

**EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Osteoprotegerint befolyásoló tényezők vizsgálata  
és a D-vitamin mérések standardizációja  
a HunMen tanulmányban**

**Jakab Éva**

**Témavezető: Dr. Bhattoa Harjit Pal**



**DEBRECENI EGYETEM  
LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA  
Debrecen, 2019**

## TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK .....	4
1. BEVEZETÉS.....	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	9
2.1. A csontszövet élettana, csontfelépítés és csontlebontás folyamata és szabályozása.....	9
2.2. OPG/RANKL/RANK rendszer .....	12
2.3. Csontszövetre ható hormonok kapcsolata a csontanyagcserével .....	12
2.3.1. D-vitamin anyagcseréje és csontanyagcserére való hatása.....	12
2.3.2. Parathormon hatása a csontanyagcserére .....	14
2.3.3. Nemi hormonok hatása a csontanyagcserére.....	14
2.3.4. Calcitonin hatása a csontanyagcserére .....	15
2.3.5. Pajzsmirigyhormonok hatása a csontanyagcserére .....	15
2.3.6. Glucocorticoidok hatása a csontanyagcserére .....	15
2.3.7. Növekedési hormon hatása a csontanyagcserére.....	16
2.4. Cystatin C és csontanyagcsere kapcsolata.....	17
2.5. Csontspecifikus biokémiai markerek .....	17
2.5.1. A csontfelépítés biokémiai markerei .....	17
2.5.2. A csontlebontás biokémiai markerei .....	18
2.6. Csont ásványianyag-sűrűség (osteodensitometria) mérés .....	19
2.7. 25-hidroxi-D-vitamin meghatározási módszerek .....	20
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	22
3.1. Osteoprotegerint befolyásoló tényezők vizsgálata .....	22
3.2. A 25-hidroxi-D-vitamin mérési adatok standardizációja .....	22
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	24
4.1. Vizsgálati személyek .....	24
4.2. Vizsgálati módszerek és paraméterek.....	24

4.3. DEQAS minták jellemzése .....	28
4.4. DEQAS és HunMen minták vizsgálata .....	28
4.5. Csont ásványianyag-sűrűség mérések .....	29
4.6. Számítások és elemző statisztikai módszerek .....	29
5. EREDMÉNYEK.....	30
5.1. Vizsgálati résztvevők laboratóriumi és statisztikai jellemzői .....	30
5.2. Osteoprotegerint befolyásoló tényezők vizsgálata .....	31
5.3. DEQAS és HunMen minták vizsgálata .....	36
5.4. A 25-hidroxi-D-vitamin mérési adatok standardizációja .....	37
6. MEGBESZÉLÉS .....	40
6.1. Osteoprotegerint befolyásoló tényezők a HunMen tanulmányban és saját mérési eredményeink összehasonlítása irodalmi adatokkal .....	40
6.2. A 25-hidroxi-D-vitamin mérési adatok standardizációja .....	44
7. ÖSSZEFOGLALÁS .....	46
8. SUMMARY .....	47
9. AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ TUDOMÁNYOS MEGÁLLAPÍTÁSAI, GYAKORLATI JELENTŐSÉGE .....	48
10. IRODALOMJEGYZÉK .....	49
10.1. Az értekezésben hivatkozott közlemények jegyzéke .....	49
10.2. Saját közlemények jegyzéke.....	59
11. TÁRGYSZAVAK / KEYWORDS .....	61
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	62
13. FÜGGELÉK .....	63

## RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

25OHD	25-hydroxyvitamin D / 25-hidroxi-D-vitamin
1,25(OH) <sub>2</sub> D	1,25-dihydroxyvitamin D / 1,25-dihidroxi-D-vitamin
ALP	alkaline phosphatase / alkalikus foszfatáz
ALTM	All Laboratory Trimmed Mean / összlaboratórium szűkített átlag
BMD	bone mineral density / csont ásványianyag-sűrűség
BMI	body mass index / testtömeg index
BMP	bone morphogenetic protein / csont morfogenetikus fehérje
BMU	basic multicellular unit / soksejtű elemi egység
BSAP	bone specific alkaline phosphatase / csontspecifikus alkalikus foszfatáz
CBFA1	core binding factor alpha 1 / alfa-1 core-kötő faktor
CFU-GM	colony forming unit-granulocyte/macrophage / granulocytá/makrofág kolónia formáló egység
CKD-EPI	Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration / Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration vizsgálat
CLIA	chemiluminescent immunoassay / chemiluminescens immunoassay
CTx	C-terminal telopeptide of type I collagen / I. típusú kollagén C-terminális telopeptid
CYP450	cytochrome P450 / citokróm P450
DBP	vitamin D binding protein / D-vitamin-kötő fehérje
DEQAS	Vitamin D External Quality Assessment Scheme / D-vitamin külső minőségértékelési program
DXA	dual energy X-ray absorptiometry / kettős energiájú röntgenfotonos abszorpciometria
E2	17 $\beta$ -estradiol / 17 $\beta$ -oestradiol
ECLIA	electrochemiluminescent immunoassay / elektrochemiluminescens immunoassay
eGFR	estimated glomerular filtration rate / becsült glomeruláris filtrációs ráta
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay / enzimmel kötött immunsorbens assay
EQA	external quality assessment / külső minőségértékelés
ER $\alpha$	estrogen receptor <i>alpha</i> / oestrogén receptor <i>alfa</i>
ER $\beta$	estrogen receptor <i>beta</i> / oestrogén receptor <i>béta</i>

FGF	fibroblast growth factor / fibroblast növekedési faktor
FN	femoral neck / combnyak
FTI	free testosterone index / szabad testosteron index
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor / granulocita kolónia stimuláló faktor
GM-CSF	granulocyte macrophage-colony stimulating factor / granulocita makrofág kolónia stimuláló faktor
HPLC	high pressure liquid chromatography / nagynyomású folyadékkromatográfia
IFN $\gamma$	interferon gamma / interferon gamma
IGF-I	insulin-like growth factor / inzulin-szerű növekedési faktor
IL	interleukin / interleukin
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry / folyadékkromatográfia-tandem tömegspektrometria
LS	lumbar spine / lumbális gerinc
MDRD	4-variable Modification of Diet in Renal Disease / 4-variable Modification of Diet in Renal Disease vizsgálat
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor / makrofág kolónia-stimuláló faktor
MSC	mesenchymal stem cell / mesenchymális őssejt
NF- $\kappa$ B	nuclear factor <i>kappa</i> B / nukleáris faktor <i>kappa</i> B
NIST	National Institute for Standards and Technology / Nemzeti Szabványügyi és Technológiai Intézmény
NTx	N-terminal telopeptide of type I collagen / I. típusú kollagén N-terminális telopeptid
Ob	osteoblast / osteoblast
Oc	osteoclast / osteoclast
OC	osteocalcin / osteocalcin
OPG	osteoprotegerin / osteoprotegerin
PG	prostaglandin / prostaglandin
PDGF	platelet-derived growth factor / trombocitákból származó növekedési faktor
PICP	procollagen type-I C-terminal propeptide / I. típusú prokollagén C-terminális propeptid
PINP	procollagen type-I N-terminal propeptide / I. típusú prokollagén N-terminális propeptid
PTH	parathyroid hormone / parathormon
PTHR	parathyroid hormone receptor / parathormon receptor

PTHrP	parathyroid hormone-related protein / parathormon-szerű fehérje
RANK	receptor activator of nuclear factor <i>kappa</i> B / nukleáris faktor <i>kappa</i> B receptor aktivátor
RANKL	receptor activator of nuclear factor <i>kappa</i> B ligand / nukleáris faktor <i>kappa</i> B receptor aktivátor ligand
sRANKL	soluble receptor activator of nuclear factor <i>kappa</i> B ligand / szolubilis nukleáris faktor <i>kappa</i> B receptor aktivátor ligand
RIA	radioimmunoassay / radioaktív jelölésen alapuló immunoassay
RMP	reference measurement procedure / referencia mérési eljárás
RXR	retinoid X receptor / retinsav X-receptora
SHBG	sexhormon binding globulin / szexhormon-kötő globulin
SCF	stem cell factor / őssejt faktor
SPA	single photon absorpciometry / egyes foton abszorpciometria
SXA	single energy X-ray absorpciometry / egyszeres energiájú röntgenfotonos abszorpciometria
T	testosterone / testosteron
TGF- $\beta$	transforming growth factor <i>beta</i> / transzformáló növekedési faktor <i>béta</i>
TNF	tumor necrosis factor / tumor nekrozis faktor
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor <i>alpha</i> / tumor nekrozis faktor <i>alfa</i>
TRAP	tartarate resistant acid phosphatase / tartarát rezisztens savi foszfatáz
ULN	upper limit of normal / normál (referencia) tartomány felső határa
VDR	vitamin D receptor / D-vitamin receptor
VDRE	vitamin D response element / D-vitamin reszponzív elemek
VDSP	Vitamin D Standardization Program / D-vitamin Standardizációs Program
WHO	World Health Organization / Egészségügyi Világszervezet

## 1. BEVEZETÉS

Az osteoprotegerin (OPG), valamint a nukleáris faktor *kappa* B receptor aktivátor ligand (RANKL), a tumor nekrozis faktor receptor szupercsalád két tagja, elengedhetetlen a csontfelszívódás szabályozásában [1,2]. Az OPG/RANKL/RANK rendszer kulcsfontosságú szabályozója az osteoclastogenesisnek és jelentős közvetítő tényező az oestradiol, testosteron, parathormon, D-vitamin és a csontforgalom között [3-6]. Számos irodalmi adat számol be az OPG és RANKL vizsgálatáról egészséges férfiakban [7-19], de csak részben tisztázott a kapcsolatuk a háttérben működő befolyásoló molekuláris szereplőkkel, mint például a cystatin C csontanyagcserevel való kapcsolata [14]. A cystatin C kis molekulatömegű (13 kDa) fehérje, cisztein proteináz inhibitor, amit minden sejtmaggal rendelkező sejt termel. Az osteoblastokban is szintetizálódik és lassítja az osteoclast képződést a praeosteoclastok differenciálódásának egy késői stádiumában [20,21]. Irodalmi adatok alapján felmerült, hogy a cystatin C csontanyagcsere szabályozásában betöltött szerepe jelentős részben tisztázásra vár.

