



## **Središnja medicinska knjižnica**

**Jadrijević, Stipislav (2011) *Dinamika koštanog metabolizma nakon transplantacije jetre*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

<http://medlib.mef.hr/1008>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Stipislav Jadrijević**

**Dinamika koštanog metabolizma nakon  
transplantacije jetre**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2011.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Stipislav Jadrijević**

**Dinamika koštanog metabolizma nakon  
transplantacije jetre**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2011.**

Rad je izrađen u Klinici za kirurgiju Kliničke bolnice Merkur i Kliničkom zavodu za laborotorijsku dijagnostiku KBC Rebro Zagreb.

Voditeljica rada: prof. dr. sc. Vesna Kušec

Rad posvećujem svim transplantiranim pacijentima u Republici Hrvatskoj i svijetu.

## POPIS SKRAĆENICA

<b>BMD</b>	mineralna gustoća kosti (engl. bone mineral density)
<b>BMI</b>	indeks tjelesne mase (engl. body mass index)
<b>DXA</b>	dvoenergetska apsorpcijska x zraka
<b>OPG</b>	osteoprotegerin
<b>RANK</b>	receptor za aktivaciju jezgrinog faktora kapa- B (engl. receptor activator of nuclear faktor kappa B)
<b>RANK-L</b>	ligand receptora za aktivaciju jezgrinog faktora kapa B
<b>MSCF 1</b>	stimulirajući kolonija makrofagni faktor 1 (engl. macrophage colony stimulating factor 1)
<b>25- OHD</b>	25- hidroksi vitamin D
<b>OLT</b>	ortotopna transplantacija jetre (engl. ortotopic liver transplantation)
<b>PTH</b>	paratiroidni hormon
<b>SZO</b>	svjetska zdravstvena organizacija
<b>Tx</b>	transplantacija
<b>RH</b>	Republika Hrvatska
<b>MELD</b>	model za izračun završnog stadija jetrene bolesti (engl. model for end stage liver disease)
<b>Ntx</b>	n terminalni teleopeptid dio kolagenog lanca
<b>Ctx</b>	c terminalni teleopeptid dio kolagenog lanca

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	4
2. GRAĐA KOŠTANOG TKIVA .....	6
2.1. STANICE KOŠTANOG TKIVA.....	6
2.2. KOŠTANA MEĐUSTANIČNA TVAR .....	7
2.3. PERIOST I ENDOST .....	7
3. VRSTE KOŠTANOG TKIVA.....	8
4. FUNKCIJA KOŠTANOG TKIVA .....	9
4.1. POTPORNA FUNKCIJA KOŠTANOG TKIVA .....	9
4.2. METABOLIČKA FUNKCIJA KOŠTANOG TKIVA .....	9
5. MEHANIZAM KALCIFIKACIJE KOSTI.....	10
5.1. KOŠTANA PREGRADNJA .....	10
5.2. KLINIČKA PROCJENA KOŠTANE RAZGRADNJE.....	12
5.3. KLINIČKA PROCJENA KOŠTANE IZGRADNJE .....	12
5.4. UČINCI BIOLOŠKE VARIJABILNOSTI NA PREGRADNJU KOSTI.....	13
6. ULOGA VITAMINA D U KOŠTANOM METABOLIZMU.....	15
7. OSTEOPOROZA .....	16
8. DOSADAŠNJA SAZNANJA O DINAMICI KOŠTANOG METABOLIZMA PRIJE I NAKON TRANSPLANTACIJE JETRE .....	17
9. HIPOTEZA .....	23
10. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	24
11. METODE ISTRAŽIVANJA.....	25
11.1. BOLESNICI .....	25

11.2. DENZITOMETRIJA .....	27
11.3. BIOKEMIJSKE PRETRAGE KOŠTANE PREGRADNJE .....	28
11.4. USTROJ POKUSA.....	30
11.5. STATISTIČKE ANALIZE.....	30
12. REZULTATI.....	31
12.1. DESKRIPTIVNA STATISTIKA BIOKEMIJSKIH VARIJABLI .....	31
12.2. ISPITVANJE RAZLIKE IZMEĐU SPOLOVA ZA REZULTATE U PRVOM I DRUGOM MJERENJU .....	35
12.3. SLIKOVNI PRIKAZ PROMJENA ISPITIVANIH VARIJABLI U VREMENU PRAĆENJA .....	38
12.3.1. Slikovni prikaz promjena biokemijskih varijabli u vremenu praćenja .....	38
12.3.2. Slikovni prikaz promjena denzitometrijskih varijabli u vremenu praćenja ...	46
12.4. ISPITIVANJE RAZLIKE VARIJABLI IZMEĐU POJEDINIH MJERENJA....	50
12.4.1. Ispitivanje razlika biokemijskih varijabli između pojedinih mjerenja.....	50
12.4.2. Ispitivanje razlika denzitometrijskih varijabli između pojedinih mjerenja....	60
12.5. ISPTIVANE VARIJABLE U ODNOSU NA ŽIVOTNU DOB NAPOČETKU ISTRAŽIVANJA.....	67
12.5.1. Biokemijske varijable u odnosu na životnu dob .....	67
12.5.2. Denzitometrijskih varijabli u odnosu na životnu dob .....	70
13. RASPRAVA.....	77
13.1. PROCJENA POREMEĆAJA KOŠTANOG METABOLIZMA KOD NAŠIH BOLESNIKA.....	77
13.2. PORMEĆAJ MINERALIZACIJE UTVRĐENI POMOĆU DXA .....	78

---

13.3. PROCJENA KOŠTANOG METABOLIZMA POMOĆU BIOKEMIJSKIH POKAZATELJA KOŠTANE PREGRADNJE .....	78
14. ZAKLJUČCI .....	82
15. SAŽETAK .....	84
16. SUMMARY .....	86
17. LITERATURA .....	88
18. ŽIVOTOPIS .....	94



## 1. UVOD

Davne 1963. godine u Denveru SAD, Dr. Starzl je napravio prvu humanu transplantaciju jetre u svijetu. Primatelj je bilo trogodišnje dijete s atrezijom žučnih vodova, no nažalost pacijent nije uspio preživjeti operaciju. Iduće 1964. godine napravljeno je još šest transplantacija jetara i to pet u SAD i jedna u Francuskoj. Te su operacije također neslavno završile, pacijenti su umrli zbog kirurških komplikacija, a najduže je preživljenje bilo 22 dana.<sup>(1)</sup>

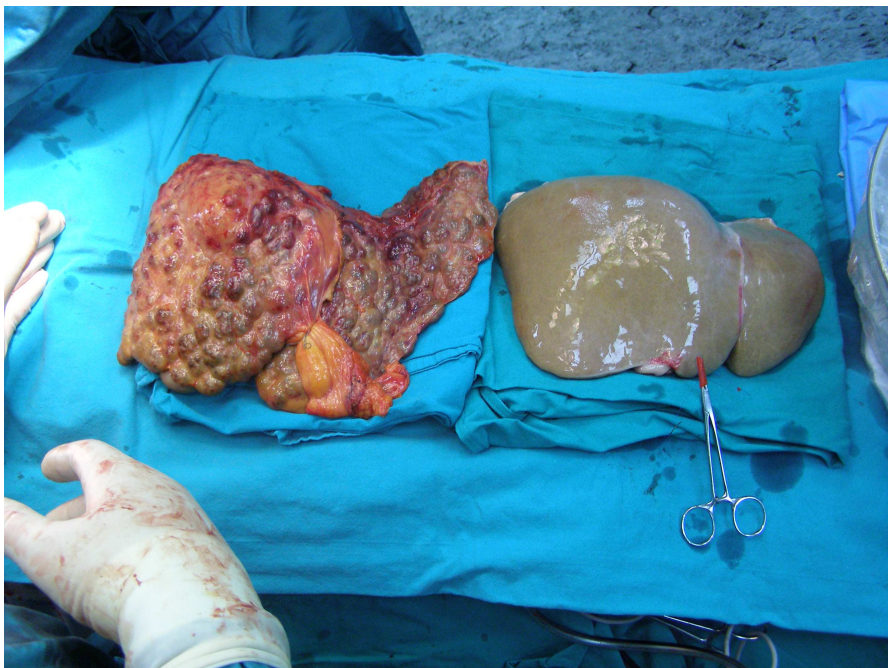
Početak osamdesetih godina dvadesetog stoljeća u kliničku uporabu je uveden imunosupresiv Ciklosporin, nakon čega dolazi do ubrzanog napretka transplantacijske medicine diljem svijeta.<sup>(2,3)</sup>

Napretkom kirurške tehnike, medicinske tehnologije, i uvođenjem u terapiju novih potentnih imunosupresivnih lijekova (Prograf, monoklonska protutijela, Cell Cept, Sirolimus, Everolimus) transplantacija jetre postala je rutinski terapijski postupak u liječenju terminalnog stadija jetrene bolesti.<sup>(2,3,4)</sup>

Danas se transplantacija jetre uspješno izvodi u 81 zemlji diljem svijeta. **Republika Hrvatska je u 2010. godini bila prva u svijetu po broju transplantiranih jetara na milijun stanovnika.** Sama Tx jetre i poslijeoperacijsko liječenje predstavljaju u stručnom smislu jednu od zahtjevnijih zdravstvenih usluga. U svijetu takva zdravstvena usluga pruža pacijentima koji su u završnom stadiju jetrene bolesti samo u specijaliziranim i vrhunsko opremljenim zdravstvenim ustanovama. Zdravstveni sustav kako u organizacijskom tako i u stručnom smislu mora biti na visokoj razini da bi se mogla uspješno izvoditi Tx jetre. Činjenica da je RH u 2010. godini bila prva u Tx jetre u svijetu dovoljno govori o razvijenosti transplantacijske medicine, kako u stručnom tako i organizacijskom smislu u RH. Godišnje se u svijetu presadi na desetke tisuća jetara.<sup>(1,5)</sup> No to i dalje nije dovoljno, naime puno je više pacijenata koji čekaju novi organ, nego što ima darivatelja organa, pa se ta disproporcija nastoji riješiti presađivanjem dijela jetre sa živog donora<sup>(6)</sup>, ili dijeljenjem jetre na dva dijela tzv "split transplantacija".<sup>(7,8)</sup>

Jetra i srce nisu, za razliku od bubrega i gušterače, a pogotovo tankog crijeva „imunogeni“ organi te se prilikom transplantacije često ne uzima u obzir tkivna podudarnost (HLA tipizacija), već je dovoljno da primatelj i davatelj imaju indentičnu ili podudarnu krvnu grupu. Iako je moguće uspješno izvesti i Tx u slučaju kada primatelj i davatelj imaju različite krvne grupe takve se transplantacije danas u svijetu rijetko izvode.<sup>(9)</sup>

Model za izračun završnog stadija jetrene bolesti (MELD) je najobjektivniji način za formiranje liste prioriteta za transplantaciju jetre. MELD<sup>(10,11)</sup> vrijednost se računa po posebnoj formuli a za izračun su potrebni vrijednosti bilirubina, kreatinina i INR-a. Taj izračun najurgentnijim pacijentima omogućuje da dobiju organ i na taj se način znatno smanjuje smrtnost na listi čekanja. U terminalnom stadiju jetrene bolesti cijelokupni je metabolizam organizma poremećen pa tako i koštani (slika 1). Kronična bolest jetre i njoj pridružena stanja kao što su hipogonadizam, poremećen metabolizam vitamina D, slaba prehranaje, ingestija alkohola, poremećen metabolizam žuči i slabija tjelesna aktivnost pridonose gubitku koštane mase (BMD). Isto tako poznato je da je ubrzan gubitak koštane mase i u ranom periodu nakon transplantacije što se pak objašnjava utjecajem kortikosteroida, imunosupresivnih lijekova i imobilizacijom u ranom postoperativnom periodu. Gubitak koštane mase dovodi do povećanog rizika od fraktura a samim tim do povećanog morbiditeta i mortaliteta kod tih pacijenata.<sup>(12,13,14,15,16)</sup>



**Slika 1.** *Cirotična (poremećen metabolizam) i zdrava (uredan metabolizam) jetra*

## 2. GRAĐA KOŠTANOG TKIVA

Kosti su izgrađene od tri dijela:

- **koštanog tkiva,**
- **koštane srži**
- **pokosnice**

Ta tri dijela čine biološku cjelinu.

Koštano tkivo dio je potpornog tkiva kojeg još sačinjavaju vezivno i hrskavično tkivo. Koštano tkivo je najtvrdi oblik potpornog tkiva, i ono je glavni sastojak skeleta. Uz potpornu funkciju, na kosti se vežu mišići, kosti štite vitalne organe, štiti koštanu srž iz koje nastaju krvne stanice. Osnovna strukturna značajka koštanog tkiva je da je izgrađeno od dvaju različitih elemenata, tj. stanica koštanog tkiva i međustanične tvari. Druga važna uloga koštanog tkiva je metabolička. Kost se neprestano razgrađuje i nanovo izgrađuje, ona je prvenstveno dinamično uravnotežen rezervar kalcija, fosfora i u manjoj mjeri drugih elemenata u organizmu.<sup>(17,18,19)</sup>

### 2.1. STANICE KOŠTANOG TKIVA

Dva osnovna tipa stanica koštanog tkiva su stanice koje izgrađuju (osteoblasti) i stanice koje razgrađuju kost (osteoklasti). Osteoblasti su stanice mezenhinskog porijekla, a razvijaju se od multipotentnih zametnih stanica koštane srži, a iz istih se stanica mogu diferencirati i masne mišićne i hrskavične stanice. Osteoblasti sintetiziraju organske sastojke međustanične tvari, a uz to su nužni za ugradnju anorganskih sastojaka u matriks, te reguliraju i aktivnost osteoklasta. Sastojke međustanične tvari koje sintetiziraju osteoblasti čine kolagen tip I, koštana alkalna fosfataza, osteokalcin, nekolagene bjelančevine, proteoglikane i glikoproteine. Osteoblasti imaju jednu jezgru, kada su metabolički inaktivni poredani su poput stanica jednoslojnog epitela. Aktivnošću, tj. sintezom matriksa osteoblasti poprimaju kubičan oblik, a citoplazma im postaje bazofilnija. Kad izlučeni matriks potpuno okruži osteoblast, osteoblast postaje osteocit koji zajedno sa slojem novog, još neovapnjenog matriksa čini osteoid. Na svojoj površini osteoblasti imaju receptore za hormone i čimbenike rasta (receptor za paratiroidni hormon i receptor za peptid povezan s paratiroidnim hormonom), a preko kojih se regulira metabolizam kosti.<sup>(17,18,19,20)</sup>

Osteoklasti su koštane stanice hematopoetskog porijekla, nastaju iz zajedničke

monocitno makrofagne loze. Oni su vrlo velike stanice koje mogu sadržavati i do sto jezgara. Kada su osteoklasti aktivni na njihovoj površini prema koštanom matriksu razvijaju se resice preko kojih se izlučuju enzimi i tvari koje razgrađuju organski dio matriksa i otapaju kristale kalcijevih soli. Važni čimbenici aktivacije i diferencijacije osteoklasta su: čimbenik poticanja makrofagnih kolonija (engl. macrophage colony stimulating faktor 1, MCSF 1) i ligand čimbenika jezgrine pobude (engl. receptor activator of nuclear factor – kappa B, RANKL). Osteoklasti sadržavaju receptore za kalcitonin i za tiroksin ali nemaju receptore za paratiroidni hormon (PTH).<sup>(21,22,23)</sup>

## 2.2. KOŠTANA MEĐUSTANIČNA TVAR

Međustanična tvar čini glavnu masu koštanog tkiva a sačinjavaju ga organski i anorganski dio, ona se odlikuje čvrstoćom, tvrdoćom i elastičnošću. Organski dio čini oko 30-40 % međustanične tvari, a sastoji se od kolagena tip 1 i amorfne tvari. Glikoproteini koji se nalaze u amorfnoj tvari i alkalna fosfataza koju proizvode osteoblasti, su najvjerojatnije odgovorni za početak ovapnjenja međustanične tvari. Druga tkiva koja sadrže kolagen tipa I ne sadrže glikoproteine te je to razlog zbog kojeg samo koštano tkivo mineralizira. Kolagena vlakna čine oko 95 % organskog dijela međustanične tvari, a ostatak čini amorfna tvar, koju uz glikoproteine još sačinjavaju i hondrotin sulfat i hijeluronska kiselina. Anorganski dio iznosi 60-70 % od ukupne količine međustanične tvari, pretežno se sastoji od kalcija i fosfata a sadržava još i bikarbonate, kalij, citrate, natrij i magnezij. Kalcij i fosfor kristaliziraju i tvore hidroksiapatit.<sup>(17,18,19,23)</sup>

## 2.3. PERIOST I ENDOST

Vanjska i unutrašnja površina kosti sastoji se od stanica i veziva, stanice izgrađuju kost i one su trajna opskrba novim osteoblastima koji su potrebni za rast i obnovu kosti. Periost se sastoji od kolagenih vlakana i stanica sličnim fibroblastima te stanice se mogu diferencirati u osteoblaste. Endost izgrađuje jedan sloj spljoštenih stanica, on je puno tanji od periosta a prekriva sve unutarnje površine kosti. Glavna funkcija periosta i endosta su prehrana kosti te opskrba kosti osteoblastima bitnim za rast i cijeljenje kosti.<sup>(17,18,19,23,24)</sup>

### 3. VRSTE KOŠTANOG TKIVA

Kada kost prerežano na presjeku se vide dva dijela kosti kompaktni spužvasti dio. Golim okom promatrajući ta dva različita dijela su u stvari imaju isti mikroskopski sastav kosti. Kompaktno koštano tkivo sadrži koštane kanaliće i šupljine u koje su uložene krvne žile i vezivo. Ti su Haversovi i Volkmanovi kanali. U dugim kostima Haversovi kanali teku paralelno s uzdužnom osi kosti dok su Volkmanovi položeni poprečno i koso te se na taj način prelaze u Haversove kanale. Oko Haversovih kanala su postavljene koncentrično koštane lamele i one s kanalom čine koštanu jedinicu koja se naziva osteom. Spužvasto koštano tkivo sastoji se od koštanih gredica između kojih se nalazi koštana srž. Spužvasto koštano tkivo pretežno se nalazi u epifizama dugih kostiju. Spužvasto koštano tkivo nema Haversovih i Volkmanovih kanala pa prema tome nema ni krvnih žila.<sup>(17)</sup>

## **4. FUNKCIJA KOŠTANOG TKIVA**

Dvije osnovne funkcije koštanog tkiva su potporna i metabolička.<sup>(16)</sup>

### **4.1. POTPORNA FUNKCIJA KOŠTANOG TKIVA**

Uz koštano tkivo, hrskavično i vezivno tkivo su dio potpornog tkiva. Koštano tkivo je najtvrdi oblik potpornog tkiva, i ono je glavni sastojak skeleta. Uz potporna funkciju, na kosti se vežu mišići i tetive, kosti štite vitalne organe, štiti koštanu srž iz koje nastaju krvne stanice.<sup>(16)</sup>

### **4.2. METABOLIČKA FUNKCIJA KOŠTANOG TKIVA**

Metabolička funkcija je druga važna funkcija koštanog sustava. Naime koštano tkivo sadrži 99% sveukupne količine kalcija u organizmu i služi kao njegovo skladište. Koncentracija kalcija u plazmi je postojana i iznosi 2,4 mmol/L. Ukoliko dođe do poremećaja (smanjenja) kalcija u plazmi kalcij se mobilizira na dva načina iz kosti. Brzi način predstavlja prijenos kalcijevih iona s kristala hidroksiapatita u intesticijsku tekućinu a odatle u plazmu. Sporiji prijenos mobilizacije kalcijevih iona ovisi o djelovanju hormona na koštano tkivo, u prvom redu paratiroidnog hormona i kalcitonina. Paratiroidni hormon potiče osteoblaste, koji pak aktiviraju osteoklaste da resorbiraju koštani matriks i time se oslobađa kalcij. Djelovanje paratiroidnog hormona na osteoblaste je u smislu pobude osteoblasta da luče čimbenike stimulacije osteoklasta (RANKL). Period koji je potreban za aktivaciju osteoklasta je oko 3-4 tjedna. Kalcitonin ima inhibicijsko djelovanje na osteoklaste, no za metabolizam kosti puno je značajnije djelovanje paratiroidnog hormona nego kalcitonina.<sup>(17,18,20,25)</sup>

## 5. MEHANIZAM KALCIFIKACIJE KOSTI

Aktivirani osteoblasti luče kolagen i to monomerne lance i amorfnu tvar bogatu glikoproteinima. Kolageni monomeri se polimeriziraju te tako tvore kolagenska vlakna. Kolagena vlakna i amorfna tvar tvore tkivo koje se zove osteoid. Osteoid zarobi neke osteoblaste koji su ga sintetizirali nakon čega ti osteoblasti postaju inaktivni te se zovu osteociti. Postepeno dolazi do odlaganja na površinu kolagenih vlakana u osteoidu kalcijevih soli. Odlaganje se odvija u pravilnim razmacima duž svakog kolagenog vlakna, i to odlaganje može trajati danima i tjednima sve dok se ne stvore kristali hidroksiapatita. Mehanizam taloženja kalcijevih soli u osteoid još nije poznat. Pretpostavlja se da tomu potpomažu osteoblasti lučenjem neke tvari inhibitora pirofosfata. Inhibitor sprječava djelovanje pirofosfata koji sprječavaju kristalizaciju hidroksiapatita. Nakon što se neutralizira pirofosfat prirodni afinitet kolagenih vlakana prema kalcijevim solima izaziva taloženje.<sup>(26)</sup>

### 5.1. KOŠTANA PREGRADNJA

Koštana pregradnja je proces kojim se kost trajno obnavlja, pri čemu se uklanjaju oštećeni dijelovi kosti, stvara nova kost te se na taj način održava homeostaza Ca u organizmu. Homeostaza koštanog tkiva odvija se **pregradnjom**, procesom zamjene stare kosti i obnove novostvorenim koštanim tkivom. Pregradnja je jedno od temeljnih zbivanja koštanog tkiva i uglavnom se odvija kod odraslih osoba. Kod djece se tijekom rasta i razvoja organizma prevladava proces rasta i stvaranja oblika kosti. Osteoklasti su stanice hematopoetskog porijekla i razvijaju se od monocitno/makrogagne progenitorske stanice. Osteoklasti na svojoj površini imaju receptore za kalcitonin, receptor za vitronektin i za kiselu alkalnu fosfatazu otpornu na tartarat. Za održavanje normalne građe kosti važno je da su u koštanoj pregradnji proces razgradnje i stvaranja nove kosti ravnomjerni. Koštana pregradnja obuhvaća četiri stadija:

- **pobuda osteoklasta**
- **razgradnja kosti**
- **obrat**
- **izgradnja kosti**

U prvoj fazi pobuđeni osteoklasti stvaraju kiseli okoliš otapajući minerale koštanog tkiva i na taj način vrše resorpciju kosti.<sup>(27)</sup> Da bi se osteoklasti pobudili potrebni su signali koje šalju osteoblasti. Dakle za resorpciju i stvaranje nove kosti potrebno je zajedničko djelovanje osteoblasta i osteoklasta te tvari koje sudjeluju u

njihovoj aktivaciji.

Ligand receptora za aktivaciju jezgrinog faktora kapa B (RANKL; engl. Receptor activator nuclear faktor kappa B ligand) je molekula koje sintetiziraju osteoblasti i koja uz pomoć faktora rasta makrofagnih kolonija (M-CSF; engl. Colony stimulating faktor) potiče stvaranje i aktivaciju osteoklasta.<sup>(24)</sup> Prekursor osteoklasta na svojoj površini sadrži receptor za aktivaciju jezgrinog faktora kapa B (RANK; engl. Receptor aktivator nuclear faktor kappa B) za kojeg se veže RANKL.<sup>(20,27)</sup>

Osteoprotegerin (OPG) je molekula koje sintetiziraju osteoblasti, a koja je funkcionalni antagonist RANKL-a<sup>(28,29,30,31,32)</sup>, i na taj način djeluje na osteoklaste te tako kontrolira koštanu razgradnju. Enzimi (katepsin K i matriksne mijeloproliferaze) koje produciraju osteoklasti cijepaju sastojke koštanog matriksa i tako nastaju djelovi kolagenih vlakana: N- terminalni (Ntx) i C- terminalni teleopeptid (Ctx) kolagena tipa I. Cijepajući na taj način bjelančevine međustanične koštane tvari i otapajući minerale osteoklasti uklanjaju mikroskopski količinu kosti stvarajući udubine na kosti, te se na taj način stanjuju a mogu čak i prekinuti koštane gredice. Faza razgradnje traje 3-4 tjedna, nakon čega nastupa obrat te u području razgradnje kosti dolazi do izgradnje nove kosti.<sup>(21)</sup>

Nakon faze resorpcije dolazi faza izgradnje kosti i taj proces traje oko 3. mjeseca. Najzaslužniji za izgradnju nove kosti su osteoblasti koji inače potiču iz multipotentnih zametnih stanica koštane srži. Oni sintetiziraju sastojke koji su važni za međustaničnu koštanu tvar, tj osteoblasti na mjestu razgrađene kosti stvaraju nemineraliziranu koštanu međustaničnu tvar (osteoid) koja se postepeno mineralizira. Osteoblasti prilikom stvaranja nove kosti produciraju još i osteokalcin, kolagen tip I, koštanu alkalnu fosfatazu, nekolagene bjelančevine, proteoglikane, hijaluron i glikoproteine. Osteoblasti izlučuju prokolagen čiji se krajevi pomoću proteaza ocjepe i tako nastane kolagen tip I. Molekule kolagena tip I se potom stepenasto poslože tako da se krajevi molekula vezani poprečnim vezama tvoreći tako čvrstoću koštane međustanične tvari. Nakon izgradnje nastupa faza mirovanja koja traje oko 2 godine.<sup>(21)</sup>

Koštana pregradnja odvija se tijekom cijelog života, a najintezivnija je tijekom rasta i u odrasloj dobi. Intezitet koštane pregradnje procjenjuje se mjerenjem koncentracije enzima i peptida koji su rezultat fizioloških aktivnosti osteoklasta i osteoblasta. Biokemijski pokazatelji koštane pregradnje mjere se u serumu i urinu, a najznačajniji predstavnici koštane pregradnje koji se mogu mjeriti komercijalnim testovima su: osteokalcin, koštana alkalna fosfataza, C-terminalni propeptid prokolagena



I i N- terminalni propeptid prokolagena I. Smatra se da se godišnje u odrasle osobe obnovi oko 10% koštane tvari kostura, i to 3% u kortikalnoj i 30 % u spužvastoj kosti.<sup>(19,21)</sup>

## 5.2. KLINIČKA PROCJENA KOŠTANE RAZGRADNJE

Prilikom razgradnje kosti osteoblasti produciraju enzime pomoću kojih cijepaju kolagen tipa I u koštanom matriksu na manje dijelove i ti dijelovi dospijevaju u cirkulaciju nakon čega se izlučuju mokraćom. Ti dijelovi molekule kolagena su amino i karboksiterepeotid a vezani su piridolinskim poprečnim vezama i kao takvi metaboliti u krvi su dobar pokazatelj razgradnje kosti. Nakon što se dodatno metaboliziraju (cijepaju se poprečne veze) u bubregu pa se u mokraći mogu mjeriti slobodni piridoloni. Danas postoje komercijalna protutjela za za rutinsko mjerenje koncentracije metabolita u krvi i mokraći koji nastaju razgradnjom kolagena tip I prilikom razgradnje kosti. Kolagen tipa I je osim koštanog tkiva, sastojak i drugih tkiva kao što su: koža, rožnica, hrskavica, vezivno tkivo, krvne žile, no njihov je metabolizam puno sporiji i ne pridonosi procjeni koštane razgradnje. Kemijski sastav piridolinskih veza koje se mjere u mokraći specifičan je za koštano tkivo. Rezultati razgradnje kolagena tipa I u mokraći se izračunavaju po kreatininu u mokraći čime se smanjuje varijacija uzrokovana veličinom tijela.

