



Središnja medicinska knjižnica

Muljačić, Ante (2006) *Utjecaj vrijednosti koštanog izoenzima na prognozu tijeka i brzine koštanog cijeljenja*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

<http://medlib.mef.hr/214>

University of Zagreb Medical School Repository

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

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ante Muljačić

**Utjecaj vrijednosti koštanog izoenzima na prognozu tijeka i brzine koštanog
cijeljenja**

DISERTACIJA



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ante Muljačić

**Utjecaj vrijednosti koštanog izoenzima na prognozu tijeka i brzine koštanog
cijeljenja**

DISERTACIJA

Zagreb, 2006.

Disertacija je izrađena u ustanovama:**Klinika za traumatologiju Zagreb**

Ravnatelj: prof.dr.sc. Gojko Buljat
Odjel za laboratorijsku dijagnostiku

Klinički bolnički centar Zagreb

Ravnatelj: prof.dr.sc. Željko Reiner
Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku

Voditelj rada:

prof.dr.sc. Dubravko Orlić

Zahvaljujem:

Prof.dr.sc. Dubravku Orliću, dr.med. na uputama i svesrdnoj pomoći tijekom izradbe ovog rada, bez čije pomoći ovaj rad ne bi bio uspješno dovršen

Prof.dr.sc. Gojku Buljatu, dr.med. na nesebičnoj pomoći koju mi je tijekom godina pružao u stjecanju znanstvenih i strukovnih znanja

Mr.sc. Mirjani Zoran, spec.med. biokemije na pomoći pri izvedbi pokusa (*posthumno*)

Prof. dr. sc. Dubravki Čvorišćec, spec. medicinske biokemije **i svim djelatnicima**

Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku

KBC-a Zagreb na pomoći i razumijevanju u izradi pokusa

Prof. Mariji Gazzari, na lektoriranju rada
Marini Pavić, dipl.ing. i svim djelatnicima
Klinike za traumatologiju Zagreb na pomoći i
razumijevanju u izradi rada

SADRŽAJ	Stranica
UVOD	001
1. GRAĐA KOSTI	002
1.1. HISTOLOŠKA STRUKTURA KOSTI.....	002
1.2. SASTOJCI KOSTI.....	007
1.3 CIJELJENJE KOSTI.....	009
1.3.1.PRIMARNO CIJELJENJE KOSTI.....	014
1.3.2.SEKUNDARNO CIJELJENJE KOSTI.....	015
1.4. ALKALNA FOSFATAZA.....	016
1.5. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA.....	019
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	023
3. METODE I ISPITANICI	024
3.1. KLINIČKI UZORAK.....	024
3.2. LABORATORIJSKE METODE MJERENJA.....	025
3.2.1. ODREĐIVANJE ALKALNE FOSFATAZE.....	025
3.2.2. ODREĐIVANJE KOŠTANOG IZOENZIMA.....	026
3.3. KLINIČKA OBRADA.....	026
3.3.1. RADIOLOŠKA OBRADA.....	027
3.3.2. MATEMATIČKA OBRADA.....	029
3.3.3. STATISTIČKA OBRADA.....	031
4. REZULTATI	032
5. RASPRAVA	071
6. ZAKLJUČCI	076
7. SAŽETAK	078
8. SUMMARY	079
9. LITERATURA	080
10. ŽIVOTOPIS	089

UVOD

Prijelom kosti u cijeljenju je otvoreni biološki sustav s neograničenim brojem stupnjeva slobode gibanja, ovisan o brojnim čimbenicima. Analiza aktivnosti alkalne fosfataze te određivanje vrijednosti njenog koštanog izoenzima pripadaju laboratorijskim pretragama čija interpretacija i vrijednost kod ozljeđenika s prijelomima kostiju do sada nije detaljno razrađena. Strukturalne i imunološke studije, kombinirane s pokusima inhibicije, pokazuju da postoje tri različite vrste izoenzima alkalne fosfataze (jetrena – koštana – bubrežna, intestinalna i placentarna), kodirane od triju različitih genskih lokusa. Praćenjem aktivnosti alkalne fosfataze u procesu koštanog cijeljenja, mogu se ustanoviti određene zakonitosti. Dosadašnja znanstvena istraživanja pokazala su da se ukupna aktivnost alkalne fosfataze, promatrana longitudinalno periodičnim kontrolama, povećava usporedno s razvojem subperiostalnog kalusa(1). Povećanje aktivnosti alkalne fosfataze pri stabilnim ostesintezama može ukazati vrlo rano, dakle prije nego što se može uočiti rendgenskim pretragama, kako zahvat nije dovoljno stabilno izveden. Povećanje aktivnosti koštanog izoenzima alkalne fosfataze jest siguran dokaz svih promjena alkalne fosfataze koje nastaju prilikom koštanog prijeloma dugih kostiju (2). Mogućnost kvalitativnog i kvantitativnog odvajanja izoenzima alkalne fosfataze pokazuje koja je grupa izoenzima odgovorna za porast aktivnosti alkalne fosfataze u serumu ili plazmi. Analiza promjena vrijednosti koštanog izoenzima alkalne fosfataze, kod ozljeđenika s prijelomima kosti, omogućit će uočavanje i tumačenje daljnjih spoznaja o povezanosti fosfataze s prognozom tijeka i brzine koštanog cijeljenja.

1. GRAĐA KOŠTANOG TKIVA

1.1. HISTOLOŠKA STRUKTURA KOSTI

U prvim tjednima nakon začeća, embrio prolazi kroz različite faze i postupno, razvojem glave i izdanaka, od kojih se kasnije razvijaju ekstremiteti, počinje dobivati oblike.

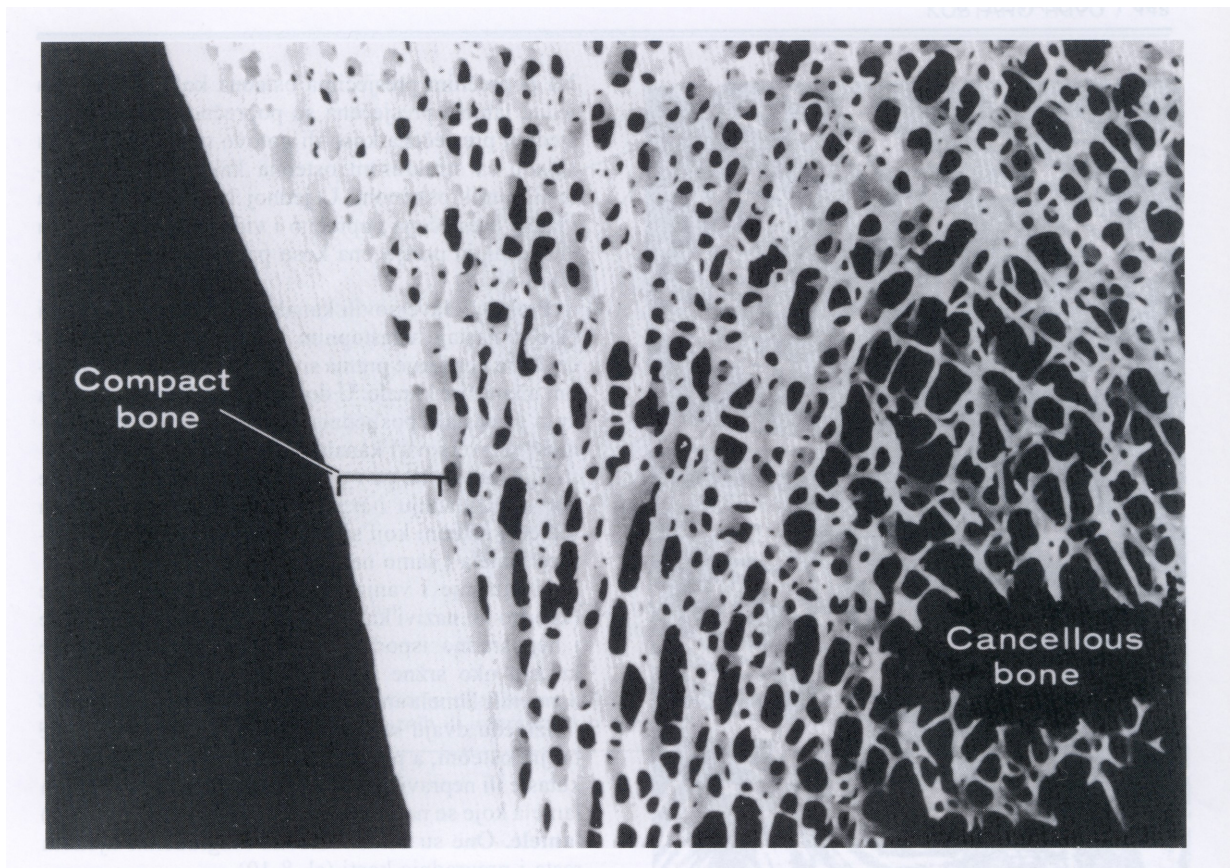
Između ektoderma i endoderma nalazi se difuzna stanična masa – mezenhim, iz koje se kasnije razvijaju različite tkivne strukture uključujući kost, fasciju, hrskavicu i mišiće.

Kosti nastaju od čvrstog mezenhinskog tkiva i to na dva načina: na direktan (npr. kosti lubanje i lica) i na indirektan način, kod kojeg nastaje prvo preobrazba u hrskavicu, a potom od nje nastaje kost (enhondralna osifikacija, npr. duge kosti).

Nakon sedmog embrionalnog tjedna započinje razvoj kosti. Rast kosti s obzirom na obujam izravna je posljedica periostalne apozicije koštanog tkiva.

Za uzdužni rast kosti odgovorna je epifizna hrskavična ploča, a za poprečni rast periost (3). Kada epifizna hrskavica prestane rasti, ona se okoštavanjem nadomješta koštanim tkivom. Nakon toga kosti više ne mogu rasti u duljinu, ali je rast u širinu i dalje moguć. (4). Razlikujemo dvije vrste kosti: membranoznu i hrskavičnu. Membranozne kosti se razvijaju izravno iz membranoznih slojeva (neke kosti lica i svoda lubanje). Hrkavične su kosti one kod kojih se najprije stvara hrskavična struktura, a zatim se ista enhondralnom osifikacijom pretvara u kost.

Kost je posebno vezivno tkivo mineralizirane kolagene građe koje u obliku kostura podupire ljudsko tijelo. Građa kosti može biti kompaktna ili spongiozna. Kompaktna kost je kontinuirana (jednolična) koštana masa koja sadrži spajajuće vaskularne kanale mikroskopskih veličina. Spongiozna kost sastoji se od trabekula različitog oblika i debljine, između kojih se nalazi prostor ispunjen koštanom moždinom. Kompaktna i spongiozna kost sastavni su dijelovi gotovo svake kosti (Slika 1).



Slika 1. Presjek kompaktne i spongiozne kosti. Preuzeo iz Junqueira LC, Caneiro J, Kelley RO. Osnove histologije, Zagreb: Školska knjiga; 1999, str. 147.

Svaka kost sastoji se od korteksa i koštane moždine. Korteks se sastoji od kompaktne kosti, a moždina od spongiozne kosti.

Spongiozna kost sastavljena je od mreže koštanih trabekula. Trabekule su načinjene od različitog broja udruženih koštanih ploča.

Osnovna struktura kompaktne kosti je Haversov sustav (Slika 2).



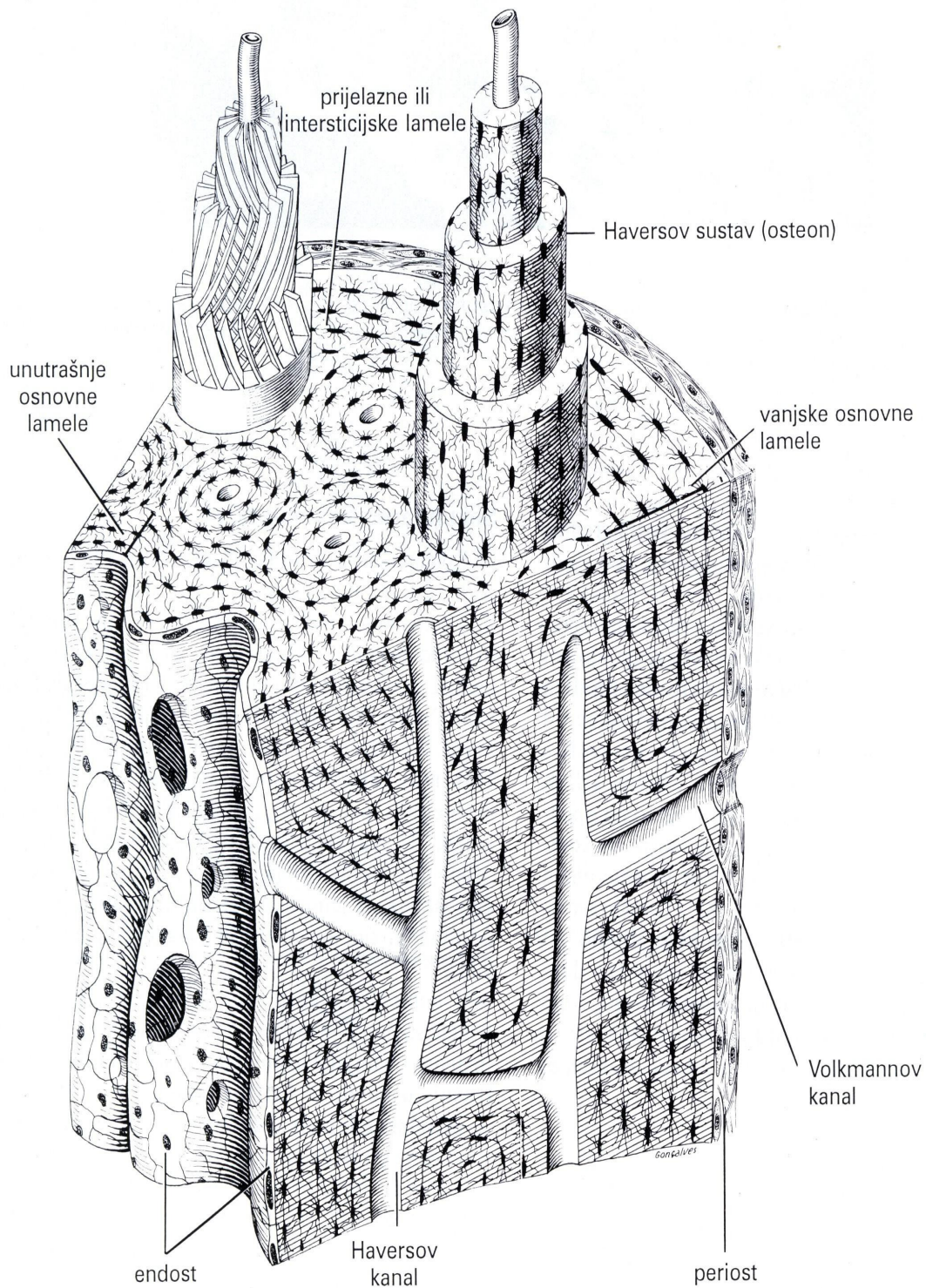
Slika 2.

Prikaz Haversovog sustava ili osteona. Preuzeto iz Junquera LC, Caneiro J, Kelley RO. Osnove histologije, Zagreb: Školska knjiga; 1999, str. 148.

On se sastoji od lamela koje koncentrično okružuju Haversov kanal. Veličina Haversovih kanala usmjerena je prema osovini duge kosti.

Zbog navedenog razloga kanali u poprečnom presjeku nalikuju malenim okruglim otvorima, a lamele su poput krugova; u longitudinalnom presjeku kanali izgledaju kao duge pukotine. Brojni kanalići prolaze radijalno od kanala do lakune i komuniciraju s objema. Služe za prenošenje hranjivih tvari do koštanih stanica -osteocita i odnošenje razgradnih tvari prema kapilarama. Kompaktna kost sastoji se od velikog broja Haversovih sustava između kojih se nalaze intersticijalne ili osnovne lamele (3).

Na vanjskoj i unutarnjoj strani kompaktne kosti nalaze se cirkumferentne lamele. Njima prolaze Volkmanovi kanali, a kroz njih pak prolaze nutritivne krvne žile, koje ulaze u kost i kroz navedene kanale dolaze do Haversovih kanala. Scharpeyevе niti oblikuju veliki sloj kolagenih niti koje prolaze od periosta u osnovnu cirkumferentnu vanjsku lamelu. One pričvršćuju periost na površini kosti i to posebice na mjestima gdje se hvataju tetive i mišići, na mjestima ulaska velikih krvnih žila u kost, te na mjestima gdje epifiza prelazi u tijelo kosti (3)(Slika 3).



Slika 3. Prikaz presjeka dijafize duge kosti. Preuzeo iz Janqueira LC, Caneiro J, Kalley RO. Osnove histologije, Zagreb: Školska knjiga: 1999, str. 146.

Periost se sastoji od gustog vezivnog tkiva koje sadrži krvne žile. Najdublji sloj periosta tzv. kambium, rahlije je građe i sadrži stanice u obliku pauka (osteogene stanice) te mrežu tankih elastičnih fibrila. Uloga periosta je važna i često se koristi jer se prekursori osteoblasta nalaze u kambijumu, te se periostalna hondrogeneza i cijeljenje prijeloma začinju iz kambijuma (5,6).

Endoost je tanka naslaga staničnog tkiva koja oblaže zidove koštanih šupljina kao i prostor koštane moždine. On je osteogen i istodobno hemopoetičan, a vjerojatno sudjeluje i u tvorbi osteoklasta.

1.2. SASTOJCI KOSTI

Periost je membrana koja pokriva vanjsku površinu kosti i pandan je perihondriju. Sastoji se od dvaju slojeva: fibroznog, vanjskog gustog sloja koji je nepravilno oblikovan i sadrži nešto fibroblasta, te osteogenetskog koji sadrži pluripotentne osteogenetske stanice plosnate građe poput pauka (3).

Osteoblasti nastaju diferencijacijom iz mezenhimnih stanica. Osteoblasti se postavljaju na površinu kosti koja brzo raste. Promjera su 15-20 mikrona i sadrže jednu veliku jezgru i nukleus. Pod svjetlosnim mikroskopom teško je razlikovati jezgru od citoplazme jer se obje bôje jako bazofilno. Osteoblasti se često međusobno povezuju sa svojim citoplazmatskim nastavcima.

Osteociti nastaju iz osteoblasta. Oni sintetiziraju i secerniraju organsku međustaničnu supstanciju kosti koja ih okružuje smještajući se u lakune intercelularne supstancije. Svaki osteocit ima oskudnu citoplazmu, veliku ovalnu jezgru s velikim kromatinskim granulama i jednu ili više jezgrica. Osteoblasti sukcesivno stvaraju nove slojeve na površini kosti, što rezultira rastom, i te stanice postaju osteociti kada se okruže novom intercelularnom supstancijom.

Lakune su ravne ili ovalne šupljine u koje ulaze nastavci stanične citoplazme kroz male otvore, u zidu same lakune, stvarajući kanaliće.

Osteoklasti su velike stanice s većim brojem jezgara. Široki prošireni dijelovi staničnih tijela sadržavaju pet do 50, pa i više jezgara. Jezgre se boje slabo kromatinski.

Citoplazma osteoklasta sadržava brojne slobodne polisome, nešto hrapave endoplazmatske mrežice, mnogo mitohondrija, dobro razvijen Golgijev kompleks i mnogo lizosoma. Osteoklasti izlučuju kiselinu, kolagenazu i druge proteolitičke enzime koji razgrađuju koštani matriks i oslobađaju mineralne sastojke.

Kanalikuli su sitni kanalići koji prožimaju kost, a sadrže osjetljive nastavke osteocita te tkivne tekućine. Kanalikuli koji su blizu površine kosti susjedi su nutritivnim krvnim žilama, primjerice Haversovim kanalima. Kanalikularni mehanizam jest način na koji hrana iz krvnih žila dolazi do osteocita, a stanični produkti odlaze u drugom smjeru.

Međustanična koštana tvar (matriks) sadrži organske tvari, anorganske tvari i vodu. Matriks je organske građe i najvećim dijelom, gotovo 90%, sastoji se od kolagena tipa I, koji se razlikuje od ostalih kolagena. Anorganske soli sastoje se najvećim dijelom od kristala hidroksiapatita. Voda ispunjava prostore u kostima uključujući nutritivne kanale Haversova sustava i ultramikroskopske kanale kolagenih fibrila.

Anorganski dio čini oko 50% suhe težine koštanog matriksa. Najviše ima kalcija i fosfora, a sadržava i bikarbonata, citrata, magnezija, kalija i natrija. Kalcij i fosfor tvore kristale hidroksiapatita, ali ima i dosta amorfnog kalcij-fosfata.

Organski dio čini kolagen tip I i amorfna osnovna tvar, koja sadržava glikozaminoglikane udružene s proteinima. Kolagen je temeljna izvanstanična bjelančevina. Više od polovice sveukupnog kolagena u organizmu nalazi se u kostima. Drugi organski sastojci su manje količine proteinskih polisaharida i lipida, posebno fosfolipida.

Fosfor u kosti sastoji se od labilne frakcije koja čini ravnotežu s fosfatnim ionima u krvi i stabilne frakcije koja je fiksirana u koštanom matriksu.

Dnevna količina potrebna čovjeku iznosi 0,88 grama, nešto je veća u dječjoj dobi te kod trudnica. Glavni je izvor fosfora mlijeko, a manji su izvori meso, sir i jaja. Fosfor postoji u hrani kako u organskom tako i u anorganskom obliku.

Koštano tkivo sadržava 99% sveukupne količine kalcija u tijelu i služi kao zaliha organizma. Koncentracije kalcija u krvi i tkivima je postojana. Kalcij se neprestano izmjenjuje između krvi i koštanog tkiva te je prijeko potreban za život. U tijelu se nalazi oko jedan kg kalcija, samo oko jedan gram nalazi se u plazmi. Ostali se dio nalazi u koštanom sustavu, i to u obliku fosfata, karbonata i hidroksida. Normalna dnevna potreba za čovjeka težine 70 kg iznosi 0,65 grama, a jedan je gram dnevno potreban djeci i trudnicama. Jedino su mlijeko i mliječni proizvodi sigurni izvori kalcija (3,7).

1.3. CIJELJENJE KOSTI

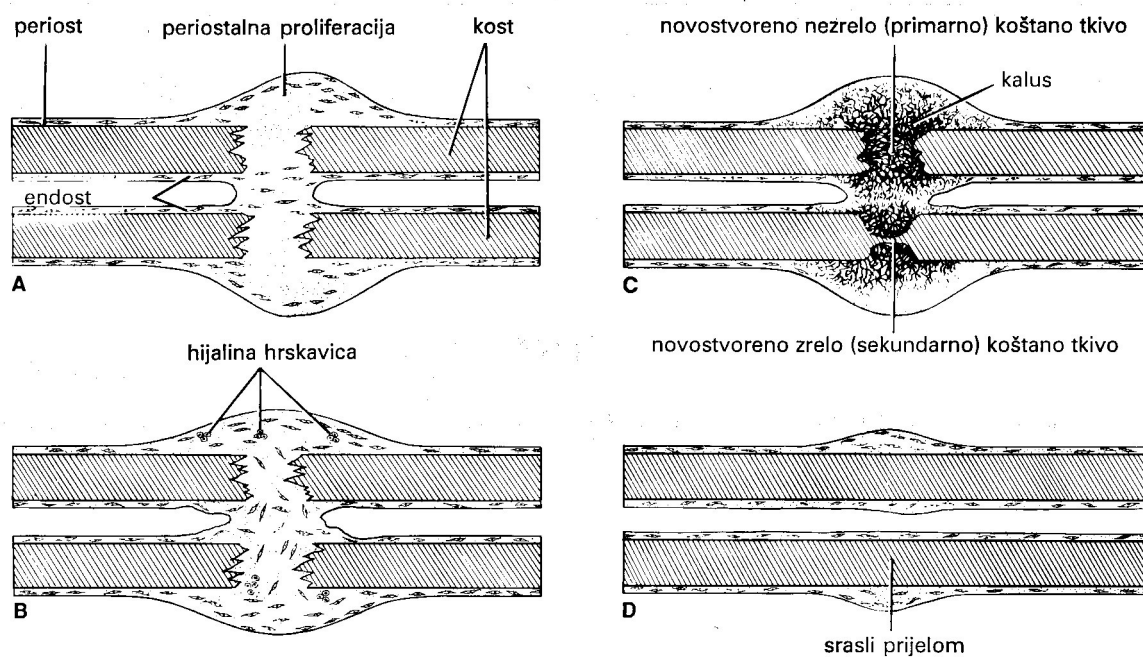
Prekid kontinuiteta kosti, neovisno je li uzrokovan traumom ili kirurškim zahvatom, uzrokuje određeni histološki proces s ciljem sanacije defekta.

Kada dođe do prekida kosti kod dvaju ili više ulomaka, nastaje prekid periosta i krvarenje u prijelomnoj pukotini te izvan nje. Prekinute se krvne žile začepi hemostatskim mehanizmom, a krv i dalje protječe kroz one krvne žile koje nisu prekinute. Budući da krvne žile Haversovim kanalima uglavnom prolaze longitudinalno kroz kost, s obje strane prijeloma tj. prijelomne pukotine, stoga na onim mjestima gdje dolazi do hemostaze u krvnim žilama i između tih mjesta, sa svake strane prijelomne pukotine, nastaje nekroza tkiva. Također i periost i koštana moždina, uz samu prijelomnu pukotinu, postaju nekrotični. Veličina te vaskularne nekroze je različita i ovisi o mjestu prijeloma. Krv i plazma infiltriraju se u okolno mišićje i ono za nekoliko sati postaje edematozno (8).

Novo tkivo - kalus nastaje oko i između ulomaka, oblikujući most preko kojeg su ulomci prvobitno spojeni. Kalus koji se razvija izvan rubova koštanih ulomaka naziva se vanjski kalus, a onaj unutar koštane pukotine naziva se unutarnji kalus.

Dva dana nakon prijeloma u dubokom sloju periosta proliferiraju osteogene stanice stvarajući fibrozni sloj periosta. Istovremeno osteogene stanice proliferiraju i u koštano moždinu, ali nešto sporije.