Jelen munkánk egyik célja az OPG és szolubilis RANKL (sRANKL) kapcsolatának elemzése volt az életkorral, cystatin C-vel, csontanyagcsere biokémiai markerekkel (osteocalcin (OC), I. típusú kollagén C-terminális telopeptid (CTX), I. típusú prokollagén N-terminális propeptid (P1NP), továbbá a 25-hidroxi-D-vitaminnal (25OHD), parathormonnal (PTH), nemi hormonokkal (17 $\beta$ -oestradiol és testosteron), valamint a csont ásványianyag-sűrűség mérési adataival.

Jelentős volumenű publikált vizsgálati anyag bizonyítja, hogy a D-vitamin a kalcium- és foszfát-anyagcsere, így a csontanyagcsere egyik kulcsfontosságú regulátora. A D-vitamin-hiány gyakorisága és népegészségügyi jelentősége az utóbbi évtizedekben laboratóriumi és epidemiológiai vizsgálatai alapján előtérbe került, és nyilvánvalóvá vált, hogy a csonthatásokon túl számos más betegségben (cardiovascularis kórképek, magas vérnyomás, daganatos betegségek, diabetes, sclerosis multiplex, rheumatoid arthritis, infekciók kialakulása) is jelentőséggel bírhat [22]. Mérésének jelentőségét egyre szélesebb körben hangsúlyozzák. A D-vitamin-hiány szerepet játszik a szkeletális és az extra-szkeletális elváltozásokban, és ezekhez az elváltozásokhoz alacsony szérumszintű 25OHD koncentrációk társulnak. A D-vitamin pótlásáról szóló felmérésekben az optimális D-vitamin szint fenntartására 50 nmol/L és 100 nmol/L közötti szérumszintű 25OHD koncentrációról számolnak be [23-26], viszont időskorú egyéneknél az elesések és törések

kockázatának csökkentésére a legtöbb szakmai szervezet 75 nmol/L feletti szérumban 25OHD koncentrációt javasol [27-30]. Az extra-szkeletális egészség fenntartására az optimális szérumban 25OHD koncentráció 75 nmol/L feletti [31-34]. Szakmai körökben a kívánatos szérumban 25OHD koncentrációkról jelenleg is széleskörű vita folyik, különös tekintettel a csontrendszeren túli hatások tekintetében [35].

A szervezet D-vitamin ellátottságát a total 25OHD koncentráció meghatározásával állapítjuk meg. A javasolt „arany standard” módszer a folyadék kromatográfia-tandem tömegspektrometria (LC-MS/MS) [36], mégis a 25OHD értékek standardizációja állandó kihívást jelent. Jelenleg kívánatos egy nemzetközileg elfogadott standardizált, egységes, automatizálható, költséghatékony módszer. A D-vitamin Standardizációs Program (VDSP) javaslata, a már meglévő populációs minta pool-ból meghatározott számú minták újra mérése az adott laboratóriumban elérhető módszerrel, majd ezt követően megismételni a National Institute for Standards and Technology (NIST) által alkalmazott LC-MS/MS referencia módszerrel. A kapott korrekciós szorzóval az eredeti módszerrel mért 25OHD értékek egységesítése lehetővé válna [37-41]. Rutin laboratóriumi gyakorlatban a 25OHD meghatározására alkalmazott módszerek közül a legelterjedtebbek az immunkémiai módszerek közül, az antitest-kötésen alapuló, továbbá specifikus fehérje-kötésen alapuló különböző jelölésű immunoassayk.

A Vitamin D External Quality Assessment Scheme (DEQAS) egy nemzetközi külső minőségértékelési program, amiben több mint ezer laboratórium vesz részt, és magába foglalja a jelenleg rendelkezésre álló összes 25OHD mérési platformot. A résztvevő laboratóriumok minden DEQAS vizsgálathoz (évente négy alkalommal) öt mintát kapnak postai úton, szobahőmérsékleten. Az eredmények online küldendők vissza, és a benyújtási határidő után a jelentés a DEQAS honlapjáról letölthető. A DEQAS mintákat 2013 áprilisától a NIST is értékeli LC-MS/MS módszerrel és a kapott eredményeket a résztvevő laboratóriumok számára is rendelkezésre bocsátja, így lehetővé teszi a résztvevő laboratóriumok számára, hogy saját eredményeiket összehasonlítsák a NIST célértékével, egyúttal kiváló lehetőséget biztosítva a standardizációs törekvésre [42].

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. A csontszövet élettana, csontfelépítés és csontlebontás folyamata és szabályozása

A csontváz az emberi test szilárd vázát alkotja, amely meghatározza a test alakját és méreteit, valamint a legtöbb izom eredésére, illetve tapadására szolgál. A csontszövet védelmet nyújt a különböző szervek számára, részt vesz a vérképzésben, valamint számos ion fontos raktára. A csontszövet sejtekből, szerves és szervetlen állományból épül fel. A csontszövet sejtjei a csontépítő osteoblastok, az osteocyták, valamint a csontbontó osteoclastok. A csont szerves állománya döntően kollagénből áll, szervetlen állományának nagy részét hidroxipatit teszi ki, ezen kívül találhatóak erek és idegek is [43].

Az osteoblastok mesenchymalis őssejtekből (MSC) differenciálódnak. Az osteoblastokká differenciálódás legfontosabb hormonális aktiválói a PTH és az 1,25(OH)<sub>2</sub>D-vitamin. Mind a PTH-, mind a 1,25(OH)<sub>2</sub>D-vitamin receptorok megtalálhatók az osteoblastok érett formáiban, ellentétben az érett osteoclastokkal, amelyekről az érés során eltűnik a PTH-, valamint a 1,25(OH)<sub>2</sub>D-vitamin-receptor. A praeosteoblastokban az alfa-1 core-kötő faktor (CBFA1) fehérje elindítja, valamint szabályozza az éréshez és a normális osteoblast aktivitáshoz szükséges gének átírását, mint például RANKL, OPG, csont-specifikus alkalikus foszfatáz, transzformáló növekedési faktor-béta, csont morfogenetikus proteinek, osteocalcin, osteopontin [44,45], emellett az oestrogén osteoblastokra gyakorolt hatásában is fontos szerepe van [46]. Az osteoblastok érése során a CBFA1 intracelluláris koncentrációja folyamatosan emelkedik [47].

Az osteocyták az érett csontban legnagyobb mennyiségben előforduló sejtípusok, a mineralizálódott csontszövettel körbezárt osteoblastokból fejlődnek ki, fontos feladatuk a csontszövet táplálása. Továbbá, a csontra ható mechanikai erőhatások közvetítésében is jelentős szerepet töltenek be, valamint meghatározzák a csontátépülés helyét [48].

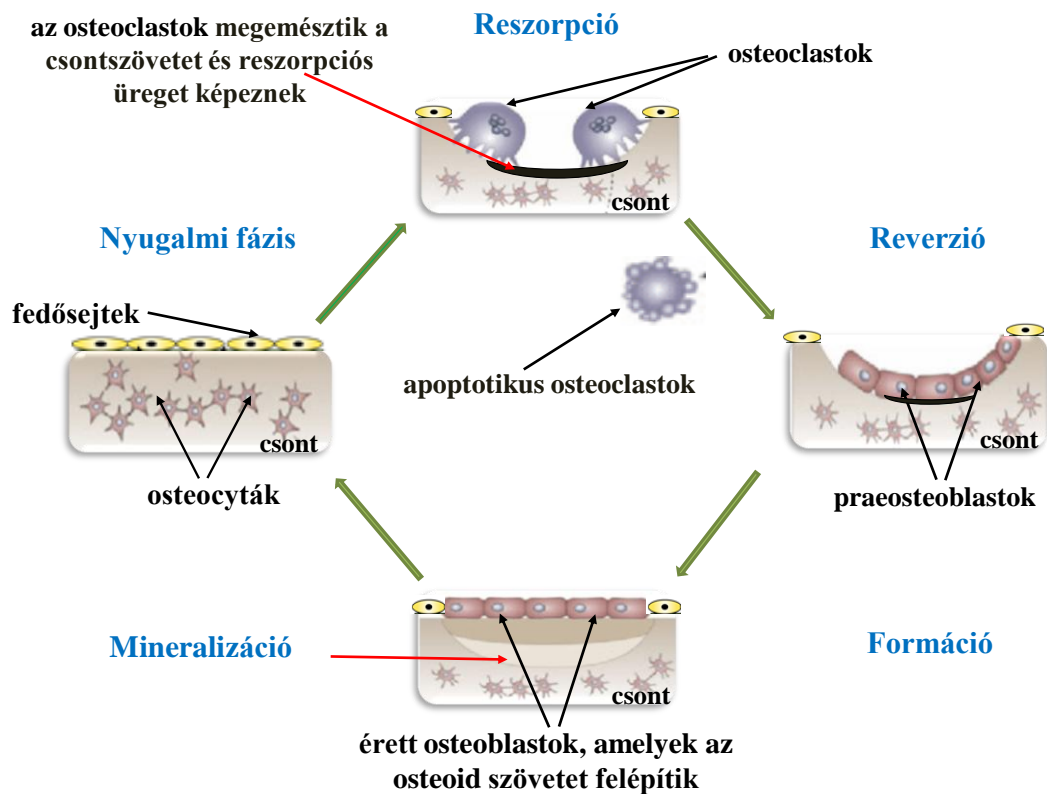
Az osteoclastok csontvelői eredetű haemopoeticus őssejt-prekursorokból, a granulocyta-macrophag irányba elkötelezett progenitor sejtekből (CFU-GM), alakulnak ki. A korai praeosteoclastok mononuclearis prefúziós osteoclastokká differenciálódnak, majd később multinuclearis osteoclastokká fuzionálnak. Az osteoclast differenciálódáshoz az osteoblastokkal kialakított sejt-sejt kontaktus, továbbá szolubilis citokinek (köztük makrofág kolónia-stimuláló faktor, M-CSF és interleukin 1, IL-1), valamint RANKL jelenléte szükséges [44]. A differenciálódás előrehaladtával a hormonális szabályozás is a lokális citokin környezetben keresztül fejti ki hatását, mivel a csontanyagcsere szempontjából fontos hormonok receptorai (PTH, D-vitamin) az érési folyamat során