Razgradnjom kolagena tip I iz kosti u međustanični prostor dospijevaju hidroksiprolin i hidroksilizin. Metoda za mjerenje ovih spojeva je visokotlačna kromatografija, a koja pak nije prikladna za rutinsku kliničku praksu. Enzim kisela fosfataza otporna na tartarat, nalazi se osim u osteoklastima još u prostati, slezeni, trombocitima, eritrocitima i makrofazima. Jedan od izoenzima 5b, karakterističan je za osteoklaste, a za mjerenje njegove aktivnosti postoje komercijalni kompleti reagensija.<sup>(22,27)</sup>

## 5.3. KLINIČKA PROCJENA KOŠTANE IZGRADNJE

Osteoblasti su koštane stanice koji su najzaslužniji za koštanu izgradnju. Klinička važnost procjene osteoblastne aktivnosti imaju kolagen tip I, osteokalcin i koštana alkalna fosfataza. Osteoblasti sintetiziraju prokolagen tipa I čiji se krajni dijelovi uklone djelovanjem enzima proteaza, nakon čega nastane kolagen tipa I i kao takav se uklapa u međukoštanu staničnu tvar. Ti propeptidi koje proteaze cijepaju istodobno s oba kraja

prokolagena tip I i kao takvi se nalaze u cirkulaciji a jedan od tih propeptida je aminopropeptid (P1NP) i on je dobar pokazatelj koštanog metabolizma.

Osteokalcin staraju uz osteoblaste i hondrociti. Osteokalcin se također ugrađuje u međustaničnu koštanu tvar, a dio dospije u cirkulaciju. S obzirom da je metabolizam koštanog tkiva znatno brži nego metabolizam ostalih tkiva koje sadržavaju stanice koje stvaraju osteokalcin, njegovo mjerenje upućuje isključivo na zbivanje u kosti.

Alkalna fosfataza, točnije jedan njen izoenzim koji se stvara u osteoblastima a koji se može mjeriti komercijalnim reagencijama. Ovaj je biokemijski pokazatelj specifičan za koštano tkivo i preko njega se može pratiti izgradnja kosti. Pomoću ukupne vrijednosti alkalne fosfataze može se također procijeniti koštanu izgradnju pod uvjetom da se ne radi o bolesti jetre. U odraslih ljudi polovicu vrijednosti alkalne fosfataze čini izoenzim iz kosti, a drugu polovicu jetreni izoenzim. Prilikom mjerenja koncentracije koštanog izoenzima moguća je križna reakcija s jetrenim i ona iznosi 10-15%. U djece 90% ukupne alkalne fosfataze otpada na koštani izoenzim. Svi navedeni pokazatelji koštane izgradnje mjere se iz krvi.<sup>(21,22,33)</sup>

## **5.4. UČINCI BIOLOŠKE VARIJABILNOSTI NA PREGRADNJU KOSTI**

Na koncentraciju analita i koštanu pregradnju mogu utjecati razni čimbenici kao što su: životna dob, spol, etnička pripadnost.

Tijekom rasta i razvoja pokazatelji koštane pregradnje dosegnu vršne vrijednosti u pubertetu i zabilježene su ranije u djevojčica nego u dječaka. Sve to upućuje na spolne razlike u rastu, spolnom sazrijevanju i povećanju koštane mase.

U žena u premenopauzi i postmenopauzi pregradnja kosti je većeg inteziteta nego kod žena koje su u generativnoj dobi, a pokazatelji koštane pregradnje su viši nego kod muškaraca iste dobi. U muškaraca generativne dobi veća je koncentracija pokazatelja koštane pregradnje, nego kod žena iste dobi što se objašnjava veličinom samog kostura. Kod muškaraca su uočene više koncentracije biokemijskih pokazatelja koštane pregradnje u dobi od 20 do 30 godina i u kasnijoj životnoj dobi od 50 do 60 godina.

Trudnoća i dojenje također su razdoblje kada dolazi do značajnijih varijacija koštane pregradnje. To je razdoblje povećanja potrebe za Ca zbog izgradnje i mineralizacije kostura fetusa, te pojačanim potrebama za kalcijem tijekom dojenja.

Etičke razlike u osobitostima kostura i koštanog metabolizma očituju se kod

pripadnika crnačke rase nižim koncentracijama biokemijskih pokazatelja koštane pregradnje kod djece, omladine i žena nakon menopauze.

Kolebanja koštane pregradnje mogu biti i na dnevnoj bazi, tako su uočene veće koncentracije pokazatelja koštane pregradnje između 2 i 8h ujutro, dok su niže koncentracije između 13 i 23 h. Za koštanu alkalnu fosfatazu dokazano je povećanje koncentracije u dva navrata tijekom dana i to između 11 i 14 h te 23 i 24 h. Zbog navedenih razloga uzorci sa pretrage kostiju uzimaju se ujutro.

Tjelesna aktivnost također utječe na pokazatelje biokemijske pregradnje kosti i to tako da je tjelovježbom potaknuta koštana izgradnja što pak upućuje na važnost mehaničkog opterećenja na koštani sustav. U profesionalnih sportaša i osoba koje se kontinuirano bave sportom izgradnja kosti je povećana za razliku od ostalog stanovništva.

S druge strane kod mirovanja dolazi do povećane razgradnje kosti. Drugi dan nakon imobilizacije koštana razgradnja se povećava, a usporava nakon ponovnog uspostavljanja pokretljivosti.

Prijelomi kao česta stanja uzrokuju povećanje koštane pregradnje i biokemijski pokazatelji mogu narasti čak i do 50%, a ti pokazatelji mogu ostati povišeni i do godinu dana. Stoga je anamnestički podatak o prijelomu jako važan pri tumačenju biokemijskih pokazatelja pregradnje kosti.<sup>(21)</sup>

## 6. ULOGA VITAMINA D U KOŠTANOM METABOLIZMU

Pod djelovanjem ultraljubičastih sunčevih zraka u koži iz 7-dehidrokolesterola, (tvari koja se normalno nalazi u koži) nastaje vitamin D (kolekalciferol). Kolekalciferol se u jetri pretvara u 25-hidroksikalciferol. Pretvorba 25- hidroksikolekalciferola u 1,25 dihidrokolekalciferol se dalje zbiva u proksimalnim kanalićima glomerula bubrega pod utjecajem paratiroidnog hormona. 1,25- dihidrokolekalciferol je najaktivniji oblik D vitamina. Ukoliko nema paratiroidnog hormona nema sinteze fiziološki najaktivnijeg oblika D vitamina. Aktivni oblik vitamina D (1,25 - dihidrokolekalciferol) pospješuje apsorpciju kalcija iz crijeva, u bubrezima i kostima. Koncentracija kalcijevih iona u plazmi nadzire sintezu najaktivnijeg oblika D vitamina, ukoliko se ista povećava koči se lučenje paratiroidnog hormona a samim tim prestaje i pretvorba u bubrezima u aktivni oblik D vitamina.<sup>(18,21,34)</sup>

## 7. OSTEOPOROZA

Osteoporozna je metabolička koštana bolest, kod koje dolazi do smanjenja koštane mase. SZO definira osteoporozu kao stanje kod kojeg se koštana masa smanjuje za 2,5 standardne devijacije od one u mladih i zdravih osoba istog spola. Poremećaj pregradnje kosti pri čemu se stvara manje novostvorene kosti nego što se predhodno razgradi stare kosti temeljni je uzrok nastanka osteoporoze.

Brojni čimbenici kao što su: prehrana oskudna s kalcijem, nedovoljna fizička aktivnost, uživanje alkohola i duhana, te neki lijekovi u prvom redu kortikosteroidi i citostatici dovode do smanjenja koštane mase a samim tim su povezani s nastankom osteoporoze.

Na temelju etiologije razlikujemo primarnu (idiopatsku) i sekundarnu osteoporozu koja nastaje kao posljedica već postojeće bolesti ili primjene lijekova. Osteoporozna je češća kod žena nego kod muškaraca a u dječjoj i mladenačkoj dobi je jako rijetka i najčešće je posljedica uzimanja lijekova ili neke bolesti. Sniženje koncentracije estrogena u postmenopauzi glavni je uzrok nastanka osteoporoze u žena. Snižena koncentracija estrogena smanjuje apoptozu osteoklasta i skrajuće život osteoblastima i tako dolazi do disproporcije u razgradnji stare kosti i izgradnji nove kosti.<sup>(18,21,35,36,37)</sup>

## **8. DOSADAŠNJA SAZNANJA O DINAMICI KOŠTANOG METABOLIZMA PRIJE I NAKON TRANSPLANTACIJE JETRE**

Već dugi niz godina terminalno zatajenje jetre se uspješno liječi transplantacijom. Suvremena dostignuća post-transplantacijskog liječenja imunosupresivnim lijekovima i kortikosteroidima imaju povoljan učinak na dugoročno preživljenje presatka. Bolesnici u terminalnom stanju jetrene bolesti (ciroza) imaju veću učestalost osteoporoze nego zdrava populacija. Osteoporoza je osobito učestala u bolesnika s primarnom bilijarnom cirozom. Wilsonova bolest također predstavlja zaseban rizik za nastanak osteoporoze, i to nezavisno o postojanja ciroze<sup>(13)</sup> Drugi nezavisni prediktori za nastanak osteoporoze su starija životna dob i snižen indeks tjelesne mase. Koštana razgradnja je ubrzana nakon transplantacije, a rizik od prijeloma povećan osobito u ranom poslijetransplantacijskom razdoblju. Zbog velike učestalosti prijeloma u bolesnika nakon transplantacije javlja se potreba za bolje razumjevanje i liječenje postransplantacijske osteoporoze.<sup>(13,14,15,16)</sup> Rizik prijeloma u bolesnika s cirozom je dvostruko veći nego u zdrave populacije, a učestalost osteoporoze 12-55%.<sup>(38)</sup> U bolesnika s primarnim sklerozirajućim kolangitisom 8-32% ima osteoporozu, a 15% prijelome. U hemokromatozi se često uz hipogonadizam javlja i osteoporoza no mehanizam učinka povećane koncentracije željeza na osteoporozu još je nerazjašnjen. Bolesnici s virusnim hepatitisom C imaju povećanu gustoću kosti. Dakle učestalost osteoporoze u bolesnika kandidata za transplantaciju jetre iznosi između 37-53%.<sup>(39)</sup>

Praćenjem zdravstvenog stanja kod ovih bolesnika optimalno bi bilo ustanoviti status koštanog sustava prije transplantacije denzitometrijom u području lumbalne kralježnice i kuka. U slučaju sekundarne osteoporoze potrebno je započeti adekvatno liječenje i ispraviti manjak D vitamina, te osigurati dostatan unos kalcija. Obilježja predtransplantacijskog stanja koštanog sustava već su ustanovljena osteoporoza i prijelomi, a ovo stanje pogoršava starija životna dob, loš prehrambeni status, imobilizacija, hipogonadizam, kaheksija, loše navike (duhanski proizvodi, alkoholna pića). Osnovna bolest nekog od organskih sustava (jetreni, plućni, bubrežni, srčani..) sa specifičnostima patologije dodatno pogoršavaju koštanu bolest.<sup>(14,16)</sup> Procjena poremećaja koštanog metabolizma i rizika prijeloma je osobito važna u bolesnika smanjene tjelesne mase, starije životne dobi, dijabetičara te onih koji su prethodno uzimali kortikosteroide. U ovih bolesnika potrebno je uvesti mjere poboljšanja općeg stanja (tjelesna aktivnost,

povećanje mišićne mase) već u pripremi za transplantaciju. U kandidata za transplantaciju jetre, srca ili pluća s dokazanom sniženom koštanom masom preporuča se započeti liječenje bisfosfonatima već prije zahvata. Naprotiv, u bolesnika na kroničnom liječenju dijalizom to je kontraindicirano zbog opasnosti nastanka adinamične kosti i zaustavljanja pregradnje kosti.<sup>(40)</sup> Tijekom 20 godina nije uočena promjena incidencije osteoporoze i prijeloma u ovim stanjima, a što ukazuje na važnost ovog medicinskog problema, ali i na činjenicu da unatoč napretku struke ovaj aspekt transplantacijske medicine nije poboljšao.

Mnogi su čimbenici nastanka post-transplantacijske osteoporoze, primjerice poremećaj koštanog metabolizma uz osnovnu bolest koji je bio prisutan prije transplantacije, imunosupresivno liječenje, prehrambene navike i one vezane uz način života, poremećaj metabolizma kalcija (lučenja PTH, metabolizam i status D vitamina)<sup>(41,42)</sup> i lučenja spolnih hormona te gonadotropina. Budući da su prijelomi prije transplantacije jetre snažan prediktor prijeloma nakon zahvata, važno je liječiti koštani poremećaj već u pripremi bolesnika za transplantaciju. U bolesnika koji su u razdoblju prije transplantacije imali normalne koncentracije PTH, D vitamina i testosterona, nakon transplantacije jetre se nađu povišene vrijednosti ovih parametara<sup>(12)</sup>, a što ukazuje na promjene metabolizma kosti i minerala uslijed promjena nastalih nakon operativnog liječenja. Liječenje poremećaja koštanog metabolizma treba započeti vrlo rano nakon transplantacije, upravo zbog ubrzane koštane razgradnje u tom razdoblju. U dugoročnom praćenju ovih bolesnika potrebno je predvidjeti redovite kontrole koštane mase i uvesti liječenje osteoporoze, primjerice bisfosfonatima i pripravcima D vitamina (kalcitriol). U prva tri mjeseca nakon transplantacije nastaje smanjenje koštane mase, a tijekom 2 godine se popravi na prvobitne vrijednosti. Prijelomi su najčešći upravo u prve dvije godine s učestalošću od 15-27%<sup>(12)</sup>. Pregledom biopsije kosti u bolesnika nakon transplantacije jetre je nađeno brže poboljšanje poremećaja koštanog metabolizma u onih koji su liječeni takrolimusom u odnosu na one koji su primali ciklosporin.<sup>(41)</sup> Kumulativna doza kortikosteroida je također povezana s poremećajem koštane izgradnje i noviji protokoli koriste manje doze<sup>(44)</sup>. Problematika post-transplantacijske osteoporoze i poremećaja koštanog metabolizma je djelomice poznata i proučena u transplantaciji bubrega. U ovih bolesnika je učestalost prijeloma 6-45%<sup>(40)</sup> i lokalizirana uglavnom na donjim ekstremitetima, osobito na kostima stopala. U dijabetičara je incidencija prijeloma veća, te je u odnosu na zdravu populaciju iste dobi 5-44 puta veća.<sup>(40)</sup> Povezanost koštane mase i rizika prijeloma je dokazana u postmenopausalnoj osteoporozi. Kod bolesnika s presatkom bubrega ta je korelacija niska, budući da je kod ovih bolesnika moguće više

oblika poremećaja koštane pregradnje (ubrzana, usporena, adinamična kost). Potrebno je naglasiti da općenito za sve poremećaje koštanog metabolizma vrijedi da koštana masa nije jedini čimbenik/prediktor prijeloma. Ostali važni čimbenici su starija životna dob, smanjena mišićna masa, slaba pokretljivost i ravnoteža, a kod bolesnika s presatkom bubrega također i dijabetička nefropatija, slabovidnost i neuropatija. Poslijetransplantacijska koštana bolest ima drugačije karakteristike u bolesnika s bubrežnim presatkom. Budući da je poslijetransplantacijski poremećaj koštanog metabolizma stanje koje se manifestira na više načina, snižena koštana masa ne ukazuje uvijek na prisutnost osteoporoze.<sup>(40)</sup> Rizik prijeloma se povećava s vremenom nakon transplantacije. Za transplantaciju drugih solidnih organa je lokalizacija najčešćih prijeloma na kralježnici, rebrima i kuku, i to uglavnom u prvoj godini nakon transplantacije, kad je i gubitak kosti najveći. Ubrzani gubitak koštane mase u razdoblju 6-12 mj. nakon transplantacije je dokazan nakon presađivanja bubrega, jetre, srca ili pluća uz primjenu standardnog protokola imunosupresije sa steroidima. Iskustvo s kasnijim razdobljima nakon transplantacije nije jednoznačno, neki istraživači su dokazali zaustavljanje, a drugi nastavak ubrzane koštane razgradnje.<sup>(40)</sup> Analiza biopsije kosti histomorfometrijom je u nekih skupina bolesnika nakon transplantacije jetre pokazala usporenu koštanu izgradnju, ali u drugih ubranu koštanu razgradnju.<sup>(43,44,45,46)</sup> Usporena koštana izgradnja je vjerojatna posljedica etilizma, smanjene sinteze IGF-1 i hiperbilirubinemije, a ubrzana razgradnja posljedica hipogonadizma. Ovo stanje pogoršava hipovitaminoza D i liječenje kortikosteroidima.<sup>(14)</sup> Najvažniji čimbenik rizika poslijetransplantacijske osteoporoze su kortikosteroidi, ali također i hipogonadizam, upalna stanja, a u bolesnika s bubrežnim presatkom hiperparatiroidizam i hipofosfatemija. Hipovitaminoza D je osobito važna u nastanku ovog stanja kod bolesnika s jetrenim ili bubrežnim presatkom, djelomice uzrokovana i zaštitom od Sunčeva svjetla uslijed opasnosti nastanka raka kože. Hipogonadizam je moguć i u nastavku bolesti nakon transplantacije. Upalna stanja s pojačanim lučenjem citokina uzrokuje poremećaj lučenja liganda (RANKL, osteoprotegerin) za receptore na osteoklastima i pojačanom koštanom razgradnjom. Kortikosteroidi su škodljivi za koštani metabolizam već u malim dozama, s učinkom kočenja koštane izgradnje. Za ostale lijekove s imunosupresivnim djelovanjem nije sa sigurnošću ustanovljena povezanost s gubitkom koštane mase, a to se odnosi na ciklosporin i takrolimus. Sirolimus, mofetil mikofenolat i azatioprin vjerojatno imaju zanemarujuću škodljivost na koštani metabolizam.<sup>(40)</sup> Liječenje bisfosfonatima (pamidronat) nakon transplantacije jetre



zaustavlja gubitak koštane mase u području lumbalne kralježnice, ali ne i području kuka te ne popravlja incidenciju prijeloma.<sup>(48)</sup> Prevencija poslijetransplantacijskog gubitka koštane mase moguća je izostavljanjem kortikosteroida u sklopu imunosupresivne terapije, ali to nije jednoznačno dokazano. Preporuča se davanje preparata D vitamina i kalcija, te liječenje bisfosfonatima. Zaustavljanje ubrzanog gubitka koštane mase u ranom razdoblju nakon transplantacije davanjem bisfosfonata (per os ili parenteralno) dokazano je za transplantaciju bubrega, srca i jetre.<sup>(40)</sup> Liječenje poremećaja koštane pregradnje temeljeno je na iskustvu liječenja osteoporoze, a osim medikamentoznog liječenja trebalo bi uključiti i fizikalnu terapiju odn. tjelovježbu sa svrhom jačanja mišića i pospješavanja ravnoteže.<sup>(15)</sup> Od lijekova su važni pripravci kalcija i D vitamina, te bisfosfonati, hormonsko nadomjesno liječenje, SERM („raloksifen”), testosteron i drugi lijekovi učinkoviti u liječenju osteoporoze. U kontroliranoj studiji primjene bisfosfonata (parenteralno zolendronat) značajna razlika je postojala za područje kuka 6 mj. nakon transplantacije. Promjene biokemijskih pokazatelja koštane pregradnje, mjerenih prije, 3, 6 i 12 mj. nakon transplantacije nisu dokazane, osim sniženja osteokalcina, a što se tumači učinkom zolendronata na koštanu pregradnju.<sup>(49)</sup> Liječenje bisfosfonatima (pamidronat) u bolesnika s transplantiranom jetrom značajano je popravilo koštanu masu u području lumbalne kralježnice nakon godine dana. U kontrolnoj skupini bolesnika nije bilo promjene koštane mase za lumbalnu kralježnicu, ali koštana masa vrata bedrene kosti je smanjena u tom razdoblju u liječenih i neliječenih bolesnika.<sup>(50,51)</sup> Biokemijski pokazatelji koštane pregradnje, osteokalcin i fragmenti kolagena koji se izlučuju mokraćom bili su sniženi uz liječenje bisfosfonatima.<sup>(50)</sup> Ovi rezultati ukazuju da liječenje bisfosfonatima može poboljšati koštanu masu, ali ne za sve lokacije skeleta na kojima se događaju tipične osteoporotične frakture. Također je izvjesno da su mnogi čimbenici uključeni u poremećaj koštane pregradnje u ovih bolesnika<sup>(15)</sup>, a na njih ne utječe liječenje bisfosfonatima.

Razdoblje rasta i razvoja je važno za koštani sustav budući da se najveći dio koštane mase uspostavi upravo u razdoblju puberteta, a u potpunosti vršna koštana masa postigne nakon 20 godine. Optimalna vršna koštana masa je preduvjet zdravlja koštanog sustava i sprječavanje nastanka osteoporoze. Problematika poslijetransplantacijskog poremećaja koštane pregradnje i nastanka osteoporoze nije isključivo pojava u odraslih bolesnika.<sup>(15)</sup> U djece i adolescenata s transplantiranom jetrom je dokazana također snižena koštana masa u odnosu na zdrave vršnjake i asimptomatski prijelomi kralježaka. Promjene su bile teže u starije djece u doba transplantacije, tj. oni stariji od 10 godina u

doba zahvata. U ove djece je također ustanovljen ubrzani gubitak koštane mase razdoblju neposredno nakon transplantacije. Također, u dugoročnom praćenju u pubertetu i kasnije je postizanje vršne koštane mase bilo lošije u odnosu na zdrave vršnjake.<sup>(52)</sup> Ovo je važno istraživanje budući da ukazuje u doba učestalih i dostupnih zahvata transplantacije na pojavnost problematike i poteškoća koštanog metabolizma u djece i odraslih, te potrebu njihovog praćenja, boljeg razumijevanja etiopatogeneze i čibenika rizika te mjera liječenja.

Upravo zbog mnogih nepoznanica u razumijevanju etiopatogeneze koštanog poremećaja kod bolesnika s kroničnim jetrenim zatajenjem/oštećenjem funkcije za sada ne postoje protokoli, preporuke i smjernice koje bi jednoznačno ukazale na primjenu i učestalost mjerenja gustoće kosti i biokemijskih pokazatelja koštane pregradnje. Za sada se može primijeniti mjerenje gustoće kosti prije transplantacije i do 3x godišnje nakon zahvata. Za područje biokemijskih pokazatelja koštane pregradnje ima još manje podataka<sup>(12)</sup>, a osobito obzirom na klirens nekih analita putem jetre tj. prokolagen i koštana alkalna fosfataza. Istraživanje molekula poveznica funkcije osteoblasta i osteoklasta, a to su osteoprotegerin i RANKL, kod bolesnika s cirozom jetre je nađeno da je osteoprotegerin povišen prije transplantacije i to osobito kod onih sa sniženom koštanom masom u području kuka.<sup>(53)</sup> Koštana izgradnja procijenjena temeljem mjerenja osteokalcina je vjerojatno snižene budući da su i koncentracije osteokalcina snižene kod bolesnika s kroničnim jetrenim bolestima prije transplantacije, a povećaju se nakon transplantacije.<sup>(54)</sup> Ovaj porast se ne uočava kod bolesnika s transplantiranom jetrom koji primaju bisfosfonate.<sup>(50)</sup>

Postoji mnogo dokaza da u osnovi svih poremećaja koštanog metabolizma ili bolesti koštanog sustava je poremećaj ravnoteže lučenja osteoprotegerina i RANKLA.<sup>(55,56,57,58,59)</sup> Povećano lučenje osteoprotegerina u klinički dokazanim bolestima koštanog sustava (primjerice osteoporoza) tumači se kompenzatornim mehanizmima održavanja homeostaze i kočenja ubrzane koštane razgradnje.

Kod bolesnika s kroničnim bolestima jetre (alkoholna ciroza, virusni hepatitis, autoimuna ciroza, primarna bilijarna ciroza, primarni sklerozirajući kolangitis) i sniženom koštanom masom su dokazane promjene osteoprotegerina i RANKL-a sukladno s poremećaju koštanog metabolizma. Ovaj sustav kompenzacije u osteoporozi s pojačanim lučenjem osteoprotegerina nije učinkovit u kroničnim bolestima jetre.<sup>(60)</sup> Čimbenici rasta i upalni citokini (IL-1, IL-6, TNF alfa) koji se pojačano stvaraju u kroničnim jetrenim bolestima istovremeno potiču lučenje osteoprotegerina i RANKL-a.<sup>(60)</sup>

Suvremena saznanja transplantacijske medicine nedvojbeno ukazuju na poremećaj koštanog metabolizma u kroničnim bolestima jetre prije i nakon transplantacije, s povećanom incidencijom osteoporoze i prijeloma. Koštana pregradnja je osobito ubrzana u prvim mjesecima nakon transplantacije, a normalizira se u razdoblju od oko 2 godine nakon zahvata. Dinamika pregradnje ostaje nerazjašnjena, osobito obzirom na promjene pokazatelja koštane pregradnje. Potrebno je istaknuti da je kod ovih bolesnika hipovitaminoza D učestala, zbog poremećaja apsorpcije i ograničenja načina života sa smanjenom izloženošću Sunčevom svjetlu. Hipovitaminoza D je nepovoljan čimbenik koštanog zdravlja. Neki pokazatelji koštane pregradnje, tj. izgradnje, metaboliziraju se jetrom. To su koštana alkalna fosfataza i prokolagen propeptid te u slučaju kroničnog oštećenja jetrene funkcije očekuje se nakupljanje ovih metabolita, čak i u stanju usporene koštane pregradnje. Normalizacijom funkcije jetre tj. nakon transplantacije, klirens nakupljenih navedenih analita bi smanjio njihovu koncentraciju. Također, razdoblju duljem od 3 i više mjeseci (zbog trajanja ciklusa koštane pregradnje = ~1 mj. razgradnja + 3 mj. izgradnja kosti) može se očekivati pojačana koštana izgradnja. Ovaj aspekt promjena i poboljšanja koštane pregradnje nakon transplantacije jetre, koji uključuje više pokazatelja koštane izgradnje i razgradnje, te molekulu poveznicu zbivanja osteoklasta i osteoblasta, nije sustavno istražen. Imunosupresivno liječenje, tj. kortikosteroidi imaju nepovoljan učinak na izgradnju kosti, a što može interferirati s oporavkom koštane izgradnje, osobito u ranom post-transplantacijskom razdoblju dok su doze lijekova visoke. Ostala imunosupresivna terapija, vrlo vjerojatno na temelju literaturnih saznanja, ima zanemariv učinak na koštani metabolizam.