Stanice dubokog sloja periosta proliferiraju tako brzo da nakon nekoliko dana stvaraju jasnu ovojniciu oko svakog ulomka u blizini prijelomne pukotine. Među njima simultano dolazi do proliferacije kapilara. Sljedeće se diferenciraju osteogene stanice. Stanice smještene duboko pokraj ovojnice nalaze se u dobro vaskulariziranom području. Pomoću odgovarajuće opskrbe krvlju, one postaju osteoblasti i tvore koštano tkivo (koštani matriks). Osteogene stanice koje se nalaze u ovojnici daleko od kosti proliferiraju tako brzo da se udaljuju od kapilara, koje nastaju sporije. Kako nemaju odgovarajuću vaskularizaciju, diferenciraju se u hondroblaste. Količina hrskavice najvećim dijelom ovisi o brzini kojom se oblikuju ovojnice. Potpuno razvijene stanice formiraju tri sloja: duboki sloj, u kojemu od koštanih trabekula nastaje kost, intermedijalni sloj - hrskavični, spaja se neprimjetno s vanjskim dijelovima novooblikovanih koštanih trabekula te vanjski sloj, koji se sastoji od proliferirajućih stanica dubokog sloja periosta. Ovojnice obaju koštanih ulomaka postaju deblje, rastu jedna prema drugoj i na kraju se fuzioniraju, pa trabekule, hrskavica i proliferirajuće stanice oblikuju most (3, 9,10). Na taj je način postignuto primarno spajanje. Istodobno spajanje dviju koštanih moždina nastaje razvojem trabekula (Slika 4).



Slika 4.

Prikaz sanacije koštanog prijeloma putem periostalnog i endostalnog stvaranja kalusa
 Preuzeto iz Janqueira LC, Caneiro J, Kalley RO, Osnove histologije, Zagreb: Školska knjiga; 1999, str. 156.

Hrskavični dio kalusa nije trajan i konačno biva zamijenjen s kosti, koja nastaje uglavnom u procesu endohondralne osifikacije. Hrskavične stanice najbliže novooblikovanoj kosti dozrijevaju, i to na taj način da se matriks kalcificira, a hondrociti odumiru. Izvorna se hrskavica progresivno smanjuje i konačno biva potpuno zamijenjena s kosti. Na kraju, s razvojem kosti mogu se katkad vidjeti maleni ostaci kalcificirane hrskavice između trabekula.

Novoformirane trabekule postaju čvrsta kost. Između trabekula koje nastaju od osteoblasta, osteoklasti pomalo pomiču nekrotičnu kost i stvaraju šupljine. Osteoblasti potpuno ispunjavaju ove šupljine i pretvaraju ih u živu kost. Na taj se način gotovo cijeli matriks mrtve kosti zamjenjuje s novom živom kosti.

U međuvremenu je unutarnji kalus premostio ulomke i stvorio trabekule koje prolaze od rubova koštane moždine kao i od osteogenih stanica same koštane moždine.

Na kraju dio unutarnjeg kalusa, koji potječe od osteogenih stanica vanjske površine ulomka, urasta u prijelomnu pukotinu te se dodaje spongioznoj kosti koja spaja koštane krajeve. S vremenom se spongiozna kost preoblikuje i pretvori u čvrstu, kompaktnu kost.

Kada se prijelomi liječe otvorenom repozicijom i kada su frakturalni ulomci čvrsto spojeni nekim od osteosintetskih materijala, ne stvara se ili se stvara vrlo malo vanjskog kalusa. Cijeljenje kosti pri tome najvećim dijelom ovisi o formiranju unutarnjeg kalusa.

S obje strane prijelomne pukotine, i to na mjestima gdje se unutar Haversovih kanala nalaze žive osteogene stanice i kapilare, dolazi do njihove proliferacije.

Osteogene stanice diferenciraju se u osteoklaste koji proširuju Haversove kanale, a s druge strane diferenciraju u osteoblaste koji se polažu na zidove proširenih kanala i u serijama stvaraju koncentrične lamele. Ovaj postupak raste prema frakturalnoj pukotini gdje novooblikovani osteoni prelaze preko pukotine u suprotni fragment. Postupak je sličan onome koji se zbiva u redovitoj pregradnji kosti u kojoj se obnavlja koštano tkivo. Prije no što novi osteoni prijeđu frakturalnu pukotinu, prostor između koštanih ulomaka mora biti spojen s nezrelom kosti koja se razvija kao unutarnji kalus od endoosta i koštane moždine. Ovaj tip spajanja nije pouzdana čvrstoća, sve dok se ne preoblikuju novi Haversovi sustavi koji prelaze s jedne na drugu stranu i zamjenjuju nezrelu kost (11,12).

Čini se da tkivna regeneracija, cijeljenje rane i osteogeneza, nije samo rezultat lokalnih (tkivnih) čimbenika, već različitih humoralnih čimbenika proizvedenih u raznim organima (13,14). Povećana osteogeneza kod pacijenata s višestrukim ozljedama glave jedan je od rijetkih primjera praćenih s hipertrofičnim kalusom i heterotrofičnom osifikacijom (15,16,17). Ta se pojava objašnjava činjenicom da je osteogeneza složen proces i rezultat brojnih čimbenika kako lokalnih tako i sustavnih (18).

Danas još uvijek ne postoji pouzdan način prognoze vremenski produljenog koštanog cijeljenja prijeloma dugih kostiju. Rana individualna prognoza pomogla bi u prevenciji komplikacija (pseudartroza) i omogućila bi fizijatru modifikaciju terapije. Pod pojmom pseudartroza, prema Weberu i Cechu smatramo one prijelome kod kojih se koštana sanacija neće ostvariti ukoliko ne primjenimo dodatna terapijska sredstva. Uzroke nastanka pseudartroza dijelimo na mehaničke i biološke. Mehanički uzroci nastanka pseudartroza mogu nastati kako kod konzervativnog, tako i kod operacijskog načina liječenja prijeloma. Kod konzervativnog načina liječenja prijeloma najčešći uzroci nastanka pseudartroza su: distrakcija ulomaka, interpozicija mekih česti u frakturnu pukotinu, djelovanje sila smika i defekti koštane mase. Kod operacijskog načina liječenja prijeloma najčešći uzroci nastanka pseudartroza su: nepotpuna repozicija koštanih ulomaka, nepotpuni stabilitet koštanih ulomaka, kao i zaostatak koštanog defekta nakon izvršene osteosinteze (19).

Pod biološke uzroke nastanka pseudartroze ubrajamo: nekrozu koštanih ulomaka nastalu zbog traumatskog oštećenja krvne irigacije ulomaka, kao i infekcije u predjelu prijeloma koje oštećujući cirkulaciju krvi, dovode do odumiranja vitaliteta tkiva (19). Pretrage biokemijskih koštanih pokazatelja mogle bi dati ranije informacije od radioloških. U tu svrhu najčešći markeri koji su se istraživali bili su osteokalcin i koštana alkalna fosfataza (građivni koštani markeri). Osim navedenih, rana serološka ispitivanja uključila su i ispitivanje kolagena I –karboksi-terminalnog propeptida (PICP), kolagena III – amino-terminalnog propeptida (PIIINP) i kolagena I – karboksi-terminalnog telopeptida (ICTP), koji izravno ukazuju na aktivnosti osteoblasta (18). Rezultati su neujednačeni, što bi se moglo objasniti korištenjem različitih metoda za određivanje markera, različitim studijskim modelima (konzervativno liječene i operacijsko liječene frakture; normalne i zakašnjele frakture, frakture dugih ili ostalih kostiju), različitim periodima promatranja, isključenjem individualnih razlika i sl. (20-29).

Uz fiziološke mehanizme cijeljenja kosti danas postoje mnoga istraživanja kojima se želi na razne načine inducirati ubrzano cijeljenje kosti (30-35). Istraživanja primjene koštanih morfogenetskih proteina dala su obećavajuće rezultate (36).

Najbolje rezultate kod koštane pregradnje u humanoj medicini pokazale su molekule koštanog morfogenog proteina 2 (BMP-2) i koštanog morfogenog proteina 7 (OP-1) i to zbog komplementarnog djelovanja na angio- i osteogenezu (37,38).

Ovisno o stupnju mirovanja koštanih ulomaka, kost će cijeljeti primarno ili sekundarno, ili uopće neće zacijeliti.

1.3.1. PRIMARNO CIJELJENJE KOSTI

Primarno koštano cijeljenje prisutno je kod anatomske pozicije ulomaka u uvjetima apsolutnog mirovanja nakon rigidne fiksacije. Ovisno o tome jesu li koštani ulomci u kontaktu ili među njima postoji pukotina, primarno koštano cijeljenje može biti kontaktno ili pukotinasto. Kontaktno primarno cijeljenje kosti sastoji se od izravnog urastanja osteona iz jednog koštanog ulomka u drugi.

Uvjet za normalno koštano cijeljenje je uzajamno djelovanje osteoblasta i osteoklasta. Osteoklasti, koji se nalaze na vrhu osteona, otapaju koštano tkivo i stvaraju kanal u koji urasta krvna kapilara.

Iz okolnog pluripotentnog vezivnog tkiva i periosta diferenciraju se osteoblasti koji stvaraju osteoid u koji se odlažu mineralne soli i tako se stvara lamelarna kost. Takvo se zaraštavanje kosti zove Haversova pregradnja.

Pukotinasto primarno koštano cijeljenje moguće je samo u uvjetima apsolutnog mirovanja koštanih ulomaka. Pukotina se ispunjava koštanim tkivom, a zatim pregrađuje po principu Haversove pregradnje. Zbog toga se teži anatomskej repoziciji ulomaka, kako bi među njima bilo što manje pukotina, a što više zona kontakta.

Iako je prema nekim autorima cilj liječenja prijeloma primarno koštano cijeljenje, ono ima i negativnih obilježja u odnosu na cijeljenje kalusom, jer je vrlo sporo i ne progradira u anaerobnim uvjetima, za razliku od cijeljenja posredovanjem kalusa (39,40).

1.3.2. SEKUNDARNO CIJELJENJE KOSTI

Sekundarno cijeljenje kosti je cijeljenje posredovano kalusom. To je prirodan način cijeljenja kosti. Osnovna karakteristika je da ulomci nisu u stanju mirovanja, već su međusobno pomični. Ako je pomičnost minimalna, pojačanim stvaranjem kalusa ulomci se stabiliziraju pa dolazi do koštane pregradnje kroz mjesto prijeloma, na kraju čega dolazi do resorpcije periostalnog kalusa. Ako je nestabilnost veća i ako takvo stanje potraje, izgledi za koštano srašćavanje su minimalni, a na mjestu prijeloma nastaje pseudartroza. Sekundarno cijeljenje prema Cruessu i Dumnontu se odvija u tri faze: inflamatorna faza, reparatorna faza i remodelirajuća faza (41).

Inflamatorna faza je karakterizirana mehaničkim i posebice vaskularnim oštećenjem tkiva praćenim nekrozom tkiva u području prijeloma. Tako na mjestu prijeloma nastane obilje nekrotičnog materijala koji potiče upalnu reakciju. Inflamatorna reakcija je najintenzivnija u prvih 24 h, a gotovo potpuno nestaje tjedan dana nakon prijeloma.

Reparatorna faza započinje nekoliko dana nakon prijeloma i traje nekoliko mjeseci. Tu fazu obilježava stvaranje kalusa. Stvaranje kalusa karakterizira relativna neovisnost o mehaničkim čimbenicima i vremenska ograničenost.

Ako primarni kalus ne uspije ujediniti dvije strane prijeloma unutar nekoliko tjedana, on prestane rasti i resorbira se. Ako uspješno poveže ulomke, proces cijeljenja napreduje do stvaranja čvrstog kalusa i njegove pregradnje.

Remodelirajuću fazu karakterizira potpuna modifikacija područja zacjeljenja prijeloma pod utjecajem mehaničkog opterećenja dok ne dosegne optimalan oblik, sličan onome prije prijeloma (41).

Prijelom kosti izolirani je mehanički događaj. Biološki odgovor na taj podražaj je resorpcija dotad vitalne kosti i cijeljenje prijeloma kalusom ili bez njega. Oba slučaja ovise o krvnoj opskrbi i stupnju mirovanja ulomaka. Svi postupci u liječenju prijeloma, s ciljem poštede krvne opskrbe ulomka, zovu se biološki.

Postoji mnogo čimbenika koji oštećuju krvnu opskrbu kosti: pomak ulomaka u trenutku prijeloma kojim nastaje početno vaskularno oštećenje, a nastavlja se pomakom ulomaka prilikom transporta; svaki kirurški pristup mjestu prijeloma kao i postavljanje implantata također ga pogoršava, ne samo dizanjem i uništavanjem periosta tijekom anatomske repozicije, već i direktnim tlačenjem periosta na površini (42-44).

1.4. ALKALNA FOSFATAZA

Alkalna fosfataza je skupina enzima s optimalnom aktivnosti u alkalnom području kod $\text{pH} = 9,8 - 10,5$. Nekad se smatralo da je alkalna fosfataza jedan enzim koji se pojavljuje u obliku raznih izoenzima. Danas se smatra da postoje razni enzimi kao što su jetrena, koštana, crijevna, bubrežna i placentarna alkalna fosfataza, iako se u literaturi i dalje navode kao izoenzimi. Ovi grupno-specifični enzimi kataliziraju hidrolizu između fosforne kiseline i alkohola. Osim što djeluju hidrolitički, fosfataze djeluju u prisutnosti akceptora i transfosforilirajuće. Smješteni su na membrani stanice. U kosti je ovaj enzim koncentriran na glavnim mjestima osifikacije, kao što su apofizalne linije i subperiostalno područje. Aktivnost alkalne fosfataze u krvi rezultat je dinamičkog ekvilibrija kvocijenta između količine koja se sintetizira i one koja se izlučuje, razgrađuje ili veže za tkiva. Promjenu aktivnosti alkalne fosfataze u serumu mogu uzrokovati različiti faktori. Ti faktori mogu biti fiziološki (rast, trudnoća, starost) i patofiziološki.

Patofiziološki faktori su:

1. hiperprodukcija iz jednog organa ili tkiva
2. djelomična ili potpuna stenoza puteva kojima kruži alkalna fosfataza
3. produkcija ili otpuštanje enzima iz neoplastičnog tkiva
4. oštećenje ili povećana permeabilnost stanične membrane
5. post-kirurška stanja i cijeljenje kosti poslije prijeloma.

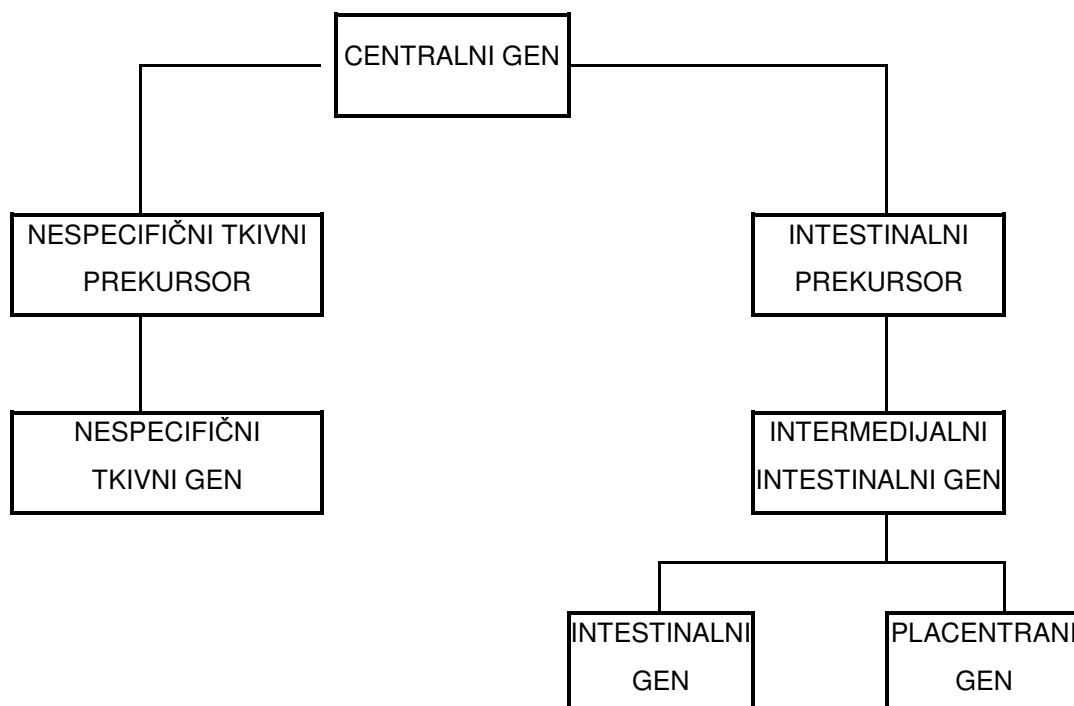
Prilikom destrukcije kosti nastaje kompenzatorna stimulacija osteoblasta zbog stvaranja nove kosti. Istodobno se povećava intracelularni sadržaj i razina alkalne fosfataze u krvi (45-48).

Eksperimentalni radovi pokazali su da je oblikovanje alkalne fosfataze usko vezano s mladim fibroblastima koji se deponiraju u fibrokolageni sustav matriksa kosti.

Posebnim postupcima bojenja došlo se do spoznaje da fibroblasti u vanjskim slojevima periosta imaju zanemarive količine ovog enzima, za razliku od fibroblasta u kambijjskom sloju koji se diferenciraju u osteoblaste i koji sadrže velike količine alkalne fosfataze.

Izoenzim alkalne fosfataze može se klasificirati s obzirom na pet različitih kriterija:

1. Danas se smatra da postoje tri gena koji su se razvili iz jednog originalnog gena. (Slika 5)
2. Alkalna fosfataza građena je od pojedinaca monomera, koji se međusobno vežu u dimere, tetramere ili čak agregate. Svaki monomer veže za sebe jedan atom cinka. Bez atoma cinka monomer je inaktivan.
3. Osobine molekula, sastav različitih peptidnih podjedinica, osobine iskazane pri elektroforezi, imunološkim reakcijama, termostabilnosti, reakciji s različitim supstratima, značajke su pomoću kojih možemo identificirati različite molekularne oblike izoenzima alkalne fosfataze.



Slika 5.

Proces diferencijacije centralnog gena tijekom evolucije

4. Izoenzimi alkalne fosfataze mogu se dijeljenjem po primarnoj strukturi peptidnih podjedinica podijeliti u četiri razreda:

- a) nespecifični tkivni (kost, bubreg, jetra)
- b) intestinalni
- c) placentarni
- d) fetalni

5. U svakoj od ovih klasa nalaze se varijante koje se očituju ponajprije pokazujući razliku u primarnoj strukturi (nije određena genetski), a mogu biti:

- mutacija dijela aminokiseline
- postradijacijska modifikacija lateralnog lanca polipeptida
- genetska deformacija nastala u trenutku izgradnje enzima
- povezanost s jednim od proteina ili lipida membrane

Kliničko značenje alkalne fosfataze značajno je u trudnoći, dječjoj dobi, patologiji kosti, hepatopatiji, onkologiji i internoj medicini. Osobito je velika dijagnostička vrijednost određivanja vrijednosti alkalne fosfataze u koštanim bolestima i bolestima jetre, te žučnih vodova (45).

1.5. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

Kost nije samo podupirač tijela i hvatište za mišiće, već je složeni sustav koji se mijenja tijekom cijelog života i čiji je metabolizam strogo određen. Postoji čitav niz čimbenika koji sudjeluju u regulaciji mehanizama koštanog cijeljenja. Posljednjih dvadesetak godina posebnu pozornost istraživača zaokuplja istraživanje lokalnih regulatora mehanizama koštanog cijeljenja (49). Najveći dio tih regulatora pripada skupini čimbenika rasta, malih peptida koji nadziru diobu, sazrijevanje i rast stanica. Prema Wolffovu postulatu promjene u lokalnom mehaničkom opterećenju određuju parametre oblikovanja koštanog tkiva. Kost je heterogeno tkivo, sastavljeno od različitih vrsta stanica uloženi u izvanstanični matriks, dok lokalni čimbenici koji na njega utječu mogu imati različito podrijetlo (50).

Iz literature je poznato da ostoblasti proizvode mnoge lokalne čimbenike (51-53). S druge strane, koštani matriks može ugraditi različite sustavne čimbenike koji krv dovode u izvanstanični prostor. Lokalni koštani čimbenici mogu se prema podrijetlu podijeliti u tri skupine: čimbenici koji proizvode samo koštane hrskavične stanice, čimbenici rasta iz koštanog matriksa i čimbenici rasta iz okolnih tkiva (54).

Već je niz godina poznato da enzim alkalna fosfataza sudjeluje u biološkim procesima okoštavanja. Silbermann i suradnici (55) u svojim istraživanjima su utvrdili da alkalna fosfataza u procesima okoštavanja sudjeluje samo jednim svojim izoenzimom i to tzv. koštanom tipom alkalne fosfataze. Isto zaključuju i Sarmiento i suradnici (56) u svojim istraživanjima.

Ispitivanjima aktivnosti alkalne fosfataze kod bolesnika s koštanim oboljenjima, bilo da se radi o stvaranju ili razaranju matriksa kosti, aktivnost ukupne alkalne fosfataze raste, a elektroforezom izoenzima ili temperaturnom inaktivacijom može se dokazati da se najveći dio toga porasta odnosi na koštani izoenzim (57).

Ekperimentalnim studijama (57,58) dokazano je da je razina koštanog izoenzima alkalne fosfataze u stanicama osteoblasta i kosti proporcionalna koštanoj formaciji. Kliničkim studijama (59,60) također je dokazano da količina koštanog izoenzima alkalne fosfataze u serumu može odrediti indeks koštane formacije. U suvremenim istraživanjima na području cijeljenja prijeloma u ljudi istraživanja sastojaka krvi imaju najznačajnije mjesto. Za to postoji nekoliko razloga.

Ta su istraživanja jednostavnija, konkretnija, te daju dinamičnu sliku zbijanja koju nije moguće dati klasičnim metodama kao što su biopsija i histološke metode (61,62).

Koštani izoenzim alkalne fosfataze javlja se u membrani osteoblasta te mu se pripisuje uloga fosfatne transferaze, ali stvarna uloga djelovanja koštanog izoenzima još uvijek je nedostavno poznata (63,64). Razni autori dokazali su da, neovisno o načinu liječenja, bilo ono konzervativno ili operacijski, kompresijskom osteosintezom, dolazi do porasta vrijednosti alkalne fosfataze s maksimumom 21. dana nakon ozljede (65-67).

Statističkom obradom i metodom korelacije dokazana je znakovita povezanost u promjenama vrijednosti koštanog izoenzima u odnosu na promjene vrijednosti ukupne alkalne fosfataze, na razini od 1,1% već sedmog dana nakon ozljede (65). Bolesnici liječeni konzervativnom metodom imali su nakon ozljede najveći porast aktivnosti alkalne fosfataze, dok su najmanji porast imali bolesnici liječeni stabilnom osteosintezom. Iz navedenog može se pretpostaviti da aktivnost alkalne fosfataze ovisi o stabilnosti koštanih ulomaka nakon prijeloma kosti. To potvrđuju i druga istraživanja koja dokazuju da nestabilna osteosinteza daje veću pokretljivost koštanih ulomaka u odnosu na stabilnu osteosintezu (68-70), dok konzervativni način liječenja daje najveću pokretljivost koštanih ulomaka (71). Proučavajući porast koštanog izoenzima obzirom na vrste trauma, Laurer i suradnici (72) zaključuju da inicijalni porast koštanog izoenzima nije samo posljedica odgovora kosti na traumu, već i ukupnog stresa vezanog za ranjavanje i operaciju. Tek se kasniji porast koštanog izoenzima povezuje s lokalizacijom frakture i raste paralelno s primijenjenom osteosintezom.

Neki pacijenti pokazuju stvaranje izrazito velike količine kalusa, praćenog izrazitim porastom aktivnosti kako ukupne alkalne fosfataze, tako i njezinog koštanog izoenzima. Ovako povećane vrijednosti, se izrazito naglašene javljaju isključivo kod bolesnika s frakturom dugih cjevastih kostiju u kombinaciji s traumatskim ozljedama mozga (73-75).

I kod tih bolesnika aktivnost koštanog izoenzima alkalne fosfataze povećava se od prvog do 21. dana nakon ozljeđivanja kontinuirano, adekvatno porastu u bolesnika bez traumatskih ozljeda mozga (65,76).

Nastupajuću heterotropnu osifikaciju ne može spriječiti ni liječenje kortikosteroidima (77,78). Istraživanja Bowlesa i suradnika (79) ne pokazuju kontinuirani rast kako ukupne alkalne fosfataze, tako ni koštanog izoenzima između prvog dana i desetog tjedna ozljeđivanja. Njihovi rezultati mjerenja alkalne fosfataze (ukupne i koštanog izoenzima) provedeni dvjema različitim metodama daju iste rezultate za obje metode. U njihovim mjerenjima aktivnost ukupne alkalne fosfataze i koštanog izoenzima značajno opada do četvrtog dana nakon ozljeđivanja, osmog dana vraća se na vrijednosti prvog, da bi nakon toga kontinuirano rasle sve do desetog tjedna.

Bowles i suradnici (80) su u svojim sljedećim istraživanjima provedenim na tibijalnim frakturama također našli pad koštanog izoenzima prvi tjedan nakon ozljeđivanja, da bi drugi tjedan njegova aktivnost počela rasti. No, za razliku od rezultata iz prethodnog istraživanja, aktivnosti ukupne alkalne fosfataze nisu padale, već su rasle već od prvog dana. Ti rezultati razlikuju se od rezultata Leunga i suradnika (2) koji, mjereći koštani izoenzim alkalne fosfataze na 49 odraslih pacijenata s frakturom dugih kosti, nisu našli inicijalni pad vrijednosti. Ni Oni i suradnici (81), istražujući ukupnu alkalnu fosfatazu na tibijalnim frakturama nisu našli početni pad vrijednosti, ali je početni porast alkalne fosfataze bio nezamjetljiv.

Eriksen i suradnici (82) su histomorfometrijskim istraživanjima koštane resorpcije dokazali korelaciju s razinom kolagena I karboksi-terminalnog telopeptida (ICTP) u serumu, dok je Cattermole (83) denzitometrijskim testovima dokazao izraženu redukciju koštanih minerala u frakturiranim kostima.

Kurdy i suradnici (61), u svojim istraživanjima željeli su odrediti prati li loše cijeljenje tibijalne frakture serološki odgovor koštanog izoenzima alkalne fosfataze, kolagena I karboksi-terminalnog propeptida (PICP), kolagena III amino-terminalnog propeptida (PIIINP) i kolagena I karboksi-terminalnog telopeptida (ICTP) u odnosu na vrijednosti kod normalno zaraštavajućih fraktura. Zaključeno je sljedeće: Produkcija kolagena I i III u prvih deset tjedana bila je adekvatna, sa značajnim povećanjem produkcije tipa III. Nije bilo serološki vidljivog deficitarnog odgovora osteoblasta inidiciranog normalnim razinama koštanog izoenzima alkalne fosfataze i ICTP u ranom periodu. Deficitaran odgovor osteoblasta uočen je tek dvadeseti tjedan nakon ozljeđivanja.

