

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**HEMODİYALİZ HASTALARINDA VASKÜLER
KALSİFİKASYON, SERUM FETUİN-A VE
OSTEOPONTİN DÜZEYLERİ**

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

Uz. Dr. ÖZKAN ULUTAŞ

NEFROLOJİ BİLİM DALI

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. HÜLYA TAŞKAPAN**

MALATYA - 2013

TEŞEKKÜR

İç Hastalıkları ve Nefroloji eğitimim boyunca sürekli destek ve yardımını gördüğüm, kendimi geliştirmemde büyük katkıları olan bilim insanı Prof. Dr. Hülya Taşkapan'a ve onun şahsında bütün Nefroloji ve İç Hastalıkları öğretim üyelerine, uzmanlarına, asistanlarına, hemşirelerine ve hastane görevlilerine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
TABLolar VE ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kronik böbrek hastalığı.....	3
2.1.1. Kronik böbrek hastalığının tanımı ve etiyolojisi.....	3
2.1.2. Kronik böbrek hastalığının evrelemesi.....	3
2.2. Vasküler kalsifikasyon.....	5
2.2.1 Vasküler kalsifikasyonun çeşitleri.....	6
2.2.2 Vasküler kalsifikasyonun mekanizması.....	7
2.2.2.1. Osteogenezin indüksiyonu.....	7
2.2.2.1.1. Osteoblast benzeri hücrelerin kaynağı.....	7
2.2.2.1.2. Anjiyogenezin rolü.....	8
2.2.2.2. Osteokondrojenik farklılaşmanın indüklenmesi.....	8
2.2.2.2.1. Kemik morfogenetik proteinleri (BMP).....	8
2.2.2.2.2. Cbfa1 ve osterik.....	9
2.2.2.2.3. Fosfat, Parathormon, Vitamin D.....	10
2.2.2.2.4. Varfarin.....	12
2.2.2.2.5. Glukokortikoidler.....	12
2.2.2.2.6. Oksijen radikalleri.....	12
2.2.2.2.7. Alkalen Fosfataz.....	13
2.2.2.2.8. Leptin.....	13
2.2.2.2.9. Apoptozis.....	13
2.2.2.3. Mineralizasyon inhibisyonunun kaybı.....	14
2.2.2.3.1. İnorganik pirofosfat.....	14
2.2.2.3.2. MGP, Osteopontin, Osteoprotegerin.....	14
2.2.2.3.3. Fetuin.....	15
2.2.2.3.4. Smad 6.....	15

2.2.2.3.5. Klotho, Fibroblast büyüme faktörü- 23 (FGF-23).....	16
2.2.3. Vasküler Kalsifikasyonun Görüntülenmesi.....	16
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	17
3.1 İnsan fetuin-A' nın Eliza yöntemi ile tayininin yapılması.....	17
3.2. İnsan OPN düzeyinin Eliza yöntemi ile tayininin yapılması.....	18
3.3. 25-OH-Vitamin D düzeyinin çalışılması.....	19
3.4. Vasküler kalsifikasyon skorlaması.....	19
3.5. İstatistiksel analiz.....	19
4. BULGULAR.....	20
5. TARTIŞMA.....	25
6. KAYNAKLAR.....	29

TABLolar VE ŞEKİLLER DİZİNİ

Tablo 1. Hastaların GFR'lerine göre KBH evreleri.....	4
Tablo 4.1: Hasta ve kontrol grubunun demografik özellikleri.....	20
Tablo 4.2: Hasta grubunda vasküler kalsifikasyonun bağımsız belirleyicileri...	21
Tablo 4.3 : VK' un varlığına göre hasta grubunun karşılaştırılması.....	22
Tablo 4.4 : VK skoruna göre hasta grubunun karşılaştırılması.....	23
Tablo 4.5: Diyabeti olan ve olmayan hastaların karşılaştırılması.....	24
Şekil 4.1 : Hasta grubunda vasküler kalsifikasyon.....	21

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- KBH** : Kronik böbrek hastalığı
GFR : Glomerüler filtrasyon hızı
eGFR : Tahmini glomerüler filtrasyon hızı
SDBY : Son dönem böbrek yetmezliği
HD : Hemodiyaliz
PD : Periton diyalizi
KDIGO: Kidney disease improving global outcomes
KVH : Kardiyovasküler hastalık
MI : Miyokardiyal infarktüs
BT : Bilgisayarlı tomografi
VK : Vasküler kalsifikasyon
Ca : Kalsiyum
HT : Hipertansiyon
DM : Diyabetes mellitus
VSMC: (Vascular smooth muscle cells) Vasküler düz kas hücresi
ECM : Ekstraselüler matriks
BMP : (Bone morphogenetic proteins) Kemik morfojenetik proteinleri
BMP-2: Kemik morfojenetik proteini-2
SMC : (Smooth muscle cells) Düz kas hücresi
CVC : (Calcifying vascular cells) Kalsifiye olan vasküler hücre
OPN : Osteopontin
TNF- α : Tümör nekrozis faktör- α
LDL : Düşük molekül ağırlıklı lipoprotein
SP : Specificity protein
PTH : Parathormon
P : Fosfat
ALP : Alkalen fosfataz
PTHrP: Parathormon related peptide
MGP : Matriks Gla protein
NPP1 : Ektonükleotid pirofosfataz/fosfodiesteraz 1
ANK : Ankirin
FGF-23: Fibroblast büyüme faktörü- 23

EBCT : Elektron beam bilgisayarlı tomografi

EKO : Ekokardiyografi

PBH : Polikistik böbrek hastalığı

PCR : Polimeraz zincir reaksiyonu

HEMODİYALİZ HASTALARINDA VASKÜLER KALSİFİKASYON, SERUM FETUİN-A VE OSTEOPONTİN DÜZEYLERİ

ÖZET

Giriş: Vasküler kalsifikasyon (VK) hemodiyalize giren üremik hastalarda aterosklerotik kalp hastalığının ciddiyetinin bir göstergesidir ve kardiyovasküler olayları gösterebilir. Fetuin-A ve osteopontin (OPN) VK' uinhibe eden faktörler olarak bildirilmiştir. Fetuin-A düzeyleri son dönem böbrek yetmezlikli hastalarda (SDBY) düşük bulunmuştur. OPN düzeyleri ile ilgili diyaliz hastalarında yapılmış yeterince çalışma yoktur. Çalışmamızın amacı HD hastalarında VK' un belirlenmesi, VK' un 25-OH-Vitamin D, fetuin-A, OPN ile ilişkisinin belirlenmesi ve VK' un bağımsız belirleyicilerinin ortaya konulmasıdır.

Gereç ve yöntem: Çalışmaya 44' ü erkek 49' u kadın haftada 3 kez 4 saat hemodiyalize (HD) giren 93 SDBY hastası dahil edilmiştir. Yaş ve cinsiyet açısından benzer 20 sağlıklı kontrol ile karşılaştırılmıştır. Hastaların mamografi dozunda direkt el bilek grafisiyle VK incelemesi yapılmış, serum fetuin-A, OPN ve 25-OH-Vitamin D düzeylerine bakılmıştır.

Bulgular: HD hastalarının 45' inde (48,4%) VK tespit edilmiştir. Hasta grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında fetuin-A ($p < 0,029$) hasta grubunda anlamlı düzeyde düşük, OPN ($p < 0,000$), ve VK ($p < 0,002$) hasta grubunda anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Yaş, DM varlığı, HD süresi, serum albumin, fosfor, PTH, 25-OH-Vitamin D, Fetuin-A, OPN, kalsiyum düzeylerinin dahil edildiği lojistik regresyon modelinde yaş (OR:1,036), DM varlığı (OR: 17,527) ve PTH (OR: 1,002) VK' un bağımsız belirleyicisi olarak bulunmuştur. VK olan ve olmayan gruplar karşılaştırıldığında fetuin-A, OPN ve 25-OH-Vitamin D açısından anlamlı farklılık gözlenmemiştir.

Sonuç: VK HD hastalarında sık görülen bir bulgudur ve yaş, DM varlığı ile PTH' un VK' nın bağımsız belirleyicileridir. Serum fetuin-A düzeyleri hemodiyaliz hastalarında kontrol grubuna göre düşük, OPN düzeylerinin yüksek olduğunu saptadık. HD hastalarında VK' un mekanizmasının daha iyi anlaşılması, rol alan faktörlerin belirlenmesi ve etki mekanizmalarının ortaya konulması için daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Vasküler Kalsifikasyon; Fetuin-A; Osteopontin

VASCULAR CALCIFICATION, SERUM FETUIN A, OSTEOPONTIN LEVELS IN HEMODIALYSIS PATIENTS

ABSTRACT

Introduction: Vascular calcification (VC) in hemodialysis (HD) patients is a sign of severity of atherosclerotic cardiac disease and can predict cardiovascular outcomes. Fetuin-A and osteopontin (OPN) are reported as inhibitor factors of VC. Serum fetuin-A level is lower in patients with end stage kidney disease (ESKD) and getting HD therapy. There is not enough data about OPN in patients who are on dialysis. The aim of our research is to determine VC in HD patients, to show the relationship between VC and 25-OH-vitamin D, fetuin-A, OPN, and to introduce independent predictors of VC.

Materials and method: Ninety three patients with ESKD and on HD therapy were recruited. Of 93 patients 44 were male and 49 female. Patient group was compared with 20 healthy controls who are similar on age and sex with patient group. A plain graphy of hand was used for evaluation of VC. Serum fetuin-A, OPN, and 25-OH-vitamin D levels of both patients and controls were measured.

Results: VC was detected in 45 (48,4%) HD patients. Serum Fetuin-A ($p < 0,029$) levels were significantly lower in the patient group than in controls, wherease OPN ($p < 0,000$) and VC ($p < 0,002$) were significantly higher in the patient group. Age (OR:1,036), being DM (OR: 17,527), and PTH (OR: 1,002) were independent predictors of VC in a logistic regression model with age, being DM, HD duration, serum albumin, phosphate, PTH, 25-OH-vitamin D, fetuin-A, OPN and calcium levels. No significant difference was found between the patients with VC and patients without VC according to fetuin-A, OPN and 25-OH-vitamin D.

Conclusion: VC is a frequent sign in HD patients and age, presence of DM, PTH are predictors of VC. We detected that serum fetuin A levels were lower in HD patients compared to those of controls wherease OPN were higher in HD patients. Further studies are needed to understand the mechanismof VC, and determine the factors playing role in VC.

Keywords: Vascular Calcification; Fetuin-A; Osteopontin

1. GİRİŞ ve AMAÇ

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. SDBY hastalarında kardiyovasküler nedenlere bağlı ölüm sıklığı normal popülasyondan 10-20 kat fazladır. Bu kardiyovasküler nedenler arasından en önemlisi aterosklerotik kalp hastalığıdır. Üremik toksinlere, kronik inflamasyona ve diğer birçok nedene bağlı olarak SDBY' li hastalarda hızlanmış bir ateroskleroz vardır (1-8).

Ateroskleroz gelişiminde klasik risk faktörlerinin yanında (yaş, cinsiyet, sigara kullanımı, hipertansiyon, diyabet, dislipidemi gibi) kronik böbrek hastalığına bağlı risk faktörleri de mevcuttur. Artmış sıvı yükü, anemi, proteinüri, hiperparatiroidizm, kalsiyum-fosfor metabolizma bozuklukları, malnütrisyon, inflamasyon, oksidatif stres, dislipidemi, hiperhomosisteinemi ve üremik toksinler hastalığa bağlı risk faktörleri olarak sayılabilir. Tüm bu risk faktörleri erken ateroskleroz ve yüksek kardiyovasküler mortaliteyi açıklamada yetersiz kaldığı için araştırmacılar yeni risk faktörlerine yönelmişlerdir. SDBY hastalarında VK bağımsız risk faktörlerinden biri olarak bulunmuştur. Tek başına VK, kardiyovasküler hastalık riski ve mortalitenin bir göstergesi olarak ortaya çıkmıştır (5-10).

Ancak VK' un mekanizması ve VK' da rol oynayan faktörler tam olarak anlaşılmış değildir. SDBY' li hastalarda en çok çalışılan faktörlerden biri fetuin-A' dır. Bazı çalışmalarda farklı sonuçlar bulunsa da birçok çalışmada düşük fetuin-A düzeylerinin artmış VK ve artmış kardiyovasküler mortalite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Osteopontin (OPN) birçok hasta grubunda daha önce çalışılmasına rağmen SDBY' i hastalarında, üzerinde çok az durulan bir faktördür. Çeşitli hayvan deneylerinde kalsifikasyon inhibitörü olarak ortaya çıksa da SDBY hastalarında VK

üzerine rolü bilinmemektedir ve OPN ile ilgili klinik araştırma yok denecek kadar azdır (10-17).

Bu çalışmadaki amacımız hemodiyaliz (HD) hastalarında VK sıklığını belirlemek ve VK' un fetuin-A, OPN ve 25-OH-vitamin D ile ilişkisini ortaya koymaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kronik böbrek hastalığı

2.1.1. Kronik böbrek hastalığının tanımı ve etiyolojisi

Kronik böbrek hastalığı (KBH), 3 ay ya da daha uzun süren yapısal ya da fonksiyonel böbrek bozukluğu olarak tanımlanmaktadır. KBH' da glomerüler filtrasyon hızı (GFR) normal ya da azalmış bulunabilir. Yapısal bozukluk görüntüleme ile kanıtlanmış böbrek hastalığı ya da doku tanısı ile gösterilirken, fonksiyonel bozukluk böbrek fonksiyon bozukluğunu gösteren kan ve idrar parametreleri ile gösterilir. Böbrek hasarı olmaksızın GFR' nin 3 aydan uzun süreli 60 ml/dak/1.73 m²'den düşük seyretmesi KBH' nın ikinci bir tanımı olarak kabul görmektedir (1). Kronik böbrek hastalığının ülkemizde ve dünyada ki en önemli sebepleri diyabetes mellitus, kronik glomerulonefritler ve hipertansiyondur.