## 9. HIPOTEZA

Poremećaj koštanog metabolizma u stanju jetrenog zatajenja se mijenja i popravlja nakon transplantacije jetre. Može se pretpostaviti oporavak koštane pregradnje, ali i interferencija kortikosteroida čije su doze visoke u ranom razdoblju nakon transplantacije sa svrhom imunosupresije i održavanja presatka. Ovim istraživanjem ćemo pokušati razjasniti dinamiku promjena koštane izgradnje i razgradnje u prvoj godini (3, 6 i 12 mj.) nakon Tx jetre, te razjasniti povoljan metabolički učinak jetrene funkcije presatka na koštanu izgradnju ili nepovoljan učinak kortikosteorida u ranom razdoblju. Istraživanje promjena osteoprotegerina, čimbenika koji se pojačano luči i u kroničnim jetrenim bolestima, dodatno će pojasniti poremećaj koštane pregradnje. Naime, može se pretpostaviti da su koncentracije osteoprotegerina povišene u ranom poslijetransplantacijskom razdoblju u smislu kompenzatornog mehanizma pojačanog lučenja zbog poremećaja pregradnje i rizika nastanka osteoporoze, sa sniženjem uz poboljšanje ovih poremećaja koštane pregradnje. Ovo istraživanje bi trebalo razjasniti temelj dinamike poremećaja i oporavka koštane pregradnje obzirom na lučenje osteoprotegerina i posljedično koštanu pregradnju. Testiranjem navedenih hipoteza razjasnit ćemo dinamiku koštane pregradnje u poslijetransplantacijskom razdoblju, obzirom na promjene i normaliziranje koštane izgradnje i razgradnje u prvih 12 mjeseci nakon zahvata. Normalizacijom životnih navika i uvjeta s poboljšanim statusom vitamina D očekuje se povoljan učinak na koštani metabolizam, a što će se pokušati dokazati ovim istraživanjem. Mjerenjem gustoće kosti dobit će se podaci o statusu skeleta, budući da je nejasno pogoršava li se osteoporoza ili popravlja u ranom razdoblju nakon transplantacije.

## 10. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je istražiti dinamiku i promjene koštane izgradnje i razgradnje, koncentracije 25-OH D i status koštane mase skeleta. Na taj način se želi razjasniti u kojem razdoblju je koštana razgradnja najviše ubrzana i u kojem razdoblju nakon transplantacije je koštana izgradnja najviše usporena, te u kakvoj je vezi pregradnja s lučenjem osteoprotegerina tijekom prve godine nakon zahvata.

Posebni ciljevi u okviru ovog istraživanja su:

1. promjene pokazatelja izgradnje kosti: koštane alkalne fosfataze i prokolagen propeptida koji se metaboliziraju u jetri 3 mj., 6 mj. i 12 mj. nakon transplantacije jetre
2. promjene pokazatelja: izgradnje kosti osteokalcina i pokazatelja razgradnje kosti kolagen I telopeptida (koji se metaboliziraju u bubregu) 3 mj., 6 mj. i 12 mj. nakon transplantacije jetre
3. promjene osteoprotegerina, čimbenika kočenja proliferacije i aktivacije osteoklasta 3mj, 6mj. i 12 mj. nakon transplantacije jetre
4. promjene koncentracije 25-OH D u 3 mj. i 12 mj. nakon transplantacije
5. status gustoće kosti (slabinska kralježnica i vrat bedrene kosti) 6 mj. i 12 mj. nakon transplantacije jetre.

Svi bolesnici primaju isti i podudarni program imunosupresivne terapije.

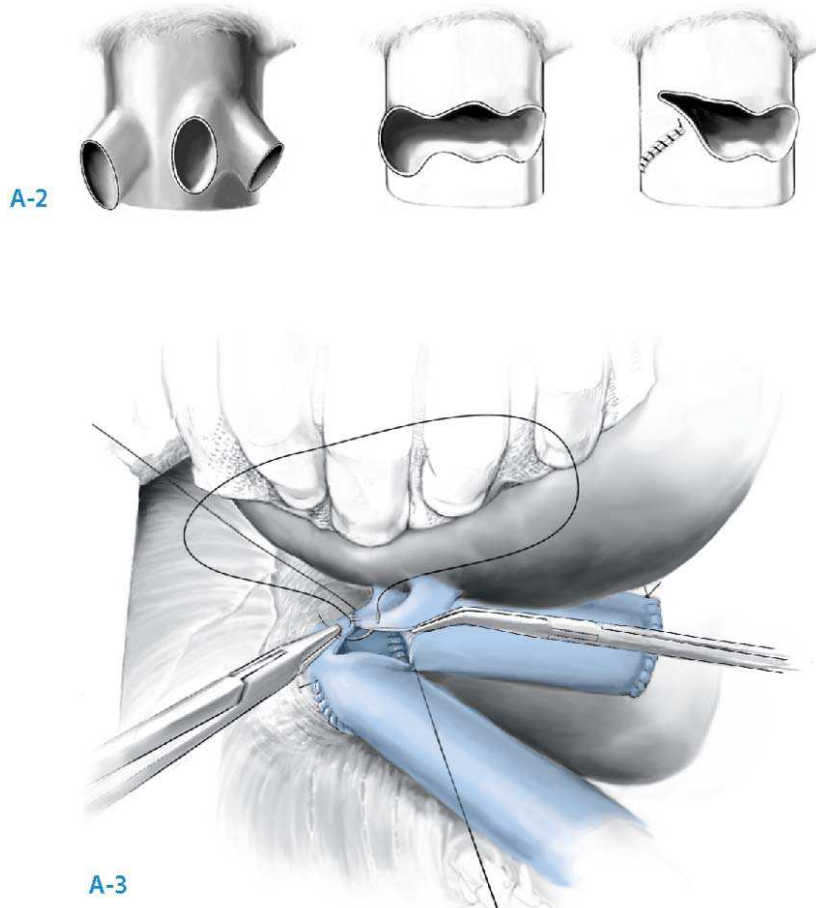
## 11. METODE ISTRAŽIVANJA

### 11.1. BOLESNICI

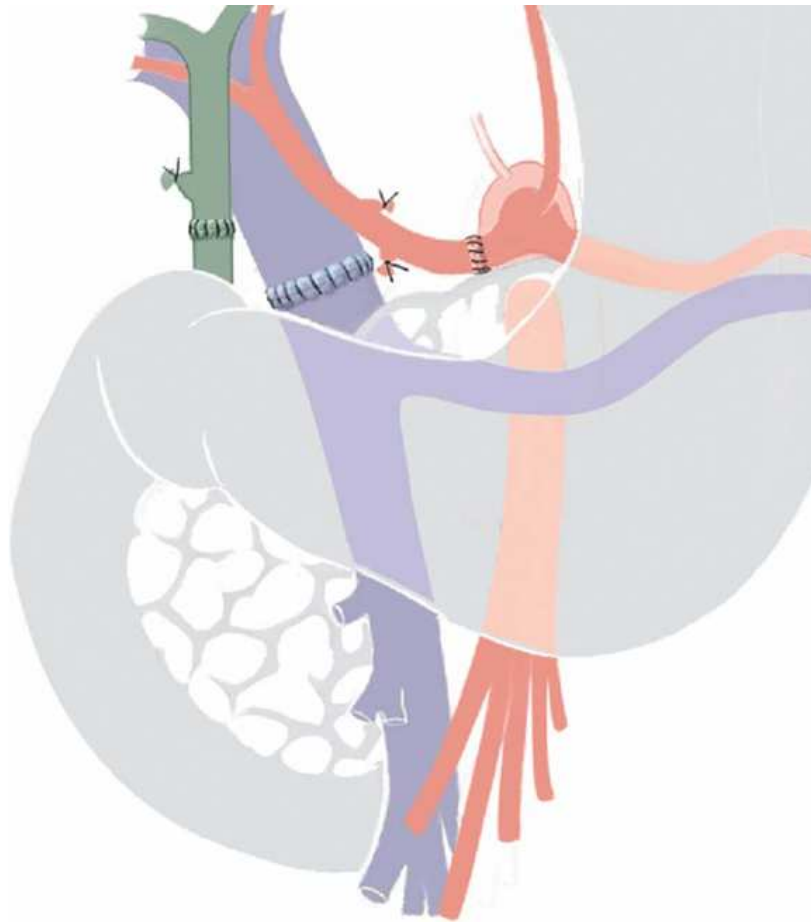
Kliničko istraživanje osteoporoze u bolesnika s transplantiranom jetrom koje se provodi u Centru za transplantaciju organa Klinike za kirurgiju KB Merkur odobreno je odlukom Etičkog povjerenstva bolnice Merkur od 16. svibnja 2007. god. Svrha ovog istraživanja je bolje poznavanje etiopatogeneze osteoporoze i mehanizama koštane razgradnje u bolesnika s transplantiranom jetrom, a što bi pridonijelo boljoj procjeni statusa koštanog sustava kod bolesnika i u liječenju ovog stanja. Istraživanje je obuhvatilo 88 odraslih bolesnika oba spola, između 18-60 godina. Donirane jetre su također bile od oba spola između 18-60 godina, a masna degeneracija u eksplantiranoj jetri nije prelazila 30%. Indikacije za transplantaciju jetre su (najčešće u ustanovi KB Merkur): etilična ciroza, hepatocelularni karcinom u cirozi, hepatitis B virusna ciroza, Wilsonova bolest, kolangiocelularni karcinom, kriptogena ciroza, primarna bilijarna ciroza, hemoendoteliom i neka druga stanja kronične bolesti jetre.

Svi bolesnici su bili u završnom stadiju jetrene bolesti, preoperacijski obrađeni na Internoj klinici KB Merkur i uključeni na listu čekanja. Odabir bolesnika za transplantaciju vršio se po stupnju hitnosti, tj. po standardnom modelu izračuna završnog stadija jetrene bolesti (MELD, model for end-stage liver disease). Srednja vrijednost MELD vrijednosti je bila 19. Bolesnici s hepatocelularnim karcinomom u cirotičnoj jetri bili su na listi u sklopu poznatih Milanskih kriterija (karcinom veličine do 5 cm, ili tri karcinomske lezije svaka manja od 3 cm)<sup>(61,62)</sup>. Svima je napravljena ortotopna transplantacija jetre "piggy back" tehnikom<sup>(63,64,65,66)</sup> (slika 2 i 3). Glavna prednost piggy back tehnike je u tome što se bolesna jetra oslobađa od donje šuplje vene (VCI) tako da nije potrebno koristiti prilikom operacije vensko-venski „Y” by pass (slika 1, 2, 3). Prosječno vrijeme hladne ishemije bilo je 9 sati. U istraživanje su bili uključeni samo oni bolesnici kojima su bilijarni putevi rekonstruirani koledikokoledokalnom anastomozom. Bolesnici koji imaju transplantiran već jedan organ (npr. bubreg) ili koji imaju retransplantiranu jetru su isključeni iz istraživanja. Po izvršenoj transplantaciji jetre primjenjivala se standardna imunosupresivna terapija kalcineurinski inhibitor (Prograf), kortikosteroid i inhibitor sinteze nukleotida (Cell Cept). Ciljane vrijednosti prografa u krvi u prvih 6 mj. iznosile su od 12-14, a drugih 6 mj od 10-12. Dnevna doza Ceel cepta iznosila je 2 grama podijeljena u dvije doze, dok je vrijednost kortikosteroida u prva tri

mjeseca bila 20 mg, a potom se svaki mjesec smanjivala za 5 mg tako da su od 6. postoperativnog mjeseca kortikosteroidi iz terapije izostavljeni. Prva dva tjedna vršile su se svakodnevne kontrole: kompletna krvna slika, jetreni enzimi, dopler jetrene arterije, razina imunosupresije, a navedeni nalazi dali su nam uvid u funkciju transplantirane jetre. Po otpustu iz bolnice redovite kontrole bile su jednom tjedno prvih mjesec dana, potom dva puta mjesečno do šestog mjeseca, a nakon toga jednom mjesečno.<sup>(2)</sup>



**Slika 2.** Piggy back tehnika transplantacije jetre



*Slika 3. Kreiranje vaskularnih struktura u hepatoduodenalnom ligamentu (arterija i vena) te rekonstrukcija bilijarnog stabla (koledoko-koledokalna anastomoza)*

## 11.2. DENZITOMETRIJA

Mineralna gustoća kosti se mjeri denzitometrijom DXA metodom. To je metoda koja koristi x-zrake dvije jačine u vrlo maloj dozi i koje se propuštaju kroz tijelo i kostur. Posebni detektori (senzori) mjere zrake koje su prošle kroz tijelo i kosti, a u elektroničkom računalu se razlike emitiranih i detektiranih zraka (energije) preračunava u mineralnu gustoću kosti (engl. bone mineral density, BMD). Mjerenje se provodi u području slabinske kralježnice (L1-L4) i vrata bedrene kosti (kuka) na uređaju Hologic (Hologic Waltham, MA, SAD). Greška mjerenja je 1%, doza zračenja je niska (3,5 mRema). Rezultati mjerenja se izražavaju u apsolutnim vrijednostima  $\text{g/cm}^2$  i kao T-vrijednost odn. Z-vrijednost. T-vrijednost je odstupanje rezultata od referentnih vrijednosti za zdravu i mladu populaciju istog spola, a Z-vrijednost je odstupanje rezultata onih za zdravu populaciju istog spola i dobi. Rezultate mjerenja mineralne gustoće kosti izrazili smo na tri načina: BMD – u apsolutnim vrijednostima ( $\text{g/cm}^2$ ), zatim kao T-



vrijednost (engl. T-score), a predstavlja odstupanje izmjerene vrijednosti BMD od vršne koštane mase mladih osoba izražene u standardnim devijacijama, i kao Z-vrijednost (engl. Z-score) koji predstavlja odstupanje izmjerene vrijednosti BMD od prosječne koštane mase osoba iste dobi izražene standardnom devijacijom. T i Z-vrijednosti su automatski izračunate koristeći podatke iz aparata QDR Delphic. Mjerenja u području slabinske kralježnice i vrata bedrene kosti omogućuju procjenu cijelog skeleta, budući da se u kralježnici pretežno nalazi trabekularna kost, a u području vrata bedrene kosti uglavnom kortikalna kost. Na temelju preporuka Svjetske zdravstvene organizacije (1994.) kvantifikacija koštane mase omogućuje procjenu osteoporoze za žene u postmenopauzi. Isti kriteriji se koriste za odrasle muškarce i primjenjuje kod sumnje na osteoporozu i osteopeniju u drugim stanjima i poremećajima koštanog metabolizma.<sup>(67,68)</sup>

**Tablica 1.** T-vrijednosti

<b>T-vrijednost</b>	<b>procjena/tumačenje</b>
>+1	povećana koštana masa
-0,99 / 0,99	normalna koštana masa
-1,0 / -2,49	osteopenija
<-2,5	osteoporoza
<-2,5 i prijelom(i)	izrazita osteoporoza

### 11.3. BIOKEMIJSKE PRETRAGE KOŠTANE PREGRADNJE

Promjene koštanog metabolizma i intenzitet koštane pregradnje je moguće neizravno procijeniti mjerenjem pokazatelja koštane pregradnje. To su pretrage koje mjere tvari koje su rezultat koštanih zbivanja osteoblasta i osteoklasta. Pokazatelji koštane izgradnje su bjelančevine nastale pri stvaranju koštanog matriksa, i to: osteokalcin, dijelovi molekula kolagena tip I (prokolagen C- ili N- propeptid) i koštana alkalna fosfataza. Pokazatelji koštane razgradnje su dijelovi kolagena I iz koštanog matriksa, primjerice telopeptid kolagena tip I. Molekule poveznice zbivanja osteoblasta i osteoklasta, tj. regulacije proliferacije, diferencijacije i aktivacije osteoklasta s posljedičnim poticanjem apoptoze ili razgradnje kosti, su važne u proučavanju koštanog metabolizma i njegovih poremećaja. Osteoprotegerin, koji stvaraju osteoblasti, ali i stanice ne-koštanih tkiva je tzv. lažni ligand receptora na osteoklastima pojačano se luči potaknut nekim hormonima (estrogeni) i čimbenicima rasta (BMP), te kalcijem u

stanjima kad su osteoklasti kočeni u aktivnosti. U poremećajima koštane pregradnje osteoprotegerin se pojačano luči u smislu kompenzacije pojačane koštane razgradnje. Mjerenje ovog analita nema klinički opravdanu primjenu, ali je važno za istraživanja koštanog tkiva i poremećaja koštane pregradnje. U procjeni koštanog metabolizma je vrlo važan status D vitamina, koji se procjenjuje mjerenjem metabolita 25-hidroksivitamina D (25-OH D). Dostatne količine 25-OH D omogućuju konverziju u biološki aktivan (hormonski) oblik 1,25-dihidroksivitamin D koji je važan regulator metabolizma kalcija, ali i staničnih zbivanja izvanskeletnih tkiva.

Biokemijski pokazatelji koštane pregradnje, uključujući osteoprotegerin i 25-OH D su izmjereni iz ostatka seruma sakupljenog tijekom redovite polikliničke kontrole bolesnika u post-transplantacijskoj skrbi. Raspored pretraga je predviđen ustrojem i planom istraživanja.

Pretrage su se vršile iz zamrznutog seruma u serijama poluautomatskom metodom na uređaju za ELISA pretrage komercijalnim kompletima reagensija prema uputama proizvođača.

**Tablica 2.** Pregled komercijalnih reagensija s uputama proizvođača

Naziv pretrage/ analita	Naziv proizvoda	Proizvođač
25-OHD	25-Hydroxy Vitamin D EIA	IDS, Tyne & Wear, Velika Britanija
Koštana alkalna fosfataza	Metra BAP	Quidel, San Diego, SAD
Osteokalcin	N-mid Osteocalcin	Nordic Bioscience, Herlev, Danska
Osteoprotegerin	Human Osteoprotegerin ELISA	BioVendor, Modrice, Republika Češka
Prokolagen, PICP	Metra CICP	Quidel, San Diego, SAD
Telopeptid	Serum Crosslaps ELISA	Nordic Bioscience, Herlev, Danska

## 11.4. USTROJ POKUSA

*Tablica 3. Vremenski periodi uzimanja uzoraka*

Vrijeme uzorkovanja	Uzorak / pretrage
Transplantacija („0”)	serum – osteokalcin, koštana alkalna fosfataza, P1CP, telopeptid, osteoprotegerin, 25-hidroksi vitamin D
14 dana nakon transplantacije	serum – osteokalcin, koštana alkalna fosfataza, P1CP, telopeptid, osteoprotegerin
3 mj. nakon transplantacije	serum – osteokalcin, koštana alkalna fosfataza, P1CP, telopeptid, osteoprotegerin, 25-hidroksi vitamin D
6 mj. nakon transplantacije	serum – osteokalcin, koštana alkalna fosfataza, P1CP, telopeptid, osteoprotegerin denzitometrija
12 mj. nakon transplantacije	serum – osteokalcin, koštana alkalna fosfataza, P1CP, telopeptid, osteoprotegerin, 25-hidroksi vitamin D denzitometrija

## 11.5. STATISTIČKE ANALIZE

Statističke analize su uključivale izračun deskriptivne statistike, t-testa razlika između spolova, parametrijske i neparametrijske testove (parne) za procjenu razlika između pojedinih točki mjerenja, te korelacija primjenom standardnih statističkih programa.

### Izračun veličine uzorka

- $p < 0,05$ , power 0,9
- Osteokalcin N = 14
- P1CP = 10
- Koštana alkalna fosfataza N = 7
- Ctx N > 10
- Osteoprotegerin N = 14
- 25-OH D N=3

## 12. REZULTATI

### 12.1. DESKRIPTIVNA STATISTIKA BIOKEMIJSKIH VARIJABLI

Deskriptivna statistika je prikazana u tablici 4, a uključuje rezultate broja podataka za svaku varijablu, najveću i najmanju vrijednost, aritmetičku sredinu i standardnu devijaciju. Rezultati su prikazani za životnu dob u vrijeme transplantacije te za biokemijske parametre mjerene tijekom istraživanja u pet navrata. Rezultati deskriptivne statistike za denzitometriju su prikazani u tablici 5.

*Tablica 4. Deskriptivna statistika za varijable životne dobi na početku istraživanja i rezultati mjerenih biokemijskih parametara u pet navrata (u vrijeme transplantacije, tx; nakon 14 dana, nakon 3, 6 i 12 mjeseci). Rezultati su prikazani veličinom uzorka, najmanjom i najvećom vrijednošću, aritmetičkom sredinom te standardnom devijacijom.*

<b>Varijabla (mjerna jedinica)</b>	<b>N</b>	<b>Najmanja vrijednost</b>	<b>Najveća vrijednost</b>	<b>Aritmetička sredina</b>	<b>Standardna devijacija</b>
Dob (god.)	88	16	71	51,32	10,26
Prvo mjerenje (tx)					
Osteoprotegerin (pmol/L)	88	1,50	60,00	12,38	11,97
25-OH D (nmol/L)	66	8	73	35,89	16,57
Crosslaps (µg/L)	90	0,13	2,54	1,0093	0,78
P1CP (µg/L)	88	18	936	136,23	126,09
Osteokalcin (µg/L)	87	1	66	4,85	10,17
Koštana alkalna fosfataza (IU/L)	88	3,20	133,00	19,53	15,54
Drugo mjerenje (14. dan)					
Osteoprotegerin (pmol/L)	53	1,50	27,78	4,98	4,39
Crosslaps	53	0,25	2,54	1,09	0,64

( $\mu\text{g/L}$ )					
P1CP ( $\mu\text{g/L}$ )	51	7	316	106,43	57,77
Osteokalcin ( $\mu\text{g/L}$ )	53	1	66	7,72	10,51
Koštana alkalna fosfataza (IU/L)	53	0,50	62,00	21,90	10,70
Treće mjerenje (3. mj.)					
Osteoprotegerin ( $\text{pmol/L}$ )	27	1,50	10,55	4,90	1,99
25-OH D ( $\text{nmol/L}$ )	25	12	103	25,40	19,00
Crosslaps ( $\mu\text{g/L}$ )	27	0,28	2,20	0,85	0,52
P1CP ( $\mu\text{g/L}$ )	27	37	235	110,52	53,34
Osteokalcin ( $\mu\text{g/L}$ )	27	2	66	19,59	18,56
Koštana alkalna fosfataza (IU/L)	26	5,80	51,20	19,89	11,58
Četvrto mjerenje (6 mj.)					
Osteoprotegerin ( $\text{pmol/L}$ )	16	1,56	8,94	4,06	2,13
Crosslaps ( $\mu\text{g/L}$ )	16	0,23	2,04	0,72	0,49
P1CP ( $\mu\text{g/L}$ )	16	20,80	328,00	134,43	85,88
Osteokalcin ( $\mu\text{g/L}$ )	16	1	66	26,09	21,57
Koštana alkalna fosfataza (IU/L)	16	12,50	52,40	26,41	10,27
Peto mjerenje (12 mj.)					
Osteoprotegerin ( $\text{pmol/L}$ )	15	1,50	9,81	4,34	2,50
25-OH D ( $\text{nmol/L}$ )	11	9	63	31,00	18,42

---

Crosslaps (µg/L)	15	0,10	1,25	0,51	0,32
P1CP (µg/L)	15	16,00	137,00	73,53	38,60
Osteokalcin (µg/L)	15	5	52	20,87	14,85
Koštana alkalna fosfataza (IU/L)	15	8,10	53,90	25,04	13,19

---

**Tablica 5.** Deskriptivna statistika za varijable denzitometrije mjerene u dva navrata, 6 i 12 mjeseci nakon transplantacije. Rezultati su prikazani veličinom uzorka, najmanjom i najvećom vrijednošću, aritmetičkom sredinom te standardnom devijacijom.

<b>Varijabla (mjerna jedinica)</b>	<b>N</b>	<b>Najmanja vrijednost</b>	<b>Najveća vrijednost</b>	<b>Aritmetička sredina</b>	<b>Standardna devijacija</b>
Prvo mjerenje (6 mjeseci nakon transplantacije)					
Vrat lijeve bedrene kosti BMD (g/cm <sup>2</sup> )	22	0,490	1,218	,82841	,203722
Vrat lijeve bedrene kosti T-vrijednost	22	-3,20	1,60	-1,0432	1,31256
Vrat lijeve bedrene kosti Z-vrijednost	22	-2,30	2,00	-,4445	1,25488
Slabinska kralježnica BMD (g/cm <sup>2</sup> )	22	0,658	1,331	,97173	,194469
Slabinska kralježnica T-vrijednost	22	-3,90	1,20	-1,2314	1,50189
Slabinska kralježnica Z-vrijednost	22	-3,80	1,60	-,8882	1,41393
Drugo mjerenje (12 mjeseci nakon transplantacije)					
Vrat lijeve bedrene kosti BMD (g/cm <sup>2</sup> )	11	0,446	1,311	0,91400	,216277
Vrat lijeve bedrene kosti T-vrijednost	11	-3,60	1,70	-0,6636	1,41511
Vrat lijeve	11	-2,60	2,00	-0,2455	1,32918

bedrene kosti					
Z-vrijednost					
Slabinska					
kralježnica	10	0,618	1,247	1,02840	0,197551
BMD (g/cm <sup>2</sup> )					
Slabinska					
kralježnica	11	-4,30	1,30	-0,7380	1,58348
T-vrijednost					
Slabinska					
kralježnica	11	-4,10	1,70	-0,9545	1,77672
Z-vrijednost					

## 12.2. ISPITVANJE RAZLIKE IZMEĐU SPOLOVA ZA REZULTATE U PRVOM I DRUGOM MJERENJU

Razlika između spolova testirana je za mjerenja biokemijskih varijabli s najvećim brojem podataka u prvom (transplantacija, tx) i drugom (14. d) mjerenju primjenom Mann-Whitney-evog testa. Statistički značajna razlika postojala je samo za dvije biokemijske varijable i to u drugom mjerenju, za P1CP i za koštanu alkalnu fosfatazu. U tablici 6 su prikazani rezultati testa za ove dvije varijable, te podaci o veličini uzorka, medijan i raspon. Budući da je za biokemijske parametre u prva dva mjerenja razlika između spolova postojala samo za dvije varijable, statističke analize provedene su za cijelu skupinu.

Mjerenja u nastavku istraživanja, treće, četvrto i peto imaju ukupno mali uzorak i analizirana su kao jedna skupina.

**Tablica 6.** Rezultati za dvije varijable za koje postoji statistički značajna razlika između spolova testirano Mann-Whitney-evim testom za sve biokemijske parametre u prvom i drugom mjerenju. Prikazana je Z-vrijednost, statistička značajnost (p), medijan i raspon, te veličina uzorka.

Varijable u drugom mjerenju	Z-vrijednost	p=	Medijan i raspon (N) u muškaraca	Medijan i raspon (N) u žena
P1CP (μg/L)	-3,009	0,003	91; 7-316	130,5; 65-245



			(39)	(12)
Koštana alkalna fosfataza (IU/L)	-2,295	0,02	18,4; 0,5-62 (40)	25,8; 12,2-45 (13)

Razlika između spolova testirana je za rezultate mjerenja denzitometrije u prvom i drugom mjerenju primjenom Mann-Whitney-evog testa. Nije nađena statistički značajna razlika između spolova niti za jednu varijablu denzitometrije u prvom i drugom mjerenju. U nastavku statističke obrade, rezultati denzitometrije analizirani su za cijelu skupinu tj. za muškarce i žene zajedno. Rezultati testa su prikazani u tablici 7.

**Tablica 7.** Rezultati ispitivanja razlika između spolova za varijable denzitometrije za prvo i drugo mjerenje. Nema statistički značajne razlike između spolova za ove varijable.

Varijabla (mjerna jedinica)	Mann-Whitney U	Z-vrijednost	p=
Prvo mjerenje (6 mjeseci nakon transplantacije)			
Vrat lijeve bedrene kosti BMD (g/cm <sup>2</sup> )	20,0	-1,763	0,078
Vrat lijeve bedrene kosti T-vrijednost	26,0	-1,295	0,195
Vrat lijeve bedrene kosti Z-vrijednost	19,0	-1,845	0,071
Slabinska kralježnica BMD (g/cm <sup>2</sup> )	38,0	-0,353	0,724
Slabinska kralježnica T-vrijednost	38,0	-0,353	0,724
Slabinska kralježnica Z-vrijednost	42,0	-0,039	0,969
Drugo mjerenje (12 mjeseci nakon transplantacije)			

---

Vrat lijeve bedrene kosti BMD (g/cm <sup>2</sup> )	5,0	0,000	1,0
Vrat lijeve bedrene kosti T-vrijednost	5,0	0,000	1,0
Vrat lijeve bedrene kosti Z-vrijednost	5,0	0,000	1,0
Slabinska kralježnica BMD (g/cm <sup>2</sup> )	2,0	-0,870	0,384
Slabinska kralježnica T-vrijednost	2,5	-0,792	0,428
Slabinska kralježnica Z-vrijednost	2,0	-0,949	0,343

---

## **12.3. SLIKOVNI PRIKAZ PROMJENA ISPITIVANIH VARIJABLI U VREMENU PRAĆENJA**

### **12.3.1. Slikovni prikaz promjena biokemijskih varijabli u vremenu praćenja**

Prikaz promjena biokemijskih varijabli u razdoblju praćenja nakon transplantacije jetre (0=vrijeme transplantacije, 14 d=nakon 14 dana, 3 mj=nakon 3 mj, 6 mj=nakon 6 mjeseci, 12 mj=nakon 12 mjeseci) je na slikama 4-9. Rezultati su prikazani grafikonom okvira s ručicama (engl. box-plot) s oznakom medijana i kvartila, vrijednostima koje odstupaju te brojem uzoraka u gornjem dijelu svakog grafikona, te s oznakom referentnog raspona.

