

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİMDALI**

(UZMANLIK TEZİ)

**HEMODİYALİZ HASTALARINDA
KORONER ARTER KALSİYUM
SKORLAMASI, KEMİK MİNERAL DENSİTOMETRESİ VE
SERUM FETUİN-A ARASINDAKİ İLİŞKİ**

DR KÜLTİĞİN TÜRKMEN

**DANIŞMAN
PROF DR ALAATTİN YILDIZ**

**İÇ HASTALIKLARI ABD BAŞKANI
PROF DR MURAT DİLMENER**

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yüksek lisans / Doktora. Tezi olarak kabul edilmiştir.

/ /

Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları

Program Adı :

Programın seviyesi : Yüksek Lisans () Doktora ()

Anabilim Dalı : İç Hastalıkları

Tez Sahibi : Dr KÜLTİGİN TÜRKMEN

Tez Başlığı : Hemodiyaliz Hastalarında Koroner Arter Kalsiyum Skorlaması, Kemik Mineral Dansitometresi Ve Serum Fetuin-A Arasındaki İlişki

Sınav Yeri : İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi

Sınav Tarihi : 10 Mart 2008

Tez Sınav Jürisi

1.Prof Dr Murat Dilmener, İstanbul Üniv., İstanbul Tıp Fak, İç Hastalıkları ABD.

2.Prof Dr Alaattin Yıldız (Tez Danışmanı), İstanbul Üniv., İstanbul Tıp Fak, İç Hastalıkları ABD.

3.Prof Dr Sevgi Kalayoğlu Beşışık, İstanbul Üniv., İstanbul Tıp Fak. İç Hastalıkları ABD.

4.Prof Dr Vakur Akkaya, İstanbul Üniv., İstanbul Tıp Fak. İç Hastalıkları ABD.

5.Prof Dr Yesari Karter, İstanbul Üniv., Cerrahpaşa Tıp Fak, İç Hastalıkları ABD.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

KÜLTİĞİN TÜRKMEN

TEŞEKKÜR

Her zaman yanımda olan ve beni benden fazla düşünen anne ve babama, canımdan öte olan kardeşime ve çok düşünceli ve özverili olan sevgili hayat arkadaşşıma teşekkürü borç bilirim.

Bir bilim adamı olarak kendisini örnek aldığım, asistanlığım boyunca kendimi geliştirmemde büyük katkısı bulunan ve tezimin hazırlanmasında gösterdiği yakın ilgi ve bilimsel desteği için tez danışmanım Prof. Dr. Alaattin Yıldız'a, ayrıca tezimde büyük emekleri olan Prof. Dr. Günnur Deniz, Prof. Dr. Ayşegül Telci, Uzm. Dr. Fatih Salman, Uzm. Dr. Gaye Usluer, Uzm Dr. Yasemin Türkmen, Dr. Bora Uslu, Dr Abdullah Özkök, Dr Fatih Tufan ve Dr. Mükremin Uysal'a ve anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Murat Dilmener'e şahsında eğitimimize katkıda bulunan tüm öğretim üyelerimize, uzmanlarımıza, çalışma arkadaşlarımıza, hemşirelere ve hastane görevlilerine teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1129

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kronik Böbrek Yetersizliğinin Tanımı Ve Etyolojisi	3
2.2. KBY Hastalarında Başlıca Morbidite Ve Mortalite Nedenleri.....	4
2.3. MİA Sendromu	6
2.4. Vasküler Kalsifikasyon.....	6
2.5. Damar Duvarında Kalsifikasyon.....	7
2.6. Vasküler Kalsifikasyon Mekanizmaları.....	7
2.6.1. Damar Duvarında Osteogenezin Aktive Olması.....	8
2.6.1.1. Dolaşımda Bulunan Osteoblast Ve Osteoklast Öncülleri	10
2.6.1.2. Vasküler Kemikleşmede OPG/RANKL/RANK Sisteminin Rolü	10
2.6.2. Vasküler Kalsifikasyonu Engelleyen Faktörlerin Eksikliği.....	13
2.6.3. Kolaylaşmış Kemik Yapım-Yıkımı	15
2.6.4. Anormal Mineral Metabolizması	15
2.6.5. İnflamasyon Ve Vasküler Kalsifikasyon	18
2.7. Son Dönem Böbrek Yetersizliğinde Fetuin-A'nin Klinik Rolü	19
2.8. Vasküler Kalsifikasyonun Görüntülenmesi Ve Klinik Uygulamaları	20
2.9. Son Dönem Böbrek Yetersizliği Bulunan Hastaların Kemik Mineral Dansitesi...21	
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1. Serum Fetuin-A Düzey Tayini.....	23
3.2. Serum IL-1 Beta Tayini	24

3.3. Serum IL-6 Tayini.....	25
3.4. Serum TNF-A Tayini.....	25
3.5. Kemik Mineral Dansitometri (DEXA):	26
3.6. Koroner Arter Kalsiyum Skorlaması	26
3.7. İstatistiksel Analiz.....	27
4. BULGULAR.....	28
4.1. Hastaların Demografik Özellikleri, Serum Biyokimik Değerleri Ve Koroner Arter Kalsiyum Skorları	28
4.2. Hastaların Koroner Arter Kalsiyum Skorları Ve Fetuin-A Değerleri.....	30
4.3. Hastaların Kemik Mineral Dansitometri Sonuçları	33
5. TARTIŞMA	35
KAYNAKLAR	37

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Kronik böbrek hastalığı evreleri	3
Tablo 2-2: OPG- RANKL ile ilişkili faktörler.....	12
Tablo 2-3: Üremik hastalarda VK risk faktörleri.....	16
Tablo 4-1: Hastaların demografik özellikleri.....	28
Tablo 4-2 Hastaların klinik özellikleri ve biyomekanik değerleri.....	29
Tablo 4-3: Hastaların inflamasyon parametreleri ve Fetuin-A düzeyi	29
Tablo 4-4: Hastaların KAKS ve KMD değerleri	30
Tablo 4-5: KAKS'a göre hastaların demografik özellikleri ve biyomekanik değerleri	31
Tablo 4-6: Fetuin A ve inflamasyon göstergelerinin koroner arter kalsifikasyon skoruna göre değerlendirilmesi	32
Tablo 4-7: Hastaların KAKS'larına göre kemik mineral dansitometre T skorları	34
Tablo 4-8: Hastaların femur T skorlarına göre ayrılmış gruplar ile Fetuin-A ilişkisi	34

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Vasküler kalsifikasyon mekanizması (48)	19
Şekil 4-1: Fetuin-A ile KAKS arasındaki ilişki (r:-0.30, p:0.009)	32
Şekil 4-2: Fetuin A ile KAKS'a göre ayrılmış her 3 grup arasındaki ilişki.....	33

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

Ca: Kalsiyum

KOL: Toplam kolesterol düzeyi

BMP: kemik morfogenez protein

DEXA: Dual-enerji- x-ışını absorpsiyometri

EBCT: Electron beam computed tomography

HDL-C: Yüksek dansiteli lipoprotein kolesterol

KAH: Koroner arter hastalığı

KAKS: Koroner arter kalsifikasyon skoru

KB: Kan basıncı

KBY: Kronik böbrek yetersizliği

KMD: Kemik mineral dansitesi

KVH: Kardiyovasküler hastalık

LDL-C: Düşük dansiteli lipoprotein kolesterol

MGP: Matriks Gla protein

MIA Sendromu: Malnütrisyon-inflamasyon-ateroskleroz sendromu

mM: Mili molar

OPG: Osteoprotegerin

OPN: Osteopontin

Pit-1: Sodyuma bağımlı fosfor taşıyıcısı

Pi: İnorganik fosfor

PDGF: Trombosit kökenli büyüme faktörü

iPTH: intakt parathormon düzeyi

PTHrp: Parathormon ilişkili peptid

RUNX2/Cbfa-1: osteoblast dönüşüm transkripsiyon faktörü

SD: Standart sapma

SDBY: Son dönem böbrek yetersizliği

TG: Trigliserid

TGF- β : Transforming growth factor- β

VKİ: Vücut kitle indeksi

VSMC: Vasküler düz kas hücresi

ÖZET

Giriş. Koroner arter kalsifikasyonu hemodiyalize giren üremik hastalarda aterosklerotik vasküler hastalığın ciddiyetinin bir göstergesidir ve kardiyovasküler olayları predikte edebilir. Son dönem böbrek yetersizliği gelişen hastalarda vasküler kalsifikasyon ve osteoporoz yaygın olarak gözlenmektedir. Fetuin-A, vasküler kalsifikasyon inhibitörü olarak bulunmuş ve SDBY'li hastalarda serum fetuin-A düzeyinin ileri derecede düşük olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızın amacı koroner arter kalsifikasyonu, kemik mineral dansitometresi ve serum fetuin-A düzeyleri arasındaki ilişkiyi incelemektir.

Materyal-Methodoloji. Bu çalışmaya 38'i erkek ve 40'ı kadın olmak üzere haftada toplam 3 kez hemodiyalize girmekte olan 78 adet SDBY hastası dahil edilmiştir. Hastaların ortalama yaşı $52 \pm 14,5$ yıl'dır. Hastalara electron-beam computed tomography ile koroner arter kalsiyum skorlaması ve dual enerji X-ışını absorpsiyometri tekniği ile KMD analizi yapılmıştır. KAKS değerlerine göre hastalar Grup 1 (KAKS 0-10 arası) ve Grup 2 (KAKS 10-249) ve Grup 3 (KAKS ≥ 250) olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Hastalar femur T skoru -2.0 'nin altında olan bireyler grup 1, -2.0 üzerinde olan bireyler grup 2 olarak ele alınmıştır.

Sonuçlar. Yaş arttıkça ve Kt/V azaldıkça KAKS' da anlamlı olarak artmaktadır, bunun dışında diğer demografik özellikler ve serum biyokimyasal parametreleri açısından her 3 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Fetuin A düzeyleri ile KAKS arasında sadece grup 1 ile grup 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı ($p:0,023$). Her üç grup fetuin-A açısından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlılık yoktu. Çalışma hastalarının kemik mineral dansitometri ölçümlerine ait bulgular KAKS gruplarına göre değerlendirildiğinde her üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. KMD grupları arasında fetuin-A ve KAKS değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

Sonuç: Fetuin-A konsantrasyonu ile KAKS korele bulunmuştur. Bu bulgu fetuinin vasküler kalsifikasyon oluşumundaki rolünü destekler. Kemik dansitometresi ile KAKS arasında ilişki bulunmamıştır. Bu konuda daha geniş kapsamlı çalışmalara daha iyi metodlarla ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Hemodiyaliz, vasküler kalsifikasyon, kemik mineral dansitesi, fetuin-A

ABSTRACT

Introduction: Coronary artery calcification is an indicator of the severity of atherosclerotic vascular disease in patients with uremia on chronic hemodialysis treatment. Vascular calcification and osteoporosis are seen commonly in endstage renal failure patients. Fetuin-A is a vascular calcification inhibitor and ESRD patients have very low serum level of this protein. In our study, the relationship between coronary artery calcification, bone mineral densiometry and serum fetuin-A levels are determined.

Material-methode: Seventy eight ESRD patients (38 male and 40 female) who need dialysis three times a week are included to our study. Patient's average ages are 52 ± 14.5 year. Coronary artery calcium score and BMD are determined by electron-beam computed tomography and dual energy X ray absorptiometry respectively. Patients are divided to three groups according to CACS value; group 1 (CACS 0-10), group 2 (CACS 10-249) and group 3 (CACS ≥ 250). Patients were separated according to their femoral T scores as: group 1, subjects with femoral T score below -2 and group 2, subjects with femoral T score above -2.

Results: It was detected that CACS increased significantly as age increased and Kt/V decreased. There was no other significant difference between the groups about their other demographic characteristics and biochemical parameters. There was a statistically significant difference in Fetuin A levels only between CACS group 1 and CACS group 3 ($p=0.023$). When all three groups were compared regarding their Fetuin A levels, there was no statistically significant difference. There was no statistically significant difference between the CACS groups in their bone mineral density measurements. There was no statistically significant difference in Fetuin-A and CACS levels between these groups.

Conclusion: To this study, there is a relationship between fetuin A and coronary arter calcification level. Fetuin A plays an important role at this relation by inhibiting vascular calcification and influencing bone metabolism. There is no relationship between CACS and BMD.

Key words: hemodialysis, vascular calcification, bone mineral dansity, fetuin

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Etyolojik neden ne olursa olsun son dönem böbrek yetersizliği gelişen ve hemodiyaliz tedavisi altındaki hastaların genel popülasyona kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük kemik mineral dansitesine sahip olduğu gösterilmiştir (1). Benzer şekilde genel popülasyona göre diyaliz hastalarında artmış ateroskleroz prevalansı ve insidansı mevcuttur (2). Yakın zamanda yapılan araştırmalarda kemik metabolizması anormallikleri ile arteriyel kalsifikasyon arasında yakın bir ilişki mevcuttur.

Kardiyovasküler hastalıklar (KVH) son dönem böbrek yetersizliği (SDBY) gelişen hastalarda en önemli mortalite ve morbidite nedeni olup, tüm ölümlerin yaklaşık %50'sinden ve hastanede yatış nedenlerinin %20'sinden sorumludur. Günümüzde SDBY hastalarında, KVH riski genel popülasyona oranla yaklaşık 10-20 kat daha fazladır. Kronik böbrek yetersizliği birçok sistemi etkilemekle birlikte bunlar arasında en önemli olanı erken ateroskleroz gelişimidir. Bu nedenle hastaların yaklaşık yarısının ölüm sebebi aterosklerotik kalp hastalığıdır (3-5).