Amerika Birleşik Devletleri'nde 2002 yılı sonu itibariyle son dönem böbrek yetmezlikli (SDBY) hastaların insidansı milyon nüfusta 333' tür ve bu hastaların yıllık tedavi maliyetleri 17 milyar dolar civarındadır (2). Türkiye' de 2011 yılı sonu itibariyle Hemodiyaliz (HD) tedavisi alan hasta sayısı 49309, periton diyalizi (PD) tedavisi alan hasta sayısı 4635' tir (3) ve milyon nüfus başına HD ya da PD tedavisi alan hasta prevalansı 713 civarındadır.

2.1.2. Kronik böbrek hastalığının evrelemesi

Kidney disease improving global outcomes (KDIGO) klavuzu 2013' e göre kronik böbrek hastalığı GFR temel alınarak 5 evreye ayrılmıştır (Tablo 1). KBH' nin

evrelendirilmesi altta yatan böbrek hastalığının doğru tanımlanması, böbrek hasarının düzeyi, komorbid durumlar, komplikasyonların tahmini, böbrek hastalığının ne kadar hızlı ilerleyeceği ya da oluşabilecek kardiyovasküler hastalıklar hakkında bilgi vermez. Evrelendirme, hastalığın kategorizasyonu anlamına gelir ve keyfi evrelendirmeleri engellemek için yapılmıştır. Hastaların değerlendirilmesi ve yönetiminde standardı yakalayabilmek ve kılavuz önerilerinin daha kolay uygulanmasına imkan sağlamaktadır.

Tablo 1. Hastaların GFR'lerine göre KBH evreleri.

Evre	Tanımı	GFR(ml/dak/1.73 m ²)
1	Normal ya da artmış GFR'li böbrek hasarı	≥90
2	Hafif azalmış GFR'li böbrek hasarı	60-89
3a	Hafif-orta azalmış GFR'li böbrek hasarı	45-59
3b	Orta-ciddi azalmış GFR'li böbrek hasarı	30-44
4	Ciddi azalmış GFR'li böbrek hasarı	15-29
5	Böbrek yetmezliği	<15

(ya da diyaliz hastası)

Kardiyovasküler hastalıklar (KVH) renal replasman tedavileri almakta olan hastalarda en önemli mortalite ve morbidite sebebidir ve ölümlerin %50' sinden sorumlu tutulmaktadır. SDBY' likli hastalarda koroner arter hastalığı mortalitenin %20' sinden sorumlu tutulmaktadır (5). Kronik böbrek hastalığı, koroner arter hastalığı oluşumunda bağımsız risk faktörleri arasında yer almaktadır (4-8). Yapılan çalışmalarda GFR 60 ml/dak/1.73 m²'nin altına düştüğünde ya da idrarda albumin saptandığında ölüm ve kardiyovasküler mortalitede artış olduğu gösterilmiştir. Kronik böbrek hastalığındaki ilerleme genç yaştaki hastalarda bile kardiyovasküler morbidite ve mortalite riskini arttırmaktadır. KBH hastalarının herhangi bir kardiyovasküler olay geçirip SDBY' ne ilerlemeleri, akut miyokardiyal infarktüs (MI) riski, tekrarlayan MI riski, kalp yetmezliği ve ani kardiyak ölüm riski yüksektir ve bu kardiyovasküler olaylar sonrası mortaliteleri normal popülasyondan daha fazladır. Geniş kohortlarda KBH ve KVH (akut koroner sendrom, MI, kalp yetmezliği, ani kardiyak ölüm) arasında güçlü

bir bağımsız ilişki saptanmıştır. Tahmini GFR' si (eGFR) 45-59 ml/dak/1.73 m² arasında olanlarda %43, < 15 ml/dak/1.73 m² olanlarda %343 KVH riski artışı vardır (9). Geçirilen akut bir KVH sonrası ölüm riski GFR' si < 45 ml/dak/1.73 m² olan hastalarda oldukça yüksektir (10-12).

Yaş, erkek cinsiyet, sigara kullanımı, hipertansiyon, diyabet, dislipidemi KVH açısından bilinen risk faktörleridir. KBH olanlarda bunlara ek olarak hastalığa özgü risk faktörleri (artmış sıvı yükü, anemi, proteinüri, hiperparatiroidizm, kalsiyum- fosfor metabolizma bozuklukları, malnütrisyon, inflamasyon, oksidatif stres, dislipidemi, hiperhomosisteinemi ve üremik toksinler gibi) KVH sıklığını arttırmaktadır (13,14). Son yıllarda yapılan çalışmalarda KBH' nda vasküler kalsifikasyon (VK), damar sertliği arteriyal hipertansiyon, sol ventrikül hipertrofisi ve kardiyomiyopati ile beraber ölümün güçlü ve bağımsız bir belirteci olarak ortaya çıkmaktadır (15,16).

2.2. Vasküler kalsifikasyon

Vasküler kalsifikasyon (VK) kronik böbrek yetersizliği, diyabet, hipertansiyon ve ateroskleroz gibi endotel hasar oluşumu ile giden hastalıklarda sıklıkla görülen ve artmış morbidite ve mortalite ile ilişkili bir durumdur (17). KBH' nda artmış VK prediyaliz hastalarda bile görülebilen, aktif vitamin D ve fosfor bağlayıcılarının yaygın kullanılmadığı dönemlerde de sık karşılaşılan bir bulgudur (18). KBH' lı ve SDBY' li çocuklarda yapılan çalışmalarda %60'ın üzerinde yumuşak doku kalsifikasyonu ve %36 oranında kalsinozis ve VK saptanmıştır (16). KBH' nda bilgisayarlı tomografi (BT) ile yapılan çalışmalarda koroner arter kalsifikasyonu yüksek oranda görülmüştür. Diyabetik nefropatili hastalarda non-diyabetiklere oranla koroner arter kalsifikasyonu daha fazla görülmüştür (94%-59% p<0,001) (19). Direkt grafilerde bile SDBY hastalarında VK 57%' ye varan oranlarda gösterilebilmektedir. PD hastalarında direkt grafi ile 50% oranında vasküler kalsifikasyon saptanmıştır (20). Sonuç olarak prediyaliz hastalarda ve SDBY hastalarında vasküler kalsifikasyonun sıkça karşılaşılan bir bulgu olduğu görülmektedir.

2.2.1 Vasküler kalsifikasyonun çeşitleri

Arterial kalsifikasyon odakları içindeki kalsiyum (Ca) insan arteriovenöz fistüllerinden ve aortalarından alınan örneklerde de gösterildiği gibi hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) yapısındadır. VK damar duvarında iki ayrı tabakada olabilir:

- a) İntimal kalsifikasyon
- b) Mediyal kalsifikasyon (Mönckeberg sklerozu)

VK embriyonik kemikleşme ile benzerlik gösterir. Embriyonik kemikleşme 'endokondral kemikleşme' ve 'intramembranöz kemikleşme' olmak üzere süreci iki şekilde gerçekleştirmektedir. Endokondral kemikleşme, kondrogenез sonrası mevcut vaskülarize hiyalin kıvrıkdağın yerini alan kemikleşme türü iken intramembranöz kemikleşme ise kıvrıkdağın modele ihtiyaç duymadan mezenşimal kök hücrelerin osteoblastik hücrelere dönüşmesi ve tip 1 kollajenden oluşan matriksin kalsifikasyonu ile oluşmaktadır (21). İntimal kalsifikasyon oluşumunda endokondral kemikleşme esas rol oynarken, mediyal kalsifikasyonda ise primer olarak intramembranöz kemikleşme görülmektedir (22).

İntimal kalsifikasyon tipik olarak koroner arterler gibi kasları besleyen arterlerde ve aorta gibi büyük damarlardaki aterosklerotik lezyonlarda görülür. Aterosklerotik lezyonlar genellikle çocukluk çağında yağlı çizgilenmeler (içi yağ damlacıklarıyla dolu olan makrofaj birikintileri) şeklinde başlayıp ileri yaşlarda pre-aterom plağı ve ateroskleroza dönüşürler. Pre-ateromlar yağ damlacıkları, ölü hücre artıkları ve makrofaj köpük hücreleri içerirler. Ateromlar da yağlı çekirdek, yağ içeren düz kas hücreleri ve Ca granülleri içerirler (23).

Mediyal kalsifikasyon daha çok orta ve büyük arterlerin (femoral, tibial, uterin arterler gibi) elastik laminalarında oluşur ve vasküler düz kas hücreleri ile yakından ilişkilidir. Mediyal kalsifikasyon direkt grafide boru ya da tramvay şeklinde bir görünüm göstermektedir ve genellikle non-inflamatuvar bir durumdur (24-26).

İntimal kalsifikasyon ilerleyen yaşla beraber aterosklerotik lezyonlarda oluşmaktadır ve hipertansiyon (HT), diyabetes mellitus (DM), dislipidemi, sigara kullanımı gibi risk faktörleriyle yakından ilişkilidir (27). İntimal kalsifikasyon yama tarzındadır ve damar duvarı boyunca devamlılık göstermez. Mediyal kalsifikasyonun gençlik çağında başlar ve SDBY hastalarında sıkça görülür.

2.2.2 Vasküler kalsifikasyonun mekanizması

Uzun yıllardır VK bilinen bir durum olmakla beraber son yıllarda yaşlanmaya bağlı pasif bir mekanizması olmadığı anlaşılmıştır. Yeni kanıtlar kalsifikasyon oluşumu aktivatörleri ve mineralizasyon inhibitörlerinin yarış halinde olduğu sıkı kontrol altında olan bir sürece işaret etmektedir. Ancak kesin mekanizma tam olarak bilinmemektedir. VK mekanizmasını 2 başlık altında inceleyebiliriz.

- 1) Osteogenezin indüksiyonu
- 2) Mineralizasyon inhibisyonunun kaybı

2.2.2.1. Osteogenezin indüksiyonu

2.2.2.1.1. Osteoblast benzeri hücrelerin kaynağı

Damar duvarında bulunan osteoblast benzeri hücreler VK mekanizmasını açıklamada önemli yere sahiptir. Bu hücrelerin nereden köken aldığı tam bilinmemekle beraber bu konuda çeşitli hipotezler vardır. Bazı araştırmacılar osteoblast benzeri hücrelerin vasküler düz kas hücrelerinin (VSMC) çeşitli uyarılar sonucu fenotip olarak değişmesiyle oluştuğunu (28,29), bir kısım araştırmacılar da bu hücrelerin doğuştan damar duvarında bulunan perisitler ya da dolaşımdaki kök hücrelerin aktivasyonu ve farklılaşması sonucu oluştuğunu düşünmektedirler (30).

VSMC'leri farklılaşırlar, ve çeşitli uyarıların etkisiyle çoğalıp ekstraselüler matriks (ECM) sentezine başlarlar. Oksidatif stres, kemik morfogenetik proteinleri (Bone morphogenetic proteins, BMP) ya da pirofostaf düzeyindeki değişiklikler gibi uyarılar osteojenik değişime sebep olabilir (31). Aterosklerotik lezyon fibrokalsifik plağa ilerlerse kemik morfogenetik proteini-2 (BMP-2) salgılanır ve core binding factor- α 1 (Cbfa1), osterix gibi transkripsiyon faktörleri aktive olur.

Yapılan araştırmalarda vasküler duvarda düz kas hücrelerinin (smooth muscle cells, SMC) bir alt grubu olan, kendiliğinden nodüller oluşturan ve uzun dönem kültürde bekletildiğinde kalsifikasyon gösteren kalsifiye olan vasküler hücreler (Calcifying vascular cells, CVC) bulunmuştur. Bu nodüller artmış alkalin fosfataz aktivitesi ve osteokalsin, osteonektin, osteopontin (OPN) sentezlemeleri nedeniyle pek çok açıdan kemik dokuya benzemektedirler (32). Bu hücreler multipotent kök hücre gibi davranırlar ve osteoblast dahil olmak üzere bir çok hücreye dönüşebilirler. VSMC'

lerinin 20%-30%' unu oluşturdıkları düşünülmektedir (29,33,34).

Başka bir teoriye göre damar duvarındaki perisitlerin aktivasyonu VK' ya neden olmaktadır. Perisitler endotelle sıkı ilişki içinde damar duvarında bulunmaktadır ve α -aktin, β -aktin, 3G5 epitopu taşımaları nedeniyle fenotip olarak CVC'lere çok benzerler. Bu hücreler osteoblast ve kondrosite dönüşebilen mezenşimal kök hücreleridir. Yapılan çalışmalarda perisitlerin osteoprogenitor hücrelere dönüşerek BMP uyarısı ile kafatasında yara iyileşmesini sağladığı (35), kemik doku , kırık, mineralize kırık, non-mineralize kırık dahil birçok iskelet dokuya dönüştüğü gösterilmiştir (36,37). Uzun dönem kültürde CVC' ler gibi büyük nodüller ve ECM oluştururlar. Bu nodüller tip 1 kollajen, OPN, matriks Gla protein ve osteokalsin içerirler. Aterosklerotik lezyondaki bu hücreler uyarıldığında arter duvarında osteoprogenitor hücreler oluşmasına sebep olabilir (37,38).