Koncentracije osteoprotegerina (slika 4) su povišene u vrijeme transplantacije jetre u odnosu na podatak o koncentracijama u zdravih osoba, a također je dosta vrijednosti koje odstupaju. U kasnijem razdoblju praćenja koncentracije osteoprotegerina su niže i odgovaraju vrijednostima u zdravih osoba, ali postoje pojedinačne povišene vrijednosti (one koje odstupaju).

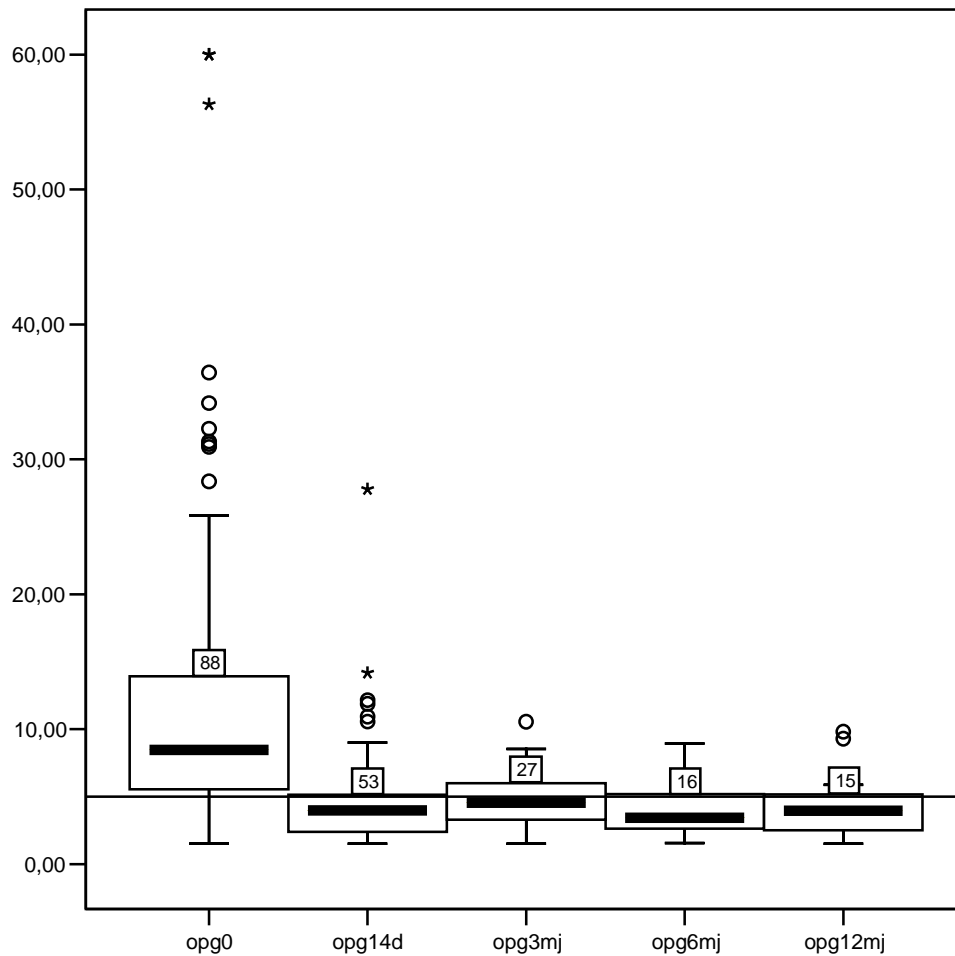
Koncentracije 25-OH D (slika 5) su snižene za sve bolesnike tijekom cjelokupnog praćenja. Manjak 25-OH D se pogoršava 6 i 12 mjeseci nakon transplantacije. Koncentracija 25-OH D je samo u jednog bolesnika u jednom mjerenju bila iznad granica nedostatka 6 mjeseci nakon transplantacije.

Koncentracije crosslapsa (slika 6) su pretežno povišene u vrijeme transplantacije, 14 dana i 3 mjeseca nakon zahvata, a što se očituje smještajem medijana iznad gornje referentne granice. U daljnjem praćenju dolazi do normalizacije koncentracije crosslapsa, te 12 mjeseci nakon transplantacije koncentracije uglavnom nisu povišene.

Koncentracije PICP (slika 7) su tijekom razdoblja praćenja uglavnom unutar granica referentnih raspona. Iznimka pojedinačne povišene i odstupajuće vrijednosti uglavnom su na početku praćenja tj. u vrijeme transplantacije i 14 dana nakon transplantacije. U jednog bolesnika je 3 mjeseca nakon transplantacije povišena koncentracije PICP.

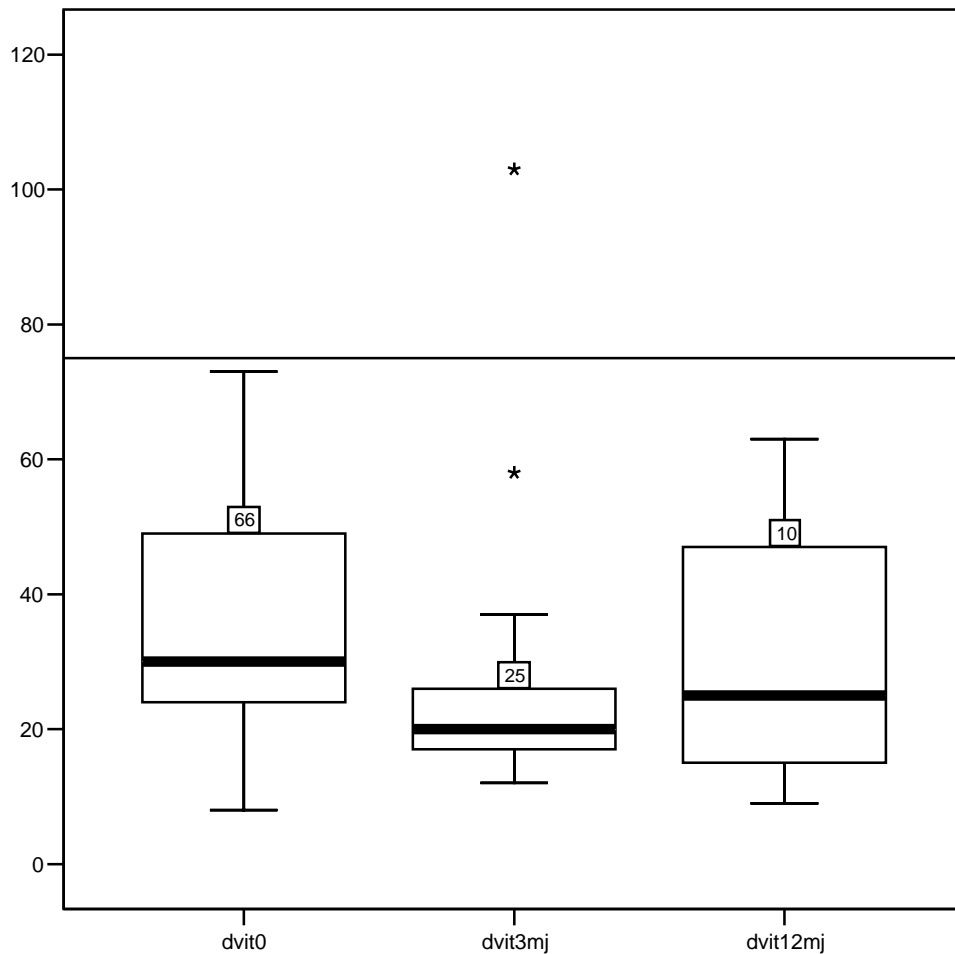
Koncentracije osteokalcina (slika 8) su snižene u vrijeme transplantacije i nakon 14 dana, s iznimkom ukupno 3 povišene vrijednosti u ovom razdoblju praćenja. U nastavku praćenja, nakon 3 mjeseca i kasnije dolazi do normalizacije koncentracija osteokalcina, oporavka izgradnje kosti, te je medijan unutar referentnog raspona i većom učestalošću povišenih koncentracija.

Aktivnosti koštane alkalne fosfataze (slika 9) su uglavnom unutar referentnog raspona. Manja učestalost povišenih i sniženih aktivnosti izmjerena je na početku praćenja u vrijeme transplantacije. U nastavku praćenja aktivnosti koštane alkalne fosfataze većinom su u referentnim granicama.



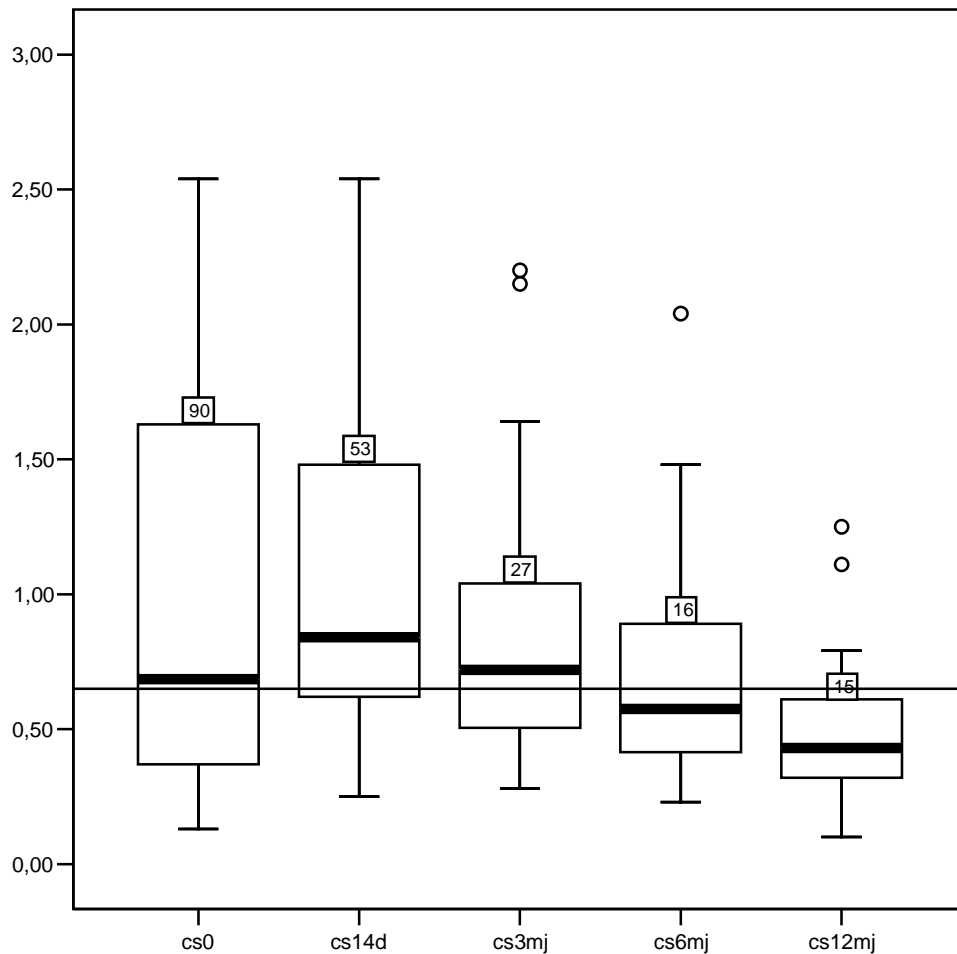
#### **Slika 4.**

*Prikaz promjena koncentracija osteoprotegrina (opg, pmol/L) u razdoblju praćenja nakon transplantacije jetre (0=vrijeme transplantacije, 14 d=nakon 14 dana, 3 mj=nakon 3 mj, 6 mj=nakon 6 mjeseci, 12 mj=nakon 12 mjeseci). Rezultati su prikazani grafikonom okvira s ručicama (engl. box-plot) s oznakom medijana i kvartila, vrijednostima koje odstupaju te brojem uzoraka u gornjem dijelu svakog grafikona. Također je označena srednja vrijednost za osteoprotegerin u zdravih osoba (5 pmol/L).*



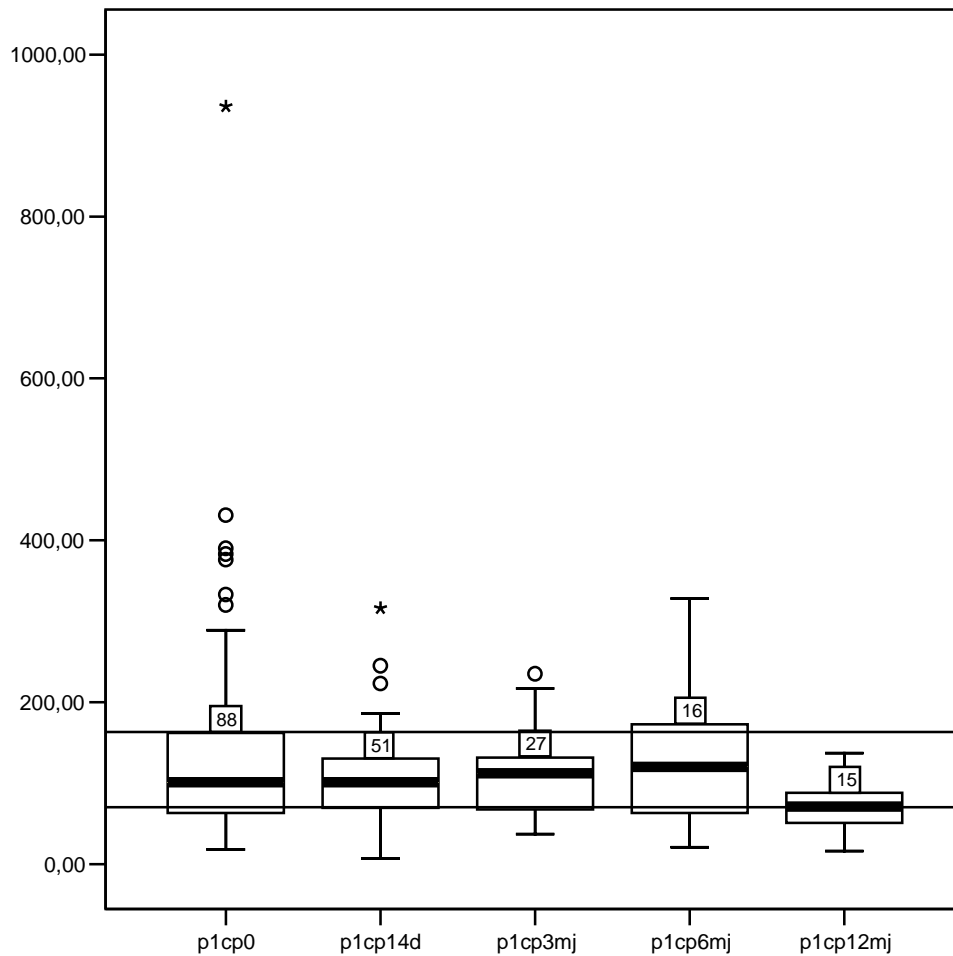
**Slika 5.**

Prikaz promjena koncentracija 25-OH D (Dvit, nmol/L) u razdoblju praćenja nakon transplantacije jetre (0=vrijeme transplantacije, 14 d=nakon 14 dana, 3 mj=nakon 3 mj, 6 mj=nakon 6 mjeseci, 12 mj=nakon 12 mjeseci). Rezultati su prikazani grafikonom okvira s ručicama (engl. box-plot) s oznakom medijana i kvartila, vrijednostima koje odstupaju te brojem uzoraka u gornjem dijelu svakog grafikona. Također je označena gornja granica nedostatne koncentracije 25-OH D (75 nmol/L).



**Slika 6.**

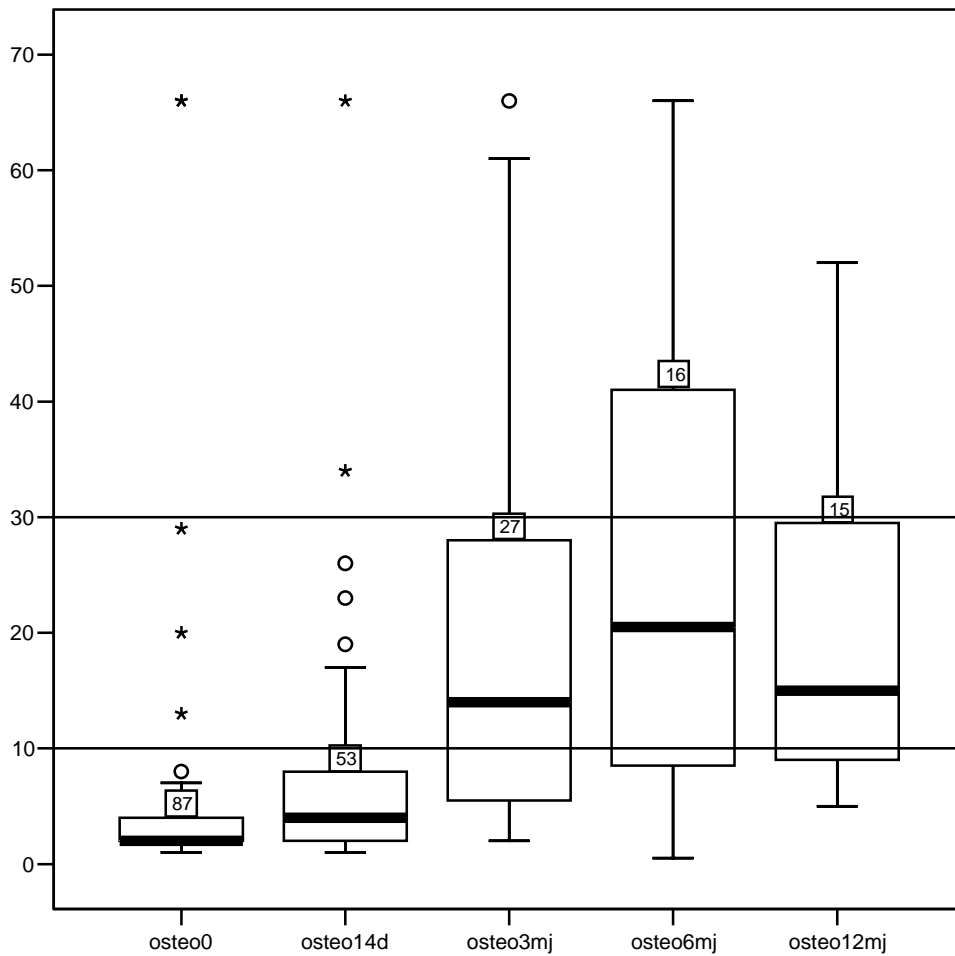
Prikaz promjena koncentracija crosslapsa (cs,  $\mu\text{g/L}$ ) u razdoblju praćenja nakon transplantacije jetre (0=vrijeme transplantacije, 14 d=nakon 14 dana, 3 mj=nakon 3 mj, 6 mj=nakon 6 mjeseci, 12 mj=nakon 12 mjeseci). Rezultati su prikazani grafikonom okvira s ručicama (engl. box-plot) s oznakom medijana i kvartila, vrijednostima koje odstupaju te brojem uzoraka u gornjem dijelu svakog grafikona. Također je označena gornja granica referentnog raspona ( $0,65 \mu\text{g/L}$ ).



**Slika 7.**

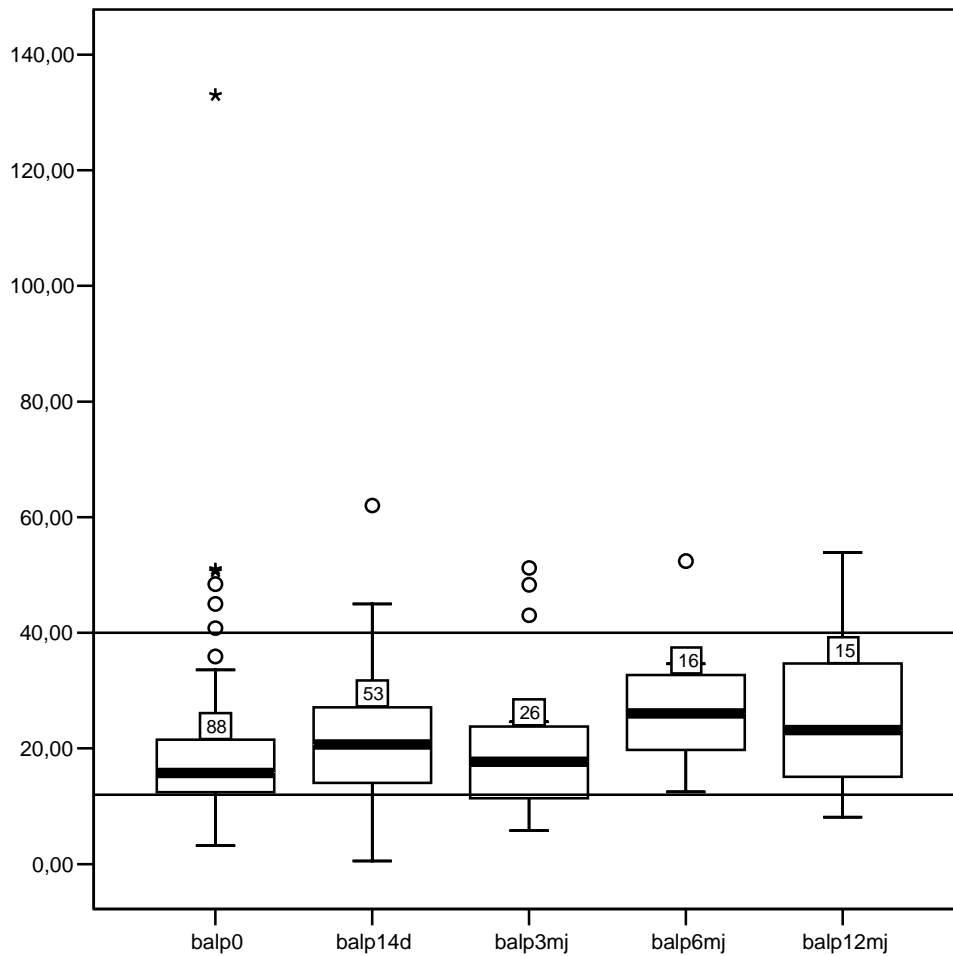
Prikaz promjena koncentracija PICP (p1cp, µg/L) u razdoblju praćenja nakon transplantacije jetre (0=vrijeme transplantacije, 14 d=nakon 14 dana, 3 mj=nakon 3 mj, 6 mj=nakon 6 mjeseci, 12 mj=nakon 12 mjeseci). Rezultati su prikazani grafikonom okvira s ručicama (engl. box-plot) s oznakom medijana i kvartila, vrijednostima koje odstupaju te brojem uzoraka u gornjem dijelu svakog grafikona. Također je označen referentni raspon (70-163 µg/L).





**Slika 8.**

Prikaz promjena koncentracija osteokalcina (*osteocalcin*, µg/L) u razdoblju praćenja nakon transplantacije jetre (0=vrijeme transplantacije, 14 d=nakon 14 dana, 3 mj=nakon 3 mj, 6 mj=nakon 6 mjeseci, 12 mj=nakon 12 mjeseci). Rezultati su prikazani grafikonom okvira s ručicama (engl. *box-plot*) s oznakom medijana i kvartila, vrijednostima koje odstupaju te brojem uzoraka u gornjem dijelu svakog grafikona. Također je označen referentni raspon (10-30 µg/L).



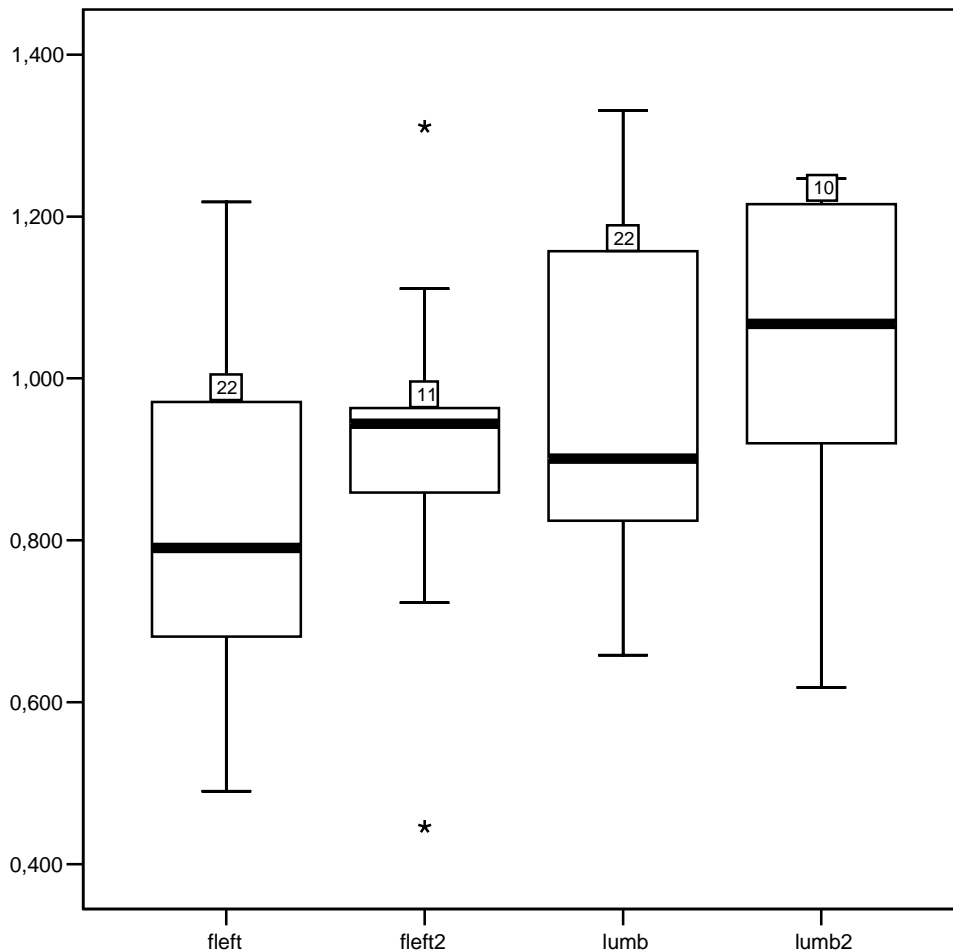
**Slika 9.**

*Prikaz promjena aktivnosti koštane alkalne fosfataze (balp, IU/L) u razdoblju praćenja nakon transplantacije jetre (0=vrijeme transplantacije, 14 d=nakon 14 dana, 3 mj=nakon 3 mj, 6 mj=nakon 6 mjeseci, 12 mj=nakon 12 mjeseci). Rezultati su prikazani grafikonom okvira s ručicama (engl. box-plot) s oznakom medijana i kvartila, vrijednostima koje odstupaju te brojem uzoraka u gornjem dijelu svakog grafikona. Također je označen referentni raspon (12-40 IU/L).*

### **12.3.2. Slikovni prikaz promjena denzitometrijskih varijabli u vremenu praćenja**

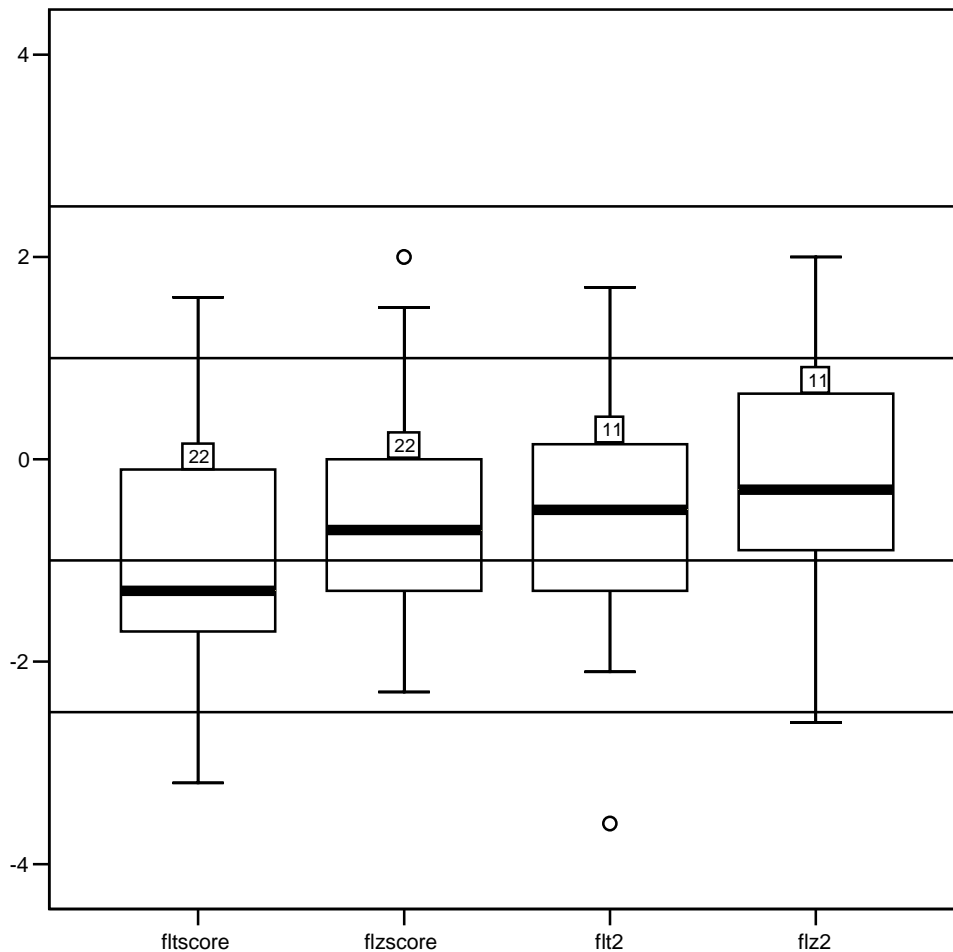
Rezultati denzitometrija prikazani su zajedno za muškarce i žene u ovom ispitivanju budući da nije bilo statistički značajne razlike. Koštana masa vrata lijeve bedrene kosti na temelju medijana i slabinske kralježnice popravljaju se tijekom praćenja. Također je koštana masa slabinske kralježnice veća od one vrata bedrene kosti (slika 10). Rezultati T i Z-vrijednosti vrata lijeve bedrene kosti tijekom praćenja ukazuju uvidom u medijan i raspon da u većine bolesnika postoji normalna koštana masa ili osteopenija te da se popravljaju tijekom praćenja (slika 11).

