

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

Antun Lončarić

**Izražaj GLA-bogatog proteina kao biljega vaskularne kalcifikacije u
kroničnoj bubrežnoj bolesti**

Doktorski rad

Rijeka, 2026.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Antun Lončarić

**Izražaj GLA-bogatog proteina kao biljega vaskularne kalcifikacije u
kroničnoj bubrežnoj bolesti**

Doktorski rad

Mentor: izv. prof. dr. sc. Lara Batičić, dipl. sanit. ing.

Rijeka, 2026.

UNIVERSITY OF RIJEKA

FACULTY OF MEDICINE

Antun Lončarić

**Expression of Gla-Rich Protein as a Marker of Vascular
Calcification in Chronic Kidney Disease**

Doctoral thesis

Mentor: izv. prof. dr. sc. Lara Batičić, dipl. sanit. ing.

Rijeka, 2026.

Mentor rada:

izv. prof. dr. sc. Lara Batičić, dipl. sanit. ing.

Doktorski rad obranjen je dana _____ na Medicinskom
fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____ (titula, ime i prezime)

2. _____ (titula, ime i prezime)

3. _____ (titula, ime i prezime)

4. _____ (titula, ime i prezime)

5. _____ (titula, ime i prezime)

Rad ima _____ listova.

UDK: _____

ZAHVALA

Posebnu i iskrenu zahvalnost upućujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Lari Batičić dipl. sanit. ing. na nesebičnoj pomoći, stručnom vodstvu, trajnoj dostupnosti i podršci koju mi je pružala tijekom izrade ovoga rada. Njezino mentorstvo, razumijevanje i spremnost da u svakom trenutku pomogne bili su od neprocjenjive važnosti za dovršetak ovog doktorskog istraživanja. Osobito sam joj zahvalan što je, nakon smrti moje prvotne mentorice, preuzela vođenje mog doktorata i omogućila nastavak ovoga projekta.

S dubokim poštovanjem i zahvalnošću prisjećam se i svoje prvotne mentorice, prof. dr. sc. Tanje Ćelić Črnac dr. med., kojoj zahvaljujem na podršci, povjerenju i važnoj ulozi u pokretanju ovoga istraživanja. Njezin doprinos ostaje trajno utkan u temelje ovoga rada.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Ivanu Bubiću dr. med. sa Zavoda za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju bubrega Kliničkog bolničkog centra Rijeka na susretljivosti i pomoći, osobito na posudbi uređaja za mjerenje brzine pulsno vala, čime je omogućena važna sastavnica ovog istraživanja.

Posebnu zahvalnost upućujem prim. dr. sc. Diani Balenović dr. med. i Ivanu Horvatu dr. med., s Odjela za kardiologiju Opće bolnice Dr. Ivo Pedišić Sisak na pomoći pri ehokardiografskoj obradi ispitanika. Također zahvaljujem glavnoj sestri Odjela za kardiologiju, Grozdani Arbutini Suljić mag. med. tech. na iznimnoj pomoći i angažmanu tijekom uzorkovanja.

Zahvaljujem svim djelatnicima Odjela za radiologiju Opće bolnice Dr. Ivo Pedišić Sisak na pomoći pri izvođenju radioloških snimanja potrebnih za procjenu stupnja kalcifikacije abdominalne aorte.

Posebno zahvaljujem svim djelatnicima Odjela za dijalizu Opće bolnice Dr. Ivo Pedišić Sisak na velikoj pomoći tijekom uzorkovanja i provedbe istraživanja u dijaliznih bolesnika.

Također zahvaljujem svim djelatnicima Odjela za transfuzijsku medicinu te Odjela za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu Opće bolnice Dr. Ivo Pedišić Sisak na pomoći u obradi, pohrani uzoraka i laboratorijskoj analizi.

Zahvaljujem i djelatnicima Zavoda za anatomiju te Zavoda za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta u Rijeci na pomoći oko pohrane uzoraka i laboratorijske dijagnostike.

Na kraju, najveću i najdublju zahvalnost upućujem svojoj supruzi Marleni, sinu Maxu i obitelji na ljubavi, razumijevanju, strpljenju i trajnoj podršci tijekom izrade ovoga rada.

Posebno zahvaljujem svojoj supruzi Marleni, koja mi nije bila samo najveća osobna potpora, nego je i profesionalno pridonijela ovom istraživanju sudjelovanjem u analizi radioloških snimaka za procjenu stupnja kalcifikacije abdominalne aorte. Njezina podrška bila je moj najveći oslonac tijekom cijelog ovog puta.

SAŽETAK

Cilj istraživanja: Ispitati povezanost ukupnog GLA-bogatog proteina (tGRP) s pokazateljima vaskularne kalcifikacije, arterijske krutosti i odabranim parametrima mineralnog metabolizma u ispitanika različitog stupnja bubrežne funkcije.

Ispitanici i metode: U istraživanje je uključeno 185 ispitanika: kontrolna skupina (n = 61), bolesnici s kroničnom bubrežnom bolešću (KBB) stadija IIIb–IV (n = 61) te bolesnici s KBB stadija V na hemodijalizi (HD) (n = 63). Vaskularna kalcifikacija procijenjena je Kauppila zbrojem, a arterijska krutost mjerenjem brzine pulsog vala (PWV). Analizirani su klinički, laboratorijski i vaskularni pokazatelji, uključujući tGRP, dok su fibroblastni čimbenik rasta 23 (FGF-23) i β -Klotho (KLb) bili dostupni u podskupinama ispitanika.

Rezultati: Pokazatelji vaskularne kalcifikacije i arterijske krutosti bili su izraženiji u uznapredovalijim stadijima bubrežne bolesti. Koncentracije tGRP-a razlikovale su se među skupinama, uz nelinearan obrazac raspodjele i najniže vrijednosti u skupini KBB stadija IIIb–IV. tGRP je u multivarijatnim modelima pokazao statistički značajnu, ali skromnu neovisnu povezanost s vaskularnim fenotipom, dok je povezanost s FGF-23 i KLb bila izraženija. Dob, šećerna bolest i bubrežna funkcija pokazali su se važnijim odrednicama vaskularnog fenotipa od tGRP-a.

Zaključak: Ukupni GLA-bogati protein ne ponaša se kao robustan samostalan biljeg već razvijene vaskularne kalcifikacije ni arterijske krutosti u KBB-u. Nalazi upućuju na to da tGRP vjerojatnije odražava poremećeni biokemijski okoliš kronične bubrežne bolesti-mineralno-koštanog poremećaja (KBB–MKP) nego opseg već uspostavljenog vaskularnog oštećenja.

Ključne riječi: Biomarkeri; Brzina pulsog vala; Kronična bubrežna insuficijencija; Vaskularna kalcifikacija; Vitamin K.

SUMMARY

Objectives: To examine the association of total Gla-rich protein (tGRP) with vascular calcification, arterial stiffness, and selected parameters of mineral metabolism in subjects with different levels of renal function.

Patients and Methods: This observational study included 185 participants: a control group (n = 61), patients with chronic kidney disease (CKD) stages IIIb–IV (n = 61), and patients with CKD stage V on maintenance hemodialysis (HD) (n = 63). Vascular calcification was assessed by the Kauppila score, and arterial stiffness by pulse wave velocity (PWV). Clinical, laboratory, and vascular parameters were analyzed, including tGRP, while fibroblast growth factor 23 (FGF-23) and β -Klotho (KLb) were available in subsets of participants.

Results: Markers of vascular calcification and arterial stiffness were more pronounced in advanced stages of kidney disease. tGRP concentrations differed significantly among the groups, showing a nonlinear distribution pattern with the lowest values in the CKD IIIb–IV group. tGRP showed a statistically significant but modest independent association with the vascular phenotype in multivariable models, whereas its associations with FGF-23 and KLb were more pronounced. Age, diabetes, and renal function were stronger determinants of the vascular phenotype than tGRP.

Conclusion: Total Gla-rich protein does not appear to be a robust independent marker of established vascular calcification or arterial stiffness in CKD. The findings suggest that tGRP more likely reflects the disturbed biochemical environment of chronic kidney disease–mineral and bone disorder (CKD–MBD) than the extent of already developed vascular damage.

Key words: Biomarkers; Pulse Wave Analysis; Renal Insufficiency, Chronic; Vascular Calcification; Vitamin K.

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA.....	1
1.1. Epidemiologija i klinički značaj vaskularne kalcifikacije u kroničnoj bubrežnoj bolesti.....	2
1.1.1. Definicija KBB i javnozdravstveni značaj.....	2
1.1.2. Kardiovaskularni rizik u KBB: tradicionalni i netradicionalni mehanizmi ...	3
1.1.3. Vaskularna kalcifikacija u KBB: definicija, učestalost i prognostička vrijednost	4
1.1.4. Fenotip vaskularne kalcifikacije u KBB i hemodinamske posljedice: arterijska krutost i ishodi	6
1.1.5. Procjena vaskularne kalcifikacije u kliničkoj praksi: slikovni pokazatelji i potreba za ranim/biološkim biljezima	6
1.1.6. Vitamin K–ovisni proteini i GRP	7
1.2. Fenotipovi vaskularne kalcifikacije i arterijska krutost	8
1.2.1. Definicija i klinički značaj vaskularne kalcifikacije	8
1.2.2. Fenotipska podjela: intimalna i medijalna kalcifikacija	9
1.2.3. Intimalna kalcifikacija i aterosklerotski proces	10
1.2.4. Medijalna kalcifikacija, povezanost s KBB i šećernom bolesti	11
1.2.5. Hemodinamske posljedice medijalne kalcifikacije	12
1.2.6. Procjena arterijske krutosti: brzina pulsnog vala	13
1.2.7. Procjena kalcifikacijskog tereta: Kauppila i radiološki biljezi.....	13
1.2.8. Poseban entitet: kalcifilaksija (kalcificirajuća uremijska arteriopatija) ..	14
1.3. Patogeneza vaskularne kalcifikacije u KBB: uremijsko okruženje, fenotipska transformacija VSMC i sustavni regulatori	15
1.3.1. Uremijsko okruženje i KBB–MKP kao “okidači” prokalcifikacijskog preusmjerenja	15
1.3.2. Fosfat kao ključni signal: ulazak u stanicu i osteogeni poticaj	16
1.3.3. Izvanstanične vezikule i nukleacija minerala: “mikro-žarišta” kalcifikacije 17	
1.3.4. Kalcijproteinske čestice i T50: integrativna mjera kalcifikacijske sklonosti seruma.....	18
1.3.5. Gubitak inhibitora kalcifikacije i slabljenje zaštite: uloga Matrix GLA proteina (MGP) i širih inhibitorskih sustava	18
1.3.6. Uremijski toksini, upala i oksidativni stres: pojačavanje osteogenog odgovora.....	20
1.3.7. Pirofosfat (PPi) kao endogeni inhibitor: važna, često zanemarena os....	20

1.3.8. Poveznica prema GRP-u: mjesto vitamin K–ovisnih proteina u modernim modelima vaskularne kalcifikacije	21
1.4. KBB–MKP i mineralni stres: CPP, fetuin-A i sklonost kalcifikaciji	22
1.4.1. Mineralni stres u KBB-u: fosfat, kalcij i uremijsko okruženje kao čimbenici prokalcifikacijskog okoliša	22
1.4.2. Fetuin-A i CPP: vezanje minerala i zaštita od precipitacije	23
1.4.3. T50 kao funkcionalna mjera serumske sklonosti kalcifikaciji	24
1.4.4. Slabljenje obrane od mineralnog stresa u KBB-u i njegove posljedice ...	25
1.5. Vitamin K–ovisni inhibitori vaskularne kalcifikacije (MGP kao prototip)	26
1.5.1. Vitamin K–ovisni proteini i važnost γ -karboksilacije za funkcionalnost inhibitora kalcifikacije	26
1.5.2. MGP kao dokaz koncepta: ključni lokalni inhibitor i most prema GRP-u	28
1.6. GRP: biološke značajke i dokazi u vaskularnoj kalcifikaciji/KBB	30
1.6.1. Nomenklatura, struktura i vitamin K–ovisna γ -karboksilacija	30
1.6.2. Tkivna distribucija i lokalizacija: od cirkulacije do mjesta patološke mineralizacije	31
1.6.3. Antikalcifikacijski učinci: mehanistički okvir (mineralna interakcija, VSMC fenotip, signalizacija)	31
1.6.4. GRP u CPP/EV i veza s mineralnim stresom: od pufera do efektoru	32
1.6.5. Klinički podaci u KBB-u i dijalizi: biomarkerni potencijal i povezanost s vaskularnim fenotipom	33
1.6.6. Ograničenja dosadašnjih radova: frakcije, metodologija i konfuzori (vitamin K status, upala, stadij bolesti)	34
1.7. Fenotipizacija u ovom radu: logika odabira PWV-a, Kauppila AAC-a i ehokardiografske procjene aortnog zaliska i lijeve klijetke	35
1.7.1. Zašto je potrebna višerazinska fenotipizacija?	35
1.7.2. PWV kao funkcionalni “otisak” krutosti i medijalne mineralizacije	36
1.7.3. Kauppila AAC kao dostupna i validirana mjera strukturnog kalcifikacijskog tereta	37
1.7.4. Ehokardiografska procjena aortnog zaliska i lijeve klijetke: organske posljedice vaskularnog fenotipa (valvularna kalcifikacija i remodeliranje lijeve klijetke)	37
1.7.5. Sažetak logike odabira mjera u ovom radu	38
1.8. Praznine u znanju i ključna metodološka ograničenja	39
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	41
2.1. Hipoteze istraživanja	42
2.1.1. Glavna hipoteza:	42
2.1.2. Specifične hipoteze:	42

2.2.	Ciljevi istraživanja	42
2.2.1.	Opći cilj:	42
2.2.2.	Specifični ciljevi:	43
3.	ISPITANICI I METODE	44
3.1.	Dizajn istraživanja	45
3.2.	Ispitanici – uključni i isključni kriteriji	45
3.3.	Etički aspekti istraživanja	46
3.4.	Klinička procjena i osnovni podaci	46
3.5.	Laboratorijske analize i biomarkeri	46
3.6.	Procjena vaskularne kalcifikacije	47
3.7.	Procjena arterijske krutosti i pulsne hemodinamike	47
3.8.	Ehokardiografska procjena	48
3.9.	Praćenje i klinički ishodi	48
3.10.	Statistička obrada podataka	49
4.	REZULTATI	50
4.1.	Osnovna obilježja ispitivane populacije i raspodjela ispitanika po skupinama 51	
4.2.	Razlike u kontinuiranim kliničkim, ehokardiografskim, vaskularnim i biokemijskim varijablama među skupinama	53
4.3.	Povezanost GRP-a s bubrežnom funkcijom, vaskularnim fenotipom i biokemijskim pokazateljima KBB–MKP osi	64
4.4.	Vrijednosti GRP-a prema kliničkim događajima tijekom praćenja i varfarinskoj terapiji	66
4.5.	Multivarijatni model prediktora Kauppila zbroja	68
4.6.	Multivarijatni model prediktora PWV-a	69
4.7.	Povezanost tGRP-a s biokemijskim pokazateljima KBB–MKP osi: multivarijatni modeli za KLb i FGF-23	71
4.8.	Analiza dostupnosti vrijednosti KLb i FGF-23	72
5.	RASPRAVA	76
6.	ZAKLJUČCI	86
7.	LITERATURA	89
8.	POPIS SLIKA	103
9.	POPIS TABLICA	104
10.	POPIS POKRATA	105
11.	ŽIVOTOPIS	107

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. Epidemiologija i klinički značaj vaskularne kalcifikacije u kroničnoj bubrežnoj bolesti

1.1.1. Definicija KBB i javnozdravstveni značaj

Kronična bubrežna bolest (KBB) definira se kao abnormalnost strukture ili funkcije bubrega prisutna najmanje tri mjeseca, uz implikacije za zdravlje, a klasificira se prema uzroku, kategoriji glomerularne filtracije i albuminuriji [1]. Takva klasifikacija ne odražava samo stupanj bubrežne disfunkcije, nego i heterogenost rizika progresije bolesti, razvoja komplikacija te ukupnog, osobito kardiovaskularnog, rizika među bolesnicima s KBB [1,2].

U suvremenom javnozdravstvenom kontekstu KBB se više ne promatra samo kao preteča završnog stadija bubrežne bolesti, nego kao samostalan i rastući uzrok globalnog morbiditeta i mortaliteta [2–4]. Procjenjuje se da KBB zahvaća više od jedne desetine odrasle populacije u svijetu, odnosno stotine milijuna ljudi globalno [3,4]. Dodatno zabrinjava činjenica da teret KBB-a i dalje raste, kako zbog starenja populacije, tako i zbog sve veće prevalencije šećerne bolesti, arterijske hipertenzije, pretilosti i drugih kroničnih nezaraznih bolesti koje pridonose nastanku i progresiji bubrežnog oštećenja [2,3]. Suvremene epidemiološke analize pokazuju da KBB sve značajnije doprinosi ukupnom globalnom teretu bolesti [2,4]. Prema najnovijim procjenama Global Burden of Disease Study 2023, KBB je 2023. godine bila deveti vodeći uzrok smrti u svijetu te dvanaesti vodeći uzrok izgubljenih godina zdravog života, dok je oštećena bubrežna funkcija pridonijela značajnom udjelu kardiovaskularnih smrti [4]. Posebno je važno istaknuti da je KBB među rijetkim velikim nezaraznim bolestima kod kojih se tijekom posljednjih desetljeća bilježi porast broja smrtnih ishoda, što dodatno naglašava njezin rastući javnozdravstveni značaj [2,4].

Klinički značaj KBB-a dodatno proizlazi iz činjenice da nepovoljni ishodi u ovoj bolesti nisu ograničeni samo na progresiju prema nadomjesnom bubrežnom liječenju, nego u velikoj mjeri proizlaze iz kardiovaskularnih komplikacija, koje predstavljaju vodeći uzrok smrti u bolesnika s KBB [2,5]. Zbog toga se KBB danas promatra kao multisistemska bolest koja zahtijeva rano prepoznavanje, preciznu stratifikaciju rizika i bolje razumijevanje patofizioloških mehanizama koji povezuju bubrežno oštećenje s kardiovaskularnim pobolom i mortalitetom [2,5].

1.1.2. Kardiovaskularni rizik u KBB: tradicionalni i netradicionalni mehanizmi

Kardiovaskularne bolesti vodeći su uzrok smrti u svim stadijima kronične bubrežne bolesti, a njihova učestalost i prognostička važnost rastu s pogoršanjem bubrežne funkcije, osobito u uznapredovaloj KBB i u bolesnika na kroničnoj dijalizi [5]. Važno je pritom naglasiti da se povišeni kardiovaskularni rizik u KBB-u ne pojavljuje tek u završnom stadiju bolesti, nego je prisutan već u ranijim fazama smanjenja bubrežne funkcije, što upućuje na činjenicu da sama KBB predstavlja snažan i samostalan modulator kardiovaskularnog rizika [6,7].

Tradicionalni čimbenici rizika, poput dobi, arterijske hipertenzije, šećerne bolesti, pušenja i dislipidemije, nesumnjivo pridonose razvoju aterosklerotske i drugih kardiovaskularnih bolesti u KBB-u, ali ne mogu u potpunosti objasniti veličinu opaženog rizika [5,6,8]. U brojnim epidemiološkim i mehanističkim analizama pokazano je da bolesnici s KBB-om imaju izražen "rezidualni" ili KBB-specifični kardiovaskularni rizik, koji proizlazi iz složenog međudjelovanja poremećaja mineralnog metabolizma, kronične upale, oksidativnog stresa, endotelne disfunkcije, arterijske krutosti, anemije, volumnog i tlačnog opterećenja te akumulacije uremijskih toksina [5–11]. Takav se rizik ne manifestira samo povećanom učestalošću koronarne bolesti, nego i većom učestalošću zatajivanja srca, aritmija, nagle srčane smrti, valvularne bolesti i difuznog vaskularnog remodeliranja, što dodatno razlikuje kardiovaskularni profil KBB-a od onoga u općoj populaciji [5,7,8].

Jedna od ključnih osobitosti KBB-a jest postojanje uremijskog okruženja, odnosno sustavnog biološkog okruženja obilježenog retencijom tvari koje se normalno izlučuju bubrežima, poremećajem ionske i hormonske homeostaze te pojačanom aktivacijom upalnih i oksidacijskih puteva [6,10,11]. Uremijski toksini, uključujući proteinski vezane molekule poput indoksil-sulfata i p-krezil-sulfata, mogu izravno poticati vaskularnu i miokardnu ozljedu, inducirati oksidativni stres, promicati upalni odgovor, narušavati endotelnu funkciju te pogodovati fenotipskoj promjeni vaskularnih glatkomišićnih stanica (*engl. vascular smooth muscle cell; VSMC*) prema prokalcifikacijskom i proaterogenom obrascu [10,11]. Posljedično se u KBB-u razvija kardiovaskularni fenotip koji je istodobno aterosklerotski, arteriosklerotski i metaboličko-kalcifikacijski, s većim udjelom difuzne arterijske krutosti i medijalne kalcifikacije nego u bolesnika bez bubrežne bolesti [7,12].

Širi konceptualni okvir u kojem se ovi poremećaji integriraju često se opisuje pojmom kronične bubrežne bolesti–mineralno-koštanog poremećaja (KBB–MKP; *engl. chronic kidney disease–mineral and bone disorder*, CKD–MBD) koji obuhvaća laboratorijske abnormalnosti metabolizma fosfata, kalcija, paratireoidnog hormona, vitamina D, poremećaje osi fibroblastnog čimbenika rasta 23 (*engl. fibroblast growth factor 23*, FGF-23)/Klotho, promjene koštane pregradnje te vaskularne i mekotkivne kalcifikacije [9,13]. Važnost KBB–MKP okvira leži u tome što povezuje naizgled odvojene organske sustave- bubrež, kost, krvne žile i srce u jedinstven patofiziološki kontinuum u kojem poremećaji mineralne homeostaze pridonose ne samo koštanoj bolesti nego i ubrzanom vaskularnom starenju, kalcifikaciji i nepovoljnim kardiovaskularnim ishodima [7,9,13,14]. U tom smislu KBB–MKP nije tek biokemijski konstrukt, nego klinički relevantan sindrom koji pomaže objasniti zašto standardna korekcija tradicionalnih čimbenika rizika često ne uspijeva u potpunosti smanjiti kardiovaskularni pobol i mortalitet u KBB populaciji [5,7,9].

U tom se patofiziološkom kontekstu vaskularna kalcifikacija nameće kao jedna od klinički najrelevantnijih komplikacija KBB-a i potencijalni medijator poveznice između bubrežne disfunkcije i nepovoljnih kardiovaskularnih ishoda [5,9,12]. Ona ne predstavlja samo pasivni “ostatak” dugotrajnog metaboličkog poremećaja, nego aktivno reguliran proces povezan s mineralnim stresom, gubitkom inhibitora kalcifikacije, upalom i vaskularnim remodeliranjem, pri čemu njezine posljedice uključuju porast arterijske krutosti, širenje tlaka pulsa, povećano opterećenje lijeve klijetke (LV) te daljnje pogoršanje ukupnog kardiovaskularnog rizika [5,12,15,16]. Zbog toga je razumijevanje i fenotipizacija vaskularne kalcifikacije u KBB-u od središnje važnosti za suvremene modele procjene rizika, osobito kada se istražuju biomarkeri i regulatori kalcifikacije koji bi mogli odražavati biološki aktivnu fazu procesa prije razvoja uznapredovalog strukturnog oštećenja.

1.1.3. Vaskularna kalcifikacija u KBB: definicija, učestalost i prognostička vrijednost

Vaskularna kalcifikacija označava patološko odlaganje kalcij-fosfatnih mineralnih depozita u stijenci krvnih žila te se danas smatra aktivno reguliranim biološkim procesom, a ne samo pasivnim taloženjem minerala u oštećenom tkivu

[12,17,18]. Iako se kalcifikacijske promjene mogu razvijati i u sklopu fiziološkog starenja, njihova je pojava u pojedinim bolestima znatno ubrzana, osobito u šećernoj bolesti i kroničnoj bubrežnoj bolesti, gdje uremijsko okruženje, poremećaji mineralnog metabolizma, kronična upala i gubitak inhibitora kalcifikacije stvaraju izrazito prokalcifikacijsko okruženje [5,12,17,18]. U tom smislu vaskularna kalcifikacija u KBB-u ne predstavlja samo popratnu pojavu kronične bolesti, nego jednu od središnjih manifestacija poremećene vaskularne homeostaze u uremiji [5,12,18].

U bolesnika s KBB-om vaskularna kalcifikacija pojavljuje se ranije, napreduje brže i često doseže veći opseg nego u osoba iste dobi s očuvanom bubrežnom funkcijom, a osobito je izražena u završnom stadiju bubrežne bolesti (*engl. end-stage renal disease*, ESRD) i u bolesnika na kroničnoj dijalizi [17–20]. Klinički i slikovni podaci pokazuju da je u ESRD populaciji kalcifikacija vrlo česta i često progresivna, pri čemu može zahvatiti više vaskularnih područja istodobno, uključujući koronarne arterije, aortu i periferne arterije [19,20]. Važno je također naglasiti da se u KBB-u vaskularna kalcifikacija ne svodi samo na aterosklerotsku intimalnu bolest, nego se često očituje i kao kalcifikacija medije, koja je posebno povezana s arterijskom krutošću, nepovoljnom pulsnom hemodinamikom i povećanim opterećenjem LV [12,18,21].

Klinički značaj vaskularne kalcifikacije u KBB-u proizlazi iz činjenice da ona odražava kumulativni učinak dugotrajnog metaboličkog, upalnog i hemodinamskog opterećenja na vaskularnu stijenku te predstavlja snažan pokazatelj ukupnog vaskularnog oštećenja [5,12,18]. U brojnim kohortnim studijama i sustavnim analizama prisutnost i veći opseg vaskularne kalcifikacije povezani su s višim rizikom kardiovaskularnih događaja, fatalnih kardiovaskularnih ishoda i ukupnog mortaliteta, pri čemu je prognostička vrijednost osobito izražena u bolesnika s KBB-om [5,22,23].

Primjerice, meta-analički podaci za abdominalnu aortnu kalcifikaciju pokazuju da bolesnici s KBB-om i izraženijom kalcifikacijom imaju znatno veći rizik budućih kardiovaskularnih događaja, fatalnih kardiovaskularnih ishoda i ukupne smrtnosti nego oni bez ili s manjim kalcifikacijskim teretom [23]. Stoga se vaskularna kalcifikacija u KBB-u može promatrati ne samo kao morfološki biljeg već nastalog oštećenja, nego i kao klinički relevantan prognostički biljeg koji integrira djelovanje brojnih tradicionalnih

i netradicionalnih čimbenika rizika te opravdava potrebu za njezinom sustavnom fenotipizacijom u kliničkim i istraživačkim modelima KBB.

1.1.4. Fenotip vaskularne kalcifikacije u KBB i hemodinamske posljedice: arterijska krutost i ishodi

Važno je istaknuti da vaskularna kalcifikacija u kroničnoj bubrežnoj bolesti može zahvatiti i intimu i mediju, pri čemu je kalcifikacija medije osobito karakteristična za KBB i završni stadij bubrežne bolesti te je usko povezana s povećanjem arterijske krutosti [17,18,21].

S kliničkog gledišta, vaskularna kalcifikacija nije samo slikovni nalaz, nego strukturna podloga važnih hemodinamskih promjena [5,21,24]. Kalcifikacija medije povećava krutost arterijske stijenke i smanjuje vaskularnu popustljivost, što pogoduje porastu sistoličkog tlaka i tlaka pulsa te povećanju brzine pulsnog vala [15,21,24]. Takve promjene povećavaju tlačno opterećenje LV, pogoduju razvoju hipertrofije i remodeliranja miokarda te mogu kompromitirati koronarnu perfuziju tijekom dijasole [21,24,25]. U tom smislu arterijska krutost predstavlja funkcionalni izraz strukturnog oštećenja vaskularne stijenke i jedan od ključnih mehanizama kojima vaskularna kalcifikacija doprinosi nepovoljnim kardiovaskularnim ishodima u KBB-u [5,15,24].

Brojne kliničke studije pokazale su da je povećana aortna krutost, najčešće procijenjena brzinom pulsnog vala, povezana s većim rizikom zatajivanja srca, kardiovaskularnih događaja i mortaliteta u bolesnika s uznapredovalom KBB i ESRD [15,26,27]. Time se vaskularna kalcifikacija u KBB-u može promatrati ne samo kao komplikacija kronične bolesti, nego i kao važan mehanizam koji pridonosi daljnjem porastu kardiovaskularnog rizika u toj visokorizičnoj populaciji [5,21].

1.1.5. Procjena vaskularne kalcifikacije u kliničkoj praksi: slikovni pokazatelji i potreba za ranim/biološkim biljezima

S obzirom na visoku učestalost i izraženu prognostičku važnost vaskularne kalcifikacije u kroničnoj bubrežnoj bolesti, njezina precizna karakterizacija ima važne implikacije za procjenu kardiovaskularnog rizika i kliničko odlučivanje [5,12].

U kliničkoj se praksi interes stoga usmjerava na kombinaciju slikovnih pokazatelja kalcifikacijskog tereta i funkcionalnih mjera vaskularnog oštećenja, ali i na metode koje su dovoljno dostupne, reproducibilne i primjenjive u široj populaciji bolesnika s KBB-om [15,23,24]. Među takvim pristupima osobito je važna procjena kalcifikacije abdominalne aorte na lateralnim radiogramima lumbalne kralježnice, budući da je riječ o jednostavnoj i relativno dostupnoj metodi koja omogućuje semikvantitativnu procjenu kalcifikacijskog opterećenja [28,29]. Abdominalna aortna kalcifikacija procijenjena na ovaj način pokazala se prediktorom budućeg vaskularnog morbiditeta i mortaliteta u populacijskim kohortama, a njezina je prognostička vrijednost potvrđena i u sustavnim pregledima i metaanalizama [22,23].

U bolesnika s KBB-om i osobito u onih na dijalizi, takve slikovne mjere imaju dodatnu vrijednost jer pružaju uvid u već razvijeni strukturni vaskularni fenotip koji odražava dugotrajni mineralni i upalni stres [12,18,29]. Međutim, važno je naglasiti da slikovne metode dominantno bilježe kumulativni teret procesa, odnosno konačni rezultat višegodišnjeg remodeliranja i mineralizacije vaskularne stijenke, a manje njegovu ranu ili biološki aktivnu fazu [12,30]. Zbog toga se posljednjih godina sve veća pozornost usmjerava prema biomarkerima i mehanistički utemeljenim pokazateljima koji bi mogli odražavati ranu ili aktivnu kalcifikaciju, poremećenu obranu od mineralnog stresa i sklonost seruma taloženju minerala prije razvoja opsežnog morfološkog oštećenja [31–33]. U tom su kontekstu osobito zanimljivi cirkulirajući inhibitori kalcifikacije, vitamin K–ovisni proteini, kalciproteinske čestice i funkcionalni testovi serumske sklonosti kalcifikaciji, jer potencijalno omogućuju uvid u dinamičniju, biološki aktivnu komponentu procesa koju same slikovne metode ne mogu u potpunosti obuhvatiti [30,31,34].

1.1.6. Vitamin K–ovisni proteini i GRP

U kontekstu praćenja vaskularne kalcifikacije opravdano je istraživati endogene inhibitore kalcifikacije i vitamin K–ovisne proteine kao potencijalne biljege i modulatore ovog procesa [35,36]. Vitamin K–ovisni proteini osobito su zanimljivi u kroničnoj bubrežnoj bolesti, jer njihova biološka aktivnost ovisi o γ -karboksilaciji, odnosno o posttranslacijskoj modifikaciji nužnoj za učinkovito vezanje kalcija i regulaciju ektopične mineralizacije [35,37]. U bolesnika s KBB-om ta je os posebno relevantna

zbog izraženog mineralnog stresa, česte funkcionalne insuficijencije vitamina K i istodobne prisutnosti upalnih i uremijskih mehanizama koji pogoduju vaskularnom remodeliranju i kalcifikaciji [36,38–40].

Među vitamin K–ovisnim proteinima GLA-bogati protein (GRP) sve se češće prepoznaje kao kandidat s mogućom anti-kalcifikacijskom i imunomodulacijskom ulogom [41–44]. Njegova je istraživačka vrijednost u tome što potencijalno povezuje biološki aktivne mehanizme kalcifikacije, uključujući interakciju s mineralnim fazama i upalnim odgovorom, s klinički mjerljivim vaskularnim fenotipom u bolesnika s KBB-om [45,46]. Zbog toga GRP predstavlja logičan fokus daljnje rasprave o molekularnim regulatorima vaskularne kalcifikacije u kroničnoj bubrežnoj bolesti [41,46,47].

Iako je u ovom radu naglasak stavljen na ulogu GRP-a u kroničnoj bubrežnoj bolesti i vaskularnoj kalcifikaciji, važno je istaknuti da biološko značenje ovog proteina nadilazi okvir kronične bubrežne bolesti–mineralno-koštanog poremećaja (KBB–MKP). Dosadašnja istraživanja povezivala su GRP i s drugim stanjima obilježenima poremećenom mineralizacijom, upalom i remodeliranjem tkiva, uključujući osteoartritis, patološke kalcifikacije mekih tkiva i određene neoplastične procese, što dodatno podupire njegovu širu biološku relevantnost [48–50].

Ipak, u kontekstu ove disertacije od posebne su važnosti upravo oni aspekti biologije GRP-a koji ga smještaju na sjecište mineralnog stresa, inhibitora kalcifikacije i vaskularnog oštećenja u KBB-u.

1.2. Fenotipovi vaskularne kalcifikacije i arterijska krutost

1.2.1. Definicija i klinički značaj vaskularne kalcifikacije

Vaskularna kalcifikacija definira se kao neprimjereno, patološko odlaganje mineralnih depozita u obliku kalcij-fosfatnih soli u vaskularna tkiva [17]. Danas se ne smatra pasivnim taloženjem minerala u degenerativno promijenjenoj stijenci krvne žile, nego aktivno reguliranim procesom koji uključuje promjene vaskularnih stanica, izvanstaničnog matriksa i lokalnih inhibitora mineralizacije [17,51]. Iako se kalcifikacijske promjene mogu razvijati i u sklopu fiziološkog starenja, njihova učestalost i opseg izrazito ovise o prisutnosti komorbiditeta i ukupnom vaskularnom opterećenju te su osobito izraženi u aterosklerozi, šećernoj bolesti i kroničnoj

bubrežnoj bolesti [5,17,18]. U tom smislu vaskularna kalcifikacija predstavlja završni morfološki izraz složenih metaboličkih, upalnih i staničnih procesa koji se međusobno preklapaju i pojačavaju [12,51].