2.2.2.1.2. Anjiyogenezin rolü

Vasküler ve valvüler kalsifikasyonun olması için anjiyogeneze ihtiyaç olduğunu gösteren deliller vardır. Kalsifikasyon alanlarında daha fazla neovaskülarizasyon görülmektedir. Bir çalışmada insan kalbine silikon enjekte edilmiş ve enjeksiyon bölgelerinde çok fazla miktarda anjiyogeneze saptanmıştır (39). Anjiyogenezin kalsifiye alanlar etrafında olduğu ve lezyonun büyüklüğü ile doğru orantılı olduğu görülmüştür. Anjiyogeneze ve kalsifikasyonun aynı lokalizasyonda olması VK' nun vasküler endotel, SMS, perisit, osteoprogenitor hücreler ve osteoblastların yakın etkileşimiyle olan multifaktöryel bir hadise olduğunu göstermektedir. Collett ve arkadaşlarının çalışmasında BMP-2, BMP-4 ve vasküler endotelial büyüme faktörün (VEGF), osteoblast göçünü ve farklılaşmasını uyardığı görülmüştür (40). VEGF' nin osteoblastlar ve kondrositler üzerinde reseptörleri mevcuttur ve bir dizi karmaşık uyarı sistemi sonucu bu hücreleri aktive etmektedir. Anjiyogenezin siyaloprotein ve OPN gibi diğer mediyatörleri de fibrokalsifik plakta bulunmaktadır (41,42).

2.2.2.2. Osteokondrojenik farklılaşmanın indüklenmesi

2.2.2.2.1. Kemik morfogenetik proteinleri (BMP)

BMP' ler transforming büyüme faktörü- β (TGF- β) ailesinden olup VK' da mediatör olarak yer alırlar. BMP-2 ve BMP-4 lokal inflamasyonu ve mineralizasyonu aktive ederken, BMP-7 VK' u geciktirmektedir. BMP-2 60 kDa bir protein olarak

sentezlenir ve 18-kDa' luk bir monomer olarak salgılanır. İki monomer birleşerek aktif homodimeri oluşturur ve reseptörüne bağlanır (43). BMP reseptörleri kemik morfojenetik proteini reseptörü-1 (Bone morphogenetic protein receptor, BMPR1 ve BMPR2' dir. Ligandı bu reseptörlere bağlandığında BMPR2 tip 1 reseptörün fosforilasyonunu ve aktivasyonunu sağlar ve sonrasında düzenleyici Smad' lar fosforillenir (44-46). Bu Smad' lar hedef gen ekspresyonunu sağlarlar (47). BMP-2' nin direkt etkileri de mevcuttur ancak hem reseptör üzerinden hem de direkt etkileri tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır.

BMP-2' nin aksine BMP-7 VK' u engellemekte, osteoblastik değişimi terse çevirmektedir (48). BMP-7 etkisini p21, Smad 6 ve 7' yi aktive ederek gösterir. Fare modellerinde BMP-7 ile tedavi edilenlerde VK' un durduğu gösterilmiştir (49). BMP-2 ve BMP-7' nin etkilerinin birbirinin zıt olması reseptörlere bağlanma şekillerinin farklı ve sinyal yolağını farklı yollardan aktive ettiklerini düşündürmektedir. Familial pulmoner hipertansiyon hastalarında BMPR2 mutasyonları bildirilmiştir. Bu hastaların yarısında normal popülasyonda çok nadir bir durum olan pulmoner damarlarda distrofik kalsifikasyonlar saptanmıştır (50).

BMP-2' ler multipotent mezenşimal hücrelerin hem ostejenik hem de kondrojenik farklılaşmalarını sağlarlar (51). Aterosklerotik lezyon ilerledikçe endotel hücreleri, SMC' ler ve köpük hücrelerinden BMP salınımı artar (52-54). Ayrıca oksidatif stres, kan akım turbülansı ve hipoksi BMP salınımını ve kalsifikasyonu arttırmaktadır (55-58). VSMC' nin tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) ve okside düşük molekül ağırlıklı lipoprotein (LDL) inkübasyonu sonucu BMP-2 salınımının arttığı gösterilmiştir (59).

2.2.2.2.2. Cbfa1 ve osteriks

BMP-2 vasküler kalsifikasyon açısından önemli bir mediatördür ve reseptöre bağlanma sonrası hücre içi etkileri VK' da anahtar rol oynayan bazı osteojenik transkripsiyon faktörleri (Msx2, Cbfa1, osterix) aracılığıyla olur. Cbfa1 osteoblastik farklılaşmada anahtar rol oynar ve etkisi için osterix' e ihtiyaç duyar (60,61). Osteriks SP (Specificity protein) transkripsiyon faktör ailesinden çinko parmak içeren bir proteindir. Osteriks olmayan farelerde kemik doku oluşmamaktadır. Cbfa1 olmayan farelerde fonksiyonel osteoblastlar olmaz ve hipertrofik kartilaj ya da mineralize kemik oluşmaz (62). İnsanda Cbfa1 mutasyonu sonucu fontanelerin açık olduğu, çok sayıda

diş, klavikula yokluğu ve boy kısalığı kliniği görülen kleidokraniyal displazi hastalığı ortaya çıkar (63). VSMC' inde sentezlenen Cbfa1 osteoblastik farklılaşmanın bir belirteçidir ve VK' un ilk basamağıdır. KBH' ndan alınan doku örneklerinde Cbfa1 özellikle kalsifiye arteryal dokuda görülmüştür (64). Cbfa1 osteoblastik farklılaşmada rol alan osteokalsin, OPN, tip 1 kollajen gibi proteinleri kontrol eder (65). Cbfa1 yolağı Cbfa1' in yanında ECM/hücre etkileşimi ile de kontrol edilir. U0126 ECM/hücre etkileşiminin inhibitörüdür ve osteokalsin geninin uyarılmasını engeller (66).

2.2.2.2.3. Fosfat, Parathormon, Vitamin D

KBH' nda yaşla orantısız derecede VK görülür. Aynı yaştaki KBH hastalarını normal kontrollerle ultrasonografi ile karşılaştırıldığında, KBH hastalarında çok daha fazla kalsifiye plaklar görülmüştür (67). Hipotezlerden biri bu hastalardaki azalmış GFR ve artmış parathormona (PTH) bağlı yüksek fosfat (P) düzeylerinin VK' a sebep olduğu yönündedir. Önceleri bu durum artmış serum fosfatının kalsiyum ile birleşerek damar duvarına çöktüğü şeklinde basitçe açıklanmaya çalışılsa da yapılan çalışmalar yüksek P düzeylerinin VSMC' de osteoblastik farklılaşmaya neden olduğunu göstermiştir. Hücre kültürlerine P eklenince VSMC' lerde mineralizasyonun arttığı ve bu hücrelerden OPN, alkalen fosfataz (ALP) sentezlendiği görülmüştür (68,69). Böbrek yetmezlikli hastalarda yükselmiş P düzeylerinin VSMC' nde farklılaşma yapması bir Na bağımlı P kotransporter olan Pit-1' bağılıdır. Böbrek yetmezlikli hastalarda Pit-1 kanallarının sayısı artmıştır. Bu kanallar hem serum P düzeyini yükselterek hem de direkt olarak Cbfa1 sentezini arttırarak VSMC' nde osteoblastik farklılaşmaya sebep olurlar (70). Tek başına yüksek P düzeyleri KBH' nda artmış VK' u açıklayamaz. Bu hastalardan P düzeylerinden bağımsız alınan serum örnekleri VSMC' nde OPN, ALP sentezini ve kalsifikasyonu arttırmıştır (69). Yine bu hastaların serum örnekleri Cbfa1 sentezini arttırmıştır.

PTH ve parathormon related peptid (PTHrP) patolojik kalsifikasyonda bir mediatör olarak rol oynayabilir. PTH ve PTHrP düşük dozlarda ALP' yi inhibe ederek VK' u engelleyebilir (71). Damarlardaki inhibitör rolünün yanında PTH kemiklerde osteoblastik gen sentezini arttırır. Ayrıca PTH' un protein kinaz A' yı aktive ederek osteoblastlardaki Cbfa1' in uyardığı ile ilgili bilgiler vardır (72), ancak VSMC' lerinde Cbfa1' i uyardığı ile ilgili veri yoktur.

KBH' nda renal osteodistrofiyi engellemek için kullanılan fosfat bağlayıcılar (kalsiyum içeren) ve vitamin D analoglarının VK' u tetiklediği bilinmektedir. Bazı hastalarda kalsiflaksiye varan VK görülmektedir. Bu durumda sevalemer gibi Ca içermeyen P bağlayıcı ajanları kullanmanın bazı avantajları olabilir. Hayvan çalışmalarında sevalemerin üremik farelerde serum P ve PTH düzeylerini düşürdüğü, aort kalsifikasyonu ve renal osteodistrofiyi azalttığı gösterilmiştir (73). Kalsiyum karbonat ve sevalemeri karşılaştıran fare çalışmalarında sevalemerin P'ı benzer düzeyde düşürmesinin yanında Ca, P ürünlerinde azalma, PTH düzeylerinde azalma ve buna bağlı olarak aortik kalsifikasyon ile renal osteodistrofide azalma sağladığı gösterilmiştir (74). Koroner arter hastalığı olanlarda yapılan klinik çalışmalarda sevalemerin kalsiyum içeren fosfor bağlayıcılara kıyasla VK' un ilerlemesini daha fazla engellediği görülmüştür (75). HD hastalarında sevalemer tedavisinin LDL kolesterol ve inflamasyonu azalttığı görülmüştür (76). Başka bir çalışmada sevalemer ile tedavi edilen hastaların kalsiyum içeren P bağlayıcılarla tedavi edilenlere kıyasla daha az hiperkalsemiye meyilli oldukları ve bilgisayarlı tomografi ile bakılan damar kalsifikasyonunun sevalemer grubunda ilerlemediği diğer grupta ciddi düzeyde arttığı gösterilmiştir (77). Ayrıca sevalemer tedavisinin kemik kaybını kalsiyum tuzlarına göre daha fazla azalttığı gösterilmiştir (78).

Sekonder hiperparatiroidinin tedavisinde kullanılan kalsitriol (1,25 dihidroksi vitamin D, vitamin D' nin aktif formu) distrofik kalsifikasyon yapabilir. Zaten vitamin D toksisitesi hayvan çalışmalarında VK' u çalışmak için model olarak kullanılmaktadır (79). Kalsitriol doz bağımlı olarak VSMC' de ALP aktivitesini artırır (80). Makrofajların 1 α -hidroksilaz aktivitesi mevcuttur ve dolaşımdaki 25-hidroksi vitamin D' yi aktif formuna çevirebilir. Kalsitriol reseptörüne bağlandıktan sonra VEGF, elastin ve tip 1 kollajen gibi yapısal proteinler, matriks metalloproteinaz 9, miyozin gibi damar duvarındaki birçok geni etkiler (81-84). Yapısal proteinler sentezini artırması kalsitriolün VK' a olan etkisini açıklamaya yardımcı olabilir. KBH' nda kalsitriol tedavisi barsaklardan Ca ve P emilimini artırarak hiperfosfatemi ve hiperkalsemiye dolayısıyla yumuşak dokuda kalsifikasyona sebep olabilir. VSMC hücre kültürlerine kalsitriol verildiğinde hücrelerde kalsifikasyon ve ALP aktivite artışı görülmüştür (71). Vitamin D analogları ile tedavinin VK üzerine etkisi tartışmalıdır. Orta ve yüksek kardiyovasküler riski olan hastalar üzerinde yapılan 2 çalışmada aktif vitamin D tedavisinin VK' u azalttığı sonucuna ulaşılmıştır (85,86). KBH' nda hiperfosfatemi ve sekonder hiperparatiroidinin tedavisi için geliştirilen parakalsitriol ve kalsimimetik

ajanların ektopik kalsifikasyonu azaltıp, yaşam sürelerini arttırabileceği söylenmektedir.

2.2.2.2.4. Varfarin

Vitamin D antagonisti olan ve oral antikoagülan olarak kullanılan varfarin, bir kalsifikasyon inhibitörü olan matriks Gla proteininin (MGP) γ -karboksilasyonunu engelleyerek VK' a sebep olur. Bu nedenle varfarin tedavisinin etkileri tavşanlarda ve insanlarda çalışılmıştır. Varfarin tedavisi verilen tavşanlarda aortun lamina propriası ve aort kapağında 2 hafta sonra kalsifikasyon başlamış 5 hafta sonrada direkt grafide görünür hale gelmiştir (87). Varfarin alan hastalar (88 ± 113 ay) almayanlarla karşılaştırıldığında Koroner ve valvuler kalsifikasyon skorları daha yüksek bulunmuş (88).

2.2.2.2.5. Glukokortikoidler

Antiinflamatuvar özellikli bir grup steroid hormonu olan glukokortikoidlerin osteoblastik farklılaşma ve ektopik kalsifikasyona sebep olduğu gösterilmiştir. Uzun dönem kullanımda osteoporozu sebep olan glukokortikoidler vasküler hücrelerde osteokondrojenik farklılaşmaya sebep olmaktadır (89). Deksametazon verilen VSMC' inin osteoblastik farklılaşmaya sebep olan genler ve fenotipik markırlar sentezlediği görülmüştür. Benzer şekilde deksametazona maruz kalan perisitlerde MGP, OPN, ve vasküler kalsifikasyon bağımlı faktör mRNA gibi kalsifikasyon inhibitörlerinin azaldığı, ALP aktivitesi ve kalsiyum birikiminin arttığı görülmüştür. Bu çalışmalar kronik glukokortikoid tedavisinin değişik düzeylerde kalsifikasyon yapabileceğini göstermektedir (89).