Podudarni rezultati postoje za T i Z-vrijednosti slabinske kralježnice tijekom praćenja te ukazuju uvidom u medijan i raspon da u većine bolesnika postoji normalna koštana masa ili osteopenija te da se popravljaju tijekom praćenja (slika 12).



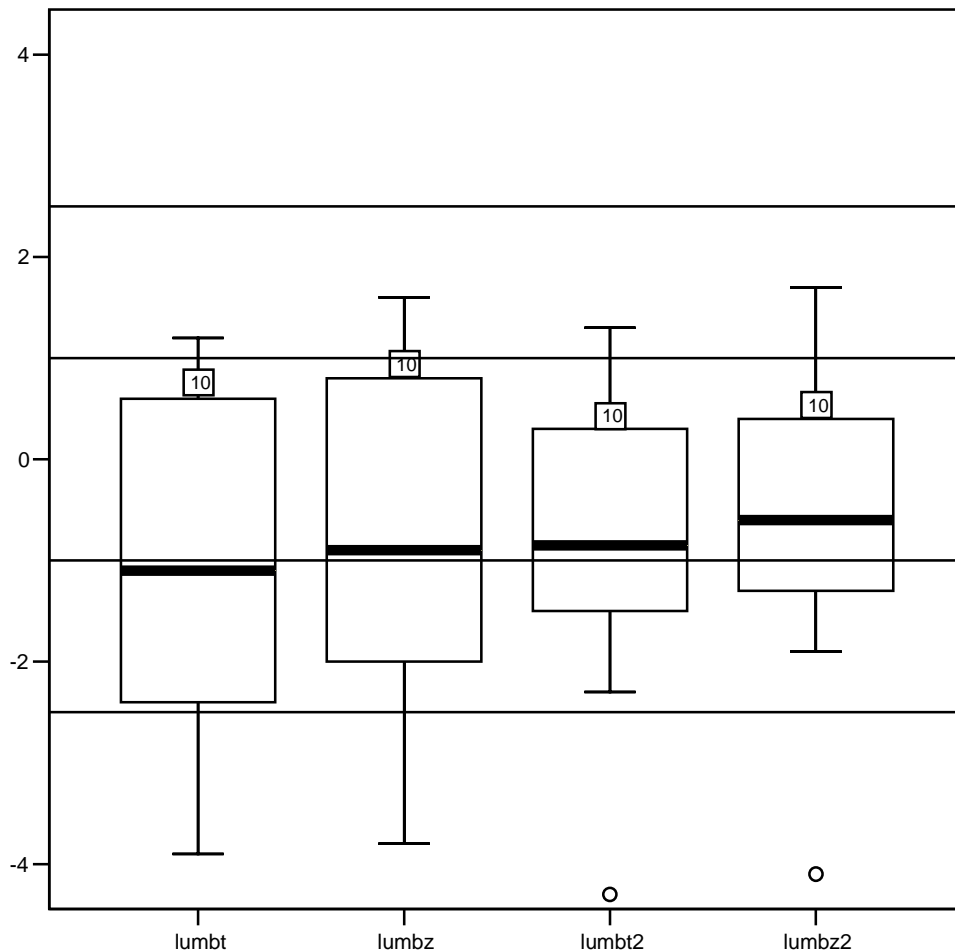
**Slika 10.**

Prikaz promjena koštane mase (BMD,  $\text{g/cm}^2$ ) vrata lijeve bedrene kosti u razdoblju praćenja nakon transplantacije jetre (fleft =nakon 6 mjeseci, fleft2 =nakon 12 mjeseci) i slabinske kralježnice (lumb=nakon 6 mjeseci , lumb2=nakon 12 mjeseci). Rezultati su prikazani grafikonom okvira s ručicama (engl. box-plot) s oznakom medijana i kvartila, vrijednostima koje odstupaju te brojem uzoraka u gornjem dijelu svakog grafikona.



**Slika 11.**

Prikaz promjena T-vrijednosti i Z-vrijednosti vrata lijeve bedrene kosti u razdoblju praćenja nakon transplantacije jetre (fltscore i flzscore =nakon 6 mjeseci, flt2 i flz2 =nakon 12 mjeseci). Rezultati su prikazani grafikonom okvira s ručicama (engl. box-plot) s oznakom medijana i kvartila, vrijednostima koje odstupaju te brojem uzoraka u gornjem dijelu svakog grafikona. Također je označen raspon normalnih vrijednosti (1/-1), osteopenije (-1/-2,5) i osteoporoze (<-2,5), te umjereno povećane (1/2,5) i znatno povećane (>2,5).



**Slika 12.**

*Prikaz promjena T-vrijednosti i Z-vrijednosti slabinske kralježnice u razdoblju praćenja nakon transplantacije jetre (lumbt i lumbz =nakon 6 mjeseci, lumbt2 i lumbz2 =nakon 12 mjeseci). Rezultati su prikazani grafikonom okvira s ručicama (engl. box-plot) s oznakom medijana i kvartila, vrijednostima koje odstupaju te brojem uzoraka u gornjem dijelu svakog grafikona. Također je označen raspon normalnih vrijednosti (1/-1), osteopenije (-1/-2,5) i osteoporoze <-2,5), te umjereno povećane (1/2,5) i znatno povećane (>2,5).*

## **12.4. ISPITIVANJE RAZLIKE VARIJABLI IZMEĐU POJEDINIH MJERENJA**

### **12.4.1. Ispitivanje razlika biokemijskih varijabli između pojedinih mjerenja**

Za ispitivanje razlika biokemijskih varijabli između pojedinih mjerenja je korišten Wilcoxonov test za vezane (parne) uzorke uz razinu statističke značajnosti za dvosmjerni test. Rezultati su prikazani u tablici 8 prema 5 mjerenja za osteoprotegerin, crosslaps, P1CP, osteokalcin, koštanu alkalnu fosfatazu i za 3 mjerenja za 25-OH D.

Za osteoprotegerin nađeno je da je koncentracija mjerenja u vrijeme transplantacije (tx) statistički značajno veća u odnosu prema koncentraciji ostalim mjerenjima, tj. nakon 14 dana, 3, 6 i 12 mjeseci. Koncentracija osteoprotegerina se nakon 14 dana snizuje za oko 60% i ostaje na toj razini koncentracije. Statistički značajno sniženje također postoji između mjerenja nakon 3 i 6 mjeseci. Slikovni prikaz promjena koncentracija pojedinačnih mjerenja je na slici 13.

Za koncentraciju 25-OH D je nađeno da je koncentracija početnog mjerenja u vrijeme transplantacije (tx) statistički značajno više u odnosu na koncentraciju nakon 6 mjeseci. Koncentracija 25-OH D je snižena u svih bolesnika tijekom praćenja, osim u jednom mjerenju 3 mj nakon transplantacije. Slikovni prikaz promjena koncentracija pojedinačnih mjerenja je na slici 14.

Za crosslaps je nađeno da je koncentracija mjerenja 14. dan statistički značajno veća u odnosu na mjerenje nakon 12 mjeseci. Koncentracije crosslapsa su uglavnom povišene u većine bolesnika tijekom praćenja. Slikovni prikaz promjena koncentracija pojedinačnih mjerenja je na slici 15.

Za P1CP je nađeno da je koncentracija početnog mjerenja u vrijeme transplantacije (tx) statistički značajno veća u odnosu prema mjerenju nakon 3 i 12 mjeseci. Koncentracija P1CP statistički značajno se smanjuje između razdoblja 3 i 12 mjeseci te 6 i 12 mj. Koncentracije P1CP su na početku praćenja u vrijeme transplantacije povišene, snižene i unutar referentnog raspona, te za neke ispitanike tijekom praćenja ponovo pretežno povišene 6 mjeseci nakon transplantacije. Slikovni prikaz promjena koncentracija pojedinačnih mjerenja je na slici 16.

Za osteokalcin je nađeno da je koncentracija početnog mjerenja u vrijeme transplantacije (tx) statistički značajno manja u odnosu prema koncentraciji u ostalim mjerenjima, tj. nakon 14 dana, 3, 6 i 12 mjeseci. Koncentracija osteokalcina u poslijetransplantacijskom razdoblju progresivno raste do 6. mjeseca, a u 12. mjesecu je

malo niža, ali ne statistički značajno. Statistički značajni porast koncentracije osteokalcina također postoji između 14. dana i 3 mjeseca, te 14. dana i 6 mjeseci. Osteokalcin je na početku praćenja snižen u skoro svih bolesnika, u nekih ostaje snižen tijekom praćenja, ali u nekih je očito povećanje lučenja sa ili bez smanjenja nakon 6 mjeseci. Slikovni prikaz promjena koncentracija pojedinačnih mjerenja je na slici 17.

Za koštanu alkalnu fosfatazu je nađeno da je aktivnost početnog mjerenja u vrijeme transplantacije (tx) statistički značajno manja u odnosu prema mjerenju nakon 14 dana i 6 mjeseci. Na početku praćenja su aktivnosti koštane alkalne fosfataze snižene ili niže unutar referentnog raspona, ali tijekom praćenja se vrijednosti popravljaju i u nekolicine bolesnika povisuju iznad gornje granice referentnog raspona. Slikovni prikaz promjena koncentracija pojedinačnih mjerenja je na slici 18.

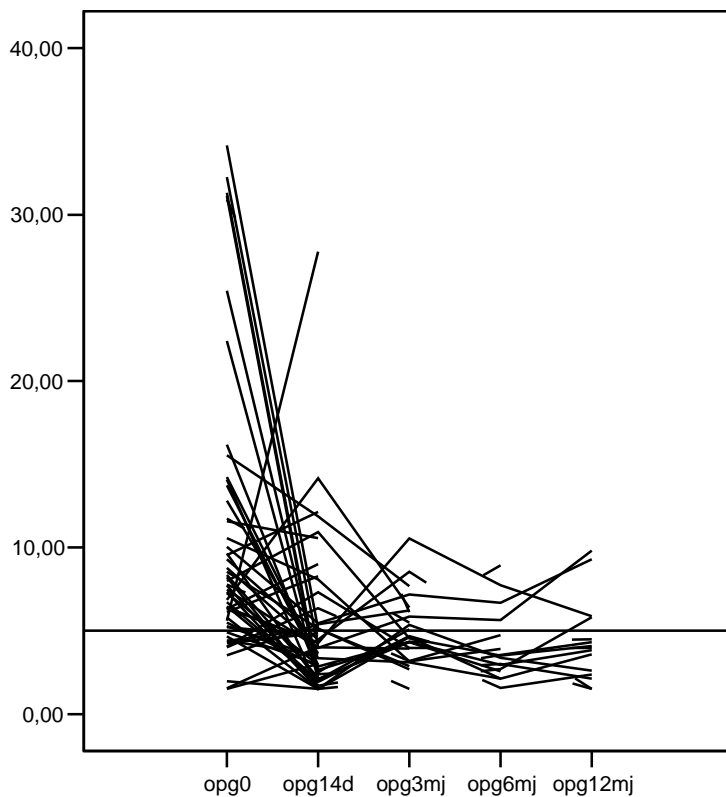


**Tablica 8.**

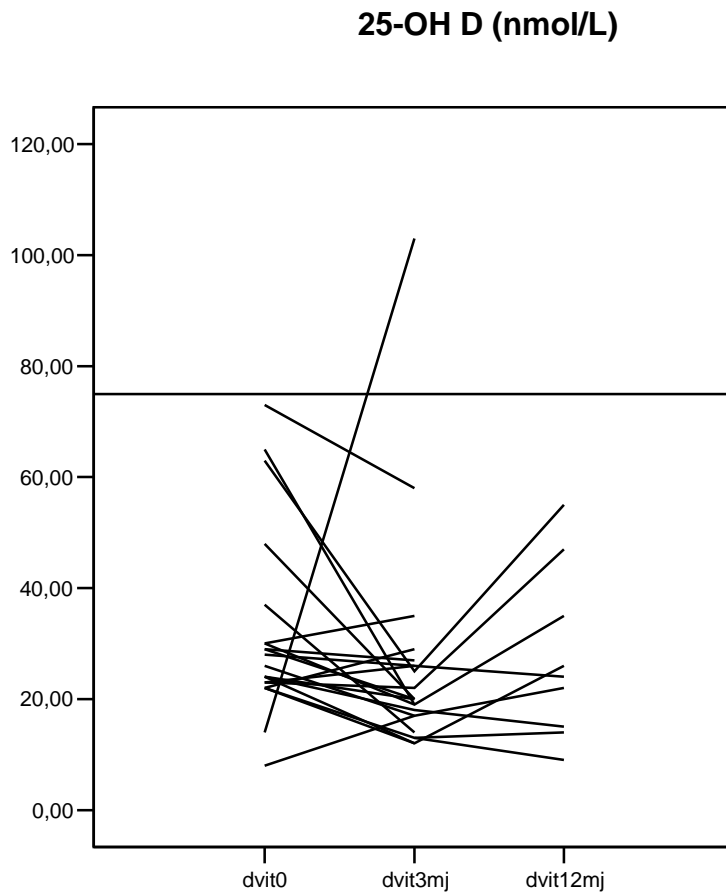
Rezultati Wilcoxonovog testa za vezane uzorke za biokemijske varijable između kombinacija mjerenja prikazani vrijednostima za Z i statističku značajnost.

Varijabla/ Mjerenje	Osteoprotegerin	25-OH D	Crosslaps	PICP	Osteokalcin	Koštana alkalna fosfataza
tx/14 dan	z -3,982 p<0,0005 n=50	/	z=-1,078 p=0,281 n=51	z=- 1,111 p=0,266 n=47	z=-3,616 p<0,0005 n=48	z=-3,646 p<0,0005 n=49
tx/3 mj.	z -3,673 p<0,0005 n=25	z=- 2,296 p=0,022 n=21	z=-0,431 p=0,667 n=25	z=- 2,229 p=0,026 n=24	z=-3,997 p<0,0005 n=24	z=-1,293 p=0,196 n=23
tx/6 mj.	z -3,413 p<0,001 n=16	/	z=-1,306 p=0,191 n=16	z0,595 p=0,552 n=	z=-2,480 p=0,013 n=14	z=-2,159 p=0,031 n=15
tx/12 mj.	z=-3,010 p=0,003 n=15	z=- 0,140 p=0,889 n=8	z=-1,932 p=0,053 n=15	z=- 2,557 p=0,011 n=16	z=-3,182 p=0,001 n=13	z=-1,915 p=0,056 n=14
14 d/3 mj.	z=-0,122 p=0,903 n=21	/	z=-0,070 p=0,945 n=21	z=- 0,886 p=0,375 n=15	z=-3,437 p=0,001 n=21	z=-0,784 p=0,433 n=20
14 d/6 mj.	z=-0,767 p=0,443 n=15	/	z=-1,499 p=0,147 n=15	z=- 0,994 p=0,320 n=21	z=-2,813 p=0,005 n=15	z=-1,193 p=0,233 n=15
14 d/12 mj	z=-0,625 p=0,532 n=15	/	z=-3,17 p=0,002 n=15	z=- 1,392 p=0,164 n=15	z=-3,297 p=0,001 n=15	z=-0,682 p=0,495 n=15

3 mj./6 mj.	$z=-2,045$ $p=0,041$ $n=11$	/	$z=-0,561$ $p=0,575$ $n=11$	$z=-$ 0,533 $p=0,594$ $n=11$	$z=-1,379$ $p=0,168$ $n=11$	$z=-0,765$ $p=0,444$ $n=10$
3 mj./12 mj.	$z=-1,423$ $p=0,155$ $n=11$	$z=-$ 1,599 $p=0,110$ $n=9$	$z=-1,913$ $p=0,056$ $n=11$	$z=-$ 2,490 $p=0,013$ $n=11$	$z=-0,667$ $p=0,505$ $n=11$	$z=-0,711$ $p=0,477$ $n=11$
6 mj./12 mj.	$z=-1,511$ $p=0,131$ $n=11$	/	$z=-1,326$ $p=0,185$ $n=11$	$z=-$ 2,134 $p=0,033$ $n=11$	$z=-0,766$ $p=0,443$ $n=11$	$z=-0,089$ $p=0,929$ $n=11$

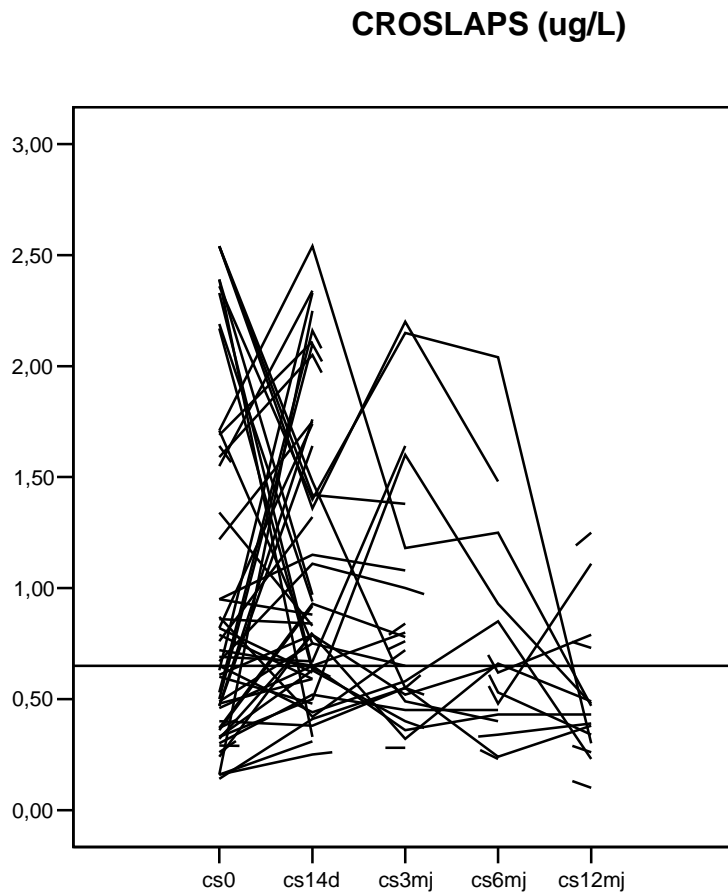
**OSTEOPROTEGERIN (pmol/L)****Slika 13.**

Slikovni prikaz promjena koncentracija pojedinačnih mjerenja osteoprotegerina (opg; 0=vrijeme transplantacije, 14d=nakon 14 dana, 3mj=nakon 3 mj, 6mj=nakon 6 mjeseci, 12mj=nakon 12 mjeseci; pmol/L). Koncentracija osteoprotegerina u vrijeme transplantacije je statistički značajno veća u odnosu na ostala mjerenja, tj. nakon 14 dana, 3, 6 i 12 mjeseci. Označena je koncentracija osteoprotegerina u zdravih osoba (5 pmol/L).



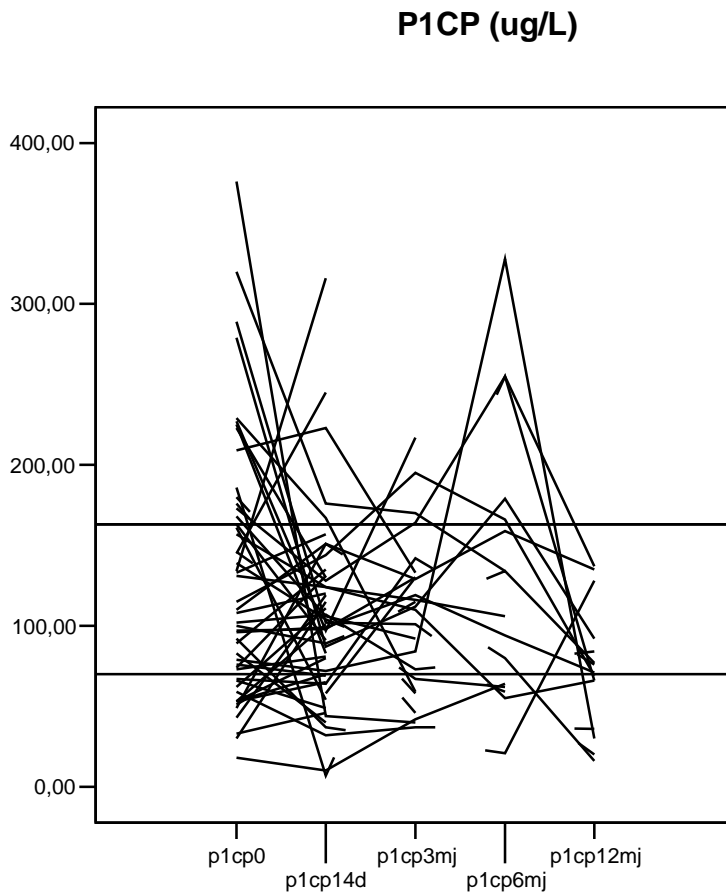
**Slika 14.**

*Slikovni prikaz promjena koncentracija pojedinačnih mjerenja 25-OH D (0=vrijeme transplantacije, 3mj=nakon 3 mj, 12mj=nakon 12 mjeseci; nmol/L). Za koncentraciju 25-OH D je nađeno da je koncentracija početnog mjerenja u vrijeme transplantacije statistički značajno više u odnosu na koncentraciju nakon 6 mjeseci. Prikazana je granica manjka 25-OH D (75 nmol/L).*

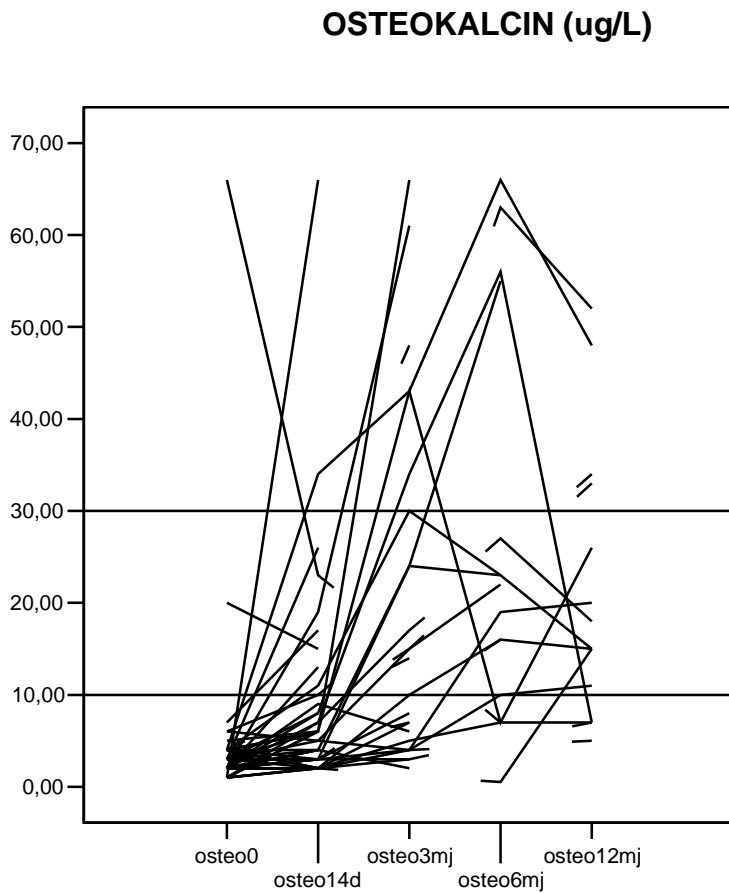


***Slika 15.***

*Slikovni prikaz promjena koncentracija pojedinačnih mjerenja crosslapsa (cs; 0=vrijeme transplantacije, 14 d=nakon 14 dana, 3 mj=nakon 3 mj, 6 mj=nakon 6 mjeseci, 12 mj=nakon 12 mjeseci;  $\mu\text{g/L}$ ). Koncentracija mjerenja crosslapsa 14 dan statistički značajno veća u odnosu na mjerenje nakon 12 mjeseci. Označena je gornja granica referentnog raspona ( $0,65 \mu\text{g/L}$ ).*

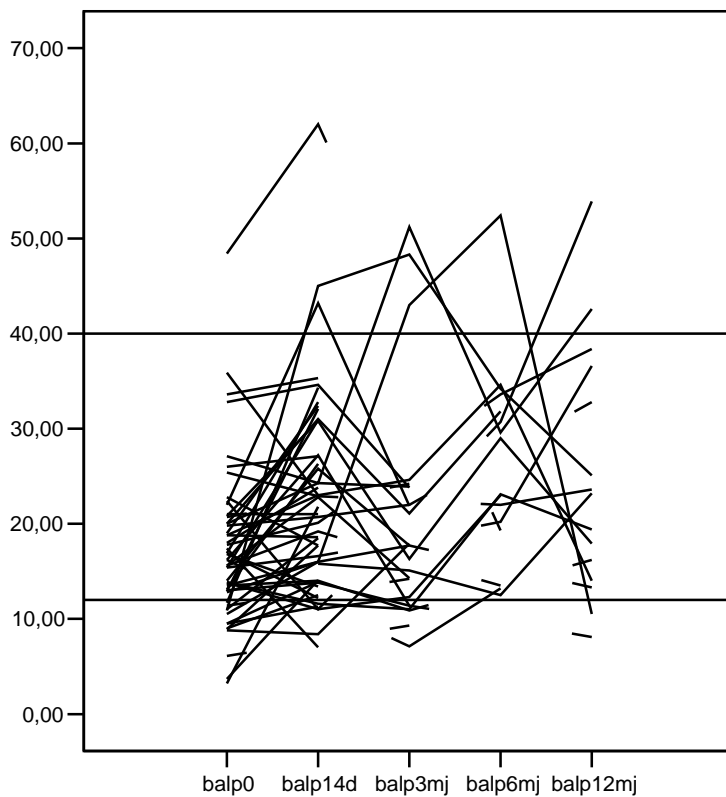
**Slika 16.**

*Slikovni prikaz promjena koncentracija pojedinačnih mjerenja P1CP (0=vrijeme transplantacije, 14 d=nakon 14 dana, 3 mj=nakon 3 mj, 6 mj=nakon 6 mjeseci, 12 mj=nakon 12 mjeseci;  $\mu\text{g/L}$ ). Koncentracija početnog mjerenja u vrijeme transplantacije statistički značajno veća u odnosu prema mjerenju nakon 3 i 12 mjeseci. Koncentracija P1CP statistički značajno se smanjuje između razdoblja 3 i 12 mjeseci te 6 i 12 mj. Označen je referentni raspon (70-163  $\mu\text{g/L}$ ).*



**Slika 17.**

Slikovni prikaz promjena koncentracija pojedinačnih mjerenja osteokalcina (osteo; 0=vrijeme transplantacije, 14 d=nakon 14 dana, 3 mj=nakon 3 mj, 6 mj=nakon 6 mjeseci, 12 mj=nakon 12 mjeseci;  $\mu\text{g/L}$ ). Koncentracija osteokalcina početnog mjerenja u vrijeme transplantacije statistički značajno manja u odnosu prema koncentraciji u ostalim mjerenjima, tj. nakon 14 dana, 3, 6 i 12 mjeseci. Statistički značajni porast koncentracije osteokalcina također postoji između 14. dana i 3 mjeseca, te 14. dana i 6 mjeseci. Označen je referentni raspon (10-30  $\mu\text{g/L}$ ).