Ateroskleroz risk faktörleri arasında yaş, cinsiyet, sigara kullanımı, hipertansiyon, diyabet, dislipidemi vb. yer almaktadır. Buna ek olarak KBY oluşumu ile ortaya çıkan ve hastalığa özgü risk faktörleri de KVH sıklığında artışa neden olmaktadır. Bu risk faktörleri arasında; artmış sıvı yükü, anemi, proteinüri, hiperparatiroidizm, kalsiyum-fosfor metabolizma bozuklukları, malnütrisyon, inflamasyon, oksidatif stres, dislipidemi, hiperhomosisteinemi ve üremik toksinler yer almaktadır (6,7). Tüm bu risk faktörleri erken ateroskleroz patogeneziyi açıklamada yetersiz kalmakta ve SDBY'de modifiye edilebilir ek risk faktörlerinin olabileceğini düşündürmektedir. Yeni risk faktörlerinin ve bunlara yönelik tedavi seçeneklerinin bulunmasıyla erken ateroskleroz gelişimini önlemek suretiyle SDBY'ne bağlı artmış mortalite ve morbiditenin azaltılması hedef alınmaktadır.

Diyaliz tedavisi gören KBY hastalarında erken dönemde gelişen aterosklerozu takiben ortaya çıkan damar ve kalp kapak kalsifikasyonu kardiyovasküler hastalıkların esasını oluşturmaktadır. Aynı zamanda bu hasta grubunda yapılan çalışmalarda vasküler kalsifikasyonun bağımsız bir risk faktörü olduğu tespit edilmiştir (8,9). Goodman ve arkadaşları genç diyaliz hastalarında 20-30'lu yıllarda koroner arter kalsifikasyonun sık

olduğunu göstermişler ve bu durumun hiperfosfatemi, kalsiyum-fosfor çarpımındaki artış ve artmış kalsiyum alımı ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir (10).

Son yıllarda yapılan hayvan deneylerinde vasküler kalsifikasyonu önleyen proteinler tespit edilmiştir. Bunlar arasında fetuin-A, matrix Gla Protein (MGP), osteoprotegerin (OPG), bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) sayılmaktadır. Fetuin-A en önemli sistemik inhibitörlerden biri olup serum presipitasyon inhibitör kapasitesinin %50'sine sahiptir (11,12). Bu proteinlerin bilinmesi vasküler kalsifikasyonun önlenmesinde yeni tedavi seçeneklerinin ortaya çıkmasına olanak sağlamaktadır.

Çalışmamıza 6 aydan uzun süredir hemodiyaliz tedavisi görmekte olan 78 hasta dahil edilmiştir. Angina pectoris, geçirilmiş miyokard infarktüsü veya anjioplasti, periferik arter hastalığı, serebrovasküler olay öyküsü olmayan hastalarda;

1- Koroner arter kalsifikasyonunun non-invazif olarak electron-beam computed tomography (EBCT) tekniği ile değerlendirilmesi

2- Kemik mineral dansitometrisinin dual enerji X-ışını absorpsiyometri (DEXA) tekniği ile değerlendirilmesi

3- Hastalardan elde edilecek kan örneğinden serum fetuin-A, IL-1 beta, IL-6, TNF-alfa düzeyi çalışılması

4- Hemoglobin, hematokrit, üre, kreatinin, kalsiyum, fosfor, albumin, total kolesterol, trigliserid ve intakt parathormon düzeylerinin(iPTH) ölçülmesi

5- Çalışılan parametreler arasında korelasyonun yanısıra risk grup ile faktörlerinin araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kronik Böbrek Yetersizliğinin Tanımı Ve Etiyolojisi

Kronik böbrek yetersizliği; renal veya sistemik hastalıklar neticesinde üç ay ve daha uzun süreli böbrek hasarı veya glomerüler filtrasyon hızının (GFR) 60 ml/dak/1.73 m²'nin altına düşmesi sonucunda böbrek fonksiyonlarının geri dönüşümsüz kaybı olarak tanımlanmıştır. Tanımda bahsedilen böbrek hasarı ile histopatolojik tanı veya böbrek hasar göstergelerinin (proteinüri, görüntüleme ile küçülmüş böbrek vb.) varlığı kastedilmektedir. Tablo 2-1'de kronik böbrek yetmezliğinin evreleri gösterilmiştir. Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de kronik böbrek yetmezliğinin en sık üç nedeni arasında diyabetes mellitus, kronik glomerülonefrit ve hipertansiyon bulunmaktadır (12).

Tablo 2-1: Kronik böbrek hastalığı evreleri

Evre	Tanım	GFR (ml/dak./1.73 m ²)	NFK/DOQI 2002 verilerine tahmini hasta sayısı
1	Normal veya ↑ GFR ile böbrek hasarı	>90	5,900,000
2	Hafif ↓ GFR ile birlikte böbrek hasarı	60-89	5,300,000
3	Orta derecede ↓ GFR	30-59	7,600,000
4	Ağır derecede ↓ GFR	15-29	400,000
5	Son dönem böbrek yetersizliği	<15	300,000

GFR: Glomerüler filtrasyon hızı, ↑:artmış, ↓: azalmış

NHANES 3 raporuna göre toplumun % 12,3'ünde GFR<60 ml/dak/1,73 m² tespit edilmiştir. King ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada dünyada 1995 yılında diyabet sıklığı % 4 (135,000,000) olarak bulunmuş ve bu değer 2025 yılında %5,4'ü (300,000,000) aşacağı tahmin edilmiştir. Satman ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptığı ve 24,788 kişi üzerinde yapılan Türkiye epidemiyolojik çalışmasında (TURDEP) 20 yaş

ve üzeri diyabet sıklığı %7,2, bozulmuş glukoz toleransı %6,7 bulunmuştur. Türk Nefroloji Derneği 2004 kayıtlarına göre, son dönem böbrek yetersizliği nedeniyle 32036 hasta hemodiyalize girmekte, 2954 hastaya periton diyalizi (CAPD) uygulamaktadır (13). Amerika Birleşik Devletleri'nde 2002 yılı itibari ile renal replasman tedavisi almakta olan 406,000 hasta mevcut olup SDBY insidansı milyonda 333 olarak tespit edilmiştir. Tedavi maliyetinin ise 2002'de yıllık 17 milyar dolara ulaştığı belirtilmektedir (14).

2.2. KBY Hastalarında Başlıca Morbidite Ve Mortalite Nedenleri

Kardiyovasküler hastalıklar renal replasman tedavisi altında olan hastalarda en önemli mortalite ve morbidite nedeni olup, tüm ölümlerin yaklaşık %50'sinden ve toplam hastanede yatmakta olan hastaların %20'sinden sorumludur. Günümüzde renal replasman tedavisindeki gelişmelere rağmen son dönem böbrek yetersizliği bulunan hastalarda, kardiyovasküler hastalık riski genel popülasyonla karşılaştırıldığında yaklaşık olarak 10-20 kat daha fazladır.

ABD'de 25-34 yaş grubundaki diyaliz hastalarının yıllık kardiyovasküler mortalite oranı 85 yaş üzerindeki sağlıklı bireylerin yıllık kardiyovasküler mortalite oranında eşit olduğu tespit edilmiştir (3-5).

Kardiyovasküler olay sıklığı normal böbrek fonksiyonu olan evre 1 hastalarda 9.2-14/1000 hasta yılı iken hafif-orta dereceli böbrek fonksiyon bozukluğu olanlarda 22-27/1000 hasta yılı, son dönem böbrek yetersizliği bulunan hastalarda 380/1000 hasta yılına çıkmaktadır. SDBY hastalarında koroner arter hastalığı ve konjestif kalp yetmezliği sıklığı %40 iken, sol ventrikül hipertrofi sıklığı %75 dolaylarındadır. KBY'nin henüz erken dönemlerinden itibaren miyokard infarktüsü (MI) sıklığı normal popülasyona göre yüksektir. Diyaliz öncesi kalp yetmezliği, koroner arter hastalığı (KAH) ve miyokard infarktüs öyküsü olanlarda diyaliz tedavisi altındaki süreçte mortalite 2-3 kat artmaktadır. Bütün bu bulgular aslında KBY'li hastalarda erken evrelerden itibaren kardiyovasküler hastalık riskinin bulunduğunu ve renal replasman tedavileri ile de bu riskin devam ettiğini göstermektedir (4,15,16).

Bilinen risk faktörleri arasında yaş, cinsiyet, sigara kullanımı, hipertansiyon, diyabet, dislipidemi vb. yer almaktadır. Buna ek olarak KBY oluşumu ile ortaya çıkan

ve hastalığa özgü risk faktörleri de KVH sıklığında artışa neden olmaktadır. Bu risk faktörleri arasında; artmış sıvı yükü, anemi, proteinüri, hiperparatiroidizm, kalsiyum-fosfor metabolizma bozuklukları, malnütrisyon, inflamasyon, oksidatif stres, dislipidemi, hiperhomosisteinemi ve üremik toksinler yer almaktadır (6,7). Tüm bu risk faktörleri erken ateroskleroz patogeneziyi açıklamada yetersiz kalmakta ve SDBY’de modifiye edilebilir ek risk faktörlerinin olabileceğini düşündürmektedir. Yeni risk faktörlerinin ve bunlara yönelik tedavi seçeneklerinin bulunmasıyla erken ateroskleroz gelişimini önlemek suretiyle SDBY’ne bağlı artmış mortalite ve morbiditenin azaltılması hedef alınmaktadır.

Diyaliz tedavisi gören KBY hastalarında erken dönemde gelişen aterosklerozu takiben ortaya çıkan damar ve kalp kapak kalsifikasyonu kardiyovasküler hastalıkların esasını oluşturmaktadır. Aynı zamanda bu hasta grubunda yapılan çalışmalarda vasküler kalsifikasyonun bağımsız bir risk faktörü olduğu tespit edilmiştir (8,9). Goodman ve arkadaşları genç diyaliz hastalarında 20-30’lu yıllarda koroner arter kalsifikasyonun sık olduğunu göstermişler ve bu durumun hiperfosfatemi, kalsiyum-fosfor çarpımındaki artış ve artmış kalsiyum alımı ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir (10).

Son yıllarda yapılan hayvan deneylerinde vasküler kalsifikasyonu önleyen proteinler tespit edilmiştir. Bunlar arasında fetuin-A, matrix Gla Protein (MGP), osteoprotegerin (OPG), bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) sayılmaktadır. Bu proteinlerin bilinmesi vasküler kalsifikasyonun önlenmesinde yeni tedavi seçeneklerinin ortaya çıkmasına olanak sağlamaktadır. Bu proteinlerden fetuin-A en önemli sistemik inhibitörlerden biri olup serum presipitasyon inhibitör kapasitesinin %50’sine sahiptir (11,12).

İnsanlarda yapılan çalışmalarda fetuin-A düzeyi kısa ve uzun dönem diyaliz hastalarında kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. Fetuin-A düzeyindeki düşüklük ‘malnütrisyon-inflamasyon-ateroskleroz sendromu’ (MIA Sendromu) ile ve KV mortalite ile ilişkilidir (11,12,17,18).

2.3. MIA Sendromu

Malnütrisyon-inflamasyon-ateroskleroz baş harflerinden oluşan bu sendrom ilk kez 1998 yılında Bergström ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. KBY hastalarındaki artmış proinflamatuvar sitokinler ile malnütrisyon ve erken ateroskleroz gelişimi arasındaki ilişkinin kurulduğu bu sendromda malnütrisyon, inflamasyon ve aterosklerozun her biri birer morbidite ve mortalite nedenidir. Yapılan çalışmalarda MIA komponentlerinin tümünü taşıyan KBY hastalarının yaşam sürelerinin daha kısa olduğu bildirilmiştir (19).

2.4. Vasküler Kalsifikasyon

Vasküler kalsifikasyon kronik böbrek yetersizliği, diyabet, hipertansiyon ve ateroskleroz gibi endotel hasar oluşumu ile giden hastalıklarda sıklıkla görülen ve artmış morbidite ve mortalite ilişkili bir durumdur (20). Son 25 yılda yapılan çalışmalar aterosklerotik plak gelişiminde inflamasyon ve kazanılmış immünitinin büyük rol oynadığını göstermektedir (21). Aterosklerozun vasküler kalsifikasyon (VK) ile ilişkisi önemli fakat üzerinde az durulan bir konudur. Vasküler kalsifikasyon daha önceleri damar intima veya medya tabakasında gelişen pasif ve dejeneratif bir olay olarak değerlendirilmiş ancak son yıllarda bu olayın aktif ve programlı bir süreç olduğu bulunmuştur (22). Ateroskleroz sürecinde rol alan kronik inflamasyon aynı zamanda vasküler kalsifikasyona neden olan mekanizmaları da düzenlemektedir (23). Son dönemde yapılan çalışmalar VK gelişim sürecinde angiogenezin önemini ve osteoblast ve osteoklastların bu olaydaki etkilerini açıklığa kavuşturmuştur (24).