Kalcifikacija velikih arterija mijenja mehanička svojstva vaskularne stijenke, smanjuje elastičnost i popustljivost te pridonosi nepovoljnim hemodinamskim promjenama [21,24]. Klinički, veći teret vaskularne kalcifikacije povezan je s višim rizikom kardiovaskularnih događaja i mortaliteta, a prognostička je važnost osobito izražena u bolesnika s KBB-om i završnim stadijem bubrežne bolesti [18,22,23]. Zbog toga se vaskularna kalcifikacija danas promatra ne samo kao morfološki biljeg vaskularnog oštećenja, nego i kao klinički relevantan pokazatelj nepovoljnog kardiovaskularnog fenotipa [5,21,23].

1.2.2. Fenotipska podjela: intimalna i medijalna kalcifikacija

Važno je naglasiti da vaskularna kalcifikacija nije jedinstven entitet, nego obuhvaća fenotipove koji se razlikuju prema lokalizaciji unutar stijenke krvne žile, patofiziološkom kontekstu i kliničkim posljedicama [17,21]. Klasično se razlikuju intimalna i medijalna kalcifikacija [21].

Intimalna kalcifikacija tipično je povezana s aterosklerotskim plakom, upalom i aterotrombotskim rizikom, dok medijalna kalcifikacija, odnosno kalcifikacija medije, primarno zahvaća elastične slojeve i vaskularne glatkomišićne stanice medije te je osobito povezana s gubitkom arterijske elastičnosti i porastom arterijske krutosti [18,21,52]. Ova podjela nije samo histološka, nego ima jasnu kliničku implikaciju: intimalna kalcifikacija u pravilu više odražava aterosklerotski teret i rizik ishemijskih događaja, dok medijalna kalcifikacija više doprinosi nepovoljnoj pulsnoj hemodinamici, povišenju sistoličkog tlaka i tlaka pulsa te posljedičnom opterećenju LV [18,21,24].

Unatoč konceptualnoj koristi ove podjele, u kliničkim i slikovnim studijama često nije moguće potpuno jasno razlučiti intimalnu od medijalne komponente, što dodatno naglašava potrebu za integracijom morfoloških i funkcionalnih pokazatelja vaskularnog oštećenja [17,21]. U praksi, osobito u kroničnoj bubrežnoj bolesti, ta se dva procesa često preklapaju i mogu koegzistirati u istoj vaskularnoj regiji, ali se razlikuju prema dominantnom mehanizmu nastanka i prema tome na koji način

moduliraju klinički rizik [17,18,21]. Upravo je takvo preklapanje osobito važno u KBB-u, gdje se aterosklerotski i metaboličko-kalcifikacijski mehanizmi međusobno pojačavaju te zajednički oblikuju vaskularni fenotip bolesnika [5,17,18].

1.2.3. Intimalna kalcifikacija i aterosklerotski proces

Intimalna kalcifikacija tipično se razvija u sklopu aterosklerotskog plaka, u kontekstu dislipidemije, endotelne disfunkcije, kronične upale i lokalnog remodeliranja vaskularne stijenke [51,52]. Ateroskleroza je difuzna, sporo progresivna bolest koja može istodobno zahvatiti više arterijskih bazena, zbog čega velik dio bolesnika ostaje asimptomatski godinama ili desetljećima prije prve kliničke manifestacije. Kada se bolest klinički očituje, simptomi su najčešće posljedica postupnog suženja lumena i smanjenja protoka ili, u akutnim situacijama, destabilizacije plaka praćene trombozom i okluzijom arterije [52].

Klinička prezentacija stoga ovisi o zahvaćenom vaskularnom teritoriju te može uključivati stabilnu anginu i akutni koronarni sindrom, ishemijski moždani udar, simptome periferne arterijske bolesti ili renovaskularnu hipertenziju i progresiju bubrežne disfunkcije. U tom okviru intimalna kalcifikacija može služiti kao slikovni biljeg aterosklerotskog tereta, budući da odražava dugotrajan lokalni učinak upale, lipida, stanične smrti i reparacijskih procesa unutar plaka. Međutim, njezin odnos prema stabilnosti plaka nije jednoznačan. Naime, kliničko značenje kalcifikacije ovisi o morfologiji, veličini i distribuciji kalcifikacijskih depozita, kao i o istodobno prisutnim upalnim, lipidnim i fibrozno-remodelacijskim procesima unutar aterosklerotske lezije [51,52].

Važno je pritom naglasiti da intimalna kalcifikacija nije samo “pasivni ostatak” aterosklerotskog procesa, nego odražava dinamičnu interakciju između upalnih stanica, VSMC i izvanstaničnog matriksa [17,51]. U tom smislu ona predstavlja dio šire biologije aterosklerotskog plaka, a ne izdvojeni morfološki nalaz [51–53]. Zbog toga intimalnu kalcifikaciju ne treba tumačiti izolirano, nego u širem kliničkom i patobiološkom kontekstu, uzimajući u obzir ukupnu aterosklerotsku bolest, komorbiditete i lokalni vaskularni fenotip [21,52].

U bolesnika s KBB to je osobito važno, jer se aterosklerotski mehanizmi često preklapaju s metaboličko-kalcifikacijskim i uremijskim čimbenicima pa intimalna komponenta vaskularne kalcifikacije može biti dio složenijeg i heterogenijeg vaskularnog oštećenja nego u općoj populaciji [5,17,18]. Takvo preklapanje dodatno otežava jednostavno tumačenje slikovnih nalaza i podupire potrebu za integracijom morfoloških, funkcionalnih i bioloških pokazatelja vaskularnog oštećenja u KBB-u [12,17,21].

1.2.4. Medijalna kalcifikacija, povezanost s KBB i šećernom bolešću

Medijalna kalcifikacija, odnosno kalcifikacija medije, tradicionalno opisana i kao Mönckebergova skleroza, zahvaća tunicu mediju, koja je građena od VSMC uronjenih u mrežu elastičnih i vezivnih vlakana [21]. Za razliku od intimalne kalcifikacije, medijalna kalcifikacija nije primarno obilježje aterosklerotskog plaka, nego odražava poremećaj vaskularne homeostaze i mineralizacije unutar same stijenke krvne žile [17,21]. Ovaj fenotip kalcifikacije osobito je čest u šećernoj bolesti i kroničnoj bubrežnoj bolesti te se može razvijati i bez izražene luminalne stenoze [18,21,54]. To dodatno podupiru noviji pregledni podaci koji pokazuju da hiperglikemija izravno potiče osteogenu diferencijaciju vaskularnih glatkomišićnih stanica, čime šećerna bolest aktivno sudjeluje u nastanku prokalcifikacijskog vaskularnog fenotipa [55].

Iako bolesnici s KBB-om mogu razviti i intimalnu i medijalnu kalcifikaciju, u KBB-u i završnom stadiju bubrežne bolesti medijalna je komponenta često posebno izražena i klinički važna zbog svojih funkcionalnih posljedica na arterijsku krutost i pulsnu hemodinamiku [17,18,21]. U pedijatrijskoj KBB, gdje klasična ateroskleroza nije dominantan proces, medijalna kalcifikacija često prevladava, što dodatno podupire važnost metaboličkih, mineralnih i uremijskih čimbenika u njezinu nastanku. Upravo taj nalaz snažno sugerira da se medijalna kalcifikacija ne može svesti samo na "starenje krvne žile", nego predstavlja poseban patobiološki odgovor na poremećeni mineralni i upalno okruženje [21,56].

Premda se medijalna kalcifikacija nekoć smatrala relativno "benignom" jer nije nužno stenotična ni trombogena, danas je jasno da je povezana s nepovoljnim ishodima, uključujući veću kardiovaskularnu smrtnost, pogoršanje arterijske krutosti i, u određenim populacijama poput bolesnika sa šećernom bolešću ili ESRD-om,

povećan rizik ishemijskih komplikacija i amputacija [18,21,57]. Dodatno, sve je više dokaza da unutar kategorije medijalne kalcifikacije postoje heterogeni mehanizmi te da starenje, metabolički poremećaji, šećerna bolest i uremijsko okruženje mogu djelovati kumulativno i ubrzavati proces mineralizacije [21,58,59]. Zbog toga medijalnu kalcifikaciju treba promatrati kao klinički relevantan i mehanistički specifičan fenotip vaskularnog oštećenja, osobito u bolesnika s KBB-om [21].

1.2.5. Hemodinamske posljedice medijalne kalcifikacije

Hemodinamske posljedice medijalne kalcifikacije bitno se razlikuju od onih koje se primarno povezuju s aterosklerotskom, intimalnom kalcifikacijom [18,21]. Difuzno odlaganje mineralnih depozita u mediji povećava krutost arterijske stijenke i smanjuje vaskularnu popustljivost, čime se umanjuje sposobnost arterijskog sustava da tijekom sistole apsorbira dio udarnog volumena i amortizira porast tlaka [16,17,21]. Takve promjene dovode do porasta sistoličkog tlaka i tlaka pulsa, povećanja brzine pulsno vala te ranijeg povrata reflektiranih pulsni valova iz perifernih arterijskih segmenata prema središnjim arterijama, što zajedno povećava središnje tlačno opterećenje [16,24]. Istodobno se snižava dijastolički tlak, što može kompromitirati koronarnu perfuziju tijekom dijastole, osobito u prisutnosti istodobne aterosklerotske bolesti [16,21].

Takve promjene imaju važne posljedice na srce i cijeli arterijski sustav [15,24]. Povećano sistoličko i pulsno opterećenje pogoduje razvoju hipertrofije i remodeliranja LV, povećava potrebu miokarda za kisikom i doprinosi nastanku dijastoličke disfunkcije [24,25]. U bolesnika s KBB, kod kojih su i volumno opterećenje, hipertenzija i metabolički poremećaji često istodobno prisutni, učinak arterijske krutosti može biti dodatno izražen [5,15,25]. Time medijalna kalcifikacija i s njom povezana arterijska krutost predstavljaju važan mehanistički most između strukturnog vaskularnog oštećenja i klinički relevantnih ishoda, uključujući zatajivanje srca, ishemijske događaje i povećani mortalitet u populaciji s KBB-om [5,15,26].

1.2.6. Procjena arterijske krutosti: brzina pulsog vala

Arterijska krutost u kliničkoj se praksi najčešće procjenjuje mjerenjem brzine pulsog vala (*engl. pulse wave velocity, PWV*) duž definiranog arterijskog segmenta [16]. Karotidno-femoralni PWV smatra se referentnom neinvazivnom metodom za procjenu aortne krutosti, no u svakodnevnoj kliničkoj i istraživačkoj praksi sve se češće primjenjuju i oscilometrijske metode koje omogućuju jednostavniju i reproducibilnu procjenu arterijske krutosti [15,16]. Što je arterijska stijenka kruća, to se pulsni val kroz arterijski sustav širi brže [16].

PWV je dinamičan parametar koji ne odražava samo trenutne hemodinamske uvjete, osobito razinu arterijskog tlaka, nego i strukturna svojstva arterijske stijenke, uključujući remodeliranje, gubitak elastičnosti i kalcifikacijski teret [15,16,24]. Upravo zbog toga PWV predstavlja funkcionalni izraz kumulativnog vaskularnog oštećenja i može pružiti dodatnu prognostičku informaciju uz standardne parametre krvnog tlaka [16,60]. U bolesnika s kroničnom bubrežnom bolesti njegova je važnost osobito velika, jer se u toj populaciji arterijska krutost razvija pod utjecajem i tradicionalnih čimbenika rizika i KBB-specifičnih mehanizama, uključujući uremijsko okruženje, poremećaje mineralnog metabolizma i medijalnu kalcifikaciju [5,15,24].

U skladu s time, viši PWV u KBB populaciji povezan je s nepovoljnijim ishodima; primjerice, u CRIC kohorti pokazano je da je PWV neovisno povezan s progresijom KBB i mortalitetom [15]. U praktičnom smislu, PWV se stoga može promatrati kao funkcionalni "otisak" strukturnih promjena u arterijskoj stijenci te kao korisna dopuna klasičnim hemodinamskim mjerama u procjeni ukupnog kardiovaskularnog rizika u bolesnika s KBB-om [15,16,24].

1.2.7. Procjena kalcifikacijskog tereta: Kauppila i radiološki biljezi

Za klinički relevantnu fenotipizaciju vaskularnog oštećenja osobito je korisno kombinirati funkcionalne mjere arterijske krutosti s procjenom kalcifikacijskog tereta dostupnim slikovnim metodama [15,23,24]. Takav pristup omogućuje istodobnu procjenu strukturnog opterećenja kalcifikacijom i njegovih funkcionalnih posljedica na arterijsku hemodinamiku [17,21,24]. U tom je kontekstu osobito važna procjena kalcifikacije abdominalne aorte (*engl. abdominal aortic calcification, AAC*) na lateralnim radiogramima lumbalne kralježnice, koja omogućuje jednostavnu i

reproducibilnu semikvantitativnu procjenu kalcifikacijskog tereta [28]. Bodovni sustav koji su opisali Kauppila i suradnici, poznat i kao AAC zbroj, temelji se na procjeni opsega kalcifikacijskih depozita uz prednju i stražnju stijenku abdominalne aorte u razini lumbalnih kralježaka te je zbog svoje praktičnosti široko prihvaćen u kliničkim i istraživačkim studijama [23,28].

Prognostička vrijednost abdominalne aortne kalcifikacije potvrđena je u populacijskim kohortama, gdje se pokazalo da je AAC neovisni prediktor vaskularnog morbiditeta i mortaliteta [22]. Noviji sustavni pregledi i metaanalize dodatno su potvrdili da prisutnost i veći opseg AAC nose povećani rizik budućih kardiovaskularnih događaja, fatalnih kardiovaskularnih ishoda i ukupne smrtnosti, pri čemu je prognostička važnost osobito izražena u bolesnika s KBB [23].

U bolesnika na dijalizi AAC procijenjen na nativnim radiogramima opisan je i u okviru CORD studije, što dodatno podupire primjenjivost ove metode u KBB/ESRD populaciji [29]. U praktičnom smislu, kombinacija AAC-a kao pokazatelja strukturnog opterećenja kalcifikacijom i PWV-a kao funkcionalnog pokazatelja arterijske krutosti omogućuje cjelovitiju procjenu vaskularnog fenotipa [15,23,24]. Takav je pristup osobito relevantan u KBB-u, gdje se medijalna kalcifikacija i arterijska krutost često razvijaju paralelno, međusobno pojačavaju hemodinamske posljedice i zajedno nose prognostičku težinu [5,17,21].

1.2.8. Poseban entitet: kalcifilaksija (kalcificirajuća uremijska arteriolopatija)

Poseban, rijedak, ali izrazito morbiditetan oblik kalcifikacije u uznapredovaloj kroničnoj bubrežnoj bolesti jest kalcificirajuća uremijska arteriolopatija, odnosno kalcifilaksija [61,62]. Riječ je o teškoj vaskulopatiji malih i srednjih arteriola obilježenoj medijalnom kalcifikacijom, intimalnom proliferacijom, trombozom i posljedičnom ishemijskom nekrozom kože i potkožnog tkiva [61,63]. Klinički se najčešće očituje izrazito bolnim kožnim lezijama i nekrozama, a povezana je s vrlo visokom smrtnošću. Iako kalcifilaksija predstavlja ekstremni fenotip vaskularne kalcifikacije, njezina je važnost u tome što ilustrira do koje mjere poremećaji mineralnog metabolizma, vaskularne homeostaze i uremijskog okruženja u KBB-u mogu dovesti do dramatičnih, životno ugrožavajućih manifestacija vaskularne patologije [62]. U tom smislu kalcifilaksija nadilazi značenje rijetke komplikacije te predstavlja snažan klinički dokaz

da su kalcifikacija i tromboinflatorno vaskularno oštećenje u KBB-u dio istog patobiološkog kontinuuma [61,63]. Razumijevanje razlika između intimalne i medijalne kalcifikacije te između mjera arterijske krutosti i kalcifikacijskog tereta stoga predstavlja važan temelj za razmatranje mehanizama koji povezuju uremijsko okruženje, KBB–MKP i regulatore kalcifikacije, uključujući vitamin K–ovisne proteine [17,21,61].

1.3. Patogeneza vaskularne kalcifikacije u KBB: uremijsko okruženje, fenotipska transformacija VSMC i sustavni regulatori

Fenotipske razlike između intimalne i medijalne kalcifikacije, kao i njihove različite funkcionalne i kliničke implikacije, jasno upućuju na to da vaskularna kalcifikacija u KBB-u predstavlja složen, višerazinski i aktivno reguliran proces [17,21]. U suvremenom shvaćanju, vaskularna kalcifikacija u KBB nije pasivno taloženje kalcij–fosfatnih soli, nego dinamično preoblikovanje vaskularne stijenke pod utjecajem uremijskog i metaboličkog okruženja. Središnje mjesto u tom procesu zauzimaju VSMC koje, pod utjecajem tih čimbenika, gube kontraktilni fenotip i postupno poprimaju osteohondrogeni program, uz remodeliranje izvanstaničnog matriksa, pojavu prokalcifikacijskih vezikula i promjene u ravnoteži inhibitora i promotora mineralizacije [17,51].

1.3.1. Uremijsko okruženje i KBB–MKP kao “okidači” prokalcifikacijskog preusmjerenja

U kroničnoj bubrežnoj bolesti razvija se složen sklop poremećaja poznat kao kronična bubrežna bolest–mineralno–koštani poremećaj (KBB–MKP), obilježen retencijom fosfata, promjenama koncentracije kalcija, sekundarnim hiperparatireoidizmom, poremećajem metabolizma vitamina D te promjenama u osi FGF-23/Klotho [9,17]. Zajednički učinak tih poremećaja stvara trajni prokalcifikacijski pritisak na vaskularni sustav i remeti fiziološku ravnotežu između promotora i inhibitora mineralizacije [5,17]. U takvom uremijskom i metaboličkom okruženju vaskularna stijenka ne djeluje kao pasivna meta oštećenja, nego kao aktivno tkivo koje odgovara na mineralni stres, upalu i hormonske promjene fenotipskim i strukturnim preoblikovanjem [17,51].

Važno je naglasiti da se u KBB-u vaskularna kalcifikacija često razvija u mediji, gdje dominiraju rigidnost i gubitak elastičnosti arterijske stijenke, dok je intimalna komponenta češće povezana s aterosklerotskom upalom, lipidnim opterećenjem i razvojem plaka. Iako se intimalna i medijalna kalcifikacija u praksi često preklapaju, upravo je medijalni obrazac osobito karakterističan za KBB i ESRD, što dodatno upućuje na važnost KBB–MKP osi i uremijskog okruženja u nastanku prokalcifikacijskog vaskularnog fenotipa [17,18,21]. U tom se smislu KBB–MKP ne može promatrati samo kao poremećaj laboratorijskih parametara i koštanog metabolizma, nego kao središnji patofiziološki okvir koji povezuje bubrežnu disfunkciju s vaskularnom kalcifikacijom i njezinim hemodinamskim i kliničkim posljedicama [5,9,64].

1.3.2. Fosfat kao ključni signal: ulazak u stanicu i osteogeni poticaj

Fosfat u KBB ne predstavlja samo laboratorijski biljeg poremećenog mineralnog metabolizma, nego i izravni biološki signal koji u VSMC potiče promjenu fenotipa prema osteo/hondrogenom profilu [17,65,66]. Klasični *in vitro* modeli pokazali su da povišene koncentracije fosfata mogu inducirati mineralizaciju VSMC te izazvati promjene u ekspresiji gena obilježene supresijom kontraktilnih markera i aktivacijom osteogenih čimbenika [51,65]. Time se VSMC postupno udaljuju od svojeg fiziološkog kontraktilnog fenotipa i ulaze u program sličan onome koji se viđa u koštanom i hrskavičnom tkivu [17,51].

Ključan korak u tom procesu jest stanični unos fosfata putem natrij-ovisnog fosfatnog kotransportera tipa III, osobito PiT-1 [67]. Pokazano je da inhibicija ili smanjenje ekspresije PiT-1 može ublažiti ili blokirati fosfatom induciranu kalcifikaciju i fenotipsku modulaciju VSMC, što upućuje na to da je intracelularni unos fosfata nužan za pokretanje osteogenog odgovora. U tom smislu fosfat ne djeluje samo kao pasivni supstrat za precipitaciju minerala, nego kao aktivni signalni okidač koji mijenja stanično ponašanje i program ekspresije gena [65,67].

Nadalje, u uremijskom okruženju osteogeni program dodatno pojačavaju upalni medijatori, oksidativni stres i promjene u izvanstaničnom matriksu, uključujući elastolizu i gubitak zaštitnih svojstava vaskularne stijenke [12,17,51]. Zbog toga se VSMC u KBB-u ne ponašaju kao pasivni “prijemnici” fosfata, nego kao dinamičan

efektorni sustav u kojem se zbrajaju metabolički, upalni i strukturni signali [17,51]. Takva integracija podražaja dodatno objašnjava zašto je fosfatom inducirana kalcifikacija u KBB-u osobito izražena te zašto je prijelaz VSMC prema osteogenom fenotipu jedan od središnjih događaja u patogenezi vaskularne kalcifikacije [5,17,51].

1.3.3. Izvanstanične vezikule i nukleacija minerala: “mikro-žarišta” kalcifikacije

Jedan od koncepata koji je posebno važan za suvremeno razumijevanje patogeneze vaskularne kalcifikacije jest da se inicijalna mineralizacija često odvija na razini izvanstaničnih vezikula (EV), uključujući egzosome i matriks-vezikule, koje djeluju kao platforme za nukleaciju i rast kristala [68]. Te vezikule ne predstavljaju samo pasivne ostatke stanične aktivnosti, nego aktivne mikrodomene u kojima se koncentriraju komponente pogodne za inicijaciju mineralne depozicije [68,69]. Kapustin i suradnici pokazali su da je kalcifikacija VSMC posredovana reguliranom sekrecijom egzosoma te da stres kalcijem i fosfatom, uz gubitak kontraktilnog fenotipa, potiče oslobađanje vezikula koje olakšavaju lokalnu mineralizaciju [68].

Ovaj je mehanizam osobito važan jer povezuje stanični fenotip VSMC, sastav i biološka svojstva EV-a te lokalni nastanak kalcifikacijskih žarišta [12,68]. U prokalcifikacijskom okruženju vezikule mogu biti osiromašene inhibitorima mineralizacije i istodobno obogaćene komponentama koje pogoduju nukleaciji kristala, čime postaju svojevrsna “mikro-žarišta” vaskularne kalcifikacije [30,68]. Suvremeni pregledi dodatno naglašavaju da je oslobađanje matriks-vezikula i drugih oblika EV-a sastavni dio osteogenog preusmjerenja VSMC te da taj proces u KBB-u pojačavaju fosfatni stres, upala i oksidativni podražaji [12,30].

U tom smislu EV predstavljaju važnu vezu između staničnih promjena i nastanka vidljive mineralizacije u stijenci krvne žile [12,68,70]. Njihova klinička relevantnost proizlazi iz činjenice da omogućuju bolje razumijevanje kako se molekularni i stanični signali prevode u lokalnu depoziciju minerala, a u KBB-u i iz mogućnosti da posluže kao biološki pokazatelji aktivne faze kalcifikacije ili čak kao potencijalna terapijska meta [30,71].

1.3.4. Kalcijproteinske čestice i T50: integrativna mjera kalcifikacijske sklonosti seruma

Budući da su serum i intersticijski prostor u fiziološkim uvjetima blizu hipersaturacije kalcijem i fosfatom, organizam održava mineralnu homeostazu zahvaljujući tzv. mineralnom puferu, odnosno sustavu inhibitora koji vežu i stabiliziraju mineral u manje štetnim oblicima [31,34]. U tom su kontekstu kalcijproteinske čestice (CPP) važan koncept mineralne homeostaze, jer predstavljaju kompleksne nanočestice sastavljene od kalcij-fosfatnog minerala i proteina, ponajprije fetuina-A [31,33]. Prijelaz iz primarnih u zrelije, sekundarne CPP može se kvantificirati testom T50, koji odražava ukupnu intrinzičnu sposobnost seruma da odgađa precipitaciju kalcij-fosfatnih soli i stabilizira mineralni stres [33,34].

U populaciji s kroničnom bubrežnom bolesti CPP i T50 sve se češće promatraju kao funkcionalni biomarkeri vaskularnog rizika. Pregledni radovi naglašavaju da CPP i T50 odražavaju ravnotežu između promotora i inhibitora mineralizacije, uključujući fosfat, kalcij, magnezij, bikarbonat, fetuin-A i druge upalne odnosno signalne komponente te na taj način povezuju "biokemiju" s vaskularnim fenotipom [31,33]. Niži T50, koji odražava bržu transformaciju prema sekundarnim CPP i veću sklonost kalcifikaciji, povezan je s nepovoljnijim ishodima u različitim KBB populacijama. Prospektivno je pokazano da niži T50 predviđa lošije ishode u predijaliznoj KBB, a slične povezanosti opisane su i u primatelja bubrežnog presatka [31,72,73].

Dodatno, noviji podaci upućuju na to da CPP u uremijskom okruženju nisu samo pasivni biljezi, nego i aktivni efektori vaskularnog oštećenja [31,42]. Eksperimentalni i translacijski radovi pokazuju da CPP i EV mogu ulaziti u VSMC, poticati osteohondrogenu diferencijaciju, pojačavati upalni odgovor i sudjelovati u stvaranju prokalcifikacijskog okruženja [42]. Time CPP/T50 koncept postaje posebno važan jer omogućuje povezivanje systemske mineralne homeostaze, staničnih mehanizama kalcifikacije i klinički mjerljivog vaskularnog fenotipa u KBB-u [31,33,42].

1.3.5. Gubitak inhibitora kalcifikacije i slabljenje zaštite: uloga Matrix GLA proteina (MGP) i širih inhibitornih sustava

Vaskularna mineralizacija ne ovisi samo o prisutnosti promotora kalcifikacije, nego i o integritetu zaštitnih mehanizama koji u fiziološkim uvjetima aktivno koče

ektopičnu depoziciju minerala [35,74]. U tom finom balansu inhibitora i promotora kalcifikacije Matrix GLA Protein (MGP) zauzima posebno važno mjesto kao jedan od najpotentnijih lokalnih inhibitora vaskularne kalcifikacije [35,75]. Njegova biološka aktivnost uvjetovana je vitamin K–ovisnom γ -karboksilacijom pa MGP svoju zaštitnu funkciju može učinkovito ostvarivati samo kada je posttranslacijski aktiviran [35,37]. U tom smislu vitamin K–ovisna aktivacija MGP-a predstavlja svojevrsni regulacijski mehanizam koji određuje hoće li lokalni inhibitorni sustav biti funkcionalan ili će vaskularna stijenka postati podložnija ektopičnoj mineralizaciji [37].

U KBB ovaj je zaštitni sustav osobito ranjiv [36,39]. Uremijsko okruženje, dijetalne restrikcije, poremećena apsorpcija, polifarmacija i druge metaboličke okolnosti pridonose čestoj funkcionalnoj insuficijenciji vitamina K, zbog čega raste udio neaktivnih, nekarboksiliranih oblika vitamina K–ovisnih proteina [36,38,39]. Važnost očuvanog vitamin K–ovisnog zaštitnog sustava dodatno se očituje u opažanjima da je primjena antagonista vitamina K povezana s većim opsegom vaskularne i valvularne kalcifikacije [76]. Posljedično dolazi do slabljenja zaštite protiv medijalne kalcifikacije, što se sve više prepoznaje kao jedan od važnih mehanizama progresije vaskularnog oštećenja u KBB-u [39,77]. Takvo tumačenje dodatno podupire činjenica da su niski vitamin K status i povišene razine neaktivnog MGP-a povezani s ubrzanom vaskularnom kalcifikacijom i nepovoljnijim vaskularnim fenotipom u različitim KBB kohortama [36,78,79].

Iako je MGP najčešće navođen kao prototip vitamin K–ovisnog inhibitora kalcifikacije, on se ne može promatrati izolirano [35,78]. Vaskularna homeostaza ovisi o širem inhibitornom sustavu koji uključuje i druge lokalne i sistemske zaštitne čimbenike od mineralizacije, poput fetuina-A, pirofosfata (PPi) i srodnih regulatornih mehanizama [80,81]. Ipak, MGP ostaje osobito važan, jer elegantno povezuje nutritivni čimbenik, posttranslacijsku aktivaciju proteina i stvarni vaskularni fenotip [37,78]. Upravo zato vitamin K–ovisni mehanizmi, a potom i drugi srodni regulatori poput GRP-a, predstavljaju logičan nastavak razmatranja molekularne “obrane” od vaskularne kalcifikacije u KBB-u [35,41].

1.3.6. Uremijski toksini, upala i oksidativni stres: pojačavanje osteogenog odgovora

Uz KBB–MKP, uremijsko okruženje obilježavaju i brojni netradicionalni čimbenici koji dodatno pojačavaju sklonost vaskularne stijenke kalcifikaciji [5]. Među njima se osobito ističu uremijski toksini, kronična upala, endotelna disfunkcija i oksidativni stres, koji zajedno stvaraju biološko okruženje pogodno za osteogeno preusmjeravanje VSMC [12,82]. Uremijski toksini, osobito protein-vezane molekule poput indoksil-sulfata i p-krezil-sulfata, ne djeluju samo kao pasivni markeri retencije, nego kao aktivni medijatori vaskularnog oštećenja [5,82]. Pokazano je da mogu poticati medijalnu kalcifikaciju putem međudjelovanja upalnih, koagulacijskih i lipidnih putova, ali i kroz epigenetske mehanizme koji moduliraju odgovor vaskularne stijenke na mineralni stres [82].

Kao primjer specifičnog signalnog puta, indoksil-sulfat može ubrzati kalcifikaciju VSMC preko miR-29b ovisne aktivacije Wnt/ β -katenin signalizacije, čime se dodatno pojačava osteohondrogeni program [83]. Međutim, djelovanje uremijskih toksina ne treba promatrati izolirano. U KBB-u upala i oksidativni stres djeluju sinergistički s fosfatnim i kalcijским opterećenjem, čine vaskularnu stijenku osjetljivijom za prokalcifikacijske signale i ubrzavaju prijelaz VSMC u fenotip sklon mineralizaciji [12,82]. U tom smislu uremijski toksini, upala i oksidativni stres djeluju kao pojačivači već postojećeg KBB–MKP pritiska, čime se vaskularna kalcifikacija pokazuje ne samo kao metabolički, nego i upalno i signalno posredovan proces [5,12,82]. Takvo poimanje važno je, jer dodatno objašnjava zašto je vaskularna kalcifikacija u KBB-u često agresivnija i brže progresivna nego u populacijama bez uremijskog okruženja [5,12].

1.3.7. Pirofosfat (PPI) kao endogeni inhibitor: važna, često zanemarena os

Posebno zanimljiv inhibitorni sustav u vaskularnoj kalcifikaciji povezan s KBB-om predstavlja ekstracelularni PPI, snažan fiziološki inhibitor taloženja kalcij-fosfatnih soli [84]. Na konceptualnoj razini PPI se smatra jednim od ključnih “čuvara” protiv ektopične mineralizacije, jer vaskularni matriks i ionsko okruženje već u fiziološkim uvjetima pogoduju nastanku kalcifikacijskih depozita [81]. Stoga održavanje odgovarajuće razine PPI ima važnu zaštitnu ulogu u sprječavanju spontane nukleacije

i rasta kristala u stijenci krvne žile [81,84]. U KBB bilježe se niže razine PPI i pojačana aktivnost enzima uključenih u njegovu razgradnju, osobito tkivno nespecifične alkalne fosfataze (TNAP), što može olakšati progresiju vaskularne kalcifikacije [84].

Važnost PPI osi proizlazi i iz činjenice da taj inhibitor ne djeluje izolirano, nego je dio šire mreže regulatora mineralizacije koji održavaju ravnotežu između mineralnog stresa i zaštitnih mehanizama vaskularne stijenke. Kada je ta ravnoteža narušena, kao u KBB-u, smanjenje PPI dodatno pomiče sustav prema prokalcifikacijskom stanju [81,84]. Klinički, u ESRD i KBB kohortama opisana je negativna povezanost plazmatskog PPI i vaskularne kalcifikacije, uz nalaze da razine PPI nisu bitno određene samim modalitetom dijalize, nego prije ukupnim poremećajem PPI metabolizma u uremijskom okruženju. To dodatno podupire tumačenje da je PPI važan endogeni inhibitor čiji gubitak pridonosi “propadanju zaštite” od vaskularne mineralizacije u KBB-u [81,85].

1.3.8. Poveznica prema GRP-u: mjesto vitamin K–ovisnih proteina u modernim modelima vaskularne kalcifikacije

Unutar ovako složene patofiziološke mreže, vitamin K–ovisni proteini predstavljaju logičnu točku spajanja metaboličke, odnosno mineralne, i upalne komponente vaskularne kalcifikacije [35,78]. Njihova je važnost osobito izražena u KBB, gdje se mineralni stres, funkcionalna insuficijencija vitamina K i uremijsko okruženje međusobno preklapaju te stvaraju uvjete u kojima zaštitni mehanizmi protiv ektopične mineralizacije mogu biti kompromitirani [36,78]. U tom kontekstu GLA-bogati protein (GRP) osobito je zanimljiv jer, uz potencijalnu antikalcifikacijsku ulogu, sudjeluje i u procesima koji povezuju mineralizaciju, upalu i izvanstanične nanostrukture [41,47].

Posebna vrijednost GRP-a proizlazi iz činjenice da se pojavljuje i u kontekstu CPPa i EV-a, odnosno u strukturama koje u uremijskom okruženju mogu postati prokalcifikacijske i proinflamatorne [42]. Eksperimentalni i translacijski podaci upućuju na to da γ -karboksilirani GRP može imati inhibitorni učinak na procese indukcije kalcifikacije i upale, dok promjene u njegovu statusu ili raspodjeli unutar CPP/EV sustava mogu odražavati pomak od zaštitnog prema štetnom mineralnom fenotipu [41,42]. Time GRP ne djeluje samo kao potencijalni biljeg nego i kao molekularni

modulator na sjecištu mineralnog stresa, stanične signalizacije i vaskularnog fenotipa [41,46].