Jingushi i suradnici (84) pronašli su porast prokolagena I i alkalne fosfataze između kraja drugog i četvrtog tjedna nakon frakture dugih kosti. Isti rezultati potvrđeni su istraživanjima Joerringa i suradnika (85).

Rana prisutnost kolagena III u frakturnom kalusu objašnjava se kao normalna reakcija inicijalne mezenhimske proliferacije (86,87).

Aktivnost koštanog izoenzima alkalne fosfataze proporcionalna je veličini kalusa. To je zaključak raznih istraživanja in vitro (88-90), kao i in vivo (91-93,1), ali količina samog koštanog izoenzima nije mjerena. Opisane su razne metode mjerenja prisutnosti koštanog izoenzima u serumu (26,94), no sama aktivnost tog enzima za vrijeme cijeljenja rijetko je istraživana (2,95,96).

Dibba i suradnici (97) istraživali su razlike u kemijskom sastavu kosti različitih regija uključujući koštani izoenzim s obzirom na etničku pripadnost. Istraživanja obavljena na različitim afričkim etničkim skupinama (Kaukaziani i Gambiani) pokazala su različite vrijednosti koštanog izoenzima, ali te vrijednosti nisu bile značajne.

Vrijednosti izlučenih fosfata i kalija bile su značajno različite kod pripadnika različitih etničkih skupina što bi moglo imati i različite posljedice vezane za frakture dugih kostiju (54).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Analiza aktivnosti alkalne fosfataze (AP) je standardna laboratorijska pretraga. Interpretacija i vrijednost te pretrage kod bolesnika s prijelomima kostiju do sada nije u potpunosti istražena, posebice odnos aktivnosti koštanog izoenzima alkalne fosfataze na prognozu tijeka i brzine koštanog cijeljenja. Istraživanja na tom području pokazala su povezanost aktivnosti alkalne fosfataze (AP) s veličinom prijelomne pukotine, te obujmom subperiostalnog kalusa (65). Dokazana povećana aktivnost alkalne fosfataze prilikom sanacije koštanog prijeloma i povećanje aktivnosti koštanog izoenzima alkalne fosfataze ukazala je na potrebu istraživanja i razjašnjavanja kliničkog značenja promjena ovih pretraga u procjeni, praćenju i prognozi ishoda cijeljenja prijeloma kosti. Hipoteza istraživanja je utvrditi povezanost aktivnosti koštanog izoenzima alkalne fosfataze s tijekom i ishodom cijeljenja prijeloma dugih kostiju kod bolesnika liječenih operacijskom metodom. Standardni klinički postupci utvrđivanja koštanog cijeljenja vrjednuju subjektivni stav bolesnika, znanje i iskustvo odgovornog liječnika te radiološki nalaz. Kako je stav bolesnika podložan subjektivnom vrjednovanju boli kod opterećenja ili mirovanja, njegova vrijednost nije sigurna. Radiološko praćenje također značajno ovisi o iskustvu i subjektivnom stavu radiologa, a praćenje je dugotrajno. Mjerenje aktivnosti koštanog izoenzima u ranoj posttraumatskoj fazi može ukazati vrlo rano na prognozu stabilnosti izvršene osteosinteze, odnosno na brzinu koštanog cijeljenja. Cilj ovog istraživanja je ustanoviti kliničko značenje mjerenja koštanog izoenzima alkalne fosfataze u procjeni tijeka operacijski liječenog prijeloma uz standardne elemente procjene u okviru primjene načela dobre kliničke prakse (klinički nalaz i RTG). Rezultati praćenja promjena vrijednosti koštanog izoenzima omogućit će dodatno poznavanje metaboličkih procesa cijeljenja kosti bolesnika i mogućoj primjeni mjerenja aktivnosti ukupne i koštane alkalne fosfataze u praćenju i prognozi cijeljenja kosti.

3. METODE I ISPITANICI

3.1. KLINIČKI UZORAK

Aktivnost koštanog izoenzima AP određivana je u serumu 41 bolesnika s prijelomom dugih kostiju, hospitaliziranih u našoj klinici, liječenih operacijski, koji su nakon liječenja kirurški sanirani. Dvadeset šest (63,4%) bolesnika bilo je muškog spola, a petnaest (36,6%) ženskog spola. Muškarci su bili prosječno stari 37,3 godina, a žene su bile prosječno stare 47,9 godina. Trideset i troje (80,4%) bolesnika imalo je prijelom potkoljenice, sedam (17,1%) prijelom femura, a samo jedan (2,4%) prijelom humerusa. Najčešći uzroci nastanka prijeloma su pad na ravnoj podlozi, pad s visine te prijelom nastao kao posljedica prometne nezgode. U naše ispitivanje uzeti su u obzir samo oni bolesnici koji su imali izolirani prijelom femura, potkoljenice i u jednom slučaju nadlaktice. U ispitivanje nisu uzeti bolesnici koji bi uz gore navedene imali i neku drugu pridruženu ozljedu. U ispitivanje su uzeti u obzir samo oni bolesnici koji su bili potpuno zdravi, kako anamnestički, tako i na osnovu laboratorijskih pokazatelja te nisu bolovali od kroničnih oboljenja, a nisu do trenutka nezgode uzimali neki od lijekova koji utječu na stvaranje i izgradnju koštanog tkiva. Svi ispitanici podvrgnuti su operacijskom zbrinjavanju prijeloma. Svi bolesnici s izoliranim prijelomom jedne od navedenih lokacija su prije izvedenog operacijskog zahvata informirani o svrhi istaživanja te su s istim bili suglasni. Uz uzimanje anamnestičkih podataka, u ispitanika su učinjene standardne biokemijske pretrage koje su dio preoperativne pripreme (KKS, ukupni bilirubin, AST, ALT, GGT, SE i pretraga urina), a koje su bile u referentom rasponu. Svim bolesnicima su laboratorijske pretrage učinjene neposredno nakon traume, prilikom primitka u kliniku, a kontrolne pretrage su rađene kod svih bolesnika prema protokolu ujutro, natašte, kao što je to i uobičajeno u kliničkoj praksi. Želimo naglasiti da su u ovim znanstvenim istraživanjima korišteni laboratorijski hematološki nalazi, kao i rendgenske slike isključivo rađene kao dio redovne kliničke procedure tijekom boravka pacijenata u klinici i u okviru rutinskih pretraga tijekom kontrola nakon otpusta s klinike. Svi pacijenti kirurški su bili zbrinuti. Aktivnost koštanog izoenzima određivana je u serumu bolesnika svakih sedam dana tijekom četiriju tjedana.

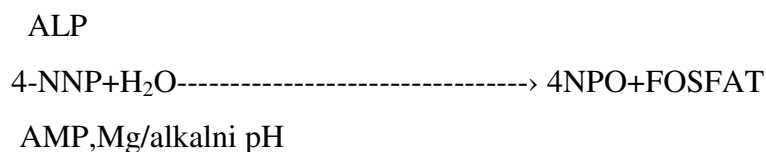
Mjerenja alkalne fosfataze iz kojih je izračunavan koštani izoenzim su obavljena na protočnom spektralnom fotometru OPTON PM2DL, debljine kivete 1cm, kod valne duljine 405 nm i pri temperaturi od 37°. Isti bolesnici praćeni su i radiološki periodičnim kontrolama tijekom više mjeseci.

3.2. LABORATORIJSKE METODE MJERENJA

Laboratorijska obrada uzoraka sastoji se od dviju različitih metoda: metode određivanja alkalne fosfataze i metode određivanja aktivnosti izoenzima koštane alkalne fosfataze (98).

3.2.1. ODREĐIVANJE ALKALNE FOSFATAZE

Analitički uzorak za određivanje aktivnosti alkalne fosfataze je serum koji se dobije centrifugiranjem uzorka krvi bez antikoagulansa na 3500 okretaja kroz 10 minuta. Analiza aktivnosti alkalne fosfataze vrši se odmah nakon odvajanja ili, ako je uzorak na sobnoj temperaturi, najkasnije 4 sata nakon vađenja krvi. Za određivanje alkalne fosfataze korištena je metoda Da Foncesca-Wolheim (99) prema preporukama Međunarodnog udruženja kliničke kemije (IFCC-a). Kao supstrat koristi se 4-nitrofenilfosfat (4-NNP), a kao akcelerator fosfata djeluje aminomentilpropanol (AMP). Pod optimiziranim uvjetima alkalna fosfataza (ALP) prisutna u uzorku katalizira sljedeću transforilacijsku reakciju:



Intenzitet stvorenog žutog obojenja 4-nitrofenoksida (4-NPO) mjeri se na 405 nm, a proporcionalan je katalitičkoj aktivnosti alkalne fosfataze (ALP) u uzorku. Referentne vrijednosti za odrasle su: N=47, X=67+/-20 U/L(47-87).

3.2.2. ODREĐIVANJE KOŠTANOG IZOENZIMA

Nakon što je određena ukupna aktivnost ALP u serumu, slijedi određivanje aktivnosti izoenzima koštane ALP. Aktivnost izoenzima određena je prema metodi koju je opisao S.B.Rosalki i A.Y.Foo 1984. godine (26). Upotrijebljen je Boehringerov test koji sadrži lektin iz pšeničnih klica (2g/L lektina u 5 mmol/L acetatnog pufera pH 4,5).

Prvo se s precipitirajućim reagensom istaloži koštana alkalna fosfataza. Nakon 30 minutne inkubacije na sobnoj temperaturi uzorak se centrifugira šest minuta na 4000 okretaja. U supernatantu prethodno opisanom IFCC metodom, odredi se preostala aktivnost ALP-a. Računskim putem na temelju razlike ukupne aktivnosti ALP-a i preostale aktivnosti ALP-a u supernatantu dobije se aktivnost izoenzima košanog ALP-a (koštani ALP U/L=1,118x ukupna ALP U/L-2,35x aktivnost u supernatantu U/L).

Referentne vrijednosti za odrasle su: N=50, X=25+/-12U/L(13-37).

3.3. KLINIČKA OBRADA

Tijek cijeljenja ozljeđenika redovito je klinički i radiološki praćen cijelo vrijeme hospitalizacije redovnim kontrolama, te periodičnim kontrolama (klinička i radiološka) nakon otpusta, pa sve do potpune sanacije prijeloma. Prema brzini cijeljenja košanog prijeloma naše ispitanike smo podijelili u dvije skupine:

- skupina s brzim koštanim cijeljenjem podrazumjeva one ispitanike koji su 6 tjedana nakon operacijskog zahvata mogli početi s punim opterećenjem operiranog ekstremiteta
- skupina sa sporim cijeljenjem prijeloma podrazumjeva one ispitanike kod kojih je puno opterećenje operiranog ekstremiteta bilo dopušteno tek nakon desetak tjedana, a potpuna koštana sanacija trajala je više mjeseci.

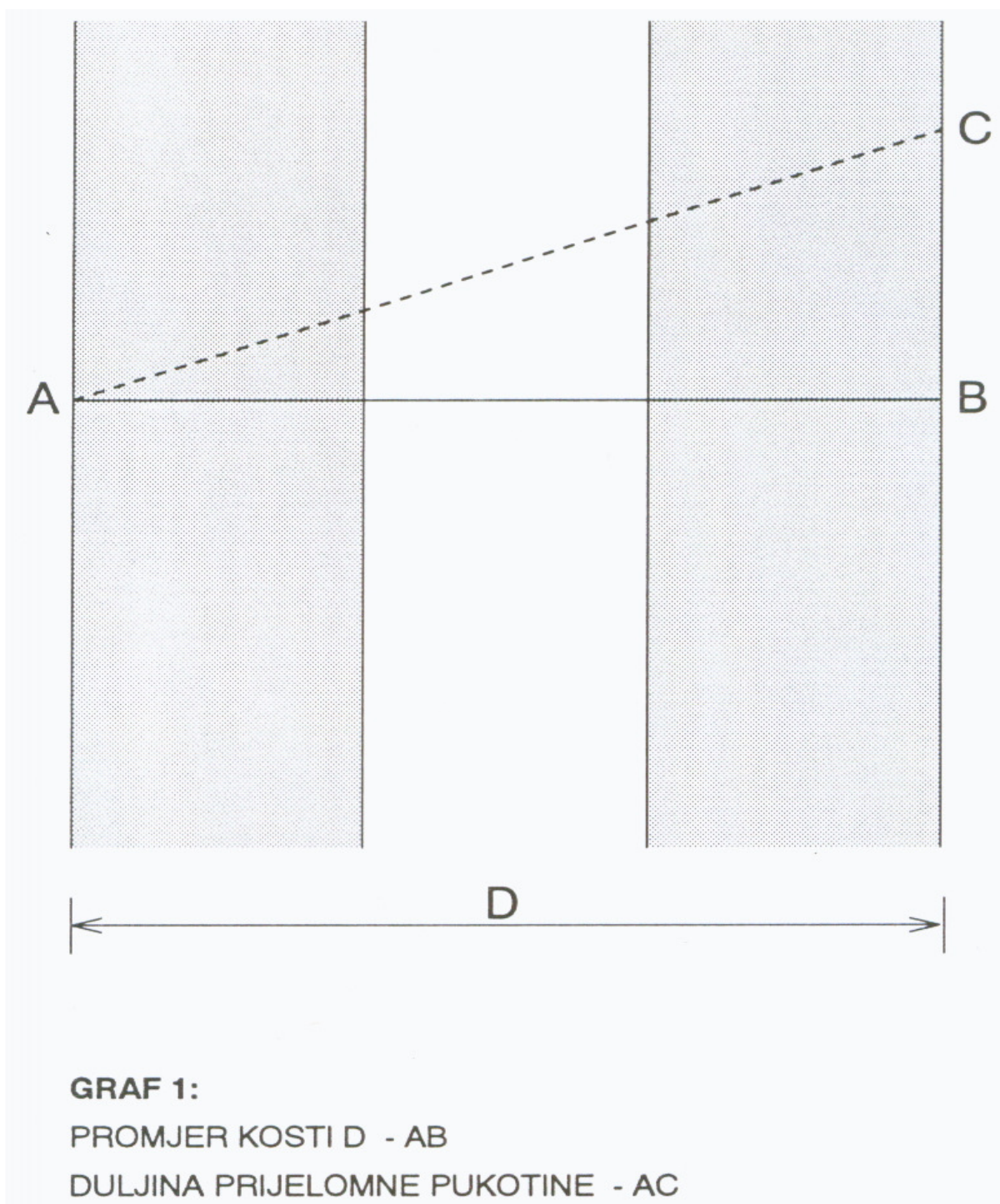
3.3.1. RADIOLOŠKA OBRADA

Pretpostavlja se da aktivnost koštanog tipa alkalne fosfataze ovisi o opsegu prijeloma tj. frakturnoj površini kosti.

Budući da se ta površina ne može točno odrediti iz rendgenograma, koji daje plošnu sliku, korišten je aproksimativan parametar, a to je duljina projekcije prijelomne pukotine, odnosno zbroj duljina svih projekcija prijelomnih pukotina. Svi navedeni parametri mjereni su u milimetrima.

Kako bi se izbjegla pogreška nastala pri uvećanju rendgenske slike, ta je vrijednost izražena i modularno kao omjer duljine prijelomne pukotine i poprečnog promjera dijafize kosti (Slika 6).

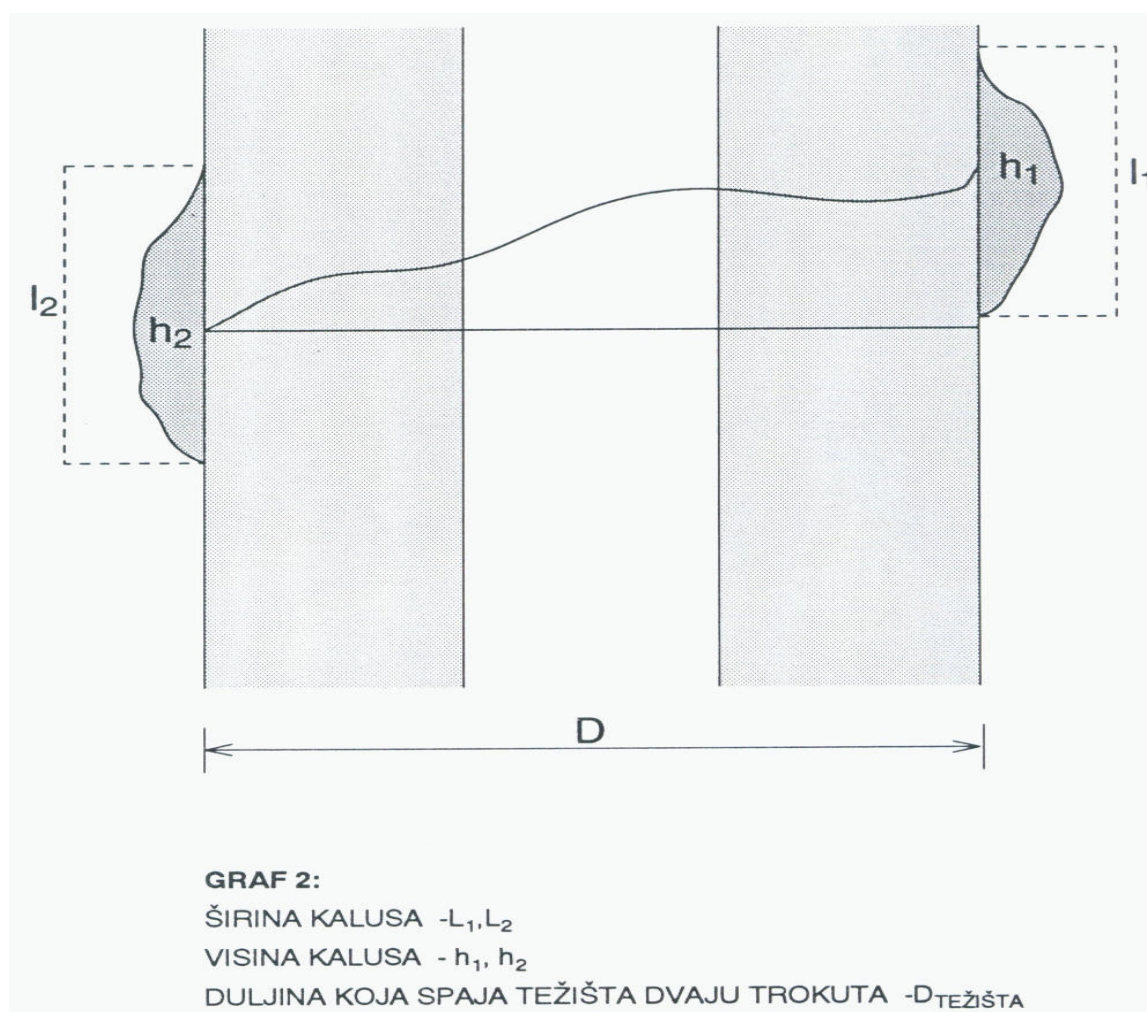
Što je taj omjer veći znači da će prijelomna pukotina biti više kosa ili će ukazivati na višeivernu frakturu. Pri posve poprečnim prijelomima omjer će iznositi jedan prema jedan. Veća prijelomna pukotina znači veću pokretljivost, veću prijelomnu površinu, veći unutarnji kalus i veću pregradnju kosti, što bi moglo potvrditi pretpostavku o korelaciji između veličine prijeloma i aktivnosti koštanog izoenzima alkalne fosfataze i ukupne aktivnosti alkalne fosfataze. Parametri za izračunavanje opsega prijeloma tj. frakturne površine kosti izmjereni su na rendgenskoj slici. Rendgensko snimanje obavljeno je standardnom metodom po tipu kosti sa standardnim filmom, standardnom ekspozicijom, a snimljeni filmovi razvijeni su u automatskoj komori. Posebna pozornost prilikom snimanja posvećena je konstantnom odnosu fokus-film-objekt, kako bi uvećanje slike kosti bilo uvijek isto. Također je posvećena posebna pozornost identičnoj projekciji kosti.



Slika 6. Shematski prikaz prijeloma kosti.

3.3.2. MATEMATIČKA OBRADA

Opsežnost periostalnog kalusa mjerili smo pomoću parametara prikazanih na slici 7. Odredili smo duljinu kalusa L (duljina koja spaja one točke gdje kalusno uzvišenje prelazi u normalnu kost) te visinu kalusa koju smo označili s H (udaljenost najizbočenijeg dijela kalusa od crte koja bi označavala vanjsku subperiostalnu površinu korteksa). (Slika 7)



Slika 7. Shematski prikaz stvaranja kalusa

Kalus je obično vretenastog oblika, često nepravilnog, te smo za izračunavanje njegova volumena koristili aproksimativno matematičke metode.

Vretenasta projekcija kalusa najčešće se može aproksimirati s trokutom. Prema formuli za izračunavanje površine trokuta (Formula 1) dobiven je parametar koji označava površinu projekcije kalusa s jedne ili s druge strane.

$$P = \frac{1}{2} l \times h (\text{mm}^2) \quad \text{Formula 1}$$

l = duljina kalusa tj. duljina koja spaja točke gdje kalusno uzvišenje prelazi u normalnu kost

h = visina kalusa tj. udaljenost najizbočenijeg dijela kalusa od crte koja bi označavala vanjsku subperiostalnu površinu korteksa

Volumen stvorenog kalusa izračunat je pomoću Formule 2.

$$V = \frac{1}{2} l h D \pi (\text{mm}^3) \quad \text{Formula 2}$$

D = spojnica težišnica zamišljene kružnice oko koje trokut rotira

Ako površinu trokuta koji rotira (P) zamjenimo s A , formula izgleda

$$V = A D \pi (\text{mm}^3) \quad \text{Formula 3}$$

Dobivena formula odgovara pretpostavci da je kalus jednako razvijen s obje strane rendgenske slike. Budući da je nejednak, A se zamijeni s $A_1 + A_2$ i Formula 4 glasi:

$$V = \frac{1}{2} (A_1 + A_2) D \pi$$

Formula 4

Ako postoji više rendgenskih slika iz različitih projekcija tada se dobije i preciznija aproksimacija volumena vanjskog kalusa

$$V = \frac{1}{n} (A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_n) D \pi \quad \text{ili} \quad V = \frac{1}{n} A_i D \pi$$

Formula 5

gdje je n broj projekcija sjene kalusa, a A_i suma svih površina sjene kalusa.

3.3.3. STATISTIČKA OBRADA

Statistička obrada dobivenih rezultata izrađena je u sklopu statističkog paketa SPSS. Rezultati su prikazani tablično i grafički. S obzirom na primijenjene metode, statistička se obrada sastoji od deskriptivne statistike i neparametrijske statistike.

Deskriptivna statistika

Prikazane su procjene parametara za varijable u uzorku prema grupama ispitanika i danima mjerenja. Kontinuirane varijable prikazane su kao aritmetička sredina, standardna devijacija, medijan, najmanja i najveća vrijednost. Kategoričke varijable prikazane su u tablici frekvencija kao broj opažanja. Prikazane su varijable u cijelom uzorku ispitanika i po grupama s obzirom na mjesto prijeloma.

Neparametrijska statistika

Kvantitativni podaci su međugrupno uspoređeni Mann-Whitneyevim U testom, dok su između dana (između više vremena) uspoređeni Wilcoxon rang testom (između dvaju vremena) (100, 101). Vrijednosti $p \leq 0,05$ smatrane su značajne.

4. REZULTATI

4.1. Deskriptivna analiza podataka ukupne alkalne fosfataze i koštane alkalne fosfataze za sve ispitanike po lokaciji prijeloma, ishodu cijeljenja prijeloma i danima

Svim ispitanicima ukupna alkalna fosfataza i koštana alkalna fosfataza mjerena je 1., 7., 14. i 21. dana, a rezultati deskriptivne statistike su u tablici 4.1.1.

	Ukupna alkalna fosfataza				Koštana alkalna fosfataza			
	1. dan	7. dan	14. dan	21. dan	1. dan	7. dan	14. dan	21. dan
N	41	41	10	5	41	41	10	5
Aritmetička sredina	128,00	132,05	175,00	246,20	46,34	32,78	48,80	106,40
Medijan	110,00	122,00	158,50	219,00	28,00	16,00	42,50	64,00
S.D.	86,82	50,50	70,59	116,54	74,82	49,27	42,31	100,05
Najmanja vrijednost	41,00	59,00	107,00	145,00	2,00	2,00	2,00	30,00
Najveća vrijednost	508,00	317,00	340,00	429,00	368,00	253,00	148,00	278,00

Tablica 4.1.1. Deskriptivna statistika za rezultate ukupne i koštane alkalne fosfataze za sve ispitanike po danima

Prikaz rezultata deskriptivne statistike za ukupnu i koštanu alkalnu fosfatazu u odnosu na lokaciju operacijski liječenog prijeloma po danima prikazan je na tablici 4.1.2.

Lokacija prijeloma		Ukupna alkalna fosfataza				Koštana alkalna fosfataza			
		1.dan	7.dan	14.dan	21.dan	1.dan	7.dan	14.dan	21.dan
Potko- ljenica	N	33	33	9	5	33	33	9	5
	Aritmetička sredina	124,27	130,67	181,22	246,20	45,06	29,52	54,00	106,40
	Medijan	109,00	119,00	172,00	219,00	27,00	13,00	53,00	64,00
	S.D.	92,32	53,17	71,91	116,54	81,51	47,74	41,35	100,05
	Najmanja vrijednost	54,00	74,00	107,00	145,00	2,00	2,00	14,00	30,00
	Najveća vrijednost	508,00	317,00	340,00	429,00	368,00	253,00	148,00	278,00
Femur	N	7	7	1		7	7	1	
	Aritmetička sredina	146,00	135,71	119,00		57,43	48,86	2,00	
	Medijan	139,00	137,00	119,00		58,00	23,00	2,00	
	S.D.	65,94	42,84	.		38,97	60,53	.	
	Najmanja vrijednost	41,00	59,00	119,00		6,00	5,00	2,00	
	Najveća vrijednost	265,00	195,00	119,00		126,00	178,00	2,00	
Hume- rus	N	1	1			1	1		
	Aritmetička sredina	125,00	152,00			11,00	28,00		
	Medijan	125,00	152,00			11,00	28,00		
	S.D.		
	Najmanja vrijednost	125,00	152,00			11,00	28,00		
	Najveća vrijednost	125,00	152,00			11,00	28,00		

Tablica 4.1.2. Deskriptivna statistika za ukupnu i koštanu alkalnu fosfatazu za sve ispitanike po lokaciji prijeloma i danima

Sve ispitanike, neovisno o lokaciji operacijski liječenog prijeloma, a prema konačnom ishodu koštanog cijeljenja, podijelili smo u dvije skupine:

- skupina ispitanika s brzim koštanim cijeljenjem
- skupina ispitanika sa sporim koštanim cijeljenjem

Prikaz vrijednosti izmjerenih parametara za obje skupine prikazan je na tablici 4.1.3.