2.2.2.2.6. Oksijen radikalleri

Oksidatif stres BMP-2, Cfba1 ve osteoblastik farklılaşma faktörlerinin sentezini artırır. CVC' in oksidatif stres maruz kalmaları osteogenezin aktifleşmesini sağlar (90). Okside LDL, okside 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine (ox-PAPC) ve isoprostane 8- isoprostane E₂' ye maruz kalan CVC' lerde ALP aktivitesinde artış gözlenmiştir (90). Endotel hücrelerinin okside LDL' ye maruz kaldıklarında BMP-2 üretmeleri, BMP-2 yolağında oksiyen radikallerinin mediyatör olabileceklerini düşündürmektedir.

2.2.2.2.7. Alkalen Fosfataz

ALP osteoblastların fonksiyonel fenotipik belirteçidir, ALP aktivitesi VK' un ve ECM birikiminin erken belirteçidir. Endokondral kemikleşmede ALP aktivitesi hidroksiapatit oluşumu için kritik öneme sahiptir. Damarlarda da ALP sentezi varsa kemiktekine benzer etki yapar. Mediyal kalsifikasyonda SMC' nde ALP düzeyleri yüksektir, Aterosklerotik lezyon içindeki VSMC' nde de ALP aktivitesi yüksek bulunmuştur. ALP vasküler kalsifikasyonun etkili bir inhibitörü olan pirofosfat düzeylerini azaltarak VK' a sebep olur (91,92).

2.2.2.2.8. Leptin

Artmış leptin düzeyinin VK' a sebep olabileceği ile ilgili deliller vardır. Obezitede ve azalan GFR' ye bağlı olarak böbrek yetmezliğinde serum leptin düzeyleri artar. Leptin ventromediyal hipotalamik nöronlardaki reseptörlerine ve osteoblastlar üzerindeki β -adrenerjik reseptörlere bağlanarak ektopik kalsifikasyona sebep olur (93,94). Fare modellerinde artmış leptin düzeyleri kemik kitlesinin azalmasına neden olmuştur (93-95). Leptin kemik iliğindeki kök hücrelerin osteoprogenitör hücrelere dönüşmesini sağlar (96), ayrıca CVC' de in vitro osteoblastik farklılaşmaya neden olur (97). Leptin osteoblastik farklılaşmaya meyilli VSMC' e selektif olarak etki eder, farelerin arter duvarlarındaki CVC' de leptin reseptörü sentezlenir (97). Aortik endotel hücrelerinde leptin BMP-2 sentezine neden olan oksidatif stresi artırır (98).

2.2.2.2.9. Apoptozis

VK' un diğer bir mekanizması da patolojik süreçlere bağlı ya da yaşlanmanın doğal sonucu olarak VSMC' nin apoptozise uğramasıdır. BMP' ler pulmoner arterdeki SMC' nde bulunan bir antiapoptotik mediyatör olan Bcl-2 sentezini azaltarak apoptozise neden olurlar (99). Ayrıca apoptozisin in vitro inhibisyonu kalsifikasyonu inhibe ederken, stimülasyonunun kalsifikasyonu 10 kat arttırdığı gösterilmiştir (100). Apoptozis ve kalsifikasyon ile ilgili veriler daha çok yaşlılarda görülen mediyal kalsifikasyonla ilgili olsada, VSMC ve kök hücrelerdeki farklılaşma ile beraber apoptozis aterosklerotik kalsifikasyonda da rol oynamaktadır.

2.2.2.3. Mineralizasyon inhibisyonunun kaybı

Dolaşımda bulunan bazı yapısal proteinler vasküler ve yumuşak doku kalsifikasyonunu engellemektedir. Bu kalsifikasyon inhibitörlerinin kaybı ya da yetersiz olması VK ya da yumuşak doku kalsifikasyonuna neden olur.

2.2.2.3.1. İnorganik pirofosfat

İnorganik pirofosfat VC' un güçlü bir inhibitörüdür ve giderek bir vasküler parakrin faktör olarak algılanmaktadır. ALP' nin substratı olmasının yanında inorganik pirofosfat düzeyleri ektonükleotid pirofosfataz/fosfodiesteraz 1 (NPP1) aktivitesi ve bir selüler pirofosfat taşıyıcısı olan ankirin (ANK) tarafından düzenlenmekte ve normal sınırlarda tutulmaktadır. NPP1 eksikliği infantil idiyopatik arteryal kalsifikasyona, ANK eksikliği ise endokondral VK' da artışa neden olur (101,102). Pirofosfat direkt olarak hidroksiapatit oluşumunu ve Ca birikimini inhibe eder (103) ve VSMC' nin osteokondrojenik dönüşümünü engeller. NPP1' i olmayan farelerde arteryal ve ligamentel kalsifikasyon sık görülür (102). Bu çalışmalar ALP' yi inhibe ederek, NPP1 ve ANK' yı aktive ederek VC' nun engellenebileceğini göstermektedir (104).

2.2.2.3.2. MGP, Osteopontin, Osteoprotegerin

MGP hücre farklılaşmasını ve kalsifikasyonu engellemekle beraber hangi mekanizmayla yaptığı tam aydınlatılamamıştır (105-107). Etkisini BMP/BMPR2 kompleksini inhibe ederek ve BMP-2' ye direkt bağlanarak gösterir (105,106). Mineral depolanması ve osteojenik farklılaşmayı kontrol eden MGP' nin BMP2' ye olan oranıdır. Bu oran <1 ya da >15 ise kalsifikasyona meyil var demektir, 1-15 arasında ise kalsifikasyonun engellendiği yönündedir (106).MGP endoplazmik retikulumda K vitaminine bağlı γ karboksilasyona uğradıktan sonra aktif formuna dönüşür. MGP nin γ karboksilasyona uğramış formu MGP/BMP2 kompleksini oluşturur ve BMP-2' nin BMPR2 ile etkileşimini engeller (108). γ karboksilasyona uğramış MGP dolaşımda yine bir kalsifikasyon inhibitörü olan fetuine bağlanarak taşınır (109). γ karboksilasyona uğramamış MGP ise kalsifikasyonu artırır (110). MGP sentezlemeyen farelerde ateroskleroz olmaksızın arteryal kalsifikasyon görülmüştür (111). İnsanlarda BT ile bakılan VK düzeyleri serum MGP ile ters orantılı bulunmuştur (112). MGP dolaşımda

serbest bulunmaz, lokal arteriyel kalsifikasyon odaklarında sentezlenir (113). Bunun vücudun normal homeostazını korumak amaçlı olduğu düşünülmektedir. Kalsifikasyon odaklarında MGP artışı VK' u engelleyemezse aterosklerotik ya da mediyal kalsifikasyon görülür (114,115). MGP polimorfizmi ile plak kalsifikasyonu ve miyokardiyal infarktüs arasında zayıf bir ilişki bulunmuştur (116).

OPN kalsifikasyonu önleyen bir diğer önemli moleküldür. OPN' nin görevi osteoklast yüzeyinde bulunan ve integrin ailesinden olan $\alpha_v\beta_3$ 'e bağlanıp hücre içi kalsiyum düzeyini düşürüp osteoklastları uyarmaktır. OPN üzerinden gelişen osteoklastik kemik yıkımının bir diğer mekanizması da kemik rezorpsiyonu için asidik mikroortam oluşturan karbonik anhidraz 2 enziminin yapımının arttırılmasıdır. Ayrıca apatit kristallerine bağlanmak suretiyle mineralizasyonu direkt olarak da engelleyebilmektedir. OPN, aterosklerotik plak çevresinde bulunan makrofaj, düz kas hücreleri ve endotelyal hücrelerden de lezyonun şiddetiyle orantılı olarak salgılanmaktadır. Yapılan deneysel çalışmalarda MGP eksikliği olan farelerle hem MGP hem de OPN eksikliği olan fareler karşılaştırıldığında 2. grupta daha ciddi aortik kalsifikasyon olduğu ve OPN enjekte edilen farelerde ektopik kalsifikasyonun gerilediği görülmüştür (116-120). Osteoprotegerin (OPG) de VC' un etkili bir inhibitörüdür.

2.2.2.3.3. Fetuin

Damar duvarında fonksiyon gösteren OPN, OPG ve MGP' nin aksine fetuin dolaşımında etkilidir. Hidroksiapatit kristallerinin oluşmasını engeller ancak oluşan kristaller üzerine etkisi yoktur. Fetuini olmayan farelerde böbrek, kalp, dil ve ciltte yaygın kalsifikasyon görülmüştür. Düşük serum fetuin düzeyleri mortalite artışı ile ilişkilidir. Kalsiflaksi olan hastalarda serum fetuin-A düzeyleri yüksek bulunmuştur, bu da kalsiyum hemostazını koruma amaçlı fetuinin yükseldiğini ancak bunu başaramadığını gösteriyor olabilir.

2.2.2.3.4. Smad 6

Smad 6 intrasellüler BMPR2 inhibitörüdür. Smad 6' sını olmayan farelerde ciddi ektopik kalsifikasyonlar, damar duvarı kalsifikasyonu ve aortada kartilaj metaplazisi görülür.

2.2.2.3.5. Klotho, Fibroblast büyüme faktörü- 23 (FGF-23)

Klotho yaşlanmayı önleyici etkisinin yanında FGF-23' ün FGF reseptörüne bağlanmasını sağlayan bir kofaktördür. Klotho ve FGF-23 fosfat ve vitamin D metabolizmasında önemli yere sahiptir; fosforun idrarla atılımını artırır, vitamin D' nin 1 hidroksilasyonunu inhibe ederler. Hem klotho hem de FGF-23 eksikliği olan hastalarda, hızlı yaşlanma, ateroskleroz, yumuşak doku kalsifikasyonu ve VK gibi benzer bir klinik durum ortaya çıkmaktadır. KBH' ı olan farelerde fazla klotho sentezleyenlerin klotho eksikliği olanlara oranla daha az aortik kalsifikasyonu olduğu gösterilmiştir. Ayrıca klotho in vitro VSMC' nde fosfat bağımlı kalsifikasyonu direkt inhibe etmektedir. KBH' nda FGF-23' ün VK' a olan etkisi net değildir. KBH' nda yapılan bir çalışmada yüksek FGF-23 düzeylerinin artmış ateroskleroz ve VK' la ilişkili olduğu gösterilmiştir. Normal böbrek fonksiyonlu hastalarda ateroskleroz ile FGF-23 düzeyleri arasında ters orantı olduğu gösterilmiştir (121).

2.2.3. Vasküler Kalsifikasyonun Görüntülenmesi

Şu anda vasküler kalsifikasyonu net olarak gösteren duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bir biyokimyasal belirteç bulunmamaktadır. Görüntüleme ile VK tanısı konulabilmekle beraber görüntüleme metodu konusunda da üzerinde fikir birliği sağlanmış bir yöntem bulunmamaktadır. VK tanısında invazif olmayan görüntüleme metodları altın standarttır. Görüntüleme yöntemlerinden elektron beam bilgisayarlı tomografi (EBCT) ve multislice BT yaygın kullanılan pahalı yöntemlerdendir. Etkinliği yüksek olmasına rağmen maliyet-etkinliği açısından tartışmalıdır. Bu yöntemlerde kalsifiye alan, yoğunluk katsayısı ile çarpılarak agrastron CAC skoru hesaplanır. CAC skorunu kardiyak hadiselerin tahmininde etkindir. Ancak bu yöntemle mediyal ve intimal kalsifikasyon ayrımı yapılamamaktadır. Yeni başlayan kalsifikasyonu gösterme de ise diğer radyolojik yöntemler gibi etkisizdir (122). KDIGO 2009 klavuzu VK için daha ucuz olan lateral abdominal grafi, valvüler kalsifikasyon için de EKO ile görüntüleme önermektedir. Bir çok çalışmada basit ve ucuz direkt el grafisi ve direkt abdominal grafi gibi görüntüleme yöntemleri ve çeşitli skorlama sistemleri kullanılmıştır (122).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamıza en az 1 ay süreyle diyalize girmekte olan 93 hemodiyaliz hastası ve yaş ve cinsiyet oranı açısından hasta grubuna benzer 20 sağlıklı kontrol dahil edilmiştir. Çalışma için İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Yerel Etik Kurulundan gerekli izin alınmıştır (Dosya no: 2012/154). Çalışma, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No:2012/148). Çalışmaya dahil edilen tüm hastalar ve kontrol grubunu çalışma hakkında bilgilendirilmiş ve onam formu imzalamışlardır. Çalışmaya alınan tüm hastaların; yaş, cinsiyet, boy, vücut ağırlığı, vücut kitle indeksleri (BMI), SDBY etiyojisi, diyaliz süreleri (ay), medikal tedavi süreleri (ay) değerleri dosyalarından kaydedildi. Rutin biyokimyasal testlerden kan üre azotu (BUN), serum kreatinin, albumin, kalsiyum, fosfor ve PTH çalışıldı. Hastaların hepsi haftada 3 kez 4'er saat süreyle, semisentetik diyaliz membranı kullanılarak bikarbonatlı diyalize alınmaktaydı. Herhangi bir hastalığı olmayan sağlıklı kontrollerin biyokimyasal testleri İnönü Üniversitesi Merkez Biyokimya Laboratuvarı'nda çalışıldı.