Upravo takav položaj GRP-a u suvremenim modelima vaskularne kalcifikacije opravdava njegovu detaljniju razradu u nastavku uvoda, osobito s obzirom na mehanizme djelovanja, karboksilacijski status, biomarkerni potencijal i povezanost s klinički mjerljivim vaskularnim fenotipom u bolesnika s KBB-om [42,46,47].

1.4. KBB–MKP i mineralni stres: CPP, fetuin-A i sklonost kalcifikaciji

1.4.1. Mineralni stres u KBB-u: fosfat, kalcij i uremijsko okruženje kao čimbenici prokalcifikacijskog okoliša

U KBB progresivno se narušava fina ravnoteža između unosa, eliminacije i hormonalne regulacije minerala, što rezultira stanjem trajno povišenog “mineralnog stresa” [9,86]. Retencija fosfata, promjene u koncentraciji kalcija, sekundarni hiperparatireoidizam te poremećaji u osi vitamina D i FGF-23/Klotho zajedno stvaraju biološko okruženje koje pogoduje nukleaciji i rastu kalcij–fosfatnih kompleksa, osobito u uznapredovalim stadijima KBB-a i tijekom dijalize [17,87,88].

U kontekstu poremećene endokrine regulacije u KBB-u važno je kratko razlikovati α -Klotho od β -Klotho (KLb), budući da se ova dva proteina često pogrešno promatraju unutar iste signalne osi. Dok je α -Klotho kanonski koreceptor za FGF-23 i ima središnju ulogu u regulaciji fosfatne homeostaze, β -Klotho primarno sudjeluje u signalizaciji FGF-19 i FGF-21 te je više povezan s metaboličkom i endokrinom prilagodbom nego s klasičnom FGF-23/ α -Klotho osi [87,89]. U tom smislu, uključivanje KLb u ovo istraživanje nije zamišljeno kao izravna procjena kanonske FGF-23 signalizacije, nego kao prošireni biokemijski pokazatelj KBB–MKP i poremećenog metaboličkog okoliša [89,90]. Takav pristup može biti osobito koristan u istraživanjima koja nastoje povezati vaskularni fenotip s cirkulirajućim biomarkerima, jer omogućuje širi uvid u endokrino-metaboličke prilagodbe koje prate progresiju kronične bubrežne bolesti [90]. Istodobno, pri interpretaciji povezanosti KLb s drugim biomarkerima, osobito s GRP-om i FGF-23, potreban je oprez, jer takvi odnosi ne moraju odražavati izravnu ligand–koreceptor povezanost, nego prije zajedničku pripadnost istom poremećenom biokemijskom okruženju uznapredovale KBB [89,90]. U takvom

okruženju vaskularni sustav nije izložen samo kroničnom metaboličkom opterećenju, nego i trajnom prokalcifikacijskom pritisku koji remeti ravnotežu između promotora i inhibitora mineralizacije [5,17].

Važno je pritom naglasiti da je krv, odnosno plazma, fiziološki metastabilan sustav u odnosu na kalcij i fosfat; i u zdravih osoba ionsko je okruženje dovoljno blizu zasićenja da bi bez zaštitnih mehanizama bilo sklono precipitaciji minerala. Zato se homeostaza oslanja na inhibitorne i “pufer” sustave koji mineral privremeno vežu, stabiliziraju i usmjeravaju prema manje štetnim oblicima. Jedan od ključnih sistemskih elemenata te obrane je fetuin-A, plazmatski protein koji veže mineralne nanokomplekse i sudjeluje u formiranju CPP-a, čime modulira njihov daljnji biološki učinak i smanjuje sklonost ektopičnoj mineralizaciji [31,80].

U KBB-u se upravo taj sustav mineralnog pufera nalazi pod trajnim opterećenjem [30,31]. Što je veći mineralni stres, to je veća potreba za proteinskim i koloidnim sustavima koji održavaju topljivost minerala i sprječavaju spontanu nukleaciju kristala u mekim tkivima [31,80]. Kada se kapacitet te zaštite iscrpi ili pomakne prema stvaranju biološki aktivnijih oblika mineralnih kompleksa, otvara se prostor za prijelaz od kompenzirane mineralne homeostaze prema prokalcifikacijskom vaskularnom fenotipu [30,31,91]. U tom smislu mineralni stres u KBB-u predstavlja temeljni patofiziološki okvir za razumijevanje CPP/fetuin-A osi i koncepta serumske “sklonosti kalcifikaciji” koji će biti razmotren u nastavku [31,80].

1.4.2. Fetuin-A i CPP: vezanje minerala i zaštita od precipitacije

Fetuin-A djeluje kao središnji “mineralni šaperon” u cirkulaciji: veže inicijalne kalcij–fosfatne nanoklastere i stabilizira ih u koloidnom obliku, čime smanjuje vjerojatnost nekontrolirane precipitacije i taloženja minerala u mekim tkivima, uključujući vaskularnu stijenku [80,92]. U suvremenim modelima mineralne homeostaze ti se fetuin-A–mineral kompleksi organiziraju u CPP, koje predstavljaju funkcionalnu sastavnicu mineralnog pufera krvi [31,92].

CPP se najčešće opisuju kao dinamičan sustav sazrijevanja: primarne CPP, koje su češće amorfnog karaktera i biološki manje reaktivne, s vremenom mogu prelaziti u sekundarne CPP, kristalnije i potencijalno biološki “aktivnije” čestice s većim

proinflamatornim i prokalcifikacijskim potencijalom. U kroničnoj bubrežnoj bolesti taj je sustav trajno opterećen viškom fosfata i promjenama u sastavu plazme, uključujući upalu, oksidativni stres i promjene u koncentraciji magnezija i bikarbonata, pa raste udio čestica koje nose veći prokalcifikacijski potencijal [31,33].

Klinička relevantnost CPP okvira u KBB-u poduprta je nalazima da su fetuin-A-sadržavajuće, fosforilirane CPP povezane s “prokalcifikacijskim okruženjem” i povećanom aortnom krutošću u predijaliznoj KBB [93]. Ti podaci sugeriraju da CPP nisu samo laboratorijski koncept, nego mjerljiva poveznica između mineralnog stresa, serumske biokemije i vaskularnog fenotipa [33,93]. U tom smislu CPP i fetuin-A predstavljaju važan most između sistemske mineralne homeostaze i lokalnih vaskularnih posljedica KBB–MKP-a [31,80,93].

1.4.3. T50 kao funkcionalna mjera serumske sklonosti kalcifikaciji

Kako koncept CPP-a u praksi odražava ravnotežu promotora i inhibitora mineralizacije, razvijen je funkcionalni pristup procjeni serumske “sklonosti kalcifikaciji” [33]. U tom okviru, test serumske kalcifikacijske sklonosti (T50) kvantificira vrijeme transformacije primarnih, manje zrelih CPP u zrelije, sekundarne čestice te na taj način predstavlja integrativnu mjeru intrinzične sposobnosti seruma da odgađa precipitaciju kalcij-fosfatnih soli i stabilizira mineralni pufer [31,34]. Za razliku od pojedinačnih laboratorijskih parametara, T50 u jednoj funkcionalnoj mjeri objedinjuje učinke fosfata, kalcija, magnezija, bikarbonata, fetuina-A i drugih čimbenika koji određuju serumski odgovor na mineralni stres [33,34].

U kliničkim studijama niži T50, odnosno kraće vrijeme transformacije prema sekundarnim CPP, povezan je s nepovoljnijim ishodima u različitim populacijama bolesnika s KBB [33,94]. Prospektivno je pokazano da niži T50 predviđa lošije ishode u predijaliznoj KBB, a slične povezanosti opisane su i u transplantiranih bolesnika [72,73,94]. U kohortama bolesnika na hemodijalizi (HD) T50 je također identificiran kao neovisni prediktor ukupnog mortaliteta, iako dodatna prognostička vrijednost, uz postojeće modele rizika može varirati među studijama [95].

Važno je istaknuti i terapijsku perspektivu. Iako je T50 u načelu “modificirajuća” mjera, jer ovisi o biokemijskom sastavu seruma i raspoloživosti inhibitora

mineralizacije, učinci pojedinih intervencija nisu uniformni [33,96]. Primjerice, u randomiziranom ispitivanju u bolesnika s KBB stadija IIIb/IV sevelamer karbonat tijekom 12 tjedana nije značajno promijenio T50 u odnosu na placebo, što sugerira da sama manipulacija fosfatnim opterećenjem u ranijim stadijima bolesti možda nije dovoljna za mjerljivu promjenu serumske kalcifikacijske otpornosti ili da su za to potrebne dulje i kompleksnije intervencije [96]. U tom smislu T50 nije samo biljeg postojećeg mineralnog stresa, nego i potencijalni funkcionalni alat za procjenu koliko je sustav mineralnog pufera uopće podložan terapijskoj modulaciji [34,96].

1.4.4. Slabljenje obrane od mineralnog stresa u KBB-u i njegove posljedice

U KBB dolazi do višestrukog “pucanja” zaštitnih slojeva koji u fiziološkim uvjetima održavaju mineralnu homeostazu i sprečavaju ektopičnu kalcifikaciju [31,80]. S jedne strane raste mineralno opterećenje, obilježeno retencijom fosfata, poremećenom Ca/P dinamikom i signalnim promjenama unutar KBB–MKP osi [9,17]. S druge strane, kronična upala, malnutricija–inflamacija fenotip i uremijsko okruženje mogu smanjiti dostupnost i funkcionalnu učinkovitost sistemskih inhibitora mineralizacije, uključujući fetuin-A, koji se ponaša i kao negativni protein akutne faze [97,98]. U dijaliznih bolesnika niže koncentracije fetuin-A povezane su s višom kardiovaskularnom smrtnošću, što snažno podcrtava kliničku važnost ove “obrambene osi” [97].

Nadalje, sustav CPP-a nije samo pasivni “spremnik” za višak minerala [31,99]. CPP se moraju učinkovito uklanjati iz cirkulacije, a eksperimentalno je pokazano da se klirens fetuin-A–CPP odvija preko fagocitnih mehanizama, uključujući scavenger receptor-A (SR-A) [100]. To je patofiziološki važno jer zasićenje ili poremećaj klirensa može povećati cirkulirajući mineralni stres i potencijalno omogućiti veću interakciju CPP-a sa staničnim komponentama vaskularnog zida [31,100].

U tom smislu CPP se mogu promatrati i kao veza između metaboličke i imunološke komponente uremijskog okruženja [31,101]. U eksperimentalnim sustavima pokazano je da fetuin-A–sadržavajuće CPP mogu ublažavati mineralni stres u makrofagima, što dodatno podupire ideju da su kvaliteta i stupanj maturacije CPP-a, kao i dinamička ravnoteža njihova stvaranja i klirensa, ključni za to hoće li prevladati zaštitni ili štetni učinak [101]. Kada se ravnoteža tog sustava pomakne

prema većem udjelu zrelijih sekundarnih CPP i nižim vrijednostima T50, sistemski mineralni pufer djelomično gubi svoju zaštitnu funkciju, a rezultat se postupno prevodi u mjerljiv vaskularni fenotip, uključujući povećanu arterijsku krutost i veći kalcifikacijski teret [31,33,93].

Zaključno, KBB–MKP i uremijsko okruženje u KBB-u stvaraju stanje kronične prokalcifikacijske napetosti u kojem se sistemski mineralni pufer može iscrpiti ili usmjeriti u patološkom smjeru [31,80]. Upravo to slabljenje obrane pomaže objasniti zašto u KBB-u serumski i stanični mehanizmi zaštite od mineralizacije više ne uspijevaju oduprijeti trajnom mineralnom stresu te zašto se taj disbalans na kraju očituje kao vaskularna kalcifikacija i arterijska krutost [5,31].

1.5. Vitamin K–ovisni inhibitori vaskularne kalcifikacije (MGP kao prototip)

1.5.1. Vitamin K–ovisni proteini i važnost γ -karboksilacije za funkcionalnost inhibitora kalcifikacije

U vaskularnoj stijenci postoji niz endogenih zaštitnih mehanizama čija je osnovna uloga spriječiti ektopičnu mineralizaciju u uvjetima kroničnog mineralnog stresa [35]. Posebno važnu skupinu čine vitamin K–ovisni proteini, čija biološka aktivnost ovisi o posttranslacijskoj modifikaciji, odnosno γ -karboksilaciji glutamatnih (GLU) ostataka u γ -karboksi-glutamat (GLA) [35,37]. Tek karboksilirani GLA-ostaci omogućuju visokoafinitetno vezanje kalcija i interakciju s mineralnim fazama, poput hidroksiapatita, čime vitamin K–ovisni proteini stječu svoj puni anti-kalcifikacijski kapacitet u tkivima koja nisu predviđena za mineralizaciju [37,74,102]. U tom smislu vitamin K ne djeluje samo kao nutritivni čimbenik, nego kao funkcionalni kofaktor koji određuje hoće li lokalni inhibitori kalcifikacije uopće biti biološki aktivni [37].

Koncept funkcionalne insuficijencije vitamina K osobito je relevantan u KBB, jer se u toj populaciji istodobno pojačava prokalcifikacijski poticaj, uključujući fosfatno i kalcijско opterećenje, uremijsko okruženje i kroničnu upalu, dok se “kočnice” mineralizacije mogu naći u stanju relativne neaktivnosti [36,39]. Upravo zato se MGP često navodi kao paradigmatican primjer inhibitora “kojem treba vitamin K”: bez adekvatne karboksilacije MGP gubi dio svoje zaštitne funkcije i ostaje prisutan pretežno u biološki neaktivnim oblicima [35,37,103]. U KBB-u je suboptimalan status

vitamina K čest i višefaktorski uvjetovan. Dijetalne restrikcije, promijenjena crijevna apsorpcija, polifarmacija te kronična upala i uremijsko okruženje mogu dovesti do stanja u kojem je dostupnost vitamina K u perifernim tkivima nedostatna u odnosu na potrebe, osobito u uvjetima povećanog mineralnog stresa [36,38,39].

Važno je pritom naglasiti da se ne radi nužno o apsolutnom deficitu vitamina K, nego o funkcionalnoj insuficijenciji koja rezultira većim udjelom nekarboksiliranih, dakle biološki neaktivnijih frakcija vitamin K–ovisnih proteina [36,37]. Takvo stanje nadovezuje nutritivno-metaboličku komponentu na već postojeće KBB–MKP okidače i dodatno pomiče ravnotežu prema ektopičnoj mineralizaciji i vaskularnom remodeliranju [17,39]. Time vitamin K–ovisna os postaje osobito konceptualno privlačna, jer povezuje potencijalno modificirajući čimbenik s vrlo konkretnim molekularnim preduvjetom funkcije inhibitora kalcifikacije [36,37]. Klinički i translacijski interes dodatno pojačava činjenica da se neaktivnost MGP-a može pratiti kroz cirkulirajuće frakcije, osobito de-fosforilirani, ne-karboksilirani MGP (dp-ucMGP), koji se često interpretira kao funkcionalni pokazatelj perifernog, odnosno ekstrahepatičkog, statusa vitamina K i posredno inaktivirane anti-kalcifikacijske obrane [104]. U KBB-u razine dp-ucMGP u pravilu rastu s padom procijenjene glomerularne filtracije (eGFR) te su povezane s većim kalcifikacijskim teretom, što podupire hipotezu da je poremećena vitamin K–ovisna aktivacija MGP-a relevantna za vaskularni fenotip u uremiji [79].

Dodatni, metodološki vrlo “čist” dokaz važnosti ove osi dolazi iz farmakološke antagonizacije vitamina K [105]. Inhibicija recikliranja vitamina K, primjerice vitamin K antagonistima poput varfarina, funkcionalno onemogućuje γ -karboksilaciju vitamin K–ovisnih proteina, uključujući MGP, i time može ukloniti važan dio lokalne zaštite od mineralizacije [37,105]. U eksperimentalnom modelu KBB-a, terapijske doze varfarina značajno su povećale podložnost vaskularnoj kalcifikaciji i pogoršale hemodinamske pokazatelje, dok je visok unos vitamina K₁ ublažio razvoj kalcifikacije [105,106]. U skladu s time, i u humanim longitudinalnim analizama varfarin je povezan s ubrzanjem progresije medijalne arterijske kalcifikacije, pri čemu je učinak osobito izražen u ESRD populaciji [107]. Iako je logično očekivati da bi nadoknada vitamina K mogla ponovno aktivirati dio vitamin K–ovisne zaštite, što bi se vidjelo kroz smanjenje dp-ucMGP, učinci na kalcifikacijski teret i kliničke ishode nisu uniformni među studijama

[36,78,108]. To vjerojatno odražava heterogenost KBB populacije, različite fenotipove kalcifikacije i složenost uremijskog okruženja [5,78].

1.5.2. MGP kao dokaz koncepta: ključni lokalni inhibitor i most prema GRP-u

MGP se smatra jednim od najvažnijih lokalnih inhibitora ektopične mineralizacije u stijenci krvnih žila te se s razlogom promatra kao prototip vitamina K–ovisnog anti-kalcifikacijskog sustava [35]. Njegova ključna fiziološka uloga najuvjerljivije je potvrđena u genetskim modelima, u kojima manjak MGP-a dovodi do spontane i fulminantne kalcifikacije arterija i hrskavice, uz teške strukturne i kliničke posljedice, što predstavlja jedan od najsnažnijih dokaza da je vaskularna kalcifikacija aktivno reguliran proces koji zahtijeva stalno endogeno kočenje [109].

Važnost MGP-a potvrđena je i u ljudi: mutacije gena MGP uzrokuju Keutelov sindrom, rijedak nasljedni poremećaj obilježen abnormalnom kalcifikacijom hrskavice i karakterističnim vaskularnim manifestacijama, čime se fiziološka relevantnost ovog proteina jasno proteže i izvan eksperimentalnih sustava [110].

Mehanistički, MGP se ne može promatrati samo kao pasivni mineral-vezujući protein [35]. Naprotiv, njegova je uloga znatno šira jer zahvaća i regulaciju proosteogenih signalnih putova u vaskularnoj stijenci. Pokazano je da MGP interferira sa signalizacijom koštanog morfogenetskog proteina 2 (*engl. bone morphogenetic protein 2*; BMP 2), što je osobito važno jer BMP-2 potiče osteohondrogenu diferencijaciju i transdiferencijski program sličan onome koji se opaža tijekom fenotipske transformacije VSMC u KBB [111]. Drugim riječima, MGP djeluje upravo na presjeku mineralne homeostaze i signalne biologije, odnosno na mjestu gdje se u uremijskom okruženju preklapaju fosfatni stres, upala i osteogeni odgovor vaskularne stijenke [112].

U kontekstu KBB-a i završnog stadija bubrežne bolesti, važnost MGP-a dodatno raste jer se medijalna kalcifikacija često razvija usporedno s porastom arterijske krutosti i nepovoljnim hemodinamskim posljedicama [113]. Pritom je biološka aktivnost MGP-a izravno uvjetovana njegovom γ -karboksilacijom, dok je u uremijskom okruženju učestalo prisutan povećan udio neaktivnih, nedovoljno karboksiliranih frakcija [114]. Stoga MGP nije tek još jedan inhibitor kalcifikacije, nego konceptualni

model koji pokazuje kako poremećaj jedne posttranslacijske modifikacije (vitamin K–ovisne karboksilacije) može metabolički i nutritivni disbalans prevesti u mjerljiv vaskularni fenotip [105].

Dodatnu težinu toj koncepciji daje činjenica da antagonizacija vitamina K, osobito tijekom liječenja varfarinom, može ubrzati kalcifikaciju medije, što je pokazano i u eksperimentalnim modelima, i u kliničkim opažanjima [75,105]. Time se potvrđuje da vitamin K–ovisna inhibitorna mreža nije tek popratna pojava, nego funkcionalno i biološki relevantan mehanizam kočenja ektopične mineralizacije.

Upravo zato je logičan sljedeći korak u razradi uvoda proširiti fokus s MGP-a na druge vitamina K–ovisne proteine koji bi mogli djelovati na sličnim čvorištima mineralnog stresa, signalizacije i upale [35,115]. U tom okviru GRP postaje osobito zanimljiv kandidat jer se, uz vitamin K–ovisnu karboksilaciju i prisutnost GLA-domena, sve češće razmatra i u kontekstu mineralnih nanostrukture, uključujući CPP i EV, kao i u kontekstu imunomodulacije [42,116]. Takvo pozicioniranje čini GRP potencijalnim medijatorom biološki aktivne faze vaskularne kalcifikacije te kandidatom za povezivanje molekularnih mehanizama mineralizacije s klinički relevantnim vaskularnim fenotipom u KBB-u [41].

Ipak, pri interpretaciji vitamin K–ovisne osi u kroničnoj bubrežnoj bolesti potrebno je zadržati određeni oprez [117]. Biomarkeri poput dp-ucMGP-a korisni su pokazatelji funkcionalnog statusa vitamina K, ali njihove koncentracije ne odražavaju isključivo stupanj vaskularne kalcifikacije, nego na njih mogu utjecati i bubrežna funkcija, upalni status, nutritivno stanje te istodobna terapija, zbog čega se povezanosti s vaskularnim promjenama i kliničkim ishodima među različitim kohortama ne moraju u potpunosti podudarati [79,118].

Nadalje, iako suplementacija vitaminom K u pravilu dovodi do očekivanih promjena biomarkera, osobito do smanjenja dp-ucMGP-a, njezini učinci na progresiju vaskularne kalcifikacije i na tvrde kliničke ishode zasad nisu dosljedno potvrđeni [117,119]. Takva nedosljednost vjerojatno odražava biološku i kliničku heterogenost samog procesa, uključujući razlike između intimalne i medijalne kalcifikacije, različite stadije bolesti, početni teret kalcifikacije te činjenicu da slikovne metode ponajprije bilježe kumulativni rezultat dugotrajnog procesa, a ne nužno njegovu biološki najaktivniju fazu [21].

Upravo zato ima smisla razmotriti i druge vitamin K–ovisne kandidate koji bi mogli bolje povezati mineralni stres, upalu i aktivnu fazu mineralizacije, s klinički mjerljivim vaskularnim fenotipom, što dodatno opravdava fokus na GRP-u u nastavku ovog uvoda [41,42].

1.6. GRP: biološke značajke i dokazi u vaskularnoj kalcifikaciji/KBB

1.6.1. Nomenklatura, struktura i vitamin K–ovisna γ -karboksilacija

GLA-bogati protein (GRP) pripada skupini vitamin K–ovisnih proteina te se u literaturi često navodi i pod nazivom UCMA (Upper zone of growth plate and cartilage matrix associated protein) [120]. GRP je inicijalno opisan kao novi vitamin K–ovisni protein identificiran u hrskavici, a njegova visoka očuvanost među kralježnjacima upućuje na važnu biološku funkciju. Ističe se posebno bogatom GLA domenom, što upućuje na funkcionalnu specijalizaciju za vezanje kalcija i interakciju s mineralnim fazama, odnosno za sudjelovanje u regulaciji procesa mineralizacije [44,50,121].

Kao i kod drugih vitamin K–ovisnih proteina, biološka aktivnost GRP-a ovisi o γ -karboksilaciji glutamatnih ostataka, odnosno o pretvorbi GLU u GLA, procesu koji zahtijeva vitamin K kao kofaktor [117,120]. U uvjetima mineralnog stresa, uključujući povišene koncentracije fosfata, poremećenu ravnotežu kalcija i fosfata te uremijsko okruženje, upravo je ova posttranslacijska modifikacija ključna, jer određuje hoće li GRP djelovati kao aktivni inhibitor ektopične mineralizacije ili će dominantno biti prisutan u funkcionalno slabije aktivnim oblicima [120].

U KBB to je osobito relevantno, jer se istodobno susreću snažan prokalcifikacijski poticaj, povezan s KBB–MKP-om, upalom i oksidativnim stresom te visoka prevalencija funkcionalne insuficijencije vitamina K [117]. Takvo biološko okruženje stvara uvjete u kojima zaštitna uloga vitamin K–ovisnih proteina može biti narušena, uključujući i potencijalno zaštitno djelovanje GRP-a [117,120].

Stoga se GRP već na razini osnovne biologije nameće kao kandidat koji povezuje mineralni stres, poremećaj vitamin K–ovisne karboksilacije i oslabljenu endogenu obranu od patološke kalcifikacije [120,121].

1.6.2. Tkivna distribucija i lokalizacija: od cirkulacije do mjesta patološke mineralizacije

Iako je GRP prvotno opisan u kontekstu hrskavičnog tkiva, važan iskorak u razumijevanju njegove vaskularne relevantnosti bio je nalaz da je prisutan i u serumu te da se akumulira na mjestima patološke kalcifikacije [44,122]. Takva distribucija ima jasnu patofiziološku logiku: u uvjetima nestabilnosti sustava kalcija i fosfata, proteini sposobni vezati kalcij i mineralne nanostrukture mogu se regrutirati na mjesta nukleacije i rasta kristala ili se ugrađivati u već formirane mineralne depozite [120,122]. U vaskularnom sustavu, a osobito u kroničnoj bubrežnoj bolesti, to znači da se GRP može promatrati kao dio šire mreže molekula koje ne samo da prate, nego potencijalno i moduliraju proces ektopične mineralizacije [41,42].

U tom se smislu GRP konceptualno nadovezuje na paradigmu MGP-a: oba proteina pripadaju skupini vitamin K–ovisnih proteina, oba su usko povezana s mineralno-regulatornom biologijom, a njihovo se djelovanje može promatrati kroz prizmu funkcionalne aktivacije γ -karboksilacijom u uvjetima kroničnog mineralnog stresa [35,117,120].

GRP ipak pokazuje i određene posebnosti [120]. Uz lokalnu prisutnost u kalcificiranim lezijama, sve se više naglašava njegova uloga u nanostrukturnim oblicima mineralnog pufera, osobito u CPP i EV, kao i njegova moguća povezanost s upalnim odgovorom [41,42]. Upravo ta kombinacija cirkulirajuće prisutnosti, lokalne akumulacije na mjestima patološke mineralizacije te povezanosti s mineralnim i upalnim signalima čini GRP osobito zanimljivim kandidatom u istraživanju vaskularne kalcifikacije u KBB-u [42,122].

1.6.3. Antikalcifikacijski učinci: mehanistički okvir (mineralna interakcija, VSMC fenotip, signalizacija)

Eksperimentalni i translacijski podaci podupiru koncept da GRP djeluje kao inhibitor kalcifikacije u kardiovaskularnom sustavu. U humanim kardiovaskularnim tkivima GRP je opisan kao protein povezan s kalcificiranim područjima, ali istodobno i kao funkcionalni inhibitor mineralizacije, što upućuje na to da njegova lokalna prisutnost ne odražava samo pasivnu kolokaciju s depozitima, nego i potencijalno zaštitnu ulogu u regulaciji kalcifikacijskog procesa [41]. Nadalje, iz biokemijske

perspektive, važno je da GRP može imati izravnu interakciju s bazičnim kalcij-fosfatnim kristalima, što podupire model prema kojem sudjeluje u modulaciji nukleacije, rasta i sazrijevanja mineralne faze [41,123].

Na razini VSMC, koje predstavljaju središnji efektorski stanični tip medijalne kalcifikacije u KBB-u, posebno je važan nalaz da GRP inhibira fosfatom induciranu kalcifikaciju VSMC-a putem signalizacije koštanih morfogenetskih proteina (*engl. bone morphogenetic proteins*, BMP) ovisne o signalnim proteinima SMAD (*engl. suppressor of mothers against decapentaplegic*, SMAD) [124]. Taj je mehanizam patofiziološki osobito relevantan jer BMP os i osteohondrogena reprogramacija VSMC-a čine jednu od ključnih završnih putanja kroz koje fosfatni i uremijski stres prelaze u stvarni kalcificirajući fenotip [124,125]. Time GRP dobiva dodatnu mehanističku težinu, budući da se ne svodi samo na biljeg prisutan u kalcificiranim depozitima, nego se uklapa u model aktivnog modulatora signalnih putova uključenih u osteogeni odgovor vaskularne stijenke [41,124].

Važno je naglasiti da se u KBB-u antikalcifikacijski učinci GRP-a vjerojatno ne mogu objasniti jednim dominantnim mehanizmom [123]. Umjesto toga, oni se vjerojatno ostvaruju unutar šire mreže inhibitora i promotora mineralizacije, u kojoj mineralni stres, gubitak vitamin K–ovisne zaštitne komponente, upala i uremijski toksini zajednički određuju hoće li VSMC prijeći u osteohondrogeni program i hoće li lokalni mikrokoliš pogodovati stabilnoj nukleaciji kristala [123,125]. U takvom mrežnom okviru GRP je osobito zanimljiv, jer potencijalno zahvaća više razina istodobno: mineralnu, kroz interakciju s kristalima i mineralnim česticama; staničnu, kroz modulaciju odgovora VSMC-a te sistemsku, kroz povezanost s CPP i EV [123,126].

1.6.4. GRP u CPP/EV i veza s mineralnim stresom: od pufera do efektor

Jedna od najvažnijih suvremenih poveznica između serumske biokemije i vaskularnog fenotipa u KBB jest koncept mineralnog pufera, u kojem fetuin-A i CPP privremeno stabiliziraju prezasićeni kalcij-fosfatni sustav, dok njihova destabilizacija odražava porast kalcifikacijskog stresa [33,127].

U tom su okviru osobito važne činjenice da CPP i EV izolirane iz cirkulacije bolesnika s uznapredovalom KBB mogu poticati vaskularnu kalcifikaciju te da je GRP konstitutivna sastavnica tih nanostruktura, što ga izravno povezuje s cirkulirajućim odgovorom na mineralni stres [42,44]. Takav nalaz ima više neposrednih implikacija: GRP se može nalaziti u „transportnim” i/ili „tampon” strukturama koje privremeno vezuju mineralni teret, ali istodobno, ovisno o sastavu i zrelosti tih čestica, može biti uključen i u prijelaz prema prokalcifikacijskom fenotipu [42,126].

U kontekstu KBB-a to je osobito važno jer se smanjena serumska sposobnost odgađanja sazrijevanja CPP-a, mjerena T50 testom, tumači kao povećana sklonost kalcifikaciji, odnosno poremećaj mineralnog pufera [33,127]. U takvom okruženju GRP bi mogao, ne samo odražavati, nego i djelomično sudjelovati u prijelazu iz relativno zaštitnog u štetniji mineralni fenotip, osobito ako se njegova raspodjela mijenja između slobodne serumske frakcije i CPP/EV-vezanog oblika [42,126]. Ako je pritom i karboksilacijski status GRP-a promjenjiv, ovisno o statusu vitamina K i uremijskim čimbenicima, tada nije svejedno mjeri li se ukupni GRP ili pojedine funkcionalne frakcije [120,126].

Upravo zato GRP postaje osobito zanimljiv kandidat za povezivanje serumske sklonosti kalcifikaciji s klinički mjerljivim vaskularnim fenotipom u KBB-u.

1.6.5. Klinički podaci u KBB-u i dijalizi: biomarkerni potencijal i povezanost s vaskularnim fenotipom

Klinički interes za GRP u KBB proizlazi iz pretpostavke da njegove cirkulirajuće razine, odnosno potencijalno i pojedine funkcionalne frakcije, mogu odražavati biološki aktivnu fazu vaskularne kalcifikacije ili iscrpljivanje zaštitnih mehanizama usmjerenih protiv patološke mineralizacije [46]. U pilot presječnoj studiji provedenoj u bolesnika sa šećernom bolešću tipa 2 i KBB-om, snižene serumske koncentracije GRP-a bile su povezane s težim stupnjem bubrežne disfunkcije, poremećajima mineralnog metabolizma i većim teretom vaskularne kalcifikacije, zbog čega je GRP predložen kao rani i novi biljeg vaskularnog oštećenja u toj populaciji [46]. Iako takav dizajn ne omogućuje zaključivanje o uzročnosti, važnost takvih nalaza leži u tome što pokazuju da GRP varira zajedno s klinički relevantnim fenotipovima u populaciji obilježenoj ubrzanom kalcifikacijom i visokim kardiovaskularnim rizikom [46].

Dodatnu kliničku relevantnost daju noviji podaci iz populacije bolesnika na peritonejskoj dijalizi, u kojoj je GRP bio povezan s vaskularnom kalcifikacijom, upalnim pokazateljima i biljezima mineralnog metabolizma [47]. Takvi rezultati dodatno podupiru koncept da GRP nije nužno samo „čisti” mineralni biljeg, već biljeg koji može odražavati presjek mineralne i upalne biologije u uznapredovaloj KBB [47,123]. To je osobito važno u dijaliznih bolesnika, kod kojih mineralni stres, kronična upala i poremećaji KBB–MKP osi često djeluju međusobno pojačavajuće i zajedno oblikuju vaskularni fenotip [123]. Upravo zato GRP ostaje zanimljiv kandidat za daljnju fenotipizaciju u KBB-u, ali uz oprez da se njegova interpretacija zasad temelji pretežno na presječnim i asocijacijskim podacima, a ne na longitudinalnoj potvrdi prediktivne vrijednosti [46,47].

1.6.6. Ograničenja dosadašnjih radova: frakcije, metodologija i konfuzori (vitamin K status, upala, stadij bolesti)

Unatoč rastućem interesu za GRP u kroničnoj bubrežnoj bolesti, interpretacija dosadašnjih nalaza ostaje opterećena značajnom metodološkom i biološkom heterogenošću [116].

Prvo, kao i kod drugih vitamin K–ovisnih proteina, funkcionalna relevantnost GRP-a vjerojatno ovisi o njegovu karboksilacijskom statusu pa rezultati različitih studija ne moraju biti izravno usporedivi ako se mjeri ukupni GRP (tGRP), pojedine frakcije ili GRP vezan uz CPP i EV [42,116].

Drugo, u KBB-u je status vitamina K često kompromitiran, a dodatnu složenost unose terapijski čimbenici, osobito lijekovi koji interferiraju s ciklusom vitamina K, zbog čega koncentracije i funkcionalna aktivnost vitamin K–ovisnih proteina mogu odražavati ne samo bolest, nego i terapijski ili ijtrogeni učinak [78,117].

Treće, uremijsko okruženje sam po sebi stvara velik broj potencijalnih konfuzora: upala, malnutricija, oksidativni stres i uremijski toksini mogu istodobno utjecati na razine cirkulirajućih proteina, mineralni pufer, serumsku sklonost kalcifikaciji i sam vaskularni fenotip [33,123]. Zbog toga se bez pažljive multivarijatne prilagodbe teško može razlučiti predstavlja li opažena povezanost GRP-a neovisni signal ili tek odraz šireg patobiološkog konteksta [46,47].