eltűnnek az osteoclastok felszínéről, illetve sejtmagjából. Így ezek a hormonok főleg a differenciálódó osteoblastokon keresztül hatnak az osteoclastogenesisre, serkentve a stroma- és osteoblast-prekurzor sejtek IL-6- és IL-11-termelését [49].

A csontszövet szerves extracelluláris mátrixának döntő részét kollagén rostok, elsősorban I. típusú kollagén, és emellett egyéb, nem kollagén típusú molekulák, a proteoglikánok, glikoproteinek, karboxilált fehérjék és sejteket összetartó kötőfehérjék alkotják. Az I. típusú kollagént az osteoblastok, valamint a fibroblastok termelik. A kollagének prokollagénből képződnek, hélix elrendezésben, homológ peptidláncokból állnak [50]. A prokollagén mindkét végén non-helikális régiókat tartalmaz, ezek az aminos terminális és karboxi-terminális régiók (N-, és C-telopeptidek, N-, és C-propeptidek). Szekréciót követően a prokollagénről peptidáz katalízissal leválik egy N-, és C-terminális propeptid, és az így szabaddá váló telopeptidek irányítják a kollagénrostok polimerizációját [51]. A szerves állomány  $\text{Ca}^{2+}$ - és  $\text{PO}_4^{2-}$ -ionokból álló hidroxipapatit kristályok formájában rakódik le a kollagén rostok által létrehozott térhálóban, ami megadja a csont mechanikai szilárdságát [52].

A csontszövet az élet során folyamatosan épül (modelling), majd a csúcscsonttömeg elérése után szakaszosan átépül (remodelling). Az osteoblastok és osteoclastok aktivitása, így a csontbontás és csontépítés folyamatai egymással szoros összehangolt kapcsolatban vannak, ami a szabályzó faktorok (szisztémás és helyi) kölcsönhatásainak eredménye. A remodelling soksejtű elemi egységekben (basic multicellular unit, BMU) zajlik, ahol a nyugalomban lévő csontállomány felszínét borító lapos osteoblast sejtek helyére osteoclastok sorakoznak fel, és proteolitikus enzimeik segítségével alagutat vájnak a csontba, megkezdik a csont feloldását, reszorpciós üregeket (Howship-lacuna) képeznek. Ez a szakasz 7–10 napig tart, majd az osteoclastok apoptosisa következik be. Ezzel egyidőben aktív osteoblastok érkeznek a kialakult reszorpciós üregekbe, amit először szerves alapállománnyal (főként I. típusú kollagénnel) kitöltöttek, majd később ásványi anyagokat építenek be és megindul az új csont képzése. [53,54]. A csont-remodelling folyamatát az 1. ábra szemlélteti.

A csontreszorpció és formáció közti egyensúly kialakításában a csontszövet sejtes elemei, helyi hatású- és szisztémás mediátorok, valamint citokinek összehangolt működése vesz részt [55]. A remodellinget szabályzó helyi hatású- és szisztémás mediátorokat, valamint ezek fokozó és gátló hatását az 1. táblázat foglalja össze.



1. ábra. Csont-remodelling folyamata (forrás: saját ábra)

1. táblázat. A remodellinget szabályozó helyi hatású- és szisztémás mediátorok, valamint ezek fokozó és gátló hatása [55].

Fokozó hatások	Gátló hatások
<b>Helyi hatású mediátorok</b>	
IL-1	TGF- $\beta$
IL-6	OPG
TNF- $\alpha$	IFN $\gamma$
IL-11	IL-4
IL-17	IL-10
FGF	IL-13
PG	IL-18
SCF	IGF-I
RANKL	PDGF
GM-CSF	BMP
<b>Szisztémás mediátorok</b>	
PTH	Calcitonin
PTHrP	Oestrogen
Thyroxin	Testosteron

## **2.2. OPG/RANKL/RANK rendszer**

Az osteoprotegerin, valamint a nukleáris faktor *kappa* B receptor aktivátor ligand, a tumor nekrozis faktor receptor szupercsalád két tagja, elengedhetetlen a csontfelszívódás szabályozásában [1,2]. Az OPG szolubilis fehérje, ami a keringésben 60 kDa-os monomer, továbbá diszulfid hidakkal összekapcsolt 120 kDa-os homodimer formában van jelen. Az OPG az osteoclast aktiválódás és differenciálódás negatív szabályozója, ami az osteoblastok és más sejttípus által szekretált csapda receptor (szolubilis RANK-receptor) a RANKL-hoz kompetitíve kötődik. A RANKL-ot elsősorban az osteoblastok, receptorát a RANK-ot a praeosteoclastok és ugyanebből a sejtvonalból származó sejtek expresszálják. Amikor a RANKL a RANK-hoz kötődik, osteoclastogenezist és csontreszorpciót indukál [3,56]. A RANK aktiválódás specifikus gének expressziójához vezet, melyek szerepet játszanak az osteoclastok differenciálódásában, túlélésében és csontreszorpciós aktivitásában. Az OPG a RANKL-hoz kötődve megakadályozza az osteoclaston levő RANKL/RANK kötődést, ezáltal gátolja a többmagvú funkcióképes osteoclastok kialakulását, valamint a csontbontást [57]. Az OPG/RANKL/RANK rendszer zavara fokozott osteoclast aktivitáshoz és csontreszorpcióhoz vezethet. Az osteoblastok nyugalomban relatíve nagy mennyiségű OPG-t termelnek, aktiválódás után azonban az OPG termelése lecsökken, a RANKL-é viszont emelkedik [58]. A RANKL/OPG hányadosnak jelentősége van a remodelling során. Amennyiben az OPG szekréció csökken vagy a RANKL expresszió megnő, a remodelling egyensúlya a reszorpció irányába mozdul el. Ellentétes hatást vált ki a RANK expresszió csökkenése vagy az OPG termelés megnövekedése [59-61].

## **2.3. Csontszövetre ható hormonok kapcsolata a csontanyagcserével**

### **2.3.1. D-vitamin anyagcseréje és csontanyagcserére való hatása**

A D-vitamin a zsírban oldódó, szteránvázás vegyületek csoportjába tartozik. Két legfontosabb formája a cholecalciferol (D<sub>3</sub>-vitamin) és a növényi eredetű ergocalciferol (D<sub>2</sub>-vitamin). A D-vitamin fotolitikus átalakulása a bőrben kezdődik, ahol a 7-dehydro-cholesterinből a napfény UV-B sugárzásának (290-315 nm) hatására kialakul a D<sub>3</sub>-previtamin, majd D<sub>3</sub>-vitaminná izomerizálódik. Ennek a metabolitnak a biológiai hatásossága csekély, az aktiválódáshoz újabb átalakulásokra van szükség. A D<sub>2</sub>- és a D<sub>3</sub>-vitamin a továbbiakban azonos átalakulásokon megy át, és a keletkezett metabolitok

biológiai hatásai azonosak. A D-vitamin a májsejtek mitokondriumában a 25-ös szénatomon hidroxilálódik a citokróm P450 monooxygenáz-rendszerhez tartozó CYP enzimek hatására, melynek eredményeként kialakul a 25OHD-vitamin. A második hidroxilációs lépés a vese proximális tubulusaiban történik az 1  $\alpha$ -hidroxiláz enzim hatására, amely során kialakul a hatékony 1,25(OH)<sub>2</sub>D-vitamin (D-hormon) [62].