Iz tablice je vidljivo da se aritmetička sredina izmjerenih vrijednosti, kako ukupne, tako i koštane alkalne fosfataze kod brzog koštanog cijeljenja prema danima mjerenja postupno smanjuje, a aritmetička sredina istih parametara kod sporog koštanog cijeljenja postupno raste.

Ishod koštanog cijeljenja		Ukupna alkalna fosfataza				Koštana alkalna fosfataza			
		1. dan	7. dan	14. dan	21. dan	1. dan	7. dan	14. dan	21. dan
brzo	N	15	15	3		15	15	3	
	Aritmetička sredina	139,60	121,73	113,00		56,47	19,67	17,67	
	Medijan	109,00	118,00	113,00		29,00	12,00	19,00	
	S.D.	91,41	36,74	6,00		88,34	18,80	15,04	
	Najmanja vrijednost	73,00	74,00	107,00		7,00	2,00	2,00	
	Najveća vrijednost	426,00	211,00	119,00		368,00	74,00	32,00	
sporo	N	26	26	7	5	26	26	7	5
	Aritmetička sredina	120,19	139,12	201,57	246,20	36,50	44,35	62,14	106,40
	Medijan	114,50	124,50	187,00	219,00	22,50	19,00	57,00	64,00
	S.D.	84,90	56,82	68,68	116,54	64,75	61,54	43,79	100,05
	Najmanja vrijednost	41,00	59,00	135,00	145,00	2,00	2,00	14,00	30,00
	Najveća vrijednost	508,00	317,00	340,00	429,00	342,00	253,00	148,00	278,00

Tablica 4.1.3. Deskriptivna statistika ukupne i koštane alkalne fosfataze za sve ispitanike po ishodu cijeljenja i danima

Naše ispitivanje obuhvaća prema lokaciji operacijski liječenog prijeloma dvije skupine ispitanika: skupinu liječenih prijeloma potkoljenica i skupinu liječenih prijeloma femura. Prema ishodu koštanog cijeljenja, rezultati izmjerenih vrijednosti u skupini potkoljenice, prikazani su na tablici 4.1.4. Iz tablice je vidljivo da aritmetička sredina izmjerenih vrijednosti ukupne i koštane alkalne fosfataze kod brzog koštanog cijeljenja prema danima mjerenja pokazuje umjeren pad, a aritmetička sredina istih parametara kod sporog koštanog cijeljenja postupno raste.

Potkoljenica ishod koštanog cijeljenja		Ukupna alkalna fosfataza				Koštana alkalna fosfataza			
		1. dan	7. dan	14. dan	21. dan	1. dan	7. dan	14. dan	21. dan
brzo	N	14	14	2		14	14	2	
	Aritmetička sredina	130,64	120,50	110,00		55,43	19,43	25,50	
	Medijan	109,00	116,50	110,00		28,50	11,00	25,50	
	S.D.	87,77	37,80	4,24		91,58	19,49	9,19	
	Najmanja vrijednost	73,00	74,00	107,00		7,00	2,00	19,00	
	Najveća vrijednost	426,00	211,00	113,00		368,00	74,00	32,00	
sporo	N	19	19	7	5	19	19	7	5
	Aritmetička sredina	119,58	138,16	201,57	246,20	37,42	36,95	62,14	106,40
	Medijan	99,00	122,00	187,00	219,00	22,00	14,00	57,00	64,00
	S.D.	97,63	62,08	68,68	116,54	74,89	60,33	43,79	100,05
	Najmanja vrijednost	54,00	76,00	135,00	145,00	2,00	2,00	14,00	30,00
	Najveća vrijednost	508,00	317,00	340,00	429,00	342,00	253,00	148,00	278,00

Tablica 4.1.4. Deskriptivna statistika za ukupnu i koštanu alkalne fosfatazu za potkoljenicu po ishodu cijeljenja i danima

U skupini operacijski liječenog prijeloma femura prikazanih na tablici 4.1.5., vidljivo je da jedan ispitanik s brzim koštanim cijeljenjem pokazuje prema danima mjerenja pad vrijednosti izmjerenih parametara, a da aritmetička sredina izmjerenih parametara kod sporog koštanog cijeljenja prema danima mjerenja pokazuje porast izmjerenih vrijednosti.

Femur ishod koštanog cijeljenja		Ukupna alkalna fosfataza			Koštana alkalna fosfataza		
		1. dan	7. dan	14. dan	1. dan	7. dan	14. dan
brzo	N	1	1	1	1	1	1
		265	139	119	71	23	2
sporo	N	6	6		6	6	
	Aritmetička sredina	121,33	140,00		37,83	70,50	
	Medijan	130,00	146,00		34,00	51,50	
	S.D.	41,47	47,26		25,21	68,90	
	Najmanja vrijednost	41,00	59,00		6,00	5,00	
	Najveća vrijednost	162,00	195,00		73,00	178,00	

Tablica 4.1.5. Deskriptivna statistika odn. rezultati ukupne i koštane alkalne fosfataze za femur po ishodu cijeljenja i danima

Opsežnost stvaranja periostalnog kalusa kod svakog ispitanika mjerili smo pomoću parametara prikazanih na slici 7. Vrijednosti izmjerenih parametara prema lokaciji prijeloma, za svaku skupinu ispitanika i ukupno, prikazani su na tablici 4.1.6.

Lokacija prijeloma		D	L1	L2	L3	H1	H2	H3
Potkoljenica	N	33	33	33	2	33	33	2
	Aritmetička sredina	28,91	41,52	32,88	40,00	2,42	2,00	5,00
	Medijan	28,00	35,00	40,00	40,00	2,00	2,00	5,00
	S.D.	5,92	44,66	33,24	,00	2,88	2,52	,00
	Najmanja vrijednost	21,00	,00	,00	40,00	,00	,00	5,00
	Najveća vrijednost	50,00	155,00	100,00	40,00	11,00	10,00	5,00
Femur	N	7	7	7		7	7	
	Aritmetička sredina	35,71	86,43	37,14		10,00	3,29	
	Medijan	37,00	70,00	40,00		10,00	2,00	
	S.D.	7,67	57,21	39,04		7,05	4,07	
	Najmanja vrijednost	26,00	,00	,00		,00	,00	
	Najveća vrijednost	50,00	160,00	100,00		20,00	11,00	
Humerus	N	1	1	1		1	1	
		25,00	100,00	100,00		6,00	7,00	
Ukupno	N	41	41	41	2	41	41	2
	Aritmetička sredina	29,98	50,61	35,24	40,00	3,80	2,34	5,00
	Medijan	28,00	50,00	40,00	40,00	2,00	2,00	5,00
	S.D.	6,65	49,40	34,96	,00	4,74	2,89	,00
	Najmanja vrijednost	21,00	,00	,00	40,00	,00	,00	5,00
	Najveća vrijednost	50,00	160,00	100,00	40,00	20,00	11,00	5,00

Tablica 4.1.6. Deskriptivna statistika odn. rezultati parametara D (duljina koja spaja težište dvaju trokuta), L1, L2 i L3 (širina kalusa), H1, H2, H3 (visina kalusa) po lokaciji prijeloma i ukupno

4.2. TESTIRANJE RAZLIKA PO DANIMA, UKUPNE I KOŠTANE ALKALNE FOSFATAZE ZA CIJELU SKUPINU I ZA SVAKU LOKACIJU PRIJELOMA TE MEĐU LOKACIJAMA PRIJELOMA

Testiranje razlika po danima ukupne i koštane alkalne fosfataze za sve ispitanike te za pojedine skupine provedene su za skupine potkoljenica i femur, budući da je bio samo jedan ispitanik s prijelomom humerusa.

Testiranje razlika parametra ukupne alkalne fosfataze po danima između potkoljenice i femura Mann-Whitney U - testom prikazano je na tablici 4.2.1.

Ukupna alkalna fosfataza			
	1. dan	7. dan	14. dan
Mann-Whitney U	56,00	79,00	2,00
Z	2,11	1,30	,870
P	,034	,194	,384
Lokacija prijeloma: Potkoljenica-Femur			

Tablica 4.2.1. Testiranje razlika parametra ukupna alkalna fosfataza po danima između potkoljenice i femura

Nađena je statistički značajna razlika u ukupnoj alkalnoj fosfatazi između potkoljenice i femura u 1. danu, $Z=2,119$; $P=0,034$; dok kod ostalih dana nije nađena statistički značajna razlika.

Testiranje razlika parametra koštane alkalne fosfataze po danima, između potkoljenice i femura Mann-Whitney U – testom, prikazano je na tablici 4.2.2.

Koštana alkalna fosfataza			
	1. dan	7. dan	14. dan
Mann-Whitney U	63,00	80,00	,00
Z	1,87	1,264	1,567
P	,062	,206	,117
Lokacija prijeloma: Potkoljenica-Femur			

Tablica 4.2.2. Testiranje razlika parametra koštane alkalne fosfataze po danima između potkoljenice i femura

Nije nađena statistički značajna razlika u koštanoj alkalnoj fosfatazi između potkoljenice i femura po danima.

Testiranje razlika parametara ukupne alkalne fosfataze i koštane alkalne fosfataze između dana, provedeno je Wilcoxon rang testom.

Testiranje razlika parametra ukupne alkalne fosfataze između dana prikazano je na tablici 4.2.3.

Ukupna alkalna fosfataza						
Wilcoxon rang test	7.dan - 1. dan	14.dan - 1. dan	21.dan - 1. dan	14.dan - 7. dan	21.dan - 7. dan	21.dan - 14. dan
Z	1,438	,765	1,214	1,682	2,023	1,826
P	,150	,444	,225	,093	,043	,068

Tablica 4.2.3. Testiranje razlika parametra ukupne alkalne fosfataze između dana

Rezultati testiranja ukazuju da je nađena statistički značajna razlika u ukupnoj alkalnoj fosfatazi između 7. i 21.dana $Z=2,023$; $P=0,043$, dok između ostalih dana nije nađena statistički značajna razlika.

Testiranje razlika parametra koštane alkalne fosfataze između dana prikazano je na tablici 4.2.4.

Koštana alkalna fosfataza						
Wilcoxon rang test	7.dan - 1. dan	14.dan - 1. dan	21.dan - 1. dan	14.dan - 7. dan	21.dan - 7. dan	21.dan - 14. dan
Z	1,997	,051	,944	1,784	2,023	1,214
P	,046	,959	,345	,074	,043	,225

Tablica 4.2.4. Testiranje razlika parametra koštane alkalne fosfataze između dana

Rezultati testiranja ukazuju da je nađena statistički značajna razlika u koštanoj alkalnoj fosfatazi između 7. i 21. dana $Z=2,023$; $P=0,043$, dok između ostalih dana nije nađena statistički značajna razlika.

Testiranje razlike parametra ukupne i koštane alkalne fosfataze između ishoda cijeljenja provedeno je Mann-Whitney U - testom.

Testiranje razlike parametra ukupne i alkalne fosfataze između ishoda cijeljenja za cijelu skupinu prikazano je na tablici 4.2.5.

	Ukupna alkalna fosfataza			Koštana alkalna fosfataza		
	1. dan	7. dan	14. dan	1. dan	7. dan	14. dan
Mann-Whitney U	175,00	147,00	,00	134,50	159,50	3,00
Z	,542	1,300	2,393	1,639	,961	1,709
P	,588	,194	,017	,101	,336	,087
Ishod cijeljenja: brzo-sporo						

Tablica 4.2.5. Testiranje razlika parametra ukupne i koštane alkalne fosfataze između ishoda cijeljenja

Rezultati testiranja ukazuju da je nađena statistički značajna razlika između ishoda cijeljenja u ukupnoj alkalnoj fosfatazi 14. dana $Z=2,393$; $P=0,017$, dok za ostale dane i za koštanu alkalnu fosfatazu nije nađena statistički značajna razlika.

Testiranje razlike parametra ukupne i koštane alkalne fosfataze između ishoda cijeljenja kod potkoljenice prikazano je na tablici 4.2.6.

	Ukupna alkalna fosfataza			Koštana alkalna fosfataza		
	1. dan	7. dan	14. dan	1. dan	7. dan	14. dan
Mann-Whitney U	108,00	102,50	,00	88,50	120,00	3,00
Z	,912	1,112	2,049	1,622	,474	1,171
P	,362	,266	,040	,105	,636	,242
Ishod cijeljenja: brzo-sporo						

Tablica 4.2.6. Testiranje razlika parametra ukupne i koštane alkalne fosfataze između ishoda cijeljenja kod potkoljenice

Rezultati testiranja ukazuju da je nađena statistički značajna razlika između ishoda cijeljenja potkoljenice u ukupnoj alkalnoj fosfatazi 14. dana $Z=2,049$; $P=0,040$, dok za ostale dane i za koštanu alkalnu fosfatazu nije nađena statistički značajna razlika.

Testiranje razlika parametra ukupne i koštane alkalne fosfataze između ishoda cijeljenja kod femura prikazano je na tablici 4.2.7.

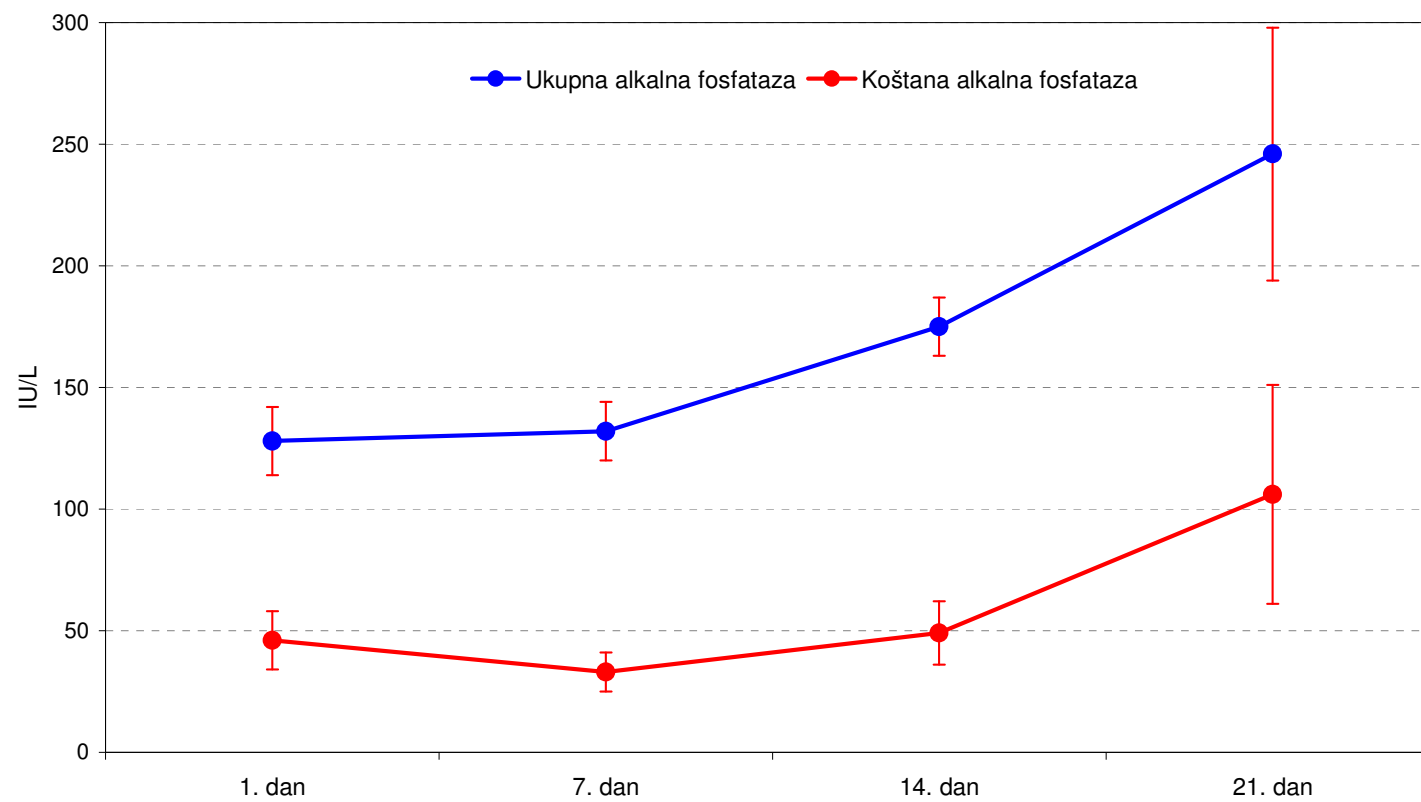
	Ukupna alkalna fosfataza		Koštana alkalna fosfataza	
	1. dan	7. dan	1. dan	7. dan
Mann-Whitney U	,00	3,00	1,00	2,00
Z	1,500	,000	1,000	,500
P	,134	1,000	,317	,617
Ishod cijeljenja: brzo-sporo				

Tablica 4.2.7. Testiranje razlika parametra ukupne i koštane alkalne fosfataze između ishoda cijeljenja kod femura

Rezultati testiranja ukazuju da nije nađena statistički značajna razlika ovisno o ishodu cijeljenja femura u ukupnoj i koštanoj alkalnoj fosfatazi između ishoda liječenja za ispitivane dane.

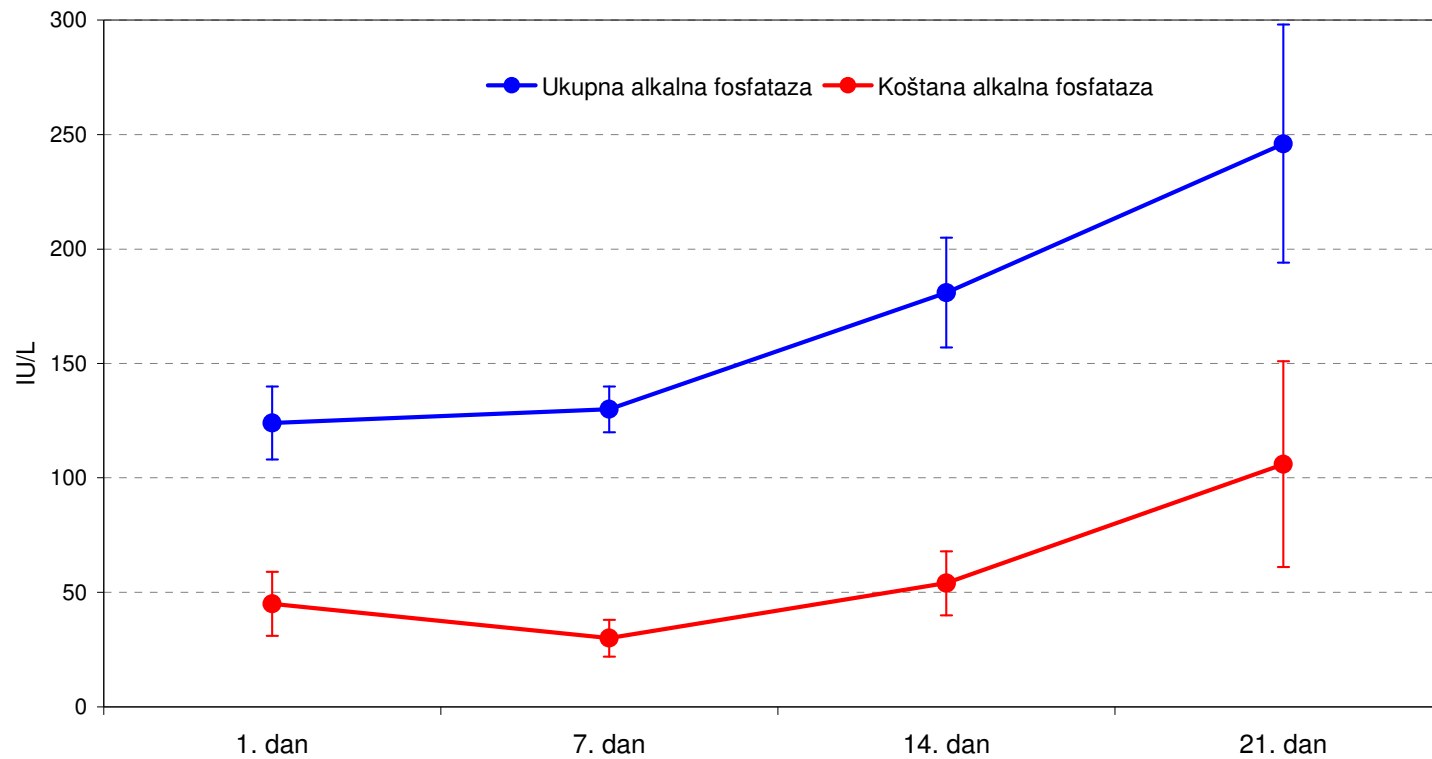
4.3. GRAFIČKI PRIKAZ UKUPNE I KOŠTANE ALKALNE FOSFATAZE PO DANIMA, LOKACIJAMA I ISHODU LIJEČENJA

Praćenje rezultata našeg istraživanja i promjena vrijednosti ukupne alkalne fosfataze i koštane alkalne fosfataze za cijelu skupinu ispitanika po danima ispitivanja prikazan je na slici 4.3.1. Iz navedene slike je vidno da su promjene aktivnosti ukupne i koštane alkalne fosfataze po danima podudarne.

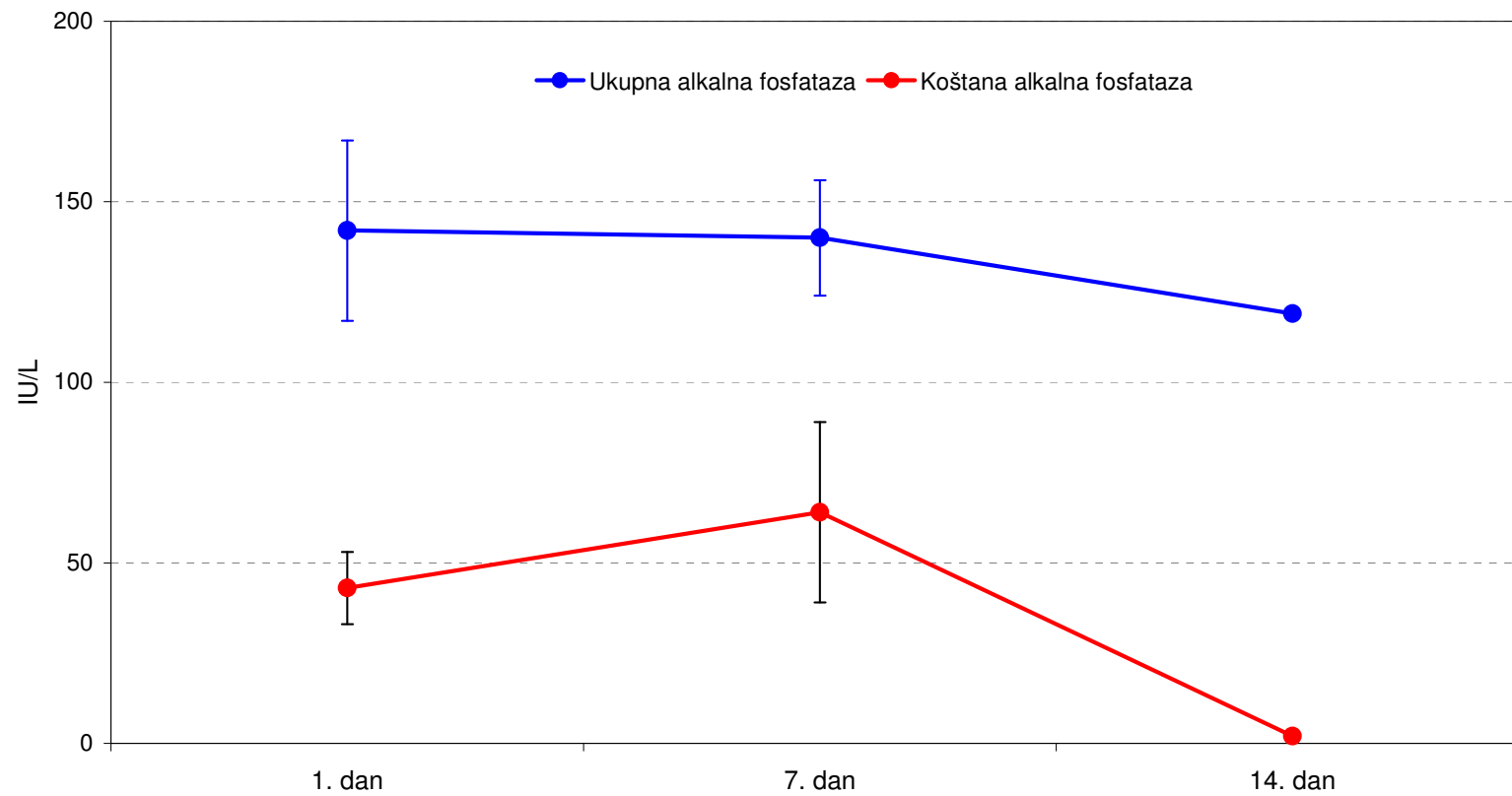


Slika 4.3.1. Prikaz aritmetičke sredine \pm S.E. ukupne i koštane alkalne fosfataze po danima za sve lokacije i nezavisno od ishoda cijeljenja.

Kako smo u našem ispitivanju uzeli u obzir dvije različite lokacije prijeloma tj. prijelome potkoljenice i prijelome femura to je iz slika 4.3.2 i 4.3.3 vidno da su promjene aktivnosti ukupne i koštane alkalne fosfataze podudarne za potkoljenu i femur. Potrebno je istaknuti da se vrijednosti ovih parametara kod potkoljenice povećavaju, a kod femura snizuju tijekom praćenja.