Konačno, velik dio dosadašnje literature temelji se na presječnim dizajnima, dok slikovne metode dominantno odražavaju kumulativni teret već nastale kalcifikacije [33,46]. Stoga je moguće da GRP bolje odražava aktivnu biologiju procesa, uključujući dinamiku CPP/EV sustava, nego kumulativni kalcifikacijski teret vidljiv na slikovnim mjerama vaskularne kalcifikacije [33,42].

Uzimajući sve navedeno u obzir, GRP je opravdano promatrati kao potencijalnog biljega i mogućeg modulatora vaskularne kalcifikacije u KBB-u, ali uz nužan metodološki oprez: potrebno je preciznije definirati koju frakciju GRP-a mjerimo, u kakvom je odnosu s vitamin K statusom i kako se povezuje s pokazateljima mineralnog stresa, poput CPP-a i T50 te s klinički relevantnim vaskularnim fenotipovima [33,42,116].

1.7. Fenotipizacija u ovom radu: logika odabira PWV-a, Kauppila AAC-a i ehokardiografske procjene aortnog zaliska i lijeve klijetke

1.7.1. Zašto je potrebna višerazinska fenotipizacija?

U KBB vaskularna kalcifikacija i arterijska krutost rijetko predstavljaju odvojene fenomene; mnogo češće one čine sastavnice šireg kardiovaskularnog fenotipa uremije, u kojem se strukturne promjene u stijenci žile preklapaju s funkcionalnim hemodinamskim posljedicama i posljedičnim oštećenjem ciljnih organa [21,59].

Kalcifikacija medije i druge forme vaskularne kalcifikacije u KBB-u povezane su s povećanjem arterijske krutosti, porastom tlaka pulsa i nepovoljnim promjenama pulsne valne refleksije, što povećava sistoličko opterećenje LV i pogoduje razvoju hipertrofije, dijastoličke disfunkcije i progresiji srčanog remodeliranja [128–130]. U istom patobiološkom okviru valvularna, osobito aortna, kalcifikacija ne predstavlja izolirani nalaz, nego dio kontinuuma KBB–MKP povezanog kardiovaskularnog oštećenja [13,129]. Upravo zato je u ovom radu opravdano primijeniti višerazinsku fenotipizaciju koja kombinira funkcionalne pokazatelje pulsne hemodinamike i arterijske krutosti, strukturnu procjenu kalcifikacijskog tereta te ehokardiografski prikaz posljedica na razini srca i zalistaka [9,15]. Takav pristup omogućuje da se potencijalni biološki signal, primjerice poremećaj inhibitora kalcifikacije ili marker mineralnog

stresa, ne promatra izolirano, nego u odnosu prema klinički mjerljivim i prognostički relevantnim manifestacijama vaskularnog i kardijalnog remodeliranja [13,21].

U tom je smislu uključivanje PWV-a, Kauppila AAC zbroja te ehokardiografske procjene aortnog zaliska (AV) i LV metodološki logično, jer obuhvaća tri međusobno povezana sloja istog procesa: vaskularnu funkciju, kumulativni kalcifikacijski teret i organsku posljedicu na srcu [130–132].

1.7.2. PWV kao funkcionalni “otisak” krutosti i medijalne mineralizacije

PWV predstavlja funkcionalni izraz kroničnog remodeliranja arterijske stijenke [130]. U KBB medijalna kalcifikacija, gubitak elastičnih svojstava i fibroelastično remodeliranje aorte i velikih arterija dovode do smanjenja arterijske popustljivosti, povećanja brzine pulsnog vala te porasta sistoličkog i pulsnog opterećenja LV [24,130]. Na taj način PWV ne odražava samo „tvrdoću” arterije u uskom mehaničkom smislu, nego i hemodinamsku posljedicu kumulativnog strukturnog oštećenja vaskularne stijenke.

PWV pritom zauzima posebno mjesto jer, iako je djelomično pod utjecajem trenutačnog arterijskog tlaka, integrira i stabilnije strukturne karakteristike arterijske stijenke pa zato nadilazi informaciju koju daju same konvencionalne vrijednosti krvnog tlaka [130]. U populaciji s KBB-om to je osobito važno jer su veće vrijednosti PWV-a povezane s progresijom bubrežne bolesti i većim rizikom smrti, što je pokazano i u CRIC kohorti, dok su raniji radovi u uznapređovaloj bubrežnoj bolesti pokazali snažnu povezanost aortne krutosti s preživljenjem [15]. Zbog dobre reproducibilnosti, jasne patofiziološke utemeljenosti i prognostičke vrijednosti, procjena arterijske krutosti PWV-om, prepoznata je i u suvremenim smjernicama kao relevantan pokazatelj subkliničkog oštećenja ciljnih organa i dodatni element stratifikacije kardiovaskularnog rizika [133].

U praktičnom okviru ovog rada PWV stoga čini funkcionalnu os fenotipizacije, odnosno mjeru preko koje se potencijalni učinci mineralnog stresa i medijalne kalcifikacije mogu povezati s klinički mjerljivim hemodinamskim fenotipom u KBB-u [15,130].

1.7.3. Kauppila AAC kao dostupna i validirana mjera strukturnog kalcifikacijskog tereta

Za razliku od PWV-a, koji primarno odražava funkcionalnu posljedicu arterijskog remodeliranja i krutosti, abdominalna aortna kalcifikacija (AAC) procijenjena prema Kauppila zbroju daje uvid u strukturni teret već razvijene vaskularne kalcifikacije [28].

Važna prednost ove metode jest to što se temelji na lateralnoj radiografiji lumbalne kralježnice, odnosno na široko dostupnoj, relativno jeftinoj i standardiziranoj slikovnoj pretrazi koja omogućuje semikvantitativnu procjenu opsega kalcifikacijskih promjena u stijenci abdominalne aorte [28]. Prognostička vrijednost AAC-a potvrđena je još u populacijskim kohortama, u kojima je veći teret AAC-a bio povezan s većim rizikom kardiovaskularnih događaja i smrtnosti [22]. U populaciji bolesnika s KBB-om i osobito u dijaliznih bolesnika, klinička relevantnost AAC-a dodatno je ojačana studijama poput CORD-a, koje su pokazale da je ova mjera izvediva u rutinskim uvjetima i da dobro odražava visok teret vaskularne kalcifikacije u uznapredovaloj KBB [29].

U metodološkom smislu AAC po Kauppili dobro nadopunjuje PWV: dok jedna mjera opisuje kumulativni strukturni teret kalcifikacije, druga opisuje njezin funkcionalni hemodinamski učinak [28,130]. Upravo je ta komplementarnost osobito vrijedna u fenotipizaciji bolesnika s KBB-om, u kojih se strukturalne i funkcionalne posljedice KBB–MKP-a i vaskularnog remodeliranja međusobno prožimaju [29,130].

Dodatno, sintetizirani dokazi u HD bolesnika upućuju na to da AAC nosi prognostičku informaciju za buduće kardiovaskularne događaje i mortalitet, što podupire njegovu korisnost kao praktičnog i klinički relevantnog strukturnog fenotipa u istraživačkom dizajnu [23,134].

1.7.4. Ehokardiografska procjena aortnog zaliska i lijeve klijetke: organske posljedice vaskularnog fenotipa (valvularna kalcifikacija i remodeliranje lijeve klijetke)

Treća komponenta fenotipizacije u ovom radu odnosi se na posljedice vaskularnog i mineralno-metaboličkog remodeliranja na razini ciljnog organa, odnosno

srca [128]. U KBB kronično pulsno opterećenje, povećana aortna krutost i nepovoljan metaboličko-upalno okruženje zajednički doprinose razvoju hipertrofije LV, poremećaju dijastoličke funkcije i progresiji prema zatajivanju srca [6,128]. Ehokardiografija je u tom kontekstu posebno važna, jer omogućuje procjenu geometrije, mase i funkcije LV u stvarnom kliničkom okruženju te tako predstavlja najpraktičniji način prikaza kardijalne posljedice vaskularnog procesa [135,136]. U bolesnika s uznapređovalom KBB-om i ESRD strukturne promjene LV imaju jasnu prognostičku važnost, zbog čega je ehokardiografska fenotipizacija u ovom kontekstu važna, jer prikazuje organsku, srčanu posljedicu kroničnog vaskularnog i hemodinamskog opterećenja, ponajprije kroz valvularnu kalcifikaciju i remodeliranje LV [137,138].

Usporedno s time, kalcifikacija AV i progresija prema aortnoj stenozu u KBB-u često su ubrzane u odnosu na opću populaciju te se uklapaju u širi okvir KBB–MKP-a i sustavnog mineralnog stresa [139,140]. Iako valvularna kalcifikacija nije u potpunosti identična vaskularnoj kalcifikaciji, jer uključuje djelomično različitu mikrookolinu i lokalne mehanizme, u bolesnika s KBB-om obje se često razvijaju unutar istog prokalcifikacijskog i proinflamatornog okruženja [139,141]. Zbog toga ehokardiografska procjena morfologije i funkcije AV predstavlja važan dodatni fenotipski sloj koji povezuje sistemsku sklonost mineralizaciji s klinički relevantnim valvularnim ishodima [129,139].

1.7.5. Sažetak logike odabira mjera u ovom radu

Kombinacija PWV-a, AAC procijenjene prema Kauppila zbroju te ehokardiografske procjene AV i LV omogućuje višerazinsku, odnosno „vertikalnu” fenotipizaciju kardiovaskularnog oštećenja u KBB [29,130,142]. U tom okviru PWV predstavlja funkcionalnu komponentu fenotipa, jer odražava hemodinamsku posljedicu arterijske krutosti i kroničnog remodeliranja velikih arterija; AAC po Kauppili daje strukturnu informaciju o kumulativnom kalcifikacijskom teretu; dok ehokardiografija prikazuje posljedice tog procesa na razini ciljnog organa, uključujući remodeliranje LV i valvularni fenotip [15,28,29,130,142].

Takav pristup omogućuje da se potencijalni biološki signal, primjerice poremećaj inhibitora kalcifikacije ili biljeg mineralnog stresa, ne promatra izolirano,

nego kroz više međusobno povezanih razina iste patobiološke cjeline [29,130,142]. Upravo je to osobito važno u KBB-u, gdje nijedna pojedina mjera sama po sebi ne može dovoljno obuhvatiti heterogenost procesa koji istodobno uključuje mineralni stres, vaskularno remodeliranje, arterijsku krutost i kardijalne posljedice [130,134,142].

Stoga ovakav dizajn pruža racionalan okvir za ispitivanje povezanosti vitamin K–ovisnih regulatora mineralizacije, a osobito GRP-a, s mjerljivim vaskularnim i kardiološkim fenotipom u KBB-u [15,29,130,142].

1.8. Praznine u znanju i ključna metodološka ograničenja

Iako su kliničko značenje vaskularne kalcifikacije i arterijske krutosti u KBB-u te mehanističke veze između KBB–MKP-a, mineralnog stresa, vitamin K–ovisnih proteina i CPP/EV osi danas znatno jasnije, još uvijek postoje važne praznine koje ograničavaju razvoj pouzdanih biljega i klinički primjenjive stratifikacije rizika [47,123].

Prvo, iako je biološka aktivnost GRP-a vjerojatno snažno određena njegovim karboksilacijskim statusom, u kliničkim se studijama najčešće mjeri ukupni cirkulirajući GRP (tGRP) standardnim imunokemijskim pristupima, bez jasnog razlučivanja funkcionalno različitih proteoformi i bioloških okruženja u kojima je protein prisutan [42,46,47]. Posljedično, opažene povezanosti između tGRP-a i vaskularnih fenotipova mogu predstavljati mješoviti signal više bioloških stanja, pri čemu odnos prema kalcifikaciji i arterijskoj krutosti može varirati ovisno o statusu vitamina K, stupnju bubrežne disfunkcije i intenzitetu mineralnog stresa [46,143].

Drugo, iako je patofiziološki vrlo uvjerljivo očekivati da se signal inhibitora kalcifikacije najbolje prepoznaje kada se istodobno procjenjuju i struktura i funkcija vaskularnog sustava, takvi integrirani modeli u KBB-u još su razmjerno rijetki [144,145]. Dostupni podaci pokazuju da su abdominalne vaskularne kalcifikacije i aortna krutost povezane u bolesnika s KBB stadija III-IV, ali ovakvi pristupi još nisu standardizirani, niti su rutinski povezani s novijim molekularnim kandidatima poput GRP-a [144]. To znači da i dalje nedostaju dovoljno dobro integrirane kohorte u kojima bi se istodobno i sustavno povezali molekularni biljezi, strukturni kalcifikacijski teret i funkcionalne posljedice vaskularnog remodeliranja [144,145].

Treće, dosadašnje kliničke studije o GRP-u u KBB-u uglavnom su presječne i heterogene, zbog čega ostaje nedovoljno razjašnjeno predstavlja li GRP neovisni biomarker vaskularnog fenotipa ili prije svega odražava širi KBB–MKP i upalni kontekst. To je osobito važno jer bez robusne multivarijatne prilagodbe na ključne determinante, uključujući funkciju bubrega, mineralni metabolizam, upalu i terapijske utjecaje, nije moguće pouzdano procijeniti dodanu vrijednost GRP-a u stratifikaciji rizika [46,47].

Dodatnu složenost unosi i činjenica da mnogi biljezi vitamin K–ovisne osi, uključujući cirkulirajuće pokazatelje MGP-a, ovise o bubrežnoj funkciji, što nas upozorava da se sličan interpretacijski oprez mora primijeniti i pri razmatranju GRP-a. [143].

Konačno, slikovne metode dominantno odražavaju kumulativni teret već razvijene kalcifikacije, dok bi cirkulirajući biomarkeri i CPP/EV dinamika mogli bolje odražavati biološki aktivnu fazu procesa [42,145]. Upravo ta vremenska i biološka neusklađenost između aktivnog mineralnog stresa i kumulativnog strukturnog opterećenja vidljivog na slikovnim metodama može objasniti zašto korelacije između molekularnih pokazatelja i vaskularnog fenotipa ponekad ispadaju slabe ili varijabilne, osobito između različitih stadija KBB-a i različitih kohorti [33,42].

Zbog svega navedenog opravdano je provesti istraživanje u kojem se u jasno okarakteriziranoj populaciji bolesnika s KBB-om istodobno kvantificiraju strukturni kalcifikacijski teret, pulsna hemodinamika i arterijska krutost te ehokardiografski AV/LV fenotip, a zatim ispituje povezanost GRP-a s tim fenotipovima i procjenjuje ostaje li ta povezanost neovisna nakon prilagodbe na ključne kliničke i biokemijske determinante KBB–MKP osi [46,47,144].

Takav pristup osmišljen je kako bi pridonio boljem razumijevanju nekih od glavnih praznina postojeće literature, osobito problema miješanih GRP signala, nedostatka integrirane fenotipizacije i ograničenja presječnih, heterogenih kohorti.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

2.1. Hipoteze istraživanja

2.1.1. Glavna hipoteza:

Serumske vrijednosti ukupnog GLA-bogato proteina (tGRP) povezane su s vaskularnom kalcifikacijom i nepovoljnim vaskularnim fenotipom u bolesnika s KBB te mogu služiti kao biljeg ranog vaskularnog oštećenja.

2.1.2. Specifične hipoteze:

1. Serumske vrijednosti tGRP-a razlikuju se između kontrolnih ispitanika, bolesnika s KBB-om stadija IIIb–IV i bolesnika na kroničnoj HD.
2. tGRP je povezan sa stupnjem bubrežne disfunkcije i pokazateljima poremećaja mineralnog metabolizma u KBB-u.
3. Niže serumske vrijednosti tGRP-a povezane su s većim stupnjem vaskularne kalcifikacije.
4. tGRP je povezan s funkcionalnim i strukturnim vaskularnim fenotipom, uključujući arterijsku krutost i AAC.
5. Povezanost tGRP-a s vaskularnim fenotipom ostaje prisutna i nakon prilagodbe na ključne kliničke i biokemijske čimbenike KBB-a.
6. Serumske vrijednosti tGRP-a povezane su s nepovoljnim kardiovaskularnim ishodima u bolesnika s KBB-om.

2.2. Ciljevi istraživanja

2.2.1. Opći cilj:

Ispitati može li se ukupni GLA-bogati protein (tGRP) koristiti kao biljeg vaskularne kalcifikacije i nepovoljnog vaskularnog fenotipa u bolesnika s KBB-om.

2.2.2. Specifični ciljevi:

1. Odrediti serumske vrijednosti tGRP-a u kontrolnih ispitanika, bolesnika s KBB-om stadija IIIb–IV i bolesnika s KBB-om stadija V na kroničnoj HD.
2. Usporediti serumske vrijednosti tGRP-a među navedenim skupinama ispitanika.
3. Ispitati povezanost tGRP-a s pokazateljima bubrežne funkcije, osobito s eGFR.
4. Ispitati povezanost tGRP-a sa strukturnim pokazateljima vaskularne kalcifikacije, osobito s AAC procijenjenom prema Kauppila zbroju.
5. Ispitati povezanost tGRP-a s funkcionalnim pokazateljima arterijske krutosti i pulsne hemodinamike, osobito s PWV.
6. Ispitati povezanost tGRP-a s ehokardiografskim obilježjima kardiovaskularnog fenotipa, uključujući kalcifikaciju AV i remodeliranje LV.
7. Ispitati povezanost tGRP-a s odabranim biokemijskim pokazateljima KBB–MKP osi i upale.
8. Procijeniti jesu li serumske vrijednosti tGRP-a povezane s nepovoljnim kardiovaskularnim ishodima i mortalitetom tijekom praćenja.
9. Procijeniti ostaje li povezanost tGRP-a s vaskularnim i kardiološkim fenotipovima neovisna nakon prilagodbe na ključne kliničke i biokemijske čimbenike.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Dizajn istraživanja

Ovo istraživanje osmišljeno je kao prospektivna, opservacijska studija provedena u Općoj bolnici „Dr. Ivo Pedišić“ Sisak u suradnji s Medicinskim fakultetom Sveučilišta u Rijeci. U istraživanje su uključivani odrasli ispitanici tijekom razdoblja od prosinca 2022. do rujna 2023. godine. Ispitanici su raspoređeni u tri skupine: kontrolnu skupinu bez kronične bubrežne bolesti, skupinu bolesnika s kroničnom bubrežnom bolešću stadija IIIb–IV te skupinu bolesnika s kroničnom bubrežnom bolešću stadija V na programu kronične HD. Stadij kronične bubrežne bolesti određivan je na temelju eGFR-a, izračunatog primjenom jednadžbe Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI).

Istraživanje prikazano u ovom doktorskom radu temelji se na kohorti čiji je dio rezultata prethodno objavljen u izvornom znanstvenom radu Lončarić i sur. u časopisu Journal of Clinical Medicine [146].

3.2. Ispitanici – uključni i isključni kriteriji

U skupinu bolesnika s kroničnom bubrežnom bolešću uključivani su ispitanici u dobi od 18 do 85 godina sa stadijem IIIb–IV KBB-a ili bolesnici sa završnim stadijem bubrežne bolesti na programu kronične HD. Svi su ispitanici prije uključivanja potpisali pisani informirani pristanak.

Iz istraživanja su isključeni ispitanici mlađi od 18 i stariji od 85 godina, trudnice i dojilje, bolesnici nakon transplantacije bubrega, bolesnici s aktivnom malignom bolesti, kroničnom bolešću jetre te bolesnici s poremećajima mineralno-koštanog metabolizma koji nisu bili povezani s kroničnom bubrežnom bolešću. U skladu s izvornom prijavom teme, dodatno nisu uključivani ispitanici koji nisu mogli dati informirani pristanak.

Kontrolnu skupinu činili su ispitanici bez kronične bubrežne bolesti stadija III ili višeg, s eGFR-om ≥ 60 mL/min/1,73 m², bez poznate vaskularne kalcifikacije i bez dokazane aterosklerotske kardiovaskularne bolesti. Kontrolni ispitanici nisu smjeli imati anamnezu koronarne bolesti, periferne arterijske bolesti, infarkta miokarda, moždanog udara ni prethodnih koronarnih ili perifernih revaskularizacijskih zahvata. Također su isključeni ispitanici s kroničnim sistemskim bolestima koje mogu značajno

utjecati na vaskularni status, poremećajima mineralno-koštanog metabolizma, aktivnom malignom bolesti te oni koji su primali terapiju koja značajno utječe na koštani ili mineralni metabolizam.

Ovakav odabir kontrolne skupine omogućio je referentnu populaciju s minimalnim teretom očite vaskularne bolesti, uz svijest da takav pristup može smanjiti opću primjenjivost rezultata i naglasiti razlike među skupinama.

3.3. Etički aspekti istraživanja

Istraživanje je provedeno u skladu s Helsinškom deklaracijom i temeljnim bioetičkim načelima. Protokol istraživanja odobrila su etička povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci i Opće bolnice „Dr. Ivo Pedišić“ Sisak. Svi ispitanici prije uključivanja potpisali su informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju.

3.4. Klinička procjena i osnovni podaci

Pri uključivanju su prikupljeni demografski podaci, komorbiditeti i podaci o terapiji. Arterijski tlak mjereno je nakon najmanje pet minuta mirovanja u sjedećem položaju, a za analizu su korištene srednje vrijednosti ponovljenih mjerenja.

3.5. Laboratorijske analize i biomarkeri

Venska krv uzorkovana je jednokratno tijekom studijskog razdoblja. Rutinske laboratorijske analize obrađene su neposredno nakon uzorkovanja, dok su uzorci seruma za određivanje biomarkera centrifugirani, alikvotirani i pohranjeni do daljnje obrade. U bolesnika na HD uzorci krvi uzimani su neposredno prije dijalizne procedure. Nakon početne pohrane u lokalnoj ustanovi na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do jednog mjeseca, uzorci su preneseni na Medicinski fakultet u Rijeci, gdje su čuvani na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do serijske analize, uz nastojanje da se broj ciklusa smrzavanja i odmrzavanja svede na minimum.

Serumske koncentracije ukupnog GLA-bogatog proteina (tGRP), fibroblastnog čimbenika rasta 23 (FGF-23) i β -Kloth (KLb) određene su komercijalno dostupnim imunoenzimskim metodama (*engl. enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA),

prema uputama proizvođača. Za određivanje GRP-a korišten je Human GLA-rich protein (GRP) ELISA Kit (Cat. No. E6794Hu; BT Lab/Bioassay Technology Laboratory, Shanghai, China), za FGF-23 Human Fibroblast Growth Factor-23 (FGF-23) ELISA Kit (Cat. No. E0059Hu; BT Lab/Bioassay Technology Laboratory, Shanghai, China), a za β -Klotho Human Klotho beta (KLb) ELISA kit (Cat. No. E2782Hu; BT Lab/Bioassay Technology Laboratory, Shanghai, China).

Korišteni GRP test kvantificira ukupni cirkulirajući GRP (tGRP) i ne razlikuje karboksilirane od nekarboksiliranih frakcija; stoga se u ovom istraživanju analiziraju odnosi tGRP-a s vaskularnim fenotipovima i biokemijskim obilježjima KBB–MKP osi. Laboratorijsko osoblje nije bilo upoznato s kliničkim, ni slikovnim podacima ispitanika.

3.6. Procjena vaskularne kalcifikacije

Vaskularna kalcifikacija procijenjena je na lateralnim radiogramima lumbalne kralježnice prikazom abdominalne aorte. Teret kalcifikacije kvantificiran je primjenom validiranog Kauppila zbroja abdominalne aortne kalcifikacije, u rasponu od 0 do 24 [28]. Radiograme su neovisno ocjenjivala dva evaluatora koji nisu imali uvid u kliničke i laboratorijske podatke, a neslaganja su razriješena konsenzusom. Ovakav pristup u skladu je i s prijavom teme i s kasnijim rukopisom, u kojem je Kauppila zbroj korišten kao glavni strukturni pokazatelj kalcifikacijskog tereta.

3.7. Procjena arterijske krutosti i pulsne hemodinamike

Arterijska krutost procijenjena je neinvazivno, oscilometrijskim mjerenjem brzine pulsno vala (PWV) i središnjih hemodinamskih parametara pomoću uređaja Agedio B900 (IEM GmbH, Stolberg, Njemačka). Mjerenja su izvođena nakon standardiziranog razdoblja mirovanja u ležećem položaju. Za svakog ispitanika provedena su tri uzastopna mjerenja u razmacima od pet minuta, a u analizi je korištena srednja vrijednost dobivenih mjerenja.

Procjena PWV-a bila je unaprijed planirani dio vaskularne fenotipizacije u sklopu istraživačkog protokola. Zbog organizacijskih okolnosti i ograničene dostupnosti uređaja, mjerenje nije za sve ispitanike nužno provedeno istoga dana kao uključivanje u istraživanje ili uzorkovanje krvi, nego u sklopu zasebnog mjernog ciklusa

unutar provedbe istraživanja. Stoga se PWV u ovom radu tumači kao jednokratna funkcionalna procjena vaskularnog fenotipa, a ne kao ponavljana longitudinalna mjera arterijske krutosti.

3.8. Ehokardiografska procjena

Transtorakalna ehokardiografija provedena je pomoću ultrazvučnog sustava Vivid S6 (GE Vingmed Ultrasound AS, Horten, Norway). Preglede su izvodila dva iskusna kardiologa, kao ciljane ehokardiografske procjene usmjerene na strukturne parametre relevantne za protokol istraživanja. Iz standardnih parasternalnih presjeka određivane su dimenzije LV i debljina stijenki. Također je semikvantitativno procjenjivan stupanj kalcifikacije AV prema vizualnoj ljestvici od 0 do 4, u skladu s prethodno opisanom metodologijom [147]. Ukratko, ocjena 0 označavala je odsutnost kalcifikacije, ocjena 1 parcijalnu kalcifikaciju jednog kuspisa, ocjena 2 parcijalne kalcifikacije dvaju kuspisa, ocjena 3 izraženiju kalcifikaciju dvaju kuspisa, a ocjena 4 opsežnu kalcifikaciju sva tri kuspisa. Iako su tijekom rutinskih pregleda dobiveni i doplerski parametri transvalvularnih brzina i gradijenata, oni nisu uključeni u glavnu analizu jer sistolička funkcija LV nije bila sustavno procijenjena u svih ispitanika.

3.9. Praćenje i klinički ishodi

Ispitanici su praćeni do 24 mjeseca nakon uključivanja u istraživanje. Podaci o preživljenju i kardiovaskularnim događajima prikupljani su iz medicinske dokumentacije i tijekom kontrolnih kontakata. Primarni ishod bio je ukupna smrtnost, a sekundarni ishodi obuhvaćali su velike neželjene kardiovaskularne događaje. U skladu s izvornom prijavom teme, tijekom praćenja bilježeni su smrt od bilo kojeg uzroka, smrt zbog infarkta miokarda, smrt zbog moždanog udara, preboljeli srčani ili moždani udar te intervencijski ili kirurški revaskularizacijski zahvati. Vaskularni fenotipovi, uključujući Kauppila zbroj i PWV, procijenjeni su jednokratno i nisu ponavljani tijekom praćenja.

3.10. Statistička obrada podataka

Statistička analiza provedena je programom IBM SPSS Statistics, verzija 25. Normalnost distribucije kontinuiranih varijabli procijenjena je Kolmogorov–Smirnovljevim testom. Budući da većina varijabli nije slijedila normalnu distribuciju, kontinuirani podaci prikazani su kao medijan i interkvartilni raspon, a kategorički kao apsolutni i relativni brojevi. Sve su analize bile dvosmjerne, a vrijednost $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom. Za unaprijed definirane skupine višestrukih usporedbi primijenjena je Bonferronijeva korekcija. Za usporedbu triju skupina ispitanika korišten je Kruskal–Wallisov test za kontinuirane varijable te hi-kvadrat test ili Fisherov egzaktni test za kategoričke varijable, prema potrebi. Kada je ukupni učinak skupine bio značajan, provedene su post hoc parne usporedbe Mann–Whitneyjevim U testom za kontinuirane varijable, uz odgovarajuću korekciju za višestruka testiranja. Povezanosti između GRP-a i kontinuiranih odnosno ordinalnih varijabli procjenjivane su Spearmanovim koeficijentom korelacije.

Za procjenu neovisnih prediktora vaskularnog kalcifikacijskog tereta i arterijske krutosti korišteni su višestruki linearni regresijski modeli sa zasebnim modelima za Kauppila zbroj i PWV kao zavisne varijable. U modele su unaprijed uključeni dob, šećerna bolest i eGFR, a GRP je dodatno uveden kao "forced-entry" prediktor radi procjene njegove neovisne povezanosti s pojedinim vaskularnim fenotipom. Pretpostavke linearne regresije provjerene su standardnim dijagnostičkim postupcima, uključujući procjenu kolinearnosti, distribucije reziduala te linearnosti i homoskedastičnosti. Rezultati regresijske analize prikazani su kao nestandardizirani (B) i standardizirani (β) koeficijenti s pripadnim p-vrijednostima. U eksploratornim analizama praćenja razlike u koncentracijama GRP-a prema pojavi kliničkih događaja procjenjivane su Mann–Whitneyjevim U testom.

4. REZULTATI

4.1. Osnovna obilježja ispitivane populacije i raspodjela ispitanika po skupinama

U istraživanje je uključeno ukupno 185 ispitanika, raspoređenih u tri skupine prema bubrežnoj funkciji i modalitetu liječenja: kontrolna skupina ($n = 61$), skupina bolesnika s KBB stadija IIIb–IV ($n = 61$) te skupina bolesnika s KBB stadija V na programu kronične HD ($n = 63$). Osnovna kategorička obilježja ispitivane populacije prema skupinama prikazana su u Tablici 1.

Analiza kategoričkih varijabli pokazala je da se skupine razlikuju u nizu klinički važnih obilježja. U odnosu na kontrolnu skupinu, bolesnici s KBB imali su veću prevalenciju arterijske hipertenzije, šećerne bolesti, hiperlipidemije i hiperparatireoidizma. U skupinama s KBB-om također je zabilježena veća učestalost prethodnih kardiovaskularnih događaja i zahvata, osobito prethodnog infarkta miokarda i perkutane koronarne intervencije. Spolna raspodjela među skupinama nije se statistički značajno razlikovala.

Promatrano po pojedinim skupinama, arterijska hipertenzija bila je gotovo univerzalno prisutna u bolesnika s KBB-om, dok je hiperparatireoidizam bio osobito izražen u skupini bolesnika na HD. Šećerna bolest i hiperlipidemija također su bile učestalije u KBB skupinama nego u kontrolnoj skupini, što potvrđuje očekivano nepovoljniji kardiometabolički profil bolesnika s uznapredovalijom bubrežnom bolešću. U skupini bolesnika na HD zabilježena je i veća učestalost uzimanja varfarinske terapije.

S obzirom na velik broj kategoričkih usporedbi, rezultate je potrebno tumačiti uz oprez i u kontekstu korekcije na višestruko testiranje. Najkonzistentnije i klinički najvažnije razlike među skupinama odnosile su se na arterijsku hipertenziju, šećernu bolest, hiperlipidemiju, hiperparatireoidizam, prethodni infarkt miokarda i prethodnu perkutanu koronarnu intervenciju.

Ukupno gledano, ispitivana populacija pokazuje očekivanu gradaciju kardiovaskularnog i metaboličkog opterećenja kroz stadije KBB, pri čemu bolesnici s uznapredovalom KBB-om i osobito oni na HD imaju najveći teret komorbiditeta.

Takva raspodjela kliničkih obilježja važna je za interpretaciju daljnjih analiza, jer upućuje na to da razlike među skupinama ne odražavaju samo stupanj bubrežne disfunkcije, nego i širi integrirani fenotip uznapredovale KBB.

Tablica 1. Kategorička obilježja ispitivane populacije prema skupinama

Varijabla	Kontrola (n = 61)	KBB IIIb–IV (n = 61)	HD (n = 63)	p
Spol, muški, n (%)	24 (39,3)	31 (50,8)	36 (57,1)	0,134
Arterijska hipertenzija, n (%)	36 (59,0)	61 (100,0)	61 (96,8)	<0,001
Šećerna bolest, n (%)	14 (23,0)	35 (57,4)	29 (46,0)	<0,001
Hiperlipidemija, n (%)	27 (44,3)	51 (83,6)	38 (60,3)	<0,001
Fibrilacija atrijsa, n (%)	4 (6,6)	13 (21,3)	18 (28,6)	0,006
Hiperparatireoidizam, n (%)	5 (8,2)	30 (49,2)	62 (98,4)	<0,001
Uzimanje varfarina, n (%)	2 (3,3)	8 (13,1)	19 (30,2)	<0,001
Prethodni infarkt miokarda, n (%)	0 (0,0)	12 (19,7)	12 (19,0)	0,001
Prethodna PCI, n (%)	0 (0,0)	14 (23,0)	10 (15,9)	0,001
Prethodni CABG, n (%)	0 (0,0)	2 (3,3)	3 (4,8)	0,248
Prethodni CVI, n (%)	0 (0,0)	3 (4,9)	6 (9,5)	0,048
Ukupna smrtnost tijekom praćenja, n (%)	1 (1,6)	4 (6,6)	9 (14,3)	0,027
Kardiovaskularna smrtnost tijekom praćenja, n (%)	0 (0,0)	1 (1,6)	3 (4,8)	0,179

Podaci su prikazani kao broj ispitanika i postotak, n (%). Razlike među skupinama ispitane su hi-kvadrat testom, odnosno Fisherovim egzaktnim testom kada je to bilo

prikladno. HD- hemodijaliza; KBB- kronična bubrežna bolest; PCI- perkutana koronarna intervencija; CABG- kirurško premoštenje koronarnih arterija; CVI- cerebrovaskularni inzult.

4.2. Razlike u kontinuiranim kliničkim, ehokardiografskim, vaskularnim i biokemijskim varijablama među skupinama

Kontinuirane kliničke, ehokardiografske, vaskularne i biokemijske varijable prema skupinama prikazane su u Tablici 2. Budući da većina analiziranih varijabli nije slijedila normalnu distribuciju, razlike među trima skupinama ispitane su Kruskal–Wallisovim testom, a za post hoc usporedbe korišten je Mann–Whitneyjev U test, uz Bonferronijevu korekciju.