2.5. Damar Duvarında Kalsifikasyon

Kardiyovasküler sistemde damar duvar kalsifikasyonu üç değişik alanda görülebilir:

- aterosklerozun geliştiği intima tabakası
- Mönckeberg sklerozunun görüldüğü medya tabakası
- kalp kapakçıkları (valvüler kalsifikasyon)

Bu alanların dışında bazı yazarlar dördüncü olarak ‘vasküler kalsiflaksiyi’ de VK tipi olarak kabul etmektedirler (20). Her üç kalsifikasyon türünde ortak olan angiogenez ve inflamasyonun bu sürece eşlik etmesidir. İnflamasyonda primer olarak makrofaj ve T lenfositler rol almakta, kalsifikasyon yerine göre bu hücrelerin infiltrasyon alanları değişmektedir (21).

Vasküler kalsifikasyon embriyonik kemikleşme ile benzerlik gösterir. Embriyonik kemikleşme süreci iki şekilde gerçekleşmektedir. Bunlardan ilki ‘endokondral kemikleşme’, diğeri ise ‘intramembranöz kemikleşme’dir. Endokondral kemikleşme, kondrogenez sonrası mevcut vaskülarize hiyalin kıvrıma yerini alan kemikleşme türü iken intramembranöz kemikleşme ise kırık modelde ihtiyaç duymadan mezenşimal kök hücrelerin osteoblastik hücrelere dönüşmesi ve tip 1 kollajenden oluşan matriksin kalsifikasyonu ile oluşmaktadır (20). İntimal kalsifikasyon oluşumunda endokondral kemikleşme esas rol oynarken, medyal kalsifikasyonda ise primer olarak intramembranöz kemikleşme görülmektedir (21).

2.6. Vasküler Kalsifikasyon Mekanizmaları

Geçmiş yıllarda vasküler kalsifikasyonun ateroskleroz veya yaşla ilişkili olarak pasif bir süreç olduğu düşünülmüş ancak yeni kanıtlar bu sürecin birden fazla basamaktan oluşan dinamik bir olay olduğunu göstermiştir.

Anlaşılabilir olması açısından VK mekanizması;

- 1) damar duvarında osteogenezin aktive olması,
- 2) vasküler kalsifikasyonu engelleyen faktörlerin eksikliği,
- 3) kolaylaşmış kemik yapım-yıkımı,
- 4) anormal mineral metabolizması olarak dört ana başlıkta ele alınıp

incelenecektir:

2.6.1. Damar Duvarında Osteogenezin Aktive Olması

Damar duvarında bulunan birçok hücre osteojenik ve kondrojenik hücelere diferansiye olarak vasküler kalsifikasyon sürecince rol oynamaktadır. Damar düz kas (VSMC) ve adventisyal perisit hücreleri değişime en yatkın olan ve osteojenik – kondrojenik protein yapımını üstlenen esas hücrelerdir. Bu hücrelerden salınan osteonektin, osteopontin (OPN), paratiroid hormon (PTH), kemik morfojenik protein-2 (BMP-2), matriks gama-karboksiglutamik asit protein (MGP) vb proteinlerin hem aterosklerotik plaklarda hem de medyal kalsifikasyon alanlarında direkt veya indirekt olarak rol aldıkları gösterilmiştir. Ayrıca dolaşımda ve VK alanlarında osteoblast benzeri hücreler ile tartarat rezistan asit fosfataz (TRAP) pozitif osteoklast benzeri hücrelerin bulunması patolojik vasküler kalsifikasyon oluşum süreci ile kemik metabolizması arasındaki sıkı ilişkiyi açığa çıkarmaktadır (25). VSMC ve osteoblastlar ortak mezenşimal öncüllerden köken almaktadır. VSMC'lerin osteoblastlara dönüşümde RUNX2/Cfba-1 adlı transkripsiyon faktörünün rol oynadığı düşünülmektedir. Ortamda fosfat varlığında VSMC'ler osteoblastlara dönüşmekte ve mineralize matriks oluşumu gerçekleşmektedir (25).

VSMC gibi adventisya tabakasında bulunan perisitler de birden fazla hücre öncülü gibi davranarak kalsifiye nodüller oluşturabilme yeteneğine sahip hücrelerdir.

Bunlar damar duvarında osteoid ve kondroid hücrelere dönüşerek özellikle diyabet ve son dönem böbrek yetersizliğinde mediyal kalsifikasyona neden olabilmektedir. Bujan ve arkadaşlarının sıçanlar üzerinde yaptığı deneyde segmental olarak adventisyal tabakakası çıkarılmış damarlarda kalsifikasyon gelişmemesi adventisyada mevcut bulunan hücrelerin bu olayda rol aldığını desteklemektedir (1).

Hem osteoblast hem de osteoklast öncülleri çeşitli sitokinlerin yardımı ile genetik olarak programlanmış bir şekilde birbirleriyle etkileşime girerek esas hücreleri oluştururlar. Bu olayda osteoblastlar başrolde ve bunu da ‘osteoid’ olarak bilinen mineralize kemik matriks oluşumunu arttırmak, kemik yıkımından sorumlu osteoklastların değişim–gelişim aşamalarını ve aktivitelerini düzenlemek suretiyle yapmaktadırlar. Birden fazla büyüme faktörü ve hormonun öncül mezenkimal hücreden osteoblasta dönüşüm aşamasında etkili olduğu günümüzde bilinmektedir. Bunlardan en önemlisi osteoblast ile ilişkili spesifik genlerin transkripsiyonundan sorumlu olan RUNX2/Cbfa-1 olarak adlandırılan transkripsiyon faktörüdür. Kondrosit gelişimi ile ilişkili olan transkripsiyon faktörü ise ‘Sox 9’ adlı faktördür (25).

Diğer taraftan osteoklastlar mononükleer hücre öncüllerinden oluşan multinükleer hücrelerdir. Yapılan çalışmalar sonucunda osteoklastogenez ve osteoklast aktivasyonunu pozitif ve negatif yönde düzenleyen en az 24 değişik gen lokusunun olduğu tespit edilmiştir (25). Osteoklast maturasyonundan esas olarak sorumlu tutulan faktörler arasında monosit koloni stimüle eden faktör (M-CSF), RANK ve RANK ligand yer almaktadır. Bu sitokinler aterosklerotik plakta bulunmakta ve arteriyel duvarda kemikleşmeden sorumlu tutulmaktadır (21).

Son yapılan çalışmalar vasküler kalsifikasyon sürecinde rol oynayan ve kemik morfojenik proteinleri (BMP) adı verilen faktörler üzerine yoğunlaşmıştır. Kemik morfojenik proteinleri (BMPs), TGF-beta ailesine üye 30 kadar proteindir. Bu proteinler

adlarını kemik yapımı ile ilgili görevlerinden almalarına karşın birçok dokunun gelişim sürecinde rol oynamaktadırlar. BMP'nin hücre üzerine etkileri kendileri özgül olan BMP reseptör 1 ve 2 üzerinden olmakta ve bu reseptörlerin aktive olmasıyla 'Smad' adı verilen düzenleyici transkripsiyon faktörlerinin etkisi başlamaktadır (26). Vasküler kalsifikasyon gelişim sürecinde rol alan en önemli kemik morfojenik protein alt tipleri BMP-2 ve BMP-7'dir. Her iki protein de hem kemik hem de diğer birçok organ oluşumunda gereklidir. BMP-2 vasküler kalsifikasyonu indüklerken, BMP-7 bu süreci inhibe etmektedir (26).

2.6.1.1. Dolaşımda Bulunan Osteoblast Ve Osteoklast Öncülleri

Daha önce yapılan çalışmalarda doku tamirinde kemik iliği kökenli hücrelerin rol oynadığı gösterilmiştir. Dolaşımda hem osteoblast hem de osteoklastların bulunduğu tanımlanmış, adöloşanlarda ve kemik kırıkları vb. doku hasarında bu hücrelerin dolaşımda arttığı tespit edilmiştir (25). Vasküler kalsifikasyon alanlarında da tespit edilen bu hücrelerin rolleri tam olarak açıklığa kavuşmamıştır.

2.6.1.2. Vasküler Kemikleşmede OPG/RANKL/RANK Sisteminin Rolü

Yapılan çalışmalar ışığında kemik dokusunda ve damar duvarında mineral dengesi, osteoklast olgunlaşması ve aktivasyonunda değişik faktörlerin rol oynadığını bilmekteyiz. Bu bağlamda tümör nekrozis faktör- α (TNF $-\alpha$) ailesinden olduğu tespit edilen OPG, RANK, RANKL; hem osteoklast fonksiyonlarını hem de T ve B hücrelerinin immünomodülatör etkilerini düzenlemede görev almaktadır. Kemik kökenli osteoblast ve osteoklast öncüllerinin damar duvarında ve kemik iliğinde mevcut bulunan VSMC ile birlikte M-CSF ve RANKL salgıladıkları ve bu iki proteinin

osteoklast öncülleri üzerinde bulunan özgül reseptörler yardımı ile osteoklastogenez ve kemik yıkımında rol oynadığı bulunmuştur. Damar düz kas hücreleri (VSCM), endotelial hücreler, osteoblastlar ve bunların öncül hücreleri protein yapısında olan OPG salgılamaktadır. OPG, RANKL ile birlikte kendileri için uygun reseptör olan RANK için yarışmaktadır. OPG hem damar duvarında hem de dolaşımda çözünür olarak bulunabilir ve osteoklast öncülleri üzerinde bulunan RANK molekülüne bağlanarak RANKL-RANK etkileşimini inhibe ederek osteoklastogenezini önleyebilmektedir. Bunlara ek olarak OPG, TNF aracılı apoptoz indükleyen ligand (TRAIL) üzerinden apoptozu inhibe edebilmektedir. Normal damar duvarında OPG düzenli olarak salgılanırken RANKL-RANK genellikle saptanamaz. Buna karşılık hem OPG hem de RANK ve RANKL intimal aterosklerotik kalsifiye plaklarda tespit edilebilmiştir (25).

Koroner arter hastalığı ve koroner arter kalsifikasyonu bulunan kimselerde OPG düzeyinin yüksek olduğu ve bu miktarın kalsifikasyon düzeyi ile korrle olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Osteoklast diferansiyasyonu ve erken matürasyonu için RANKL ve M-CSF birlikte hareket etmektedir. RANKL yokluğunda M-CSF tek başına osteoklast transformasyonunu gerçekleştirmez (25).

RANKL, TNF alfa ailesine üye olan ve T hücre, osteoblast ve stromal hücreler tarafından salınan bir proteindir. RANKL mononükleer hücre öncülleri üzerinde bulunan RANK isimli membran yüzey reseptörüne bağlanarak hücre değişim ve gelişimi için gerekli birçok intrasellüler uyarıları harekete geçirir. RANK, CD-40 molekülüne fenotipik olarak benzer ve ikincil mesajcı olarak TNF reseptör aktive eden faktörü (TRAF) kullanır. Bilinen altı farklı TRAF molekülünden osteoklastların sitoskeletal organizasyonu ve resorbtif aktivitesinden sorumlu en önemli rol oynayan TRAF-6 dır. RANKL osteoklastlarda NF-kB'yi genellikle TRAF-6 üzerinden

etkinleştirmekte ve bunun sonucunda NF-kB nukleusa geçerek uygun genleri aktive etmektedir. RANKL'ın osteoklastlarda ikincil mesajcı olarak kullandığı bir diğer yolak C-jun ile ilişkilidir (25).

RANK/RANKL/OPG sistemi M-CSF ile birlikte kemik homeostazında kritik öneme sahiptir. Birçok osteotrofik molekül etkilerini RANKL ve/veya OPG ekspresyonu düzenlemek suretiyle göstermektedir. RANKL yapımı; kalsitriol (vitamin D), kalsiyum, parathormon (PTH), glukokortikoidler, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF)-1, prostoglandin E2, TNF-alfa, interlökin (IL)-1, IL-6, IL-11 etkisi ile artmaktadır. Bunlardan bazıları (kalsitriol, PTH, glukokortikoidler, prostoglandin E2, IGF-1) aynı zamanda OPG yapımını da baskılamaktadır (25).

Tablo 2-2: OPG- RANKL ile ilişkili faktörler

FAKTÖR	OPG	RANKL
1,25 (OH) ₂ vitamin D ₃	↑	↑
BMP-2	↑	?
Kalsiyum	↑	↑
İmmüsupresifler	↓	↑
Glukokortikoidler	↓	↑
IL-1β	↑	↑
IL-6	?	↑
Prostoglandin E ₂	↓	↑
PTH	↓	↑
TGF- β	↑	↓
TNF-α	↑	↑

Deneysel çalışmalarda RANKL enjekte edilen farelerde osteoporoz gelişirken, RANKL gen hasarı olanlarda osteoklast yokluğu ve osteopetrosis geliştiği bulunmuştur. Buna benzer osteoporotik fenotip RANK molekülü eksprese edemeyen veya M-CSF geni hasarlı farelerde gözlenmiştir (25). Aşırı OPG ekspresyonu yapan transgenik farelerde osteopetrosis oluşurken, OPG ekspresyonu yapamayanlarda ciddi osteoporoz tespit edilmiştir. Plazma OPG seviyelerindeki artış koroner ve aortik kalsifikasyon ile koreledir (25,26). Son dönem böbrek yetersizliği gelişen hastalarda vasküler kalsifikasyonun hızlı ilerlemesi artmış kalsiyum alımı ve serum OPG seviyeleri ile ilgilidir (26).