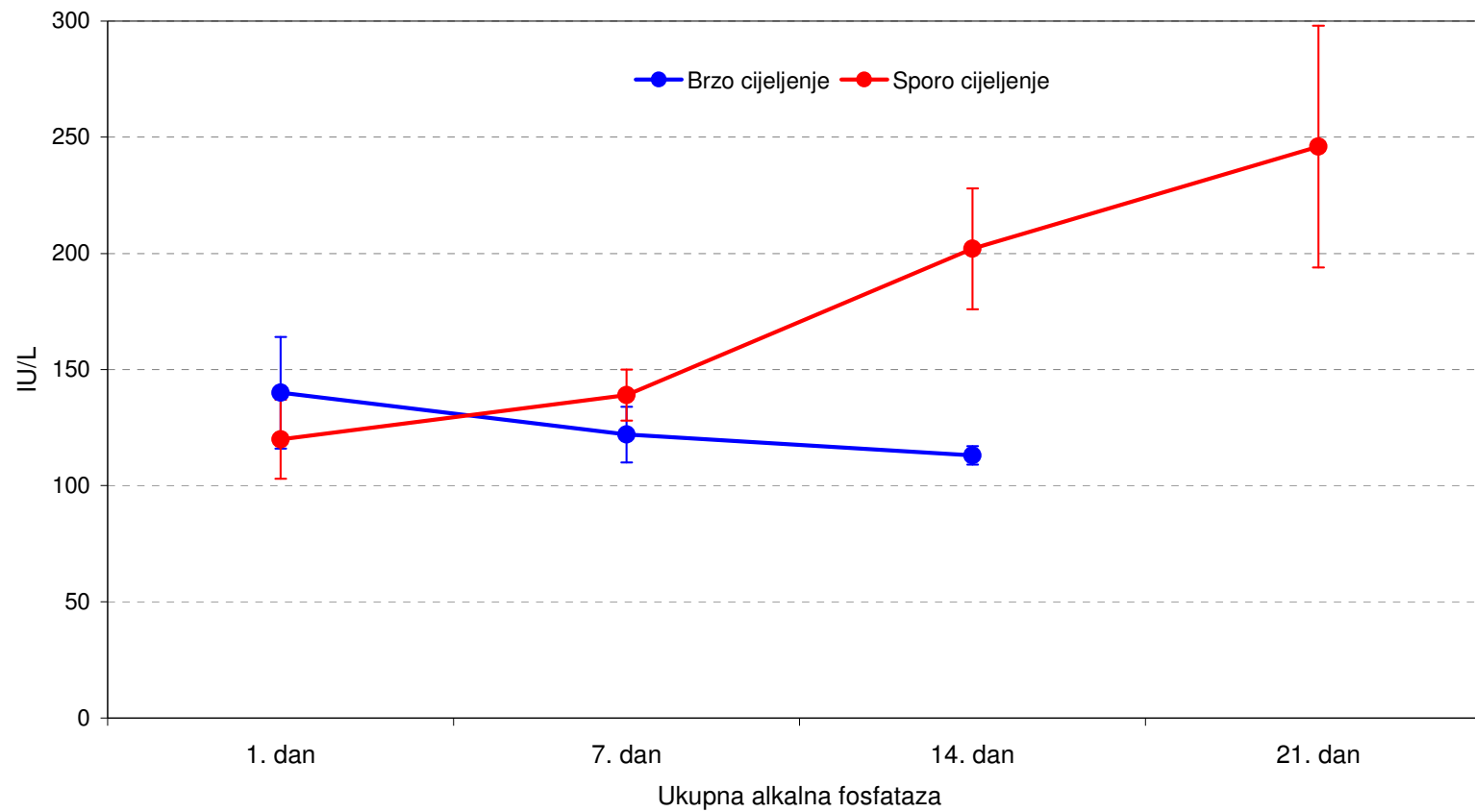


Slika 4.3.2. Prikaz aritmetičke sredine \pm S.E. ukupne i koštane alkalne fosfataze po danima – potkoljenica

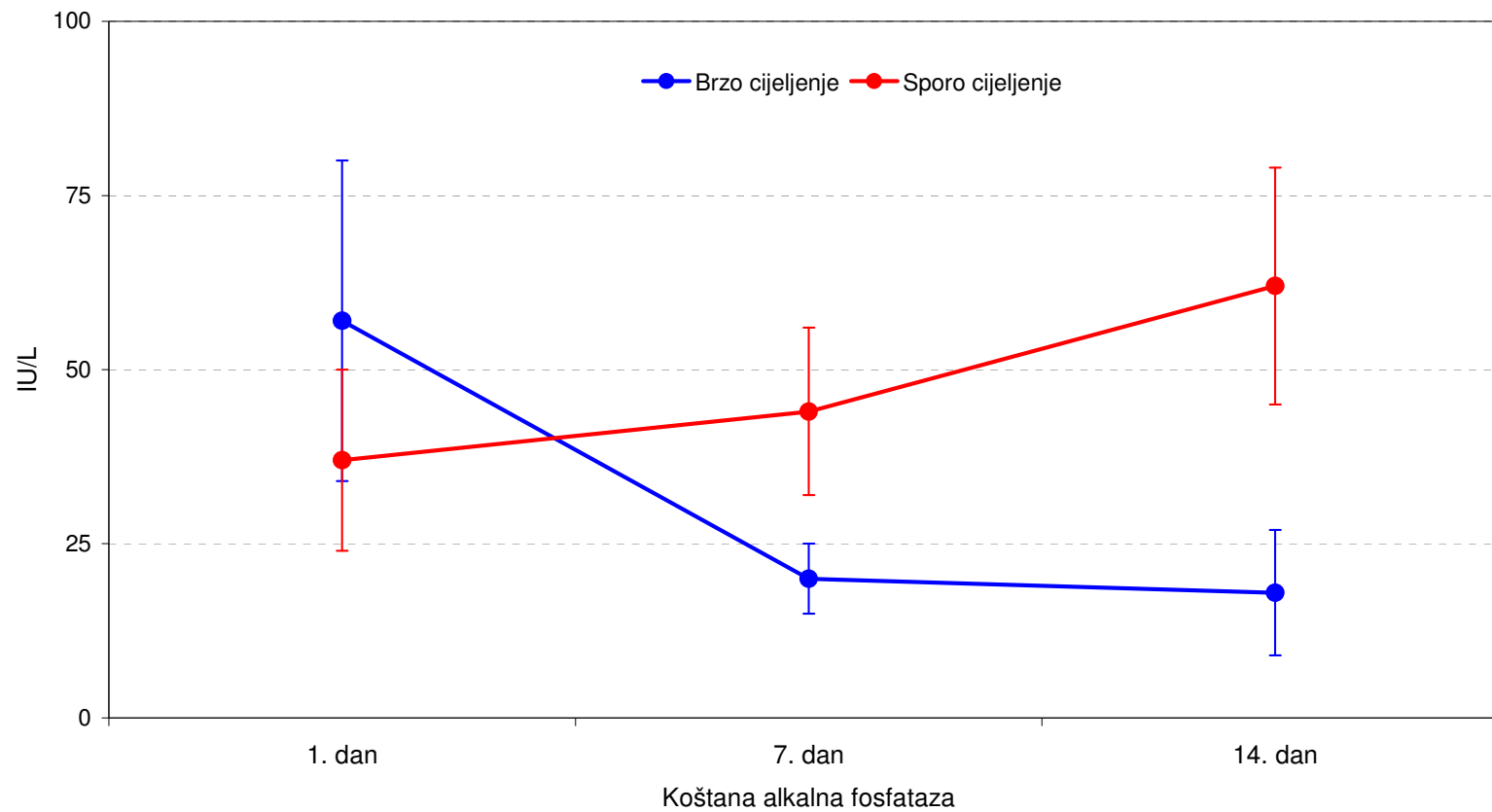


Slika 4.3.3. Prikaz aritmetičke sredine \pm S.E. ukupne i koštane alkalne fosfataze po danima – femur

Naše ispitanike podijelili smo u dvije skupine: grupu s brzim i grupu sa sporim koštanim cijeljenjem. Na slici 4.3.4. prikazane su promjene aktivnosti ukupne i 4.3.5. koštane alkalne fosfataze po danima i brzini cijeljenja prijeloma. Iz slika je vidno da kod brzog cijeljenja prijeloma postoji pad vrijednosti ukupne alkalne fosfataze i koštane alkalne fosfataze izmjerene 7. dana i 14. dana u odnosu na vrijednost izmjerenu 1. dana. Kod sporog cijeljenja prijeloma uočava se porast vrijednosti ukupne alkalne fosfataze i koštane alkalne fosfataze izmjerene 7. dana, 14. dana i 21. dana u odnosu na vrijednost izmjerenu 1. dana ispitivanja.

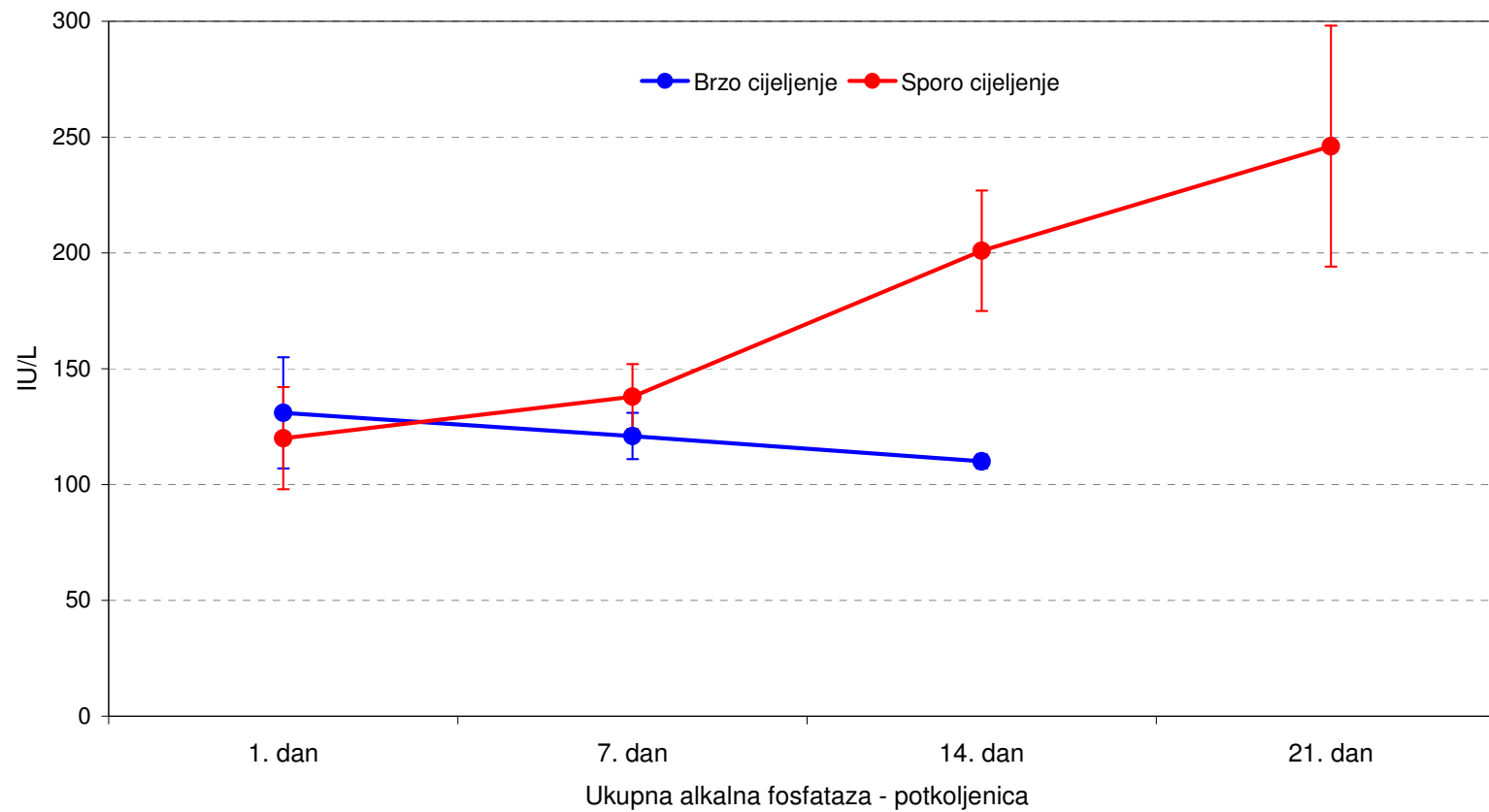


Slika 4.3.4. Prikaz aritmetičke sredine \pm S.E. ukupne alkalne fosfataze po danima i cijeljenju prijeloma

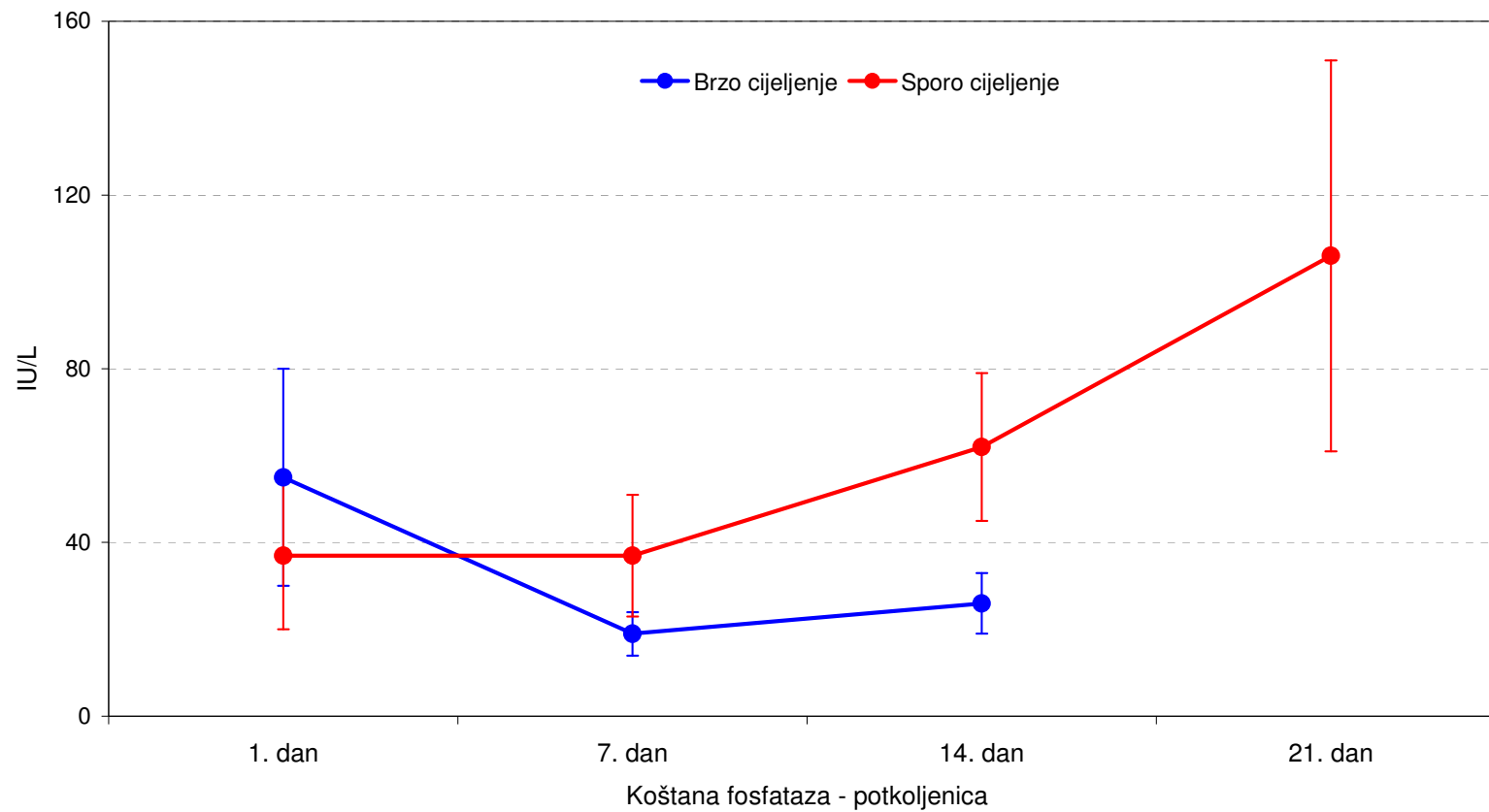


Slika 4.3.5. Prikaz aritmetičke sredine \pm S.E. koštane alkalne fosfataze po danima i cijeljenju prijeloma

Kad uzmemo u obzir izdvojenu grupu ispitanika s prijelomom potkoljenice, prema rezultatima ispitivanja možemo pratiti promjene ukupne alkalne fosfataze po danima i brzini cijeljenja prijeloma, prikazano na slici 4.3.6. Za istu grupu ispitanika možemo pratiti promjene koštane alkalne fosfataze po danima i brzini cijeljenja prijeloma, prikazano na slici 4.3.7. Promatramo li izolirano, grupu ispitanika s prijelomom potkoljenice, vidno je da je brzo cijeljenje koštanog prijeloma povezano s padom vrijednosti ukupne i koštane alkalne fosfataze 7., 14., i 21. dana u odnosu na vrijednost izmjerenu 1. dana. Iz istih slika je istodobno vidno da je sporo cijeljenje koštanog prijeloma povezano s porastom vrijednosti ukupne alkalne fosfataze i koštane alkalne fosfataze izmjerene 7., 14., i 21. dana u odnosu na vrijednost izmjerenu 1. dana ispitivanja.

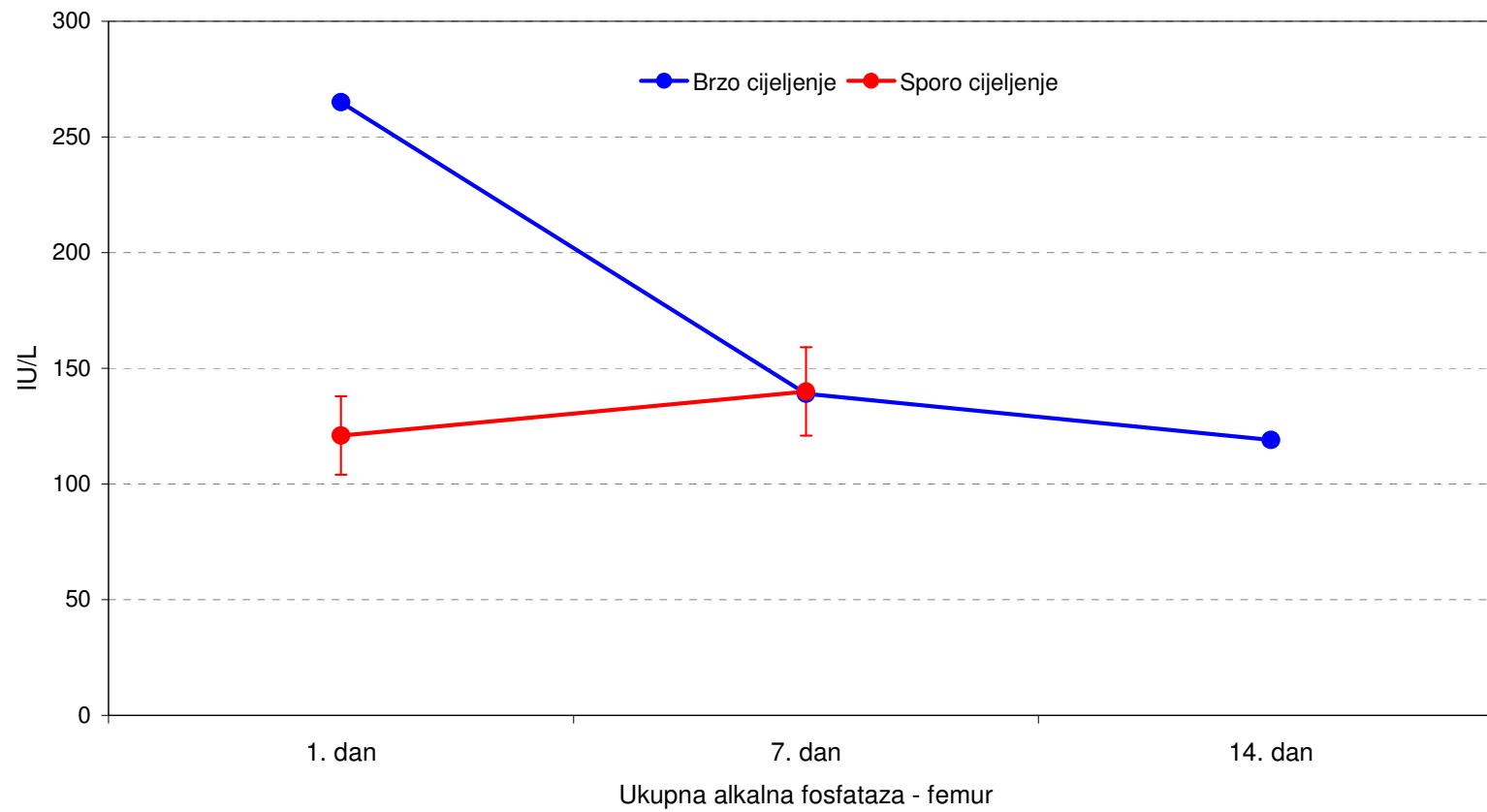


Slika 4.3.6. Prikaz aritmetičke sredine \pm S.E. ukupne alkalne fosfataze po danima i cijeljenju prijeloma potkoljenice

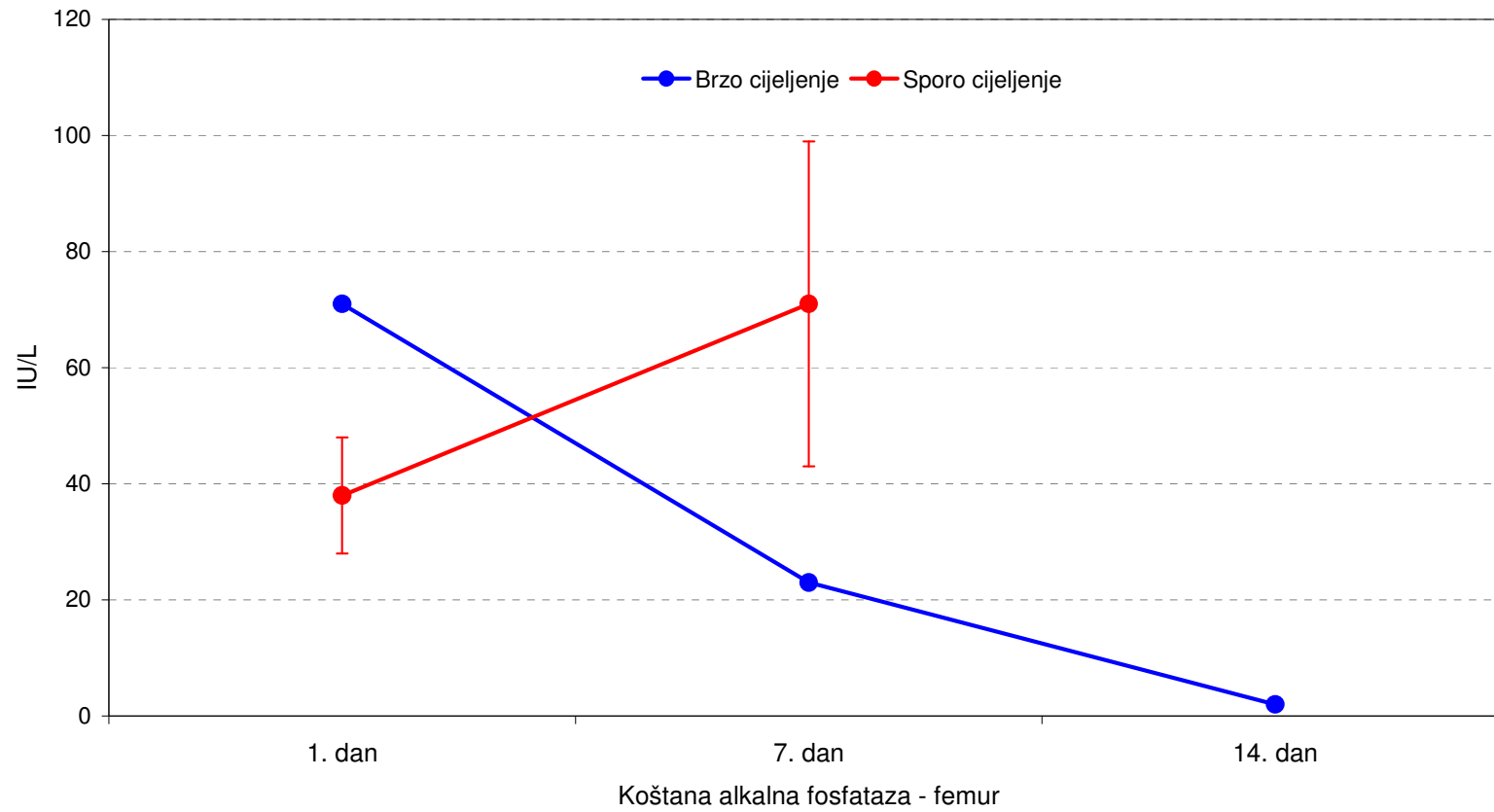


Slika 4.3.7. Prikaz aritmetičke sredine \pm S.E. koštane alkalne fosfataze po danima i cijeljenju prijeloma potkoljenice

Kad uzmemo u obzir izdvojenu grupu ispitanika s prijelomom femura, prema rezultatima ispitivanja možemo pratiti promjene ukupne alkalne fosfataze po danima i brzini cijeljenja prijeloma, prikazano na slici 4.3.8. Za istu grupu ispitanika možemo pratiti promjene koštane alkalne fosfataze po danima i brzini cijeljenja prijeloma, prikazano na slici 4.3.9. Promatramo li izoliranu grupu ispitanika s prijelomom femura, vidno je da je brzo cijeljenje koštanog prijeloma povezano s padom vrijednosti ukupne i koštane alkalne fosfataze 7. i 14. dana nakon traume u odnosu na vrijednost izmjerenu 1. dana. Iz istih slika je istodobno vidno da je sporo cijeljenje koštanog prijeloma povezano s porastom vrijednosti ukupne alkalne fosfataze i koštane alkalne fosfataze izmjerene 7. i 14. dana u odnosu na vrijednost izmjerenu 1. dana ispitivanja.