Analiza je pokazala statistički značajne razlike među skupinama u nizu varijabli koje odražavaju bubrežnu funkciju, vaskularni fenotip, ehokardiografske strukturne pokazatelje i obilježja poremećaja mineralnog metabolizma. Očekivano, eGFR se progresivno smanjivao od kontrolne skupine prema bolesnicima s KBB-om stadija IIIb–IV i dalje prema bolesnicima na HD. Istodobno su se vrijednosti PWV-a i Kauppila zbroya povećavale kroz stadije bolesti, što upućuje na progresivno povećanje arterijske krutosti i kalcifikacijskog opterećenja s napredovanjem bubrežne disfunkcije.

Među ehokardiografskim varijablama zabilježene su značajne razlike u debljini interventrikularnog septuma, debljini stražnje stijenke LV i semikvantitativnom zbroju kalcifikacije AV, pri čemu su više vrijednosti uglavnom opažene u skupinama s KBB, osobito u bolesnika na HD. Slično tomu, sistolički arterijski tlak bio je viši u uznapredovalijim stadijima bolesti, dok za dijastolički tlak nije utvrđena statistički značajna razlika među skupinama.

Od biokemijskih pokazatelja, među skupinama su utvrđene značajne razlike u koncentracijama tGRP-a, KLB-a, FGF-23, kalcija, fosfata i paratireoidnog hormona (PTH). Posebno je važno da su vrijednosti tGRP-a pokazivale nelinearan obrazac, s najnižim medijanom u skupini bolesnika s KBB-om stadija IIIb–IV, dok su više vrijednosti opažene i u kontrolnoj skupini i u skupini bolesnika na HD. Nasuprot tome, PWV i Kauppila zbroj pokazivali su očekivani progresivni porast kroz stupnjeve bubrežne bolesti.

Vrijednosti PTH-a i fosfata bile su najviše u skupini bolesnika na HD, dok su vrijednosti kalcija bile niže u toj skupini nego u kontrolnoj i predijaliznoj KBB skupini. KLB i FGF-23 također su se značajno razlikovali među skupinama, što je u skladu s poremećajem KBB–MKP osi u uznapredovaloj KBB.

Ukupno gledano, rezultati pokazuju jasnu gradaciju vaskularnog, ehokardiografskog i biokemijskog fenotipa kroz stadije KBB, ali i izdvajaju tGRP kao biomarker s obrascem raspodjele koji nije linearan u odnosu na progresiju bubrežne disfunkcije. Upravo je taj nalaz bio dodatni razlog za detaljniju analizu povezanosti tGRP-a s vaskularnim i biokemijskim obilježjima u daljnjim dijelovima rezultata.

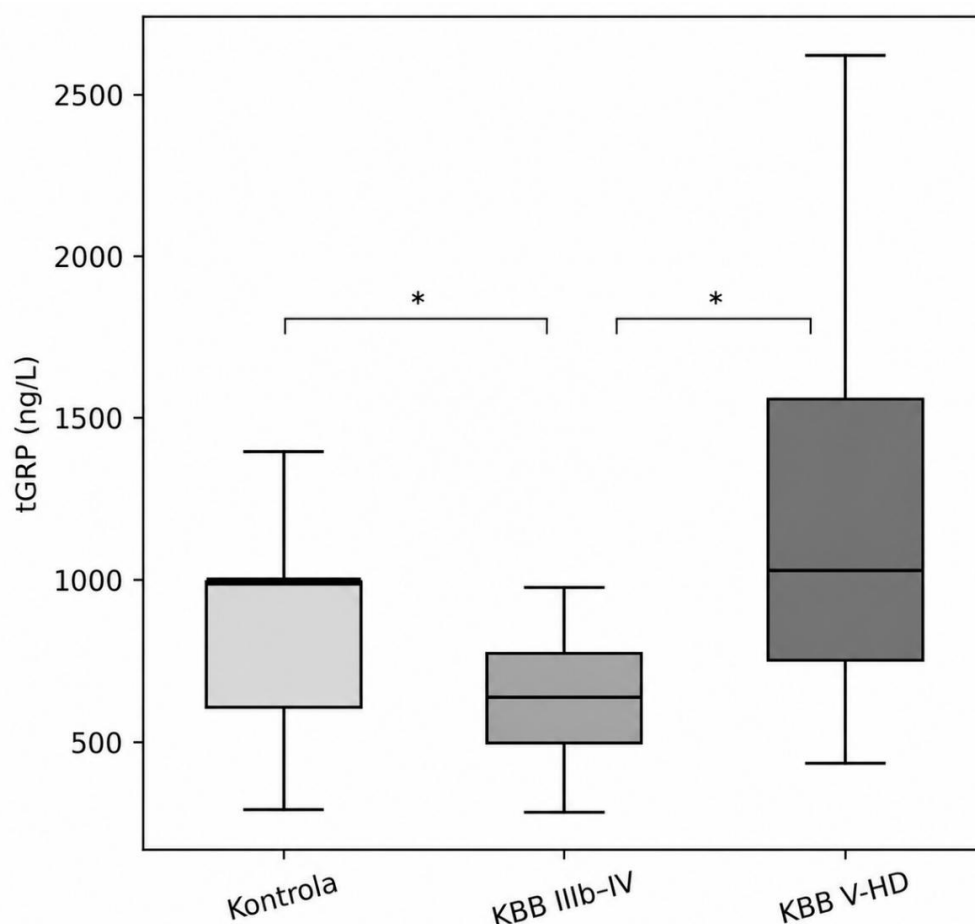
Tablica 2. Kontinuirane kliničke, ehokardiografske, vaskularne i biokemijske varijable prema skupinama

Varijabla	Kontrola (n = 61)	KBB stadij IIIb–IV (n = 61)	HD (n = 63)	χ^2	p
Dob, godine	63 (58–65,5)	73 (65,5–76,5)	69 (62–76)	34,84	<0,001
eGFR (mL/min/1,73 m ²)	83 (74,5–91,5)	31 (22–37)	6 (4–8)	163,12	<0,001
IVS (mm)	11 (10–11)	12 (11–13)	12 (11–14)	34,98	<0,001
LVPW (mm)	10 (9–11)	11 (10–12)	12 (10–13)	34,75	<0,001
AO zbroj	1 (0–2)	2 (1–3)	3 (2–3)	49,33	<0,001
LVDd (mm)	49 (46–52)	51 (47–55)	53 (48–55)	9,28	0,010
Sistolički tlak (mmHg)	130 (122,5–138,5)	135,4 (128–144,5)	141,9 (134–148)	27,50	<0,001
Dijastolički tlak (mmHg)	82 (78–87,5)	83 (80–87)	82,5 (77–87)	0,96	0,620
PWV (m/s)	8,7 (7,95–9,6)	9,6 (8,7–10,5)	10,5 (9,9–11,1)	46,41	<0,001
BMI (kg/m ²)	27,5 (24,9–29,45)	29,6 (26,9–32,25)	27,9 (24,6–33,4)	11,14	<0,001

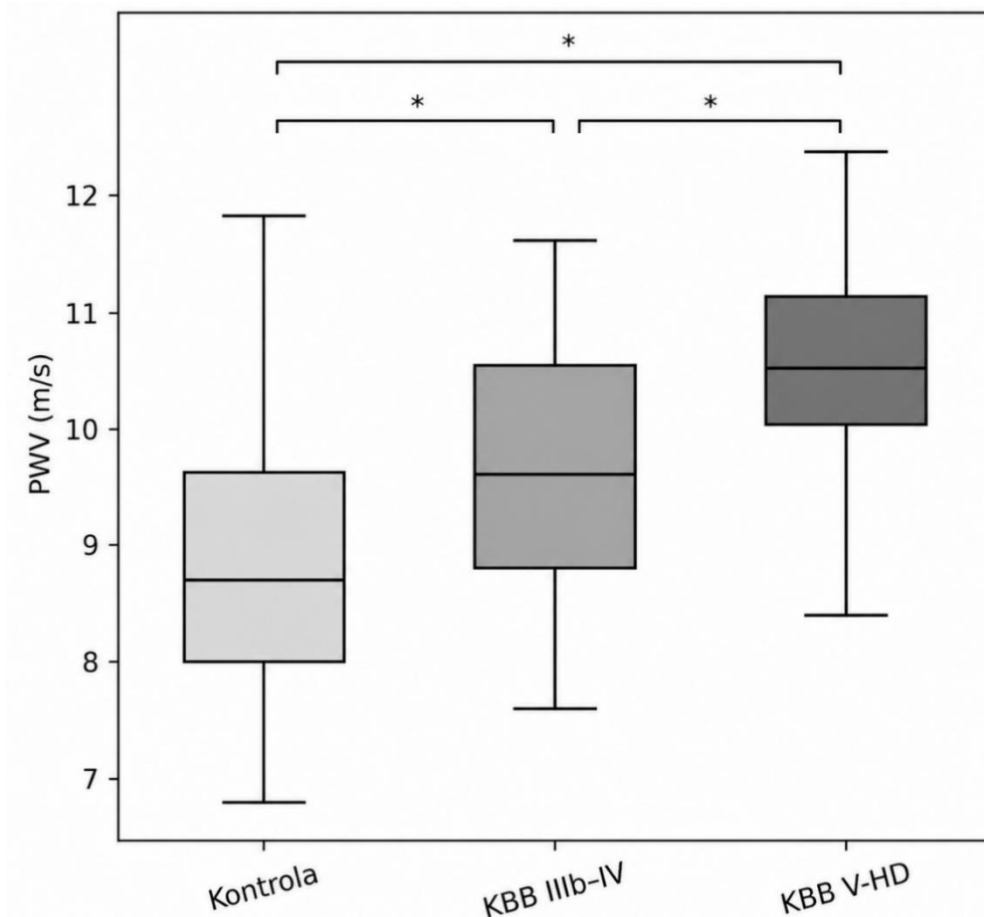
Kauppila zbroj	3 (1–7,5)	12 (4,5–20,5)	14 (5–23)	41,74	<0,001
KLb (nmol/L)	25,33 (17,9– 31,8)	21,47 (17,39– 23,74)	30,98 (23,38– 68,74)	23,70	<0,001
tGRP (ng/L)	994,93 (607,98– 994,93)	638,67 (499,4– 781,1)	1028,41 (751,80– 1574,07)	42,10	<0,001
FGF-23 (pg/mL)	246,26 (188,82– 323,28)	188,25 (161,68– 215,79)	264,12 (228,85– 444,28)	23,66	<0,001
Kalcij (mmol/L)	2,35 (2,28– 2,41)	2,38 (2,29– 2,48)	2,21 (2,11– 2,31)	41,89	<0,001
Fosfat (mmol/L)	1,23 (1,11– 1,34)	1,23 (1,09– 1,42)	1,49 (1,22– 1,78)	26,85	<0,001
PTH (pmol/L)	7,93 (5,81– 10,66)	9,8 (6,17– 16,57)	26,27 (16,52– 41,72)	72,07	<0,001

Podaci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon). Razlike među skupinama ispitane su Kruskal–Wallisovim testom. eGFR- procijenjena glomerularna filtracija; HD- hemodijaliza; IVS- debljina interventrikularnog septuma; LVPW- debljina stražnje stijenke LV; AO zbroj- semikvantitativni zbroj kalcifikacije AV; LVDd- enddiastolički promjer LV; PWV- brzina pulsog vala; BMI- indeks tjelesne mase; KLb- β -Klotho; tGRP- ukupni GLA-bogati protein; PTH- paratireoidni hormon. KLb i FGF-23 bili su dostupni samo u podskupinama ispitanika.

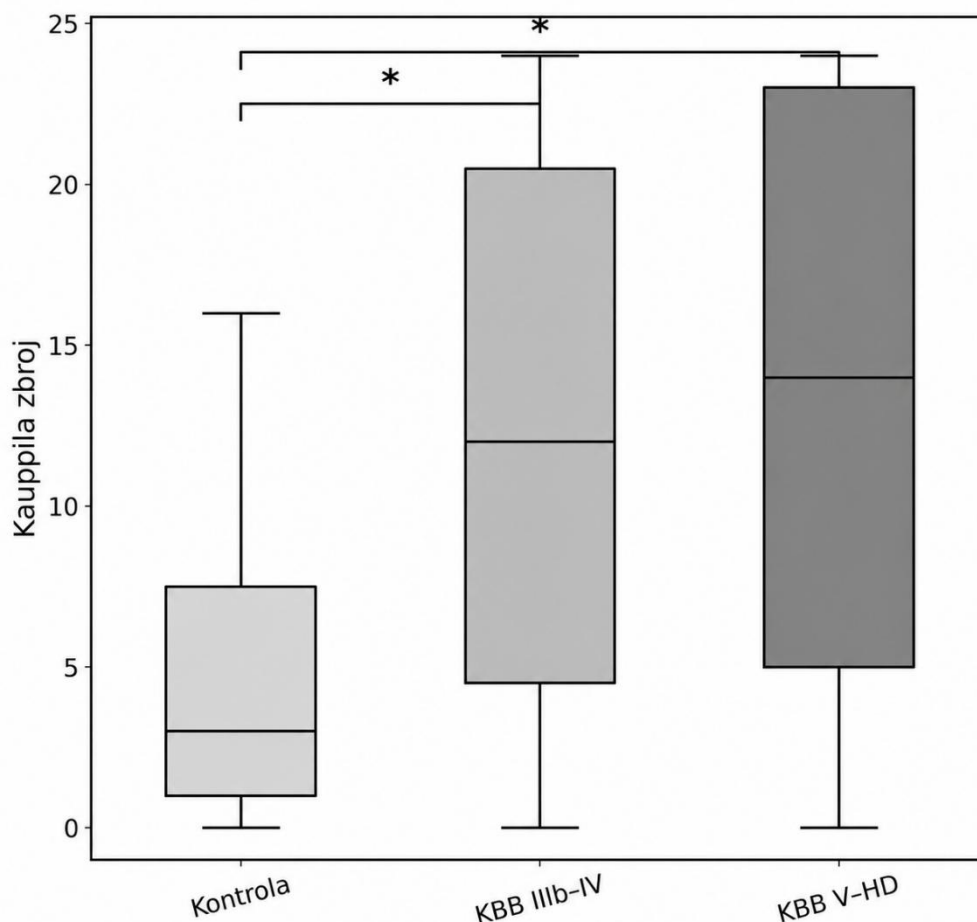
Radi preglednijeg prikaza najvažnijih razlika među skupinama, raspodjela odabranih vaskularnih i biokemijskih pokazatelja prikazana je u nastavku na slikama 1-8.



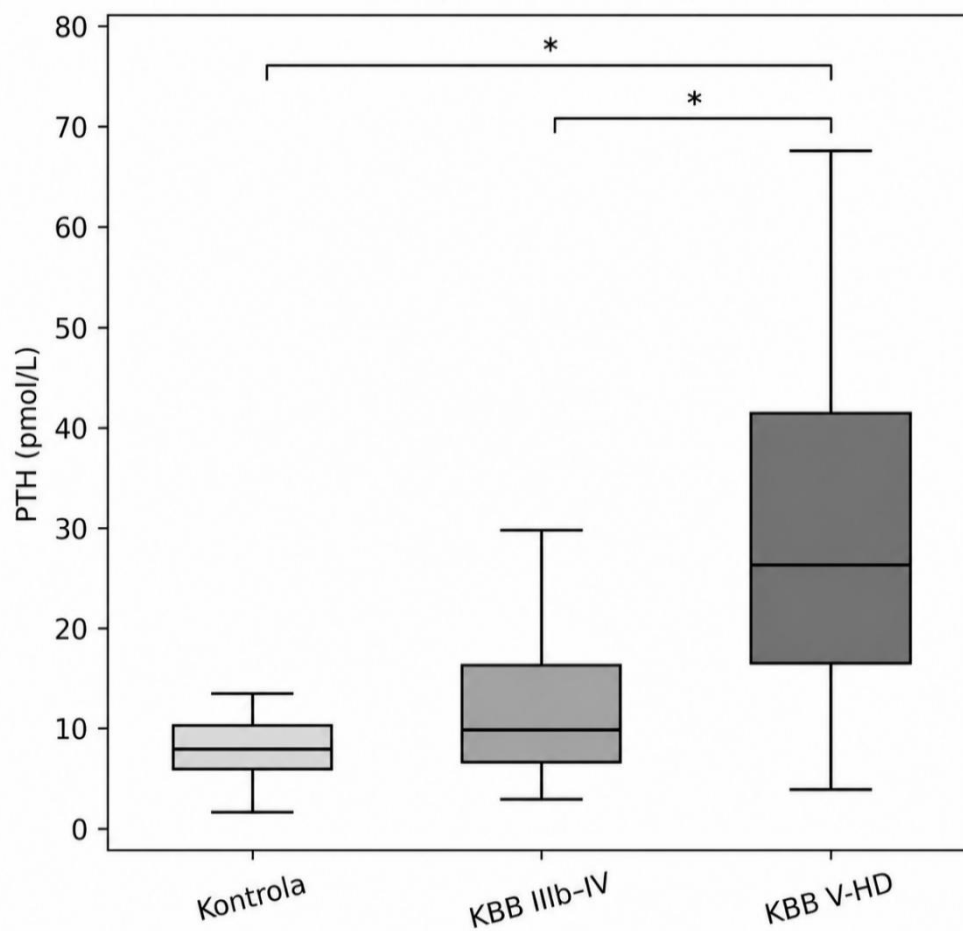
Slika 1. Raspodjela tGRP-a prema skupinama. Prikazan je box-plot ukupnog GLA-bogatom proteina (tGRP) u kontrolnoj skupini, skupini bolesnika s KBB stadija IIIb–IV i skupini bolesnika s KBB stadija V na HD. Središnja linija unutar kutije označava medijan, rubovi kutije interkvartilni raspon (IQR), a whiskeri minimalne i maksimalne vrijednosti. Razlike među skupinama analizirane su Kruskal–Wallisovim testom, nakon čega su provedene post hoc parne usporedbe Mann–Whitneyjevim U testom uz korekciju za multipla testiranja. Zvezdica (*) označava statistički značajnu razliku između odgovarajućih skupina. Grafički prikaz pokazuje nelinearan obrazac raspodjele tGRP-a, s najnižim vrijednostima u skupini KBB IIIb–IV te višim vrijednostima u kontrolnoj i HD skupini.



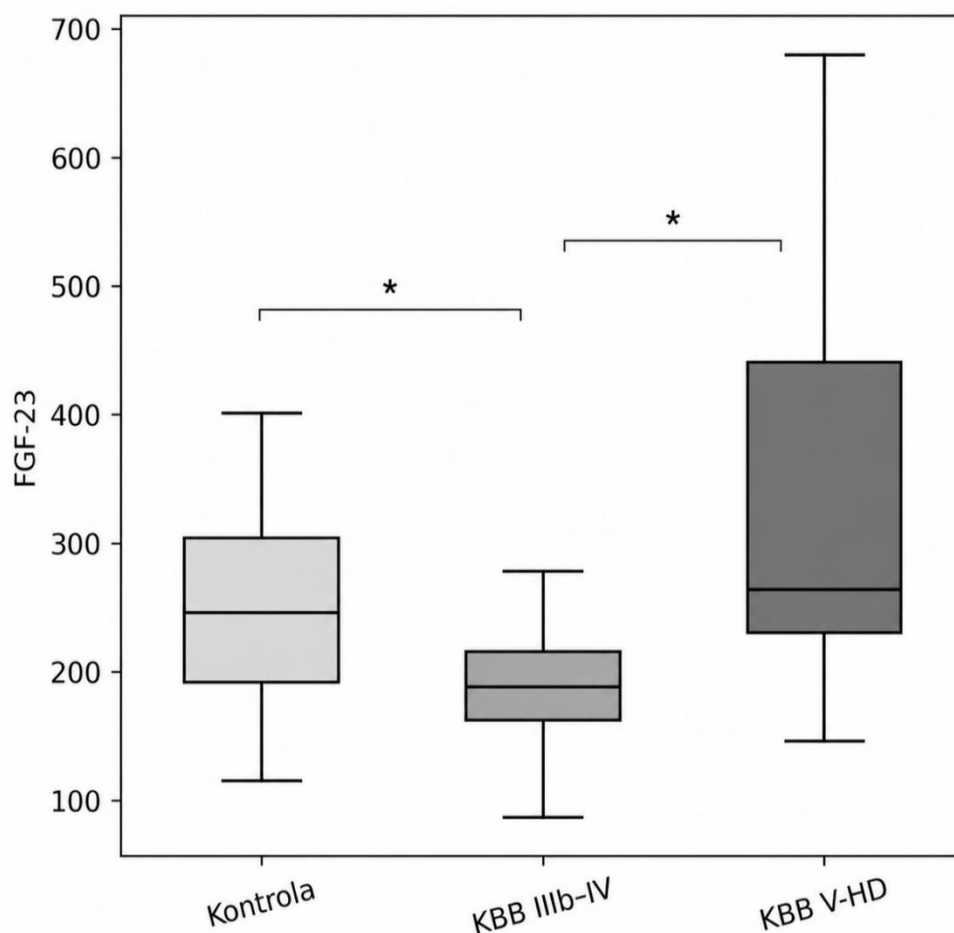
Slika 2. Raspodjela PWV-a prema skupinama. Prikazan je box-plot brzine pulsog vala (PWV) u kontrolnoj skupini, skupini bolesnika s KBB stadija IIIb–IV i skupini bolesnika s KBB stadija V na HD. Središnja linija unutar kutije označava medijan, rubovi kutije interkvartilni raspon (IQR), a whiskeri minimalne i maksimalne vrijednosti. Razlike među skupinama analizirane su Kruskal–Wallisovim testom, nakon čega su provedene post hoc parne usporedbe Mann–Whitneyjevim U testom uz korekciju za multipla testiranja. Zvezdica (*) označava statistički značajnu razliku između odgovarajućih skupina. Grafički prikaz pokazuje progresivan porast PWV-a od kontrolne skupine prema bolesnicima s KBB-om stadija IIIb–IV i dalje prema bolesnicima na HD, što je u skladu s porastom arterijske krutosti u uznapredovalijim stadijima KBB.



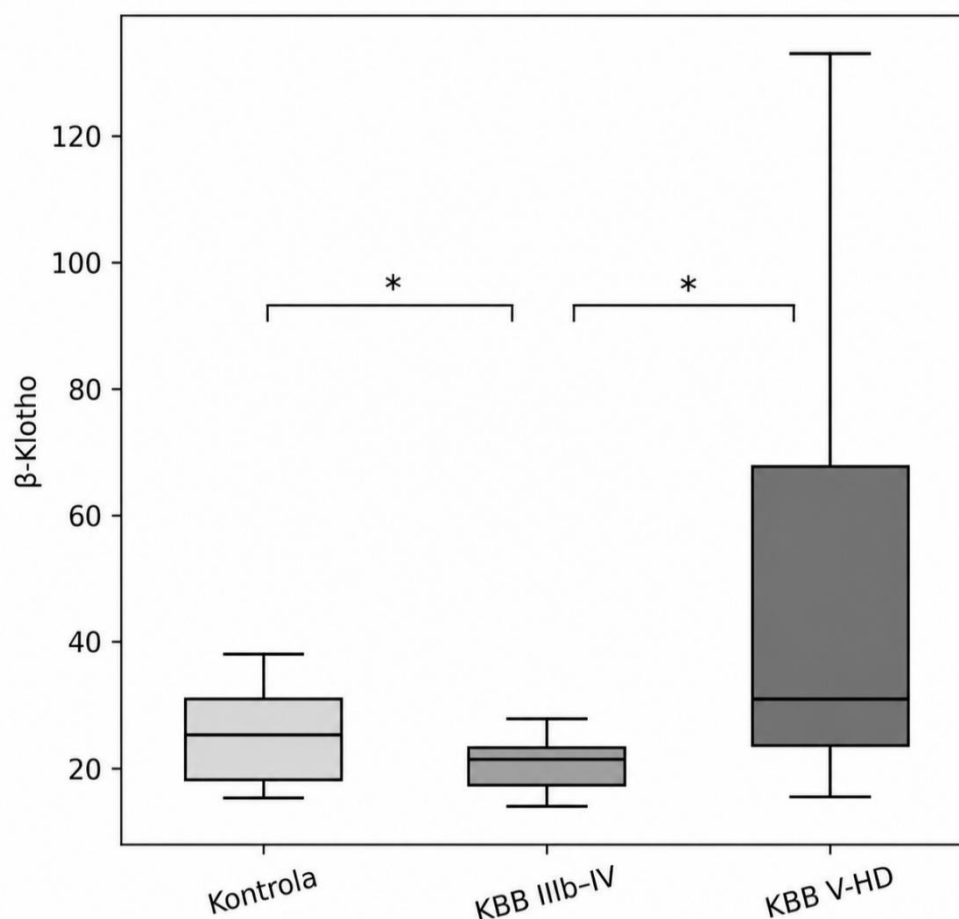
Slika 3. Raspodjela Kauppila zbroja prema skupinama. Prikazan je box-plot Kauppila zbroja u kontrolnoj skupini, skupini bolesnika s KBB stadija IIIb–IV i skupini bolesnika s KBB stadija V na HD. Središnja linija unutar kutije označava medijan, rubovi kutije interkvartilni raspon (IQR), a whiskeri minimalne i maksimalne vrijednosti. Razlike među skupinama analizirane su Kruskal–Wallisovim testom, nakon čega su provedene post hoc parne usporedbe Mann–Whitneyjevim U testom uz korekciju za multipla testiranja. Zvezdica (*) označava statistički značajnu razliku između odgovarajućih skupina. Grafički prikaz pokazuje veće vrijednosti Kauppila zbroja u obje skupine bolesnika s kroničnom bubrežnom bolešću u odnosu na kontrolnu skupinu, što upućuje na veći teret abdominalne aortne kalcifikacije u uznapredovalijim stadijima bolesti.



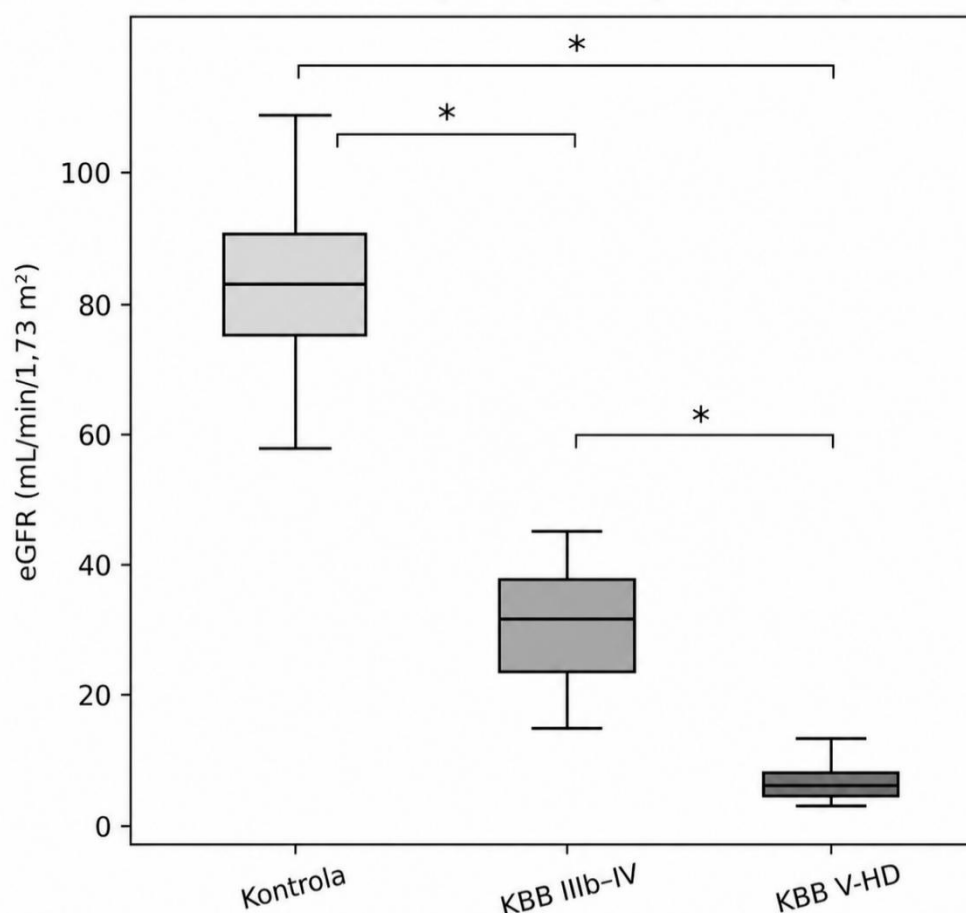
Slika 4. Raspodjela PTH-a prema skupinama. Prikazan je box-plot paratireoidnog hormona (PTH) u kontrolnoj skupini, skupini bolesnika s KBB stadija IIIb–IV i skupini bolesnika s KBB stadija V na HD. Središnja linija unutar kutije označava medijan, rubovi kutije interkvartilni raspon (IQR), a whiskeri minimalne i maksimalne vrijednosti. Razlike među skupinama analizirane su Kruskal–Wallisovim testom, nakon čega su provedene post hoc parne usporedbe Mann–Whitneyjevim U testom uz korekciju za multipla testiranja. Zvezdica (*) označava statistički značajnu razliku između odgovarajućih skupina. Grafički prikaz pokazuje porast vrijednosti PTH-a kroz uznapredovalije stadije KBB, s najvišim vrijednostima u skupini bolesnika na HD.



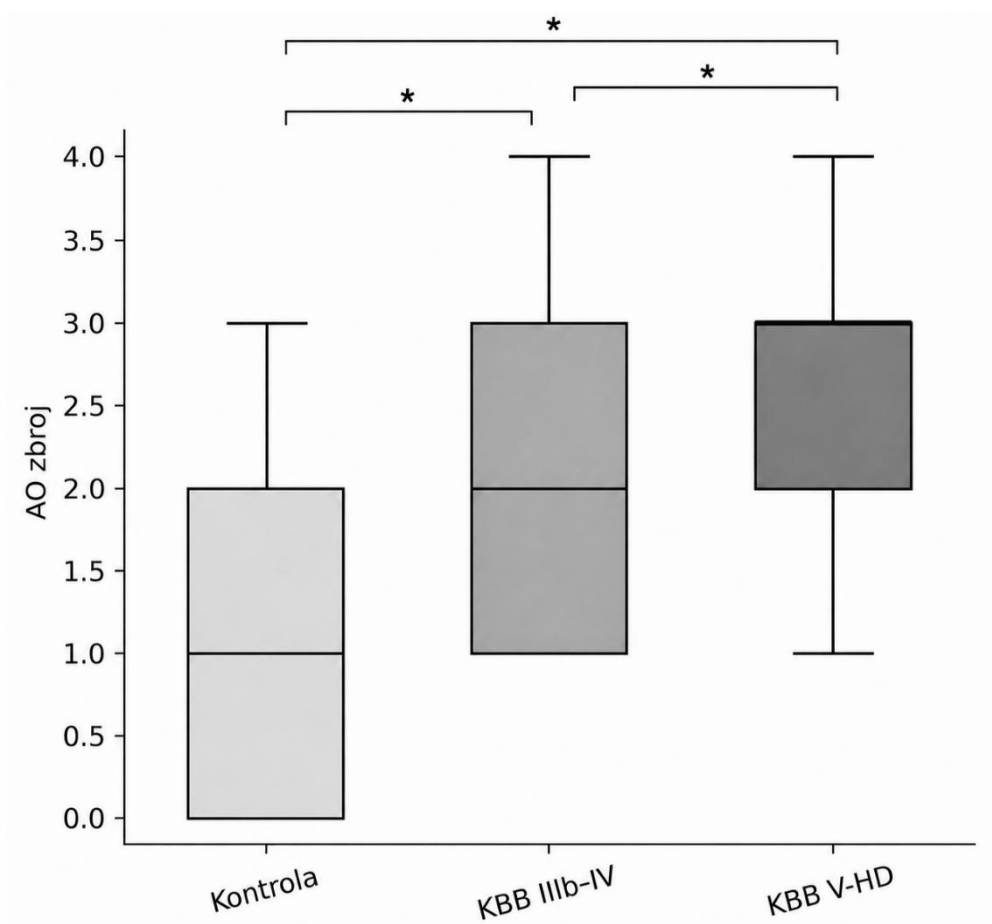
Slika 5. Raspodjela FGF-23 prema skupinama. Prikazan je box-plot fibroblastnog čimbenika rasta 23 (FGF-23) u kontrolnoj skupini, skupini bolesnika s KBB stadija IIIb–IV i skupini bolesnika s KBB stadija V na HD. Središnja linija unutar kutije označava medijan, rubovi kutije interkvartilni raspon (IQR), a whiskeri minimalne i maksimalne vrijednosti. Razlike među skupinama analizirane su Kruskal–Wallisovim testom, nakon čega su provedene post hoc parne usporedbe Mann–Whitneyjevim U testom uz korekciju za multipla testiranja. Zvezdica (*) označava statistički značajnu razliku između odgovarajućih skupina. Grafički prikaz pokazuje nelinearan obrazac raspodjele FGF-23, s nižim vrijednostima u skupini KBB IIIb–IV te višim vrijednostima u kontrolnoj i HD skupini.



Slika 6. Raspodjela β -Klotho prema skupinama. Prikazan je box-plot β -Klotho (KLb) u kontrolnoj skupini, skupini bolesnika s KBB stadija IIIb–IV i skupini bolesnika s KBB stadija V na HD. Središnja linija unutar kutije označava medijan, rubovi kutije interkvartilni raspon (IQR), a whiskeri minimalne i maksimalne vrijednosti. Razlike među skupinama analizirane su Kruskal–Wallisovim testom, nakon čega su provedene post hoc parne usporedbe Mann–Whitneyjevim U testom uz korekciju za multipla testiranja. Zvezdica (*) označava statistički značajnu razliku između odgovarajućih skupina. Grafički prikaz pokazuje nelinearan obrazac raspodjele KLb, s najnižim vrijednostima u skupini KBB IIIb–IV te višim vrijednostima u HD skupini.