A D-vitamin és az összes hidroxilált metabolitja a plazma fehérjéihez kötődve szállítódik a vérben, részben D-vitamin-kötő fehérjéhez (Vitamin D binding protein, DBP), részben albuminhoz kötődve. A D-vitamin-kötő fehérje a májban szintetizálódik és koncentrációja a vérben molárisan hússzor nagyobb, mint a D-vitamin metabolitoké. A 25OHD-vitamin 88%-a a specifikus transzportfehérjéhez kötődik, 0,03%-a szabad, a többi albuminhoz kötődve kering a vérben. A D-vitamin félélet-ideje a keringésben magas, ami annak a következménye, hogy kötött állapotban kevésbé metabolizálódik. A DBP-hez kötődő D-vitamin a glomerulus membránján keresztül filtrálódik, továbbá a proximális tubulusban resorbeálódik. Az aktív D-vitamin a retinsav X-receptorával (RXR) heterodimert képez a nucleáris receptoraihoz (Vitamin D receptor, VDR) való kötődése révén, továbbá a ligandkötés után a szabályozott gén promoter régiójában a VDRE-hez (Vitamin D Response Element) kötődve befolyásolja annak működését [63].

A D-vitamin alapvető fontosságú az egészséges csontozat számára, legfőbb hatását a kalcium anyagcserére fejt ki. Az 1,25(OH)<sub>2</sub>D-vitamin a vékonybélben közvetlenül segíti a kalcium felszívódását az enterocytákban, és indukálja a kalcium felszívódáshoz szükséges fehérje, a kalbindin szintézisét, továbbá a Na-P<sub>i</sub> kotranszporter expressziójának stimulálásán keresztül a foszfát felszívódását segíti [64].

Az 1,25(OH)<sub>2</sub>D-vitamin hatása az osteoblastokon és az osteoclastokon is érvényesül, mivel mind az osteoclast, mind az osteoblast előalakokon D-vitamin receptor található. Az aktív D-vitamin a parathormonnal (PTH) együtt növeli a RANKL kifejeződését az osteoblastokon, ezen keresztül fokozza az osteoclastok érését és aktivitását, továbbá gátolja a kifejezett osteoblastok apoptózisát, valamint fokozza a csontképzést [54]. Az 1,25(OH)<sub>2</sub>D-vitamin a normális plazma kalcium és foszfát homeosztázist a csont reszorpcióján keresztül is szabályozza az osteoclastogenesis és osteoclastaktivitás gátlásával, a csontokban a parathormonnal együtt egyensúlyban tartják a kalcium lerakódás és felszabadulás folyamatát, a vese disztális tubulusokban pedig stimulálják a calcium reabszorpciót, vagyis a kalcium kiürülését gátolják. Hatására az I-es típusú kollagén és a

mátrixfehérjék (osteocalcin, osteopontin) képződése, így az osteoid szövet mineralizációja fokozódik [65,66].

Súlyos D-vitamin-hiányban felnőttkorban osteomalácia, gyermekkorban rachitis alakul ki. Időskori osteoporosisban fokozódik a csonttörés esélye, mert a csontátépülés folyamata eltolódik a csontbontás irányába. Osteomaláciára utaló jelek nélkül fennálló kisfokú D-vitamin-hiány nagyobb törési rizikóhoz vezethet, aminek oka, hogy csökken a bélből a kalcium felszívódása, szekunder hyperparathyreosis jön létre, aminek következtében felgyorsul a csontátépülés, így csontvesztés alakul ki, valamint károsodik a csont mikroszerkezete [67].

### **2.3.2. Parathormon hatása a csontanyagcserére**

A PTH a mellékpajzsmirigy fősejtjeiben termelődő, 84 aminosavból álló peptidhormon, a kalcium-anyagcsere fő szabályozója. A bioszintézist és szekréciót a szérumban kalcium, valamint a szérumban magnézium koncentráció csökkenése is fokozza. PTH hatására a vesében nő az 1  $\alpha$ -hidroxiláz aktivitás, aminek eredményeképpen fokozódik az 1,25(OH)<sub>2</sub>D-vitamin szintézis [68]. A PTH a csontreszorpció fő aktivátora, hatására (1,25(OH)<sub>2</sub>D-vitaminnal együttműködve) az osteoblastok membránjában fokozódik a RANKL expresszió, ami stimulálja az osteoclastogenezist, valamint az érett osteoclastokat is aktiválja. PTH receptorok csak az osteoblastokon vannak, az osteoclastok működését az osteoblastokon keresztül közvetve szabályozza az IL-1, IL-6, IL-11 citokinek termelésének serkentésével. Az osteoblastokon a PTH a receptorára kötődve az OPG szekréció csökkenését indukálja. Az aktiválódott OPG/RANKL/RANK rendszeren keresztül a RANKL túlsúlyba kerül, az osteoclastok felszínén jelen levő RANK-hoz kötődik, ami az osteoclast differenciálódás, valamint a csontreszorpció fokozódásához vezet [69].

### **2.3.3. Nemi hormonok hatása a csontanyagcserére**

A nemi hormonok (androgének, oestrogének) fontos hatással vannak a csontok fiziológiájára, így alapvető szerepet játszanak a csontok növekedésének szabályozásában, az epiphysisfugák záródásában. Az oestrogének receptoraikon (ER $\alpha$  és ER $\beta$ ) keresztül fejtik ki hatásaikat. Receptoraik mind az osteoblastokon, mind osteoclastokon és az osteocytákon is megtalálhatók. Az oestradiol hatás az osteoblastokon az inzulin-szerű növekedési faktor (IGF), OPG és transzformáló növekedési faktor *béta* (TGF- $\beta$ ) szintézis fokozásával, valamint a csontvelőben a monocyták IL-6, IL-1, tumor nekrosis faktor (TNF)

termelésének gátlásával érvényesül. Az oestrogének nagyobb mértékben, mint az androgének gátolják a csontreszorpciót, növelik a csontképzést, gyorsítják az osteoclastok apoptosist. Az osteoblastokon közel azonos mennyiségű androgén- és oestrogén-receptor található. Ezen kívül chondrocytákon és praeosteoclastokon is találtak androgén receptorokat, továbbá a csontreszorpció gátlásában, valamint a csontképzés fokozásában a major androgéneknek fontos szerepük van. Ennek eredményeképpen az androgének és oestrogének csont protektív hatással bírnak [70].

#### **2.3.4. Calcitonin hatása a csontanyagcserére**

A calcitonin a pajzsmirigy C-sejtjei által termelt 32 aminosavból álló peptidhormon, amely közvetlenül hat az osteoclastokra. A calcitonin szekréciónak a szérumban a kalcium koncentrációjának emelkedése stimulálja. A calcitonin a csontokban a PTH és D-vitamin hatását blokkolja. Továbbá, az osteolitikus csontlebonthatást gátolja, valamint a szérumban a kalcium koncentrációját csökkenti [71].

#### **2.3.5. Pajzsmirigyhormonok hatása a csontanyagcserére**

A pajzsmirigyhormonoknak fontos szerepük van a csontanyagcsere szabályozásában, jelenlétük szükséges a csontok éréséhez. A csontszövetre kifejtett hatásuk főként az osteoblastokon jelen levő magreceptorokon keresztül érvényesül, de membránreceptorokat is aktiválhat. Trijód-tironin hatására az osteoblastokban növekszik az alkalikus foszfataz, osteocalcin, IGF-I szintézise. A pajzsmirigy hormonok emelkedett koncentrációjának következtében felgyorsul a csontanyagcsere, ami a csontreszorpció túlsúlyát eredményezi, aminek hatására csonttritkulás alakul ki [72].

#### **2.3.6. Glucocorticoidok hatása a csontanyagcserére**

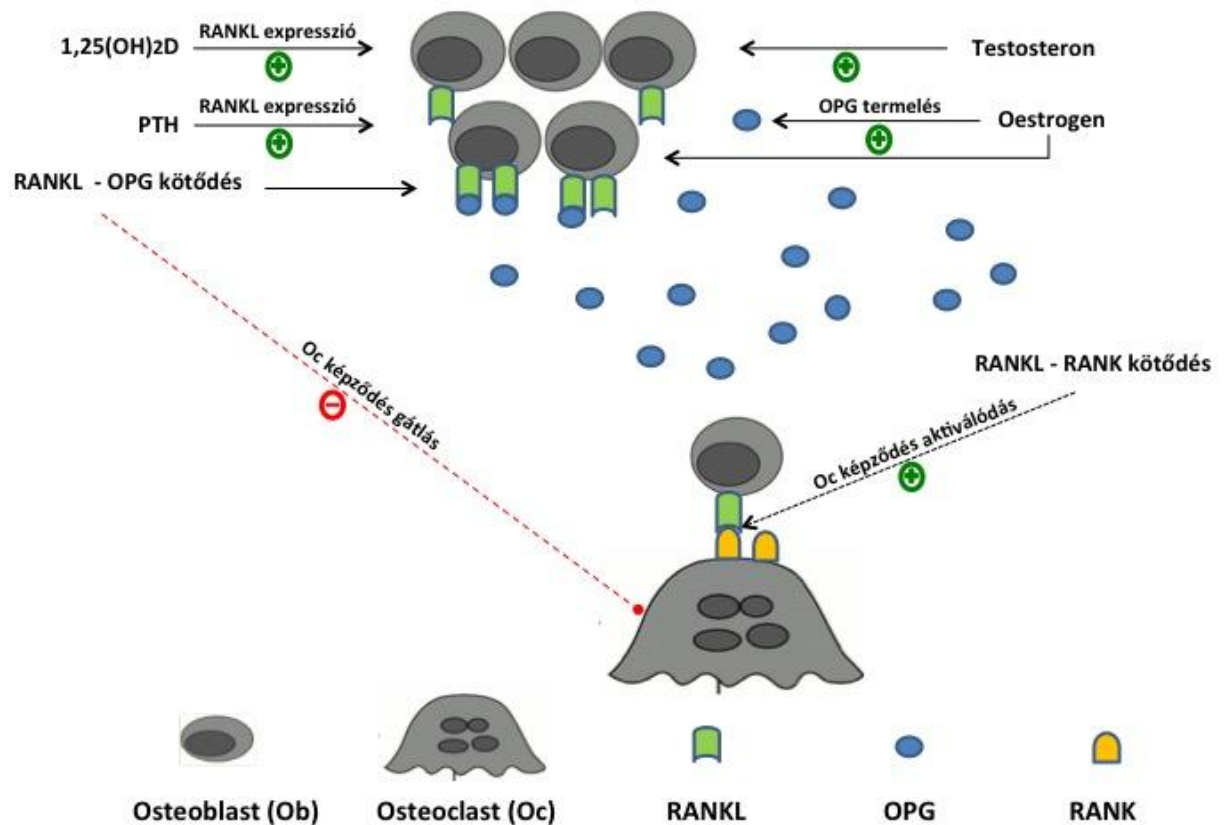
A glucocorticoidokat a mellékvesekéreg termeli, csontanyagcsereben betöltött szerepük az osteoblastokra, továbbá az osteoclastokra és a kötőszöveti sejtekre kifejtett hatásukkal magyarázható. A glucocorticoid hormonok gátolják az osteoblastok proliferációját, és a kiérett osteoblastok funkcióit, ezáltal a kollagén és osteocalcin szintézisét. Továbbá közvetlenül gátolják az osteoclastok csontmátrixhoz való letapadását. Hatásukra a szérumban a kalcium koncentráció, valamint a kalcium abszorpciója a bélből csökken, részben közvetlenül, részben a D-vitamin aktiválódás gátlása miatt. Szekunder