2.6.2. Vasküler Kalsifikasyonu Engelleyen Faktörlerin Eksikliği

Birçok biyolojik olayda olduğu gibi vasküler kalsifikasyon da negatif geri beslenme (negatif feedback) ile kontrol edilmektedir. Daha önceki yıllarda VK'nın basitçe serum kalsiyum-fosfor dengesine bağlı olduğu düşünülmüş ancak son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda bu sürecin oluşumunu önleyen birçok mineral (sitrat, magnezyum gibi) ve spesifik proteinin yer aldığı tespit edilmiştir. Ektopik kalsifikasyonun engellenmesinde rol alan negatif düzenleyiciler arasında fetuin A, MGP, OPG, OPN, BMP-7, PTHrp ve inorganik pirofosfat sayılmaktadır.

Fetuin A (α -2 Heremans-Schmid glikoproteini); plasmada bulunan, apatit kristallerinin yapımını ve damar duvarına çökmesini engelleyerek kalsifikasyonu önleyen glikoprotein yapısında bir moleküldür. Fetuin-A ektopik kalsifikasyonu önlerken kemik mineralizasyonunu inhibe etmez. Fetuin-A eksikliği olan farelerde hiperkalsemi durumunda kemik kalsifikasyonunda artış görülmüştür. Vasküler kalsifikasyon için yüksek risk grubunda bulunan böbrek yetersizliği olan bireylerde serum Fetuin-A düzeyinin çok düşük olduğu tespit edilmiştir (25).

MGP; düşük molekül ağırlığına sahip bir protein olup, esas fonksiyonu glutamik asit kalıntılarını K vitaminine bağımlı gama karboksilaz aktivitesiyle işlevsel hale getirmektir. MGP'nin normalde arteriyel damar duvarında bulunduğu ve yapılan çalışmalarda aterosklerotik plaklarda bu miktarın arttığı tespit edilmiştir. Yapılan deneysel çalışmalarda MGP eksikliği olan farelerde aortik kalsifikasyonun arttığı gösterilmiştir. Son kanıtlar MGP'nin mezenkimal hücrelerin osteojenik hücrelere dönüşümünü BMP-2 üzerinden engellediği ve böylece damar duvarında gelişen mineralizasyonu önlediği gösterilmiştir (25).

OPN ; matriks proteini olup kalsifikasyonu önleyen bir diğer önemli moleküldür. Esas görevi osteoklast yüzeyinde bulunan ve integrin ailesinden olan $\alpha\beta3$ 'e bağlanıp hücre içi kalsiyum düzeyini azaltarak osteoklastları aktifleştirmektir. OPN üzerinden gelişen osteoklastik kemik yıkımının bir diğer mekanizması da kemik rezorpsiyonu için asidik mikroortam oluşturan karbonik anhidraz 2 enziminin yapımının arttırılmasıdır. OPN ayrıca apatit kristallerine bağlanmak suretiyle mineralizasyonu direkt olarak da engelleyebilmektedir. Damar duvarında yaptığı önemli işlevlerin yanısıra OPN; aterosklerotik plak çevresinde bulunan makrofaj, düz kas hücreleri ve endotelial hücrelerden de hastalığın şiddetiyle orantılı olarak salgılanmaktadır. Yapılan deneysel çalışmalarda MGP eksikliği olan farelerle hem MGP hem de OPN eksikliği olan fareler karşılaştırıldığında son grupta çok daha ciddi aortik kalsifikasyon olduğu ve dışardan OPN enjekte edilen farelerde ektopik kalsifikasyonun gerilediği bulunmuştur (25).

OPG; TNF ailesine ait osteoblast kökenli vasküler kalsifikasyon inhibitörü olup bu görevi osteoklast değişimini ve aktivasyonunu inhibe ederek yerine getirmektedir (25).

2.6.3. Kolaylaşmış Kemik Yapım-Yıkımı

Vasküler kalsifikasyon ve osteoporoz sıklıkla aynı hasta grubunda görülür ve bu bireyler yaşlılık, östrojen eksikliği, kronik böbrek yetersizliği, inflamatuvar hastalıklar ve glukokortikoid kullanımı gibi benzer risk faktörlerine sahiptirler. Osteoporoz gelişen bireylerde arteriyel kalsifikasyon görülme sıklığı artmıştır (28). Postmenapozal kadınlarda ise VK ile osteoporoz arasındaki ilişkiden kolaylaşmış kemik yapım-yıkımı sonucunda dolaşımda bulunan ve VK için çekirdek görevi gören komplekslerin varlığı sorumlu tutulmaktadır (25). Ateroskleroz ile osteoporoz gelişimi arasında korelasyon yapılan hayvan deneylerinde gösterilmiştir. OPG eksikliği (OPG -/-) olan farelerde osteoklastik aktivite artışından dolayı erken dönemde osteoporoz ve arteriyel kalsifikasyon gelişimi saptanmış ve *invivo* olarak kemik kaybını önlemeye yönelik bifosfanat ve OPG gibi ilaçların aynı zamanda arteriyel kalsifikasyonu önlediği tespit edilmiştir (25).

2.6.4. Anormal Mineral Metabolizması

Vasküler kalsifikasyon gelişimde serum mineral dengesi kritik öneme sahiptir. Böbrek yetersizliği gelişmiş bireylerde kemik ve mineral metabolizma bozuklukları görülmekte ve bu durum parathormon (PTH) ile hedef doku olan kemik arasındaki ilişkinin değişmesine bağlanmaktadır. Bu olay ilk olarak 1970'li yılların başında keşfedilmiş ve daha sonraları bu olaya 'üremide kemik dokunun parathormon etkisine direnci sonucu meydana gelen sekonder hiperparatiroidizm' adı verilmiştir. (27) 1990'lı yılların başında ise diyaliz hastalarında kemik yapım-yıkımının daha yavaş olduğu bulunmuş ve üremik hastalarda bu sürecin devam edebilmesi için serum optimal PTH düzeyinin normale oranla iki-iki buçuk kat yüksek olması gerekliliği ortaya atılmıştır

(27). Vasküler kalsifikasyon için risk faktörleri oldukça fazladır ve Tablo 2-3'te detaylı olarak gösterilmiştir.

Tablo 2-3: Üremik hastalarda VK risk faktörleri

Modifiye edilebilir risk faktörleri	Modifiye edilemeyen risk faktörleri
Serum fosfat düzeyi	yaş
Serum kalsiyum düzeyi	diyaliz süresi
Ca X P ürünü	cinsiyet
Oral kalsiyum içeren fosfat bağlayıcıları	genetik
Hiperparatiroidizm	
Vitamin D kullanımı	
Dislipidemi	
İnflamasyon	
Diğerleri: Oksidatif stres, warfarin, homosistein, leptin, artmış demir yükü	

Vasküler kalsifikasyon gelişimde mineraller kemikle ilişkili moleküllerin yapımını, bunların osteojenik hücrelere dönüşümünü ve ektopik kalsifikasyon oluşumunu arttırabilmektedir (25). Daha önceki yıllarda basit mantıkla serum fosfat yüksekliğinin mineralizasyonda rol oynadığı düşünülmüş ancak yapılan deneysel çalışmalarda ekstrasellüler fosfatın damar düz kas üzerine olan etkileri keşfedilmiştir. Buna göre serum fosfat düzeyi arttığında, VSMC Pit-1 adlı sodyum bağımlı fosfat taşıyıcısı aracılığı ile fosfatı hücre içine almakta ve artmış intrasellüler fosfat RUNX2/Cbfa-1, osteokalsin ve osteopontin genlerini aktive etmektedir. Sonuçta VSMC osteoblastik hücrelere dönüşmekte ve VK gelişimine neden olmaktadır. Bununla ilişkili olarak yapılan invivo çalışmalarda insan VSMC ile alkalin fosfataz varlığında inorganik fosfat kaynağı olan Beta-gliserofosfat, kültür ortamına konulduğunda VSMC'nın kemik protein yapımını arttırdığı ve bunların mineralize olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde

bu kültür ortamına kalsiyum eklendiğinde VSMC'nın osteoblast benzeri hücrelere dönüşümünün ve mineralizasyonun arttığı gösterilmiştir (25).

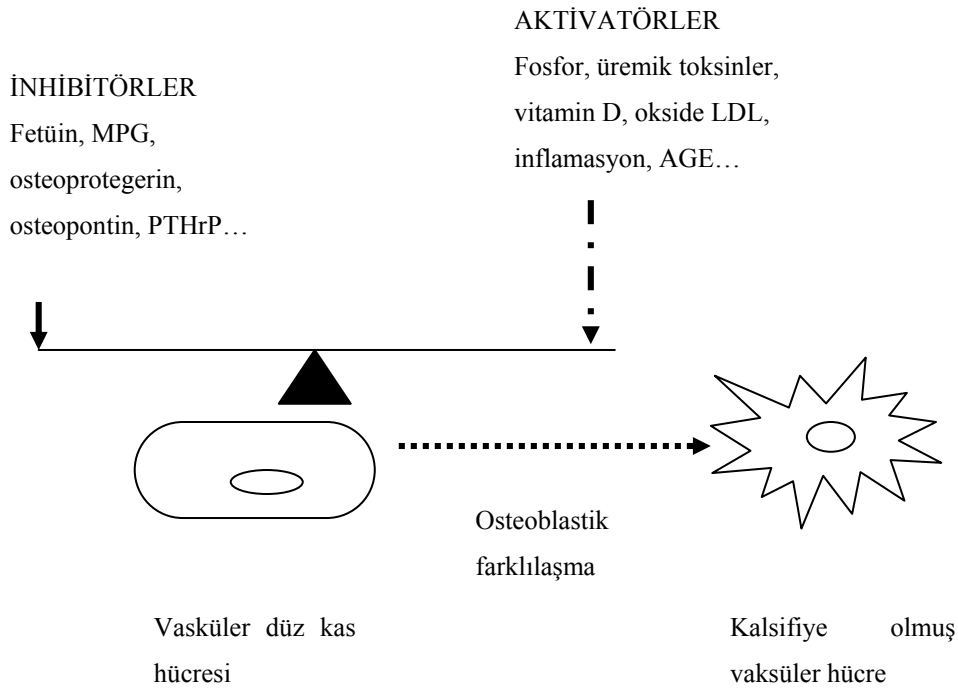
Morii ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada fosfat düzeyleri normal bile olsa aterosklerotik plaklarda 'trombosit kökenli büyüme faktörü' (PDGF) arttığını ve bunun sonucunda Pit-1 kanalının aktive olarak intrasellüler fosfor düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (49). İnorganik pirofosfat ve bunun seviyesini ayarlayan 'nükleotid pirofosfataz fosfodiesteraz' (NPP) enzimi kalsiyum depolanmasını önlemede büyük öneme sahiptir. Pirofosfat damar duvarında VK için gerekli olan çekirdek oluşumunu ve kalsiyum çökmesini engellerken aynı zamanda VSMC'in osteojenik hücre dönüşümünü önlemektedir. İnsanlarda NPP enzim eksikliği yaygın medyal kalsifikasyon ve erken yaşta kardiyovasküler ölümle sonuçlanan 'infantil idyopatik arteriyel kalsifikasyon' adlı hastalığa neden olmaktadır (25).

Metabolik hastalıklar ve ateroskleroz ile ilişkili durumlarda görülen arteriyel kalsifikasyon gelişim sürecinde minerallerin tetiklediği aktif hücresel mekanizmaların yanı sıra pasif mekanizmaların da önemi göz ardı edilemez. Bu durumlarda apoptotik hücre kalıntıları ve kolesterol kristalleri kalsifikasyon için yatak görevi görürler (29).

Böbrek yetersizliği bulunan hastalarda total vücut kalsiyum dengesini sağlamaya yönelik tedavi modaliteleri, VK (özellikle medyal) gelişim ve ilerlemesini yavaşlatmaktadır (30). Yine son dönem böbrek yetersizliği gelişmiş bireylerde kalsiyum içeren fosfat bağlayıcılarının veya hemodiyaliz sırasında yüksek miktarda kalsiyum içeren diyalizat kullanımına bağlı olarak VK'nın hızla ilerlediği gösterilmiştir (31).

2.6.5. İnflamasyon Ve Vasküler Kalsifikasyon

Son yıllarda yapılan çalışmalar kalsifikasyon gelişim sürecinde inflamasyonun önemini ve gerekliliğini vurgulamaktadır. Tüm patolojik VK örneklerinde inflamasyon erken dönemde saptanmıştır. Buna örnek olarak sarkoidoz, tüberküloz ve malignitelere olduğu gibi kronik inflamasyon alanlarında görülen yumuşak doku kalsifikasyonu verilebilir. Bu bağlamda inflamasyonun kemik yapım ve yıkım sürecinin birçok aşamasında rol oynadığı ve özellikle VSMC'nin osteojenik hücrelere dönüşümünde, osteoblastik öncül hücrelerin oluşumunda ve hidroksiapatit kristallerinin bu hücrelere çökmesinde görev aldığı bildirilmiştir (25). Buna karşılık kemik kaybında rol oynayan birçok inflamatuvar sitokin osteoklastogenezde de söz sahibidir (Şekil 2-1). Örneğin proinflamatuvar sitokinlerden IL-1 ve TNF-alfa'nın etkisiyle vasküler hücrelerden OPG ve RANKL ekspresyonun arttığı buna karşılık TGF-beta ve PPAR-gama vb. antiinflamatuvar sitokinlerin OPG yapımını baskıladığı tespit edilmiştir. İnterferon-gama ise NF-kB tarafından uyarılan OPG/RANK/RANKL sistemini inhibe ederek osteoklastogenezi baskılamaktadır (25).