Slika 7. Raspodjela eGFR-a prema skupinama. Prikazan je box-plot procijenjene glomerularne filtracije (eGFR) u kontrolnoj skupini, skupini bolesnika s KBB stadija IIIb–IV i skupini bolesnika s KBB stadija V na HD. Središnja linija unutar kutije označava medijan, rubovi kutije interkvartilni raspon (IQR), a whiskeri minimalne i maksimalne vrijednosti. Razlike među skupinama analizirane su Kruskal–Wallisovim testom, nakon čega su provedene post hoc parne usporedbe Mann–Whitneyjevim U testom uz korekciju za multipla testiranja. Zvezdica (*) označava statistički značajnu razliku između odgovarajućih skupina. Grafički prikaz pokazuje očekivano progresivno smanjenje eGFR-a od kontrolne skupine prema bolesnicima s KBB-om stadija IIIb–IV i dalje prema bolesnicima na HD, što odražava gradaciju bubrežne disfunkcije među promatranim skupinama.



Slika 8. Raspodjela AO zbroja prema skupinama. Prikazan je box-plot semikvantitativnog zbroja kalcifikacije AV (AO zbroj) u kontrolnoj skupini, skupini bolesnika s KBB stadija IIIb–IV i skupini bolesnika s KBB stadija V na HD. Središnja linija unutar kutije označava medijan, rubovi kutije interkvartilni raspon (IQR), a whiskeri minimalne i maksimalne vrijednosti. Razlike među skupinama analizirane su Kruskal–Wallisovim testom, nakon čega su provedene post hoc parne usporedbe Mann–Whitneyjevim U testom uz korekciju za multipla testiranja. Zvezdica (*) označava statistički značajnu razliku između odgovarajućih skupina. Grafički prikaz pokazuje porast AO zbroja kroz uznapredovalije stadije KBB, s najvišim vrijednostima u skupini bolesnika na HD, što je u skladu s većim teretom valvularne kalcifikacije u uznapredovaloj bolesti.

4.3. Povezanost GRP-a s bubrežnom funkcijom, vaskularnim fenotipom i biokemijskim pokazateljima KBB–MKP osi

Povezanosti između kontinuiranih varijabli ispitane su Spearmanovim koeficijentom korelacije, a rezultati su prikazani u Tablici 3. S obzirom na velik broj usporedbi, za interpretaciju korelacija primijenjena je Bonferronijeva korekcija, pri čemu je prag statističke značajnosti postavljen na $p < 0,003$.

Analiza je pokazala da je tGRP bio značajno, negativno povezan s eGFR-om, što upućuje na povezanost tGRP-a s progresijom bubrežne disfunkcije kroz spektar KBB. Istodobno je tGRP pokazao značajnu pozitivnu povezanost s KLb, FGF-23 i fosfatom, odnosno s biokemijskim pokazateljima koji odražavaju poremećaj KBB–MKP osi i mineralnog metabolizma.

Nasuprot tome, tGRP nije pokazao statistički značajnu povezanost s glavnim vaskularnim fenotipskim pokazateljima nakon korekcije na višestruko testiranje. Nije utvrđena značajna korelacija tGRP-a s PWV-om, Kauppila zbrojem, ni AO zbrojem. Također nije nađena značajna povezanost s dobi, serumskim kalcijem, ni s PTH nakon Bonferronijeve korekcije.

Dobiveni nalazi upućuju na to da je u ovom uzorku tGRP bio znatno snažnije povezan s biokemijskim poremećajima karakterističnima za KBB–MKP, nego sa strukturnim ili funkcionalnim vaskularnim fenotipom. Drugim riječima, tGRP se u korelacijskoj analizi nije pokazao kao snažan odraz vaskularnog kalcifikacijskog opterećenja ili arterijske krutosti, nego prije kao marker biokemijskog okoliša uznapredovale KBB.

Istodobno, korelacijska matrica potvrđuje i očekivane odnose među ostalim varijablama: niži eGFR bio je povezan s višim vrijednostima PWV-a, Kauppila zbroja, fosfata i PTH-a, dok su dob i sistolički tlak bili pozitivno povezani s pokazateljima arterijske krutosti i kalcifikacijskog tereta. Takav obrazac dodatno podupire pretpostavku da vaskularni fenotip u KBB nastaje djelovanjem više međusobno povezanih čimbenika, pri čemu se tGRP u ovoj fazi analize jače veže uz KBB–MKP biokemijski profil, nego uz same vaskularne manifestacije.

Tablica 3. Spearmanovi koeficijenti korelacije između kontinuiranih varijabli u istraživanju

Varijabla	1. Dob	2. eGFR	3. IVS	4. LVPW	5. AO zbroj	6. LVDd	7. Sistola	8. Dijastola	9. PWV	10. BMI	11. Kauppila	12. KLb	13. tGRP	14. FGF-23	15. Ca	16. P	17. PTH
1. Dob	1,00	- 0,300*	0,171	0,132	0,458*	-0,090	- 0,340*	0,088	0,568*	0,018	0,547*	-0,258	-0,059	-0,111	0,071	-0,090	0,139
2. eGFR		1,00	- 0,411*	- 0,409*	- 0,535*	-0,195	- 0,338*	0,097	- 0,486*	-0,095	-0,429*	- 0,344*	- 0,220*	-0,291	0,351*	- 0,391*	- 0,669*
3. IVS			1,00	0,858*	0,452*	0,275*	0,176	0,021	0,198	0,270*	0,267*	-0,090	-0,025	-0,077	-0,139	0,142	0,233*
4. LVPW				1,00	0,445*	0,333*	0,170	0,016	0,212	0,204	0,249*	-0,014	0,036	-0,030	-0,196	0,120	0,262*
5. AO zbroj					1,00	0,271*	0,371*	0,022	0,478*	0,122	0,533*	-0,041	0,100	-0,069	-0,168	0,143	0,332*
6. LVDd						1,00	0,159	-0,038	0,093	0,300*	0,075	-0,038	0,029	0,076	- 0,292*	0,065	0,160
7. Sistola							1,00	0,460*	0,666*	0,059	0,566*	0,020	0,117	0,190	-0,083	0,151	0,165
8. Dijastola								1,00	0,111	0,131	0,021	0,094	-0,044	0,004	-0,003	-0,142	-0,189
9. PWV									1,00	0,022	0,813*	0,073	0,149	0,200	-0,097	0,176	0,314*
10. BMI										1,00	0,102	-0,066	-0,104	-0,057	-0,077	0,099	0,008
11. Kauppila											1,00	-0,125	0,064	0,008	0,015	0,219*	0,221*
12. KLb												1,00	0,720*	0,673*	-0,192	0,221	0,307
13. tGRP													1,00	0,625*	-0,209	0,241*	0,185
14. FGF-23														1,00	-0,109	0,211	0,274
15. Ca															1,00	-0,211	- 0,379*
16. P																1,00	0,330*
17. PTH																	1,00

Podaci su prikazani kao Spearmanovi koeficijenti korelacije (ρ). Statistički značajne povezanosti nakon Bonferronijeve korekcije označene su zvjezdicom (*), pri čemu je prag značajnosti postavljen na $p < 0,003$. eGFR- procijenjena glomerularna filtracija; IVS- debljina interventrikularnog septuma; LVPW- debljina stražnje stijenke LV; AO zbroj- semikvantitativni zbroj kalcifikacije AV; LVDd- enddiastolički promjer LV; PWV- brzina pulsnog vala; BMI- indeks tjelesne mase; KLb- β -Klotho; tGRP- ukupni GLA- bogati protein; FGF-23- fibroblastni čimbenik rasta 23; PTH- paratireoidni hormon.

Iz prikazanih rezultata vidljivo je da je tGRP bio značajno negativno povezan s eGFR-om te pozitivno povezan s KLb, FGF-23 i fosfatom, dok nakon Bonferronijeve korekcije nije pokazao značajnu povezanost s PWV-om, Kauppila zbrojem, ni AO zbrojem.

Ovakav nalaz upućuje na to, da je u ovom uzorku tGRP bio izraženije povezan s biokemijskim obilježjima KBB–MKP osi nego s glavnim vaskularnim fenotipskim pokazateljima.

4.4. Vrijednosti GRP-a prema kliničkim događajima tijekom praćenja i varfarinskoj terapiji

Kako bi se dodatno procijenila moguća klinička relevantnost tGRP-a, analizirane su razlike u njegovim vrijednostima s obzirom na pojavu pojedinih kliničkih događaja tijekom praćenja, kao i s obzirom na uzimanje varfarinske terapije. Rezultati ovih analiza prikazani su u Tablici 4. Obzirom da su distribucije bile nenormalne, za usporedbu skupina korišten je Mann–Whitneyjev U test.

Analiza nije pokazala statistički značajne razlike u vrijednostima tGRP-a između ispitanika s obzirom na pojavu infarkta miokarda, perkutane koronarne intervencije, kirurškog premoštenja koronarnih arterija, cerebrovaskularnog inzulta, amputacije, kardiovaskularne smrti, ni ukupne smrtnosti tijekom razdoblja praćenja. Također nije utvrđena statistički značajna razlika u vrijednostima tGRP-a između ispitanika koji su uzimali varfarin i onih koji nisu bili na varfarinskoj terapiji.

Dobivene rezultate potrebno je tumačiti oprezno. Naime, broj ispitanika s pojedinim događajima tijekom praćenja bio je vrlo malen, zbog čega je statistička snaga ovih analiza bila ograničena. Stoga izostanak statistički značajne razlike ne

može biti tumačen kao čvrst dokaz nepostojanja povezanosti između tGRP-a i kliničkih ishoda, nego prije kao nalaz koji u ovom uzorku nije dosegao statističku uvjerljivost.

Posebno je važno naglasiti da je u ovom istraživanju određivan ukupni GRP (tGRP), a ne njegove funkcionalne frakcije povezane s karboksilacijskim statusom. Zbog toga se ni izostanak razlike prema varfarinskoj terapiji ne može interpretirati kao dokaz da vitamin K antagonizam nema utjecaja na GRP-ovisnu biologiju, nego samo kao pokazatelj da u ovom uzorku nije utvrđena razlika u koncentracijama ukupnog cirkulirajućeg proteina.

Ukupno gledano, ove eksploratorne analize nisu poduprle jasnu povezanost tGRP-a s kratkoročnim kliničkim događajima tijekom praćenja. Glavna vrijednost ovog dijela rezultata stoga nije u potvrdi prognostičke uloge tGRP-a, nego u pokazivanju da se eventualna klinička relevantnost ovog biomarkera u budućim istraživanjima mora procjenjivati na većim uzorcima i uz dulje praćenje.

Vrijednosti tGRP-a prema kliničkim događajima tijekom praćenja i prema uzimanju varfarinske terapije prikazane su u Tablici 4.

Tablica 4. Vrijednosti tGRP-a prema varfarinskoj terapiji i kliničkim događajima tijekom praćenja

Događaj / stanje	Bez događaja/bez stanja tGRP, medijan (IQR)	Događaj/stanje prisutno tGRP, medijan (IQR)	U	p
Infarkt miokarda tijekom praćenja	798,31 (608,40–1017,22), n = 178	772,97 (492,27–1574,07), n = 7	621,00	0,989
PCI tijekom praćenja	789,24 (608,82–1013,84), n = 179	959,34 (479,51–2402,99), n = 6	470,00	0,603
CABG tijekom praćenja	807,12 (608,40–1027,63), n = 182	638,67 (619,58–660,08), n = 3	159,00	0,215
CVI tijekom praćenja	789,24 (607,15–999,31), n = 183	1371,39 (1291,34–1451,45), n = 2	59,00	0,099
Amputacija tijekom praćenja	791,13 (608,82–1006,57), n = 181	826,88 (400,65–1459,15), n = 4	342,50	0,854

Kardiovaskularna smrt tijekom praćenja	791,13 (607,98–1020,61), n = 181	874,68 (524,16–1424,65), n = 4	353,00	0,932
Smrt od bilo kojeg uzroka	791,13 (600,49–999,31), n = 171	829,98 (665,79–999,31), n = 14	1061,00	0,480
Uzimanje varfarina	790,18 (602,16–994,93), n = 156	834,75 (617,98–1250,44), n = 29	2117,00	0,584

Podaci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon). Razlike među skupinama ispitane su Mann–Whitneyjevim U testom. tGRP- ukupni GLA-bogati protein; PCI- perkutana koronarna intervencija; CABG- kirurško premoštenje koronarnih arterija; CVI- cerebrovaskularni inzult.

4.5. Multivarijatni model prediktora Kauppila zbroja

Kako bi se ispitalo doprinosi li tGRP neovisno teretu vaskularne kalcifikacije uz poznate kliničke odrednice, provedena je multipla linearna regresijska analiza s Kauppila zbrojem kao zavisnom varijablom. U model su kao nezavisne varijable uključeni dob, šećerna bolest, tGRP i eGFR. Rezultati multiplog linearnog regresijskog modela za prediktore Kauppila zbroja prikazani su u Tablici 5.

Regresijski model bio je statistički značajan ($F(4,180) = 36,471$; $p < 0,001$) te je objašnjavao 39,4% varijance Kauppila zbroja ($R^2 = 0,394$). Veća dob, prisutnost šećerne bolesti, viši tGRP i niži eGFR bili su neovisno povezani s višim Kauppila zbrojem. Među uključenim prediktorima najsnažniji standardizirani doprinos imali su dob i eGFR, dok je neovisni doprinos tGRP-a bio statistički značajan, ali skromnog intenziteta.

Dobiveni nalazi pokazuju da su starija dob, prisutnost šećerne bolesti i niži eGFR bili očekivano povezani s višim Kauppila zbrojem. Za tGRP je također postignuta statistička značajnost, međutim njegov je učinak bio slab, što je vidljivo iz manjeg standardiziranog regresijskog koeficijenta u odnosu na dob, šećernu bolest i eGFR. Stoga se tGRP u ovom modelu ne može smatrati snažnim neovisnim prediktorom vaskularne kalcifikacije, nego biomarkerom s malim, ali statistički prisutnim dodatnim doprinosom.

Ukupno gledano, ovaj model podupire tumačenje da tGRP nije dominantna odrednica vaskularne kalcifikacije, nego biomarker sa slabijom, ali statistički prisutnom neovisnom povezanošću unutar šireg kliničkog i KBB-povezanog fenotipa.

Tablica 5. Multipli linearni regresijski model prediktora Kauppila zbroja

Varijabla	B	SE	β	t	p
Konstanta	-12,178	4,237	—	-2,874	0,005
Dob	0,330	0,056	0,372	5,865	<0,001
Šećerna bolest	3,808	1,022	0,224	3,727	<0,001
tGRP	0,002	0,001	0,135	2,235	0,027
eGFR	-0,062	0,016	-0,248	-3,833	<0,001

Prikazan je multipli linearni regresijski model s Kauppila zbrojem kao zavisnom varijablom. B- nestandardizirani regresijski koeficijent; SE- standardna pogreška; β - standardizirani regresijski koeficijent; tGRP- ukupni GLA-bogati protein; eGFR- procijenjena glomerularna filtracija. Statistika modela: $F(4,180) = 36,471$; $p < 0,001$; $R^2 = 0,394$.

4.6. Multivarijatni model prediktora PWV-a

Kako bi se ispitalo doprinosi li tGRP neovisno arterijskoj krutosti uz poznate kliničke odrednice, provedena je multipla linearna regresijska analiza s PWV-om kao zavisnom varijablom. U model su kao nezavisne varijable uključeni dob, šećerna bolest, tGRP i eGFR. Rezultati multiplog linearnog regresijskog modela za prediktore brzine pulsog vala prikazani su u Tablici 6.

Regresijski model bio je statistički značajan ($F(4,180) = 37,794$; $p < 0,001$) te je objašnjavao 45,6% varijance PWV-a ($R^2 = 0,456$). Veća dob, viši tGRP i niži eGFR bili su neovisno povezani s višim vrijednostima PWV-a, dok šećerna bolest nakon prilagodbe nije ostala statistički značajan prediktor. Među uključenim varijablama najveći standardizirani doprinos imao je dob, zatim bubrežna funkcija, dok je doprinos tGRP-a bio manji.

Dobiveni nalazi upućuju na to da je arterijska krutost u ovom uzorku prvenstveno određena očekivanim kliničkim čimbenicima, osobito dobi i stupnjem bubrežne disfunkcije. Iako je za tGRP i u ovom modelu postignuta statistička značajnost, veličina njegova učinka bila je slaba, odnosno osjetno manja od učinka dobi i bubrežne funkcije. Takav rezultat upućuje na to da tGRP nije glavni prediktor arterijske krutosti, nego pokazuje tek skromnu neovisnu povezanost s PWV-om nakon prilagodbe na ključne kliničke čimbenike.

Ukupno gledano, ovaj model podupire tumačenje da tGRP nije dominantna odrednica arterijske krutosti, nego biomarker sa slabijom, ali statistički prisutnom neovisnom povezanošću unutar šireg kliničkog i KBB-povezanog fenotipa. Taj je nalaz u skladu s prethodnim opažanjem da je tGRP u analizi bez prilagodbe izraženije povezan s biokemijskim pokazateljima KBB–MKP osi, nego sa samim vaskularnim manifestacijama bolesti.

Tablica 6. Multipli linearni regresijski model prediktora brzine pulsnog vala (PWV)

Varijabla	B	SE	β	t	p
Konstanta	5,403	0,622	—	8,688	<0,001
Dob	0,064	0,008	0,464	7,736	<0,001
Šećerna bolest	0,281	0,150	0,107	1,874	0,063
tGRP	0,0002	0,0001	0,140	2,450	0,015
eGFR	-0,013	0,002	-0,325	-5,415	<0,001

Prikazan je multipli linearni regresijski model s PWV-om kao zavisnom varijablom. B- nestandardizirani regresijski koeficijent; SE- standardna pogreška; β- standardizirani regresijski koeficijent; tGRP- ukupni GLA-bogati protein; eGFR- procijenjena glomerularna filtracija. Statistika modela: $F(4,180) = 37,794$; $p < 0,001$; $R^2 = 0,456$.

4.7. Povezanost tGRP-a s biokemijskim pokazateljima KBB–MKP osi: multivarijatni modeli za KLb i FGF-23

Kako bi se dodatno ispitala povezanost tGRP-a s biokemijskim pokazateljima KBB–MKP osi, provedene su dvije multiple linearne regresijske analize: jedna s β -Klotho (KLb), a druga s FGF-23 kao zavisnom varijablom. U oba modela kao nezavisne varijable uključeni su eGFR i tGRP.

U modelu za regresijski model bio je statistički značajan ($F(2,78) = 204,30$; $p < 0,001$) te je objašnjavao 83,9% varijance KLb-a ($R^2 = 0,839$). U tom modelu tGRP se pokazao statistički značajnim neovisnim prediktorom, dok eGFR nije ostao značajan nakon prilagodbe. Standardizirani regresijski koeficijent za tGRP bio je vrlo visok, što upućuje na izrazito snažnu povezanost između tGRP-a i KLb-a u ovom poduzorku ispitanika.

Slično prethodnom je i model za FGF-23 bio je statistički značajan ($F(2,80) = 147,028$; $p < 0,001$) te je objašnjavao 78,5% varijance FGF-23 ($R^2 = 0,785$). U ovom je modelu tGRP ostao statistički značajan neovisni prediktor, dok eGFR nije pokazao neovisnu povezanost nakon prilagodbe. Kao i u modelu za KLb, standardizirani doprinos tGRP-a bio je izrazito velik.

Dobiveni nalazi dodatno podupiru zaključak da je tGRP u ovom istraživanju bio znatno izraženije povezan s biokemijskim obilježjima KBB–MKP osi nego sa strukturnim i funkcionalnim vaskularnim fenotipom. Drugim riječima, dok je u modelima za Kauppila zbroj i PWV za tGRP postignuta statistička značajnost uz slab učinak, u modelima za KLb i FGF-23 njegova je povezanost bila osjetno snažnija.

Ipak, ove rezultate treba tumačiti oprezno. Naime, KLb i FGF-23 bili su dostupni samo u podskupinama ispitanika, a dodatne analize pokazale su da su se ispitanici s dostupnim vrijednostima tih biomarkera razlikovali od ostatka uzorka prema spolu i bubrežnoj funkciji. Stoga se visoke vrijednosti objašnjene varijance u ovim modelima ne smiju tumačiti kao konačan dokaz izravne biološke povezanosti, nego prije kao snažan signal unutar specifičnog poduzorka, koji zahtijeva potvrdu u većim i metodološki ujednačenijim kohortama.

Ukupno gledano, rezultati ovih analiza podupiru tumačenje da tGRP u ovom istraživanju prije svega odražava biokemijski KBB–MKP profil, a manje izravno sam

vaskularni fenotip. To je u skladu s prethodnim korelacijskim i regresijskim analizama te dodatno podupire interpretaciju tGRP-a kao biomarkera poremećenog biokemijskog okoliša uznapredovale kronične bubrežne bolesti. Rezultati multiplih linearnih regresijskih modela za prediktore β -Klotho i FGF-23 prikazani su u Tablicama 7. i 8.

Tablica 7. Multipli linearni regresijski model prediktora KLb

Varijabla	B	SE	β	t	p
Konstanta	4,777	2,754	—	1,735	0,087
eGFR	-0,053	0,043	-0,057	-1,235	0,221
tGRP	0,029	0,001	0,904	19,434	<0,001

Prikazan je multipli linearni regresijski model s KLb kao zavisnom varijablom. B- nestandardizirani regresijski koeficijent; SE- standardna pogreška; β - standardizirani regresijski koeficijent; tGRP- ukupni GLA-bogati protein; eGFR- procijenjena glomerularna filtracija. Statistika modela: $F(2,78) = 204,30$; $p < 0,001$; $R^2 = 0,839$.

Tablica 8. Multipli linearni regresijski model prediktora FGF-23

Varijabla	B	SE	β	t	p
Konstanta	69,931	22,333	—	3,131	0,002
eGFR	-0,395	0,340	-0,062	-1,165	0,248
tGRP	0,210	0,013	0,875	16,558	<0,001

Prikazan je multipli linearni regresijski model s FGF-23 kao zavisnom varijablom. B- nestandardizirani regresijski koeficijent; SE- standardna pogreška; β - standardizirani regresijski koeficijent; tGRP- ukupni GLA-bogati protein; eGFR- procijenjena glomerularna filtracija. Statistika modela: $F(2,80) = 147,028$; $p < 0,001$; $R^2 = 0,785$.

4.8. Analiza dostupnosti vrijednosti KLb i FGF-23

S obzirom da vrijednosti KLb i FGF-23 nisu bile dostupne za sve ispitanike, provedena je dodatna analiza kako bi se ispitalo razlikuju li se ispitanici s dostupnim i

nedostupnim vrijednostima tih biomarkera prema odabranim kliničkim i fenotipskim obilježjima.

Analiza je pokazala da se ispitanici s dostupnim i nedostupnim vrijednostima KLb razlikuju prema spolu i eGFR-u, dok nisu utvrđene značajne razlike u dobi, prisutnosti šećerne bolesti, arterijske hipertenzije, Kauppila zbroju, PWV-u i BMI-u. Sličan obrazac opažen je i za FGF-23: značajne razlike utvrđene su prema spolu i eGFR-u, dok za ostale analizirane varijable nije bilo statistički značajnih razlika.

Ovi nalazi upućuju na mogućnost selekcijske pristranosti u podskupinama s dostupnim vrijednostima KLb i FGF-23, osobito u odnosu na spol i bubrežnu funkciju. Stoga rezultate regresijskih modela za ove biomarkere treba tumačiti oprezno, uzimajući u obzir da se ne odnose na potpuno reprezentativan presjek cjelokupnog uzorka. Istodobno, činjenica da nisu utvrđene značajne razlike u glavnim vaskularnim fenotipskim varijablama, uključujući PWV i Kauppila zbroj, djelomično podupire interpretacijsku vrijednost tih analiza. Rezultati analiza dostupnosti vrijednosti KLb i FGF-23 prikazani su u Tablicama 9. i 10.

Tablica 9. Usporedba ispitanika prema dostupnosti vrijednosti KLb

Varijabla	KLb nedostaje	KLb izmjeren	Test	p
Dob, godine	67 (62–73), n = 106	67 (61–75), n = 79	U = 4049,50	0,702
Spol, muški, n (%)	45 (42,5)	46 (58,2)	$\chi^2 = 4,507$	<0,05
Šećerna bolest, n (%)	44 (41,5)	34 (43,0)	$\chi^2 = 0,043$	>0,05
Arterijska hipertenzija, n (%)	87 (82,1)	71 (89,9)	$\chi^2 = 2,208$	>0,05
eGFR (mL/min/1,73 m ²)	36,0 (10,75–78,25), n = 106	23,0 (6,0–42,0), n = 79	U = 3254,00	0,010
Kauppila zbroj	7,0 (2,75–15,0), n = 106	12,0 (3,0–20,0), n = 79	U = 3523,00	0,065

PWV (m/s)	9,6 (8,57–10,5), n = 106	9,8 (8,4–10,7), n = 79	U = 3740,50	0,215
BMI (kg/m ²)	28,0 (26,0–30,1), n = 106	29,1 (25,5–32,9), n = 79	U = 3796,00	0,278

Kontinuirane varijable prikazane su kao medijan (interkvartilni raspon), a kategoričke kao broj i postotak, n (%). Za usporedbu kontinuiranih varijabli korišten je Mann–Whitneyjev U test, a za kategoričke hi-kvadrat test. eGFR- procijenjena glomerularna filtracija; PWV- brzina pulsnog vala; BMI- indeks tjelesne mase.

Tablica 10. Usporedba ispitanika prema dostupnosti vrijednosti FGF-23

Varijabla	FGF-23 nedostaje	FGF-23 izmjeren	Test	p
Dob, godine	68 (62–73), n = 104	67 (61–74), n = 81	U = 4194,00	0,960
Spol, muški, n (%)	44 (42,3)	47 (58,0)	$\chi^2 = 4,500$	<0,05
Šećerna bolest, n (%)	45 (43,3)	33 (40,7)	$\chi^2 = 0,119$	>0,05
Arterijska hipertenzija, n (%)	85 (81,7)	73 (90,1)	$\chi^2 = 2,208$	>0,05
eGFR (mL/min/1,73 m ²)	33,5 (10,0–78,0), n = 104	26,0 (6,0–44,0), n = 81	U = 3485,00	0,044
Kaupila zbroj	8,0 (3,0–15,0), n = 104	11,0 (2,5–20,0), n = 81	U = 3816,00	0,272
PWV (m/s)	9,65 (8,6–10,5), n = 104	9,8 (8,35–10,7), n = 81	U = 3953,50	0,215
BMI (kg/m ²)	27,95 (25,92–29,95), n = 104	29,3 (25,7–33,15), n = 81	U = 3657,00	0,125

Kontinuirane varijable prikazane su kao medijan (interkvartilni raspon), a kategoričke kao broj i postotak, n (%). Za usporedbu kontinuiranih varijabli korišten je Mann–Whitneyjev U test, a za kategoričke hi-kvadrat test. eGFR- procijenjena glomerularna filtracija; PWV- brzina pulsnog vala; BMI- indeks tjelesne mase.

Sažeto, dobiveni rezultati pokazuju da se tGRP razlikuje među skupinama ispitanika duž spektra KBB-a te da je njegova povezanost izraženija s biokemijskim pokazateljima KBB–MKP osi, nego s glavnim strukturnim i funkcionalnim vaskularnim fenotipovima. Iako je u multivarijatnim modelima za Kauppila zbroj i PWV za tGRP postignuta statistička značajnost, veličina učinka bila je skromna, dok je povezanost s KLB i FGF-23 bila osjetno snažnija. Ovakav obrazac nalaza zahtijeva pažljivu interpretaciju u kontekstu patofiziologije KBB–MKP-a, uloge tGRP-a u mineralnom stresu te metodoloških ograničenja provedenog istraživanja, što će biti razmotreno u sljedećem poglavlju.

5. RASPRAVA

U ovom istraživanju analizirana je povezanost tGRP-a s pokazateljima vaskularne kalcifikacije, arterijske krutosti i odabranim parametrima mineralnog metabolizma u ispitanika različitog stupnja bubrežne funkcije, uključujući bolesnike s KBB stadija IIIb–IV, bolesnike s terminalnim stadijem KBB na HD te ispitanike kontrolne skupine bez uznapredovale bubrežne bolesti [5,6,9].

Glavni nalazi ovog istraživanja mogu se sažeti u nekoliko točaka.

Prvo, koncentracije tGRP-a značajno su se razlikovale među ispitivanim skupinama, pri čemu je uočena nelinearna raspodjela vrijednosti, s najnižim koncentracijama u skupini bolesnika s KBB stadija IIIb–IV i višim vrijednostima u kontrolnoj i HD skupini [46,47,123].

Drugo, pokazatelji vaskularne kalcifikacije i arterijske krutosti rasli su očekivano s progresijom bubrežne bolesti, potvrđujući da se u uznapredovalo KBB kumulativno povećava opterećenje vaskularnim oštećenjem [17,25,130,142].

Treće, unatoč mehanističkoj utemeljenosti GRP-a kao inhibitora patološke mineralizacije, u ovoj kohorti nije potvrđena njegova neovisna povezanost s morfološkim pokazateljima vaskularne kalcifikacije, niti s PWV-om kao funkcionalnim pokazateljem arterijske krutosti [41,42,124].

Nasuprot tomu, tGRP je pokazao značajnije odnose s parametrima KBB–MKP osi, osobito s FGF-23 i KLb, što upućuje na mogućnost da cirkulirajući tGRP u bolesnika s KBB odražava prije svega poremećeni biokemijski i regulatorni okoliš mineralnog metabolizma, a manje već formirani vaskularni fenotip [87,123,147]. Ovi nalazi prethodno su prikazani u našem izvornom radu objavljenom u časopisu *Journal of Clinical Medicine* [146].

Takav obrazac nalaza važan je jer smješta GRP u realniji patofiziološki okvir. Naime, u eksperimentalnim i translacijskim istraživanjima GRP se sve više prepoznaje kao protein s antikalcifikacijskim, imunomodulacijskim i protuupalnim svojstvima, uključen u regulaciju mineralizacije, komunikaciju putem EV-a i modulaciju fenotipa VSMC-a [120,126,148,149]. Upravo zato rezultati ovog rada pridonose razjašnjavanju pitanja odražava li cirkulirajući tGRP u KBB populaciji prije svega aktivne regulatorne procese povezane s KBB–MKP-om, ili pak predstavlja izravan biljeg opterećenja vaskularnom kalcifikacijom. Naši rezultati više podupiru prvo tumačenje [46,47].

Jedan od najupečatljivijih nalaza ovog rada jest činjenica da se tGRP značajno razlikovao među skupinama, ali ne na jednostavno linearan način. Intuitivno bi se moglo očekivati da biljeg koji je povezan s poremećenim mineralnim metabolizmom i vaskularnom kalcifikacijom progresivno raste ili pada usporedno s pogoršanjem bubrežne funkcije. Međutim, naši rezultati ukazuju na složeniji obrazac, što sugerira da tGRP ne odražava samo stupanj bubrežnog oštećenja, nego vjerojatno i promjene u ekspresiji, potrošnji, klirensu, posttranslacijskim modifikacijama te biološkoj ulozi proteina u različitim fazama bolesti [42,116,123,146].

Jedno od mogućih objašnjenja nižih vrijednosti tGRP-a u bolesnika s KBB stadija IIIb–IV jest da upravo u toj fazi dolazi do intenziviranja ranih poremećaja mineralnog metabolizma, fosfatnog opterećenja, upalnih podražaja i promjene fenotipa VSMC-a, pri čemu se zaštitni inhibitori ektopične mineralizacije relativno troše, nedostavno sintetiziraju ili postaju funkcionalno nedostatni [13,14,65]. Takav model podsjeća na ono što se u literaturi opisuje i za druge proteine uključene u zaštitu od kalcifikacije, osobito u kontekstu vitamin K-ovisnih inhibitora poput MGP-a, kod kojih ukupna koncentracija ne mora nužno odgovarati stvarnoj biološkoj aktivnosti [35,37,79,118]. Drugim riječima, u intermedijarnim fazama KBB moguće je postojanje svojevrsnog relativnog deficita funkcionalne zaštite, čak i ako ukupne cirkulirajuće koncentracije nekog proteina ne upućuju jasno na takvo stanje [36,77,78].

S druge strane, više vrijednosti tGRP-a u HD skupini ne moraju značiti povoljniji ili zaštitniji profil [47,123]. U terminalnoj fazi KBB-a i tijekom kronične HD dolazi do dubokih promjena unutarnjeg okoliša: izraženije retencije uremijskih toksina, jačeg upalnog stanja, težih poremećaja fosfatno-kalcijskog metabolizma, hormonalne disregulacije i promjene sinteze i razgradnje brojnih proteina [10,82,83]. U takvim okolnostima povišenje tGRP-a može odražavati kompenzatorno pojačanu ekspresiju, smanjen klirens, nakupljanje nefunkcionalnih oblika ili povećano otpuštanje iz tkiva, a ne nužno povećanje efektivne antikalcifikacijske aktivnosti [42,116,126]. Ovdje je osobito važno naglasiti da je u ovom istraživanju mjeren tGRP, a ne pojedine funkcionalne frakcije, primjerice karboksilirani i nekarboksilirani oblici. Budući da biološka aktivnost vitamin K-ovisnih proteina u velikoj mjeri ovisi o posttranslacijskoj γ -karboksilaciji, određivanje samo ukupne koncentracije može prikriti ključne razlike između biološki aktivnog i neaktivnog proteina [35,75,119].

Naši rezultati pokazali su da su i slikovni pokazatelji vaskularne kalcifikacije i funkcionalni pokazatelji arterijske krutosti bili izraženiji u uznapredovalijim stadijima bubrežne bolesti, osobito u bolesnika na HD [20,131,144]. Takav nalaz u potpunosti je u skladu s današnjim razumijevanjem KBB-a kao sustavne bolesti obilježene progresivnim mineralnim stresom, kroničnom upalom, oksidativnim stresom, endotelnom disfunkcijom, promjenama u vaskularnom glatkom mišićju i poremećenim inhibitorima i promotorima kalcifikacije [5,11,12,30]. U tom smislu naši podaci ne predstavljaju iznenađenje, nego potvrdu da je ispitivana kohorta biološki konzistentna s očekivanim KBB–MKP fenotipom [9].

Vaskularna kalcifikacija u KBB nije pasivno taloženje kalcija i fosfata, nego aktivno reguliran proces koji uključuje osteohondrogenu transdiferencijaciju VSMC-a, stvaranje i sazrijevanje CPP-a, gubitak endogenih inhibitora mineralizacije te kompleksno međudjelovanje lokalnih i sistemskih medijatora [31,80,81]. S progresijom bubrežne bolesti dolazi do retencije fosfata i hormonalnih promjena koje uključuju FGF-23, Klotho, PTH i vitamin D os, a sve to pridonosi stvaranju prokalcifikacijskog okruženja [14,87]. U tom je kontekstu logično da morfološki pokazatelji kalcifikacije i arterijska krutost rastu kako bolest napreduje [15,113].