**KOŠTANA ALKALNA FOSFATAZA (U/L)****Slika 18.**

Slikovni prikaz promjena koncentracija pojedinačnih mjerenja koštane alkalne fosfataze (balp; 0=vrijeme transplantacije, 14 d=nakon 14 dana, 3 mj=nakon 3 mj, 6 mj=nakon 6 mjeseci, 12 mj=nakon 12 mjeseci;  $\mu\text{g/L}$ ). Aktivnost koštane alkalne fosfataze početnog mjerenja u vrijeme transplantacije statistički je značajno manja u odnosu prema mjerenju nakon 14 dana i 6 mjeseci. Označen je referentni raspon (12-40  $\mu\text{g/L}$ ).



### 12.4.2. Ispitivanje razlika denzitometrijskih varijabli između pojedinih mjerenja

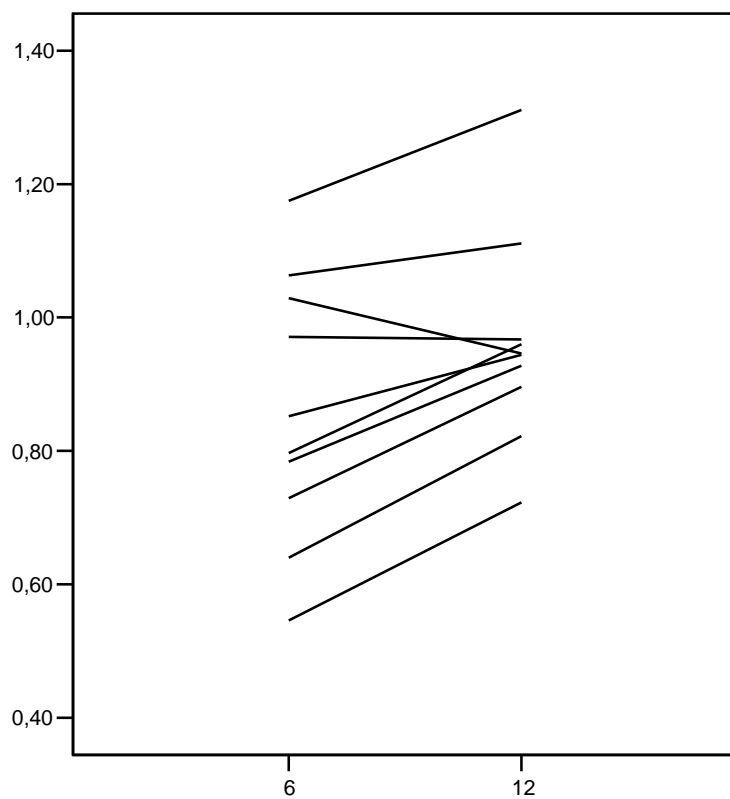
Za ispitivanje razlika denzitometrijskih varijabli između dva mjerenja, 6 i 12 mjeseci nakon transplantacije korišten je Wilcoxonov test za vezane (parne) uzorke uz razinu statističke značajnosti za dvosmjerni test. Rezultati za deset bolesnika su prikazani u tablici 9. Statistički značajna razlika postoji samo za povećanje koštane mase vrata bedrene kosti. Na slikovnom prikazu gustoće kosti vrata lijeve bedrene kosti se uočava povećanje u većine bolesnika (slika 19).

Za gustoću kosti slabinske kralježnice na slikovnom prikazu (slika 20) uočava se u većine bolesnika da nema promjene rezultata mjerenja. Slični su slikovni prikazi za T i Z-vrijednosti vrata lijeve bedrene kosti (slike 21 i 22) i slabinske kralježnice (slika 23 i 24) na kojima se uočava da postoje uglavnom rezultati normalne i osteopenične koštane mase. Također je vidljivo da se vrijednosti T i Z-vrijednosti bolesnika većinom ne mijenjaju tijekom ovog razdoblja praćenja.

#### **Tablica 9.**

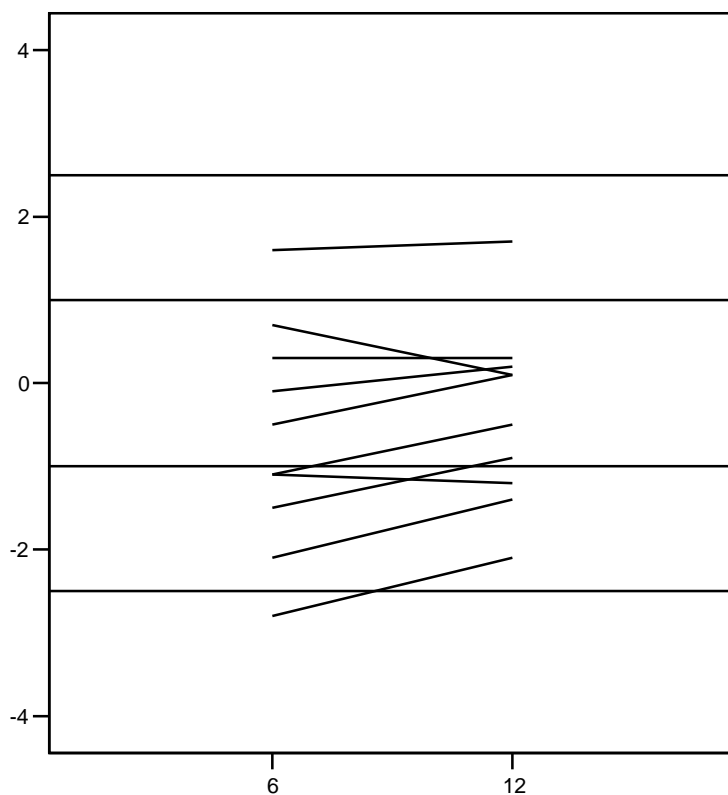
*Rezultati Wilcoxonovog testa za vezane uzorke za denzitometrijske varijable između dva mjerenja (6 i 12 mjeseci nakon transplantacije) za deset bolesnika prikazani vrijednostima za Z i statističku značajnost.*

Varijabla	Vrat lijeve bedrene kosti BMD	Vrat lijeve bedrene kosti T-vrijednost	Vrat lijeve bedrene kosti Z-vrijednost	Lumbalna kralježnica BMD	Lumbalna kralježnica T-vrijednost	Lumbalna kralježnica Z-vrijednost
6mj / 12 mj	z -2,395 p=0,017	z=-1,856 p=0,063	z=-0,850 p=0,395	z=-1,122 p=0,262	z=-0,102 p=0,919	z=-0,205 p=0,838

**VRAT LIJEVE BEDRENE KOSTI BMD**

**Slika 19.**

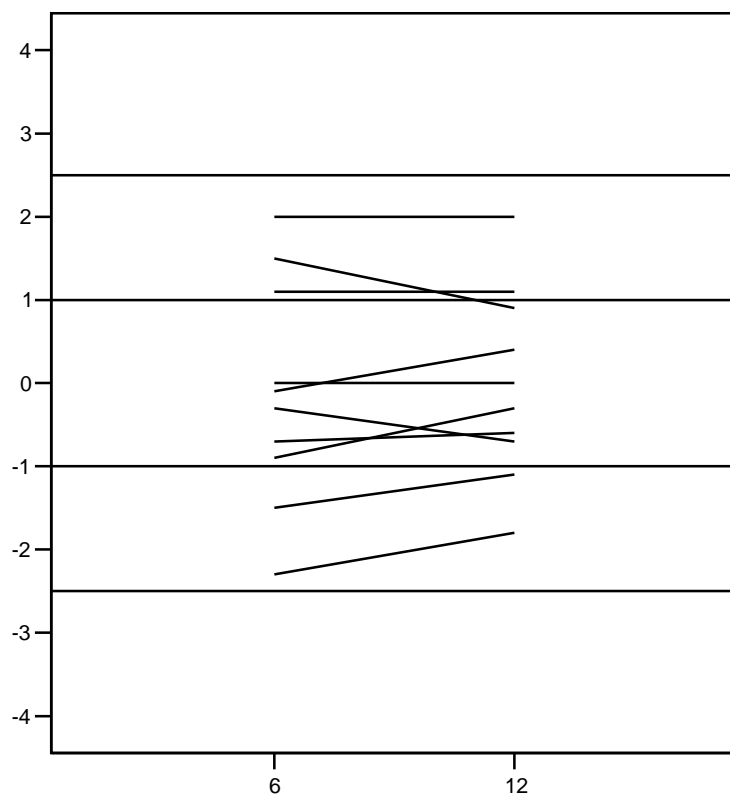
*Slikovni prikaz promjena pojedinačnih mjerenja gustoće kosti vrata lijeve bedrene kosti (BMD,  $g/cm^2$ ; 6=6 mjeseci nakon transplantacije, 12=12 mjeseci nakon transplantacije).*

**VRAT LIJEVE BEDRENE KOSTI T SKOR**

**Slika 20.**

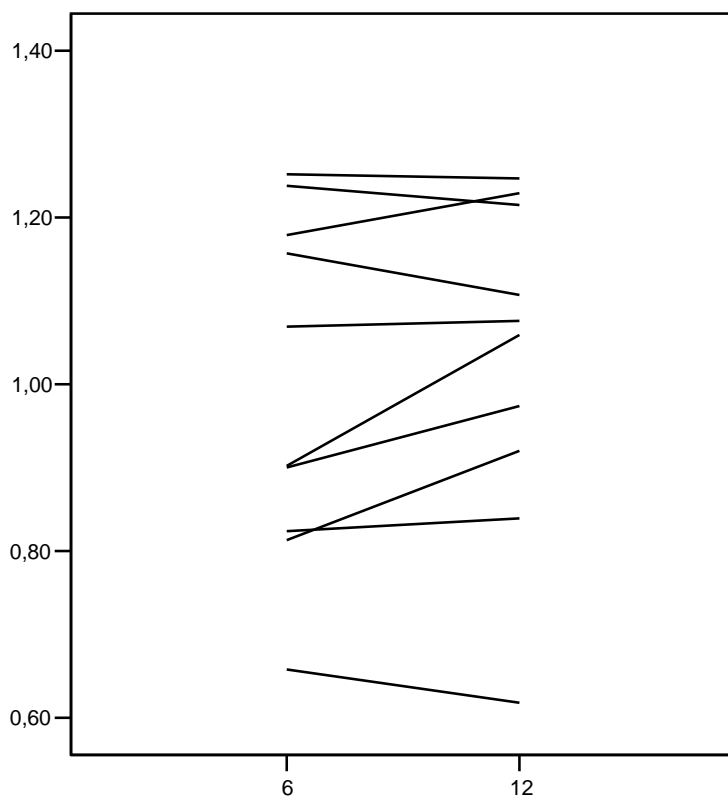
Slikovni prikaz promjena pojedinačnih mjerenja T-vrijednosti vrata lijeve bedrene kosti (6=6 mjeseci nakon transplantacije, 12=12 mjeseci nakon transplantacije). Također je označen raspon normalnih vrijednosti (1/-1), osteopenije (-1/-2,5) i osteoporoze (<-2,5), te umjereno povećane (1/2,5) i znatno povećane (>2,5).

## VRAT LIJEVE BEDRENE KOSTI Z SKOR



**Slika 21.**

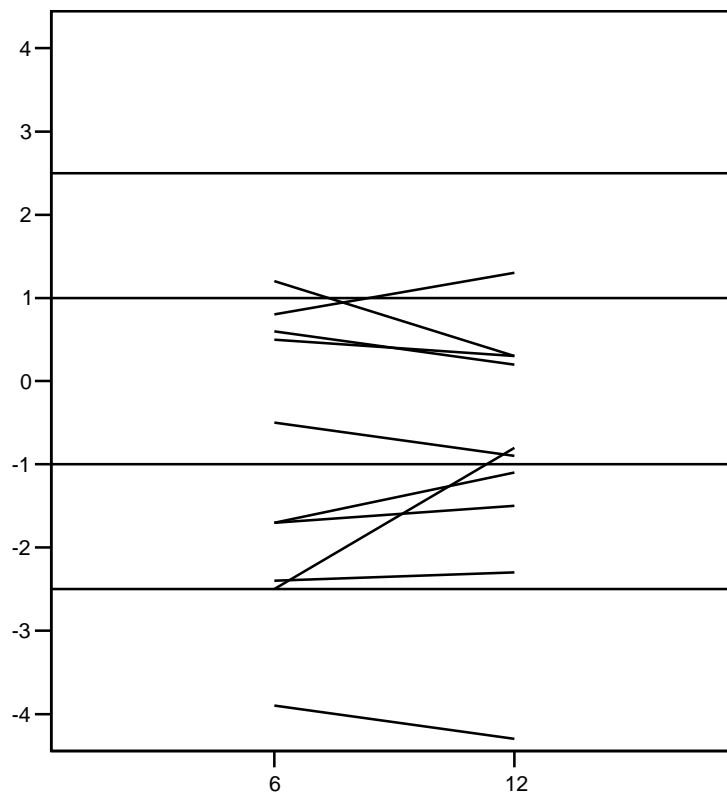
Slikovni prikaz promjena pojedinačnih mjerenja Z-vrijednosti vrata lijeve bedrene kosti (6=6 mjeseci nakon transplantacije, 12=12 mjeseci nakon transplantacije). Također je označen raspon normalnih vrijednosti (1/-1), osteopenije (-1/-2,5) i osteoporoze (<-2,5), te umjereno povećane (1/2,5) i znatno povećane (>2,5).

**SLABINSKA KRALJEŽNICA BMD**

**Slika 22.**

*Slikovni prikaz promjena pojedinačnih mjerenja gustoće kosti slabinske kralježnice (BMD, g/cm<sup>2</sup>; 6=6 mjeseci nakon transplantacije, 12=12 mjeseci nakon transplantacije).*

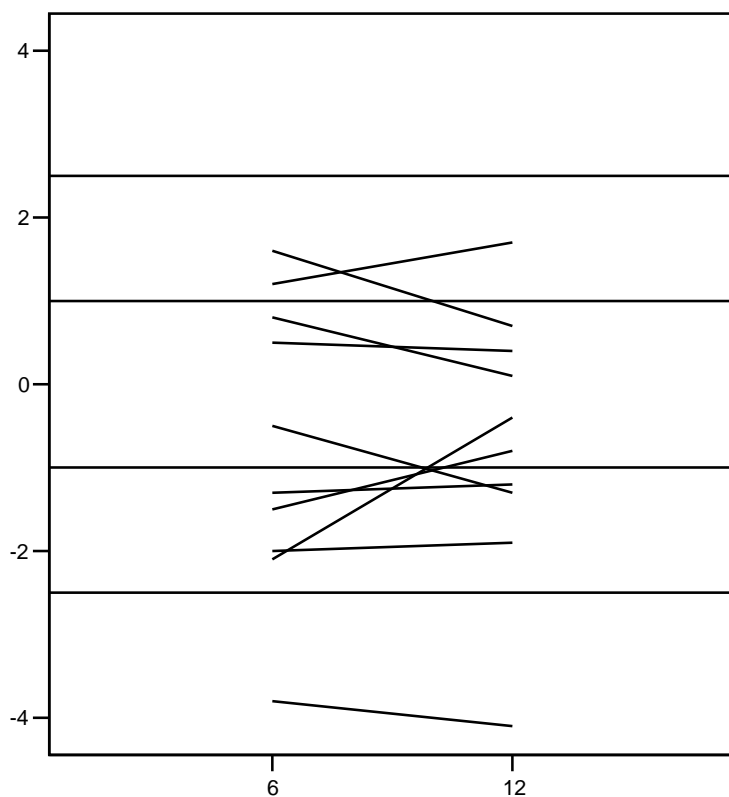
### SLABINSKA KRALJEŽNICA T SKOR



**Slika 23.**

Slikovni prikaz promjena pojedinačnih mjerenja T-vrijednosti slabinske kralježnice (6=6 mjeseci nakon transplantacije, 12=12 mjeseci nakon transplantacije). Također je označen raspon normalnih vrijednosti (1/-1), osteopenije (-1/-2,5) i osteoporoze (<-2,5), te umjereno povećane (1/2,5) i znatno povećane (>2,5).

## SLABINSKA KRALJEŽNICA Z SKOR

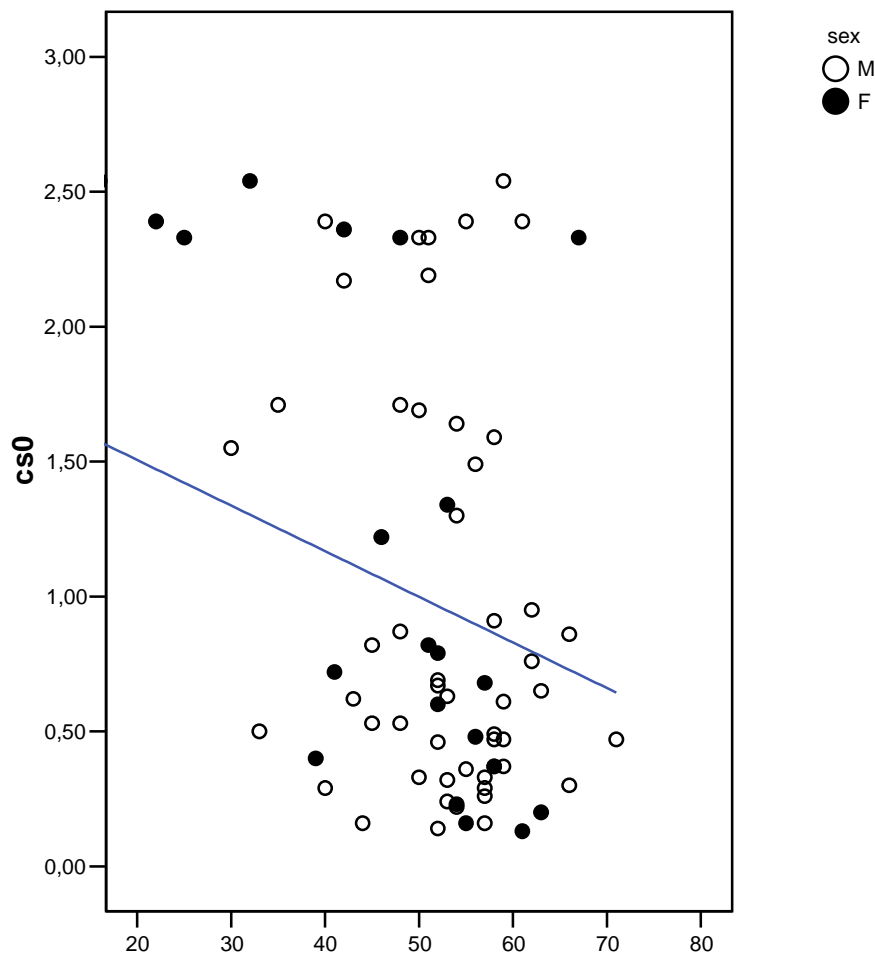
**Slika 24.**

Slikovni prikaz promjena pojedinačnih mjerenja Z-vrijednosti slabinske kralježnice (6=6 mjeseci nakon transplantacije, 12=12 mjeseci nakon transplantacije). Također je označen raspon normalnih vrijednosti (1/-1), osteopenije (-1/-2,5) i osteoporoze (<-2,5), te umjereno povećane (1/2,5) i znatno povećane (>2,5).

## 12.5. ISPTIVANE VARIJABLE U ODNOSU NA ŽIVOTNU DOB NAPOČETKU ISTRAŽIVANJA

### 12.5.1. Biokemijske varijable u odnosu na životnu dob

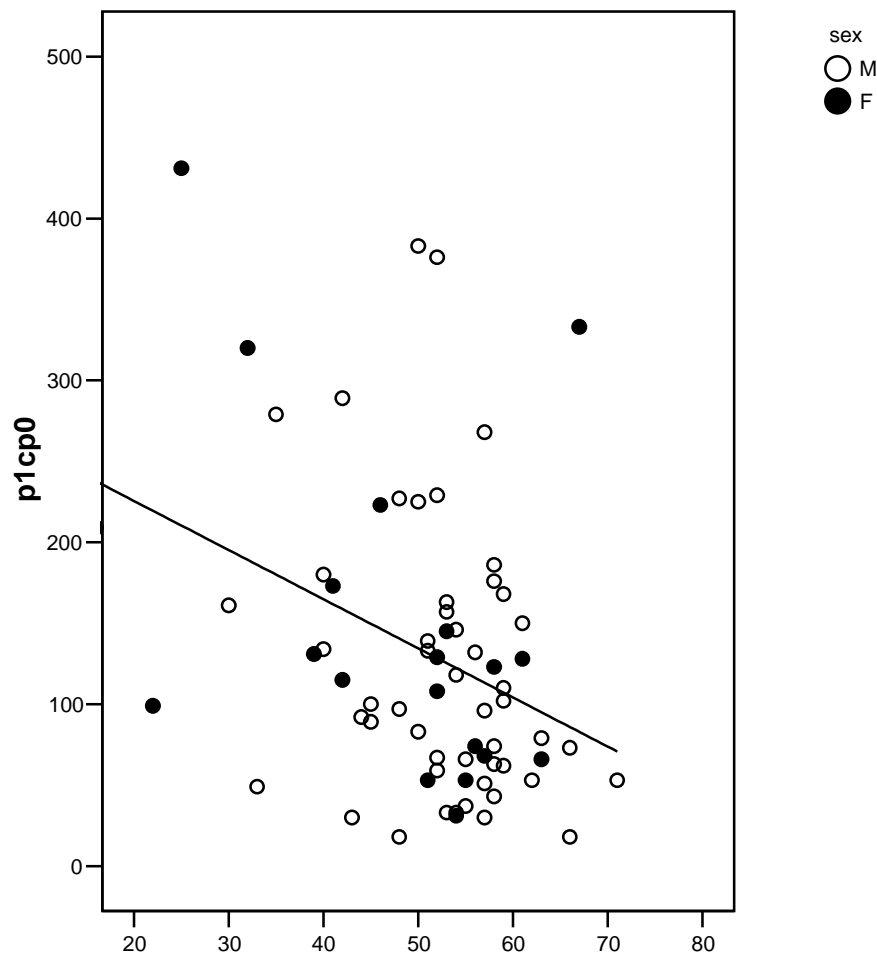
Ispitana je korelacija (Pearson) životne dobi i biokemijskih varijabli na početku praćenja u vrijeme transplantacije. U nastavku praćenja je broj ispitanika manji te nije ispitana korelacija. Statistički značajna negativna korelacija sa životnom dobi je za crosslaps ( $r=-0,401$ ,  $p<0,0005$ ) i P1CP ( $r=-0,343$ ,  $p=0,004$ ). Slikovni prikaz samo za ove dvije statistički značajne korelacije je na slici 25 i 26.





**Slika 25.**

*Prikaz rezultata crosslapsa ( $cs0$ ,  $\mu\text{g/L}$ ) u vrijeme transplantacije u odnosu na životnu dob za muškarce (otvoreni kružić,  $M$ ) i žene (crni kružić,  $F$ ). Označen je pravac negativne statistički značajne korelacije.*



**Slika 26.**

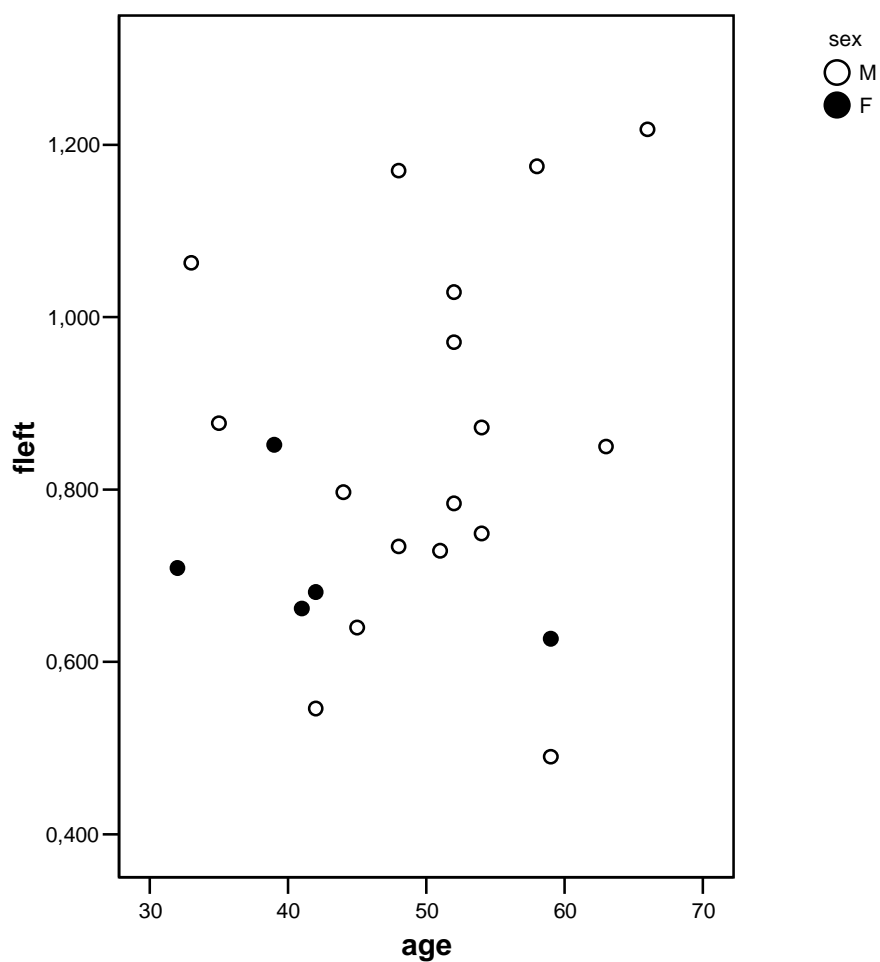
*Prikaz rezultata PICP (PICP0,  $\mu\text{g/L}$ ) u vrijeme transplantacije u odnosu na životnu dob za muškarce (otvoreni kružić, M) i žene (crni kružić, F). Označen je pravac negativne statistički značajne korelacije.*

### **12.5.2. Denzitometrijskih varijabli u odnosu na životnu dob**

Denzitometrijske varijable prikazane su slikovno radi boljeg uvida u odnosu na životnu dob, unatoč nepostojanja statistički značajne korelacije svih ispitanih denzitometrijskih varijabli i životne dobi za ovu skupinu bolesnika.