Hastalardan ve kontrol grubundan bir gecelik açlığı takiben alınan venöz kan örnekleri uygun tüplere konularak 5000 devirde 5 dakika santrifüj edilerek serumuna ayrıldı ve -20°C'de saklandı.

3.1 İnsan fetuin-A'nın Eliza yöntemi ile tayininin yapılması:

İnsan fetuin-A ölçümünde eliza yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde uygun BioVendor marka insan fetuin-A kiti kullanıldı. Bu yöntemde İnsan fetuin-A'ya spesifik poliklonal antikor ile kaplı 96 kuyucuklu plak kullanıldı. Kitin içeriğindeki konjüгат hariç, tüm solüsyonlar oda ısısına getirilerek çalışıldı. Kit içerisinde mevcut

olan standartta 1 ml standart dilüsyon tamponu eklenerek 100 ng/ml stok standart solüsyonu hazırlandı. Daha sonra dilüsyon tamponuyla bu stok standarttan seri sulandırma yapılarak 0; 2; 5; 10; 20; 40; 100 ng/ml' lik konsantrasyonlarda standartlar hazırlandı. Numuneler dilüsyon tamponu ile 10000 kat dilüe edildi.

Blank olarak belirlenen kuyucuklara 100µl standart numune dilüsyon tamponu eklendi. Daha sonra 100 µl standart 100 µl numune uygun kuyucuklara eklendi. Plak 1 saat oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 3 kez yıkama solüsyonu ile plak yıkandı. 100µl konjüгат solüsyonu eklenip 1 saat oda ısısında inkübe edildi. Ardından plak 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı. Yıkamanın ardından 100µl substrat solüsyonu kuyucuklara eklenip 15 dk inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda 100 µl stop solüsyonu kuyucuklara eklenerek reaksiyon durduruldu. Çalışma sonunda plak okuyucu yardımıyla 450 nm de okuması yapıldı. Kitin sensitivitesi 0.104 ng/ml' dir. Çıkan sonuç 1000' e bölünerek µg/ml' ye çevrildi.

3.2. İnsan OPN düzeyinin Eliza yöntemi ile tayininin yapılması:

İnsan OPN ölçümünde Eliza yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde İnsan OPN' ine spesifik antikor ile kaplı 96 kuyucuklu plak kullanıldı. Bu yöntemde uygun eBioscience Platinum Elisakiti kullanıldı. Kitin içeriğindeki konjüгат hariç, tüm solüsyonlar oda ısısına getirilerek çalışıldı. Kit içerisinde mevcut olan standartta 0,33 ml distile su eklenerek 60 ng/ml stok standart solüsyonu hazırlandı. Daha sonra standart solüsyonda seri sulandırma yapılarak 0; 0,23; 0,47; 0,94; 1,88; 3,75; 7,5; 15; 30 ng/ml' lik konsantrasyonlarda standartlar hazırlandı. Numuneler örnek dilüsyon tamponuyla 1/5 kat oranında dilüe edildi. İlk olarak plak 2 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı. Blank olarak belirlenen kuyucuklara 100 µl standart dilüsyon tamponu eklendi. Daha önceden yerleri belirlenen standart ve dilüe edilmiş numunelerden 100 µl plaktaki kuyucuklara eklendi. İki saat oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 6 kez yıkama tamponuyla plak yıkandı. Yüz µl biotinkonjüгат solüsyonundan da eklenerek plak 1 saat oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 6 kez yıkama solüsyonu ile plak yıkandı. Yüz µl HRP solüsyonu eklendi. 1 saat tekrar oda ısısında inkübe edildi. Plak inkübasyon sonunda 6 kez yıkama solüsyonu yıkandı. Yıkamanın ardından 100 µl substrat solüsyonu kuyucuklara eklenip 30 dk inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda 100 µl stop solüsyonu kuyucuklara eklenerek reaksiyon durduruldu. Çalışma sonunda plak okuyucu yardımıyla 450 nm de okuması yapıldı. Kitin sensitivitesi 0.26 ng/l' dir.

3.3. 25-OH-Vitamin D düzeyinin çalışılması:

High performanceliquidchromotography (HPLC) yöntemi ile Shimadzu LC-20 AT cihazında çalışılmıştır.

3.4. Vasküler kalsifikasyon skorlaması:

Hasta ve sağlıklı kontrollerde VK' un radyolojik skorlaması için fistül olmayan koldan anteroposterior el bilek grafisi çekilmiştir. Kalsifikasyonu daha net görmek açısından grafiyer Siemens marka MammomatInspiration mamografi cihazında çekilmiştir. El metakarpallarının ortasından yatay bir çizgi çizilerek çizginin üstü ve altı birer alan kabul edilmiştir. Damar kalsifikasyonu olmayanlar 0, tek alanda olanlar 1, her iki alanda olanlar 2 olarak skorlanmıştır.

3.5. İstatistiksel analiz:

İstatistiksel analizler Statistical Package for Social Sciences v 17 (SPSS) yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Parametrik değişkenler ortalama \pm standart kayma şeklinde ifade edildi. Tanımlayıcı istatistiksel bulgular medyan, minimum ve maximum şeklinde ifade edildi. Verilerin dağılımının ölçülmesinde Shapiro-Wilk testi yapıldı. Parametrik değişkenler arasındaki ilişki t-testi ve Mann-Whitney U testi ile belirlendi. VK nun belirleyicilerini saptamak için logistik regresyon analizi yapıldı. Parametrik olmayan değişkenler arasındaki ilişki Ki-kare testi ile belirlendi. $P < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Bir değişkenin bağımsız belirleyicilerinin tespiti için lojistik regresyon testi yapıldı.

4. BULGULAR

Hemodiyalize giren 93 hastadan oluşan hasta grubunun 44' ü (47,3%) erkek 49' u (52,7%) kadın hastalardan oluşmaktaydı. Etiyolojileri açısından bakıldığında hasta grubunun 30' u (32,3%) DM, 26' sı (28%) HT, 16' sı (17,2%) kronik glomerulonefrit, 11' i (11,8%) idiyopatik, 10' u (%10,8) ise PBH, amiloidoz, renovasküler ya da postrenal nedenlere bağlı son dönem böbrek yetmezliği hastalarıydı. Hasta grubunun medyan medikal tedavi süresi 6 (0-240) ay, medyan HD süresi 53 (3-211) aydı.

Kontrol grubunda 12 (60%) erkek, 8 (40%) kadın sağlıklı kontrol bulunmaktaydı.

Tablo 4.1: Hasta ve kontrol grubunun demografik özellikleri

	Hasta grubu (n: 93)	Kontrol grubu (n: 20)	P
Cinsiyet (erkek %)	44 (47,3%)	12 (60%)	0,305
Yaş	58,3 ± 15,7	52,4 ± 10	0,086
BMI	26,4 ± 5,4	27,3 ± 3	0,217
BUN	60,7 ± 15,9	12,6 ± 1,9	0,000
Kreatinin	8 ± 2,6	0,7 ± 0,1	0,000
Albumin	3,6 ± 0,5	4 ± 0,2	0,000
Ca	8,7 ± 1	9,2 ± 0,4	0,001
P	5 ± 1,3	3,2 ± 0,5	0,000
PTH	550,6 ± 512,1	63,5 ± 33,7	0,000
25-OH-Vitamin D	12,7 ± 9,9	12,2 ± 6,5	0,477
Fetuin-A	673,6 ± 202,4	803,8 ± 277,4	0,029
OPN	5,4 ± 3,5	2,3 ± 0,8	0,000
Kalsifikasyon olanlar n (%)	45 (48,4%)	2 (10%)	0,002

BMI: Vücut kitle indeksi, BUN: Kan üre azotu, Ca:Kalsiyum, P: Fosfor, PTH: Parathormon, OPN: Osteopontin

Hasta ve kontrol grubunun biyokimyasal belirteçler açısından karşılaştırılması Tablo 4.1’ de gösterilmiştir. Serum BUN ($p=0,000$), kreatinin ($p=0,000$), albumin ($p=0,000$), Ca ($p=0,001$), P ($p=0,000$), PTH ($p=0,000$), düzeyleri karşılaştırıldığında hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark bulundu. Fetuin-A hasta grubunda anlamlı düzeyde düşük ($p=0,029$), OPN hasta grubunda anlamlı düzeyde yüksek ($p=0,000$) bulundu.



Şekil 4.1 : Hasta grubunda vasküler kalsifikasyon

Hastaların 45’ inde (48,4%) VK mevcuttu (Şekil 4.1.). Hastaların 48’ inde (51,6%) VK görülmedi, 22’ sinde (23,7%) tek bölgede, 23’ ünde (24,7%) iki bölgede kalsifikasyon saptandı.

Tablo 4.2: Hasta grubunda vasküler kalsifikasyonun bağımsız belirleyicileri.

	OR	p
Yaş	1,036	0,053
DM varlığı	17,527	0,000
PTH	1,002	0,010

Lojistik regresyon modeline yaş, DM varlığı, HD süresi, serum albumin, fosfor, PTH, 25-OH-Vitamin D, Fetuin-A, OPN, kalsiyum düzeyleri dahil edilmiştir. OR: Odds ratio

Yapılan regresyon analizinde yaş, DM ve yüksek PTH düzeyleri VK' un bağımsız belirleyicisi olarak ortaya çıkmaktadır.

Tablo 4.3 : VK' un varlığına göre hasta grubunun karşılaştırılması

	VK olan n:45 (48,4%)	VK olmayan n:48 (51,6%)	p
Cinsiyet (erkek %)	23 (24,7%)	21 (22,6%)	0,480
Yaş	61,8 ± 12,3	55,1 ± 17,8	0,065
BMI	27,4 ± 4,8	25,5 ± 5,8	0,031
BUN	57,2 ± 14	64 ± 17,1	0,028
Kreatinin	7,4 ± 2,4	8,6 ± 2,7	0,010
Albumin	3,5 ± 0,4	3,6 ± 0,5	0,088
Ca	9,2 ± 0,9	9 ± 0,9	0,421
P	4,9 ± 1,5	5,1 ± 1,1	0,207
PTH	587,9 ± 466,2	515,7 ± 554,5	0,108
25-OH-Vitamin D	12,9 ± 9	12,5 ± 10,8	0,539
Fetuin-A	651,5 ± 188,3	694,3 ± 214,7	0,377
OPN	5,4 ± 3,6	5,5 ± 3,5	0,788
CaxP	45,3 ± 14,8	45,3 ± 9,5	0,365

BMI: Vücut kitle indeksi, BUN: Kan üre azotu, Ca: Kalsiyum, P: Fosfor, PTH: Parathormon, OPN: Osteopontin

VK olan ve olmayan hastalar karşılaştırıldığında BMI ($p<0,031$), BUN ($p<0,028$) ve kreatinin ($p<0,010$) açısından gruplar arasında anlamlı fark mevcuttu.

Tablo 4.4 : VK skoruna göre hasta grubunun karşılaştırılması

	VK=0 (n=48) Kalsifikasyon yok	VK=1 (n=22) Tek bölge	VK=2 (n=23) 2 bölge	p
Cinsiyet (erkek %)	21 (22,6%)	7 (7,5%)	16 (17,2%)	0,032
Yaş	55,1± 17,8	61 ± 13,9	62,6 ± 10,7	0,177
BMI	25,5 ± 5,6	28 ± 5,1	26,9 ± 4,6	0,090
BUN	63 ± 17,1	58,7 ± 15,6	55,7 ± 12,5	0,078
Kreatinin	8,6 ± 2,7	7,6 ± 2,9	7,3 ± 1,8	0,038*
Albumin	3,6 ± 0,5	3,6 ± 0,3	3,4 ± 0,4	0,147
Ca	9 ± 0,9	9,3 ± 1,2	9 ± 0,6	0,147
P	5,1 ± 1,1	4,9 ± 1,2	5 ± 1,8	0,429
PTH	515,7 ± 554,5	692,9 ± 530,9	482,9 ± 374,2	0,119
25-OH-Vitamin D	12,5 ± 10,8	12 ± 8,6	13,8 ± 9,3	0,659
Fetuin-A	694,3 ± 214,7	680,9 ± 166,6	623,4 ± 206,6	0,375
OPN	5,5 ± 3,5	5,4 ± 3,7	5,3 ± 3,6	0,963
CaxP	45,3 ± 9,5	45,4 ± 11,9	45,2 ± 17,4	0,511

BMI: Vücut kitle indeksi, BUN: Kan üre azotu, Ca: Kalsiyum, P: Fosfor, PTH: Parathormon, OPN: Osteopontin. * VK=0 - VK=1 (p=0,038), VK=0 - VK=2 (p=0,037).

Kalsifikasyon skorlarına göre gruplar karşılaştırıldığında kreatinin düzeylerinde anlamlı fark vardı (p=0,038).