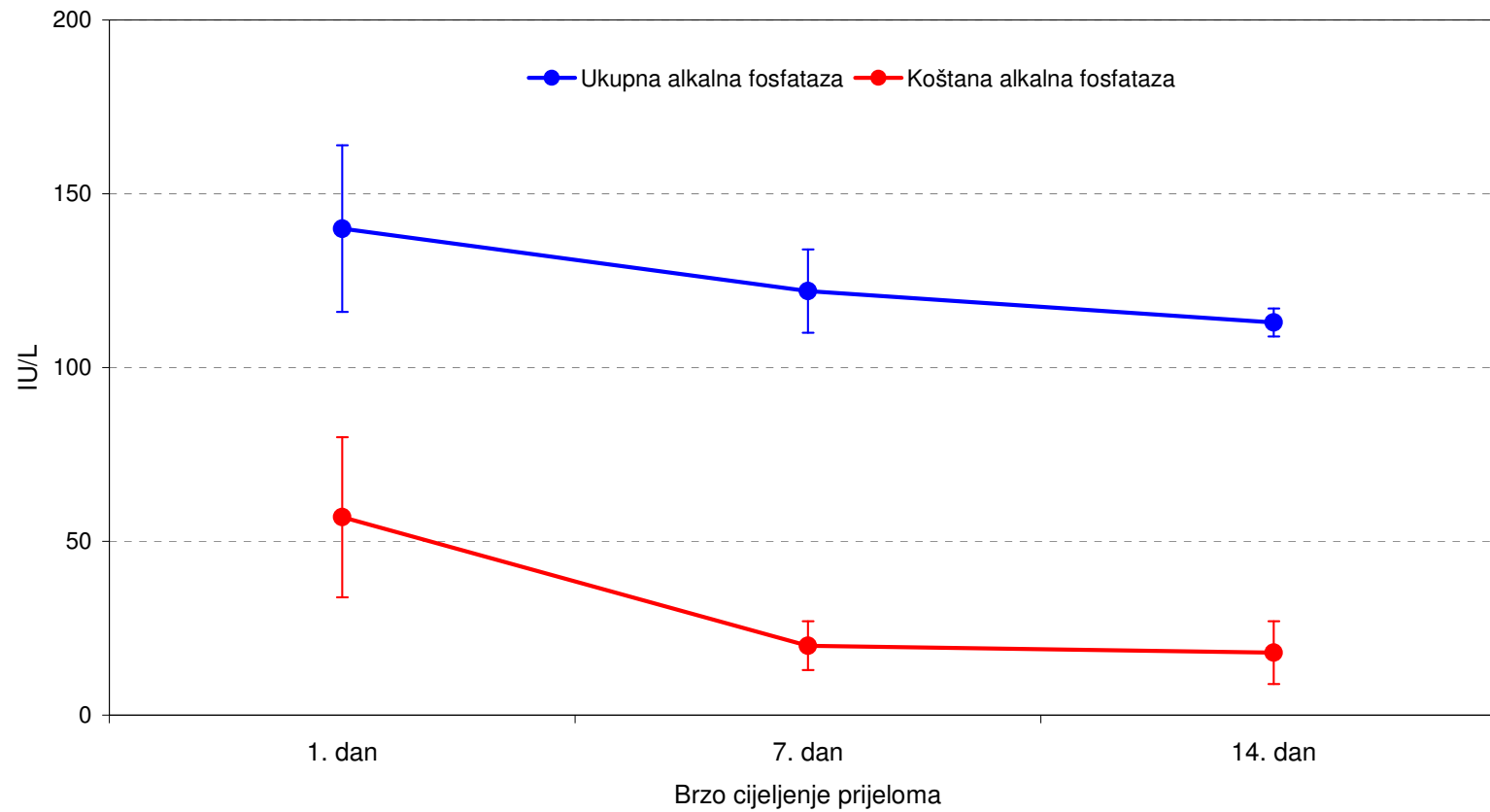


Slika 4.3.8. Prikaz aritmetičke sredine \pm S.E. ukupne alkalne fosfataze po danima i cijeljenju prijeloma femura

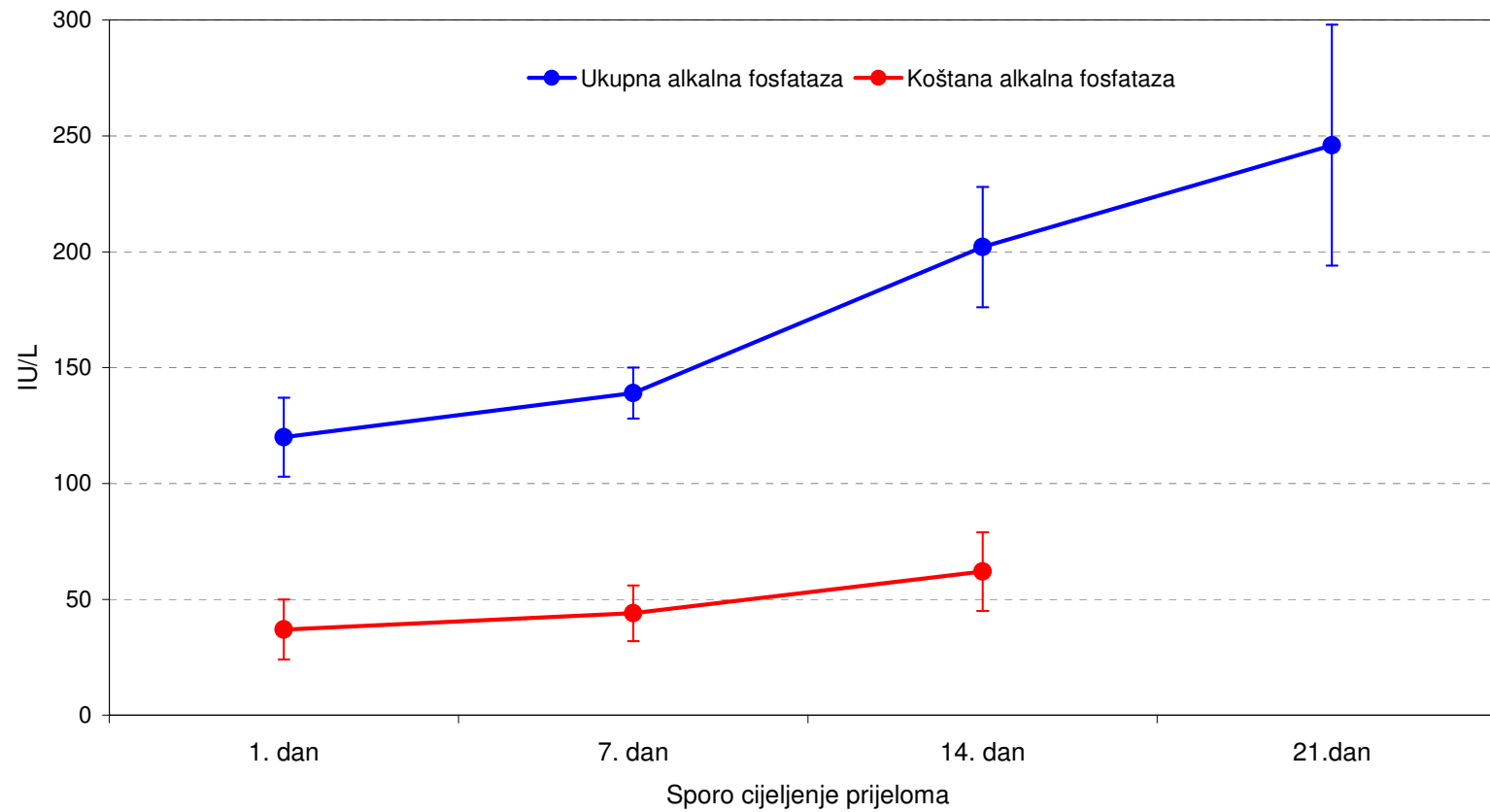


Slika 4.3.9. Prikaz aritmetičke sredine \pm S.E. koštane alkalne fosfataze po danima i cijeljenju prijeloma femura

Uzmemo li u obzir, paralelno promatrajući ukupnu i koštanu alkalnu fosfatazu po danima ispitivanja, sve ispitanike, podijeljene u dvije grupe: grupu s brzim cijeljenjem koštanog prijeloma i grupu sa sporim cijeljenjem koštanog prijeloma, vidno je sljedeće: pad izmjerenih vrijednosti ukupne alkalne fosfataze i koštane alkalne fosfataze 7. i 14. dana nakon traume u odnosu na izmjerenu vrijednost 1. dana ispitivanja, uočava se kod brzog cijeljenja koštanog prijeloma (slika 4.3.10). Porast izmjerenih vrijednosti ukupne alkalne fosfataze i koštane alkalne fosfataze 7., 14. i 21. dana nakon traume u odnosu na vrijednost izmjerenu 1. dana nakon traume ukazuje na sporo cijeljenje koštanog prijeloma (slika 4.3.11).

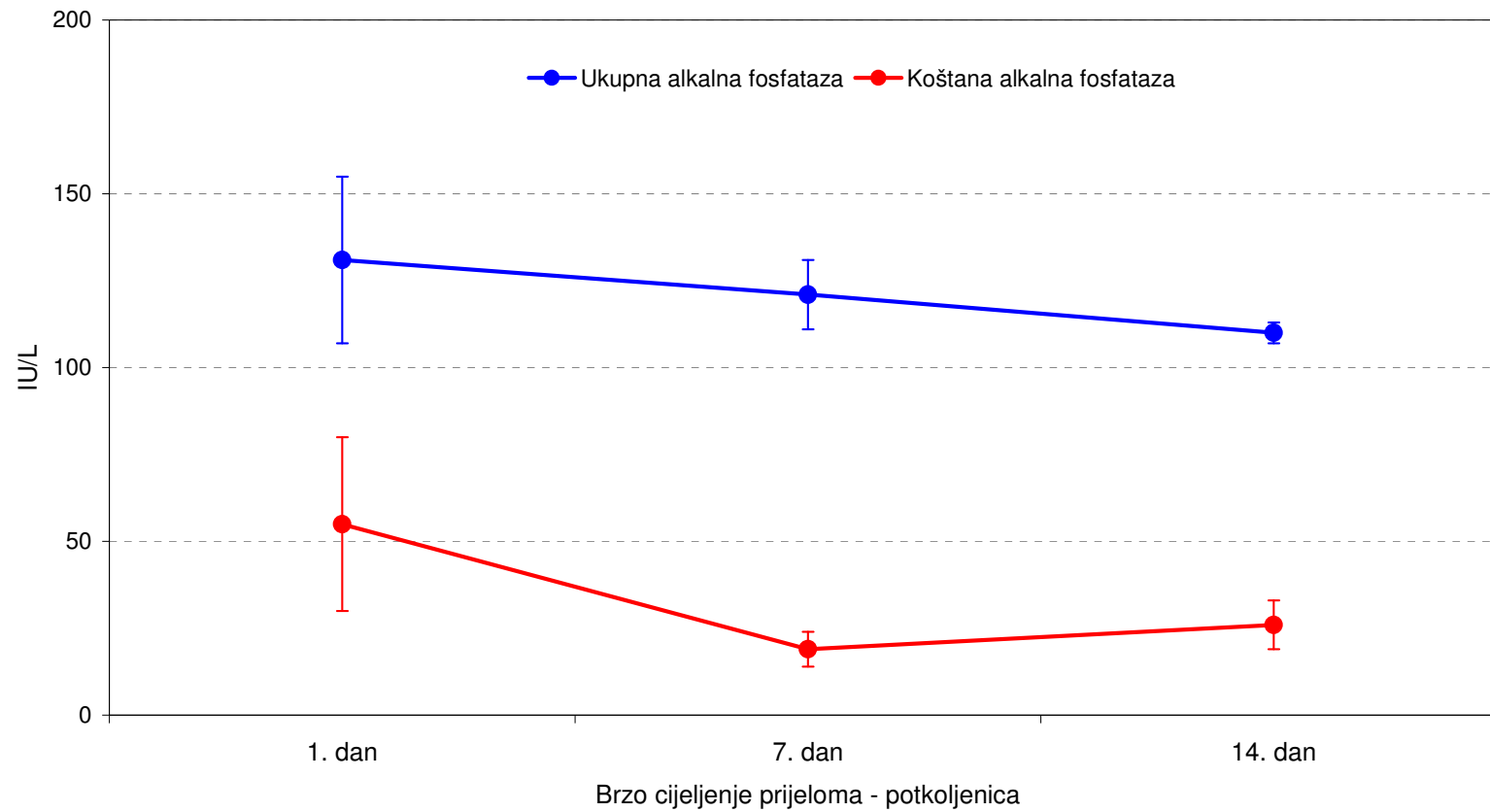


Slika 4.3.10. Prikaz aritmetičke sredine \pm S.E. ukupne i koštane alkalne fosfataze po danima za skupinu brzog cijeljenja prijeloma

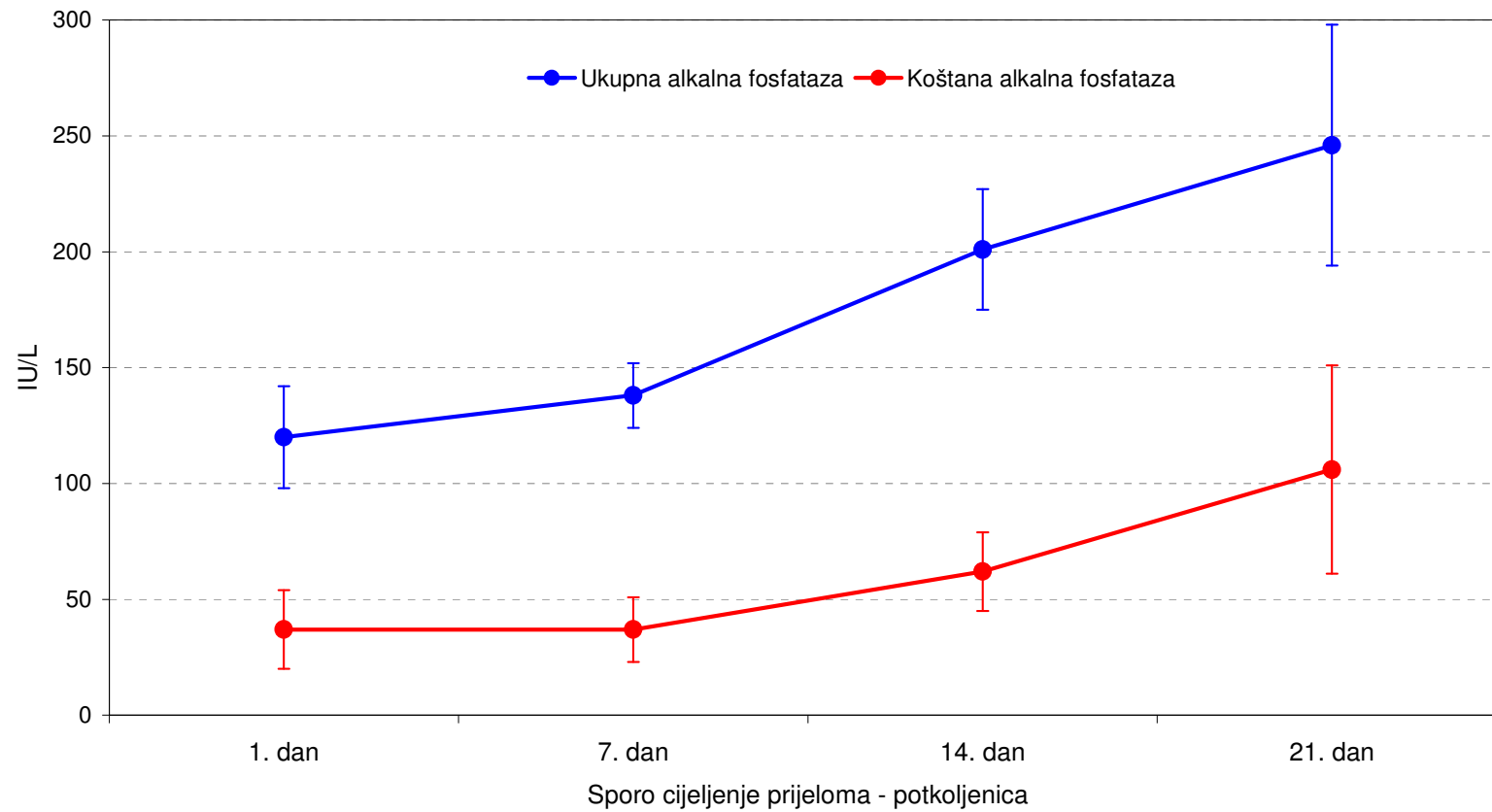


Slika 4.3.11. Prikaz aritmetičke sredine \pm S.E. ukupne i koštane alkalne fosfataze po danima za skupinu sporog cijeljenja prijeloma

Uzmemo li u obzir samo skupinu ispitanika s prijelomom potkoljenice i promatramo li unutar te skupine grupu ispitanika kod koje su promjene vrijednosti ukupne alkalne fosfataze i koštane alkalne fosfataze po danima ispitivanja povezane s brzim cijeljenjem prijeloma i grupu ispitanika kod koje su vrijednosti istih parametara povezane sa sporim cijeljenjem koštanog prijeloma uočiti ćemo slijedeće: za grupu ispitanika s brzim cijeljenjem prijeloma potkoljenice vidan je pad vrijednosti ukupne i koštane alkalne fosfataze 7. i 14. dana u odnosu na vrijednost istih parametara izmjerenu 1. dana ispitivanja (slika 4.3.12). Za grupu ispitanika sporog cijeljenja prijeloma potkoljenice vidan je porast ukupne i koštane alkalne fosfataze 7., 14. i 21. dana nakon traume u odnosu na vrijednost izmjerenu 1. dana nakon traume (slika 4.3.13).

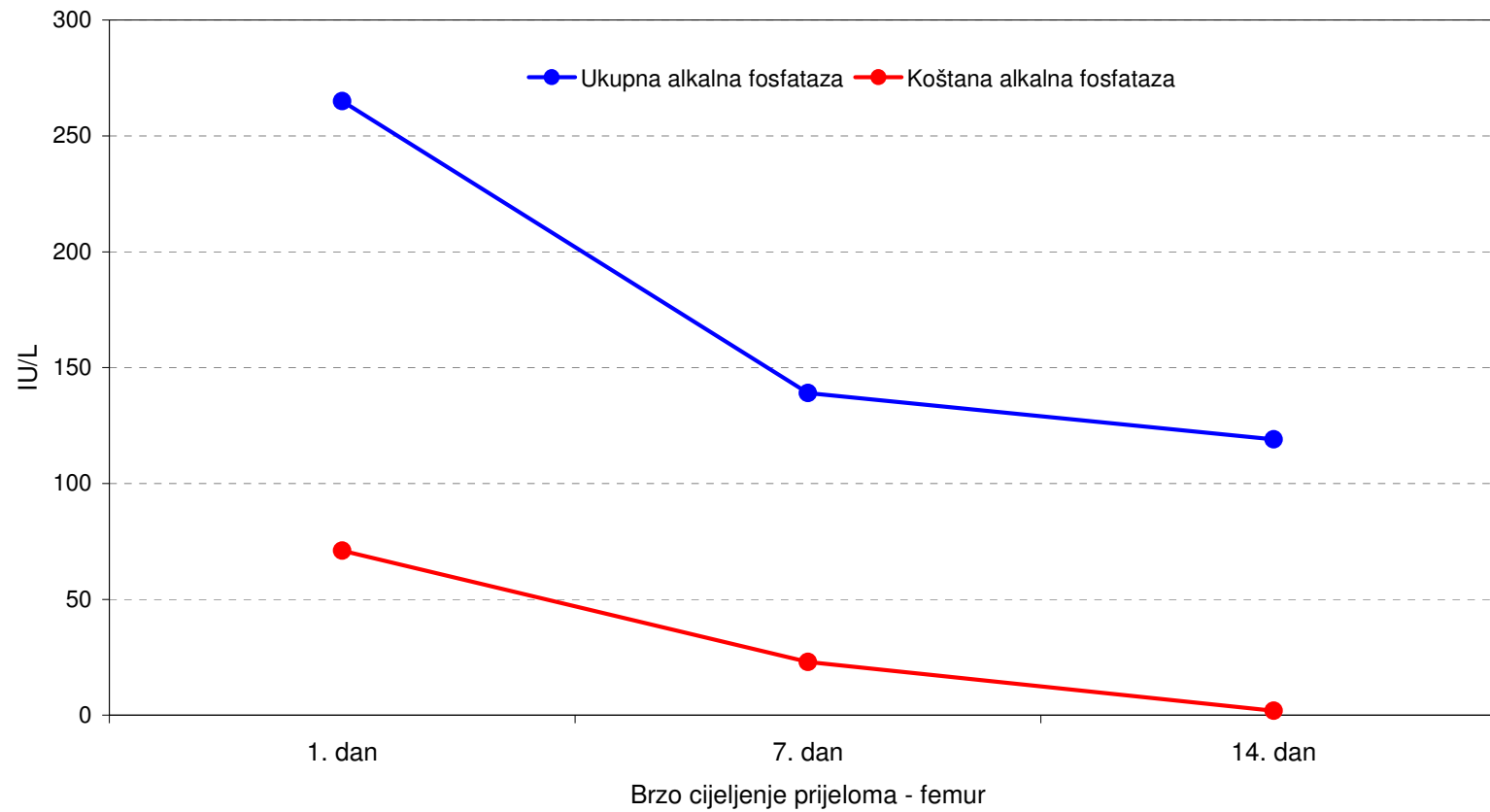


Slika 4.3.12. Prikaz aritmetičke sredine \pm S.E. ukupne i koštane alkalne fosfataze po danima za skupinu s brzim cijeljenjem prijeloma potkoljenice

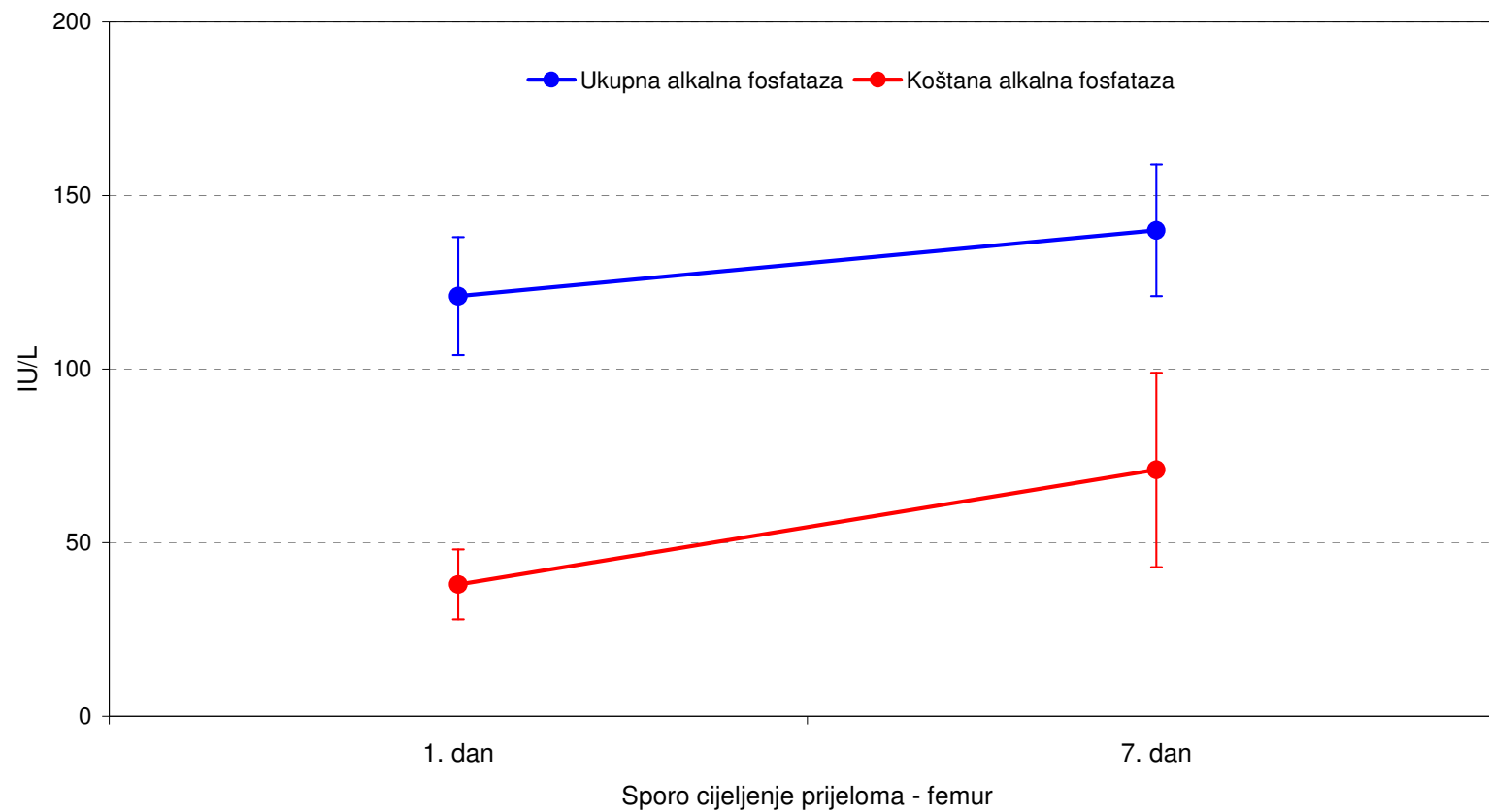


Slika 4.3.13. Prikaz aritmetičke sredine \pm S.E. ukupne i koštane alkalne fosfataze po danima za skupinu sporog cijeljenja prijeloma potkoljenice

Uzmemo li u obzir samo skupinu ispitanika s prijelomom femura i promatramo li unutar te skupine grupu ispitanika kod koje su promjene vrijednosti ukupne alkalne fosfataze i koštane alkalne fosfataze po danima ispitivanja, povezane s brzim cijeljenjem prijeloma i grupu ispitanika kod koje su vrijednosti istih parametara povezane sa sporim cijeljenjem koštanog prijeloma uočiti ćemo slijedeće: za grupu ispitanika s brzim cijeljenjem prijeloma femura vidan je pad vrijednosti ukupne i koštane alkalne fosfataze 7. i 14. dana u odnosu na vrijednost istih parametara izmjerenu 1. dana ispitivanja (slika 4.3.14). Za grupu ispitanika sporog cijeljenja prijeloma potkoljenice vidan je porast ukupne i koštane alkalne fosfataze 7. dana nakon traume u odnosu na vrijednost izmjerenu 1. dana nakon traume (4.3.15).



Slika 4.3.14. Prikaz aritmetičke sredine \pm S.E. ukupne i koštane alkalne fosfataze po danima za brzo cijeljenje prijeloma femura



Slika 4.3.15. Prikaz aritmetičke sredine \pm S.E. ukupne i koštane alkalne fosfataze po danima za skupinu sporog cijeljenja prijeloma femura

4.4. Volumen kalusa

Volumen stvorenog kalusa nakon završetka liječenja i uspješno završenog koštanog cijeljenja operacijski liječenih prijeloma izračunat je za svakog ispitanika. Volumen stvorenog kalusa po lokaciji prijeloma za sve ispitanike prikazan je na tablici 4.4.1.

Volumen kalusa (cm ³)						
Lokacija prijeloma	N	Aritmetička sredina	Medijan	S.D.	Najmanja vrijednost	Najveća vrijednost
Potkoljenica	33	8,64	3,96	14,80	,00	72,45
Femur	7	40,13	29,06	41,33	,00	113,04
Humerus	1	25,53		.		
Ukupno	41	14,43	5,28	24,04	,00	113,04

Tablica 4.4.1. Opis parametra volumen kalusa (cm³) po lokaciji prijeloma i ukupno

Volumen stvorenog kalusa prema lokaciji prijeloma i ishodu koštanog cijeljenja u ovisnosti o tome da li se radilo o brzom ili sporom cijeljenju prikazan je na tablici 4.4.2.