PTHrP: Parathyroid hormone related peptide, MPG: Matrix Gla protein, AGE: Advanced glycation end products

Şekil 2-1: Vasküler kalsifikasyon mekanizması (48)

2.7. Son Dönem Böbrek Yetersizliğinde Fetuin-A'nın Klinik Rolü

Floege ve arkadaşlarının son dönem böbrek yetersizliği bulunan ve hemodiyaliz tedavisi altındaki hastalarda yaptıkları karşılaştırmalı çalışmada kısa ve uzun dönem hemodiyaliz hastalarında normal böbrek fonksiyonu olanlara göre fetuin-A düzeyi önemli oranda düşük bulunmuş ve bu hastalardan kalsiflaksisi olanların serumlarının Ca X P kristal formasyonunu inhibe etme özelliklerinin önemli oranda düşük olduğu tespit edilmişti. Bu etki muhtemelen pürifiye fetuin-A'nın eklenmesi ile geri çevrilebilmektedir. Serum fetuin-A düzeyleri ile CRP arasındaki ilişki ters orantılıdır. Serum fetuin A ve CRP arasındaki ilişki temel alınarak yapılan çalışmalarda kardiyovasküler ve diğer nedenlere bağlı mortalitenin inflamasyonla ilişkili prediktörü olarak tanımlanabileceği ifade edilmiştir (11,32).

Moe ve arkadaşları (33) fetuin-A düşüklüğü ile koroner kalsifikasyon arasında negatif korelasyonu ve fetuin-A'nın koroner kalsifikasyonun patogenezinde önemli bir göreve sahip olduğunu bildirmişlerdir.

2.8. Vasküler Kalsifikasyonun Görüntülenmesi Ve Klinik Uygulamaları

Geçmişte vasküler kalsifikasyonu tespit edip değerlendirmek için floroskopi, dijital anjiyografi vb. birçok görüntüleme yöntemi kullanılmış fakat tatmin edici sonuçlar elde edilememiştir. EBCT ve multi dedektör BT'nin (MDCT) keşfi ile bu arayışlar son bulmuştur. EBCT ve MDCT teknikleri kullanılarak damar kalsiyum skorlaması yapılabilmekte ve kantitatif değerler elde edilebilmektedir. Yapılan çalışmalarda koroner arter hastalığı değerlendirilmesinde koroner kalsiyum skorlaması oldukça sensitif bulunmuştur (25). Bilgisayarlı tomografi teknikleri medyal-intimal kalsifikasyon arasındaki ayrımı yapmada başarılı değildir. Halbuki prognoz açısından bu ayrımın yapılması önemlidir. Tahmin edilebileceği gibi EBCT ile tespit edilmiş koroner arter kalsifikasyonu mortalitede artış ile birliktelik gösterir. Aterosklerotik plağın kalsifiye kısmı toplam plak hacminin sadece %20'sini temsil etmektedir. Dolayısıyla, arteriyel kalsifikasyonun olmaması tamamen ateroskleroz olasılığını ortadan kaldırmamaktadır. Aslında, tıkaçıcı koroner arter lezyonlarının %2-4'lük kısmında kalsifikasyon gözlenmeyebilir ve bu bulgu EBCT görüntülemeye gözden kaçabilir. Buna rağmen, EBCT tekniği halen diğer görüntüleme teknolojilerine kıyasla daha iyi yol göstermektedir (34,35). EBCT koroner kalsiyum skorları 0-10 arasında olan hastalar, düşük olasılıkla tıkaçıcı koroner arter hastalığına sahiptirler. Kalsiyum skoru 11-100 arası ve 101-400 arası değerler ise sırasıyla hafif ve orta derecede aterosklerotik plak ile uyumludur. Kalsiyum skoru 400 ve üzerinde olan hastalar asemptomatik bile olsalar yaygın aterosklerotik plak varlığından şüphelenilmeli ve gerekli kardiyak incelemeler yapılmalıdır. Asemptomatik hastalarda koroner arter kalsifikasyon varlığı kardiyovasküler morbidite ve mortalite açısından dikkat edilmesi gereken bir durumdur. Detrano ve arkadaşlarının (36) yaptığı çalışmada hastalar koroner anjiyografi ve EBCT ile değerlendirilmişler ve kalsiyum skoru medyan değer olan 75.3 hastalar, medyan değer altında olanlara göre altı kat daha fazla miyokard infarktüsü veya kardiyak ölüm riskine sahip oldukları tespit edilmiştir. Arad ve arkadaşları (37) 1173 hastayı yaklaşık ortalama 19 ay takip etmişler ve benzer sonuçlar bildirmişlerdir. Raggi ve arkadaşları (38) mutlak kalsiyum skorunun yanısıra yaşa ve cinsiyete göre beklenen kalsiyum

skorundan daha yüksek değerlerin kısa sürede yaşanabilecek kardiyak olay ve ölüm için güçlü bir prediktör olduğunu saptamışlardır .

Diyaliz hastalarında istenmeyen yumuşak doku kalsifikasyonlarını önlemek ve azaltmak üzere Ca x P çarpımının sıkı kontrolü önerildiği için tedavinin etkinliğini göstermek adına EBCT görüntüleme diyaliz hastalarında da rahatlıkla kullanılmaktadır.

2.9. Son Dönem Böbrek Yetersizliği Bulunan Hastaların Kemik Mineral Dansitesi

Kemik mineral dansitesi (KMD), sıklıkla dual-enerji- x-ışını absorpsiyometri (DEXA) yöntemi ile ölçülmektedir. DEXA ile kemik mineral dansitesi, kesin ve hızlı olarak ölçülebilmekte ve osteopeni-osteoporoz gibi hastalıkların tanısı konulabilmektedir. Değerlendirilen bölgeler radius distali, femur proksimali, ve dorsolomber vertebralardır. Ölçüm yapılan bölgeler arasında KMD değerleri farklılık göstermektedir ve risk faktörleri değerlendirilirken mutlaka hangi bölgeden ölçüm yapılacaksa o bölgenin standart değerleri göz önüne alınmalıdır. KMD ölçümleri genel popülasyonda kırık riskinin ön görülmesinde güçlü bir parametre olup, tedavinin etkinliğinin değerlendirilmesine yardımcı olmaktadır (39). Son dönem böbrek yetersizliği hastalarında KMD azalmıştır (40). Genel popülasyona oranla hemodiyaliz hastalarında kalça kırık insidansı artmıştır (41). DEXA'nın tüm bu olumlu katkılarına karşılık özellikle son dönem böbrek yetersizliği gelişmiş hasta grubunda kemik yıkımı veya kalitesi hakkında ek bir bilgi sağlamadığı gibi yapılan çalışmalarda kemik biyopsisi ile verifiye edilmiş kemik histolojisi ile de korelasyon göstermediği tespit edilmiştir.

Birçok çalışmada KMD ile kemik kırıkları arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır (42). Buna rağmen bazı çalışmalara göre vertebral kırıklı kronik böbrek hastaları ile kırığı olmayan hastalar benzer KMD değerlerine sahiptirler (43). KMD ölçüm tekniği ve yeri bu çelişkiden sorumlu tutulmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamıza en az 6 ay süreyle diyalize girmekte olan 78 son dönem böbrek hastası dahil edilmiştir. Çalışma için İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Dekanlığı Yerel Etik Kurulundan gerekli izin alınmıştır (2007/515 nolu dosya, 07/02/2007 tarihli 4467 sayı ile etik kurul onayı). Çalışma öncesinde hastalar aydınlatılmış onam formunu okumuş ve imzalamışlardır.

Yetmiş sekiz SDBY hastasının 38 'u erkek ve 40'u kadın, ortalama yaş; $52 \pm 14,5$ yıl, ortalama hemodiyaliz süresi 60 ± 41 ay'dı. Primer olarak hastalığın nedenleri; 7 hastada kronik glomerülonefrit, 20 hastada nefroskleroz, 9 hastada kronik pyelonefrit, 10 hastada diyabetik nefropati ve 4 hastada polikistik böbrek hastalığı, 4 hastada amiloidoz olup 24 hastada ise son dönem böbrek hastalığının nedeni bilinmemektedir. Çalışmaya alınan tüm hastaların; yaş, cinsiyet, vücut ağırlığı, vücut kitle indeksi, primer hastalıkları, diyaliz süreleri, rutin biyokimik değerleri kaydedildi. Hastaların kan basıncı ölçümleri diyaliz seansı öncesinde supin pozisyonda 10 dakika istirahat sonrası yapıldı. Sistolik kan basıncı 140mmHg ve/veya diastolik KB'ı 90mmHg olan veya antihipertansif ilaç kullanan hastalar hipertansif olarak kabul edildi. Hemodiyaliz hastaları haftada 3 kez 4'er saat süreyle, semisentetik diyaliz membranı kullanılarak bikarbonatlı diyalize alınmaktaydı.

Çalışmadan dışlanma kriterleri:

1. Altı aydan kısa süreli hemodiyaliz tedavisi altındaki hastalar,
2. Son bir ay içinde ağır travma, cerrahi operasyon veya yanık öyküsü bulunan hastalar,
3. Semptomatik ve dekompanse karaciğer hastalığı bulunan hastalar çalışmadan çıkarıldı.

Hastalardan bir gecelik açlığı takiben alınan venöz kan örnekleri alındı. Alınan kan örnekleri uygun tüplere konularak 5000 devirde 5 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Rutin biyokimya için alınan numuneler İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Merkez Biyokimya ve DETEA laboratuvarında çalışıldı.

Tam kan sayımı için gerekli serum örnekleri ultraviolet assay ile (Beckman-Coulter, Krefeld, Almanya); serum biyokimyasal testleri ise kinetic ultraviolet assay (Roche, Hitachi system, Indianapolis, IN, Amerika Birleşik Devletleri) ile çalışılmıştır. Plazma

glukoz konsantrasyonu, glukoz oksidaz metodu (Boehringer–Mannheim, Mannheim, Almanya) ile tayin edilmiştir. Serum trigliserid (TG) ve toplam kolesterol düzeyleri (KOL) de ticari kolorometrik assay metodu ile (GPO-PAP and CHODPAP kitleri, Boehringer–Mannheim kitleri, Almanya) ölçülmüştür.

3.1. Serum Fetuin-A Düzey Tayini

Prensip

Fetuin-A ELISA testinde insana karşı Fetuin-A özgül poliklonal antikorla kaplı 96 kuyucuklu plaklar kullanılır. Kuyucuklara eklenen standart, kalite kontrol ve dilüe serum örneklerinde bulunan Fetuin-A bu antikorlarla bağlanır ve bağlanmayanlar yıkama yoluyla ortamdan uzaklaştırılır. Horseradish peroksidaz (HRP) konjuge insana karşı poliklonal Fetuin-A kuyucuklara eklenir ve inkübasyon sonrası yıkamanın ardından substrat (H_2O_2 ve TMB) eklenerek mavi renk oluşturan enzimatik reaksiyon sağlanır, kuyucuklara eklenen asidik stop dolüsyon ile renk sarıya dönüşür ve kuyucuklar ELISA okuyucusunda 450 nm’de değerlendirilir. Elde edilen değerler başlangıçta bağlanan Fetuin-A miktarı ile orantılıdır. Dilüe edilen serum örneklerindeki Fetuin-A değerleri standartlar yardımı ile çizilen eğriden hesaplanır.

Metod

Kan örneklerinden elde edilen serumlar -20 derecede saklandı. Fetuin-A tayini için Human Fetuin-A ELISA (Biovendor Research and Diagnostic Products) kullanıldı. Testin yapılacağı gün Fetuin-A ELISA testi için serum örnekleri önce 1:100 (10µl serum+990 µl dilüsyon tamponu) oranında sulandırıldıktan sonra ikinci kez aynı oranda sulandırılarak toplamda 1:10.000 sulandırılarak hazırlandı. ELISA kitinde mevcut liyofilize Fetuin-A 1 ml dilüsyon tamponu içinde sulandırıldı ve elde edilen stok solüsyondan (100ng/ml) belirtilen şekilde sulandırmalar yapılarak standart solüsyonları (40 ng/ml, 20 ng/ml, 10 ng/ml, 5ng/ml ve 2 ng/ml) hazırlandı. 100 µl standart, kontrol ve serum örnekleri kuyucuklara eklenerek 1 saat 300 rpm çalkalamada oda sıcaklığında inkübe edildi. Inkübasyon sonrasında kuyucuklar 3 kez 400 µl yıkama solüsyonu ile yıkandı (Bio-tek Instruments ELx500). Kuyucuklara 100 µl konjugat solüsyonu eklenerek 1 saat 300 rpm çalkalamada oda sıcaklığında inkübe edildi. İkinci kez yıkamanın ardından 100 µl substrat eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığı ve karanlıkta bekletildikten sonra reaksiyon stop solüsyonu ilavesinin ardından 450 nm’de ELISA okuyucusunda (Bio-tek Instruments ELx800) değerlendirildi.