Važno je međutim naglasiti da vaskularna kalcifikacija i arterijska krutost, iako usko povezane, nisu potpuno istovjetni fenomeni [24,25]. Kalcifikacija je prije svega strukturna promjena, dok PWV predstavlja integrirani funkcionalni pokazatelj koji ovisi ne samo o kalcifikaciji, nego i o dobi, vrijednostima arterijskog tlaka, elastičnosti žilne stijenke, remodeliranju medije, kolagenskom sastavu i akutnom hemodinamskom statusu [16,24]. Stoga je metodološki i patofiziološki očekivano da se neki biljeg može pokazati povezanijim s jednim od tih fenomena, a ne s drugim.

Iako je GRP u eksperimentalnim modelima prepoznat kao inhibitor ektopične mineralizacije, u ovoj kohorti nismo dokazali njegovu neovisnu povezanost sa slikovnim pokazateljima vaskularne kalcifikacije [41,125]. Takav nalaz može se na prvi pogled doimati suprotnim biološkoj ulozi proteina, no zapravo je vrlo vjerojatno rezultat razlike između lokalne tkivne biologije i cirkulirajućeg biljega u presječnoj kliničkoj studiji [46,47,122].

Prvo, vaskularna kalcifikacija je dugotrajan, kumulativan i u značajnoj mjeri ireverzibilan proces [19,58]. Jednokratno mjerenje cirkulirajućeg tGRP-a predstavlja

snimku trenutnog biokemijskog stanja, dok slikovne metode registriraju rezultat višemjesečne ili višegodišnje izloženosti prokalcifikacijskom okolišu [22,28]. Stoga odsustvo presječne povezanosti između jednog biomarkera i slikovno vidljive kalcifikacije ne isključuje biološku uključenost tog biomarkera u ranije faze patološkog procesa [46,47].

Drugo, lokalna tkivna ekspresija GRP-a i njegova prisutnost u ekstracelularnom matriksu (ECM) ili u kalciproteinskim kompleksima mogu biti mnogo relevantniji za stvarni antikalcifikacijski učinak od same cirkulirajuće koncentracije [42,122,150]. Drugim riječima, količina tGRP-a mjerena u serumu ili plazmi možda nije dobar pokazatelj za ono što se događa u stijenci aorte, arterijama srednjeg kalibra ili zaliscima [41,42].

Treće, u populaciji s KBB-om vaskularna kalcifikacija snažno je određena dobi, dijabetesom, trajanjem bubrežne bolesti, opsegom fosfatnog opterećenja, dijaliznim stažem i nizom drugih čimbenika [5,59]. U našim multivarijantnim modelima upravo su dob, dijabetes i bubrežna funkcija bili važni prediktori kalcifikacijskog opterećenja, što upućuje na to da potencijalni signal tGRP-a, ako postoji, može biti slabiji i nadjačan dominantnim kliničkim determinantama.

Četvrto, pitanje funkcionalnih frakcija ovdje je vjerojatno od presudne važnosti. Ako se antikalcifikacijska aktivnost GRP-a oslanja na adekvatnu γ -karboksilaciju i dodatne posttranslacijske modifikacije, tada ukupna koncentracija može biti biološki nijema mjera [37,75]. Slično iskustvo već postoji s drugim vitamin K-ovisnim proteinima, osobito MGP-om, kod kojeg je upravo diferencijacija funkcionalnih oblika bitna za interpretaciju povezanosti s vaskularnom kalcifikacijom [79,118]. Naši rezultati stoga ne opovrgavaju antikalcifikacijsku ulogu GRP-a, nego prije ukazuju na to da ukupni cirkulirajući tGRP možda nije optimalan klinički marker etablirane vaskularne kalcifikacije [46,47].

Slično kao i za vaskularnu kalcifikaciju, u našoj kohorti nije potvrđena robustna neovisna povezanost tGRP-a s PWV-om. Taj je nalaz također važno pažljivo interpretirati. Arterijska krutost u KBB-u nastaje kao posljedica više međusobno povezanih procesa, koji uključuju gubitak elastičnih vlakana, povećano odlaganje kolagena, kalcifikaciju medije, hipertenziju, volumno opterećenje, promjene tonusa glatkih mišića i starenje žilne stijenke [11,16,25]. Drugim riječima, PWV nije samo

prozor u kalcifikaciju, nego integrirani završni funkcionalni ishod mnogih kroničnih vaskularnih promjena [16].

Zbog toga je sasvim moguće da pojedini biljeg povezan s KBB–MKP osovinom neće pokazati linearnu ili izravnu korelaciju s PWV-om, osobito kada je riječ o heterogenoj populaciji s različitim stupnjem bubrežnog oštećenja, dobi i komorbiditetima [24,130]. U našem istraživanju dob i eGFR pokazali su očekivano važnu povezanost s PWV-om, što je u skladu s poznatom činjenicom da su starenje i pogoršanje bubrežne funkcije među najvažnijim determinantama arterijske krutosti [15,130].

Ovaj nalaz može se tumačiti i kroz širi koncept mineralnog stresa i CPP-a. Noviji podaci dodatno podupiru koncept da CPP nisu samo pokazatelj poremećenog mineralnog okoliša, nego i aktivni medijatori vaskularne disfunkcije i arterijske krutosti, s negativnim učinkom na vaskularne stanice i biomehanička svojstva žile [31,151]. U tom okviru GRP može biti bliže regulatorima i modulatorima tih procesa nego samom završnom funkcionalnom izrazu u obliku povišenog PWV-a [42,149].

U interpretaciji ovih nalaza važno je uzeti u obzir i metodološki aspekt mjerenja arterijske krutosti u našem istraživanju. Naime, PWV nije bio mjeren strogo u istom vremenskom trenutku u odnosu na uključivanje za sve ispitanike, nego je zbog ograničene dostupnosti uređaja bio prikupljan u zasebnom mjernom ciklusu. Stoga PWV ne treba promatrati kao potpuno uniformni početni parametar za cijelu kohortu, nego kao jednokratnu funkcionalnu procjenu vaskularnog fenotipa u sklopu istraživačkog protokola. Takva vremenska neujednačenost mogla je dodatno oslabiti mogućnost detekcije suptilnijih povezanosti između tGRP-a i arterijske krutosti, osobito ako se uzme u obzir da i biomarker i funkcionalna vaskularna svojstva mogu varirati tijekom progresije bolesti i pod utjecajem interkurentnih kliničkih čimbenika. Zbog toga skromnu povezanost između tGRP-a i PWV-a treba tumačiti oprezno, kao nalaz koji ne podupire snažan i izravan odnos tGRP-a s arterijskom krutošću, ali ne isključuje mogućnost slabijih ili vremenski osjetljivih povezanosti koje bi se jasnije pokazale u strogo sinkroniziranom ili longitudinalnom dizajnu.

Za interpretaciju naših rezultata osobito je važna povezanost tGRP-a s FGF-23 i KLb [89,90]. Dok se veza s vaskularnim fenotipom nije pokazala dovoljno snažnom, odnosi s ovim parametrima upućuju na to da tGRP sudjeluje u biokemijskom i

regulatornom okolišu KBB–MKP-a [87,123]. Upravo je to možda ključna poruka ovog rada.

FGF-23 je jedan od središnjih hormona poremećenog mineralnog metabolizma u KBB. Njegovo povišenje pojavljuje se rano tijekom progresije bolesti, prije nego što postanu jasno izražene neke druge laboratorijske abnormalnosti, i odražava pokušaj organizma da održi fosfatnu ravnotežu [87]. Istodobno, kronično povišeni FGF-23 povezan je s nepovoljnim kardiovaskularnim i bubrežnim ishodima te s vaskularnim remodeliranjem [147]. Ako je tGRP povezan s FGF-23, to može značiti da sudjeluje u istoj patofiziološkoj zoni, odnosno u ranom i trajnom odgovoru na mineralni stres, fosfatno opterećenje i progresivno narušenu homeostazu [87,123].

Povezanost s KLb dodatno čini ovu priču zanimljivom. Premda se u kontekstu KBB češće naglašava α -Klotho, svaka konzistentna povezanost GRP-a s Klotho osi sugerira da bi ovaj protein mogao biti integriran u širi regulatorni odgovor koji povezuje mineralni metabolizam, stanični stres, diferencijaciju i kalcifikacijske procese [89,90]. Važno je i to da je novija metaanaliza pokazala povezanost FGF-23 i Klotho osi s arterijskom kalcifikacijom, debljinom stijenke i arterijskom krutosti, što dodatno podupire interpretaciju da je tGRP u našoj kohorti bliži KBB–MKP regulatornom okolišu nego samom konačnom vaskularnom fenotipu [152]. U našim regresijskim modelima tGRP se zadržao kao značajan prediktor FGF-23 i KLb, dok su njegove neovisne povezanosti s PWV-om i slikovno određenim stupnjem kalcifikacije bile znatno skromnije, što podupire tumačenje da tGRP prije odražava poremećeni molekularni okoliš koji pogoduje kalcifikaciji, nego opseg već razvijenog vaskularnog oštećenja [146].

Važno je naglasiti da FGF-23 i KLb nisu bili dostupni za sve uključene ispitanike, nego za podskupine sudionika. Razlog tomu nisu bili unaprijed planirana selekcija ni klinički odabir ispitanika, nego tehničko-logistički problemi tijekom pohrane biomaterijala, uključujući kvar zamrzivača i posljedično djelomično otapanje dijela uzoraka, zbog čega dio prethodno prikupljenog materijala nije bio prikladan za daljnju analizu. Dodatna analiza dostupnosti pokazala je da su se ispitanici s dostupnim mjerenjima u oba slučaja razlikovali prvenstveno prema spolu i bubrežnoj funkciji: u podskupinama s izmjerenim KLb i FGF-23 je bio veći udio muškaraca uz niže izmjerene vrijednosti eGFR-a u odnosu na ispitanike bez dostupnih mjerenja, dok nisu

utvrđene značajne razlike u dobi, prisutnosti šećerne bolesti, arterijske hipertenzije, PWV-u i BMI-u i Kauppila zbroju, uz tek graničnu tendenciju prema višim vrijednostima u podskupini s dostupnim KLB (Tablice 9. i 10.). To upućuje na mogućnost selekcijske pristranosti prvenstveno u odnosu na spol i težinu bubrežne disfunkcije, a manje u odnosu na glavne vaskularne fenotipske pokazatelje. Stoga povezanosti tGRP-a s FGF-23 i β -Klothom treba smatrati biološki informativnima, ali ih interpretirati uz oprez i potvrditi u većim kohortama sa sustavno dostupnim uzorcima.

Rezultate ovog rada potrebno je promatrati u svjetlu rastuće, ali još uvijek relativno ograničene literature o GRP-u u KBB i vaskularnoj biologiji [120,126]. Dosadašnja istraživanja uglavnom podupiru tezu da GRP ima biološka svojstva inhibitora patološke mineralizacije te da može sudjelovati u modulaciji upale, diferencijacije stanica i interakciji s mineralnim kompleksima [41,148]. Posebno su važni noviji podaci koji ukazuju da GRP utječe na osteogenu diferencijaciju VSMC-a, mineralizacijska svojstva EV-a i imunomodulatorne puteve, čime se dodatno proširuje njegovo mjesto u suvremenom modelu vaskularne kalcifikacije [149].

U translacijskim istraživanjima nije neuobičajeno da protein s jasnom biološkom ulogom u tkivu ne pokazuje jednako jasnu ili linearnu povezanost kada se mjeri u perifernoj krvi [46,47]. Razlozi za to su brojni: razlika između lokalne i sistemske ekspresije, heterogenost populacije, utjecaj bubrežnog klirensa, posttranslacijske modifikacije, vremenska nepodudarnost između biljega i kliničkog fenotipa te ograničenja samih metoda mjerenja [32,116]. Naši nalazi stoga nisu u suprotnosti s eksperimentalnim konceptom antikalcifikacijskog djelovanja GRP-a, nego upućuju na potrebu oprezne kliničke interpretacije cirkulirajućeg tGRP-a [41,42].

Iz kliničke perspektive naši rezultati sugeriraju da tGRP, barem kada se određuje kao ukupna cirkulirajuća koncentracija, vjerojatno nema dovoljnu snagu da se koristi kao samostalan marker vaskularne kalcifikacije ili arterijske krutosti u bolesnika s KBB-om [46,47]. To je važno naglasiti kako bi se izbjegla pretjerana interpretacija biomarkera koji je biološki zanimljiv, ali još nema jasno definiranu kliničku ulogu [36,78].

Međutim, istodobno bi bilo pogrešno zaključiti da je GRP klinički nevažan. Naprotiv, naši rezultati upućuju na to da bi njegova potencijalna primjena mogla biti drukčija od one koja se na prvi pogled očekuje. Umjesto da bude marker već nastalih

vaskularnih promjena, tGRP bi mogao biti koristan kao komponenta šire platforme biljega za procjenu poremećenog KBB–MKP okoliša, osobito u kombinaciji s FGF-23, Klotho, MGP-om, fetuinom-A i drugim parametrima mineralnog metabolizma [31,80,87].

Rezultate ovog istraživanja potrebno je interpretirati u svjetlu nekoliko važnih ograničenja.

Prvo, riječ je o opservacijskom istraživanju s pretežito presječnim dizajnom, što onemogućuje zaključivanje o uzročnosti [46,47].

Drugo, istraživanje je provedeno u jednoj ustanovi i na umjereno velikom uzorku, što može ograničiti generalizabilnost nalaza.

Treće, mjereno je tGRP, a ne njegove funkcionalne frakcije, što je vjerojatno jedno od najvažnijih ograničenja jer antikalciifiacijska i biološka aktivnost vitamin K-ovisnih proteina ne ovisi samo o njihovoj ukupnoj koncentraciji nego i o njihovom stupnju posttranslacijske aktivacije [35,116,119].

Četvrto, procjena vaskularne kalcifikacije temeljila se na semikvantitativnim metodama koje su klinički korisne, ali ipak ne pružaju istu razinu detaljnosti kao naprednije tomografske kvantifikacijske metode [22,23].

Peto, PWV, iako klinički relevantan pokazatelj arterijske krutosti, podložan je utjecaju hemodinamskih i tehničkih čimbenika [16]. Dodatno, mjerenje PWV-a nije za sve ispitanike bilo provedeno strogo u istom vremenskom trenutku u odnosu na uključivanje i uzorkovanje, nego u sklopu zasebnog mjernog ciklusa uvjetovanog dostupnošću uređaja. Stoga se povezanosti PWV-a s biokemijskim pokazateljima trebaju tumačiti kao odnosi između jednokratno procijenjenih obilježja vaskularnog i biokemijskog fenotipa, a ne kao strogo sinkrone ili longitudinalne promjene.

Šesto, FGF-23 i KLb nisu bili dostupni za sve uključene ispitanike, nego za podskupine sudionika, i to ne zbog unaprijed planirane selekcije ni kliničkog odabira, nego zbog tehničko-logističkih problema tijekom pohrane biomaterijala, uključujući kvar zamrzivača i posljedično djelomično otapanje dijela uzoraka, zbog čega dio prethodno prikupljenog materijala nije bio prikladan za daljnju analizu. Dodatne analize pokazale su da su se ispitanici s dostupnim mjerenjima FGF-23 i KLb razlikovali od ostatka uzorka prvenstveno prema spolu i bubrežnoj funkciji, uz veći udio muškaraca

i niže vrijednosti eGFR-a, dok za glavne vaskularne fenotipske pokazatelje, uključujući PWV i Kauppila zbroj, nisu utvrđene značajne razlike, osim granične tendencije prema višim vrijednostima Kauppila zbroja u podskupini s dostupnim KLb-om. Zbog toga se ne može u potpunosti isključiti mogućnost selekcijske pristranosti, osobito u odnosu na spol i težinu bubrežne disfunkcije pa rezultate ovih analiza treba smatrati biološki relevantnima i informativnima, ali ih je potrebno potvrditi u većim i metodološki ujednačenijim kohortama.

Sveukupno, rezultati ovog istraživanja sugeriraju da je tGRP u bolesnika s KBB-om uključen u poremećeni biokemijski okoliš KBB–MKP-a, ali se ne ponaša kao robustan samostalan marker već razvijene vaskularne kalcifikacije, ni arterijske krutosti [46,47].

Njegova nelinearna distribucija među skupinama upućuje na složenu biologiju povezanu s progresijom bubrežne bolesti, kompenzacijskim odgovorima, mogućim promjenama klirensa i činjenicom da ukupna koncentracija ne odražava nužno funkcionalnu aktivnost proteina [37,116,123].

U tom smislu naši nalazi podupiru koncept prema kojem GRP treba promatrati prije svega kao dio šire mreže regulatora mineralnog stresa i ektopične kalcifikacije, a ne kao izolirani klinički biljeg vaskularnog fenotipa [31,80,125,149]. Njegova potencijalna vrijednost stoga vjerojatnije leži u rasvjetljavanju podloge poremećenog mineralnog metabolizma i vaskularne kalcifikacije u KBB-u, nego u samostalnoj kliničkoj primjeni kao biljega već razvijeno vaskularnog oštećenja [87,123,125].

6. ZAKLJUČCI

1. Koncentracije tGRP-a značajno su se razlikovale među ispitivanim skupinama, pri čemu je uočena nelinearna raspodjela vrijednosti, s najnižim koncentracijama u bolesnika s KBB stadija IIIb–IV te višim vrijednostima u kontrolnoj i HD skupini.
2. Pokazatelji vaskularne kalcifikacije i arterijske krutosti bili su izraženiji u uznapređovalijim stadijima KBB, osobito u bolesnika na HD, što potvrđuje povezanost progresije bubrežne disfunkcije s rastućim vaskularnim opterećenjem.
3. tGRP nije se pokazao kao robustan samostalan biljeg već razvijene vaskularne kalcifikacije, ni arterijske krutosti. Iako je u multivarijatnim modelima zadržao statistički značajnu, ali skromnu povezanost s Kauppila zbrojem i PWV-om, veličina tog učinka bila je manja od učinka dobi, šećerne bolesti i bubrežne funkcije, dok su povezanosti s FGF-23 i KLb bile izraženije.
4. tGRP je pokazao značajnije odnose s parametrima KBB–MKP osi, osobito s FGF-23 i KLb, nego s morfološkim i funkcionalnim vaskularnim fenotipom, što sugerira da vjerojatnije odražava poremećeni biokemijski i regulatorni okoliš mineralnog metabolizma nego opseg već uspostavljene vaskularne kalcifikacije.
5. Dob, dijabetes i bubrežna funkcija pokazali su se važnijim odrednicama vaskularne kalcifikacije i arterijske krutosti od tGRP-a, što podupire koncept da je vaskularni fenotip u KBB-u rezultat složenog međudjelovanja brojnih kliničkih i metaboličkih čimbenika.
6. Rezultate povezanosti tGRP-a s FGF-23 i KLb treba tumačiti uz oprez zbog dostupnosti tih parametara samo u podskupinama ispitanika, pri čemu je manji broj uzoraka bio posljedica tehničko-logističkih problema tijekom pohrane biomaterijala, uključujući kvar zamrzivača i djelomično otapanje dijela uzoraka.
7. Ukupno gledajući, nalazi ovog istraživanja podupiru koncept prema kojemu GRP treba promatrati prije svega kao dio šire mreže regulatora mineralnog stresa i ektopične kalcifikacije u KBB, a ne kao izolirani klinički biljeg već razvijenog vaskularnog oštećenja.

8. Nelinearan obrazac raspodjele tGRP-a među skupinama upućuje na to da se biologija GRP-a u KBB-u ne može tumačiti kao jednostavan linearni odraz pogoršanja bubrežne funkcije, nego vjerojatno uključuje složene promjene u ekspresiji, klirensu, funkcionalnoj aktivaciji i odgovoru na mineralni stres.
9. Mjerenje ukupnog tGRP-a, bez razlikovanja njegovih funkcionalnih frakcija, predstavlja važno metodološko ograničenje i ujedno upućuje na potrebu da buduća istraživanja preciznije razjasne odnos između karboksilacijskog statusa GRP-a, KBB–MKP poremećaja i vaskularnog fenotipa.

7. LITERATURA

1. KDIGO 2024 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int.* 2024;105(4S):S117-S314. doi:10.1016/S0085-2538(24)00110-8.
2. Francis A, Harhay MN, Ong ACM i sur. Chronic kidney disease and the global public health agenda: an international consensus. *Nat Rev Nephrol.* 2024;20(7):473–85. doi:10.1038/S41581-024-00820-6.
3. Kovesdy CP. Epidemiology of chronic kidney disease: an update 2022. *Kidney Int Suppl* (2011). 2022;12(1):7–11. doi:10.1016/J.KISU.2021.11.003.
4. Mark PB, Stafford LK, Grams ME i sur. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease in adults, 1990–2023, and its attributable risk factors: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2023. *The Lancet.* 2025;406(10518):2461–82. doi:10.1016/S0140-6736(25)01853-7.
5. Jankowski J, Floege J, Fliser D, Böhm M, Marx N. Cardiovascular Disease in Chronic Kidney Disease: Pathophysiological Insights and Therapeutic Options. *Circulation.* 2021;143(11):1157–72. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.120.050686.
6. Zoccali C, Mallamaci F, Adamczak M i sur. Cardiovascular complications in chronic kidney disease: a review from the European Renal and Cardiovascular Medicine Working Group of the European Renal Association. *Cardiovasc Res.* 2023;119(11):2017–32. doi:10.1093/CVR/CVAD083.
7. Marx-Schütt K, Cherney DZI, Jankowski J, Matsushita K, Nardone M, Marx N. Cardiovascular disease in chronic kidney disease. *Eur Heart J.* 2025;46(23):2148–60. doi:10.1093/EURHEARTJ/EHAF167.
8. Vondenhoff S, Schunk SJ, Noels H. Increased cardiovascular risk in patients with chronic kidney disease. *Herz.* 2024;49(2):95–104. doi:10.1007/S00059-024-05235-4.
9. KDIGO 2017 Clinical Practice Guideline Update for the Diagnosis, Evaluation, Prevention, and Treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl* (2011). 2017;7(1):1–59. doi:10.1016/J.KISU.2017.04.001.
10. Ravid JD, Chitalia VC. Molecular Mechanisms Underlying the Cardiovascular Toxicity of Specific Uremic Solutes. *Cells.* 2020;9(9):1–18. doi:10.3390/CELLS9092024.
11. Lo Cicero L, Lentini P, Sessa C i sur. Inflammation and Arterial Stiffness as Drivers of Cardiovascular Risk in Kidney Disease. *Cardiorenal Med.* 2025;15(1):29–40. doi:10.1159/000542965.
12. Siracusa C, Carabetta N, Morano MB i sur. Understanding Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease: Pathogenesis and Therapeutic Implications. *Int J Mol Sci.* 2024;25(23). doi:10.3390/IJMS252313096.
13. Ketteler M, Evenepoel P, Holden RM i sur. Chronic kidney disease-mineral and bone disorder: conclusions from a Kidney Disease: Improving Global

- Outcomes (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney Int.* 2025;107(3):405–23. doi:10.1016/J.KINT.2024.11.
14. Salera D, Merkel N, Bellasi A, de Borst MH. Pathophysiology of chronic kidney disease-mineral bone disorder (CKD-MBD): from adaptive to maladaptive mineral homeostasis. *Clin Kidney J.* 2025;18(Suppl1):i3–14. doi:10.1093/CKJ/SFAE431.
 15. Townsend RR, Anderson AH, Chirinos JA i sur. Association of Pulse Wave Velocity With Chronic Kidney Disease Progression and Mortality: Findings From the CRIC Study (Chronic Renal Insufficiency Cohort). *Hypertension.* 2018;71(6):1101–7. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.10648.
 16. Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L i sur. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J.* 2006;27(21):2588–605. doi:10.1093/EURHEARTJ/EHL254.
 17. Paloian NJ, Giachelli CM. A current understanding of vascular calcification in CKD. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014;307(8):F891–900. doi:10.1152/AJPRENAL.00163.2014.
 18. Jablonski KL, Chonchol M. Vascular calcification in end-stage renal disease. *Hemodial Int.* 2013;17 Suppl1(01):S17-21. doi:10.1111/HDI.12084.
 19. Goodman WG, London G. Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease. *Am J Kidney Dis.* 2004;43(3):572–9. doi:10.1053/j.ajkd.2003.12.005.
 20. Floege J, Ketteler M. Vascular calcification in patients with end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2004;19(Suppl5):V59-66. doi:10.1093/NDT/GFH1058.
 21. Lanzer P, Boehm M, Sorribas V i sur. Medial vascular calcification revisited: review and perspectives. *Eur Heart J.* 2014;35(23):1515–25. doi:10.1093/EURHEARTJ/EHU163.
 22. Wilson PWF, Kauppila LI, O'Donnell CJ i sur. Abdominal aortic calcific deposits are an important predictor of vascular morbidity and mortality. *Circulation.* 2001;103(11):1529–34. doi:10.1161/01.CIR.103.11.1529.
 23. Leow K, Szulc P, Schousboe JT i sur. Prognostic Value of Abdominal Aortic Calcification: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *J Am Heart Assoc.* 2021;10(2):1–19. doi:10.1161/JAHA.120.017205.
 24. Lioufas N, Hawley CM, Cameron JD, Toussaint ND. Chronic Kidney Disease and Pulse Wave Velocity: A Narrative Review. *Int J Hypertens.* 2019;2019:9189362. doi:10.1155/2019/9189362.
 25. Zanolli L, Lentini P, Briet M i sur. Arterial Stiffness in the Heart Disease of CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2019;30(6):918–28. doi:10.1681/ASN.2019020117.
 26. Blacher J, Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ, Safar ME, London GM. Impact of aortic stiffness on survival in end-stage renal disease. *Circulation.* 1999;99(18):2434–9. doi:10.1161/01.cir.99.18.2434.

27. Guerin AP, Blacher J, Pannier B, Marchais SJ, Safar ME, London GM. Impact of aortic stiffness attenuation on survival of patients in end-stage renal failure. *Circulation*. 2001;103(7):987–92. doi:10.1161/01.CIR.103.7.987.
28. Kauppila LI, Polak JF, Cupples LA, Hannan MT, Kiel DP, Wilson PWF. New indices to classify location, severity and progression of calcific lesions in the abdominal aorta: a 25-year follow-up study. *Atherosclerosis*. 1997;132(2):245–50. doi:10.1016/S0021-9150(97)00106-8.
29. Honkanen E, Kauppila L, Wikström B i sur. Abdominal aortic calcification in dialysis patients: results of the CORD study. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23(12):4009. doi:10.1093/NDT/GFN403.
30. Palamar M, Grosu Radulescu ID, Tanasescu MD, Sircuta A, Bob F. Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease and Hemodialysis: Pathophysiological Mechanisms and Emerging Biomarkers. *Medicina*. 2025;61(12):2169. doi:10.3390/MEDICINA61122169.
31. Smith ER, Holt SG. The formation and function of calciprotein particles. *Pflugers Arch*. 2025;477(6):753–72. doi:10.1007/s00424-025-03083-7.
32. Adoberg A, Leis L, Luman M i sur. Vascular calcification inhibitors in chronic kidney disease. *Clinica Chimica Acta*. 2025;572:120271. doi:10.1016/J.CCA.2025.120271.
33. Silaghi CN, Ilyés T, Van Ballegooijen AJ, Crăciun AM. Calciprotein Particles and Serum Calcification Propensity: Hallmarks of Vascular Calcifications in Patients with Chronic Kidney Disease. *J Clin Med*. 2020;9(5):1287. doi:10.3390/JCM9051287.
34. Pasch A, Farese S, Gräber S i sur. Nanoparticle-based test measures overall propensity for calcification in serum. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(10):1744–52. doi:10.1681/ASN.2012030240.
35. Schurgers LJ, Cranenburg ECM, Vermeer C. Matrix Gla-protein: the calcification inhibitor in need of vitamin K. *Thromb Haemost*. 2008;100(4):593–603. doi:10.1160/TH08-02-0087.
36. Shea MK, Booth SL. Vitamin K, Vascular Calcification, and Chronic Kidney Disease: Current Evidence and Unanswered Questions. *Curr Dev Nutr*. 2019;3(9):nzz077. doi:10.1093/CDN/NZZ077.
37. Schurgers LJ, Uitto J, Reutelingsperger CP. Vitamin K-dependent carboxylation of matrix Gla-protein: A crucial switch to control ectopic mineralization. *Trends Mol Med*. 2013;19(4):217–26. doi:10.1016/j.molmed.2012.12.008.
38. Cranenburg ECM, Schurgers LJ, Uiterwijk HH i sur. Vitamin K intake and status are low in hemodialysis patients. *Kidney Int*. 2012;82(5):605–10. doi:10.1038/KI.2012.191.

39. Krueger T, Westenfeld R, Ketteler M, Schurgers LJ, Floege J. Vitamin K deficiency in CKD patients: a modifiable risk factor for vascular calcification? *Kidney Int.* 2009;76(1):18–22. doi:10.1038/KI.2009.126.
40. Tybjaerg Wegge V, Kjær Torbensen M, Linneberg A, Aaberg Lauridsen J. The Role of Vitamin K Deficiency in Chronic Kidney Disease—A Scoping Review. *Nutrients.* 2025;17(15):2559. doi:10.3390/NU17152559.
41. Viegas CSB, Rafael MS, Enriquez JL i sur. Gla-rich protein acts as a calcification inhibitor in the human cardiovascular system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(2):399–408. doi:10.1161/ATVBAHA.114.304823.
42. Viegas CSB, Santos L, Macedo AL i sur. Chronic kidney disease circulating calcioprotein particles and extracellular vesicles promote vascular calcification: A role for GRP (Gla-Rich Protein). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38(3):575–87. doi:10.1161/ATVBAHA.117.310578.
43. Viegas CS, Simes DC. Gla-rich Protein (GRP): A New Player In The Burden Of Vascular Calcification. *J Cardiovasc Dis Diagn.* 2016;4(4). doi:10.4172/2329-9517.1000245.
44. Loncaric A, Baticic L. Gla-Rich Protein (GRP): A Vitamin K-Dependent Regulator of Vascular Calcification, Inflammation, and Mineral Homeostasis. *Curr Issues Mol Biol.* 2026;48(5):458. doi:10.3390/CIMB48050458.
45. Viegas CSB, Herfs M, Rafael MS i sur. Gla-rich protein is a potential new vitamin K target in cancer: Evidences for a direct GRP-mineral interaction. *Biomed Res Int.* 2014;2014:340216. doi:10.1155/2014/340216.
46. Silva AP, Viegas CSB, Mendes F i sur. Gla-Rich Protein (GRP) as an Early and Novel Marker of Vascular Calcification and Kidney Dysfunction in Diabetic Patients with CKD: A Pilot Cross-Sectional Study. *J Clin Med.* 2020;9(3):635. doi:10.3390/jcm9030635.
47. Marreiros C, Viegas C, Guedes AM i sur. Gla-Rich Protein Is Associated with Vascular Calcification, Inflammation, and Mineral Markers in Peritoneal Dialysis Patients. *J Clin Med.* 2024;13(23):7429. doi:10.3390/jcm13237429.
48. Kurtulus B, Atilgan N, Yilmaz M, Dokuyucu R. Two Members of Vitamin-K-Dependent Proteins, Gla-Rich Protein (GRP) and Matrix Gla Protein (MGP), as Possible New Players in the Molecular Mechanism of Osteoarthritis. *J Clin Med.* 2024;13(17):5159. doi:10.3390/JCM13175159.
49. Cavaco S, Viegas CSB, Rafael MS i sur. Gla-rich protein is involved in the cross-talk between calcification and inflammation in osteoarthritis. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(5):1051–65. doi:10.1007/s00018-015-2033-9.
50. Bordoloi J, Dihingia A, Kalita J, Manna P. Implication of a novel vitamin K dependent protein, GRP/Ucma in the pathophysiological conditions associated with vascular and soft tissue calcification, osteoarthritis, inflammation, and carcinoma. *Int J Biol Macromol.* 2018;113:309–16. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.02.150.

51. Durham AL, Speer MY, Scatena M, Giachelli CM, Shanahan CM. Role of smooth muscle cells in vascular calcification: implications in atherosclerosis and arterial stiffness. *Cardiovasc Res*. 2018;114(4):590–600. doi:10.1093/CVR/CVY010.
52. Libby P, Buring JE, Badimon L i sur. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):56. doi:10.1038/S41572-019-0106-Z.
53. Brånén L, Hovgaard L, Nitulescu M, Bengtsson E, Nilsson J, Jovinge S. Inhibition of tumor necrosis factor- α reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(11):2137–42. doi:10.1161/01.ATV.0000143933.20616.1b.
54. Suludere MA, Killeen AL, Crisologo PA i sur. Mönckeberg's medial calcific sclerosis in diabetic and non-diabetic foot infections. *Wound Repair Regen*. 2023;31(4):542–6. doi:10.1111/WRR.13101.
55. Guo J, Du L. Regulation of osteogenic differentiation in vascular smooth muscle cells under high-glucose condition. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2025;16:1589160. doi:10.3389/FENDO.2025.1589160.
56. Sanchis P, Ho CY, Liu Y i sur. Arterial “inflammaging” drives vascular calcification in children on dialysis. *Kidney Int*. 2019;95(4):958. doi:10.1016/J.KINT.2018.12.014.
57. Huang CL, Wu IH, Wu YW i sur. Association of Lower Extremity Arterial Calcification with Amputation and Mortality in Patients with Symptomatic Peripheral Artery Disease. *PLoS One*. 2014;9(2):e90201. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0090201.
58. Ren SC, Mao N, Yi S i sur. Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease: An Update and Perspective. *Aging Dis*. 2022;13(3):673-97. doi:10.14336/AD.2021.1024.
59. Kim JS, Hwang HS. Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease: Distinct Features of Pathogenesis and Clinical Implication. *Korean Circ J*. 2021;51(12):961–82. doi:10.4070/KCJ.2021.0995.
60. Ben-Shlomo Y, Spears M, Boustred C i sur. Aortic pulse wave velocity improves cardiovascular event prediction: An individual participant meta-analysis of prospective observational data from 17,635 subjects. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63(7):636–46. doi:10.1016/j.jacc.2013.09.063.
61. Nigwekar SU, Thadhani R, Brandenburg VM. Calciphylaxis. *N Engl J Med*. 2018;378(18):1704–14. doi:10.1056/NEJMRA1505292.
62. Gallo Marin B, Aghagoli G, Hu SL, Massoud CM, Robinson-Bostom L. Calciphylaxis and Kidney Disease: A Review. *Am J Kidney Dis*. 2023;81(2):232–9. doi:10.1053/J.AJKD.2022.06.011.
63. Wu D, Lu S, Hu J i sur. Calciphylaxis: ongoing challenges and treatment opportunities with mesenchymal stem cells. *J Mol Cell Biol*. 2025;17(2):mjaf009. doi:10.1093/JMCB/MJAF009.