hyperparathyreosist előidézve, a csontból kalcium kiáramlást okoznak, hatásukra a vizelet kalcium ürítés fokozódik [55,73].

### 2.3.7. Növekedési hormon hatása a csontanyagcserére

A növekedési hormonnak jelentős szerepe van a csontok növekedésében, érési folyamataiban, hatását az IGF-I és somatostatin közvetítésén keresztül éri el. Hatására a praeosteoblast-osteoblast átalakulás, valamint a kollagén szintézis fokozódik [55].

A 2. ábra összefoglalja az értekezésben vizsgált, OPG/RANKL/RANK rendszert hormonálisan befolyásoló tényezőket.



2. ábra Az OPG/RANKL/RANK rendszer és hormonális kapcsolata (forrás: saját ábra)

RANKL: nukleáris faktor *kappa* B receptor aktivátor ligand; RANK: a RANKL receptora;

OPG: osteoprotegerin; PTH: Parathormon; 1,25(OH)<sub>2</sub>D: D-vitamin

## **2.4. Cystatin C és csontanyagcsere kapcsolata**

A cystatin C kis molekulatömegű (13kDa) fehérje, cisztein proteináz inhibitor, amit minden sejtmaggal rendelkező sejt termel, az osteoblastokban is szintetizálódik és lassítja az osteoclast képződést a praeosteoclastok differenciálódásának egy késői stádiumában [20,21]. Az osteoclastok csontreszorpciós aktivitása különböző proteolitikus enzimektől függ, különösen a cisztein proteinázok csoportjába tartozó enzimektől. Alapvetési vizsgálatok azt mutatták, hogy a cisztein proteináz gátlók reverzibilisen gátolják a csont mátrix lebomlását az osteoclastok melletti reszorpciós lakunákban [74].

## **2.5. Csontspecifikus biokémiai markerek**

A metabolikus csontbetegségek differenciál diagnosztikájára, valamint a terápiás hatékonyság megítélésére és követésére, a klinikai laboratóriumi vizsgálatok széles skálája áll rendelkezésre. A csontanyagcsere legfontosabb laboratóriumi vizsgálatai közé sorolhatók a kalcium (total és ionizált), foszfát, kreatinin (szérumból és vizeletből), glomerulus filtrációs ráta (GFR), total alkalikus foszfátáz aktivitás, szérumfehérjék (összfehérje, albumin, immunglobulinok) meghatározása. Továbbá, a gonádok (testoszon, oestrogén), mellékvesekéreg (glucocorticosteroidok), valamint a pajzsmirigy (TSH, fT3, fT4) funkciójának vizsgálata. A kalcium- és csontanyagcsere szabályozásában részvevő hormonok – a PTH és D-vitamin – mérése jelentős. A csontképző markereket az osteoblastok termelik, vagy a prokollagén metabolizmusából származnak, míg a reszorpciós markerek az osteoclastok vagy a kollagén lebomlási termékei [75-77].

### **2.5.1. A csontfelépítés biokémiai markerei**

A szérumban lévő alkalikus foszfátáz aktivitás többféle szövetből származik, így megkülönböztetünk máj, csont, vese izoformokat, valamint intestinális, placentáris és csírasejtes izoenzimeket. A csontspecifikus alkalikus foszfátázt (BSAP) az osteoblastok termelik és termelődésük pozitívan korrelál a csontképződéssel. Többféle meghatározási módszert fejlesztettek ki a máj és a csont eredetű izoformok elkülönítésére, amely során a specifikusabb csonteredetű frakció elektroforetikus elválasztható [77]. Az újabb immunoassayk szövet-specifikus monoklonális antitesteket használnak a csont izoforma meghatározására.

Az osteocalcin (OC) 49 aminosavból álló kalciumkötő fehérje, amit az osteoblastok termelnek, és aminek a képződését a D-vitamin fokozza. Az OC molekula három glutaminsav reziduumot tartalmaz, amelyek a K-vitamin-függő poszt-transzlációs karboxilációval gamma-karboxi-glutamáttá alakulnak át. A karboxiláció a fehérje konformáció változását eredményezi, ami lehetővé teszi az OC kötődését a hidroxipapatittal, így elősegítve a csontmátrix mineralizációját. Az OC jó indikátora az osteoblast aktivitásnak, mivel egy része az osteoblastokból kikerülve nem a csontmátrixba épül be, hanem a véráramba is szekretálódik. Az instabil OC molekulát egy proteáz enzim a 43-44 aminosavak között hasítja, ennek következtében alakul a stabilabb 1-43 N-terminális fragmentum (N-MID-OC), aminek meghatározására lehetőség van a klinikai laboratóriumokban [71,77].

Az I. típusú kollagén a fibroblastokban és az osteoblastokban termelődő I. típusú prokollagénből képződik. A kollagéné váló átalakulás, továbbá a csontállományba való beépülés során az amino- és karboxi-terminális propeptideket tartalmazó prokollagén molekula enzimatis katalízisen esik át, ami az I. típusú N-terminális propeptid (P1NP) és az I. típusú C-terminális propeptid (P1CP) prokollagén felszabadulását eredményezi. Meghatározásukra többféle immunoassayt fejlesztettek ki [50,51,71].

### **2.5.2. A csontlebontás biokémiai markerei**

A csontmátrixban a kollagén molekulák rostokat képeznek. A csontlebontás során a kollagén-mátrix proteolitikusan degradálódik, és a keresztkötésű molekulák a keringésbe kerülnek. Ezek a keresztkötések hidroxilzil-piridolinokból (piridolinok, Pyd), valamint lizil-piridolinokból (deoxi-piridolinok, Dpd) állnak, és a kollagén mechanikai stabilizálásáért felelősek. A piridolinok elsősorban a csontokban, porcokban és lágy szövetekben találhatóak, a deoxi-piridolinok inkább a csont kollagénjére jellemzőek. Ezek a molekulák a vesén keresztül választódnak ki, 40% szabad formában, 60% peptidhez kötötten, mennyiségük szérumból és vizeletből egyaránt kimutatható. A két vegyület közül, a deoxi-piridolin specifikusabb markere a csontreszorpciónak. Mind a szabad, mind a kötött formákra fejlesztettek ki immunoassay meghatározásokat [75,77].

A csontreszorpciót jellemző általában legtöbbször alkalmazott laboratóriumi vizsgálati módszer a karboxi-terminális telopeptideket (CTX) meghatározó immunoassayk. Mind az amino-terminális telopeptideket (NTx), mind a CTx a kollagén lebomlásakor szabadulnak

fel. Ezek a fragmentumok a keringésbe kerülnek, majd a vesén keresztül kiválasztódnak [71,75].

Az I. típusú kollagén predomináns aminosava a hidroxiprolin és hidroxilizinglikozidok, amelyek a kollagén degradációja során szabadulnak fel és a vizelettel ürülnek [75]. Meghatározásuk ma már háttérbe szorult.

A tartarát rezisztens savi foszfatáz (TRAP), glikozilált monomer metallo-enzim, fokozottan expresszálódik megnövekedett osteoclast aktivitásban és a keringésbe szekretálódik. A keringésben két izoenzimje található (TRAP5a, TRAP5b), ezek közül a TRAP5b származik az osteoclastokból, a TRAP5a az aktivált makrofágokban található. A keringésben a proteázok által hidrolizálódnak és olyan fragmenseket képeznek, amelyek a májban metabolizálódnak, és a vizelettel kiválasztódnak. Meghatározásuk ma már nem használatos [71,77].