3.2. Serum IL-1 Beta Tayini

Prensip

Biosource insan IL-1 beta kiti solid faz sandviç ELISA ile metodu ile çalışmaktadır. İnsan IL-1 β 'ya özgül antikor ile kaplı kuyucuklara örnekler, standartlar kontrol ve serum örnekleri pipetlendikten sonra biyotinlenmiş ikincil antikor eklenir. Birinci inkübasyon sırasında insan IL-1 β antijeni simultan olarak immobilize antikora ve sıvı faz biyotinlenmiş antikora bağlanır. İkincil antikor fazlasının ortamdan uzaklaştırılmasının ardından streptavidin-peroksidaz enzimi eklenir ve bağlanmayan enzim yıkama yoluyla ortamdan uzaklaştırılır. Substrat eklenir ve oluşan renk yoğunluğu ölçülür. Renk yoğunluğu direkt olarak IL-1 β konsantrasyonu ile orantılıdır.

Metod

Kan örneklerinden elde edilen serumlar -20 derecede saklandı. IL-1 β tayini için Human IL-1 β ELISA (Biosource Europe S.A. Belgium) kullanıldı. Ana standart 2500 pg/ml olacak şekilde standart sulandırma tamponu ile hazırlandı. Bu ana standarttan seri dilüsyon ile 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62.5 pg/ml, 31.2 pg/ml, 15.6 pg/ml, 7.8 pg/ml, 3.9 pg/ml ve 0 pg/ml olarak diğer standartlar hazırlandı. Kuyucuklara 50 μ l standartlar, çözülen serum örnekleri ve kontroller eklendi, 100 μ l biyotinlenmiş anti IL-1 β solüsyonu blank dışındaki tüm kuyulara ilave edilerek 2 saat oda sıcaklığında üzeri kapatılarak inkübe edildi. 4 kez 400 μ l ile yıkamanın ardından blank dışı tüm kuyucuklara 100 μ l streptavidin-HRP çalışma solüsyonu eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Tekrar yıkanan kuyucuklara 100 μ l stabilize kromojen eklendi ve mavi renk oluşumu başlatıldı. Karanlık ortamda 25 dakika bekletilen plağa son aşamada 100 μ l stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu ve plak 450 nm'de ELISA okuyucusunda (Bio-tek Instruments ELx800) değerlendirildi.

3.3. Serum IL-6 Tayini

Prensip

Biosource insan IL-6 kiti solid faz sandviç ELISA ile metodu ile çalışmaktadır. İnsan IL-6'ya özgül antikor ile kaplı kuyucuklara örnekler, standartlar kontrol ve serum örnekleri pipetlendikten sonra biyotinlenmiş ikincil antikor eklenir. Birinci inkübasyon sırasında insan IL-6 antijeni simultan olarak immobilize antikora ve sıvı faz biyotinlenmiş antikora bağlanır. İkincil antikor fazlasının ortamdan uzaklaştırılmasının ardından streptavidin-peroksidaz enzimi eklenir ve bağlanmayan enzim yıkama yoluyla ortamdan uzaklaştırılır. Substrat eklenir ve oluşan renk yoğunluğu ölçülür. Renk yoğunluğu direkt olarak IL-6 konsantrasyonu ile orantılıdır.

Metod

Kan örneklerinden elde edilen serumlar -20 derecede saklandı. IL-6 tayini için Human IL-6 ELISA (Biosource Europe S.A. Belgium) kullanıldı. Ana standart 2500 pg/ml olacak şekilde standart sulandırma tamponu ile hazırlandı. Bu ana standarttan seri dilüsyon ile 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62.5 pg/ml, 31.2 pg/ml, 15.6 pg/ml, 7.8 pg/ml ve 0 pg/ml olarak diğer standartlar hazırlandı. Kuyucuklara 100 µl standartlar, çözülen serum örnekleri ve kontroller eklendi, 50 µl biyotinlenmiş anti IL-6 solüsyonu blank dışındaki tüm kuyulara ilave edilerek 2 saat oda sıcaklığında üzeri kapatılarak inkübe edildi. 4 kez 400 µl ile yıkamanın ardından blank dışı tüm kuyucuklara 100 µl streptavidin-HRP çalışma solüsyonu eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Tekrar yıkanan kuyucuklara 100 µl stabilize kromojen eklendi ve mavi renk oluşumu başlatıldı. Karanlık ortamda 30 dakika bekletilen plağa son aşamada 100 µl stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu ve plak 450 nm'de ELISA okuyucusunda (Bio-tek Instruments ELx800) değerlendirildi.

3.4. Serum TNF-A Tayini

Prensip

Biosource insan TNF- α kiti solid faz sandviç ELISA ile metodu ile çalışmaktadır. İnsan TNF- α 'ya özgül antikor ile kaplı kuyucuklara örnekler, standartlar kontrol ve serum örnekleri pipetlenir. Birinci inkübasyon sırasında insan TNF- α antijeni simultan olarak immobilize antikora bağlanır. Yıkama sonrası insan TNF- α 'ya özgül biyotinlenmiş monoklonal antikor eklenir. İkinci inkübasyon sırasında bu antikor birinci inkübasyonda

yakalanan immobilize TNF- α 'ya bağlanır. Üçüncü inkübasyon ve bağlanmayan antikor fazlasının ortamdan uzaklaştırılmasının ardından substrat eklenir ve oluşan renk yoğunluğu ölçülür. Renk yoğunluğu direkt olarak TNF- α konsantrasyonu ile orantılıdır.

Metod

Kan örneklerinden elde edilen serumlar -20 derecede saklandı. TNF- α tayini için Human TNF- α ELISA (Biosource Europe S.A. Belgium) kullanıldı. Ana standart 2000 pg/ml olacak şekilde standart sulandırma tamponu ile hazırlandı. Bu ana standarttan seri dilüsyon ile 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62.5 pg/ml, 31.2 pg/ml, 15.6 pg/ml, ve 0 pg/ml olarak diğer standartlar hazırlandı. Kuyucuklara 50 μ l inkübasyon tamponu eklendi. 0 pg/ml kuyucuklarına 100 μ l standart sulandırma tamponu ilavesinin ardından 100 μ l standartlar, çözülen serum örnekleri ve kontroller eklenerek 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. 4 kez 400 μ l ile yıkamanın ardından 100 μ l biyotinlenmiş anti TNF- α solüsyonu blank dışındaki tüm kuyulara ilave edilerek 1 saat oda sıcaklığında üzeri kapatılarak inkübe edildi. 4 kez 400 μ l ile yıkamanın ardından blank dışı tüm kuyucuklara 100 μ l streptavidin-HRP çalışma solüsyonu eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Tekrar yıkanan kuyucuklara 100 μ l stabilize kromojen eklendi ve mavi renk oluşumu başlatıldı. Karanlık ortamda 30 dakika bekletilen plağa son aşamada 100 μ l stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu ve plak 450 nm'de ELISA okuyucusunda (Bio-tek Instruments ELx800) değerlendirildi.

3.5. Kemik Mineral Dansitometri (DEXA):

Kemik mineral dansitometrisi DEXA yöntemi ile (Hologic QDR-2000, Waltham, MA, USA) ile femur ve lomber bölgesinde çalışılmıştır.

3.6. Koroner Arter Kalsiyum Skorlaması

Koroner arter kalsiyum skorlaması 16-MDCT scanner (Sensation 16, Siemens Medical Solutions, Erlangen, Almanya) ile gerçekleştirilmiştir. İnceleme sırasında kalp kraniyokaudal yönde, karinadan apekse kadar taranmıştır. İşlem esnasında 120 Kv'lık tüp voltajı, 133 mAs'lik efektif tüp akım zamanı çarpımı, 12x0.75 mm'lik bir kollimasyon, rotasyon başına 2.8 mm masa desteği ve 420 ms'lik tüp rotasyon zamanı

elde edilmiştir. Her hastada, mediyum düz kıvrımlı kermelde (B35f) ve 512x512'lik rekonstrüksiyon matrisinde %60'lık R-R rekonstrüksiyonu hazırlanmıştır. Daha sonra rekonstrükte edilen bütün görüntüler kalsiyum skorlama maksadıyla (Syngo Calcium Scoring CT, Siemens, Almanya) dış ortama aktarılmıştır (Leonardo, Siemens Medical Solutions, Erlangen, Almanya). Koroner kalsiyum skorlama Agatston ve arkadaşlarının tarif ettiği şekilde 130 HU'luk bir eşik göz önüne alınarak hesaplanmıştır (44).

3.7. İstatistiksel Analiz

Çalışmamızda sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir. Gruplar arasındaki farkların saptanmasında One Way ANOVA veya Student T-testi kullanılmıştır. Korelasyonların değerlendirilmesinde Spearman ve Pearson testinden yararlanılmıştır. Değerlendirme esnasında anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak alındı. Bütün istatistiksel incelemeler SPSS for Windows (13.0, SPSS Company, Illinois, USA) istatistik programı ile yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Hastaların Demografik Özellikleri, Serum Biyokimik Değerleri Ve Koroner Arter Kalsiyum Skorları

Çalışmaya katılan hastaların demografik özellikleri Tablo 4-1’de, klinik özellikleri ve serum biyokimik değerleri Tablo 4-2’de, inflamasyon parametreleri ve fetuin A düzeyleri Tablo 4-3’te, koroner arter kalsifikasyon skorları ve kemik mineral dansitometri T skorları Tablo 4-4’te gösterilmiştir.

Tablo 4-1: Hastaların demografik özellikleri

Hemodiyaliz hastalarında	
Ortalama±SD	
Hasta sayısı (n)	78
Erkek/kadın sayısı(n)	38/40
Yaş (yıl)	52±15
VKI (kg/m²)	24,2±3,7
Diyaliz süresi (ay)	60±41

SD; standart deviasyon, VKI; vücut kitle indeksi

Tablo 4-2 Hastaların klinik özellikleri ve biyosimik değerleri

Hemodiyaliz hastalarında	
Ortalama±SD (n:78)	
SKB (mmHg)	126±19
DKB (mmHg)	75±10
Hipertansiyon varlığı	%38,5 (n:30)
Kalsiyum (mg/dl)	8,8±0,5
Fosfor (mg/dl)	4,9±1,4
Ca x P (mg²/dl²)	43,6±13,2
iPTH (pg/ml)	344±33
Ürik asit (mg/dl)	6,9±0,2
Albumin (g/dl)	3,9±0,29
Ferritin (ng/ml)	696±499
Trigliserid (mg/dl)	181±116
Kolesterol (mg/dl)	166±39
Hemoglobin (g/dl)	10,9±1,56
Lökosit (hücre/mm³)	6295±1746
URR	78,4±7,0
Kt/v	1,91±0,4

SKB; sistolik kan basıncı, DKB; diyastolik kan basıncı, URR; Urea reduction rate, iPTH; İntakt Paratiroid Hormonu

Tablo 4-3: Hastaların inflamasyon parametreleri ve Fetuin-A düzeyi

Hemodiyaliz hastalarında	
Ortalama±SD (n:78)	
Fetuin A (ng/ml)	25,6±16,5
IL 1-β (pg/ml)	1,19±0,2
IL-6 (pg/ml)	9,5±1,17
TNF-α (pg/ml)	32,8±9,9
CRP (mg/l)	1,81±0,2

SD; Standart Deviasyon, IL; İnterlökin, TNF; Tümör nekroz faktör, CRP; C reaktif protein

Tablo 4-4: Hastaların KAKS ve KMD değerleri

Hemodiyaliz hastalarında (n:78) Ortalama±SD	
LM kalsiyum skoru	18,4±7,5
LAD kalsiyum skoru	264±54,5
Cx kalsiyum skoru	60±19
RCA kalsiyum skoru	139±35
Total kalsiyum skoru	488±94
Lomber t değeri	-1,5±0,2
Femur t değeri	-1,95±0,14
Warts t değeri	-2,41±0,15

LM; sol ana koroner arter, LAD; sol inen koroner arter, Cx; sirkümfleks koroner arter, RCA; sağ koroner arter

4.2. Hastaların Koroner Arter Kalsiyum Skorları Ve Fetuin-A Değerleri

Çalışmamıza alınan toplam 78 hastanın ortalama KAKS 488,5±94,5 olarak saptanmıştır. Daha sonra hastalar KAKS'a göre düşük kalsiyum skorlu hastalar (KAKS<10, Grup 1, n:25), orta kalsiyum skorlu (KAKS 10–249, Grup 2, n:26) ve yüksek kalsiyum skorlu (KAKS≥250, Grup 3, n:27) hastalar olmak üzere 3 gruba ayrılmışlardır. Çalışmaya alınan her üç hasta grubu yaş, cinsiyet, VKİ, diyaliz süreleri, kan basıncı seviyeleri, serum Ca, P, Ca x P, iPTH, total kolesterol, trigliserit düzeyleri, URR ve Kt/V oranına göre değerlendirildi. Yaş arttıkça ve Kt/V azaldıkça KAKS' da anlamlı olarak artmaktadır, bunun dışında diğer demografik özellikler ve serum biyokimyasal parametreleri açısından her 3 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (Tablo 4-5). Hastaların KAKS'larına göre Fetuin-A ve inflamasyon parametreleri (IL-1β, IL-6, TNF-α, CRP) Tablo 4-6'da özetlendiği gibi gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Yine koroner arter kalsiyum skoru arttıkça CRP ve IL-1β değerleri de artmaktaydı, ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Fetuin A düzeyleri ile KAKS arasında sadece grup 1 ile grup 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı (p: 0,023). Her üç grup fetuin-A

açısından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlılık yoktu (Şekil 4-2). Ayrıca koroner arter kalsiyum skoruyla fetuin-A arasındaki ilişkiye bakıldığında kalsiyum skoru arttıkça fetuin-A değerinin azaldığı görüldü (r:-0.30, p:0.009, Şekil 4-1).