64. Ketteler M, Block GA, Evenepoel P i sur. Executive summary of the 2017 KDIGO Chronic Kidney Disease–Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD) Guideline Update: what's changed and why it matters. *Kidney Int.* 2017;92(1):26–36. doi:10.1016/j.kint.2017.04.006.
65. Jono S, McKee MD, Murry CE i sur. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res.* 2000;87(7):E10-7. doi:10.1161/01.res.87.7.e10.
66. Novillo-Sarmiento C, García-Sáez RM, Rivas-Domínguez A i sur. Phosphate and Inflammation in Health and Kidney Disease. *Int J Mol Sci.* 2025;27(1):408. doi:10.3390/IJMS27010408.
67. Li X, Yang HY, Giachelli CM. Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res.* 2006;98(7):905–12. doi:10.1161/01.RES.0000216409.20863.e7.
68. Kapustin AN, Chatrou MLL, Drozdov I i sur. Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion. *Circ Res.* 2015;116(8):1312–23. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.305012.
69. Qin Z, Liao R, Xiong Y i sur. A narrative review of exosomes in vascular calcification. *Ann Transl Med.* 2021;9(7):579. doi:10.21037/ATM-20-7355.
70. Yang S, Zeng Z, Yuan Q. Vascular calcification: from the perspective of crosstalk. *Mol Biomed.* 2023;4(1):35. doi:10.1186/S43556-023-00146-Y.
71. Zheng Y, Wang H, Li X, Xie J, Fan J, Ren S. Extracellular vesicles in chronic kidney disease: diagnostic and therapeutic roles. *Front Pharmacol.* 2024;15:1371874. doi:10.3389/FPHAR.2024.1371874/XML.
72. Dahle DO, Åsberg A, Hartmann A, Holdaas H i sur. Serum Calcification Propensity Is a Strong and Independent Determinant of Cardiac and All-Cause Mortality in Kidney Transplant Recipients. *Am J Transplant.* 2016;16(1):204–12. doi:10.1111/AJT.13443.
73. Keyzer CA, De Borst MH, Van Den Berg E i sur. Calcification Propensity and Survival among Renal Transplant Recipients. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(1):239–48. doi:10.1681/ASN.2014070670.
74. Shioi A, Morioka T, Shoji T, Emoto M. The Inhibitory Roles of Vitamin K in Progression of Vascular Calcification. *Nutrients.* 2020;12(2):583. doi:10.3390/NU12020583.
75. Nigwekar SU, Bloch DB, Nazarian RM i sur. Vitamin K-Dependent Carboxylation of Matrix Gla Protein Influences the Risk of Calciphylaxis. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(6):1717–22. doi:10.1681/ASN.2016060651.
76. Kosciuszek ND, Kalta D, Singh M, Savinova O V. Vitamin K antagonists and cardiovascular calcification: A systematic review and meta-analysis. *Front Cardiovasc Med.* 2022;9:938567. doi:10.3389/FCVM.2022.938567.

77. Lin YL, Hsu BG. Vitamin K and vascular calcification in chronic kidney disease: An update of current evidence. *Tzu-Chi Med J.* 2022;35(1):44-50. doi:10.4103/TCMJ.TCMJ_100_22.
78. Neofytou IE, Stamou A, Demopoulos A i sur. Vitamin K for Vascular Calcification in Kidney Patients: Still Alive and Kicking, but Still a Lot to Learn. *Nutrients.* 2024;16(12):1798. doi:10.3390/NU16121798.
79. Schurgers LJ, Barreto D V., Barreto FC i sur. The circulating inactive form of matrix gla protein is a surrogate marker for vascular calcification in chronic kidney disease: a preliminary report. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010;5(4):568–75. doi:10.2215/CJN.07081009.
80. Jahnen-Dechent W, Heiss A, Schäfer C, Ketteler M. Fetuin-A regulation of calcified matrix metabolism. *Circ Res.* 2011;108(12):1494–509. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.234260.
81. Villa-Bellosta R, O'Neill WC. Pyrophosphate deficiency in vascular calcification. *Kidney Int.* 2018;93(6):1293–7. doi:10.1016/J.KINT.2017.11.035.
82. Opdebeeck B, D'Haese PC, Verhulst A. Molecular and Cellular Mechanisms that Induce Arterial Calcification by Indoxyl Sulfate and P-Cresyl Sulfate. *Toxins (Basel).* 2020;12(1):58. doi:10.3390/TOXINS12010058.
83. Zhang H, Chen J, Shen Z i sur. Indoxyl sulfate accelerates vascular smooth muscle cell calcification via microRNA-29b dependent regulation of Wnt/ β -catenin signaling. *Toxicol Lett.* 2018;284:29–36. doi:10.1016/J.TOXLET.2017.11.033.
84. Azpiazu D, Gonzalo S, González-Parra E, Egido J, Villa-Bellosta R. Role of pyrophosphate in vascular calcification in chronic kidney disease. *Nefrologia.* 2018;38(3):250–7. doi:10.1016/J.NEFRO.2017.07.005.
85. O'Neill WC, Sigrist MK, McIntyre CW. Plasma pyrophosphate and vascular calcification in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25(1):187–91. doi:10.1093/NDT/GFP362.
86. Patel P, Hashmi MF. Chronic Kidney Disease-Mineral Bone Disorder (CKD-MBD). *StatPearls*; 2024.
87. Yamada S, Giachelli CM. Vascular Calcification in CKD-MBD: Roles for Phosphate, FGF23, and Klotho. *Bone.* 2016;100:87-93. doi:10.1016/J.BONE.2016.11.012.
88. Marando M, Tamburello A, Salera D, Di Lullo L, Bellasi A. Phosphorous metabolism and manipulation in chronic kidney disease. *Nephrology (Carlton).* 2024;29(12):791–800. doi:10.1111/NEP.14407.
89. Aaldijk AS, Verzijl CRC, Jonker JW, Struik D. Biological and pharmacological functions of the FGF19- and FGF21-coreceptor beta klotho. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2023;14:1150222. doi:10.3389/FENDO.2023.1150222.

90. González-Rodríguez L, Martí-Antonio M, Díaz-Acevedo V i sur. Interplay Between Fibroblast Growth Factor-19, Beta-Klotho, and Receptors Impacts Cardiovascular Risk in Chronic Kidney Disease. *J Clin Med*. 2026;15(3):1005. doi:10.3390/JCM15031005/S1.
91. Feenstra L, Kutikhin AG, Shishkova DK i sur. Calciprotein Particles Induce Endothelial Dysfunction by Impairing Endothelial Nitric Oxide Metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2023;43(3):443–55. doi:10.1161/ATVBAHA.122.318420.
92. Heiss A, DuChesne A, Denecke B i sur. Structural basis of calcification inhibition by alpha 2-HS glycoprotein/fetuin-A. Formation of colloidal calciprotein particles. *J Biol Chem*. 2003;278(15):13333–41. doi:10.1074/JBC.M210868200.
93. Smith ER, Ford ML, Tomlinson LA, Rajkumar C, McMahon LP, Holt SG. Phosphorylated fetuin-A-containing calciprotein particles are associated with aortic stiffness and a procalcific milieu in patients with pre-dialysis CKD. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(5):1957–66. doi:10.1093/NDT/GFR609.
94. Smith ER, Ford ML, Tomlinson LA. Serum calcification propensity predicts all-cause mortality in predialysis CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(2):339–48. doi:10.1681/ASN.2013060635.
95. Zawada AM, Wolf M, Rincon Bello A. Assessment of a serum calcification propensity test for the prediction of all-cause mortality among hemodialysis patients. *BMC Nephrol*. 2023;24(1):35. doi:10.1186/S12882-023-03069-6.
96. Pluquet M, Laville SM, Brazier F i sur. The effect of sevelamer on serum calcification propensity in patients with chronic kidney disease: the results of a multicentre, double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Clin Kidney J*. 2024;18(1):sfae343. doi:10.1093/CKJ/SFAE343.
97. Ketteler M, Bongartz P, Westenfeld R i sur. Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. *Lancet*. 2003;361(9360):827–33. doi:10.1016/S0140-6736(03)12710-9.
98. Stenvinkel P, Wang K, Qureshi AR i sur. Low fetuin-A levels are associated with cardiovascular death: Impact of variations in the gene encoding fetuin. *Kidney Int*. 2005;67(6):2383–92. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00345.x.
99. Köppert S, Büscher A, Babler A i sur. Cellular clearance and biological activity of calciprotein particles depend on their maturation state and crystallinity. *Front Immunol*. 2018;9:395367. doi:10.3389/FIMMU.2018.01991/TEXT.
100. Herrmann M, Schäfer C, Heiss A i sur. Clearance of fetuin-A-containing calciprotein particles is mediated by scavenger receptor-A. *Circ Res*. 2012;111(5):575–84. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.261479.

101. Smith ER, Hanssen E, McMahon LP, Holt SG. Fetuin-A-Containing Calciprotein Particles Reduce Mineral Stress in the Macrophage. *PLoS One*. 2013;8(4):e60904. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0060904.
102. Villa JKD, Diaz MAN, Pizzuolo VR, Martino HSD. Effect of vitamin K in bone metabolism and vascular calcification: A review of mechanisms of action and evidences. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2017;57(18):3959–70. doi:10.1080/10408398.2016.1211616.
103. Price PA, Urist MR, Otawara Y. Matrix Gla protein, a new γ -carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone. *Biochem Biophys Res Commun*. 1983;117(3):765–71. doi:10.1016/0006-291X(83)91663-7.
104. Theuwissen E, Smit E, Vermeer C. The role of vitamin K in soft-tissue calcification. *Adv Nutr*. 2012;3(2):166–73. doi:10.3945/an.111.001628.
105. McCabe KM, Booth SL, Fu X i sur. Dietary vitamin K and therapeutic warfarin alter the susceptibility to vascular calcification in experimental chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2013;83(5):835–44. doi:10.1038/KI.2012.477.
106. 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(9):1400–7. doi:10.1161/01.ATV.18.9.1400.
107. Alappan HR, Kaur G, Manzoor S, Navarrete J, O'Neill WC. Warfarin Accelerates Medial Arterial Calcification in Humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020;40(5):1413–9. doi:10.1161/ATVBAHA.119.313879.
108. Van Den Heuvel EGHM, Van Schoor NM, Lips P i sur. Circulating uncarboxylated matrix Gla protein, a marker of vitamin K status, as a risk factor of cardiovascular disease. *Maturitas*. 2014;77(2):137–41. doi:10.1016/j.maturitas.2013.10.008.
109. Luo G, Ducy P, McKee MD i sur. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*. 1997;386(6620):78–81. doi:10.1038/386078A0.
110. Munroe PB, Olgunturk RO, Fryns JP. Mutations in the gene encoding the human matrix Gla protein cause Keutel syndrome. *Nat Genet*. 1999;21(1):142–4. doi:10.1038/5102.
111. Zebboudj AF, Imura M, Boström K. Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem*. 2002;277(6):4388–94. doi:10.1074/JBC.M109683200.
112. Shanahan CM, Crouthamel MH, Kapustin A, Giachelli CM. Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate. *Circ Res*. 2011;109(6):697–711. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.234914.
113. London GM. Arterial calcification: cardiovascular function and clinical outcome. *Nefrologia*. 2011;31(6):644–7. doi:10.3265/NEFROLOGIA.PRE2011.OCT.11175.

114. Schurgers LJ, Uitto J, Reutelingsperger CP. Vitamin K-dependent carboxylation of matrix Gla-protein: a crucial switch to control ectopic mineralization. *Trends Mol Med*. 2013;19(4):217–26. doi:10.1016/J.MOLMED.2012.12.008.
115. Tesfamariam B. Involvement of Vitamin K-Dependent Proteins in Vascular Calcification. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2019;24(4):323-33. doi:10.1177/1074248419838501.
116. Silaghi CN, Ilyés T, Filip VP, Farcaş M, van Ballegooijen AJ, Crăciun AM. Vitamin K dependent proteins in kidney disease. *Int J Mol Sci*. 2019;20(7):1571. doi:10.3390/ijms20071571.
117. Cozzolino M, Mangano M, Galassi A, Ciceri P, Messa P, Nigwekar S. Vitamin K in Chronic Kidney Disease. *Nutrients*. 2019;11(1):168. doi:10.3390/NU11010168.
118. Roumeliotis S, Dounousi E, Salmas M, Eleftheriadis T, Liakopoulos V. Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease: The Role of Vitamin K- Dependent Matrix Gla Protein. *Front Med (Lausanne)*. 2020;7:154. doi:10.3389/FMED.2020.00154.
119. Roumeliotis S, Duni A, Vaios V, Kitsos A, Liakopoulos V, Dounousi E. Vitamin K Supplementation for Prevention of Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease Patients: Are We There Yet? *Nutrients*. 2022;14(5):925. doi:10.3390/NU14050925.
120. Leonor Cancela M, Conceição N, Laizé V. Gla-rich protein, a new player in tissue calcification? *Adv Nutr*. 2012;3(2):174–81. doi:10.3945/an.111.001685.
121. Viegas CSB, Simes DC, Laizé V, Williamson MK, Price PA, Cancela ML. Gla-rich protein (GRP), a new vitamin K-dependent protein identified from sturgeon cartilage and highly conserved in vertebrates. *J Biol Chem*. 2008;283(52):36655–64. doi:10.1074/jbc.M802761200.
122. Viegas CSB, Cavaco S, Neves PL i sur. Gla-rich protein is a novel vitamin K-dependent protein present in serum that accumulates at sites of pathological calcifications. *Am J Pathol*. 2009;175(6):2288–98. doi:10.2353/ajpath.2009.090474.
123. Viegas C, Araújo N, Marreiros C, Simes D. The interplay between mineral metabolism, vascular calcification and inflammation in Chronic Kidney Disease (CKD): Challenging old concepts with new facts. *Aging (Albany NY)*. 2019;11(12):4274–99. doi:10.18632/aging.102046.
124. Willems BA, Furmanik M, Caron MMJ i sur. Ucma/GRP inhibits phosphate-induced vascular smooth muscle cell calcification via SMAD-dependent BMP signalling. *Sci Rep*. 2018;8(1):4961. doi:10.1038/s41598-018-23353-y.
125. Bäck M, Aranyi T, Cancela ML i sur. Endogenous Calcification Inhibitors in the Prevention of Vascular Calcification: A Consensus Statement From the COST

- Action EuroSoftCalcNet. *Front Cardiovasc Med*. 2019;5:196. doi:10.3389/FCVM.2018.00196.
126. Viegas CSB, Simes DC. A dual role for GRP in cardiovascular disease. *Aging (Albany NY)*. 2019;11(5):1323–4. doi:10.18632/AGING.101851.
 127. Smith ER, Hewitson TD, Jahnke-Dechent W. Calciprotein particles: Mineral behaving badly? *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2020;29(4):378–86. doi:10.1097/MNH.0000000000000609.
 128. Di Lullo L, House A, Gorini A, Santoboni A, Russo D, Ronco C. Chronic kidney disease and cardiovascular complications. *Heart Fail Rev*. 2015;20(3):259–72. doi:10.1007/S10741-014-9460-9.
 129. Di Lullo L, Barbera V, Bellasi A, Cozzolino M, De Pascalis A, et al. Vascular and valvular calcifications in chronic kidney disease: an update. *EMJ Nephrol*. 2016;4(1):84–91. doi:10.33590/emjnephrol/10311591.
 130. Townsend RR. Arterial Stiffness in CKD: A Review. *Am J Kidney Dis*. 2019;73(2):240–7. doi:10.1053/J.AJKD.2018.04.005.
 131. Raggi P, Bellasi A, Ferramosca E, Islam T, Muntner P, Block GA. Association of pulse wave velocity with vascular and valvular calcification in hemodialysis patients. *Kidney Int*. 2007;71(8):802–7. doi:10.1038/SJ.KI.5002164.
 132. Stefan G, Capusa C, Stancu S i sur. Abdominal aortic calcification and renal resistive index in patients with chronic kidney disease: is there a connection? *J Nephrol*. 2014;27(2):173–9. doi:10.1007/S40620-013-0021-4.
 133. McCarthy CP, Bruno RM, Brouwers S i sur. 2024 ESC Guidelines for the management of elevated blood pressure and hypertension. *Eur Heart J*. 2024;45(38):3912–4018. doi:10.1093/EURHEARTJ/EHAE178.
 134. Niu Q, Hong Y, Lee CH, Men C, Zhao H, Zuo L. Abdominal aortic calcification can predict all-cause mortality and CV events in dialysis patients: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2018;13(9):e0204526. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0204526.
 135. Di Lullo L, Gorini A, Russo D, Santoboni A, Ronco C. Left Ventricular Hypertrophy in Chronic Kidney Disease Patients: From Pathophysiology to Treatment. *Cardiorenal Med*. 2015;5(4):254–66. doi:10.1159/000435838.
 136. Amoako YA, Laryea DO, Bedu-Addo G, Nkum BC, Plange-Rhule J. Left ventricular hypertrophy among chronic kidney disease patients in Ghana. *Pan Afr Med J*. 2017;28:79. doi:10.11604/PAMJ.2017.28.79.9183.
 137. Paoletti E, Bellino D, Gallina AM, Amidone M, Cassottana P, Cannella G. Is left ventricular hypertrophy a powerful predictor of progression to dialysis in chronic kidney disease? *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26(2):670–7. doi:10.1093/NDT/GFQ409.

138. Ahmed S, Ahmed S. Prognostic role of echocardiography in patients with chronic renal failure on hemodialysis. *J Indian Coll Cardiol*. 2018;8(4):162–6. doi:10.1016/J.JICC.2018.10.002.
139. Rattazzi M, Bertacco E, Del Vecchio A, Puato M, Faggin E, Pauletto P. Aortic valve calcification in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2013;28(12):2968–76. doi:10.1093/NDT/GFT310.
140. Ternacle J, Côté N, Krapf L, Nguyen A, Clavel MA, Pibarot P. Chronic Kidney Disease and the Pathophysiology of Valvular Heart Disease. *Can J Cardiol*. 2019;35(9):1195–207. doi:10.1016/J.CJCA.2019.05.028.
141. Hénaut L, Candellier A, Huish S, Issa N, Sinha S, Massy ZA. Valvular calcification in chronic kidney disease: new insights from recent clinical and preclinical studies. *Clin Kidney J*. 2025;18(Suppl 1):i27. doi:10.1093/CKJ/SFAE421.
142. Schlieper G, Schurgers L, Brandenburg V, Reutelingsperger C, Floege J. Vascular calcification in chronic kidney disease: an update. *Nephrol Dial Transplant*. 2016;31(1):31–9. doi:10.1093/NDT/GFV111.
143. Kremer D, Groothof D, Keyzer CA i sur. Kidney Function-Dependence of Vitamin K-Status Parameters: Results from the TransplantLines Biobank and Cohort Studies. *Nutrients*. 2021;13(9):3069. doi:10.3390/NU13093069.
144. Hidalgo Santiago JC, Perelló Martínez J, Vargas Romero J, Luis Pallares J, Michan Doña A, Gómez-Fernández P. Association of aortic stiffness with abdominal vascular and coronary calcifications in patients with stage 3 and 4 chronic kidney disease. *Nefrología*. 2024;44(2):256–67. doi:10.1016/J.NEFROE.2024.03.007.
145. Peeters MJ, van den Brand JA, van Zuilen AD i sur. Abdominal aortic calcification in patients with CKD. *J Nephrol*. 2016;30(1):109-18. doi:10.1007/S40620-015-0260-7.
146. Lončarić A, Išek Lončarić M, Balenović D, Batičić L. Gla-Rich Protein Across the Chronic Kidney Disease Spectrum: Association with Vascular Calcification Burden and CKD-MBD Disturbances. *J Clin Med*. 2026;15(9):3374. doi:10.3390/JCM15093374.
147. Di Lullo L, Gorini A, Bellasi A i sur. Fibroblast growth factor 23 and parathyroid hormone predict extent of aortic valve calcifications in patients with mild to moderate chronic kidney disease. *Clin Kidney J*. 2015;8(6):732–6. doi:10.1093/ckj/sfv073.
148. Viegas CSB, Costa RM, Santos L i sur. Gla-rich protein function as an anti-inflammatory agent in monocytes/macrophages: Implications for calcification-related chronic inflammatory diseases. *PLoS One*. 2017;12(5):e0177829. doi:10.1371/journal.pone.0177829.
149. Viegas C, Carreira J, Maia TM i sur. Gla Rich Protein (GRP) Mediates Vascular Smooth Muscle Cell (VSMC) Osteogenic Differentiation, Extracellular Vesicle

- (EV) Calcification Propensity, and Immunomodulatory Properties. *Int J Mol Sci.* 2024;25(22):12406. doi:10.3390/IJMS252212406/S1.
150. Mandai S. Circulating small extracellular vesicles in chronic kidney disease and vascular calcification: “Tiny packages with big biological mission.” *Clin Exp Nephrol.* 2026;30(2):198–210. doi:10.1007/S10157-025-02793-7.
 151. Neutel CHG, Wesley CD, van Loo C i sur. Calciprotein particles induce arterial stiffening ex vivo and impair vascular cell function. *Commun Biol.* 2024;7(1):1241. doi:10.1038/S42003-024-06895-Y.
 152. Wungu CDK, Susilo H, Alsagaff MY i sur. Role of klotho and fibroblast growth factor 23 in arterial calcification, thickness, and stiffness: a meta-analysis of observational studies. *Sci Rep.* 2024;14(1):5712. doi:10.1038/S41598-024-56377-8.

8. POPIS SLIKA

Slika 1. Raspodjela tGRP-a prema skupinama.

Slika 2. Raspodjela PWV-a prema skupinama.

Slika 3. Raspodjela Kauppila zbroja prema skupinama.

Slika 4. Raspodjela PTH-a prema skupinama.

Slika 5. Raspodjela FGF-23 prema skupinama.

Slika 6. Raspodjela β -Klotho prema skupinama.

Slika 7. Raspodjela eGFR-a prema skupinama.

Slika 8. Raspodjela AO zbroja prema skupinama.

9. POPIS TABLICA

Tablica 1. Kategorička obilježja ispitivane populacije prema skupinama.

Tablica 2. Kontinuirane kliničke, ehokardiografske, vaskularne i biokemijske varijable prema skupinama.

Tablica 3. Spearmanovi koeficijenti korelacije između kontinuiranih varijabli u istraživanju.

Tablica 4. Vrijednosti tGRP-a prema varfarinskoj terapiji i kliničkim događajima tijekom praćenja.

Tablica 5. Multipli linearni regresijski model prediktora Kauppila zbroja.

Tablica 6. Multipli linearni regresijski model prediktora brzine pulsnog vala.

Tablica 7. Multipli linearni regresijski model prediktora β -Klotho.

Tablica 8. Multipli linearni regresijski model prediktora FGF-23.

Tablica 9. Usporedba ispitanika prema dostupnosti vrijednosti β -Klotho.

Tablica 10. Usporedba ispitanika prema dostupnosti vrijednosti FGF-23.

10. POPIS POKRATA

AAC – abdominalna aortna kalcifikacija

AO zbroj – semikvantitativni zbroj kalcifikacije aortnog zaliska

AV – aortni zalistak

β -Klotho – beta-Klotho

BMI – indeks tjelesne mase

BMP – koštani morfogenetski protein (*engl. bone morphogenetic protein*)

BMP-2 – koštani morfogenetski protein 2 (*engl. bone morphogenetic protein 2*)

Ca – kalcij

CKD – kronična bubrežna bolest (*engl. chronic kidney disease*)

CKD-EPI – Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration

CKD-MBD – kronična bubrežna bolest–mineralno-koštani poremećaj (*engl. chronic kidney disease–mineral and bone disorder*)

CPP – kalcijproteinske čestice

CRIC – Chronic Renal Insufficiency Cohort

ECM – izvanstanični matriks

eGFR – procijenjena glomerularna filtracija

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay

ESRD – završni stadij bubrežne bolesti (*engl. end-stage renal disease*)

EV – ekstracelularne vezikule

FGF-23 – fibroblastni čimbenik rasta 23

GLA – γ -karboksiglutaminska kiselina

GLU – glutaminska kiselina

GRP – GLA-bogati protein

HD – hemodijaliza/hemodijalizni bolesnici

KBB – kronična bubrežna bolest

KBB–MKP – kronična bubrežna bolest–mineralno-koštani poremećaj

LV – lijeva klijetka

MGP – matrix GLA protein

P – fosfor

PPi – pirofosfat

PTH – paratireoidni hormon

PWV – brzina pulsnog vala

SMAD – obitelj signalnih proteina SMAD (*engl. suppressor of mothers against decapentaplegic*)

SR-A – scavenger receptor A

T50 – funkcionalni test serumske sklonosti kalcifikaciji / vrijeme prijelaza primarnih u sekundarne kalcijproteinske čestice

tGRP – ukupni GLA-bogati protein

UCMA – upper zone of growth plate and cartilage matrix associated protein

UDK – univerzalna decimalna klasifikacija

VKA – antagonisti vitamina K

VSMC – vaskularne glatkomišićne stanice

11. ŽIVOTOPIS

OSOBNİ PODACI

Ime i prezime: Antun Lončarić, dr. med.

Datum rođenja: 14. prosinca 1994.

Državljanstvo: hrvatsko

E-pošta: antun.loncaric@uniri.hr; antun1412@gmail.com

OBRAZOVANJE

- 2021. – danas. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci- Doktorska škola iz znanstvenog područja biomedicina i zdravstvo.
- 2024./2025. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu- Sveučilišni poslijediplomski specijalistički studij- Kardiologija.
- 2013. – 2019. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci- doktor medicine.
- 2009. – 2013. Gimnazija Sisak- gimnazijsko obrazovanje.
- 2003. – 2009. Glazbena škola Frana Lhotke, Sisak, smjer gitara.
- 2001. – 2009. Osnovna škola Braća Ribar, Sisak.

PROFESIONALNI RAZVOJ I RADNO ISKUSTVO

- 10./2025. – danas. Opća bolnica „Dr. Ivo Pedišić“ Sisak- specijalist kardiolog (specijalistički ispit iz kardiologije položio je u listopadu 2025. godine u Kliničkom bolničkom centru Sestre milosrdnice u Zagrebu).
- 04./2020. – 10./2025. Opća bolnica „Dr. Ivo Pedišić“ Sisak- specijalizant kardiologije.
- 11./2019. – 04./2020. Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice, Zagreb- rad pod nadzorom doktora medicine bez specijalizacije.

NASTAVNA I AKADEMSKA AKTIVNOST TIJEKOM STUDIJA

- 2014. – 2019. Demonstrator iz anatomije, Zavod za anatomiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci.

- 2016. – 2018. Demonstrator iz patologije i patološke anatomije, Zavod za patologiju i patološku anatomiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci.
- 2017. – 2019. Demonstrator iz kliničke propedeutike, Katedra za internu medicinu, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci.
- 2017. – 2019. Voditelj demonstratora iz anatomije, Zavod za anatomiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci.

ZNANSTVENI I STRUČNI INTERES

Stručni i znanstveni interes usmjeren je na kardiologiju, kroničnu bubrežnu bolest, vaskularnu kalcifikaciju, arterijsku krutost te biomarkere povezane s poremećajem mineralno-koštanog metabolizma u kroničnoj bubrežnoj bolesti. U okviru doktorskog istraživanja bavi se ulogom GLA-bogatog proteina (GRP) kao biljega vaskularne kalcifikacije u kroničnoj bubrežnoj bolesti. Sudjelovao je na više domaćih i međunarodnih znanstvenih i stručnih skupova.

SOCIJALNE VJEŠTINE I SPOSOBNOSTI

Razvio je komunikacijske vještine kroz nastavnu aktivnost, sudjelovanje na studentskim i stručnim skupovima, znanstvena izlaganja i edukativne radionice.

ORGANIZACIJSKE VJEŠTINE I SPOSOBNOSTI

Tijekom studija stekao je iskustvo u organizaciji nastave, koordinaciji rada demonstratora i timskom radu, osobito kroz vođenje demonstratora na Zavodu za anatomiju.

TEHNIČKE VJEŠTINE I SPOSOBNOSTI

Iskustvo u radu s programskim paketom Microsoft Office, korištenje interneta, elektroničke pošte.

ČLANSTVA

- Hrvatska liječnička komora
- Hrvatski liječnički zbor
- Hrvatsko kardiološko društvo

NAGRADE I PRIZNANJA

2018. godine Dekanova nagrada za izvrsnost- najbolji student 5. godine Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

DODATNE AKADEMSKE AKTIVNOSTI

Tijekom studija sudjelovao je kao volonter prevoditelj u volonterskom projektu prevođenja Cochrane sažetaka sustavnih pregleda (Cochrane Hrvatska).

JEZIČNE VJEŠTINE

Hrvatski – materinski jezik

Engleski – C1

VOZAČKA DOZVOLA: B kategorija.

DODATNE OBAVIJESTI

Poglavlja u knjigama:

1. Štimac D., Lončarić A. Povijest i razvoj medicine temeljene na dokazima. Štimac Davor i suradnici. Medicina temeljena na dokazima. Zagreb: Medicinska naklada; 2023. god., str. 6-11.

Znanstveni, pregledni i stručni radovi:

1. Štimac D., Lončarić A., Poropat G. Cochrane kolaboracija: povijest i razvoj. Medicina fluminensis. 2017. 53;4:404-9. doi:10.21860/medflum2017_187360.
2. Lončarić A., Kršić V., Kresović A., Zaninović Jurjević T., Ružić A., Zaputović L. Klinički i epidemiološki profil pacijenata liječenih u Kliničkom bolničkom centru Rijeka s dijagnozom infektivnog endokarditisa u periodu od 4 godine. Knjižica sažetaka- "MEDRI znanstveni PIKNIK 2017". Rijeka, 2017.;14-14 (predavanje).
3. Lončarić A., Kršić V., Kresović A., Ružić A., Zaputović L., Zaninović Jurjević T. Clinical and epidemiological profile of patients treated at University Hospital Centre Rijeka with a diagnosis of infective endocarditis in a 5-year period. Cardiologia Croatica. 2018;13(5-6):203. doi: 10.15836/ccar2018.203.
4. Poropat G., Kresović A., Lacković A., Lončarić A., Marušić M., Štimac D. Meta-analysis and trias sequential analysis of prophylactic antibiotics for acute

pancreatitis. *Pancreatology*. 2018;4:S98-S99. doi: 10.1016/j.pan.2018.05.265 (poster, međunarodna recenzija).

5. Lončarić A., Kršić V., Kresović A., Ružić A., Zaputović L., Zaninović Jurjević T. Klinički i epidemiološki profil pacijenata liječenih u Kliničkom bolničkom centru Rijeka s dijagnozom infekcijskog endokarditisa u periodu od pet godina. *Medicina Fluminensis*. 2018. 54;4:406-12. doi: 10.21860/medflum2018_207359.
6. Marušić M., Kresović A., Lacković A., Lončarić A., Štimac D., Poropat G. Neutrophil-lymphocyte ratio, hematocrit, blood urea nitrogen and red-cell distribution with in the early prediction of clinically relevant outcomes in patients with acute pancreatitis. Book of Abstracts- The First European Conference of Young Gastroenterologists. Zagreb, 2018.;120-1. (poster).
7. Lončarić A., Lacković A., Kršić V., Židan D., Bačić G., Smoljan I., Tomulić V., Zaninović Jurjević T. Sudden Cardiac Death as the First Manifestation of Acute Stent Thrombosis After Successful Primary Percutaneous Coronary Intervention. Abstract book- 4th Congress of Emergency Medicine with International Participation. Rijeka, 2019. (predavanje).
8. Lacković A., Marušić M., Kresović A., Lončarić A., Štimac D., Poropat G. Unspecific Upper Abdominal Pain Caused by Portomesenteric Vein Thrombosis-Case Report. Abstract book- 4th Congress of Emergency Medicine with International Participation, Rijeka, 2019. (predavanje).
9. Lončarić A., Čelić T. Serumska ekspresija OPG/RANKL sustava u kroničnoj bubrežnoj bolesti i kod primatelja bubrežnog transplantata: odnos sa serumskom razinom iPTH-a i terapijom vitaminom D. *Medicina Fluminensis*. 2020;56(4);529-36. doi: 10.21860/medflum2020_245230.
10. Poropat G., Goričanec K., Lacković A., Kresović A., Lončarić A., Marušić M. Systematic Review with Trial Sequential Analysis of Prophylactic Antibiotics for Acute Pancreatitis. *Antibiotics*. 2022;11(9):1191. doi:10.3390/antibiotics11091191.

11. Lončarić A, Čelić Črnac T. GLA-rich protein as a marker of vascular calcification in chronic kidney disease. Book of Abstracts- 2nd Biomedicine and Health PhD Students Congress „Science and us”. Rijeka, 2024. (predavanje + poster).
12. Jerkić H., Lončarić A., Crljenko K., Klobučar I., Babić Z., Radeljić V., Delić-Brkljačić D. Mitral annular disjunction as a risk factor for sudden cardiac death – a clinical case of a sudden cardiac death survivor with mitral annular disjunction. *Cardiologia Croatica*. 2024;19(11-12):547-547. doi: 10.15836/ccar2024.547.
13. Lončarić A., Išek Lončarić M., Balenović D., Batičić L. Gla-Rich Protein Across the Chronic Kidney Disease Spectrum: Association with Vascular Calcification Burden and CKD-MBD Disturbances. *Journal of Clinical Medicine*. 2026;15:3374. doi:10.3390/JCM15093374.
14. Lončarić A., Batičić L. Gla-Rich Protein (GRP): A Vitamin K-Dependent Regulator of Vascular Calcification, Inflammation, and Mineral Homeostasis. *Current Issues in Molecular Biology*. 2026;48:458. doi:10.3390/CIMB48050458.