## **2.6. Csont ásványianyag-sűrűség (osteodensitometria) mérés**

A csontok egészségének vizsgálatában, a metabolikus csontbetegségek diagnosztikájában és követésében, valamint a bekövetkező törések előrejelzésében a csont ásványianyag-sűrűség mérésének kulcsfontosságú jelentősége van. A csont ásványianyag-sűrűségének mérésére szolgálnak a különböző densitometriás vizsgálatok. A densitometria nagy pontosságú és megbízhatóságú, számítógépes értékelést végző eljárás. Ide tartozik az egyes foton abszorpciometria (SPA) és egyszeres energiájú röntgenfotonos abszorpciometria (SXA), továbbá a kettős energiájú röntgenfotonos abszorpciometria (DXA). A végtagcsontok mindhárom módszerrel, míg az axialis csont régiók (lumbalis gerinc, csipő és proximalis femur), valamint a teljes csontváz a DXA-val mérhető. A mérési eredmény az ásványi csontsűrűség [BMD, (g/cm<sup>2</sup>)] [78,79].

A csont ásványianyag-sűrűség nemtől és kortól függ. Az értékelés legelterjedtebb módja a *T-score* megadása, ami a mért BMD értéket a populáció fiatalkori átlagértékéhez hasonlítja és a különbséget a populáció szórásában (SD) adja meg.

A WHO munkacsoport diagnosztikus kategóriáinak ajánlása: *T-score*: -1,0 felett normális a csont ásványianyag -tartalma, *T-score*: -1,0 és -2,5 között mérsékelten csökkent (*osteopenia esetén*), *T-score* : -2,5 alatt kóros (*osteoporosisban*), továbbá *T-score* : -2,5 alatti csonttömeg és meglévő osteoporotikus csonttörés a *súlyos osteoporosis* [79].

## 2.7. 25-hidroxi-D-vitamin meghatározási módszerek

A 25-hidroxi-D-vitamin meghatározás „arany standard” módszere a folyadékkromatográfia-tandem tömegspektrometria (LC-MS/MS) [36]. Rutin laboratóriumban különböző módszerek állnak rendelkezésre a 25OHD koncentráció meghatározására, ilyen például a nagynyomású folyadékkromatográfia (HPLC), az immunkémiai módszerek közül az antitest-kötésen alapuló, különböző jelölésű módszerek, mint például a chemiluminescens immunoassay (CLIA), radioimmunoassay (RIA), továbbá a specifikus fehérje-kötésen alapuló elektrochemiluminescens immunoassay (ECLIA). Bármilyen módszert választunk a szérumban 25OHD koncentráció meghatározására, a vizsgálat során az első fontos lépés a D-vitaminnak a kötőfehérjétől (DBP) való elválasztása [80,81].

Az immunkémiai módszerek analitikai és gyakorlati megbízhatóságát a gyártók által garantált minőségű ellenanyag és egyéb reagensek minősége, valamint az egész mérési folyamat egységes volta biztosítja. További minőségi előnyt és költségkímélést tesz lehetővé a nagyszámú minta sorozat-vizsgálatot biztosító automatizálás.

A HPLC-vel történő meghatározás az egyes 25-hidroxi-D-vitamin metabolitok (25OHD<sub>2</sub>, 25OHD<sub>3</sub>) szelektív mérésére alkalmas módszer, amely során a mintát az előkészítéskor kicsapató reagensekkel megtisztítjuk a fehérjétől, illetve az interferenciát okozó vegyületektől, majd ezt követően történik a metabolitok (25OHD<sub>2</sub>, 25OHD<sub>3</sub>), valamint a belső standard elválasztása fordított silica töltetű oszlopon. Az elválasztott 25OHD<sub>2</sub> és 25OHD<sub>3</sub> metabolitok kvantitatív meghatározása abszorpciós UV detektálással történik 254 vagy 265 nm-en [81].

Az immunoassay első generációja az antitest-kötésen alapuló, kompetitív elven működő I<sup>125</sup>RIA, ahol extrakciót követően az immunkomplexben a mérendő 25OHD-t radioaktívan jelölik. A mintában lévő 25OHD verseng az I<sup>125</sup>-el jelölt 25OHD-val az antitesthez való kötődésben. A radioaktivitás meghatározása egy gamma-számlálóval történik, ami fordítottan arányos a mintában levő 25OHD koncentrációval [81].

A fehérje-kötési elven (PBA) alapuló 25OHD meghatározási módszer a fiziológiásan keringő specifikus D-vitamin-kötő fehérjét (DBP) használja kötőanyagként, amelynek nagy az affinitása a 25OHD-hoz. Ezen az elven alapszik a 25OHD ECLIA meghatározási módszer [81].

A CLIA-val történő 25OHD meghatározás egy direkt, kompetitív chemiluminescens immunoassay, ahol a 25OHD-ra specifikus antitest mágnesez partikulumhoz van kötve. A mintában lévő 25OHD verseng az isoluminol származékkal jelölt 25OHD-al az antitesthez való kötődésben. Az indítóreagensek hozzáadását követően gyors chemiluminescens reakció indul el. A fényjelet egy fotoelektron-sokszorozó relatív fényegységben (RLU) méri, ami fordítottan arányos a mintában lévő 25OHD koncentrációval [81].

Jelenleg a rutindiagnosztikai laboratóriumokban alkalmazott legújabb generációjú immunoassayk mind a 25OHD<sub>2</sub> és 25OHD<sub>3</sub> metabolitok meghatározására alkalmasak, és az együttes értéket total 25OHD értéként fejezik ki.

### **3. CÉLKITŰZÉSEK**

Jelen munkánk a HunMen tanulmányra épül, amelyben debreceni lakóhelyű, 50 éves vagy idősebb, véletlenszerűen kiválasztott férfiak vettek részt 2009 szeptemberétől 2010 szeptemberéig a D-vitamin ellátottság és csontanyagcsere vizsgálatára [82].

#### **3.1. Osteoprotegerint befolyásoló tényezők vizsgálata**

Munkánk egyik célja volt, hogy a HunMen tanulmányban résztvevő férfi kohorszban meghatározzuk az OPG és sRANKL koncentrációkat, valamint ezen markerek kapcsolatát elemezzük az életkorral, a csontanyagcsere biokémiai markereivel, a cystatin C-vel, a nemi hormonokkal, valamint a csont ásványianyag-sűrűség mérési adataival.

Ezen vizsgálatok során a következő kérdésekre kerestük a választ:

- Milyen mértékű kapcsolat van az OPG, valamint a sRANKL koncentráció és csontanyagcsere biokémiai markerei között (25OHD, PTH, Osteocalcin, CTx és P1NP)?
- Az életkor mennyire befolyásolja a vizsgált paraméterek koncentrációit a vizsgált férfi kohorszban?
- Van-e összefüggés az OPG és a cystatin C, total  $17\beta$ -oestradiol, valamint a total tesztoszon között?

#### **3.2. A 25-hidroxi-D-vitamin mérési adatok standardizációja**

Több in vitro diagnosztikai eszközöket gyártó cég, kutató laboratórium, kereskedelmi laboratórium, fejlesztett ki total 25OHD eljárásokat. Ezen mérési eljárások eredményei között jelentős eltéréseket tapasztaltunk, ami felvetette a kérdést, hogy a klinikailag releváns mérési értékek esetén, mely módszer ad megbízható, pontos eredményeket. Ennek kapcsán merült fel, a különböző módszerekkel mért 25OHD értékek standardizációja rutin diagnosztikai laboratóriumban.

Munkánk további célja a HunMen tanulmány D-vitamin mérési adatainak standardizációja volt, ami kapcsán a következő konkrét célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

- A HunMen tanulmányban levő résztvevők mintáinak újra elemzése a szérumban 25OHD koncentrációk meghatározásával egy időben a DEQAS minták mérésével a laboratóriumban jelenleg alkalmazott DiaSorin LIAISON<sup>®</sup> 25OHD total CLIA meghatározási módszerrel.

- A DEQAS minták (sorszám: 481-485) NIST célértékeiből és a DEQAS minták DiaSorin LIAISON<sup>®</sup> CLIA-val mért 25OHD koncentrációk kapcsolatából származó mesterképlet alkalmazása a korábban HPLC-vel mért HunMen 25OHD mérési adatokra.

## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1. Vizsgálati személyek

A célkitűzésben megfogalmazott vizsgálatokat a HunMen tanulmányban résztvevők éhgyomri szérum mintáiból végeztük. A mintákat -70 °C-on tároltuk a feldolgozásig. A HunMen tanulmányban a résztvevők D-vitamin ellátottsága és csontanyagcseréje volt a vizsgálat tárgya. Összesen 229, véletlenszerűen kiválasztott önkéntes résztvevő került a vizsgálati személyek közé [82]. Részletes tájékoztatást követően a tanulmány résztvevői írásos beleegyezést adtak.

*Besorolási kritériumok:* 50 év feletti, ambuláner, általánosan egészségesnek vélt férfiak.

*Kizárási kritériumok:* ismert csontanyagcsere betegség, máj - vagy vesebetegség, és a csontanyagcserét befolyásoló gyógyszeres kezelés (Ca és D-vitamin pótlás).