Tablo 4-5: KAKS'a göre hastaların demografik özellikleri ve biyokimik değerleri

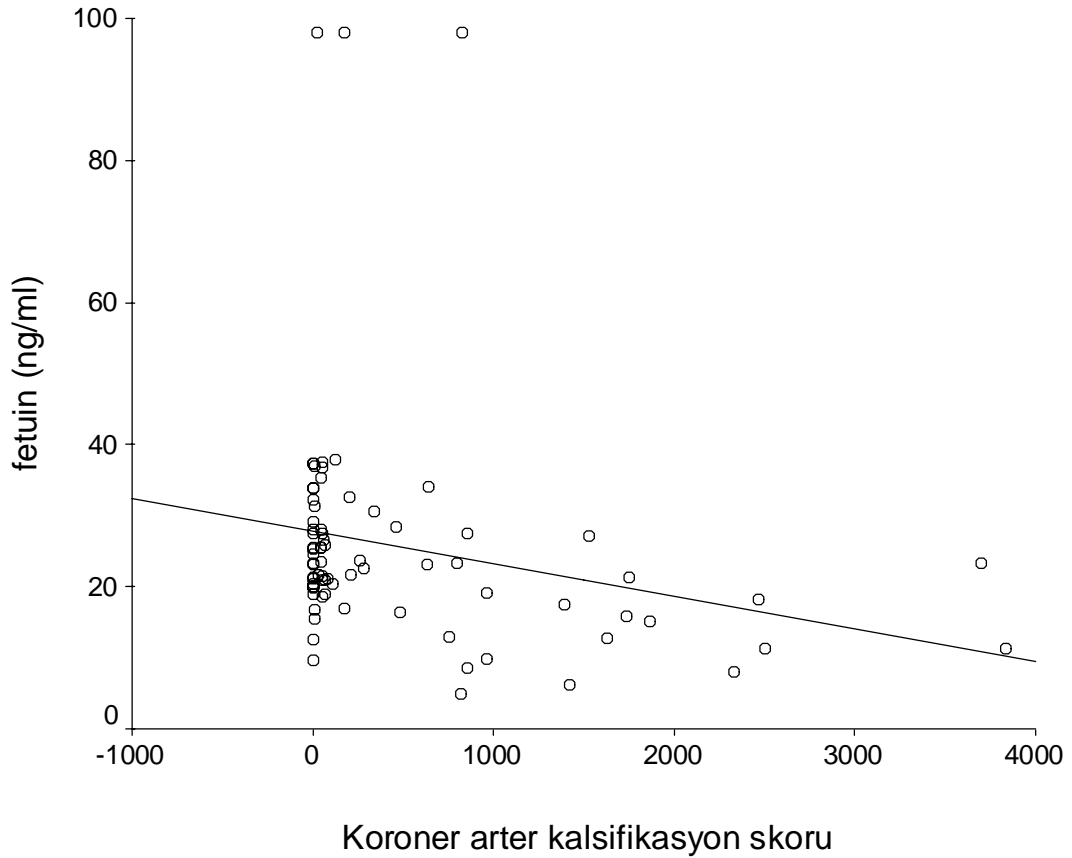
PARAMETRE	KAKS	KAKS	KAKS	P Değeri
	GRUP 1 (KAKS<10) ortalama±SD	GRUP 2 (KAKS 10-250) ortalama±SD	GRUP 3 (KAKS>250) ortalama±SD	
Yaş (yıl)	44±15	52±10	59±15	0,001*
Erkek/kadın sayısı (n)	8/17	13/13	17/10	AD
VKİ (kg/m ²)	23,4±4,0	24,84±3,93	24,42±3,33	0,043*
Diyaliz süresi(ay)	52±40	59±41	66±46	AD
KB (n,%)	11(%44)	10(%38)	9(%33)	AD
Ürik Asit (mg/dl)	6,1±1,2	6,8±1,3	6,5±0,9	AD
Kt/V	2,11±0,57	1,82±0,43	1,83±0,35	AD
Kalsiyum (mg/dl)	8,88±0,5	8,88±0,6	8,98±0,5	AD
Fosfor (mg/dl)	4,5±1,2	5,0±1,5	5,2±1,5	AD
Ca x P (mg ² /dl ²)	40,3±11,6	43,7±13,2	46,6±14,2	AD
iPTH (pg/ml)	281±259	402±314	347±296	AD
Kolesterol (mg/dl)	156±39	168±33	174±44	AD
Trigliserit (mg/dl)	154±113	194±113	195±122	AD
Albumin (g/dl)	3,9±0,3	3,9±0,3	3,9±0,3	AD

SD; Standart Deviasyon, AD; anlamlı değil, iPTH; İntakt Paratiroid Hormonu, VKİ: Vücut kitle indeksi, KB; Kan basıncı

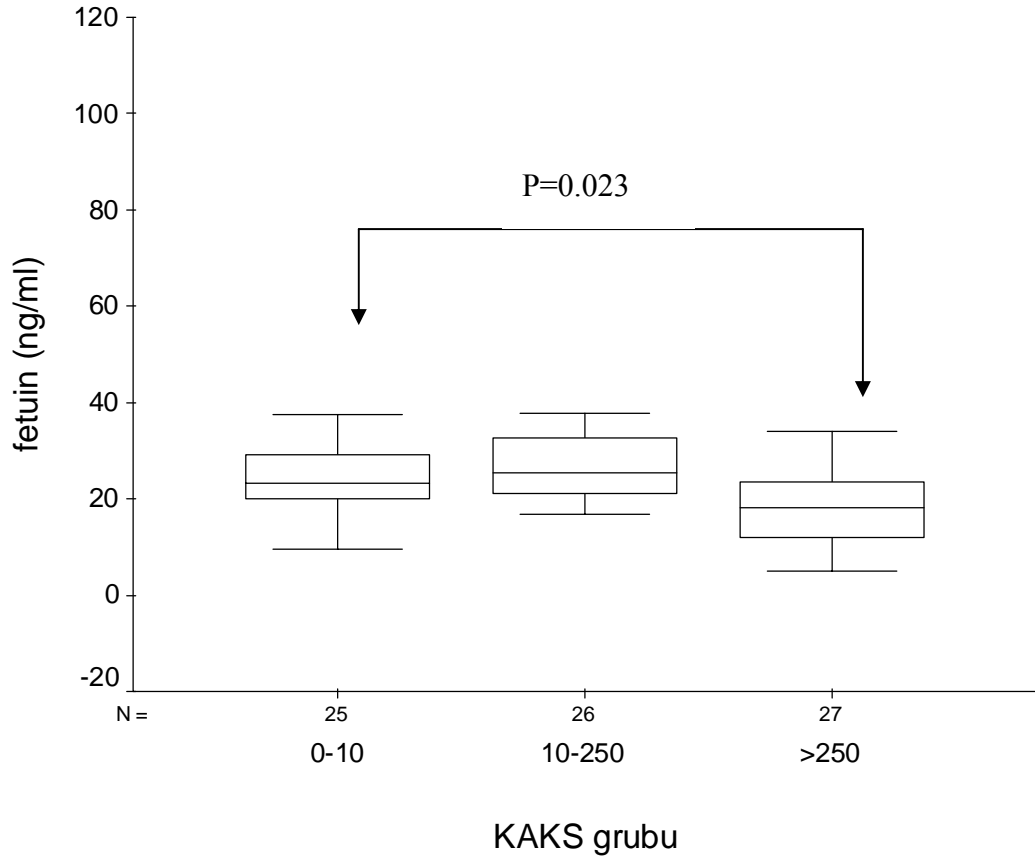
Tablo 4-6: Fetuin A ve inflamasyon göstergelerinin koroner arter kalsifikasyon skoruna göre değerlendirilmesi

PARAMETRE	KAKS	KAKS	KAKS	P Değeri
	GRUP 1	GRUP 2	GRUP 3	
	(KAKS<10)	(KAKS 10-250)	(KAKS>250)	
	ortalama±SD	ortalama±SD	ortalama±SD	
Fetuin A (ng/ml)	24,7±7,5	31,1±20,6	21,1±17,2	AD
IL 1-β (pg/ml)	0,95±0,10	1,03±0,38	1,58±0,95	AD
IL-6 (pg/ml)	11,46±1,58	8,76±7,27	8,52±7,96	AD
TNF-α (pg/ml)	29,19±10,28	34,96±7,60	34,23±11,05	AD
CRP (mg/l)	1,6±0,5	1,7±0,4	1,9±0,5	AD

SD; Standart Deviasyon, AD; anlamlı değil, IL; İnterlökin, TNF; Tümör nekroz faktör, CRP; C reaktif protein



Şekil 4-1: Fetuin-A ile KAKS arasındaki ilişki (r:-0.30, p:0.009)



Şekil 4-2: Fetuin A ile KAKS'a göre ayrılmış her 3 grup arasındaki ilişki

4.3. Hastaların Kemik Mineral Dansitometri Sonuçları

Çalışma hastalarının kemik mineral dansitometri ölçümlerine ait bulgular KAKS gruplarına göre Tablo 4-7’de gösterilmiştir. Gruplar arasında T skorları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

Hastalar femur T skorlarına göre 2 gruba ayrıldı. T skoru -2.0 ’nin altında olan bireyler grup 1, -2.0 üzerinde olan bireyler grup 2 olarak ele alınmıştır.

Hastaların femur T skor gruplarına göre yaş, fetuin-A, KAKS değerleri Tablo 4-8’de gösterildi. Gruplar arasında fetuin-A ve KAKS değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Grup 1’de yaş anlamlı olarak daha yüksekti ($p:0,017$).

Tablo 4-7: Hastaların KAKS’larına göre kemik mineral dansitometre T skorları

PARAMETRE	KAKS	KAKS	KAKS	P Değeri
	GRUP 1 (KAKS<10) ortalama±SD	GRUP 2 (KAKS 10-250) ortalama±SD	GRUP 3 (KAKS>250) ortalama±SD	
	T skoru	T skoru	T skoru	
Femur T skoru	-1,93±1,58	-1,87±1,06	-2,06±1,06	AD
Lomber T skoru	-1,45±2,08	-1,42±1,95	-1,82±1,62	AD

KAKS: Koroner arter kalsifikasyon skoru, AD; anlamlı değil

Tablo 4-8: Hastaların femur T skorlarına göre ayrılmış gruplar ile Fetuin-A ilişkisi

	Grup1 (T skoru ≤ -2)	Grup2 (T skoru > -2)	P
Fetuin-A (ng/ml)	23,51±7,7	27,8±22,3	AD
Yaş (yıl)	57,24±16,24	49,14±12,73	0,017*
KAKS	478±692	488±835	AD

KAKS: Koroner arter kalsifikasyon skoru, AD; anlamlı değil

5. TARTIŞMA

Koroner arter kalsiyum skoru hemodiyaliz hastalarında sıklıkla yüksek bulunmaktadır. Çalışmamızda koroner arter kalsifikasyon sıklığı %67.9 bulundu. Bu sonuç daha önceki çalışmalarda da benzer olarak saptanmıştır (51).

Fetuin-A; hepatositlerden sentezlenen, 60 kDa ağırlığında, yüksek serum konsantrasyonuna (0.4-1.0 g/l) sahip olan bir serum proteindir. Serumda alfa 2 bandında bulunan negatif akut faz reaktanıdır (45). Fetuin-A en önemli sistemik kalsifikasyon inhibitör proteindir. Daha önce yapılan çalışmalarda düşük fetuin-A akut inflamasyon göstergesi ve negatif akut faz reaktanı olarak tanımlanmıştır. Yaklaşık olarak serum presipitasyon inhibitör kapasitesinin yarısına sahiptir ve ektopik kalsifikasyonu önlerken kemik mineralizasyonunu inhibe etmez. Fetuin-A eksikliği olan farelerde hiperkalsemi durumunda kemik kalsifikasyonunda artış görülmüştür. Vasküler kalsifikasyon için yüksek risk grubunda bulunan böbrek yetersizliği olan bireylerde serum Fetuin-A düzeyinin çok düşük olduğu tespit edilmiştir (25).

Çalışmamızda, son dönem böbrek hastalığı olan hasta grubunda, kemik mineral dansitesi, koroner arter kalsifikasyonu ile vasküler kalsifikasyon inhibitörü olan fetuin-A arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Son dönem böbrek yetersizliği gelişen hastalarda serum fetuin-A seviyeleri ile koroner kalsifikasyon (33) arasında anlamlı ilişki bildirilmiştir. Bu konuda yapılan bir başka çalışmada (46) 132 hemodiyaliz hastasında koroner arter kalsiyum skoru multislice BT ile değerlendirilmiş ve koroner kalsiyum skoru ile fetuin-A düzeyi arasında negatif bir korelasyon tespit edilmiştir. Tüm çalışmaların aksine Hermans ve arkadaşlarının (47) yaptıkları çalışmada serum fetuin-A düzeyi yönünden SDBY hastalar ile kontrol grubu arasında fark bulunmamıştır. Ayrıca bu grup hastalardaki aort sertliği ile serum fetuin düzeyleri arasında da ilişki bulunmamıştır.