Tablo 4.5: Diyabeti olan ve olmayan hastaların karşılaştırılması

	Diyabet hastaları n: 30 (32,3%)	Diyabet olmayan hastalar n: 63 (67,7%)	p
Cinsiyet (erkek %)	18 (19,4%)	26 (28%)	0,093
Yaş	62,5 ± 9,1	56,3 ± 17,7	0,89
BMI	27± 4,6	26,2 ± 5,7	0,524
BUN	57,3 ± 13,9	62,3 ± 16,7	0,156
Kreatinin	7,4 ± 1,9	8, ± 2,8	0,138
Albumin	3,4 ± 0,5	3,6 ± 0,5	0,103
Ca	9 ± 0,6	9,1 ± 1	0,698
P	4,9 ± 1,6	5 ± 1,2	0,338
PTH	412,6 ± 279,9	615,2 ± 581,1	0,323
25-OH-Vitamin D	13,6 ± 8,7	12,2 ± 10,4	0,233
Fetuin-A	666,7 ± 223	676,8 ± 193,6	0,739
OPN	4,6483 ± 3,3	5,8 ± 3,6	0,124
CaxP	42,3 ± 14,7	45,7 ± 10,4	0,215
Kalsifikasyon olanlar n (%)	26 (28%)	19 (20,4%)	0,000

BMI: Vücut kitle indeksi, BUN: Kan üre azotu, Ca: Kalsiyum, P: Fosfor, PTH: Parathormon, OPN: Osteopontin

Diyabeti olan ve olmayan hastalar karşılaştırıldığında yaş, BMI, BUN, kreatinin, albumin, kalsiyum, PTH, 25-OH-Vitamin D, OPN, kalsiyum fosfor çarpımı açısından anlamlı bir fark yoktu, ancak VK açısından diyabeti olan grupta anlamlı şekilde artmış VK vardı ($p < 0,000$).

5. TARTIŞMA

Bu çalışma HD hastalarında VK' un sık bir bulgu olduğunu saptanmıştır (48,4%). Yaş, DM varlığı, HD süresi, serum albumin, fosfor, PTH, 25-OH-Vitamin D, fetuin-A, OPN ve kalsiyum düzeyleri dahil edildiği lojistik regresyon analizinde VK' un bağımsız belirleyicilerinin yaş, DM varlığı ve serum PTH düzeyleri olduğu gösterilmiştir. HD hastaları sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında anlamlı şekilde OPN düzeylerinin yüksek, fetuin-A düzeylerinin düşük olduğu saptanmıştır.

KBH' nda VK sık rastlanan bir bulgudur ve artmış morbidite ve mortalite ile ilişkilidir. VK' un mekanizması tam anlaşılamamıştır ve birçok faktörle ilişkilidir. KBH' nda intimal ve mediyal kalsifikasyon şeklinde 2 tür VK görülmektedir. KBH ve DM' ta mediyal kalsifikasyon daha siktir. Bu iki kalsifikasyonun mekanizması birbirinden farklı olmakla beraber lokal inflamasyonun olması, Ca-P dengesinin etkisi, kalsifikasyon inhibitör ve uyarılarının rol oynaması açısından benzerlik göstermektedir.

Direkt grafi VK' nu belirlemede basit ucuz ve kolay ulaşılan bir yöntemdir. Ayrıca histolojik olarak kanıtlanmış olmasa da direkt grafi belli ölçüde intimal ve mediyal kalsifikasyonu ayırt edebilir. Direkt grafide anjio yapılmış gibi arter duvarında demiryolu görünümü mediyal, yamalı tarzda kalsifikasyon odakları ise intimal kalsifikasyonu ve ateroskleroza işaret etmektedir (123). Çalışmamızda hastaların 48,4%' ünde mediyal kalsifikasyon saptandı.

KBH' ında VK riski yüksektir. Birçok faktör nedeniyle VSMC' i kondrojenik ya da osteojenik farklılaşma gösterir. Anormal kemik metabolizmasına bağlı yüksek Ca ve P düzeyleri, lokal salgılanan ya da dolaşımda bulunan kalsifikasyon inhibitörlerinin eksikliği, üremik toksinler ve güncel tedaviler kondrojenik ya da osteojenik faktörler arasında yer alır. İlginç olarak aynı faktörlere maruz kalan her diyaliz hastasında VK

gelişmemektedir ve uzun süre HD tedavisi alan bazı hastalarda kalsifikasyon artmamaktadır (40). Ca ve P bulunan in vitro hücre kültürü ortamına insan serumu eklendiğinde kalsifikasyonun durduğu gösterilmiştir. Bu bulgular VK' a karşı koruyucu olan lokal ya da sistemik faktörlerin olabileceğini düşündürmektedir (40). Bunlardan en önemlisi negatif bir akut faz reaktanı olan fetuin-A' dır. Fetuin-A plazmayı fazla Ca ve P' dan temizlemektedir. İnflamasyonla fetuin-A düşer ve diyaliz hastalarında düşük fetuin-A düzeylerinin, VK ve ölüm ile ilişkisi bildirilmiştir. Çalışmamızda hasta grubunda serum fetuin-A düzeyleri sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p < 0,029$). Ancak hasta grubunda VK ile serum fetuin-A düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. HD hastalarında KBH' a bağlı kronik inflamasyon nedeniyle fetuin-A düzeyleri genelde düşüktür. Literatürde fetuin-A' nın VK ve valvüler kalsifikasyonla ilişkisini gösteren birçok çalışma mevcuttur. Bazılarında düşük fetuin-A düzeyleri artmış VK ile ilişkili bulunmuştur (125-128). Bazı çalışmalarda fetuin-A ile VK arasında ilişki bulunamamıştır (129,130).

OPN kalsifikasyonu önleyen önemli bir moleküldür. OPN' nin görevi osteoklast yüzeyinde bulunan ve integrin ailesinden olan $\alpha_v\beta_3$ 'e bağlanıp hücre içi kalsiyum düzeyini düşürüp osteoklastları uyarmaktır. OPN kemik rezorpsiyonu için asidik mikroortam oluşturan karbonik anhidraz 2 enziminin yapımının arttırarak kemik yıkımına neden olur. Ayrıca apatit kristallerine bağlanmak suretiyle mineralizasyonu direkt olarak da engelleyebilmektedir. OPN, aterosklerotik plak çevresinde bulunan makrofajlar, düz kas hücreleri ve endotelial hücrelerden de lezyonun şiddetiyle orantılı olarak üretilmektedir. Yapılan deneysel çalışmalarda MGP eksikliği olan farelerle hem MGP hem de OPN eksikliği olan fareler karşılaştırıldığında 2. grupta daha ciddi aortik kalsifikasyon olduğu ve OPN enjekte edilen farelerde ektopik kalsifikasyonun gerilediği gösterilmiştir (116-120).

Chien-Te Lee ve ark. 84 HD hastası ile yapılan çalışması literatürde HD hastalarında plazma OPN düzeyleri ve VK' un karşılaştırılmasıyla ilgili tek çalışmadır. Bu çalışmada hastalar VK olan ve olmayanlar diye ayrılmıştır ve kontrol grubu ile karşılaştırılmamıştır. OPN düzeyleri ile VK arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır (131). Bizim çalışmamızda da VK ile ilişki saptanmamıştır ancak OPN düzeyleri sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0,000$). OPN' in kalsifikasyon inhibitörü olduğunu düşündüğümüzde çıkan sonuç bir tezat oluşturmaktadır. Bu noktada 'OPN yüksekliği VK' dan koruyucu mudur?' ya da 'VK geliştiğinde OPN reaktif olarak artar mı?' soruları akla gelmektedir. Proudfoot D.

ve ark.'nın insan plasentası ve insan VSMC'lerini in vitro kültürde inceledikleri çalışmada kalsifikasyon geliştikçe hücre kültüründe OPN mRNA düzeylerinin düştüğü ve en son ancak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle çok düşük miktarlarda saptandığı, OPN mRNA' sını başlangıç düzeylerinin çok altında olduğu gösterilmiştir (132). Yapılan hayvan deneylerinde OPN' in VK alanında lokal olarak arttığı gösterilmiştir. Bu nedenle OPN artışının VK' a karşı reaksiyon sonucu oluştuğunu düşündürmektedir. Westenfeld ve ark. yüksek P diyeti ile beslenen nefrektomili fareler üzerinde yaptığı çalışmada farelerde VK geliştikten sonra OPN' in kalsifikasyonu temizlemek için reaktif yükseldiği gösterilmiş ve OPN reaktif makrofaj aktivitesinin bir belirteci olarak tanımlanmıştır (133). Rivet J. ve ark.'nın retrospektif olarak kalsiflaksi saptanan SDBY' li hastaları taramışlar. Dokuz hastanın biopsilerine ulaşılmış ve bunların 8' inde OPN boyası yapılmış. Bütün hastalarda OPN boyası pozitif bulunmuştur. Bu sonuç OPN' nin kalsifikasyon alanında lokal olarak arttığını göstermektedir (134).

Rosenberg M. Ve ark.'nın 420 kronik kalp yetmezlikli hastayla yaptığı çalışmada sistolik kalp yetmezliğinde OPN' nin anlamlı şekilde yükseldiği, kalp yetmezliğinin ciddiyeti ile doğru orantılı olduğu, mortaliteyi tahmin ettiği gösterilmiştir. OPN bu çalışmada kalp yetmezliğinin ciddiyetinin gösterilmesi ve mortalite tahmininde NT-proBNP' den daha etkili bulunmuştur. NT-proBNP ve OPN düzeyleri paralellik göstermiştir. Bu çalışmada OPN sistolik kalp yetmezliğinde prognostik belirteç olarak önerilmiştir (135). HD hastalarında da sistolik kalp yetmezliği sıktır, volüm yükü fazladır ve NT-proBNP düzeyleri yüksek bulunabilir. Biz çalışmamızda hastaların volüm yükünü değerlendirmedik ve EKO incelemesi yapmadık. Hastaların kanları HD seansından hemen önce alındığı için hastalarımızın hipervolemik olabilecekleri ya da hastaların sistolik kalp yetmezlikli hastalar olabileceği yüksek OPN düzeylerini açıklayabilir.

Çalışmamızda VC' u direkt el bilek grafisiyle görüntüledik. VK tanısında BT' nin bile mikrokalsifikasyonları göstermede yetersiz kalabileceğini kesin tanının biopsi ile konulabileceğini düşünürsek VK' nun aslında daha yüksek oranda olduğunu söyleyebiliriz. Çalışmamızda VK ile OPN arasında korelasyon bulunmamasını bu durum açıklayabilir. Ayrıca OPN peptid yapıdadır ve böbreklerden atılır. Bu nedenle HD hastalarında yüksek olabileceği de akılda tutulmalıdır.

OPN aynı zamanda immün sistemde rol alan makrofaj, nötrofil ve lenfositlerden salınan proinflamatuvar bir mediyatördür. Kemotaksi, adezyon, sitokin salınımı ve

apoptozda rol oynar (136). KBH tek başına bir inflamasyon kaynağıdır. HD filtreleri ve diğer birçok neden hastalarda inflamasyonu artırır. Hastalarda oluşan inflamasyon OPN düzeylerini yükseltmiş olabilir.

OPN' nin kemik yapım ve yıkımı, immün sistem, otoimmün hastalıklar, solid tümörler ve inflamatuvar barsak hastalığında rolü ve mekanizması daha iyi bilinirken üremik hastalarda VK üzerindeki rolü ve mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Üremik hastalarda OPN ile ilgili daha fazla klinik araştırmaya ihtiyaç vardır.

25-OH-Vitamin D düzeyleri hasta ve kontrol grubunda düşük bulunmuştur. Gruplar arasında anlamlı fark gösterilememiştir. Bunun sebebi çalışmamızın kış aylarında yapılması ve vitamin D eksikliğinin Türkiye' de bir halk sağlığı problemi olarak karşımıza çıkması olarak gösterilebilir.

Çalışmamız kesitsel olması itibariyle VK' un yıllar içindeki seyri hakkında fikir vermemektedir. Kesitsel çalışmalarda olabilecek kısıtlılıklar bizim çalışmamızda da mevcuttur.

Çalışmamızın bazı güçlü yanları da vardır. Bizim bilgimize göre HD hastalarında OPN düzeyini kontrol grubuyla karşılaştıran ilk çalışmadır. Direkt grafi yöntemi olarak mamografi kullanılması VK tanısında duyarlılığı arttırmıştır. Yine mamografi görüntülemesiyle VK tanısı konulan ilk çalışmadır. Ancak mamografinin duyarlılığı BT gibi diğer ileri görüntüleme yöntemleriyle karşılaştırılmalıdır.

Sonuç olarak çalışmamızda VK' un HD hastalarında sık görülen bir bulgu olduğunu ve yaş, DM varlığı ile PTH' un VK' nun bağımsız belirleyicisi olduğunu, fetuin-A düzeylerinin hemodiyaliz hastalarında kontrol grubuna göre düşük, OPN düzeylerinin yüksek olduğunu gösterdik. HD hastalarında VK' un mekanizmasının daha iyi anlaşılması ve rol alan faktörlerin belirlenmesi ve etki mekanizmalarının ortaya konulması için daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

6. KAYNAKLAR

1. National Kidney foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002; 39: S1-266.
2. Collins AJ, Kasiske B, Herzog C, Chen SC, Everson S, Constantini E, Grimm R, McBean M, Xue J, Chavers B, Matas A, Manning W, Louis T, Pan W, Liu J, Li S, Roberts T, Dalleska F, Snyder J, Ebben J, Frazier E, Sheets D, Johnson R, Li S, Dunning S, Berrini D, Guo H, Solid C, Arko C, Daniels F, Wang X, Forrest B, Gilbertson D, St Peter W, Frederick P, Eggers P, Agodoa L. Excerpts from the United States Renal Data System 2003 Annual Data Report: atlas of end-stage renal disease in the United States. *Am J Kidney Dis*. 2003 Dec;42(6 Suppl 5):A5-7, S1-230.
3. Türkiye 2011 yılı Ulusal Hemodiyaliz, Transplantasyon ve Nefroloji Kayıt Sistemi Raporu
4. Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culleton B, Hamm LL, McCullough PA, Kasiske BL, Kelepouris E, Klag MJ, Parfrey P, Pfeffer M, Raij L, Spinosa DJ, Wilson PW, American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Circulation*. 2003;108(17):2154.
5. US Renal Data System. USRDS 2009 Annual Data report: Atlas of end-stage renal disease in the United States. *Am J Kidney Dis*. 2010; 55(Suppl 1):S1.
6. Chen J, Muntner P, Hamm LL, Jones DW, Batuman V, Fonseca V, Whelton PK, He J. The metabolic syndrome and chronic kidney disease in U.S. adults. *Ann Intern Med*. 2004;140(3):167.
7. Kaysen GA, Eiserich JP. The role of oxidative stress-altered lipoprotein structure and function and microinflammation on cardiovascular risk in patients with minor renal dysfunction. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(3):538.
8. Ix JH, Shlipak MG, Liu HH, Schiller NB, Whooley MA. Association between renal insufficiency and inducible ischemia in patients with coronary artery disease: the heart and soul study. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(12):3233.
9. Go AS, Chertow GM, Fan D et al. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 2004; 351: 1296–1305.