Részletes kórtörténet felvétele után, és egy éjszakai éhezést követően került sor a vérvételre. A vizsgálatokat natív vacutainer, elválasztó gélt tartalmazó csövekbe vett vérből, centrifugálással nyert szérumból végezték. A résztvevők mintáiból a következő laboratóriumi vizsgálatok kerültek meghatározásra: total bilirubin, aszpartát-aminotranszferáz, alanin-aminotranszferáz, gamma-glutamyl-transzpeptidáz, alkalikus foszfatáz, laktát dehidrogenáz, kolinszteráz, karbamid nitrogén, kreatinin és húgysav.

Kizárássra kerültek azok a résztvevők, akiknek vizsgálati eredményei  $\geq 2 \times \text{ULN}$ . Vizsgálati eredményeik alapján 23 önkéntes adatai nem kerültek be a végleges statisztikai elemzésbe.

A tanulmányt a Debreceni Egyetem Klinikai Központ etikai bizottság jóváhagyta.

### 4.2. Vizsgálati módszerek és paraméterek

A OPG és a szolubilis RANKL (sRANKL) koncentrációkat ELISA módszerrel (Biomedica Gruppe, Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, Wein, Austria), Labsystem Multiscan MS készülékkel határoztuk meg. A meghatározás során, detektáljuk a monomereket, dimereket és a ligand kötött OPG-t, ami monoklonális egér anti-OPG antitestet, valamint befogó antitestként biotinnal jelölt poliklonális kecske antitestet tartalmaz. A sRANKL vizsgálat, olyan enzim-immunoassay, ami érzékeli a nem komplex, szolubilis humán RANKL-ot, ami elfogó molekulaként humán rekombináns OPG-t és a kimutatásra biotinnal jelölt poliklonális kecske antitestet használ.

A 25OHD koncentrációkat LIAISON immunkémiai automatával, 25OHD total, direkt, kompetitív chemiluminescens jelölésen alapuló DiaSorin LIAISON® CLIA módszerrel határoztuk meg (DiaSorin Inc., Stillwater, MN, USA). A vizsgálat során az első inkubálás alatt a 25OHD leválasztásra kerül a kötőfehérjéről és hozzákötődik a szilárd fázison levő specifikus antitesthez, 10 perc után hozzáadjuk az isoluminol származékkal jelölt nyomkövető 25OHD-t. A mintában lévő 25OHD verseng az isoluminol származékkal jelölt 25OHD-al az antitesthez való kötődésben. További 10 percig tartó inkubálást követően, a kötetlen anyagot egy mosási ciklus során eltávolítjuk. Az indítóreagensek hozzáadására után gyors chemiluminescens reakció indul el. A fényjelet egy fotomultiplier relatív fényegységben (RLU) méri, és ez fordítottan arányos a mintában lévő 25OHD koncentrációval.

A 17 $\beta$ -oestradiol, testosteron, parathormon, osteocalcin, I. típusú kollagén C-terminális telopeptid, I. típusú prokollagén amino-terminális propeptid, szexhormon kötő globulin vizsgálatokat (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország), elektrochemiluminescens jelölésen alapuló immunkémiai módszerrel (ECLIA), Roche MODULAR E170-es immunkémiai analizátorral végeztük.

17 $\beta$ -oestradiol (E2) vizsgálat: Az Elecsys oestradiol mérési eljárás a kompetitív elvre épül, ami specifikusan 17 $\beta$ -oestradiol elleni poliklonális antitestet alkalmaz. A mintából a mesterolone hatására felszabadult endogén oestradiol vetélkedik a biotinilált antitesteken lévő kötőhelyekért a hozzáadott ruténium-komplexxel jelölt oestradiol származékkal.

Testosteron (T) vizsgálat: Az Elecsys testosteron mérési eljárás szintén a kompetitív elvre épül, ami specifikusan testosteron ellenes nagy affinitású monoklonális juh antitestet alkalmaz. A mintából a 2-bróm-oestradiol hatására felszabadult endogén testosteron vetélkedik a biotinilált antitesteken lévő kötőhelyekért a hozzáadott ruténium-komplexxel jelölt testosteron származékkal.

Szexhormon-kötő globulin (SHBG) vizsgálat: Az Elecsys SHBG vizsgálati eljárás két, specifikusan humán SHBG elleni monoklonális antitestet alkalmaz, amelynek során az SHBG-specifikus biotinilált monoklonális antitest, valamint az SHBG-specifikus, ruténium-komplexxel jelölt monoklonális antitest reakcióba lép és egy szendvics-komplexet hoz létre.

A szabad 17  $\beta$ -oestradiol indexet (FEI) a teljes 17  $\beta$ -oestradiol SHBG-hez viszonyított arányából, a szabad testosteron indexet (FTI) a teljes testosteron SHBG-hez viszonyított arányából számítottuk.

Parathormon (PTH) vizsgálat: Az intakt PTH meghatározására alkalmazott Elecsys vizsgálat a szendvics elvre épül, amelynek során a biotinilált monoklonális antitest az N-terminális fragmentummal (1-37), míg a ruténium-komplexxel jelölt monoklonális antitest a C-terminális fragmentummal (38 - 84) lép reakcióba.

Osteocalcin (OC) vizsgálat: Az Elecsys N-MID osteocalcin eljárás két monoklonális antitestet használ, melyek specifikusan az N-MID fragmentumon és az N-terminális fragmentumon található epitópok ellen irányulnak. A vizsgálat így mind a stabil N-MID fragmentum, mind a még érintetlen osteocalcin meghatározására alkalmas. Az N-MID osteocalcin-specifikus biotinilált monoklonális antitest és a ruténium-komplexxel jelölt N-MID osteocalcin-specifikus monoklonális antitest reakciója során szendvics-komplex jön létre.

I. típusú kollagén C-terminális telopeptid (CTX) vizsgálat: Az Elecsys  $\beta$ -CrossLaps vizsgálat specifikus az I. típusú kollagén fragmentumok keresztkötésben lévő izomerjeire (pirrol, piridinolinok). A mérés specificitását két olyan monoklonális antitest alkalmazása biztosítja, ami felismeri a lineáris  $\beta$ -8AA oktapeptideket (EKAHD- $\beta$ -GGR). A vizsgálati eljárás a szendvics elvet alkalmazza, amelynek során a  $\beta$ -CrossLaps elleni biotinilált monoklonális antitestek és  $\beta$ -CrossLaps-specifikus, ruténium-komplexxel jelölt monoklonális antitestek lépnek reakcióba.

I. típusú prokollagén amino-terminális propeptid (PINP) vizsgálat: Az Elecsys PINP vizsgálat a szendvics elvet alkalmazza, amelynek során a PINP-specifikus, biotinilált monoklonális antitestek és a PINP-specifikus, ruténium-komplexxel jelölt monoklonális antitestek lépnek reakcióba.

A cystatin C meghatározásokat részecskével erősített immuno-nefelometriás módszerrel, BN ProSpec készülékkel (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Germany) végeztük. A humán cystatin C-re specifikus antitestekkel bevont polistiroil részecskék humán cystatin C-t tartalmazó mintával elkeverve aggregálódnak. A nefelométer által mért szórt fény intenzitása arányos a mintában lévő cystatin C koncentrációjával. A minta cystatin C koncentrációjának meghatározása ismert

koncentrációjú cystatin C standard szérum hígításainak fényszórás értékeiből készített standard görbe alapján történik.

A kreatinin meghatározásokat Kreatinin Jaffé 2. gen. (kompenzált) módszerrel cobas c 111 automatával (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) végeztük. Az eGFR kiszámításához a 4-változós MDRD egyenletet alkalmaztuk [83]. Emellett, az eGFR számítását a CKD-EPI cystatin C és CKD-EPI kreatinin-cystatin C egyenlettel is elvégeztük [84, 85].

A biokémiai vizsgálatok analitikai jellemzőit a 2. táblázatban mutatjuk be.

**2. táblázat. Biokémiai vizsgálatok analitikai jellemzői.**

	<b>CV % (inter-assay)</b>	<b>Kimutathatósági határ (LOD)</b>	<b>Méréstartomány felső határa</b>
OPG	< 8 %	0,14 pmol/L	30 pmol/L
sRANKL	< 6 %	0,02 pmol/L	2 pmol/L
25OHD	< 8 %	10 nmol/L	375 nmol/L
E2	< 7%	0,018 nmol/L	15,78 nmol/L
T	< 9%	0,087 nmol/L	52 nmol/L
SHBG	< 6%	0,350 nmol/L	200 nmol/L
PTH	< 7%	0,127 pmol/L	530 pmol/L
Osteocalcin	< 4%	0,5 µg/L	300 µg/L
CTx	< 7%	0,010 µg/L	6 µg/L
PINP	< 6%	5 µg/L	1200 µg/L
Cystatin C	< 4%	0,05 mg/L	7,58 mg/L

### **4.3. DEQAS minták jellemzése**

A DEQAS egy nemzetközi külső minőségértékelési program, amelyben több mint ezer laboratórium vesz részt és magába foglalja a jelenleg rendelkezésre álló összes 25OHD mérési platformot. Minden DEQAS vizsgálatához (évente négy alkalommal) öt gyűjtött, kevert szérum minta érkezik postai úton, szobahőmérsékleten a résztvevő laboratóriumoknak. A 25OHD eredményeket a laboratóriumok online küldik vissza és a beküldési határidő után a jelentés a DEQAS honlapjáról letölthető. A kapott adatok statisztikai kiértékelése után megállapított ALTM (összlaboratórium szűkített átlag) és a módszercsoporthoz viszonyított torzítás feltüntetésével megadják a módszercsoportok szórását, variációs koefficiensét és elkészítik az adott laboratóriumra szabott hisztogramot. Az ALTM hasonló a referencia mérési eljárás (RMP) NIST célértékével minden egyes minta esetében [86].