Volumen kalusa (cm ³)							
Lokacija prijeloma	Ishod koštanog cijeljenja	N	Aritmetička sredina	Medijan	S.D.	Najmanja vrijednost	Najveća vrijednost
Potkoljenica	brzo	14	1,31	,00	2,67	,00	9,05
	sporo	19	14,04	9,42	17,65	1,37	72,45
Femur	brzo	1	,00				
	sporo	6	46,82	31,25	40,91	11,23	113,04
Humerus	sporo	1	25,53		.		

Tablica 4.4.2. Opis parametra volumen kalusa (cm³) po lokacija prijeloma, ishodu koštanog cijeljenja i ukupno

Testiranjem razlike parametra volumena kalusa između ishoda cijeljenja kod potkoljenice Mann-Whitney U - testom nađena je statistički značajna razlika između ishoda cijeljenja u volumenu kalusa kod potkoljenice, s većim volumenom kalusa u sporog cijeljenja $Z=4,174$; $P<0,001$ (tablica 4.4.3).

	Volumen kalusa (cm ³)
Mann-Whitney U	20,000
Z	4,174
P	,000
Ishod cijeljenja: brzo-sporo	

Tablica 4.4.3. Testiranje razlika parametra volumena kalusa (cm³) između ishoda cijeljenja kod potkoljenice.

Nakon obrade podataka izračunata je korelacija volumena kalusa s ukupnom i koštanom alkalnom fosfatazom po danima kod potkoljenice (Tablica 4.4.4). Rezultati pokazuju da ne postoji statistički značajna korelacija volumena kalusa s ukupnom i koštanom alkalnom fosfatazom po danima kod potkoljenice.

		Ukupna alkalna fosfataza				Koštana alkalna fosfataza			
		1. dan	7. dan	14. dan	21. dan	1. dan	7. dan	14. dan	21. dan
Volumen kalusa (cm ³)	Koeficijent korelacije	,050	,197	,113	,250	,016	,132	-,060	,095
	P	,783	,272	,772	,685	,928	,465	,877	,879
	N	33	33	9	5	33	33	9	5

Tablica 4.4.4. Korelacija volumena kalusa (cm³) s ukupnom i koštanom alkalnom fosfatazom po danima kod potkoljenice

Kada smo iz cijele skupine potkoljenica uzeli u obzir grupu s brzim koštanim cijeljenjem potkoljenice te izračunali korelaciju volumena kalusa s ukupnom i koštanom alkalnom fosfatazom po danima ove grupe utvrdili smo da postoji statistički značajna korelacija volumena kalusa s ukupnom alkalnom fosfatazom u 1. danu $r = 0,849$; $P < 0,01$, te s koštanom alkalnom fosfatazom u 1. danu $r = 0,785$; $P = 0,001$ i 7. danu $r = 0,0564$; $P = 0,036$ (tablica 4.4.5).

		Ukupna alkalna fosfataza		Košтана alkalna fosfataza	
		1. dan	7. dan	1. dan	7. dan
Volumen kalusa (cm ³)	Koeficijent korelacije	,849	,522	,785	,564
	P	,000	,056	,001	,036
	N	14	14	14	14

Tablica 4.4.5. Korelacija volumena kalusa (cm³) s ukupnom i koštanom alkalnom fosfatazom po danima kod potkoljenice za brzo cijeljenje prijeloma

Kada smo iz cijele skupine potkoljenica uzeli u obzir grupu sa sporim koštanim cijeljenjem te izračunali korelaciju volumena kalusa s ukupnom i koštanom alkalnom fosfatazom po danima ove grupe utvrdili smo da ne postoji statistički značajna korelacija volumena kalusa s ukupnom i koštanom alkalnom fosfatazom po danima sa sporim cijeljenjem koštanog prijeloma (tablica 4.4.6).

		Ukupna alkalna fosfataza				Košтана alkalna fosfataza			
		1. dan	7. dan	14. dan	21. dan	1. dan	7. dan	14. dan	21. dan
Volumen kalusa (cm ³)	Koeficijent korelacije	,023	,125	-,181	,250	,001	,042	-,282	,095
	P	,925	,611	,698	,685	,998	,865	,540	,879
	N	19	19	7	5	19	19	7	5

Tablica 4.4.6. Korelacija volumena kalusa (cm³) s ukupnom i koštanom alkalnom fosfatazom po danima kod potkoljenice sporog cijeljenje prijeloma

Kada smo uzeli samo skupinu ispitanika s prijelomom femura i izračunali korelaciju volumena kalusa s ukupnom i koštanom alkalnom fosfatazom po danima utvrdili smo da postoji statistički značajna korelacija volumena kalusa s koštanom alkalnom fosfatazom u 7. danu $r = 0,944$; $P = 0,001$ (tablica 4.4.7).

		Ukupna alkalna fosfataza		Koštana alkalna fosfataza	
		1. dan	7. dan	1. dan	7. dan
Volumen kalusa (cm ³)	Koeficijent korelacije	-,352	,555	-,126	,944
	P	,439	,196	,788	,001
	N	7	7	7	7

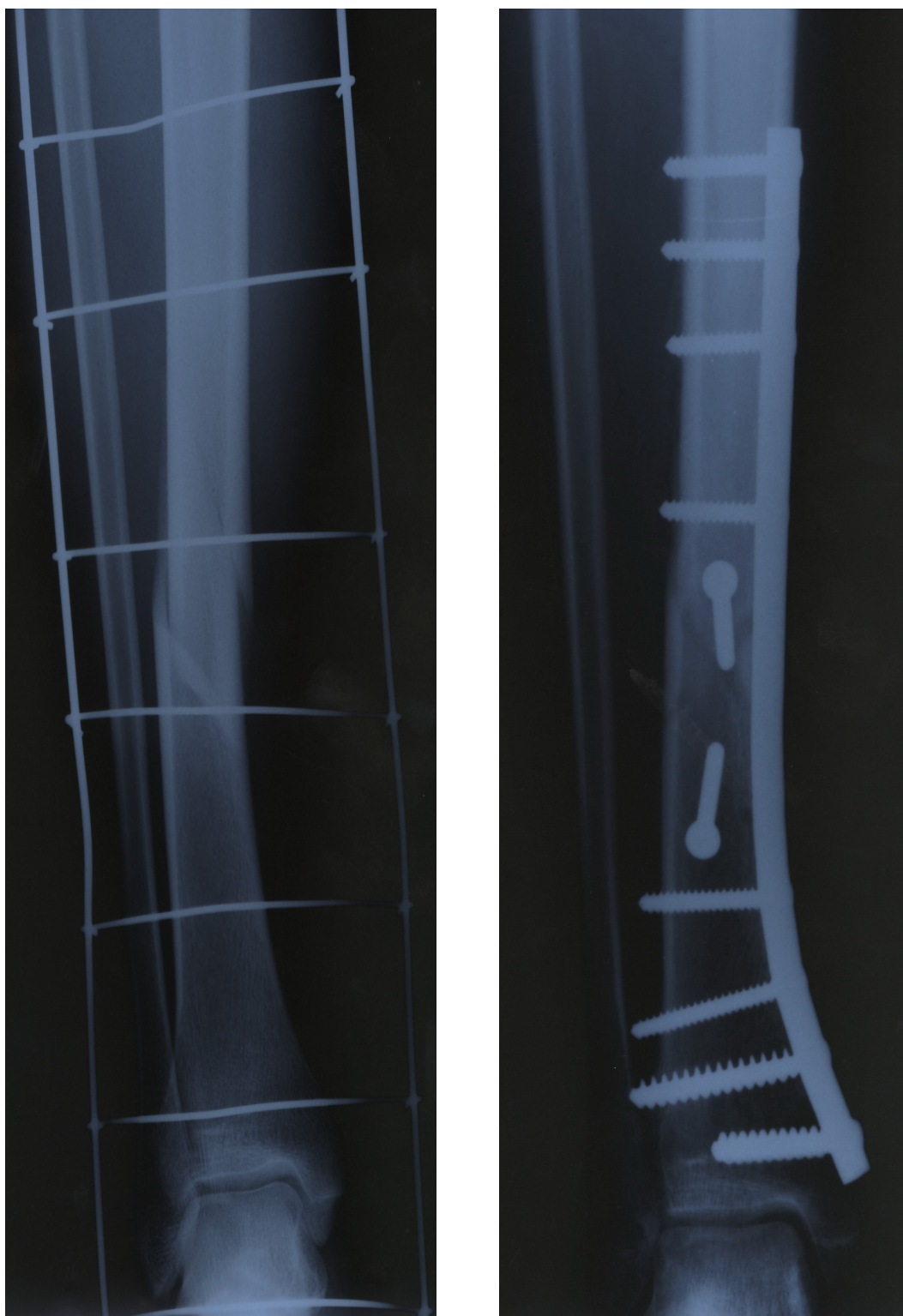
Tablica 4.4.7. Korelacija volumena kalusa (cm³) s ukupnom i koštanom alkalnom fosfatazom po danima kod femura.

Stvaranje kalusa vidljivo je nakon duljeg vremenskog perioda tj. nakon završetka koštanog cijeljenja prijeloma. Naše istraživanje, prema naprijed iznesenim rezultatima, ukazuje da mjerenje vrijednosti alkalne fosfataze i koštanog izoenzima prvog, sedmog i četrnaestog dana nakon traume, može ukazati na ishod i brzinu cijeljenja koštanog prijeloma.

Primjeri cijeljenja prijeloma ispitanika

Istaknuti primjer, praktično potpune stabilnosti koštanih ulomaka nakon izvršene osteosinteze s brzom koštanom sanacijom prikazan je u slučaju bolesnika V.A. Vrijednost alkalne fosfataze je 1. dan iznosila 81 U/L., 7. dan 62 U/L., a 14. dan 42 U/L. Promjene aktivnosti koštanog izoenzima praćene su mjerenjima na iste dane. Vrijednosti mjerenja koštanog izoenzima iznosile su 1. dana 45 U/L., 7. dana 9 U/L., a 14. dana 7 U/L. Navedene vrijednosti pratilo je na rendgenskoj snimci stvaranje praktički nevidljivog kalusa (Slika 8).

Suprotnost ovom primjeru je primjer bolesnika B.I., kod kojeg se stvorio izrazito veliki volumen kalusa (Slika 9), što ukazuje na nestabilnost izvršene osteosinteze i kod kojeg je koštana sanacija vremenski znatno produljena. U ovom slučaju vrijednost alkalne fosfataze je 1. dana iznosila 128 U/L., 7. dana 195 U/L., 14. dana 257 U/L. Vrijednost mjerenja koštanog izoenzima iznosila je 1. dana 58 U/L., 7. dana 178 U/L., a 14. dana 272 U/L, a volumen kalusa 113cm^3 . Prema tome, određivanje vrijednosti navedenih biokemijskih parametara vremenski neposredno nakon traume, ukazuje ranije od svih do danas poznatih indikatora, na procjenu brzine sanacije koštanog prijeloma, je li operacijski zahvat kvalitetno izveden i što je još važnije, koliko brzo će prijelom koštano zacijeliti.



Slika 8. Operacijski liječen prijelom stabilnom osteosintezom, brzim koštanim cijeljenjem s padom vrijednosti alkalne fosfataze i koštanog izoenzima, bez radiološki vidljivog stvaranja kalusa.



Slika 9. Operacijski liječen prijelom nestabilnom osteosintezom sa sporim koštanim cijeljenjem, s porastom vrijednosti alkalne fosfataze i koštanog izoenzima, uz radiološki vidljivo stvaranje velikog volumena kalusa (113 cm^3).

5. RASPRAVA

U suvremenoj stručnoj literaturi postoji dovoljno dokaza koji upućuju da biokemijski pokazatelji koštane pregradnje omogućuju uvid u dinamiku pregradnje, rasta i cijeljenja kosti. (6). Već je niz godina poznato da enzim alkalna fosfataza sudjeluje u biološkim procesima okoštavanja. Ovaj je biokemijski pokazatelj izgradnje kosti specifičan za koštano tkivo i u kliničkoj primjeni bolji u procjeni stanja pregradnje kosti. Mjerenjem aktivnosti ukupne alkalne fosfataze također je moguća procjena izgradnje kosti, osim u slučaju bolesti jetre. U odraslih ljudi polovicu aktivnosti ukupne alkalne fosfataze čini koštani izoenzim, a drugu polovicu jetreni izoenzim. Svi pokazatelji koštane pregradnje mjere se u krvi. (6). Prema kriteriju sanacije, pacijente s prijelomima dugih kostiju možemo podijeliti u dvije grupe: grupu koja se liječi konzervativno tj. različitim oblicima imobilizacije, te grupu koja se liječi operativno tj. jednom od metoda kompresijske osteosinteze-ekstramedularno (različiti oblici pločica), odnosno uz pomoć raznih oblika usidrenih čavala-intramedularna osteosinteza (102). Kod konzervativno liječenih bolesnika utvrđeno je da se uvijek radi o vremenski produljenom cijeljenju s izraženim povećanjem vrijednosti alkalne fosfataze, četrnaestog dana nakon ozljede i izuzetno povećanim volumenom kalusa po završetku liječenja. Pacijenti liječeni operativno prema rezultatima istraživanja (102) diferencirani su u dvije grupe: bolesnici kod kojih je stvarno učinjena stabilna osteosinteza s utvrđenim malim ili minimalnim porastom alkalne fosfataze i volumena kalusa i bolesnici kod kojih nije uspjelo postići potpuno stabilnu osteosintezu s uočenim većim porastom alkalne fosfataze i odgovarajućeg kalusa što se podudara s rezultatima drugih autora (71,102). Naša istraživanja su pokazala da su promjene ukupne i koštane alkalne fosfataze podudarne za sve dane praćenja ispitanika. Statistički značajna i pozitivna korelacija obujma kalusa na kraju praćenja je postojala za brzo cijeljenje potkoljenice s ukupnom i koštanom alkalnom fosfatazom 1. dana i koštanom 7. dana. Kod femura je statistički značajna i pozitivna korelacija postojala s koštanom alkalnom fosfatazom 7. dana. Slično istraživanje su radili Bowles i suradnici (79,80) za skupinu potkoljenica. Prema rezultatima tih istraživanja, za razliku od naših rezultata, dolazi do smanjenja aktivnosti koštanog izoenzima. Bowles smatra da je to početno smanjenje posljedica sistemskog upalnog odgovora.

Količina koštane fosfataze proporcionalna je veličini kalusa. To je zaključak raznih istraživanja in vitro (88-90) i in vivo (91-93,1), ali samo na bazi komparacije. Rezultati ovog istraživanja s mjerenjem ukupne i koštane alkalne fosfataze se podudaraju s ovim literaturnim navodima. Kontinuirani porast ukupne i koštane alkalne fosfataze obilježava skupinu sporog cijeljenja za sve lokacije prijeloma, a što neizravno ukazuje na ishod s većim stvaranjem kalusa.

Prijelom kosti uzrokuje povećanje koštane pregradnje i biokemijskih pokazatelja pregradnje čak do 50%, s time da ti pokazatelji mogu ostati povišeni tijekom 6 – 12 mjeseci zbog staničnih zbivanja tijekom cijeljenja kosti (26). U našim rezultatima također je kod većeg broja pacijenata s razvijenim većim kalusom izmjeren porast koštanog izoenzima do 50% u razdoblju između prvog i četrnaestog dana.

Mnogobrojna istraživanja biokemijskih pokazatelja koštane pregradnje do danas su u većoj mjeri fokusirana na određena patološka stanja i bolesti. Tako su biokemijski pokazatelji dosad najbolje istraženi u praćenju učinka liječenja osteoporoze (95). Prema rezultatima naših istraživanja alkalna fosfataza dosiže maksimum četrnaestog dana od ozljeđivanja, što se razlikuje od rezultata (66-67) gdje je maksimum vrijednosti alkalne fosfataze izmjeren tek 21. dana. U našim istraživanjima nije izmjeren početni pad vrijednosti ukupne alkalne fosfataze kao što je izmjereno u istraživanjima Bowlesa (79), Jingušija (84) i Joeringa (85), već je poput rezultata Leunga (2) i Onija (81) u našim istraživanjima zabilježen porast vrijednosti već od prvog dana.

Različiti rezultati napomenutih autora mogu se objasniti kompleksnošću faktora koji utječu na vrijednosti alkalne fosfataze u krvi, ali i razlikama u provedenom istraživanju. To uključuje utjecaj dnevnog ritma koštane pregradnje, utjecaj godišnjeg doba, životne dobi, spola i etničke pripadnosti. Maksimalne vrijednosti u krvi nalaze se u pubertetu zbog tjelesnog rasta. Kod žena u menopauzi i postmenopauzi pregradnja kosti je većeg intenziteta nego u žena generativne dobi, i veća je od muškaraca iste dobi. U muškaraca je koncentracija pokazatelja pregradnje veća nego u žena do menopauze.

Viša koncentracija vrijednosti pokazatelja koštane pregradnje kod muškaraca uočena je u dobi od 20 do 30 godina i od 50 do 60 godina.

Etničke razlike u osobitostima koštanog metabolizma očituju se u smanjenim vrijednostima kod pripadnika crnačke rase. Dnevna kolebanja biokemijskih parametara koštane pregradnje uočavaju se većim koncentracijama između 2 i 8 sati i nižim između 13 i 23 sata. Veličina ovih kolebanja može iznasti i do 50%. Za koštani izoenzim dokazano je povećanje između 11 i 14 sati i 23 i 24 sata. Povećana tjelesna aktivnost također može dovesti do promjene biokemijskih pokazatelja koštane pregradnje 15-40% u razdoblju od 24 do 72 sata nakon fizičkog napora. U profesionalnih sportaša vrijednosti faktora koštane pregradnje razlikuju se od one u ostalog stanovništva (103-105).

Uzimajući u obzir navedene čimbenike, odnosno znatne biološke varijabilnosti biokemijskih pokazatelja koštane pregradnje, objašnjivi su različiti rezultati istraživanja na tom području, te se nameće potreba za pažljivijim uočavanjem uzroka vezanih uz uvjete i vrijeme praćenja pojedinih ispitanika ili skupine ispitanika. Na taj način bi se izbjegao neželjen učinak čimbenika koji povećavaju varijaciju i posljedično prikrivaju kliničku pojavu ili promjenu koja se želi istražiti, a rezultati bi se lakše uspoređivali. Različita patološka stanja praćena su promjenama metabolizma kosti. Bolesti žlijezda s unutarnjim izlučivanjem, bolesti probavnog sustava kao što su Crohnova bolest, ulcerozni kolitis (106), osteogenesis imperfecta (107), morbus Paget (108) ili fibrozna displazija (109) praćene su pojavom povišenih vrijednosti pokazatelja koštanog metabolizma. Slične promjene nalaze se i kod renalne osteodistrofije, metaboličke koštane bolesti, kronične dijalize i presađivanja bubrega (110).

Zloćudne bolesti s metastazama u kostima (karcinom prostate) također pokazuju povišene vrijednosti biokemijskih parametara (111).

Sve to upućuje na to koliko je nužno za istraživanje parametara koštane aktivnosti u procesu cijeljenja kosti uzeti detaljne anamnestičke podatke ispitanika i za istraživanje izdvojiti samo potpuno zdrave osobe, kako bi se izbjegli iskrivljeni rezultati zbog utjecaja navedenih patoloških stanja i njihovog utjecaja na promjene vrijednosti.

Značaj promjena vrijednosti koštanog izoenzima nakon traume, predmet je istraživanja Laurera i suradnika (112). U ovom istraživanju obrađeno je 66 bolesnika, starijih od osamnaest godina bez poznatog ranijeg koštanog oboljenja.

Bolesnici su svrstani u pet skupina i to: skupinu koja je imala samo traumu mekih tkiva; skupinu s izoliranim prijelomima dijafize dugih kostiju (femura ili tibije); skupinu politraumatiziranih; skupinu s prijelomom pertrohanetne regije i skupinu s prijelomom vrata femura.

Slično našem istraživanju, vrijednosti koštanog izoenzima mjerene su prvog, sedmog i četrnaestog dana nakon traume te također nakon četvrtog, osmog, dvanaestog i dvadesetog tjedna. Za razliku od našeg istraživanja, vrijednost koštanog izoenzima mjerena je u prvom tjednu drugog, trećeg i četvrtog dana. Sve skupine kod kojih se radilo o prijelomima pokazale su porast vrijednosti koštanog izoenzima. Statistički značajan porast koštanog izoenzima dokazan je jedino u grupi s prijelomima dugih kostiju. Jednako tako je i naše istraživanje, u kojem su isključivo uzeti u obzir prijelomi dugih kostiju, pokazalo statistički značajan porast koštanog izoenzima već sedmog dana nakon prijeloma kod onih sa sporim cijeljenjem.

Za razliku od ovog istraživanja postoje i druga koja su ispitivala aktivnost koštanog izoenzima nakon izoliranog prijeloma tibije (79, 94). Ova istraživanja pokazala su smanjenje aktivnosti koštanog izoenzima četiri do osam dana nakon prijeloma. Upravo suprotno ovim rezultatima Leung i suradnici (2) izvjestili su o povećanju vrijednosti koštanog izoenzima neposredno nakon prijeloma. Dakle, rezultati praćenja vrijednosti koštanog izoenzima nakon prijeloma pokazuju u određenim ispitivanjima pad vrijednosti tijekom prvog tjedna, a druga provedena istraživanja su sukladna našim rezultatima, kao npr. istraživanja Leung i suradnika, koji pokazuju porast vrijednosti koštanog izoenzima. Razlog toj različitosti mogao bi biti u tome da je Leung sa suradnicima, slično kao i u našem istraživanju, mjerio vrijednosti koštanog izoenzima svaka dva tjedna te je zbog navedenog propustio registrirati promjene aktivnosti koštanog izoenzima tijekom prvih dana nakon traume.

Smanjenje aktivnosti koštanog izoenzima prvih dana nakon traume moglo bi biti u vezi s nekim drugim događanjima nakon traume. Naime, određena ispitivanja ukazuju na tzv. upalni odgovor organizma na traumu (96). Poznato je da citokini, koje otpuštaju različite aktivirane upalne stanice nakon traume (81, 96, 113, 114) mogu prvotno smanjiti aktivnost koštanog izoenzima izravno ili aktivacijom prostaglandinskog procesa.

Poznato je isto tako, da je interleukin 1 (IL-1) čimbenik razgradnje kosti (115) i da dovodi do smanjenja pokazatelja izgradnje. U nastavku procesa izazvanog traumom dolazi do stimulacije, umnažanja i proliferacije osteoblasta (116), što je neophodno za koštanu sanaciju.

U novijim istraživanjima biokemijskih pokazatelja koja se dovode u vezu sa sanacijom koštanog prijeloma, neki autori su na velikom uzorku ispitali kako se biokemijski pokazatelji koštane pregradnje mijenjaju u odnosu na ranije pretrpljeni prijelom (117). U studiju je uključen uzorak od 1024 žene, sve u dobi od 75 godina koje su u zadnje dvije godine prije pregleda imale najmanje jedan prijelom, najčešće je to bio prijelom u predjelu kuka. Među ispitivanim biokemijskim parametrima jedino je koštani izoenzim pokazao statistički značajno povećanje aktivnosti. Jednako tako postoje indicije koje ukazuju da bi koštani izoenzim također sudjelovao u procesu mineralizacije (118). Za razliku od ove skupine u našem istraživanju sudjelovali su ispitanici oba spola, i to s prosječnom dobi od 37 godina za muškarce i 47 godina za žene.

U našem istraživanju cijeljenja prijeloma dugih kostiju pokazali smo podudarne i usporedne promjene ukupne i koštane alkalne fosfataze tijekom cijelog razdoblja praćenja. Posebno je važno istaknuti da je ovisno o ishodu, već 7. dana došlo do porasta vrijednosti aktivnosti ukupne i koštane alkalne fosfataze kod sporog, odnosno opadanja kod brzog koštanog cijeljenja. Ovo je važan rezultat, budući da ukazuje na moguću prognostičku vrijednost ovog kliničkog biokemijskog parametra u praćenju uspješnosti kirurškog cijeljenja prijeloma dugih kostiju. Rezultati našeg istraživanja ukazuju da se rane promjene ovih enzima podudaraju s učinkovitosti i kvalitetom samog operacijskog zahvata.

Za kliničku primjenu mjerenja ukupne i koštane alkalne fosfataze sa svrhom ranog uočavanja ishoda cijeljenja i/ili procjene uspješnosti zahvata potrebna su daljnja istraživanja. Važno je istaknuti kako je standardna metoda praćenja cijeljenja kosti bolesnika obavljana pomoću rendgenskog snimanja. Do sada u dostupnoj literaturi nema dokaza za postojanje preporuke dobre kliničke prakse za rutinsku primjenu ovih analiza i njihovo kliničko značenje u prognozi ishoda cijeljenja dugih kostiju. Naše istraživanje je doprinjelo boljem poznavanju biologije cijeljenja kosti i mogućnosti primjene kliničko-biokemijskog praćenja cijeljenja.

6. ZAKLJUČCI

U ovom istraživanju cijeljenja kirurški zbrinutih prijeloma dugih kostiju mjerene su ukupna i koštana alkalna fosfataza tj. koštani izoenzim 1., 7., 14. i 21. dana nakon traume. Na kraju praćenog razdoblja u analizu je uključena i procjena obujma kalusa. Rezultati ovog istraživanja su pokazali:

- podudarnost promjena ukupne i koštane alkalne fosfataze tijekom cijelog praćenog razdoblja, što se očekivalo budući da je aktivnost koštane alkalne fosfataze izračunata.
- nije bilo razlike u ishodu cijeljenja, te vrijednostima aktivnosti ukupne i koštane alkalne fosfataze ovisno o lokaciji prijeloma tj. potkoljenici, femuru i humerusu, što ukazuje na homogenost proučavane skupine.
- ovisno o ishodu cijeljenja, razlike ukupne i koštane alkalne fosfataze su dokazane već 7. dana nakon prijeloma.
- kod brzog cijeljenja prijeloma već 7. dana nakon traume snizuju se aktivnosti ukupne i koštane alkalne fosfataze.
- kod sporog cijeljenja prijeloma uočava se kontinuirani porast aktivnosti ukupne i koštane alkalne fosfataze nakon prijeloma.
- obujam kalusa na kraju praćenja statistički je značajno i pozitivno korelirao samo kod brzog cijeljenja potkoljenice s vrijednostima ukupne alkalne fosfataze 1. dana, te koštane alkalne fosfataze 1. i 7. dana. Za femur je ova povezanost ustanovljena za 7. dan s koštanom alkalnom fosfatazom.
- rezultati istraživanja ukazuju na moguće prognostičko značenje mjerenja aktivnosti ukupne i koštane alkalne fosfataze kod kirurški zbrinutih prijeloma dugih kostiju, budući da se razlika između sporog i brzog cijeljenja u ovoj skupini ispitanika mogla uočiti već nakon 7. dana.
- Ishod cijeljenja prijeloma izravno ovisi o uspješnosti kirurškog zahvata, te su promjene ukupne i koštane alkalne fosfataze već nakon 7. dana dodatni pokazatelji učinkovitog zahvata osteosinteze.