10. Anavekar NS, McMurray JJ, Velazquez EJ et al. Relation between renal dysfunction and cardiovascular outcomes after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2004; 351: 1285–1295.
11. Shlipak MG, Heidenreich PA, Noguchi H et al. Association of renal insufficiency with treatment and outcomes after myocardial infarction in elderly patients. *Ann Intern Med* 2002; 137: 555–562.
12. Wright RS, Reeder GS, Herzog CA et al. Acute myocardial infarction and renal dysfunction: a high-risk combination. *Ann Intern Med* 2002; 137: 563–570.
13. 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.
14. Jaradad MI, Molitoris BA. Cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease. *Semin Nephrol.* 2002Nov;22(6):459-73. Review.
15. London GM, Guérin AP, Marchais SJ, Métivier F, Pannier B, Adda H. Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:1731-40.
16. Chiu YW, Adler SG, Budoff MJ, Takasu J, Ashai J, Mehrotra R. Coronary artery calcification and mortality in diabetic patients with proteinuria. *Kidney Int* 2010;77:1107-14
17. 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.
18. Mönckeberg JG. Ueber die reine Mediaverkalkung der Extremitätenarterien und ihr Verhalten zur Arteriosklerose. *Virchows Arch Pathol Anat* 1903;171:141-67.
19. Littlewood TD, Bennett MR. Apoptotic cell death in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2003;14:469-75.
20. Kockx MM. Apoptosis in the atherosclerotic plaque: quantitative and qualitative aspects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1519-22.
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. Speer MY, Yang HY, Brabb T, Leaf E, Look A, Lin WL, et al. Smooth muscle cells give rise to osteochondrogenic precursors and chondrocytes in calcifying arteries. *Circ Res* 2009;104:733-41.
24. Tyson KL, Reynolds JL, McNair R, Zhang Q, Weissberg PL, Shanahan CM. Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:489-94.
25. Tang Z, Wang A, Yuan F, Yan Z, Liu B, Chu JS, et al. Differentiation of multipotent vascular stem cells contributes to vascular diseases. *Nat Commun* 2012;3:875.
26. Nguyen AT, Gomez D, Bell RD, Campbell JH, Clowes AW, Gabbiani G, et al. Smooth muscle cell plasticity: fact or fiction? *Circ Res* 2013;112:17-22.
27. Hosaka N, Mizobuchi M, Ogata H, Kumata C, Kondo F, Koiwa F, et al. Elastin degradation accelerates phosphate-induced mineralization of vascular smooth muscle cells. *Calcif Tissue Int* 2009;85:523-9.
28. Demer LL. A skeleton in the atherosclerosis closet. *Circulation*. 1995;92:2029–2032.
29. Bostrom K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*. 1993;91:1800–1809.
30. Tilton RG. Capillary pericytes: perspectives and future trends. *J Electron Microscop Tech*. 1991;19:327–344.
31. Hruska KA, Mathew S, Saab G. Bone morphogenetic proteins in vascular calcification. *Circ Res*. 2005;97:105–114.
32. Watson KE, Bostrom K, Ravindranath R, Lam T, Norton B, Demer LL. TGF-beta 1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify. *J Clin Invest*. 1994;93:2106–2113.
33. Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, McNair R, Schurgers LJ, Proudfoot D, Jahnen-Dechent W, Weissberg PL, Shanahan CM. Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:2857–2867.
34. Yang H, Curinga G, Giachelli CM. Elevated extracellular calcium levels induce smooth muscle cell matrix mineralization in vitro. *Kidney Int*. 2004;66:2293–2299.
35. Sato K, Urist MR. Induced regeneration of calvaria by bone morphogenetic protein (BMP) in dogs. *Clin Orthop Relat Res*. 1985;301–311.

36. Farrington-Rock C, Crofts NJ, Doherty MJ, Ashton BA, Griffin-Jones C, Canfield AE. Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes. *Circulation*. 2004;110:2226–2232.
37. Doherty MJ, Ashton BA, Walsh S, Beresford JN, Grant ME, Canfield AE. Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res*. 1998;13:828–838.
38. Tintut Y, Parhami F, Bostrom K, Jackson SM, Demer LL. cAMP stimulates osteoblast-like differentiation of calcifying vascular cells. Potential signaling pathway for vascular calcification. *J Biol Chem*. 1998;273:7547–7553.
39. Kamat BR, Galli SJ, Barger AC, Lainey LL, Silverman KJ. Neovascularization and coronary atherosclerotic plaque: cinematographic localization and quantitative histologic analysis. *Hum Pathol*. 1987;18: 1036–1042.
40. Rebecca C. Johnson, Jane A. Leopold and Joseph Loscalzo. Vascular Calcification: Pathobiological Mechanisms and Clinical Implications. *Circ Res*. 2006;99:1044-1059
41. Iribarren C, Sidney S, Sternfeld B, Browner WS. Calcification of the aortic arch: risk factors and association with coronary heart disease, stroke, and peripheral vascular disease. *JAMA*. 2000;283:2810–2815.
42. Asou Y, Rittling SR, Yoshitake H, Tsuji K, Shinomiya K, Nifuji A, Denhardt DT, Noda M. Osteopontin facilitates angiogenesis, accumulation of osteoclasts, and resorption in ectopic bone. *Endocrinology*. 2001;142:1325–1332.
43. Israel DI, Nove J, Kerns KM, Moutsatsos IK, Kaufman RJ. Expression and characterization of bone morphogenetic protein-2 in Chinese hamster ovary cells. *Growth Factors*. 1992;7:139–150.
44. Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J*. 2000;19:1745–1754.
45. Chen AL, Fang C, Liu C, Leslie MP, Chang E, Di Cesare PE. Expression of bone morphogenetic proteins, receptors, and tissue inhibitors in human fetal, adult, and osteoarthritic articular cartilage. *J Orthop Res*. 2004;22:1188–1192.
46. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*. 2004;22:233–241.
47. ten Dijke P, Fu J, Schaap P, Roelen BA. Signal transduction of bone morphogenetic proteins in osteoblast differentiation. *J Bone Joint Surg Am*. 2003;85A(suppl 3):34–38.

48. Dorai H, Vukicevic S, Sampath TK. Bone morphogenetic protein-7 (osteogenic protein-1) inhibits smooth muscle cell proliferation and stimulates the expression of markers that are characteristic of SMC phenotype in vitro. *J Cell Physiol.* 2000;184:37–45.
49. Davies MR, Lund RJ, Hruska KA. BMP-7 is an efficacious treatment of vascular calcification in a murine model of atherosclerosis and chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:1559–1567.
50. Arbustini E, Morbini P, D'Armini AM, Repetto A, Minzioni G, Piovela F, Vigano M, Tavazzi L. Plaque composition in plexogenic and thromboembolic pulmonary hypertension: the critical role of thrombotic material in pultaceous core formation. *Heart.* 2002;88:177–182.
51. Shea CM, Edgar CM, Einhorn TA, Gerstenfeld LC. BMP treatment of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells induces both chondrogenesis and osteogenesis. *J Cell Biochem.* 2003;90:1112–1127.
52. Shin V, Zebboudj AF, Bostrom K. Endothelial cells modulate osteogenesis in calcifying vascular cells. *J Vasc Res.* 2004;41:193–201.
53. Dhore CR, Cleutjens JP, Lutgens E, Cleutjens KB, Geusens PP, Kitslaar PJ, Tordoir JH, Spronk HM, Vermeer C, Daemen MJ. Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1998–2003.
54. Csiszar A, Smith KE, Koller A, Kaley G, Edwards JG, Ungvari Z. Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression in endothelial cells: role of nuclear factor-kappaB activation by tumor necrosis factor-alpha, H₂O₂, and high intravascular pressure. *Circulation.* 2005;111: 2364–2372.
55. Mody N, Parhami F, Sarafian TA, Demer LL. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free Radic Biol Med.* 2001;31:509–519.
56. Sorescu GP, Song H, Tressel SL, Hwang J, Dikalov S, Smith DA, Boyd NL, Platt MO, Lassegue B, Griendling KK, Jo H. Bone morphogenetic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress induces monocyte adhesion by stimulating reactive oxygen species production from a nox1-based NADPH oxidase. *Circ Res.* 2004;95:773–779.
57. Sorescu GP, Sykes M, Weiss D, Platt MO, Saha A, Hwang J, Boyd N, Boo YC, Vega JD, Taylor WR, Jo H. Bone morphogenetic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress stimulates an inflammatory response. *J Biol Chem.* 2003;278:31128–31135.

58. Bouletreau PJ, Warren SM, Spector JA, Peled ZM, Gerrets RP, Greenwald JA, Longaker MT. Hypoxia and VEGF up-regulate BMP-2 mRNA and protein expression in microvascular endothelial cells: implications for fracture healing. *Plast Reconstr Surg.* 2002;109:2384–2397.
59. Cola C, Almeida M, Li D, Romeo F, Mehta JL. Regulatory role of endothelium in the expression of genes affecting arterial calcification. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;320:424–427.
60. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell.* 1997;89: 747–754.
61. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell.* 1997;89:755–764.
62. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ. *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell.* 1997;89:765–771.
63. Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Lindhout D, Cole WG, Henn W, Knoll JH, Owen MJ, Mertelsmann R, Zabel BU, Olsen BR. Mutations involving the transcription factor *CBFA1* cause cleidocranial dysplasia. *Cell.* 1997;89:773–779.
64. Moe SM, Duan D, Doehle BP, O'Neill KD, Chen NX. Uremia induces the osteoblast differentiation factor *Cbfa1* in human blood vessels. *Kidney Int.* 2003;63:1003–1011.
65. Xiao G, Jiang D, Ge C, Zhao Z, Lai Y, Boules H, Phimpilai M, Yang X, Karsenty G, Franceschi RT. Cooperative interactions between activating transcription factor 4 and *Runx2/Cbfa1* stimulate osteoblast-specific osteocalcin gene expression. *J Biol Chem.* 2005;280: 30689–30696.
66. Franceschi RT, Xiao G. Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, *Runx2*: responsiveness to multiple signal transduction pathways. *J Cell Biochem.* 2003;88:446–454.
67. Savage T, Clarke AL, Giles M, Tomson CR, Raine AE. Calcified plaque is common in the carotid and femoral arteries of dialysis patients without clinical vascular disease. *Nephrol Dial Transplant.* 1998;13:2004–2012.

68. Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H, Giachelli CM. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res.* 2000;87:e10–e17.
69. Chen NX, O’Neill KD, Duan D, Moe SM. Phosphorus and uremic serum up-regulate osteopontin expression in vascular smooth muscle cells. *Kidney Int.* 2002;62:1724 – 1731.
70. Giachelli CM. Vascular calcification: in vitro evidence for the role of inorganic phosphate. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:S300 –S304.
71. Jono S, Nishizawa Y, Shioi A, Morii H. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 increases in vitro vascular calcification by modulating secretion of endogenous parathyroid hormone-related peptide. *Circulation.* 1998;98: 1302–1306.
72. Swarthout JT, D’Alonzo RC, Selvamurugan N, Partridge NC. Parathyroid hormone-dependent signaling pathways regulating genes in bone cells. *Gene.* 2002;282:1–17.
73. Katsumata K, Kusano K, Hirata M, Tsunemi K, Nagano N, Burke SK, Fukushima N. Sevelamer hydrochloride prevents ectopic calcification and renal osteodystrophy in chronic renal failure rats. *Kidney Int.* 2003; 64:441– 450.
74. Cozzolino M, Staniforth ME, Liapis H, Finch J, Burke SK, Dusso AS, Slatopolsky E. Sevelamer hydrochloride attenuates kidney and cardiovascular calcifications in long-term experimental uremia. *Kidney Int.* 2003;64:1653–1661.
75. Block GA, Spiegel DM, Ehrlich J, Mehta R, Lindbergh J, Dreisbach A, Raggi P. Effects of sevelamer and calcium on coronary artery calcification in patients new to hemodialysis. *Kidney Int.* 2005;68:1815–1824.
76. Ferramosca E, Burke S, Chasan-Taber S, Ratti C, Chertow GM, Raggi P. Potential antiatherogenic and anti-inflammatory properties of sevelamer in maintenance hemodialysis patients. *Am Heart J.* 2005;149:820–825.
77. Chertow GM, Raggi P, Chasan-Taber S, Bommer J, Holzer H, Burke SK. Determinants of progressive vascular calcification in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2004;19:1489 –1496.
78. Raggi P, James G, Burke SK, Bommer J, Chasan-Taber S, Holzer H, Braun J, Chertow GM. Decrease in thoracic vertebral bone attenuation with calcium-based phosphate binders in hemodialysis. *J Bone Miner Res.* 2005;20:764 –772.
79. Norman PE, Powell JT. Vitamin D, shedding light on the development of disease in peripheral arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:39–46.

