ovom ispitivanju vrednosti BALP kod pacijenata koji su na hemodijalizi su bile statistički značajno niže u odnosu na kontrolnu grupu ($\boxtimes = 27$ IU/L, $p < 0,001$), dok su vrednosti TRAP bile značajno više ($\boxtimes = 8$ IU/L, $p < 0,05$). Mada su koncentracije beta-CTx bile u referentnom opsegu, bile su nešto više u odnosu na kontrolnu grupu, ali razlika nije bila statistički značajna ($\boxtimes = 2,21$ ng/mL, $p = 0,054$). 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 (Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group. Kidney Int Suppl 2009). Vrednosti ALP, kalcijuma, magnezijuma i CaxP su bile u granicama referentnih vrednosti, i nisu se značajno razlikovale u odnosu na vrednosti kontrolne grupe, ali su koncentracije fosfora i iPTH bile značajno više u odnosu na kontrolnu grupu ($\boxtimes = 1,66$ mmol/L, $p < 0,01$ i $\boxtimes = 115,4$ pg/mL, $p < 0,05$, redom). 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 ($\boxtimes = 115,4$, $p < 0,05$). Skoriji literaturni podaci ukazuju da niže vrednosti iPTH od preporučenih za pacijente na dijalizi mogu da ukažu na veći stepen preživljavanja hemodijalizirane populacije (Bervoets AR, et al. Am J Kidney Dis 2003). Dobijene

koncentracije 25D su bile značajno niže u odnosu na vrednosti kontrolne grupe (\bar{x} = 39,5 nmol/L, $p < 0,01$), što je u saglasnosti sa literaturnim podacima koji ukazuju na učestalost deficita vitamina D kod pacijenata na hemodijalizi (Medical Advisory Secretariat. Ont Health Technol Assess Ser [Internet]. 2010; Melamed ML, et al. Clin J Am Soc Nephrol 2012). Kada se analizirao efekat trajanja dijalize, dobijene su statistički značajno niže vrednosti ALP i BALP kod pacijenata koji su bili na terapiji hemodijalizom duže od 30 meseci ($p < 0,05$), što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (Block GA, et al. J Am Soc Nephrol 2004; Grzegorzewska AE, et al. Int Urol Nephrol 2006).

U ovom ispitivanju su vrednosti BALP kod CAPD pacijenata, 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), što je u slaganju sa literaturnim podacima (Abe M, et al. Nutrients 2013; Zetterberg H, Clin Chem 2005; Yamada S, et al. Clin Endocrinol 2013). Mada su koncentracije iPTH bile značajno više u odnosu na gornju granicu referentnog opsega zdrave populacije, nalazile su se u preporučenom opsegu za iPTH za pacijente na dijalizi (\bar{x} = 171,4 pg/mL, $p < 0,05$). Literaturni podaci ukazuju da 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, koja se razvija kao česta komplikacija poremećaja metabolizma kostiju kod pacijenata na dijalizi (Eddington H, et al. Periton Dial Internat 2009; Wei M et al. Int Urol Nephrol 2006). 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 (Cho MS, et al. Korean J Inter Med 2002; Shah N, et al. Perit Dial Int 2005).

U ovom ispitivanju analizirane su vrednosti CaxP predijaliznih pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu, i nije dobijena značajna razlika ($3,12 \text{ mmol}^2/\text{L}^2$ vs. $2,89 \text{ mmol}^2/\text{L}^2$, $p = 0,632$). Vrednosti kod dijaliziranih pacijenata su bile značajno više u odnosu na kontrolnu grupu: $3,90 \text{ mmol}^2/\text{L}^2$, $p < 0,01$ za hemodijalizu i $3,40 \text{ mmol}^2/\text{L}^2$, $p < 0,05$ za CAPD. Takođe, vrednosti CaxP kod hemodijaliznih bile su značajno više od predijaliznih pacijenata ($p < 0,05$), ali se vrednosti CAPD nisu značajno razlikovale od predijaliznih pacijenata ($p = 0,096$), što je u skladu sa literaturnim podacima koji ukazuju na pozitivnu korelaciju CaxP sa ekstravaskularnim komplikacijama kod pacijenata na dijalizi (Natoli JL, et al. BMC Nephrology 2013; Block GA, et al. Am J Kidney Dis 1998; Sprague SM, et al. Clin J Am Soc Nephrol 2009; Ribeiro S, et al. Nephrol Dial Transplant 1998).