- rezultati istraživanja ukazuju na moguću razliku u biologiji koštanog cijeljenja uvjetovanoj uspjehom i kvalitetom kirurškog zahvata, što uključuje vjerojatno proliferaciju većeg broja stanica (osteoblasta) tijekom duljeg razdoblja pri sporijem cijeljenju uslijed slabije učinkovitosti osteosinteze.

7. SAŽETAK

Aktivnosti ukupne i koštane alkalne fosfataze povezane su s procesima izgradnje kosti, nužnih kod cijeljenja prijeloma. Svrha našeg istraživanja bila je ispitati povezanost ukupne i koštane alkalne fosfataze s tijekom i osobitostima cijeljenja kirurški zbrinutih prijeloma dugih kostiju. Dosadašnji postupci utvrđivanja koštanog cijeljenja vrijednovali su subjektivni stav bolesnika i praćenje rendgenskim snimanjem. U ovom istraživanju aktivnost ukupnog i koštanog izoenzima određivana je u serumu 41 bolesnika s prijelomom dugih kostiju. Od 41 obrađenog bolesnika, 26 su bili muškarci, a 15 žene. Svi pacijenti liječeni su operacijski i kirurški su sanirani. Aktivnost alkalne fosfataze i koštanog izoenzima određivana je u serumu bolesnika svakih sedam dana tijekom četiriju tjedana. Isti bolesnici su praćeni i radiološki periodičnim kontrolama tijekom više mjeseci. Naše ispitanike, prema rezultatima istraživanja, mogli smo podijeliti u dvije skupine: skupinu ispitanika s prijelomom dugih kostiju karakteriziranom brzim cijeljenjem koštanog prijeloma i skupinu ispitanika s prijelomom dugih kostiju karakteriziranom sporim cijeljenjem koštanog prijeloma. Vrijednosti ukupne i koštane alkalne fosfataze podudaraju se tijekom cijelog praćenja. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je ovisno o ishodu, već 7. dana došlo do porasta vrijednosti aktivnosti ukupne i koštane alkalne fosfataze kod sporog, odnosno do opadanja kod brzog koštanog cijeljenja. Ovo je važan rezultat jer ukazuje na moguću prognostičku vrijednost tog kliničkog biokemijskog parametra u praćenju uspješnosti kirurškog cijeljenja prijeloma dugih kostiju. Nije bilo razlika ovisno o lokaciji prijeloma. Također se rane promjene ovih enzima podudaraju s učinkovitosti i kvalitetom samog operacijskog zahvata.

8.SUMMARY

Total and bone alkaline phosphatase are indicators of bone formation, a process essential in bone healing. The aim of this study was assessment of relationship of both total and bone alkaline phosphatase with the course and outcome of surgically treated long bone fractures. Standard assessment of fracture healing process is based on patient's own evaluation and radiographic findings. In this study total and bone alkaline phosphatase were measured in 41 patients with a long bone fracture, comprising 26 men and 15 women. All patients were surgically treated. Total and bone alkaline phosphatase were measured in sera on day 1, 7, 14 and 21 after sustaining injury. Patient monitoring included X-ray. According to the outcome, patients were divided into two groups: with rapid and slow healing. Total and bone alkaline phosphatase showed parallel trends in the course of this study. Depending on the healing outcome, on day 7 an increase in the case of slow healing, or decrease in the case of rapid healing, for both bone and total alkaline phosphatase was observed. No difference was found between locations of bone fracture. This is an important result indicating the prognostic significance of total and bone alkaline phosphatase measurement in the monitoring of long bone fracture healing. Also an early change of these enzymes was associated with the efficiency and skilfulness of the surgery.

9. LITERATURA

1. Van Straalen JP, Sanders E, Prummel MF. Bone alkaline phosphatase as indicator of bone formation. *Clin Chim Acta* 1991;201:27-34.
2. Leung KS, Fung KP, Sher AHL, Li CK, Lee KM. Plasma bone-specific alkaline phosphatase as an indicator of osteoblastic activity. *J Bone Joint Surg* 1993;75:288-92.
3. Junqueira LC, Caneiro J, Kelley RO. Osnove histologije, Zagreb: Školska knjiga,1999;141-162.
4. Taylor JF. The periosteum and bone growth. U: Hall BK. Ur. Bone, vol Boca Raton: CRC,1992;21-52.
5. Cornell CN, Lane JM. Current understanding of osteoconduction in bone regeneration. *Clin Orthop* 1998;355:267-73.
6. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop* 1998;355:7-21.
7. Vrhovac B i sur. Interna medicina. 3. promjenjeno i dopunjeno izdanje: Zagreb; 2003: 1427-1459.
8. Sarmiento A, Latta LL. Functional Fracture Bracing, Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag;1995.
9. Claes L, Augat P, Suger G, et al. Influence of size and stability of the osteotomy gap on the success of fracture healing. *J. Orthop Res*;1997; 15 (4):577-584.
10. Claes LE, Heigele CA, Neidlinger-Wilke C, et al. Effects of mechanical factors on the fracture healing process. *Clin. Orthop*; 1998;355 Suppl:132-147.
11. Frost HM. The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I. *Clin Orthop* 1987;7:283-293.
12. Frost HM. The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part II. *Clin Orthop* 1987;7:294-309.
13. Bidner SM. Evidence for a humoral mechanism for enhanced osteogenesis after head injury. *J Bone Joint Surg* 1990;72:1144-1149.
14. Einhorn TA, Simon G, Devlin VJ, Warman J, Sidhu SPS, Vigorita VJ. The osteogenic response to distant skeletal injury. *J Bone Joint Surg* 1990;72:1374-1378.
15. Perkins R. Callus formation and the rate of healing of femoral fractures in patients with several head injuries. *J Bone Joint Surg* 1987; 69:521-524.

16. Smith R. Head injury, fracture healing and callus. *J Bone Joint Surg* 1987;69:518-520.
17. Spencer RF. The effect of head injury on fracture healing. *J Bone Joint Surg* 1987;69:525-528.
18. Wildburger R, Zarkovic N, Dobnig H, Petek W, Hofer HP. Post-traumatic change of carboxyterminal propeptide of type I procollagen, alkaline phosphatase and its isoenzymes as predictor for enhanced osteogenesis in patient with severe head injury. *Res Exp Med* 1994;194:247-259.
19. Weber BG, Cech O. *Pseudoarthrosen*. Huber; Bern:1973.
20. Miller PD, Baran DT, Bilezikian JP, Greenspan SL, Lindsay R, Riggs BL et al. Practical clinical application of biochemical markers of bone turnover: consensus of an expert panel. *J Clins Densitom* 1999;2:323-342.
21. Riggs BL. Are biochemical markers for bone turnover clinically useful for monitoring therapy in individual osteoporotic patients; *Bone* 2000;26:551-552.
22. Delmas PD, Hardy P, Garnero P, Dain M. Monitoring individual response to hormone replacement therapy with bone markers. *Bone* 2000;26:553-560.
23. Bharnason NH, Christiansen C. Early response in biochemical markers predict long-term response in bone mass during hormone replacement therapy in early postmenopausal women. *Bone* 2000;26:561-569.
24. Carlson K, Laresson A, Simonsson B, Turesson I, Westin J, Ljunghall S. Evaluation of bone disease in multiple myeloma: a comparison between the resorption markers urinary deoxypyridinoline (DPD) and serum ICTP, and an avaluation pf the DPD (Osteocalcin and ICTP) osteocalcin ratio. *Eur J Haematol* 1999;62:300-306.
25. Nawawi H, Samson D, Apperley J, Girgis S. Biochemical bone markers in patient with multiple myeloma. *Clin Chim Acta* 1996;253:61-77.
26. Rosalki SB. Bone-origin alkaline phosphatase in plasma by wheat-germ lactin methods in bone disease. *Clin Chim Acta* 1994;226:143-150.
27. Emami A, Larsson A, Petren-Mallmin M, Larsson S. Serum bone markers after intramedullary fixed tibial fractures. *Clin Orthop* 1999;22-229.
28. Herrmann M, Klitscher D, Georg T, Frank J, Marzi I, Herrmann W. Different kinetics of bone markers in normal and delayed fracture healing of long bones. *Clin Chem* 2002;48:2263-2266.

29. Taniguchi T, Matsumoto T, Shindo H. Changes of serum levels of osteocalcin, alkaline phosphatase, IGF-I and IGF-binding protein-3 fracture healing. *Injury* 2003;34:477-9.
30. Johnson EE, Urist MR. Human bone morphogenetic protein allografting for reconstruction of femoral nonunion. *Clin Orthop* 2003;371:161-74.
31. Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, Cook SD, Cierny G, Muschler GF, Zych GA, Calhoun JH, LaForte AJ, Yin S. Osteogenic protein -1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J Bone Joint Surg Am.* 2002;suppl 1 (2):151-8.
32. Gitaij LR, Shimmin A, Friedlaender GE. Osteogenic protein-1 (OP-1) in the repair of bone defects and fractures of long bones: clinical experience. In: Vukicevic S, Sampath KT. *Bone morphogenetic protein: from laboratory to clinical practice.* Boston: Birkhauser, 2002:193-206.
33. Einhorn TA, Majeska RJ, Mohaideen A, Kagel EM, Bouxsein ML, Turek TJ, Wozney JM. A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85:1425-35.
34. Edwrdes RB, Seeherman HJ, Bogdanske JJ, Devitt J, Vanderby R Jr, Markel MD. Percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein -2 in calcium phosphatase paste accelerates healing of canine tibial osteotomy. *J Bone Joint Surg Am* 2004;86:1425-38.
35. Bragdon CR, Doherty AM, Rubash HE, Jasty M, Li HJ, Seeherman H, Harris WH. The efficiency of BMP-2 to induce bone ingrowth in a total hip replacement model. *Clin Orthop* 2003;417:50-61.
36. Mont MA, Regland PS, Biggins B et al. Use of bone morphogenetic proteins for musculoskeletal applications. *J Bone & Surg* 2004;86:41-55.
37. Geesink RG. Osteogenic activity of OPI one morphogenic protein (BMP-7) in a human fibular defect. *J Bone Joint Surg* 1999;81:708-10.
38. Freddi AH. Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg* 2001;83:1-6.
39. Raha BA, Gllinaro P, Baltensperger A. Primary bone healing. An experimental study in rabbit. *J Bone Joint Surg* 1971;14:183-6.
40. Perren SM. Biomechanical basis of fracture treatment. *Orthopade* 1992;21:3-10.

41. Cruess RL, Dumnont J. Fracture healing. *Can J Surg* 1975;18:403-13.
42. Lungerhausen W, Ullrich P. Biological osteosynthesis. *Zentralblatt fur Chirurgie* 1997;122:954-61.
43. Russell GV, Smith DG. Minimally invasive treatment of distal femur fractures: report of technique. *J Trauma* 1999;47:799-801.
44. Anko Antabak. Oštećenje periostalne cirkulacije nakon osteosinteze pločicama. Zagreb: Medicinski fakultet, 2005. Disertacija.
45. Chevigne R, Pourignaux F, Burke M. Isoenzimi della fosfatasi lalalina: interpretazione del sistema PARAGON ISOPAL. Quaderni Beckmann, 1990.
46. Štraus B. Medicinska biokemija. Zagreb: JUMENA, 1988.
47. Burlina. Izoenzymes as diagnostic indicators. *FEBS* 1980;61:115-20.
48. Crofton. Biochemistry of alkaline phosphatase isoenzymes. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1982;161-194.
49. Buckwalter JA, Einhorn TA, Bolander ME, Cruess RL Healing of the musculoskeletal tissues. In: Heckman JD. Ed. *Fractures in adults*, Philadelphia, New York : Lippincott-Raven, 1996; 261-304.
50. Einhorn TA. Enhancement of fracture healing. *J Bone Joint Surg Am* 1995; 77:940-956.
51. Nomura S, Takano-Yamamoto T. Molecular events caused by mechanical stress in bone. *Matrix Biol* 2000;19:91-96.
52. Canalis A, Centrella M, McCarthy T. Effects of basic fibroblast growth factor on bone formation in vitro. *J Clin Invest* 1988;81:1572-1577.
53. Rodan SB, Rodan GA. Fibroblast growth factor and platelet derived growth factor. Maxine Gowen. *Cytokines and bone metabolism*. Florida: Boca Raton, 1992;115-145.
54. Marušić A, Kušec V, Stavljenović-Rukavina A, Sertić J, Kušec R, Begović D. Kost: molekulska biologija uz bolesničku postelju. Zagreb: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 1991:7,8. (Biblioteka: Udžbenici i priručnici Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, sv. 19).
55. Silbermann M, Toister Z, Lewinson D. Glucocorticoid-induced changes in the activity of cartilage alkaline phosphatase. *Metab Bone Dis Rel Res* 1981;3:675.
56. Sarmiento A, Lotta LL. Closed functional treatment of fractures. Berlin: Springer, 1981.

57. Farley J, Hall S, Herring S, Tarbaux N, Matsuyama T, Wergedal J. Skeletal alkaline phosphatase specific activity is an indeks of osteoblastic phenotype in subpopulations of human osteosarcoma cell line. *Metabolism* 1986;40:664-71.
58. Farley J, Baylink D. Skeletal alkaline phosphatase as a bone formation indeks in vitro. *Metabolism* 1986;35:563-71.
59. Kjaersgaard-Andersen P, Pedersen P, Kristensen SS, Schmidt SA, Pedersen NW. Serum alkaline phosphatase as an indicator of heterotopic bone formation following total hip arthroplasty. *Clin Orthop* 1988;234:102-9.
60. Van Stralen JP, Sanders E, Prumel MF, Sanders GTB. Bone-alkaline phosphatase as indicator of bone formation. *Clin Chim Acta* 1991;201:27-34.
61. Kurdy O. Serology of abnormal fracture healing: The role of PIIINP, PICP, and BsALP. *J Orthop Trauma* 2000;14:48-53.
62. Kurdy NMG, Bowles S, March DR, Davies A, France M. Serology of collagen types I and III in normal healing of tibial shaft fractures. *J Orthop Trauma* 1998;12:122-126.
63. Stigbrand F. Human alkaline phosphatases. New York: Alan R Liss Inc, 1984.
64. Moss S. Alkaline phosphatases isoenzymes. *Clin Chem* 1982;28:2007-16.
65. Muljačić A. Aktivnost alkalne fosfataze u bolesnika s prijelomima kostiju. Zagreb: Medicinski fakultet 1993. Magistarski rad.
66. Robinson R. The possible significance of glucosa phosphoric ester in ossification. *Biochem J* 1993;17:286.
67. Fishman P. Perspectives an alkaline phosphatase isoenzymes. *Am J Med* 1974;56:616-51.
68. Mueller M, Allgoewer M, Schneider R, Willenegger H. Manual or internal fixation. 3rd edit Berlin: Springer-Verlag, 1991.
69. Baumgartl F, Kremer K, Cshreiber HW. Spezielle Chirurgie fuer die Praxis. Vol.1. Stuttgart: G. Thieme -Verlag, 1976.
70. Schauwecker F. Osteosynthesepraxis. Stuttgart: G Thieme -Verlag, 1981.
71. Schweiberer L. Konservative und operative Frakturbehandlung. U: Reitners chirurgische Operationslehre, Berlin: Reitner-Verlag, 1987.
72. Laurer HL, Hagenbourger O, Quast S, Herrmann W. Sequential changes and pattern of bone-specific alkaline phosphatase after trauma. *Eur J Trauma* 2000;26:33-38.

73. Wildburger R, Zarkovic N, Petek W, Egger W, Leopold U, Schweighofer F. Hypertrophe Kallusformation und Schadel-Hirn-Trauma: Fruhdiagnostik und das Verhalten des basischen Fibroblastenwachstumsfaktors. *Unfallchirurg* 1996;99:17-23.
74. Takami K, Iwane M, Kiyota Y, Miyamoto M, Tsukuda R, Shiosaka S. Increase of basic fibroblast growth factor immunoreactivity and its mRNA level in rat brain following transient forebrain ischemia. *Exp Brain Res* 1992;90:1-10.
75. Logan A, Frautschy SA, Gonzalez AM, Baird A. A time course for the focal elevation of synthesis of basic fibroblast growth factor and one of its high-affinity receptors following a localized cortical brain injury. *J Neurosci* 1992;12:1828-3837.
76. Heuwinkel R, Hofmann S, Kapp S, Prellwitz E. Spezielle Aspekte der Frakturheilung beim Schadenhirnverletzen. *Helv Chir Acta* 1978;45:582-85.
77. McLaren AC. Prophylaxis with indomethacin for heterotopic bone. *J Bone Joint Surg* 1990;72:245-247.
78. Ritter M. Indomethacin: An adjunct to surgical excision of immature heterotopic bone formation in a patient with severe head injury. *Orthopedics* 1987;10:1379.
79. Bowles SA, Kurdy N, Davis AM, France MW. Changes in serum bone-specific alkaline phosphatase following tibial fracture. *Ann Clin Biochem* 1997;34:690-691.
80. Bowles SA, Nazeer K, Davis AM, France MW, Marsh DA. Serum osteocalcin, total and bone-specific alkaline phosphatase following isolated tibial shaft fracture. *Ann Clin Biochem* 1996;33:130-42.
81. Oni OOA, Mahabir JP, Iqbal SJ, Gregg PJ. Serum osteocalcin and total alkaline. *Bone* 1998;3:17-22.
82. EriksenEF, Charles P, Melsen F, Mosekilde L, Risteli L, Risteli J. Serum markers of type I collagen formation and degradation in metabolic bone disease. Corelation to bone histomorphometry. *J Bone Miner Res* 1993;8:127-132.
83. Cattermole HC, Cook JE, Fordham JN, Muckle DS, Cunningham JL. One mineral changes during tibial healing. *Clin Orthop* 1997;339:190-196.
84. Jingushi S, Joyce ME, Bolander ME. Genetic expression of extracellular matrix proteins correlates with histologic changes during fracture repair. *J Bone Min Res.*1992;7:1045-1055.

85. Joerring S, Jensen LT, Andersen GR, Johansen JS. Types I and III procollagen extension peptides in serum respond to fracture in humans. *Arch Orthop Trauma Surg* 1992;111:265-267.
86. Lane JM, Suda M, von der Mark K, Timple R. Immunofluorescent localization of structural collagens types in endochondral fracture repair. *J Orthop Res* 1986; 4:318-329.
87. Page M, Hogg J, Ashhurst DE. The effect of mechanical stability on the macromolecules of the connective tissue matrices produced during fracture healing I. The collagens. *Histochem J* 1986;18:251-265.
88. Beck GR Jr, Sullivan EC, Moran E. Relationship between phosphatase levels, osteopontin expression, and mineralization in differentiating MC3T3-E1 osteoblasts. *J Cell Biochem* 1998.;68:269-80.
89. Farley J, Hall S, Herring S. Skeletal alkaline phosphatase specific activity is an index of osteoblastic phenotype in subpopulations of human osteosarcoma cell line SaOS. *Metabolism* 1986;40:664-71.
90. Farley J, Hall S, Herring S. Skeletal alkaline phosphatase as a bone formation indeks in vitro. *Metabolism* 1986;35:563-71.
91. Cormier C. Markers of bone metabolism. *Curr Opin Rheumatol* 1995;7:243-8.
92. Martin M, Van Hoof V, Couttenye M. Analytical and clinical evaluation of a method to quantify bone alkaline phosphatase, a marker of osteoblastic activity. *Anticancer Res* 1997;17:3167-70.
93. Rosalky SB, Foo AY, Burlina A. Multicenter evaluation of ISO-ALP test kit for measurement of bone alkaline phosphatase activity in serum and plasma. *Clin Chem Acta* 1993;39:648-52.
94. Bowles SA, Kurdy N, Davis AM. Serum osteocalcin, total and bone-specific alkaline phosphatase following isolated tibial shaft fracture. *Ann Clin Biochem* 1996;33:196-200.
95. Augat P, Simon U, Liedert A, Cleas L. Mechanics and mecano-biology of fracture healing in normal and osteoporotic bone. *Osteoporosis Int* 2005;16:36-43.
96. Cornell CN, Lane JM. Newest factors in fracture healing. *Clin Orthop* 1992;277:297-311.

97. Dibba B, Prentice A, Laskey MA, Stirling DM, Cole TJ. An investigation of ethnic differences in bone mineral, hip axis length, calcium metabolism and bone turnover between West African and Caucasian adults living in the United Kingdom. *Ann Human Biology* 1999;26:229-42.
98. Bogdanova M. Određivanje koštane specifične alkalne fosfataze. *Clin Chem Lab Med* 1999;37: (Suppl 1).1-6.
99. German Society for Clinical Chemistry. Standard method for the determination of alkaline phosphatase activity. *Z Klin Chem Klin Biochem* 1972;19:101.
100. STATISTICA for Windows [Computer program]. Version 6.0 Tulsa, (OK,USA): Stat Soft, Inc., 2000.
101. Davor Ivanković i suradnici *Osnove statističke analize za medicinare*. Zagreb: Biblioteka udžbenici i priručnici Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, 1988; vol. 24.
102. Ruedi TP, Murphy WM. *AO Principles of Fracture Management*. Thieme, Stuttgart-New York; 2000.
103. Henry YM, Eastell R. Biochemical markers of bone turnover; age, gender and race as sources of biological variability. U: Eastell R, Baumann M, Hoyle NR, Wiczorek L, Martin D, ed. *Bone Markers. Biochemical and Clinical Perspectives*: London, 2001;95-106.
104. Szulc P, Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover in men. *Calcif Tissue Int.* 2001; 69:229-34.
105. Delmas PD, Eastell R, Garnero P, Seibel MJ, Stephan J. Committee of scientific advisors of the International Osteoporosis Foundation. The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. *Osteoporosis Int* 2000;11 Suppl 6:2-17.
106. Lamb EJ, Wong T, Smith DJ. Metabolic bone disease in present at diagnosis in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:1895-902.
107. Primorac D, Rowe DW, Mottes M. Osteogenesis imperfecta at the beginning of bone and joint decade. *Croat Med J* 2001;42:393-415.
108. Reid IA, Davidson JS, Wattie D. Comparative responses of bone turnover markers to iophosphonate therapy in Paget's disease of bone. *Bone* 2004;35:224-30.

109. Charpurlat RD, Huyueny P, Delmas PD, Meunier PJ. Treatment of fibrous dysplasia of bone with intravenous pamidronate: long term effectiveness and evaluation of predictors of response to treatment. *Bone* 2004; 35: 235-42.
110. Hamdy NA, Risteli J. Serum Type I procollagen peptide : a non invasive indeks of bone formation in patients on haemodialysis: *Nephrol Dial Transplant* 1994;9:511-6.
111. Oremek GM, Weis A, Sapoutzis N, Sauer-Eppel H. Diagnostic value of bone and tumor markers in patients with malignant diseases. *Anticancer Res* 2003;23:987-90.
112. Laurer HL, Hagenbourger O, Quast S, Herrmann W. Sequential changes and pattern of bone specific alkaline phosphatase after trauma. *Eur J Trauma* 2000;26:33-38.
113. Andrew JG, Andrew SM, Freemont AJ. Inflammatory cells in normal human fracture healing. *Acta Orthop Scand* 1994;65:462-6.
114. Hulth A. Current concepts of fracture healing. *Clin Orthop* 1989;249:265-84.
115. Gowen M, Mundy GR. Actions of recombinant interleukin 1, interleukin 2, and interferon-gamma on bone resorption in vitro. *J Immunol* 1986;136:2478-82.
116. Frost A, Jonsson KB, Nilsson O. Inflammatory cytokines regulate proliferation of cultured human osteoblasts. *Acta Orthop Scand* 1997;68:91-6.
117. Obrant KJ, Ivaska KK, Gerdhem P, Alatalo SL, Pettersson K, Vaananen HK. Biochemical markers of bone turnover are influenced by recently sustained fracture. *Bone* 2005;36:786-792.
118. Yu Yahiro JA, Michael RH, Dubin NH, Fox KM, Sachs M, Hawkes WG. Serum and urine markers of bone matabolism during the year after hip fracture. *J Am Geriatr Soc* 2001;49:877-83.

10 ŽIVOTOPIS

Rođen sam 17. studenog 1951. godine u Dubrovniku. Osnovnu školu i gimnaziju završio sam u Zadru od 1958. do 1970. godine.

1970. godine upisao sam Medicinski fakultet u Zagrebu i diplomirao 1975. godine.

Obvezni liječnički staž obavio sam u Zagrebu.

Propisani stručni ispit za liječnike pripravnike položio sam u Zagrebu 1976. godine.

Nakon odsluženja redovnog vojnog roka započeo sam specijalizaciju iz opće kirurgije 1977. godine u SR Njemačkoj u trajanju od šest godina. Specijalistički ispit položio sam pred ispitnom komisijom Liječničke komore u Düsseldorfu, SR Njemačka 27. listopada 1983. godine.

Rješenjem Ministarstva zdravstva Republike Hrvatske nostrificirana mi je specijalizacija 30. siječnja 1984. godine.

Dana 2. kolovoza 1984. godine zaposlio sam se u Klinici za traumatologiju u Zagrebu, kao liječnik specijalist – kirurg, gdje sam 01.01.1999. godine imenovan predstojnikom Kliničkog odjela Klinike, a od 01.01.2003. godine postajem zamjenik ravnatelja Klinike za traumatologiju.

Poslijediplomski studij na Medicinskom fakultetu u Zagrebu iz opće kirurgije upisao sam 1986. Magistarski rad pod nazivom "Aktivnost alkalne fosfataze kod bolesnika s prijelomima kostiju" uspješno sam obranio 16. srpnja 1993. godine, te sam promoviran na akademski stupanj magistra znanosti iz područja medicine. U registar znanstvenih radnika Ministarstva znanosti, tehnologije i informatike upisan sam pod brojem 14086. Tijekom domovinskog rata, kao voditelj mobilne kirurške ekipe, više sam puta bio u ratom zahvaćenim područjima diljem Republike Hrvatske. Kao voditelj Ratne bolnice odlikovan sam Spomenicom domovinskog rata i stekao naziv Hrvatski branitelj. Objavio sam više stručnih i znanstvenih radova te sudjelovao na brojnim kongresima i stručnim skupovima u zemlji i inozemstvu.

Aktivno se služim engleskim i njemačkim jezikom.

Član sam Hrvatskog liječničkog zbora, Kirurške sekcije, Traumatološke sekcije; Hrvatskog udruženja ortopeda i traumatologa, Nacionalnog odbora za obilježavanje desetljeća oboljenja kostiju i zglobova Svjetske zdravstvene organizacije i Svjetskog ALUMNI – ASIF udruženja AO-International iz Hrvatske.