80. Shioi A, Mori K, Jono S, Wakikawa T, Hiura Y, Koyama H, Okuno Y, Nishizawa Y, Morii H. Mechanism of atherosclerotic calcification. *Z Kardiol.* 2000;89(suppl 2):75–79.
81. Rachez C, Freedman LP. Mechanisms of gene regulation by vitamin D(3) receptor: a network of coactivator interactions. *Gene.* 2000; 246:9–21. *Circulation.* 1997;96:1477–1481.
82. Barsony J, Prufer K. Vitamin D receptor and retinoid X receptor interactions in motion. *Vitam Horm.* 2002;65:345–376.
83. London GM, Guerin AP, Marchais SJ, Metivier F, Pannier B, Adda H. Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant.* 2003; 18:1731–1740.
84. Lin R, Amizuka N, Sasaki T, Aarts MM, Ozawa H, Goltzman D, Henderson JE, White JH. 1Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 promotes vascularization of the chondro-osseous junction by stimulating expression of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase 9. *J Bone Miner Res.* 2002;17:1604–1612.
85. Watson KE, Abrolat ML, Malone LL, Hoeg JM, Doherty T, Detrano R, Demer LL. Active serum vitamin D levels are inversely correlated with coronary calcification. *Circulation.* 1997;96:1755–1760.
86. Doherty TM, Tang W, Dascalos S, Watson KE, Demer LL, Shavelle RM, Detrano RC. Ethnic origin and serum levels of 1alpha,25- dihydroxyvitamin D3 are independent predictors of coronary calcium mass measured by electron-beam computed tomography. *Circulation.* 1997;96:1477–1481.
87. Price PA, Faus SA, Williamson MK. Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:1400 – 1407.
88. Koos R, Mahnken AH, Muhlenbruch G, Brandenburg V, Pflueger B, Wildberger JE, Kuhl HP. Relation of oral anticoagulation to cardiac valvular and coronary calcium assessed by multislice spiral computed tomography. *Am J Cardiol.* 2005;96:747–749.
89. Kirton JP, Wilkinson FL, Canfield AE, Alexander MY. Dexamethasone downregulates calcification-inhibitor molecules and accelerates osteogenic differentiation of vascular pericytes: implications for vascular calcification. *Circ Res.* 2006;98:1264–1272.
90. Parhami F, Morrow AD, Balucan J, Leitinger N, Watson AD, Tintut Y, Berliner JA, Demer LL. Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:680–687.

91. Moss DW, Eaton RH, Smith JK, Whitby LG. Association of inorganic pyrophosphatase activity with human alkaline-phosphatase preparations. *Biochem J.* 1967;102:53–57.
92. Lomashvili KA, Cobbs S, Hennigar RA, Hardcastle KI, O'Neill WC. Phosphate-induced vascular calcification: role of pyrophosphate and osteopontin. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15:1392–1401.
93. Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, Shen J, Vinson C, Rueger JM, Karsenty G. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell.* 2000;100:197–207.
94. Takeda S, Eleftheriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, Armstrong D, Ducy P, Karsenty G. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell.* 2002;111:305–317.
95. Eleftheriou F, Takeda S, Ebihara K, Magre J, Patano N, Kim CA, Ogawa Y, Liu X, Ware SM, Craigen WJ, Robert JJ, Vinson C, Nakao K, Capeau J, Karsenty G. Serum leptin level is a regulator of bone mass. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:3258–3263.
96. Thomas T, Gori F, Khosla S, Jensen MD, Burguera B, Riggs BL. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology.* 1999;140:1630–1638.
97. Parhami F, Tintut Y, Ballard A, Fogelman AM, Demer LL. Leptin enhances the calcification of vascular cells: artery wall as a target of leptin. *Circ Res.* 2001;88:954–960.
98. Yamagishi SI, Edelstein D, Du XL, Kaneda Y, Guzman M, Brownlee M. Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A. *J Biol Chem.* 2001;276:25096–25100.
99. Zhang S, Fantozzi I, Tigno DD, Yi ES, Platoshyn O, Thistlethwaite PA, Kriett JM, Yung G, Rubin LJ, Yuan JX. Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in human pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003;285:L740–L754.
100. Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, Bennett MR, Shanahan CM, Weissberg PL. Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ Res.* 2000;87:1055–1062.
101. Rutsch F, Ruf N, Vaingankar S, Toliat MR, Suk A, Hohne W, Schauer G, Lehmann M, Roscioli T, Schnabel D, Eppelen JT, Knisely A, Superti-Furga A, McGill J, Filippone M, Sinaiko AR, Vallance H, Hinrichs B, Smith W, Ferre M, Terkeltaub R, Nurnberg P. Mutations in ENPP1 are associated with 'idiopathic' infantile arterial calcification. *Nat Genet.* 2003;34:379–381.

102. Johnson K, Polewski M, van Etten D, Terkeltaub R. Chondrogenesis mediated by PPI depletion promotes spontaneous aortic calcification in NPP1^{-/-} mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:686–691.
103. Fleisch H, Russell RG, Straumann F. Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and its implications in calcium homeostasis. *Nature.* 1966;212:901–903.
104. Towler DA. Inorganic pyrophosphate: a paracrine regulator of vascular calcification and smooth muscle phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:651– 654.
105. Bostrom K, Tsao D, Shen S, Wang Y, Demer LL. Matrix GLA protein modulates differentiation induced by bone morphogenetic protein-2 in C3H10T1/2 cells. *J Biol Chem.* 2001;276:14044–14052.
106. Zebboudj AF, Imura M, Bostrom K. Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem.* 2002;277: 4388–4394.
107. Newman B, Gigout LI, Sudre L, Grant ME, Wallis GA. Coordinated expression of matrix Gla protein is required during endochondral ossification for chondrocyte survival. *J Cell Biol.* 2001;154:659–666.
108. Wallin R, Cain D, Hutson SM, Sane DC, Loeser R. Modulation of the binding of matrix Gla protein (MGP) to bone morphogenetic protein-2 (BMP-2). *Thromb Haemost.* 2000;84:1039–1044.
109. Price PA, Fraser JD, Metz-Virca G. Molecular cloning of matrix Gla protein: implications for substrate recognition by the vitamin K-dependent gamma-carboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:8335–8339.
110. Schurgers LJ, Teunissen KJ, Knapen MH, Kwaijtaal M, van Diest R, Appels A, Reutelingsperger CP, Cleutjens JP, Vermeer C. Novel conformation-specific antibodies against matrix gamma-carboxyglutamic acid (Gla) protein: undercarboxylated matrix Gla protein as marker for vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1629–1633.
111. Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature.* 1997;386:78–81.
112. Jono S, Ikari Y, Vermeer C, Dissel P, Hasegawa K, Shioi A, Taniwaki H, Kizu A, Nishizawa Y, Saito S. Matrix Gla protein is associated with coronary artery calcification as assessed by electron-beam computed tomography. *Thromb Haemost.* 2004;91:790–794.

- 113.**Canfield AE, Farrington C, Dziobon MD, Boot-Handford RP, Heagerty AM, Kumar SN, Roberts IS. The involvement of matrix glycoproteins in vascular calcification and fibrosis: an immunohistochemical study. *J Pathol.* 2002;196:228–234.
- 114.**Shanahan CM, Proudfoot D, Tyson KL, Cary NR, Edmonds M, Weissberg PL. Expression of mineralisation-regulating proteins in association with human vascular calcification. *Z Kardiol.* 2000;89(suppl 2):63– 68.
- 115.**Hao H, Hirota S, Ishibashi-Ueda H, Kushiro T, Kanmatsuse K, Yutani C. Expression of matrix Gla protein and osteonectin mRNA by human aortic smooth muscle cells. *Cardiovasc Pathol.* 2004;13:195–202.
- 116.**Herrmann SM, Whatling C, Brand E, Nicaud V, Gariépy J, Simon A, Evans A, Ruidavets JB, Arveiler D, Luc G, Tiret L, Henney A, Cambien F. Polymorphisms of the human matrix gla protein (MGP) gene, vascular calcification, and myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2386–2393.
- 117.**Miyauchi A., Alvarez J., Greenfield E.M., Teti, A., Grano, M., Colucci, S., Zambonin-Zallone, A., Ross, F.P., Teitelbaum, S.L., Cheresch, D. and et al. Recognition of osteopontin and related peptides by an alpha v beta 3 integrin stimulates immediate cell signals in osteoclasts. (1991) *J. Biol. Chem.*, 266, 20369-20374.
- 118.**Steitz S.A., Speer, M.Y., McKee, M.D., Liaw, L., Almeida, M., Yang, H. and Giachelli, C.M. Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. (2002) *Am. J. Pathol.*, 161, 2035-2046.
- 119.**Wada, T., McKee, M.D., Steitz, S. and Giachelli, C.M. Calcification of vascular smooth muscle cell cultures: inhibition by osteopontin. (1999) *Circ. Res.*, 84, 166-178.
- 120.**O'Brien, E.R., Garvin, M.R., Stewart, D.K., Hinohara, T., Simpson, J.B., Schwartz, S.M. and Giachelli, C.M. Osteopontin is synthesized by macrophage, smooth muscle, and endothelial cells in primary and restenotic human coronary atherosclerotic plaques. (1994) *Arterioscler. Thromb.*, 14, 1648-1656.
- 121.**de Oliveira RB, Okazaki H, Stingham AE, Drüeke TB, Massy ZA, Jorgetti V. Vascular calcification in chronic kidney disease: a review. *J Bras Nefrol.* 2013 Apr-Jun;35(2):147-61
- 122.**Rodrigo Bueno de Oliveira¹ Hirokazu Okazaki² Andrea E. Marques Stingham³ Tilman B. Drüeke⁴ Ziad A. Massy⁵ Vanda Jorgetti⁶ Vascular calcification in chronic kidney disease: a review. *J Bras Nefrol.* 2013 Apr-Jun;35(2):147-61

- 123.**London GM, Guérin AP, Marchais SJ, Métivier F, Pannier B, Adda H. Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant*. 2003 Sep;18(9):1731-40.
- 124.**Rebecca C. Johnson, Jane A. Leopold and Joseph Loscalzo. Vascular Calcification: Pathobiological Mechanisms and Clinical Implications. *Circ Res*. 2006;99:1044-1059
- 125.**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* 67: 2295–2304, 2005
- 126.**Cozzolino M, Galassi A, Biondi ML, Turri O, Papagni S, Mongelli N, Civita L, Gallieni M, Brancaccio D: Serum fetuin-A levels link inflammation and cardiovascular calcification in hemodialysis patients. *Am J Nephrol* 26: 423–429, 2006.
- 127.**Russo D, Corrao S, Miranda I, Ruocco C, Manzi S, Elefante R, Brancaccio D, Cozzolino M, Biondi ML, Andreucci VE: Progression of coronary artery calcification in predialysis patients. *Am J Nephrol* 27: 152–158, 2007.
- 128.**Zheng S, de Las Fuentes L, Bierhals A, Ash-Bernal R, Spence K, Slatopolsky E, Davila-Roman VG, Delmez J: Relation of serum fetuin-A levels to coronary artery calcium in African-American patients on chronic hemodialysis. *Am J Cardiol* 103: 46–49, 2009.
- 129.**Mikami S, Hamano T, Fujii N, Nagasawa Y, Isaka Y, Moriyama T, Matsuhisa M, Ito T, Imai E, Hori M: Serum osteoprotegerin as a screening tool for coronary artery calcification score in diabetic pre-dialysis patients. *Hypertens Res* 31: 1163–1170, 2008
- 130.**Jung HH, Kim SW, Han H: Inflammation, mineral metabolism and progressive coronary artery calcification in patients on haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 21: 1915–1920, 2006
- 131.**Lee CT, Chua S, Hsu CY, Tsai YC, Ng HY, Kuo CC, Wu CH, Chen TC, Chiu TT, Lee YT. Biomarkers associated with vascular and valvular calcification in chronic hemodialysis patients. *Dis Markers*. 2013;34(4):229-35.
- 132.** 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 Mar;18(3):379-88.

- 133.**Westenfeld R, Schäfer C, Krüger T, Haarmann C, Schurgers LJ, Reutelingsperger C, Ivanovski O, Druke T, Massy ZA, Ketteler M, Floege J, Jahn-Dechent W. Fetuin-A protects against atherosclerotic calcification in CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2009 Jun;20(6):1264-74
- 134.**Rivet J, Lebbé C, Urena P, Cordoliani F, Martinez F, Baglin AC, Aubert P, Aractingi S, Ronco P, Fournier P, Janin A. Cutaneous calcification in patients with end-stage renal disease: a regulated process associated with in situ osteopontin expression. *Arch Dermatol.* 2006 Jul;142(7):900-6.
- 135.**Rosenberg M, Zugck C, Nelles M, Juenger C, Frank D, Remppis A, Giannitsis E, Katus HA, Frey N. Osteopontin, a new prognostic biomarker in patients with chronic heart failure. *Circ Heart Fail.* 2008 May;1(1):43-9.
- 136.**Wang KX, Denhardt DT (2008). "Osteopontin: role in immune regulation and stress responses". *Cytokine Growth Factor Rev.* 19 (5-6): 333–45.