Takođe, specifični biomarkeri metabolizma kostiju pokazuju dobru korelaciju sa preporučenim biomarkerima: ALP, kalcijumom, neorganskim fosfatom, magnezijumom, iPTH i 25D kod KSBB pacijenata, kako je bilo i očekivano (Delanaye P, et al. Nephrol Dial Transplant 2013). Superiornost specifičnih u odnosu na preporučene biomarkere kod KSBB pacijenata, kao i njihova prednost u odnosu na invazivnu metodu biopsije, ali i standardizacija metoda određivanja specifičnih biomarkera metabolizma kostiju, ostaje da se utvrdi daljim istraživanjima (Čepelak I, et al. Biochemia Medica 2009; Jabbar Z, et al. Indian J Nephrol 2013; Sardiwal S, Am J Kidney Dis 2013; Theis M, et al. J Med Biochem 2008; Chubb P, et al. Clin Biochem 2012; Alvarez L, et al. J Bone Miner Metab 2004).

Rezultati doktorske disertacije su u skladu sa objavljenim rezultatima (Rix M, et al. *Kidney Int* 1999; Diaz Corte C, et al. *Nefrologia* 2000; Alvarez L, et al. *J Bone Miner Metab* 2004; Coen G, et al. *Am J Nephrol* 1992; Holick MF, et al. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; Malabanan A, et al. *Lancet* 1998) da postoji zavisna promena biomarkera metabolizma kostiju i vrednosti iPTH i 25D kod KSBB pacijenata. Praćenjem nivoa specifičnih i preporučenih biomarkera paralelno sa vrednostima iPTH i 25D, može se obezbediti adekvatan terapijski pristup i sprečiti progresija poremećaja mineralnog i koštanog metabolizma, ali i eventualne ekstrakoštane komplikacije (Levin A, et al. *Kidney Int* 2005; Ross AC, et al. *J Am Diet Ass* 2011; Li D, et al. *Endocrine* 2013; Ketteler M, et al. *Nephrol Dial Transplant* 2012).

Rezultati ispitivanja dijagnostičke vrednosti specifičnih (BALP, TRAP i beta-CTx) i preporučenih biomarkera (ALP, kalcijum, neorganski fosfat, magnezijum i CaxP), u proceni adinamične bolesti kostiju, su u skladu sa literaturnim navodima (Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group. *Kidney Int Suppl* 2009 i 2013; Moe S, et al. *Kidney Inter* 2006) koji ukazuju da kod KSBB pacijenata sa vrednostima iPTH < 100 pg/mL postoji velika verovatnoća od razvoja adinamične bolesti kostiju. Mada u ovom radu nije uzet u obzir klinički kriterijum za definisanje adinamične bolesti kostiju, dobijena je statistički značajna prediktivna vrednost za BALP, što je u skladu sa literaturnim navodima (Coen G, et al. *Nephrol Dial Transplant* 1996; Couttenye MM, et al. *Nephrol Dial Transplant* 1996; Urena P, et al. *Nephrol Dial Transplant* 2003; Negri A, et al. *J Am Soc Nephrol* 2001; Rix M, et al. *Kidney Int* 1999) da niske vrednosti BALP (< 27 IU/L) zajedno sa vrednostima iPTH < 100 pg/mL imaju najveću pozitivnu prediktivnu vrednost za adinamičnu bolest kostiju. Međutim, kada su analizirane odvojeno predijalizni pacijenti i pacijenti na dijalizi, za HD pacijente je dobijena najbolja dijagnostička vrednost za kalcijum. 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 (Urena P, et al. *Nephrol Dial Transplant* 2003; Delaney P, et al. *Nephrol Dial Transplant* 2013; Urena P, et al. *J Am Soc Nephrol* 1996; Shidara K, et al. *Calcif Tissue Int* 2008; Withold W, et al. *Eur J Clin Chem Clin* 1996).

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) (Frazao JM, et al. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2009; Torres A, et al. *Kidney Int* 1995; Rocha LA, et al. *Am J Kidney Dis* 2006; Fetcher S, et al. *Nephron* 1997; Jorge C, et al. *Nephron Clin Pract* 2005; Jabbar Z, et al. *Indian J Nephrol* 2013, Ferreira MA, et al. *Nephrol Dial Transplant* 2000; Delaney P, et al. *Nephrol Dial Transplant* 2013). 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.