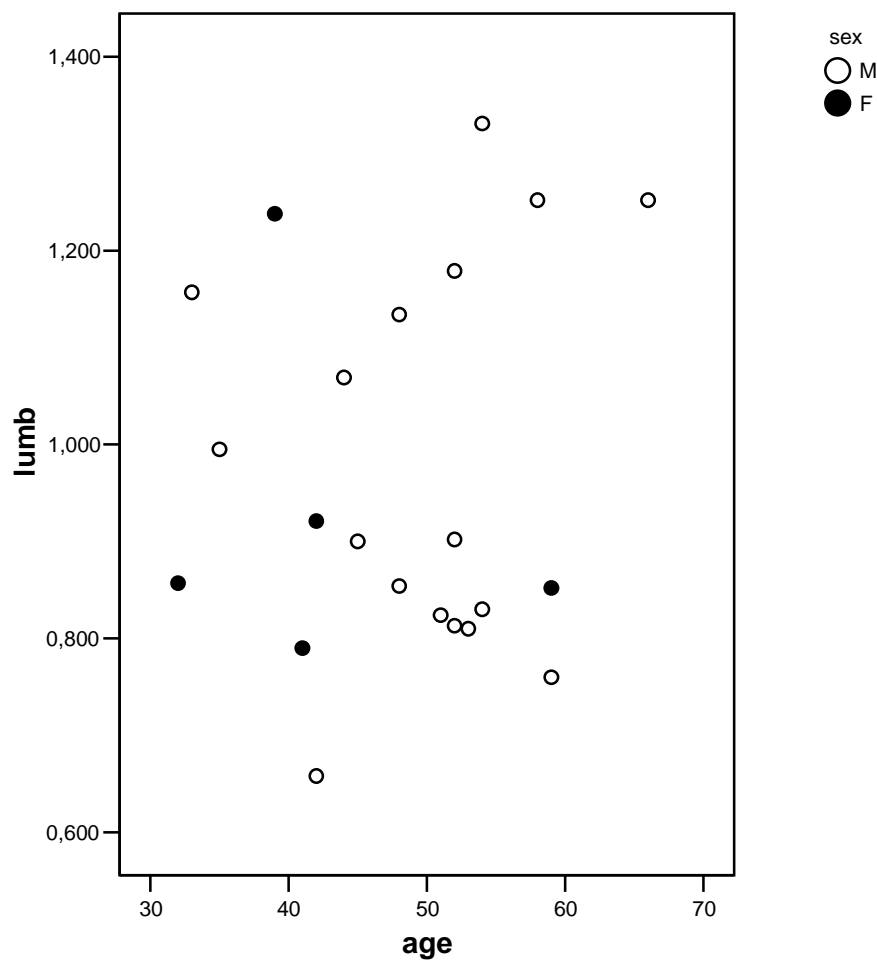
Ispitana je korelacija (Spearmanov ro) životne dobi i denzitometrijskih varijabli BMD, T i Z-vrijednosti za područje mjerenja vrata lijeve bedrene kosti i slabinske kralježnice samo za prvo mjerenje 6 mjeseci nakon transplantacije, te nije nađena statistička značajnost niti za jedan par denzitometrijskih varijabli sa životnom dobi (n=22).

Slikovni prikaz za rezultate koštane mase, T i Z-vrijednosti za vrat lijeve bedrene kosti i slabinske kralježnice ukazuje na podudarnost rezultata muškaraca i žena te nepostojanja trenda promjena sa životnom dobi (slika 27-32).



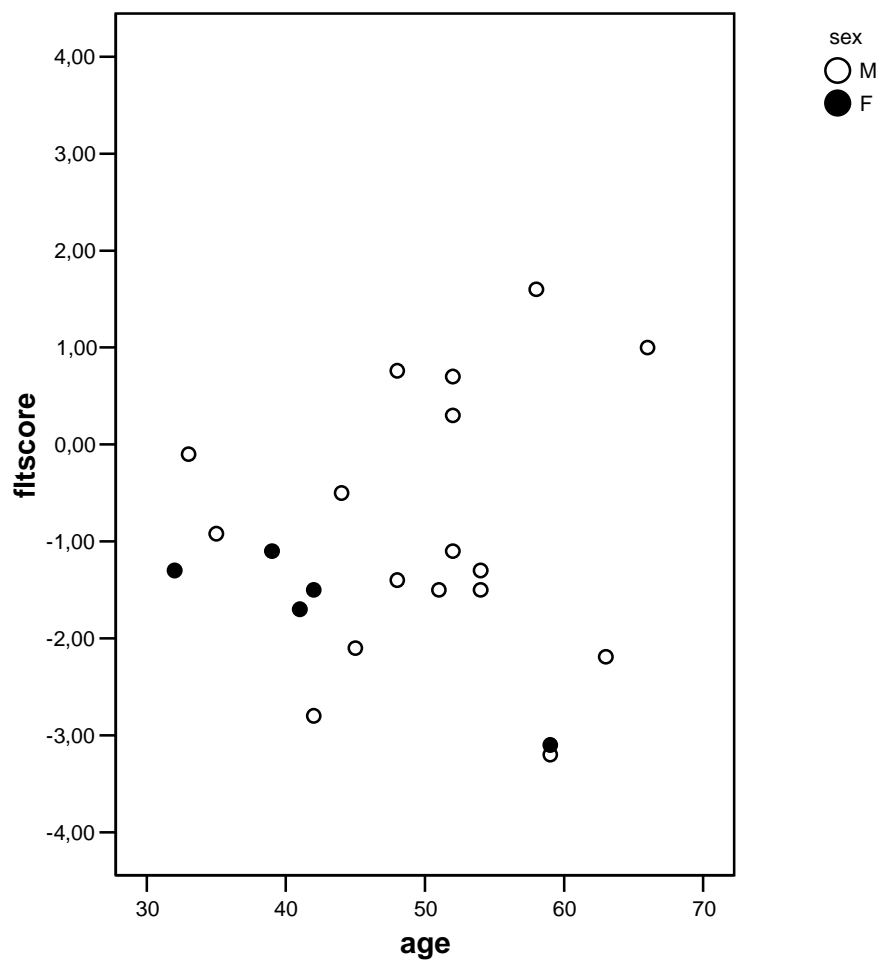
**Slika 27.**

*Prikaz rezultata koštane mase (BMD, g/cm<sup>2</sup>) vrata lijeve bedrene kosti u prvom mjerenju 6 mjeseci nakon transplantacije u odnosu na životnu dob za muškarce (otvoreni kružić, M) i žene (crni kružić, F).*



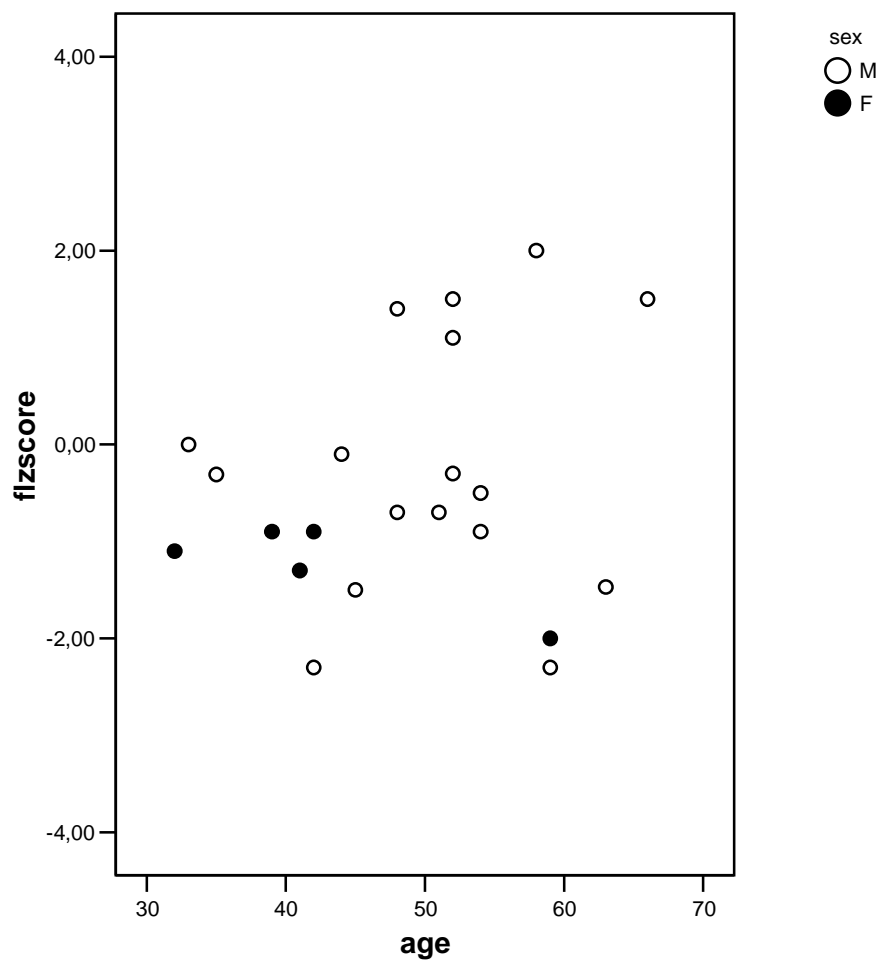
**Slika 28.**

Prikaz rezultata koštane mase ( $BMD$ ,  $g/cm^2$ ) slabinske kralježnice (lumb) u prvom mjerjenju 6 mjeseci nakon transplantacije u odnosu na životnu dob za muškarce (otvoreni kružić,  $M$ ) i žene (crni kružić,  $F$ ).



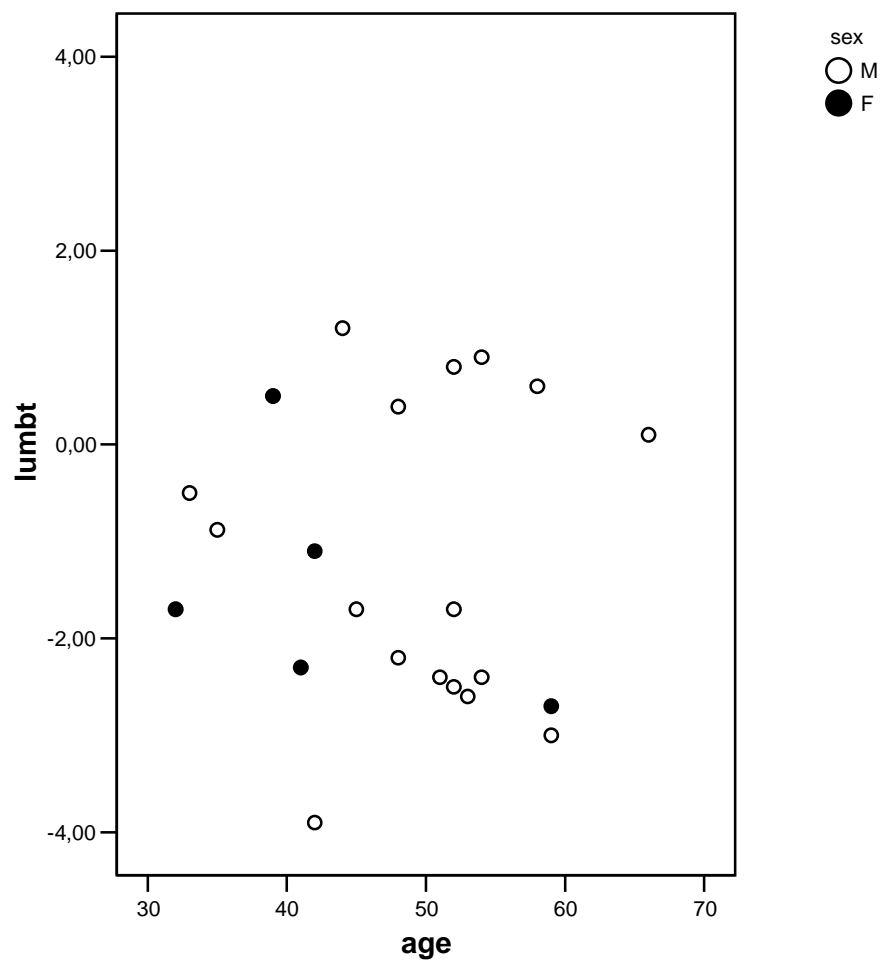
**Slika 29.**

*Prikaz rezultata Tskora vrata lijeve bedrene kosti (fltscore) u prvom mjerenju 6 mjeseci nakon transplantacije u odnosu na životnu dob za muškarce (otvoreni kružić, M) i žene (crni kružić, F).*



**Slika 30.**

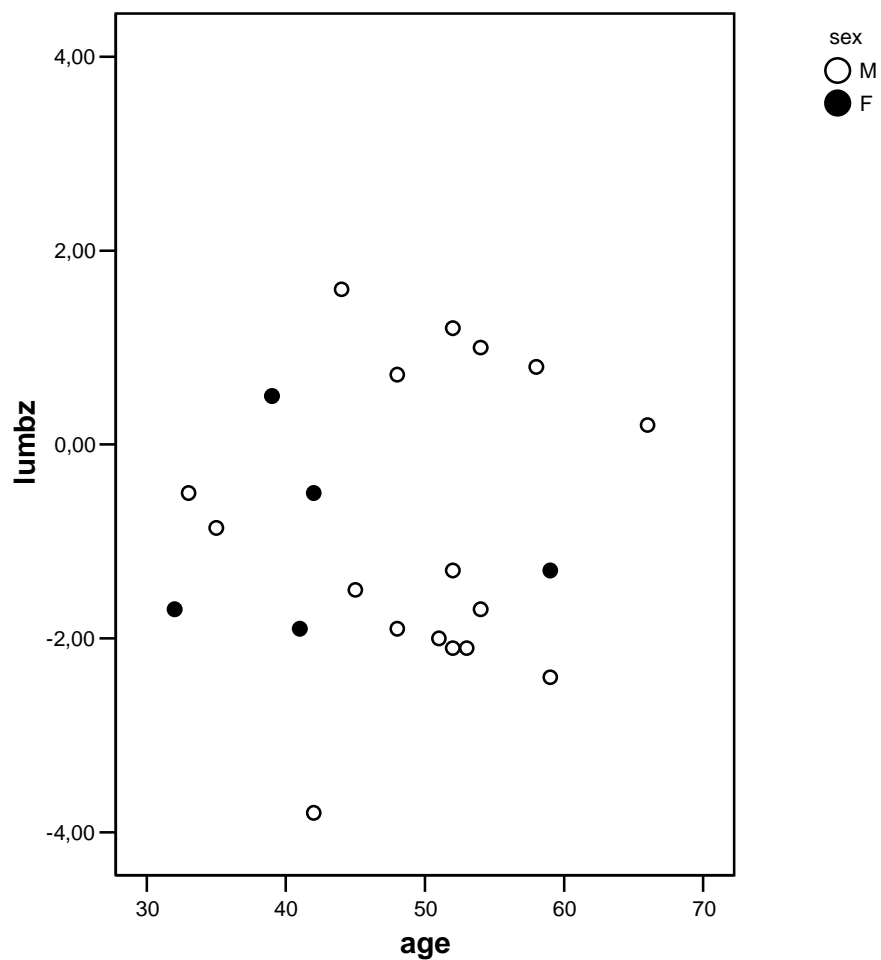
Prikaz rezultata Zskora vrata lijeve bedrene kosti (flzscore) u prvom mjerenju 6 mjeseci nakon transplantacije u odnosu na životnu dob za muškarce (otvoreni kružić, *M*) i žene (crni kružić, *F*).



**Slika 31.**

Prikaz rezultata T-vrijednosti slabinske kralježnice (lumbt) u prvom mjerenju 6 mjeseci nakon transplantacije u odnosu na životnu dob za muškarce (otvoreni kružić, M) i žene (crni kružić, F).





**Slika 32.**

*Prikaz rezultata Z-vrijednosti slabinske kralježnice (lumbz) u prvom mjerenju 6 mjeseci nakon transplantacije u odnosu na životnu dob za muškarce (otvoreni kružić, M) i žene (crni kružić, F).*

## 13. RASPRAVA

Razumijevanje etiopatogeneze koštanog poremećaja kod bolesnika s kroničnim jetrenim zatajenjem (cirozom) praćeno je mnogim nepoznanicama i do sada ne postoje protokoli, preporuke i smjernice koje bi jednoznačno ukazale na primjenu i učestalost mjerenja gustoće kosti i biokemijskih pokazatelja koštane pregradnje.<sup>(12)</sup> Kronična bolest jetre i njoj pridružena stanja kao što su hipogonadizam, poremećen metabolizam vitamina D, poremećen metabolizam žuči, ingestija alkohola, slabija ishrana te slabija tjelesna aktivnost dovode do gubitka koštane mase (BMD). Kao što je već prije pokazano u terminalnoj fazi jetrene bolesti cjelokupni je metabolizam organizma poremećen, pa tako i koštani. Rizik od prijeloma u bolesnika s cirozom je dvostruko veći nego u zdrave populacije, a učestalost osteoporoze kod njih se kreće čak i do 50%. U 8-32% bolesnika s primarnim sklerozirajućim kolangitisom ima osteoporozu, a 15% prijelome. Wilsonova bolest također predstavlja nezavistan rizik za nastanak osteoporoze, i to nezavisno od postojanja ciroze.<sup>(13)</sup> Praćenjem zdravstvenog stanja u bolesnika koji su na listi čekanja za Tx jetre bilo bi optimalno ustanoviti status koštanog sustava DXA-om u području lumbalne kralježnice i kuka. U slučaju osteoporoze idealno bi bilo započeti aktivno liječenje, osigurati dostatan unos kalcija i vitamina D. Poremećaj koštanog metabolizma koji rezultira gubitakom koštane mase (BMD) u prvoj godini nakon transplantacije jetre dovodi do povećanja rizika od fraktura, tako da je učestalost fraktura u transplantiranih pacijenata i do 40% veća nego u normalne populacije.<sup>(51)</sup>

### 13.1. PROCJENA POREMEĆAJA KOŠTANOG METABOLIZMA KOD NAŠIH BOLESNIKA

Prema međunarodnom društvu za kliničku denzitometriju, denzitometrija lumbalne kralježnice i vrata bedrene kosti je za sada jedina preporučena metoda za procjenu mineralne gustoće kosti i ona predstavlja zlatni standard za utvrđivanje poremećaja koštanog metabolizma u odraslih.<sup>(67)</sup>

S druge strane biokemijski pokazatelji koštanog metabolizma drugi su način za procjenu poremećaja koji se mogu javiti u obliku pojačane resorpcije kosti ili ukazati na poboljšanje koštanog statusa.<sup>(21)</sup>

### **13.2. PORMEĆAJ MINERALIZACIJE UTVRĐENI POMOĆU DXA**

Denzitometrijske varijable pokazuju na statistički značajno povećanje koštane mase vrata lijeve bedrene kosti u razdoblju od 6 do 12 mjeseci nakon transplantacije kod naših ispitanika, dok do sada objavljeni podatci govore o smanjenju koštane mase vrata bedrene kosti.<sup>(50)</sup> Praćenje ostalih denzitometrijskih varijabli vrata bedrene kosti (T i Z-vrijednost) i slabinske kralježnice pokazalo je da nema promjena u ovom razdoblju, te da se normalna, snižena ili čak povećana koštana masa ne mijenja tijekom razdoblja od godinu dana. Ovi rezultati pokazuju da kod većine naših ispitanika postoji normalna koštana masa ili osteopenija u području mjerenja. Za razliku od naših rezultata neke studije su pokazale oporavak koštane mase u području lumbalne kralježnice godinu dana nakon Tx, u odnosu na razinu prije Tx.<sup>(38,69,70,71)</sup> Premda su naši rezultati dobiveni na manjem broju ispitanika, dobiveni nalaz normalne i osteopenične koštane mase mogao bi biti posljedica kraćeg trajanja bolesti, ili manji utjecaj štetnosti osnovne bolesti na skelet. Nepovoljan utjecaj kortikosteroida i imunosupresiva na koštani sustav je dobro poznat.<sup>(14,40,43,46)</sup> U svakom slučaju postoji potreba za očuvanjem integriteta koštanog sustava, a jedan od načina je i liječenje bifosfonatima. Postoje istraživanja o uspješnoj primjeni bifosfanata u liječenju bolesnika s Tx jetrom. Bifosfonati su bolesnicima značajno popravili koštanu masu u području lumbalne kralježnice nakon godinu dana, dok je koštana masa vrata bedrene kosti smanjena u tom razdoblju i kod liječenih i neličenih pacijenata.<sup>(50)</sup> Mi nismo dokazali pogoršanje, već naprotiv popravljane koštane mase u području vrata lijeve bedrene kosti. Možda je to kod nas slučajan nalaz zbog malog broja ispitanih pacijenata, a možda je povoljan učinak Tx jetre na kortikalnu i trabekularnu kost, što treba i dalje nastaviti istraživati.

### **13.3. PROCJENA KOŠTANOG METABOLIZMA POMOĆU BIOKEMIJSKIH POKAZATELJA KOŠTANE PREGRADNJE**

Suvremena saznanja transplantacijske medicine nedvojbeno ukazuju na poremećaj koštanog metabolizma u kroničnim bolestima jetre prije i nakon transplantacije, a kod tih je pacijenata povećana incidencija osteoporoze i prijeloma.<sup>(13,15,16,40)</sup>

Koštana razgradnja procijenjena mjerenjem crosslapsa ukazuje na ubranu koštanu razgradnju tijekom cijelog razdoblja praćenja. Za crosslaps smo našli da je koncentracija mjerenja 14 postoperativni dan statistički značajno veća u odnosu na mjerenje nakon 12 mjeseci, što ukazuje na povoljan utjecaj transplantiranog organa i

tendenciju normalizacije koštane razgradnje. Dakle jetreno zatajenje i metabolički poremećaj osnovne bolesti uzrok su povećane koštane razgradnje i povećanog rizika za nastanak osteoporoze i prijeloma. Naši podatci dobiveni za dinamiku koncentracije crossclempa su istovijetni s podacima iz literature.<sup>(40,44,47)</sup>

Iako se nakon uspješno napravljene Tx jetre cijelokupni metabolizam u organizmu normalizira, ubrzana koštana razgradnja u ranom poslijetransplantacijskom razdoblju se povezuje i s primjenom kortikosteroida u sklopu postoperativnog liječenja.<sup>(14)</sup> Glavni imunosupresivni lijekovi Ciklosporin Takrolimus, Sirolimus mofetil mikofenolat imaju zanemariv štetan utjecaj na koštani metabolizam.<sup>(40)</sup>

Osteokalcin, pokazatelj koštane izgradnje, je na početku praćenja vrlo nizak, no ubrzo se nakon transplantacije povećava u većine bolesnika što upućuje na ubranu koštanu izgradnju. Rezultati mjerenja osteokalcina pokazuju da je njegova koncentracija u početku praćenja u vrijeme Tx statistički značajno manja u odnosu prema koncentraciji u ostalim mjerenjima, tj. nakon 14 dana, 3, 6, i 12 mjeseci. Koncentracija osteokalcina u postoperativnom razdoblju progresivno raste u prvih 6 mjeseci, dok se prema 12. mjesecu malo smanjuje no to smanjenje nije statistički značajno. Dobiveni rezultati pokazuju da je koncentracija osteokalcina vrlo niska u vrijeme transplantacije, te se u posttransplantacijskom periodu popravlja, raste i normalizira. U pojedinim ispitanika koncentracija osteokalcina ostaje snižena, no generalni je trend povećanje i normalizacija koncentracije osteokalcina u posttransplantacijskom periodu od godine dana. Do sada nema podataka o koštanoj izgradnji procijenjenom temeljem mjerenja koncentracije osteokalcina. U literaturi se mogu naći podatci samo kod pacijenata koji su bili liječeni bifosfonatima, no ni ti podatci nisu jednoznačni, naime u jednim se studijama povećava koncentracija osteokalcina kod pacijenata liječenim bifosfonatima u postransplantacijskom periodu<sup>(54)</sup> dok se u drugim studijama koncentracija osteokalcina smanjuje.<sup>(50)</sup>

Koštana izgradnja iskazana mjerenjem P1CP i koštanom alkalnom fosfatizom uglavnom je u granicama referentnih raspona tijekom cijelog razdoblja praćenja. Premda su koncentracije P1CP u većine naših ispitanika odraz normalne koštane izgradnje, postoji tijekom postoperacijskog perioda tendencija sniženja koncentracija. Koncentracija P1CP u vrijeme transplantacije statistički je značajno veća u odnosu prema mjerenju nakon 3 i 12 mjeseci, te 6 i 12 mjeseci.

Na početku mjerenja su aktivnosti koštane alkalne fosfataze snižene ili su unutar referentnih granica, ali tijekom praćenja se vrijednosti povisuju. Za koštanu alkalnu

fosfatazu nađeno je da je aktivnost početnog mjerenja u vrijeme Tx statistički značajno manja u odnosu prema mjerenju nakon 14. dana i 6. mjeseci.

P1CP i koštana alkalna fosfataza kao pokazatelji koštane izgradnje tijekom cijelog praćenja ukazuju na normalnu koštanu izgradnju, a to je u suprotnostima nalaza za osteokalcin. Ova dva parametra se mobiliziraju u jetri pa bi bilo normalno njihovo nakupljanje u organizmu za vrijeme jetrenog zatajenja.

Niske koncentracije osteokalcina na početku istraživanja i njihovo povećanje u postoperacijskom periodu mogu ukazivati na drugačiji metabolizam osteokalcina kod ovih bolesnika. Vrlo vjerojatno ovdje se ne radi o općem poremećaju jetrenog metabolizma na osteoblaste, već o mogućem klirensu osteokalcina, dakle ne događa se povećano ulaganje koštani matriks. Na taj bi način mogli objasniti rezultate mjerenja osteokalcina koji nisu podudarni s onima za P1CP i koštanu alkalnu fosfatazu a premda su oni svi zajedno proizvodi osteoblasta.

Koncentracija osteoprotegerina drugog značajnog pokazatelja koštane izgradnje povišena je u vrijeme transplantacije i statistički je značajno veća u odnosu prema koncentracijama u ostalim mjerenjima, tj nakon 14 dana, 3, 6, i 12 mjeseci. Koncentracija osteoprotegerina se nakon 14 dana snizuje na oko 60% vrijednosti u trenutku transplantacije. Visoke inicijalne koncentracije osteoprotegerina mogle bi se objasniti kao kompenzacijski učinak osteoprotegerina na kočenje svih faza razvoja i aktivacije osteoklasta. Poznato je da je pojačano lučenje osteoprotegerina u kroničnim jetrenim bolestima kao kompenzacijski učinak na koštanu razgradnju, no ono nije učinkovito u kroničnim bolestima jetre <sup>(32)</sup> pa tako često u cirozi imamo smanjenje koštane mase skeleta i osteoporozu.