Biz çalışmamıza aldığımız hastaları KAKS'a göre düşük kalsiyum skorlu hastalar (KAKS<10, Grup 1 n:25), orta kalsiyum skorlu (KAKS 10–249, Grup 2 n:26) ve yüksek kalsiyum skorlu (KAKS≥250, Grup 3 n:27) hastalar olmak üzere 3 gruba ayırdık. Fetuin A düzeyleri ile KAKS arasında sadece grup 1 ile grup 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı (p: 0,023). Her üç grup fetuin-A açısından

değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlılık yoktu. Ayrıca koroner arter kalsiyum skoruyla fetuin-A arasındaki ilişkiye bakıldığında kalsiyum skoru arttıkça fetuin-A değerinin azaldığı görüldü ($r:-0.30$, $p:0.009$).

London ve ark. (50) yaptığı çalışmada kemik biyopsilerinde dinamik kemik hastalığı bulguları olan hastalarda daha yüksek arter kalsifikasyon skoru saptanmıştır. Dinamik kemik hastalığı arter kalsifikasyonu için bir risk faktörü olarak bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda kemik dansitometrileri açısından karşılaştırıldığında osteopenik grup ile nonosteopenik grup karşılaştırıldığında anlamlı farklılık saptanmamıştır. Nonüremik popülasyonda kemik dansitometri ile koroner kalsifikasyon arasında ilişki bildirilmişken üremik hastalarda bildirilen veri yoktur.

Çalışmamızda hastalar femur T skorlarına göre 2 gruba ayrıldı. T skoru -2.0 'nin altında olan bireyler grup 1, -2.0 üzerinde olan bireyler grup 2 olarak ele alındı. Hastaların femur T skor grupları (grup 1 ve 2) ile yaş, fetuin-A ve toplam KAKS değerleri arasındaki ilişki değerlendirildi. Gruplar arasında fetuin-A ve KAKS değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Grup 1'de yaş anlamlı olarak daha yüksekti ($p:0,017$).Bizim bulgumuz bu grup hastalarda koroner kalsifikasyonun gelişimindeki kemik metabolizmasının rolünü göstermede kemik dansitometresinin yeterli olmayabileceğini düşündürmüştür.

Sonuç olarak,

1. Koroner arter kalsiyum skoru hemodiyaliz hastalarında sıklıkla yüksek bulunmaktadır. Çalışmamızda koroner arter kalsifikasyon sıklığı %67.9 bulundu. Bu sonuç daha önceki çalışmalarda da benzer olarak saptanmıştır.
2. Fetuin-A konsantrasyonu ile KAKS korele bulunmuştur. Bu bulgu fetuinin vasküler kalsifikasyon oluşumundaki rolünü destekler.
3. Kemik dansitometresi ile KAKS arasında ilişki bulunmamıştır. Bu konuda daha geniş kapsamlı çalışmalara daha iyi metodlarla (örneğin kemik biyopsisi gibi) ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Fontain MA, Albert A, Dubois B et al: Fracture and bone mineral density in hemodialysis patients. *Clin Nephrol* 2000;54:218–226.
2. Kawagishi T, Nishizawa Y, Konishi T et al: High-resolution B-mode ultrasonography in evaluation of atherosclerosis in uremia. *Kidney Int* 1995;48:820–826.
3. Collins AJ. Cardiovascular mortality in end-stage renal disease. *Am J Med Sci.* 2003
4. Menso J. Nube. The acute phase respons in chronic haemodialysis patients: a marker of cardiovascular disease ? *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17 (Suppl 3):19-23
5. Paparello J, Kshirsagar A, Batlle D. Comorbidity and cardiovascular risk factors in patients. *Semin Nephrol.* 2002 Nov; 22(6): 494-506. Review.
6. Tammy Keough-Ryan, MD, Hutchinson, MB, BCh, Brenda MacGibbon, PhD, Martin Senecal, MSc. Studies of prognostic factors in end-stage renal disease: an epidemiological statistical critique. *Am J Kidney Dis.* 2002;39:1196-1205.
7. Jaradad MI, Molitoris BA. Cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease. *Semin Nephrol.* 2002Nov;22(6):459-73. Review.
8. Blancher, J, Guerin, AP, Pannier, B et al ‘Arterial calcifications, arterial stiffness and cardiovascular risk in end stage renal disease’ *Hypertension.* 2001; 38 : 938-42
9. Wang AY, Wang M, Woo J, Law CW, Li PK, Lui SF, Sanderson JE, Cardiac valve in long-term peritoneal dialysis patients: a prospective study. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Jan;14(1):159-68
10. Goodman WG, Goldin, J, Kuizon, BD et al. ‘Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis’ *N Engl J Med.* 2000; 342 1478-83
11. Ketteler M, Westenfeld R, Schlieper G, Bradenburg V. Pathogenesis of vascular calcification in dialysis patients. *Clin Exp Nephrol.* 2005 Dec;9(4):256-70. Review.
12. Ketteler M, Bongarz P, Westenfeld R, Wildberger JE, Mahnken AH, Bohm R, Metzger T, Wanner C, Jahn-Dechent W, Floege J. Association of low fetuin-

- A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. *Lancet*. 2003 Mar 8;361(9360):827-33
13. Türkiye’de Nefroloji-Diyaliz ve Transplantasyon Registry 2004
 14. USRDS. 2003 Annual Data Report: Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States. Bethesda, MD; 2003.
 15. Culeton BF, Larson MG, Wilson PW, Evans JC, Parfrey PS, Levy D. Cardiovascular disease and mortality in a community-based cohort with mild renal insufficiency. *Kidney Int*. 1999 Dec;56(6):2214-9.
 16. Garg AX, Clark WF, Haynes RB, House AA. Moderate renal insufficiency and the risk of cardiovascular mortality: results from the NHANES I. *Kidney Int*. 2002 Apr;61(4):1486-94.
 17. Wang AY, Woo J, Lam CW, Wang M, Chan IH, Gao P, Lui SF, Li PK, Sanderson JE. Associations of serum fetuin-A with malnutrition, inflammation, atherosclerosis and valvular calcification syndrome and outcome in peritoneal dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2005 Aug;20(8):1676-85.
 18. Stenvinkel P, Wang K, Qureshi AR, Axelsson J, Pecoits-Filho R, Gao P, Barany P, Lindholm B, Jogestrand T, Heimbürger O, Holmes C, Schalling M, Nordfors L. Low fetuin-A levels are associated with cardiovascular death: Impact of variations in the gene encoding fetuin. *Kidney Int*. 2005 Jun;67(6):2383-92
 19. Peter Stenvinkel. The role of inflammation in the anaemia of end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16(Suppl 7):36-40.
 20. Proudfoot D, Skepper JN, Shanahan CM, Weissberg PL. Calcification of human vascular cells in vitro is correlated with high levels of matrix Gla protein and low levels of osteopontin expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:379–388.
 21. Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease (1999) *N. Engl. J. Med.*, 340, 115-126.
 22. Burke, A.P., Farb, A., Malcom, G.T., Liang, Y.H., Smialek, J. and Virmani, R. Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly. (1997) *N. Engl. J. Med.*, 336, 1276-1282.
 23. Doherty, T.M., Asotra, K., Fitzpatrick, L.A., Qiao, J.H., Wilkin, D.J., Detrano, R.C., Dunstan, C.R., Shah, P.K. and Rajavashisth, T.B. Calcification in

- atherosclerosis: bone biology and chronic inflammation at the arterial crossroads (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 11201-11206.
24. Collett, G.D. and Canfield, A.E. Angiogenesis and pericytes in the initiation of ectopic calcification. (2005) *Circ. Res.*, 96, 930-938.
 25. S. Dellegrottaglie, J. Sanz and S. Rajagopalan 2006 *Current Molecular Medicine*, 6, 515-524 515 Molecular Determinants of Vascular Calcification: A Bench to Bedside View
 26. Keith A. Hruska, Suresh Mathew and Georges Saab 2005 *Circ. Res.*;97;105-114 Bone Morphogenetic Proteins in Vascular Calcification
 27. Junichiro J. Kazama 2004 *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 13:411–415 Osteoprotegerin and bone mineral metabolism in renal failure
 28. Kiel, D.P., Kauppila, L.I., Cupples, L.A., Hannan, M.T., O'Donnell, C.J. and Wilson, P.W. (2001) *Calcif. Tissue Int.*, 68, 271-276.
 29. Proudfoot, D., Skepper, J.N., Hegyi, L., Bennett, M.R., Shanahan, C.M. and Weissberg, P.L. (2000) *Circ. Res.*,
 30. Chertow, G.M., Burke, S.K. and Raggi, P. (2002) *Kidney. Int.*, 62, 245-252.
 31. Raggi, P. (2002) *Nephrol. Dial. Transplant.*, 17, 332-335.
 32. Schafer C, Heiss A, Schwarz A, Westenfeld R, Ketteler M, Floege J, Muller-Esterl W, Schinke T, Jahnke-Dechent W. The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *J Clin Invest.* 2003 Aug;112(3):357-66.60
 33. Moe SM, Reslerova M, Ketteler M, O'Neill K, Duan D, Koczman J, Westenfeld R, Jahnke-Dechent W, Chen NX. Role of calcification inhibitors in the pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease (CKD). *Kidney Int.* 2005 Jun;67(6):2295-304
 34. Shaw, L.J., Raggi, P., Schisterman, E., Berman, D.S. and Callister, T.Q. (2003) *Radiology*, 228, 826-833.
 35. Raggi, P., Shaw, L.J., Berman, D.S. and Callister, T.Q. (2004) *J. Am. Coll. Cardiol.*, 43, 1663-1669.
 36. Detrano R, Hsiai T, Wang S, Puentes G, Fallavollita J, Shields P, Stanford W, Wolfkiel C, Georgiou D, Budoff M, Reed J: Prognostic value of coronary calcification and angiographic stenoses in patients undergoing coronary angiography. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:285-290.

37. Arad Y, Spadaro LA, Goodman K, Lledo-Perez A, Sherman S, Lerner G, Guerci AD: Predictive value of electron beam computed tomography of the coronary arteries. 19- month follow-up of 1173 asymptomatic subjects. *Circulation* 1996;93: 1951-1953.
38. Raggi P, Callister TQ, Cooil B, He ZX, Lippolis NJ, Russo DJ, Zelinger A, Mahmarian JJ: Identification of patients at increased risk of first unheralded acute myocardial infarction by electron-beam computed tomography. *Circulation* 2000;101: 850-855.
39. Black DM, Cummings SR, Genant HK, Nevitt MC, Palermo L, Browner W: Axial and appendicular bone density predict fractures in older women. *J Bone Miner Res* 1992;7:633-638.
40. Stein MS, Packham DK, Ebeling PR, Wark JD, Becker GJ: Prevalance and risk factors for osteopenia in dialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1996;28:515-522.
41. Coco M, Rush H: Increased incidence of hip fractures in dialysis patients with low serum parathyroid hormone. *Am J Kidney Dis* 2000;36:1115-1121.
42. Atsumi K, Kushida K, Yamazaki K, Shimuzu S, Ohmura A, Inoue T: Risk factors for vertebral fractures in renal osteodystrophy. *Am J Kidney Dis* 1999;33:287-293.
43. Jamal SA, Chase C, Goh YI, Richardson R, Hawker GA: Bone density and heel ultrasound testing do not identify patients with dialysis-dependent renal failure who have had fractures. *Am J Kidney Dis* 2002;39:843-849.
44. Agatston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, et al: Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J Am Coll Cardiol* 1990;15:827-832.
45. Raggi P, Boulay A, Chasan-Taber S, Amin N, Dillon M, Burke SK, Chertow GM. Cardiac calcification in adult hemodialysis patients. A link between end-stage renal disease and cardiovascular disease? *J Am Coll Cardiol*. 2002 Feb 20;39(4):695-701.
46. Coen G, Manni M, Agnoli A, Balducci A, Dessi M, De Angelis S, Jankovic L, Mantella D, Morosetti M, Naticchia A, Nofroni I, Romagnoli A, Gallucci MT, Tomassini M, Simonetti G, Splendiani G. Cardiac calcifications: Fetuin-A and other risk factors in hemodialysis patients. *ASAIO J*. 2006 Mar-Apr; 52(2): 150-6.

47. Hermans MM, Brandenburg V, Ketteler M, Kooman JP, van der Sande FM, Gladziwa U, Rensma PL, Bartelet K, Konings CJ, Hoeks AP, Floege J, Leunissen KM. Study on the relationship of serum fetuin-A concentration with aortic stiffness in patients on dialysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2006 May;21(5):1293-9.
48. Derici U, El Nahas AM. Vascular calcifications in uremia: old concepts and new insights. *Semin Dial*. 2006 Jan-Feb;19(1):60-8.
49. Giachelli CM, Jono S, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H: Vascular calcification and inorganic phosphate. *Am J Kidney Dis* 38:S34–S37, 2001
50. London GM, Marty C, Marchais SJ, Guerin AP, Metivier F, de Vernejoul MC: Arterial calcification and bone histomorphometry in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1943-1951.
51. Yildiz A, Memisoglu E, Oflaz H, Yazici H, Pusuroglu H, Akkaya V, Erzenin F, Tepe S. Atherosclerosis and vascular calcification are independent predictors of left ventricular hypertrophy in chronic haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.*, April 1, 2005; 20(4): 760 - 767.