D. Objavljeni i saopšteni rezultati

Radovi koji čine deo doktorske disertacije sa SCI liste

1. **Milinković N**, Majkić-Singh N, Mirković D, Beletić A, Pejanović S, Vujanić S. Relation between 25(OH)-vitamin D deficiency and markers of bone formation and resorption in haemodialysis patients. *Clin Lab* 2009;55:333–339.
Tip rada: Original article (originalan naučno istraživački rad)
IF: 1,010 (2009); ISSN: 1433-6510
Rang časopisa 18/29 u kategoriji Medical Laboratory Technology
2. **Milinković N**, Majkić-Singh N, Ignjatović S, Ležaić V, Pejanović S, Jovanović D. Correlation of bone alkaline phosphatase and iPTH with some basic biochemical markers in predialysis and dialysis patients. *Clin Lab* 2012;58:747–753.
Tip rada: Original article
IF: 0,920 (2012); ISSN: 1433-6510
Rang časopisa 21/32 u kategoriji Medical Laboratory Technology

Ostali radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. Ležaić V, Tirmenstajn B, Bukvić D, Vujišić B, Perović M, **Novaković N**, Simić-Ogrizović S, Jovanović I, Marić I, Đukanović Lj. The role of calcium-phosphate abnormalities in the progression of chronic renal failure and development of bone and cardiovascular disease. *Hippokratia* 2006, 10(Suppl 1) S6, IL8.
Tip rada: Abstract
IF: 0,589 (2012); ISSN: 1108-4189
Rang časopisa 110/155 u kategoriji Medicine, General and Internal
2. **Novaković N**, Dajak M, Pejanović S, Jovanović D, Majkić-Singh M. Poređenje biohemijskih markera koštanog prometa kod pacijenata na hemodijalizi i peritonealnoj dijalizi. *J Med Biochem* 2007;26:215–219.
Tip rada: Original article
IF: 1,084 (2012); ISSN: 1452-8258
Rang časopisa 254/290 u kategoriji Biochemistry and Molecular Biology
3. Ležaić V, Tirmenstajn-Janković B, Bukvić D, Vujišić B, Perović M, **Novaković N**, Dopsaj V, Marić I, Djukanović Lj. Efficacy of hyperphosphatemia control in the progression of chronic renal failure and the prevalence of cardiovascular calcification. *Clin Nephrol* 2009;71:21–29.
Tip rada: Original article
IF: 1,373 (2009); ISSN: 0301-0430
Rang časopisa 43/63 u kategoriji Urology and Nephrology

E. Zaključak

Rezultati doktorske disertacije su pokazali da se 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 koeficijenata varijacije za nepreciznost u seriji (Kv: 0,6–3,3%) i nepreciznosti iz dana u dan (Kv: 1,0–3,6%).

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.

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 ($p < 0,05$ 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.

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 ($4,6$ mmol²/L²) i nisu se značajno razlikovale u odnosu na ispitivane nivoe iPTH i u odnosu na nedovoljne i dovoljne količine 25D.

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 $p = 0,053$).

Sve napred navedeno ukazuje da ispitivani specifični biomarkeri (BALP, TRAP i beta-CTx) imaju uporedivu dijagnostičku tačnost kao i preporučeni biomarkeri (ALP, joni kalcijuma, neorganskog fosfata, magnezijuma, iPTH i 25D) 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“.

F. Mišljenje i predlog komisije

Na osnovu svega izloženog može se zaključiti da je kandidat u svom istraživanju opravdao postavljene ciljeve istraživanja i zato predlažemo Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta da prihvati pozitivnu ocenu doktorske disertacije pod naslovom "**Značaj određivanja biomarkera resorpcije i stvaranja kostiju kod pacijenata sa krajnjim stadijumom bolesti bubrega**" i omogući kandidatu da pristupi javnoj odbrani iste.

ČLANOVI KOMISIJE:

1. Dr Svetlana Ignjatović, mentor
redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
2. Dr Nada Majkić-Singh,
redovni profesor u penziji, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
3. Dr Višnja Ležaić,
redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

U Beogradu, 12.06.2014. godine