Hipovitaminoza D procijenjena je na temelju mjerenja koncentracije 25-OH D i postoji tijekom cijelog praćenja. Rezultati pokazuju da je koncentracija 25-OH D u vrijeme transplantacije statistički značajna viša u odnosu na koncentraciju nakon 6. mjeseci. Činjenica je da se aktivni oblik vitamina D metabolizira u jetri, i sama bolest jetre, te način života tih pacijenata (slabije izlaganje suncu) govori u prilog dobivenim rezultatima analize.

Nismo dokazali u našoj skupini bolesnika statističku razliku između muškaraca i žena za ispitane biokemijske i denzitometrijske varijable. Iznimka su dva biokemijska parametra (P1CP i koštana alkalna fosfataza), dok je korelacija sa životnom dobi za početna mjerenja statistički značajna za crosslaps i P1PC. Za denzitometrijske varijable nije dokazana statistički značajna razlika za životnu dob.

Manjkavost ovog rada manji je broj ispitanika za denzitometriju. Njihova slabija zainteresiranost za dugoročno sudjelovanje u praćenju, premda je to za njihovu dobrobit, sve to ograničava vrijednost rezultata denzitometrije, iako smo imali dovoljan broj bolesnika u pokusu za statističku analizu. Možda bi se manji broj bolesnika u pokusu praćenja denzitometrijskih varijabli mogao objasniti time što je DXA radiološka metoda pretrage koštanog sustava. Dok je smanjenje broja bolesnika u dugoročnom praćenju biokemijskih varijabli bilo i za očekivati, no ono je značajno zastupljenije po svim vremenskim intervalima praćenja za sve ispitivane varijable.

Poremećaj koštanog metabolizma u bolesnika u prvoj godini nakon transplantacije jetre ukazuje na izrazito usporenu koštanu izgradnju koja se popravlja ubrzo nakon transplantacije, te postojanje umjereno povećane koštane razgradnje. Razlike uočene između pokazatelja koštane izgradnje, tj. osteokalcina i koštane alkalne fosfataze i P1CP nije moguće tumačiti njihovim različitim metaboliziranjem putem jetre i bubrega.

Koštana masa u ovih bolesnika je normalna ili snižena (osteopenija), te se popravlja za područje vrata bedrene kosti, ali je bez promjena u slabinskoj kralježnici.

## 14. ZAKLJUČCI

U ovoj studiji je istražena dinamika i promjene koštane izgradnje i razgradnje, te koncentracije 25-OH D nakon transplantacije jetre. U početku je uključeno 88 bolesnika, a nakon 12 mjeseci je kontinuirano praćeno 15. Status koštane mase skeleta vrata lijeve bedrene kosti i slabinske kralježnice je 6 mjeseci nakon transplantacije praćen u 22 bolesnika, a 12 mjeseci nakon transplantacije u 10 bolesnika. Rezultati ovog istraživanja omogućuju sljedeće zaključke:

1. Koštana razgradnja procijenjena mjerenjem crosslapsa ukazuje na ubranu koštanu razgradnju u većine bolesnika tijekom cijelog razdoblja praćenja. Za crosslaps nađeno je da je koncentracija mjerenja 14. dan statistički značajno veća u odnosu na mjerenje nakon 12 mjeseci, a što ukazuje na tendenciju normalizacije koštane razgradnje.
2. Koštana izgradnja iskazana mjerenjem P1CP i koštanom alkalnom fosfatazom je uglavnom tijekom cijelog razdoblja praćenja unutar referentnih raspona. Premda su koncentracije P1CP u većine bolesnika odraz normalne koštane izgradnje, postoji tendencija sniženja koncentracija. Koncentracija P1CP početnog mjerenja u vrijeme transplantacije statistički značajno veća u odnosu prema mjerenju nakon 3 i 12 mjeseci. Koncentracija P1CP statistički značajno se smanjuje između razdoblja 3 i 12 mjeseci te 6 i 12 mj.
3. Na početku praćenja su aktivnosti koštane alkalne fosfataze snižene ili niže unutar referentnog raspona, ali tijekom praćenja se vrijednosti povisuju. Za koštanu alkalnu fosfatazu nađeno je da je aktivnost početnog mjerenja u vrijeme transplantacije (tx) statistički značajno manja u odnosu prema mjerenju nakon 14 dana i 6 mjeseci.
4. Osteokalcin, pokazatelj koštane izgradnje, je na početku praćenja u vrijeme transplantacije vrlo nizak, te se ubrzo povisuje u većine bolesnika u smislu ubrzane koštane izgradnje. U nekih bolesnika se izgradnja normalizira, ali u nekih ostaje izrazito usporena. Za osteokalcin nađeno je da je koncentracija početnog mjerenja u vrijeme transplantacije (tx) statistički značajno manja u odnosu prema koncentraciji u ostalim mjerenjima, tj. nakon 14 dana, 3, 6 i 12 mjeseci. Koncentracija osteokalcina u poslijetransplantacijskom razdoblju progresivno raste do 6. mjeseca, a u 12 mjesecu je malo niža, ali ne statistički značajno.

5. Hipovitaminoza D procijenjena na temelju mjerenja 25-OH D postoji tijekom cijelog praćenja. Za koncentraciju 25-OH D nađeno je da je koncentracija početnog mjerenja u vrijeme transplantacije (tx) statistički značajno više u odnosu na koncentraciju nakon 6 mjeseci.
6. Za osteoprotegerin nađeno je da je koncentracija mjerenja u vrijeme transplantacije povišena i statistički značajno veća u odnosu prema koncentraciji ostalim mjerenjima, tj. nakon 14 dana, 3, 6 i 12 mjeseci. Koncentracija osteoprotegerina se nakon 14 dana snizuje za oko 60% i ostaje na toj razini koncentracije.
7. Denzitometrijske varijable ukazuju na statistički značajno povećanje koštane mase vrata lijeve bedrene kosti u razdoblju od 6 do 12 mjeseci nakon transplantacije. Praćenje ostalih denzitometrijskih varijabli vrata bedrene kosti (T i Z-vrijednost) i slabinske kralježnice pokazalo je da nema promjena u ovom razdoblju, te da se normalna, snižena ili čak povećana koštana masa ne mijenja tijekom ovog razdoblja. Ovi rezultati su također pokazali da u većine bolesnika postoji normalna koštana masa ili osteopenija.
8. U ovoj skupini bolesnika nije dokazana statistička razlika između muškaraca i žena za ispitivane biokemijske i denzitometrijske varijable.
9. Korelacije sa životnom dobi za početna mjerenja je statistički značajna i negativna samo za crosslaps i P1CP. Za denzitometrijske varijable nije dokazana statistički značajna korelacija sa životnom dobi.
10. Poremećaj koštanog metabolizma kod bolesnika u prvoj godini nakon transplantacije jetre ukazuje na izrazito usporenu koštanu izgradnju koja se popravlja ubrzo nakon transplantacije, te postojanje umjereno povećane koštane razgradnje. Razlike uočene između pokazatelja koštane izgradnje, tj. osteokalcina i koštane alkalne fosfataze i P1CP nije moguće tumačiti njihovim različitim metaboliziranjem putem jetre i bubrega.
11. Koštana masa kod ovih bolesnika je normalna ili snižena (osteopenija), te se popravlja za područje vrata bedrene kosti, ali je bez promjena u slabinskoj kralježnici.



## 15. SAŽETAK

U završnom stadiju jetrene bolesti poremećen je koštani metabolizam. Kronična bolest jetre i njoj pridružena stanja, kao što su hipogonadizam, poremećen metabolizam vitamina D, poremećen metabolizam žuči, podhranjenost, ingestija alkohola, te slabija tjelesna aktivnost dovode do gubitka koštane mase (BMD). Isto tako poznato je da je ubrzan gubitak koštane mase u ranom periodu nakon transplantacije, a to se pak objašnjava utjecajem kortikosteroida, imunosupresivnih lijekova i imobilizacije u ranom postoperativnom periodu. Gubitak koštane mase dovodi do povećanog rizika od fraktura kod transplantiranih pacijenata, a samim tim se povećava morbiditet i mortalitet kod tih pacijenata.

Primarni cilj ovog rada bio je pratiti koštani metabolizam, tj dinamiku koštane razgradnje i koštane izgradnje, osteoprotegerina i statusa vitamina D u bolesnika s transplantiranom jetrom u prvoj godini nakon zahvata.

Dinamiku koštanog metabolizma pratili smo kod 88 bolesnika mjerenjem biokemijskih pretraga koštane izgradnje i razgradnje, 25-hidroksivitamina D, te osteoprotegerina (molekule poveznice regulacije koštane pregradnje) u vrijeme transplantacije, te nakon 14 dana, 3, 6 i 12 mjeseci. Densitometrija vrata bedrene kosti i slabinske kralježnice u 22 bolesnika 6 i 12 mjeseci nakon transplantacije.

Rezultati mjerenja biokemijskih pretraga su pokazali ubranu koštanu razgradnju tijekom cijelog razdoblja praćenja, smanjenu koštanu izgradnju na temelju koncentracija osteokalcina koja se povećala i popravila u ovom razdoblju, hipovitaminozu D u cijelom razdoblju, te početno visoke koncentracije osteoprotegerina koje su se smanjile u nastavku praćenja. Ostali pokazatelji koštane izgradnje P1CP i koštana alkalna fosfataza su tijekom praćenja bile uglavnom unutar referentnog raspona. Koncentracija crosslapsa se smanjuje ( $p=0,005$ ) u razdoblju od 14 dana do 12 mjeseci; osteokalcin se u odnosu na početno mjerenje povećava ( $p<0,02$ ), a osteoprotegerin smanjuje ( $p<0,003$ ) u svim daljnjim mjerenjima; kontinuirana hipovitaminoza 25-OH D se pogoršava 3 mjeseca nakon transplantacije ( $p<0,02$ ); P1CP se smanjuje nakon 3 i 12 mjeseci ( $p<0,02$ ); koštana alkalna fosfataza se povećava nakon 14 dana i 6 mjeseci ( $p<0,03$ ). Koštana masa u većine bolesnika je normalna ili umjereno smanjena (osteopenija), te se popravlja ( $p<0,01$ ) u području vrata bedrene kosti na kraju praćenja, ali se ne mijenja u slabinskoj kralježnici. Poremećaj koštanog metabolizma kod bolesnika u prvoj godini nakon transplantacije jetre ukazuje na izrazito usporenu koštanu izgradnju koja se popravlja ubrzo nakon

tranplantacije, te postojanje umjereno povećane koštane razgradnje. Ovaj poremećaj je iskazan i promjenama osteoprotegerina, molekule regulacije aktivnosti osteoblasta i osteoklasta. Koštana masa kod ovih bolesnika je normalna ili snižena (osteopenija), te se popravlja za područje vrata bedrene kosti, ali je bez promjena u slabinskoj kralježnici.

## 16. SUMMARY

Deterioration of bone metabolism is a major complication of end-stage liver disease. Chronic liver disease and its associated conditions, including hypogonadism, disturbed vitamin D and bile metabolism, malnourishment, alcohol ingestion, and poor physical activity all lead to decrease in bone mineral density (BMD). In addition, loss of bone mass in the early post-transplant period is known to be rapid and has been ascribed to the effects of corticosteroids, immunosuppressive agents and immobilization in the early postoperative period. Bone mass deficit leads to an increased risk of fractures in transplanted patients, with concomitant increased morbidity and mortality in those patients.

The primary objective of this study was to monitor bone metabolism, ie. the dynamics of bone resorption and formation, osteoprotegerin, and vitamin D status in the liver transplant patients over the course of the first year following transplantation.

The dynamics of bone metabolism was investigated in the study comprised 88 patients and included measurement of biochemical parameters of bone turnover, 25-hydroxy vitamin D and osteoprotegerin (decoy ligand for osteoclast function) at transplantation, after 14 days, 3, 6 and 12 months. Densitometry was performed at the left hip and lumbar spine in 22 patient after 6 and 12 months.

Results of biochemical measurements indicated increased bone resorption during the entire follow-up period, decreased bone formation as assessed by osteocalcin which normalized, 25-OH D deficiency, and initially increased osteoprotegerin which also normalized in this period. Other bone formation markers P1CP and bone alkaline phosphatase were mostly within normal range. Crosslaps decreased after 14 days and thereafter ( $p=0.005$ ), osteocalcin increased ( $p<0.02$ ) and osteoprotegerin decreased ( $p<0.003$ ) after initial measurements; 25-OH D deficiency further decreased after 3 months ( $p<0.02$ ); P1CP decreased after 3 and 12 months ( $p<0.02$ ); bone alkaline phosphatase increased after 14 days and 6 months ( $p<0.03$ ). Bone mass in most patients was either normal or osteopenic, with improvement at the left hip after 12 months ( $p<0.01$ ), but no change at the lumbar spine.

Metabolic bone disorder in the first post-transplant year was characterised by decreased bone formation which improves almost immediately after liver transplantation, and continuously increased bone resorption. Variations in osteoprotegerin levels

corresponded to osteoblast and osteoclast cell activities. Bone mass in liver transplant recipients was normal or osteopenic, but improved only for the hip site.

.

## 17. LITERATURA

1. Ronald W Busuttil. International Liver Transplantation Society 2009 Presidential Address: The Internationalization of Liver Transplantation. *Liver Transplantation* 2010; 16: 558-66.
2. Moses D. Wavamunno and Jeremy R. Chapman. Individualisation of immunosuppression: concept and rationale. *Current Opinion in Organ Transplantation* 2008. 13; 604-8.
3. Abu-Amara M, Yang SY, Trapuria N, Fuller B, Davidson BR and Seifalian AM. Liver ischemia/reperfusion injury: processes in inflammatory networks – a review. *Liver Transplantation* 2010; 16: 1016-32.
4. Rojendra Desai, Neville V. Jamieson, Alexander E. Gimson, Christopher J. Watson, Paul Gibbis, J. Andrew Bradly and Raaj Praseedon. Quality of Life up to 30 years Following Liver Transplantation 2008;14:1473-9.
5. Julia G. Thornton, Kevin D. Mullen. The Role of Hepatic Encephalopathy in the Era of MELD. *Liver Transplantation* 2007; 13: 1364-5.
6. Zoe A. Stewart, Jayme E. Locke, Robert A. Montgomery, Andrew L. Singer, Andrew M. Cameron and Dorry L Segev. ABO- Incompatible Deceased Donor Liver Transplantation in the United States: A National registry Analysis. *Liver Transplantation* 2009; 15: 883-93.
7. Charmaine A. Stewart, Michael Malinchoc, W. Ray Kim, Patrick S. Kamath. Hepatic Encephalopathy as a Predictor of Survival in Patients With End- Stage Liver Disease. *Liver Transplantation* 2007; 13: 1366-71.
8. F. K. Port, R. M. Marion, E. C. Roys and R. A. Wolfe. Trends in Organ Donation and Transplantation in the United States, 1997-2006. *A J Transpl* 2008;8: 911 - 21.
9. Compston JE. Bone marrow and bone: a functional unit. *J Endocrinology* 2002; 173: 387-94.
10. Kušec V. Procjena koštane pregradnje pomoću biokemijskih pretraga klinička primjena i značenje. *Pedijatria Croatica* 2005; 49,
11. Rodan GA. The development and funktion of the sceleton and bone metastases. *Cancer* 2003; 97 Suppl 3: 726-32
12. Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 2003; 423: 337-42.

13. Eastell RE, Baumann M, Hoyle NR, Wiczorek I. Bone markers. Biochemical and clinical perspectives. London, Martin Dunitz; 2001.
14. Dawson-Hughes B, Harris SS, Krall EA, Dallal GE. Effect of withdrawal of calcium and vitamin D supplements on bone mass in elderly men and women. *Am J Clin Nutr* 2000;72: 745-50.
15. Lukert BP, Raisz LG. Glucocorticoid induced osteoporosis: pathogenesis and management. *An Intern Med* 1990; 112: 352-64.
16. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 423: 337-42.
17. Duančić Vjekoslav: Osnove histologije čovjeka (ed 9) Medicinska knjiga 1977.
18. Stjepan Gamulin, Matko Marušić, Zdenko Kovač. Patofiziologija (ed 5) Medicinska naklada 2002.
19. Arthur C Guyton, John E. Hall. Fiziologija (ed 11) Medicinska naklada 2006.
20. Jong DJ, Corstanes FHM, Mannaerts L et al. Corticosteroid-induced osteoporosis: does it occur in patients with Crohn's disease? *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2011-6
21. Sambrook P, Birmingham J, Kelly P et al. Prevention of corticosteroid osteoporosis: A comparison of calcium, calcitonin, and calcitonin. *N Engl Med* 1993; 328: 1747-52.
22. Lukert BP, Raisz LG. Glucocorticoid induced osteoporosis: pathogenesis and management. *An Intern Med* 1990; 112: 352-64.
23. Bia M. Evaluation and management of bone disease and fractures post transplant. *Transplantation Reviews* 2008; 22: 52-61.
24. Bjoro K, Brandsaeter B, Wiencke K, Bjoro T, Godang K, Bollerslev J, Schrumpf E. Secondary osteoporosis in liver transplant recipients: a longitudinal study in patients with and without cholestatic liver disease. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 320-7.
25. Bodingbauer M, Wekerle T, Pakrah B, Roschger P, Peck-Radosavljevic M, Silberhumer G, Grampp S, Rockenshaub S, Berlakovich G, Steininger R, Klaushofer K, Oberbauer R, Muhlbacher F. Prophylactic bisphosphonate treatment prevents bone fractures after liver transplantation. *Am J Transplant* 2007; 7: 1763-9.

26. Boldo A, Taxel P. Wilson's disease followed by liver transplant in a 20-year-old female: considerations for bone health – case report and review of the literature. *Conn Med* 2009; 73:73-78.
27. Carey EJ, Balan V, Kremers WK, Hay JE. Osteopenia and osteoporosis in patients with end-stage liver disease: not just a cholestatic problem. *Liver Transpl* 2003; 10: 648-653.
28. Collier J. Bone disorders in chronic liver disease. *Hepatology* 2007; 46: 1271-8.
29. Cuthbert JA, Pak CY, Zerwekh JE, Glass KD, Combes B. Bone disease in primary biliary cirrhosis: increased bone resorption and turnover in the absence of osteoporosis or osteomalacia. *Hepatology* 1984; 4: 1-8.
30. Diamond T, Stiel D, Lunzer M, Wilkinson M, Roche J, Posen S. Osteoporosis and skeletal fractures in chronic liver disease. *Gut* 1980; 31: 82-7.
31. Diamond TH, Stiel D, Lunzer M, McDowall D, Eckstein RP, Posen S. Hepatic osteodystrophy. Static and dynamic bone histomorphometry and serum bone Gla-protein in 80 patients with chronic liver disease. *Gastroenterology* 1989; 96: 213-221.
32. Ebeling PR. Approach to the patient with transplantation-related bone loss. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;5:1483-90.
33. Guichelaar M, Schmoll J, Malinchoc M, Hay EJ. Fractures and avascular necrosis before and after orthotopic liver transplantation: long-term follow-up and predictive factors. *Hepatology* 2007; 46 doi: 10.1002/hep 21805.
34. Guichelaar MMJ, Kendall R, Schmoll J, Malinchoc M, Hay JE. Bone mineral density before and after OLT; long-term follow-up and predictive factors. *Liver Transpl* 2006; 12: 1390-1402.
35. Guichelaar MM, Malinchoc M, Sibonga J, Clarke BL, Hay JE. Bone metabolism in advanced cholestatic liver disease: analysis by bone histomorphometry. *Hepatology* 2002; 36: 895-903.
36. Schoppet M, Perissner KT, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:549-53.
37. Hofbauer LC, Schoppet M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANK/RANKL system for bone and vascular diseases. *J Am Med Assoc* 2004a; 292: 490-5.

38. Hofbauer LC, Kuhne CA, Viereck V. The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone disease. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2004b; 4:268-75.
39. Hofbauer LC. Pathophysiology of RANK ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG). *Ann Endocrinol (Paris)* 2006;67:139-41.
40. Maalouf NM, Shane E. Osteoporosis after solid organ transplantation *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 90:2456-65.
41. Mells G, Neuberger J. Long-term care of the liver allograft recipient. *Semin Liver Dis* 2009; 29: 102-120.
42. Mobarhan SA, Russell RM, Recker RR, Posner DB, Iber FL, Miller P. Metabolic bone disease in alcoholic cirrhosis: a comparison of the effects of vitamin D<sub>2</sub>, 25 hydroxyvitamin D or supportive treatment. *Hepatology* 1984; 4: 266-73.
43. Monegal A, Guanabens N, Suarez MJ, Suarez F, Clemente G, Garcia-Gonzalez M, De la Mata M, Serrano T, Casafont F, Tome S, Barrios C, Navasa M. Pamidronate in the prevention of bone loss after liver transplantation: a randomized controlled trial. *Transpl Int* 2009; 22: 198-206.
44. Monegal A, Navasa M, Guanabens N, Peris P, Pons F, Martinez de Osaba MJ, Rimola A, Rodes J, Munoz-Gomez J. Osteoporosis and bone mineral metabolism disorders in cirrhotic patients referred for orthotopic liver transplantation. *Calcif Tissue Int* 1997; 60: 148-54.
45. Monegal A, Navasa M, Peris P, Alvarez L, Pons F, Rodes J, Guanabens N. Serum osteoprotegerin and its ligand in cirrhotic patients referred for orthotopic liver transplantation: relationship with metabolic bone disease. *Liver Int* 2007; 27:492-7.
46. Rubin J, Ackert-Bicknel CL, Zhu et al. IGF-1 Regulates Osteoprotegerin ( OPG ) and Receptor Aktivator of Nuclear Faktor – kappa B Ligand in Vitro and OPG in Vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 87: 4273-9.
47. Robinovitz M, Shapiro J, Lian J, Block GD, Merkel IS and Thiel DH. Vitamin D and osteocalcin levels in the liver transplant recipients. Is osteocalcin a reable marker of bone turnover in such cases. *J Hepatol* 1992; 16: 50-5.
48. Moschen AR, Kaser A, Stadlmann S, Millonig G, Kaser S, Muhllechner P, Habor A, Graziadei I, Vogel W, Tilg H. The RANKL/OPG system and bone mineral density in patients with chornic liver disease. *J Hepatology* 2005; 43: 973-83.



49. Ninkovic , Skingle SJ, Bearcroft PWP, Bishop N, Alexander GJM, Compston JE. Incidence of vertebral fracture in the first three months following orthotopic liver transplantation. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12: 931-5.
50. Ninkovic M, Love SA, Tom B, Alexander GJ, Compston JE. High prevalence of osteoporosis in patients with chronic liver disease prior to liver transplantation. *Calcif Tissue Int* 2001; 69: 321-6.
51. OH KW, Rhee EJ, Lee WY, Kim SW, Baek KH, Kang MI, Yun EJ, Park CY, Ihm SH, Choi MG, Yoo HJ, Park SW. Circulating osteoprotegerin and receptor activator of NF-kappaB ligand system are associated with bone metabolism in middle-aged males. *Clin Endocrinol (Oxf.)* 2005; 62: 92-8.
52. Ahmad AM, Hopkins MT, Fraser WD, Ooi CG, Durham BH, Vora JP. Parathyroid hormone secretory pattern, circulating activity, and effect on bone turnover in adult growth hormone deficiency. *Bone* 2003; 32: 170-9-
53. Pennisi P, Trombetti A, Giostra E, Mentha G, Rizzoli R, Fiore CE. Pamidronate and osteoporosis prevention in liver transplant recipients. *Rheumatol Int* 2007; 27: 251-6.
54. Krishna S. Kasturi, Swapna Chennareddygari and Rajasekhara R. Mummandi. Effect of bisphosphonates on bone mineral density in liver transplant patients: a meta analysis and systematic review of randomized controlled trials. *Transplant International* 2010; 23: 200-7.
55. Valta H, Jalanko H, Holmberg C, Helenius I, Makitie O. Impaired bone health in adolescents after liver transplantation. *Am J Transplant* 2008; 8: 150-7.
56. Ward HJ. Nutritional and metabolic issues in solid organ transplantation: targets for future research. *J Ren Nutr* 2009; 19: 111-122.
57. Watson RG, Coulton L, Kanis J et al. Circulating osteocalcin in primary biliary cirrhosis following liver transplantation and druign treatment with ciclosporin. *J Hepatol* 1990; 11: 354-8.
58. Mazzaferro V, Regalia E, Dorci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F. et al. Liver transplatation for the tretmant of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1996; 334: 693-9.
59. Willscott E. Naugler and Amnon Sonnenberg. Survival and Cost Effectiveness Analysis of Completing Strategies in the Managment os Small Hepatocellular Carcinoma. *Liver Transplantation* 2010. 16; 1186-94.

60. Belgiti J, Panis Y, Sauvanet A, Gayet B, Fakete F. A new technique of side to side caval anastomosis during orthotopic hepatic transplantation without inferior vena caval occlusion. *Surg Gynecol Obstet* 1992; 175: 270-2.
61. Claude Tayar, Michael D. Kluger, Alexis Laurent and Daniel Cherqui. Optimizing Outflow in Piggyback Liver Transplantation Without Caval Occlusion: The Three-Vein Technique 2011; 17; 88-92.
62. Ducerf C, Rode A, Adham M, De la Roche E, Bizollon T, Baulieux J, Pouyet M. Hepatic outflow transplantation study after piggyback liver transplantation. *Surgery* 1996; 120: 484-7.
63. Navarro F, Le Monte MC, Fabre JM, Belgiti J, Cherqui D, Adam R et al. Specific vascular complications of orthotopic liver transplantation with preservation of the retrohepatic vena cava: review of 1361 cases. *Transplantation* 1999; 67: 1214-7.
64. Lewiecki EM, Watts NB, McClung MR, et al. Position statement. Official position of the international society for clinical densitometry. *J Clin Endocrinol Metabol* 2004; 89(8): 3651-5.
65. Lawietzki EM, Gordon CM, Baim S et al. International society for clinical densitometry 2007- adult and pediatric official positions. *Bone* 2007; 43(6): 1115-21.

## 18. ŽIVOTOPIS

1965. rođen u Splitu  
Osnovnu i srednju školu završio u Sinju
1985. upisao Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
1991. diplomirao na Medicinskom fakultetu u Zagrebu
1991. pripravnički staž DZ Medveščak
- 1992.-93. Hrvatska vojska
- 1993.-98. specijalizacija iz opće kirurgije KB Merkur  
obranio magistarski rad „Učinak pentadekapeptida BPC 157 na povratnu upalu sluznice jednjaka u štakora“
1998. studijski boravak u Monash University hospital Melbourne Australia  
(simultana transplantacija bubrega i gušterače)
1999. (simultana transplantacija bubrega i gušterače)
- 2001.-03. subspecijalizacija iz digestivne kirurgije KB Merkur i KB Sveti Duh  
prvi uspješno izveo simultanu transplantaciju gušterače i bubrega u Republici Hrvatskoj
2003. prvi napravio split liver transplantaciju
2007. sudijski boravak Charite-Wirkof Klinik Berlin (Tx bubreg)
2008. predstavnik Republike Hrvatske u Eurotransplantu (ETPAK eurotransplant pancreas advisory comitete)
- 2009.-11. prvi presadio tanko crijevo u R Hrvatskoj  
Član Hrvatskog kiruškog društva i Hrvatskog društva za endoskopsku kirurgiju  
Autor i koautor više stručnih i znanstvenih radova  
Pozvani predavač na više stručnih i znanstvenih radova u zemlji i inozemstvu  
Uže područje interesa digestivna i transplantacijska kirurgija