2013 áprilisától a DEQAS is közöl NIST célértékeket minden egyes mintára [87], így a résztvevő laboratóriumok számára lehetővé teszik, hogy saját mérési eredményeiket összehasonlítsák a NIST célértékével, emellett a célérték helyettesítheti a referencia módszerrel (LC-MS/MS) kapott értékeket. Továbbá, a DEQAS a total 25OHD (25OHD<sub>2</sub>+25OHD<sub>3</sub>) mellett a 25OHD<sub>2</sub>, 25OHD<sub>3</sub> és 3-epi-25OHD<sub>3</sub> metabolitokra vonatkozóan is közöl NIST célértékeket.

### **4.4. DEQAS és HunMen minták vizsgálata**

2009-2010-ben a HunMen tanulmányban a 25OHD koncentrációkat nagynyomású folyadékkromatográfiával (HPLC) határoztuk meg Jasco HPLC rendszerrel (Jasco, Tokyo, Japan), Bio-Rad reagenskészlettel (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). A HPLC-vel történő meghatározáskor a mintát az előkészítés során kicsapató reagensekkel megtisztítjuk a fehérjéktől, illetve az interferenciát okozó vegyületektől, majd ezt követően történik a metabolitok (25OHD<sub>2</sub>, 25OHD<sub>3</sub>), valamint a belső standard elválasztása fordított silica töltetű oszlopon. Az elválasztott 25OHD<sub>2</sub> és 25OHD<sub>3</sub> metabolitok kvantitatív meghatározása abszorpciós UV detektálással történik 265 nm-en.

A folyamatosan növekvő mintaszám miatt a Laboratóriumi Medicina Intézet rutin diagnosztikai laboratóriumában a 25OHD meghatározásokat 2014 júniusától LIAISON immunkémiai automatával, DiaSorin LIAISON<sup>®</sup> 25OHD total, direkt, kompetitív chemiluminescens immunkémiai (CLIA) módszerrel végezzük.

Jelen munkánkban a 2009-2010-es HunMen tanulmányban levő résztvevők szérum mintáit elemeztük újra a szérum total 25OHD koncentrációik meghatározásával egyidőben a DEQAS minták mérésével. A Laboratóriumi Medicina Intézet részt vesz a DEQAS-ban, és az EQA céljából érkezett öt DEQAS minta (sorszám: 481-485) mérése 2015 októberében, valamint a Hunmen tanulmányban levő résztvevők mintáiból a 25OHD koncentrációk ismételt meghatározása azonos meghatározási módszerrel (DiaSorin LIAISON<sup>®</sup> 25OHD total CLIA), azonos analitikai feltételekkel, azonos időben, ugyanolyan LOT számú reagens használatával történt. Ezt követően a HunMen tanulmány 25OHD mérési eredményeit korrigáltuk, a korrekcióhoz az öt DEQAS minta (sorszám: 481-485) NIST célértékeit és a DEQAS minták DiaSorin LIAISON<sup>®</sup> CLIA-val mért 25OHD koncentrációk kapcsolatából származó lineáris regressziós egyenletet alkalmaztuk.

#### **4.5. Csont ásványianyag-sűrűség mérések**

A HunMen tanulmány résztvevőinek a csont ásványianyag-sűrűség vizsgálatokat a Debreceni Egyetem Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikán, kettős energiájú röntgenfotonos abszorpciometriával (DXA), LUNAR Prodigy (GE-Lunar Corp., Madison, Wisc., USA) denzitométerrel végezték, L1-L4 gerinc (LS), valamint a combnyak (FN) mérési területeken.

#### **4.6. Számítások és elemző statisztikai módszerek**

Jelen vizsgálati eredmények elemzése *“post hoc”* módon történt. A vizsgált paramétereket leíró statisztikával jellemeztük (átlag, median, tartomány, szórás). A normalitás értékeléséhez a Kolmogorov-Smirnov tesztet alkalmaztunk. A legtöbb paraméter nem mutatott normál eloszlást, ezért az analíziseket Mann-Whitney U teszttel végeztük. A paraméterek közötti összefüggést Spearman féle korrelációs elemzéssel vizsgáltuk. A nem normál eloszlást mutató paraméterek esetén logaritmikus transzformációt alkalmaztunk. A vizsgálatok közötti összefüggéseket lineáris regressziós analízissel végeztük. Továbbá, az életkor befolyásolásának csökkentésére a median használatával a vizsgálati populációt életkor szerint két alcsoportra osztottuk.

A  $p < 0,05$  értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. Az elemzésekhez az 19.0-es verziójú SPSS Statistics szoftvert használtuk (IBM Corps., Armonk, NY, USA).

## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1. Vizsgálati résztvevők laboratóriumi és statisztikai jellemzői

A vizsgálati résztvevők laboratóriumi paramétereit, valamint statisztikai jellemzőit a 3. táblázatban tüntettük fel. Az életkor befolyásolásának csökkentésére, életkor szerint, a median használatával (median életkor = 59 év) a vizsgálati populációt két alcsoportra osztottuk: középkorú férfiakat tartalmazó (életkor  $\leq$  59 év,  $n = 98$ ), valamint idősödő férfiakat tartalmazó (életkor  $>$  59 év),  $n = 96$ ) csoportokra. Összehasonlítva a középkorú férfiak és az idősödő férfiak vizsgálati paramétereit, szignifikánsan magasabb OPG és cystatin C koncentrációkat találtunk az idősödő férfi csoportban levőknél, valamint jelentősen alacsonyabb sRANKL koncentrációkat és sRANKL/OPG arányokat (3.táblázat).

**3.táblázat. A vizsgálati résztvevők és vizsgált paraméterek laboratóriumi, valamint statisztikai jellemzői.**

	Összes férfi (n=194)	Középkorú férfiak (életkor $\leq$ 59 év, n = 98)	Idősödő férfiak (életkor $>$ 59 év, n= 96)
Életkor, évek (átlag, tartomány)	60,4 (51-81)	55,6 (51-59) <sup>a</sup>	65,4 (60-81) <sup>a</sup>
BMI, kg/m <sup>2</sup> (átlag, tartomány)	29,2 (17,3-41,7)	28,9 (18-38,5)	29,5 (17,3-41,7)
Osteoprotegerin, pmol/L (átlag, tartomány)	5,0 (2,2-10,1)	4,6 (2,2-7,7) <sup>b</sup>	5,4 (3,0-10,1) <sup>b</sup>
sRANKL, pmol/L (átlag, tartomány) ( $\geq$ 0,020 pmol/L kimutathatósági határ)	0,197 (0,020-0,875) (n=120)	0,226 (0,026-0,875) <sup>c</sup> (n=61)	0,167 (0,020-0,795) <sup>c</sup> (n=59)
sRANKL/OPG arány (átlag, tartomány)	0,043 (0,003-0,256)	0,053 (0,006-0,256) <sup>d</sup>	0,033 (0,003-0,176) <sup>d</sup>
E2, nmol/L (átlag, tartomány)	0,09 (0,02-0,19)	0,09 (0,03-0,19)	0,08 (0,02-0,15)
T, nmol/L (átlag, tartomány)	12,8 (0,3-41,7)	13,1 (2,7-41,7)	12,4 (0,3-32,1)
SHBG, nmol/L (átlag, tartomány)	40,8 (12,3-196,2)	40,7 (12,7-196,2)	40,9 (12,3-115,5)
FEI (átlag, tartomány)	0,0026 (0-0,009)	0,0026 (0,001-0,007)	0,0025 (0-0,009)
FTI (átlag, tartomány)	0,3398 (0,005-0,743)	0,354 (0,081-0,704) <sup>e</sup>	0,325 (0,005-0,743) <sup>e</sup>
PTH, pmol/L (átlag, tartomány)	4,2 (1-10,2)	4,2 (1-10,2)	4,3 (1,6-8,3)
25OHD, nmol/L (átlag, tartomány)	73,1 (11-185)	72,1 (11-137)	74,0 (14-185)
Osteocalcin, $\mu$ g/L (átlag, tartomány)	14,6 (5-35)	15,2 (5-33)	14,0 (6-35)
CTx, $\mu$ g/L (átlag, tartomány)	0,22 (0,01-0,77)	0,24 (0,01-0,77)	0,20 (0,04-0,70)
PINP, $\mu$ g/L (átlag, tartomány)	38,3 (10,5-98,6)	39,2 (10,5-98,6)	37,3 (13,1-81,3)
Cystatin C, mg/L (átlag, tartomány)	0,697 (0,381-1,150)	0,657 (0,381-1,060) <sup>f</sup>	0,736 (0,485-1,150) <sup>f</sup>
LS (L1-L4) BMD, gm/cm <sup>2</sup> (átlag $\pm$ SD)	1,172 $\pm$ 0,185	1,148 $\pm$ 0,167	1,197 $\pm$ 0,199
FN BMD, gm/cm <sup>2</sup> (átlag $\pm$ SD)	0,970 $\pm$ 0,137	0,980 $\pm$ 0,131	0,960 $\pm$ 0,142

Magyarázat: közép- és idősödő férfiak közötti „p” értékek: (a), (b), (f)  $p < 0,001$ ; (c)  $p = 0,048$ ; (d)  $p = 0,007$ ; (e)  $p = 0,049$ .

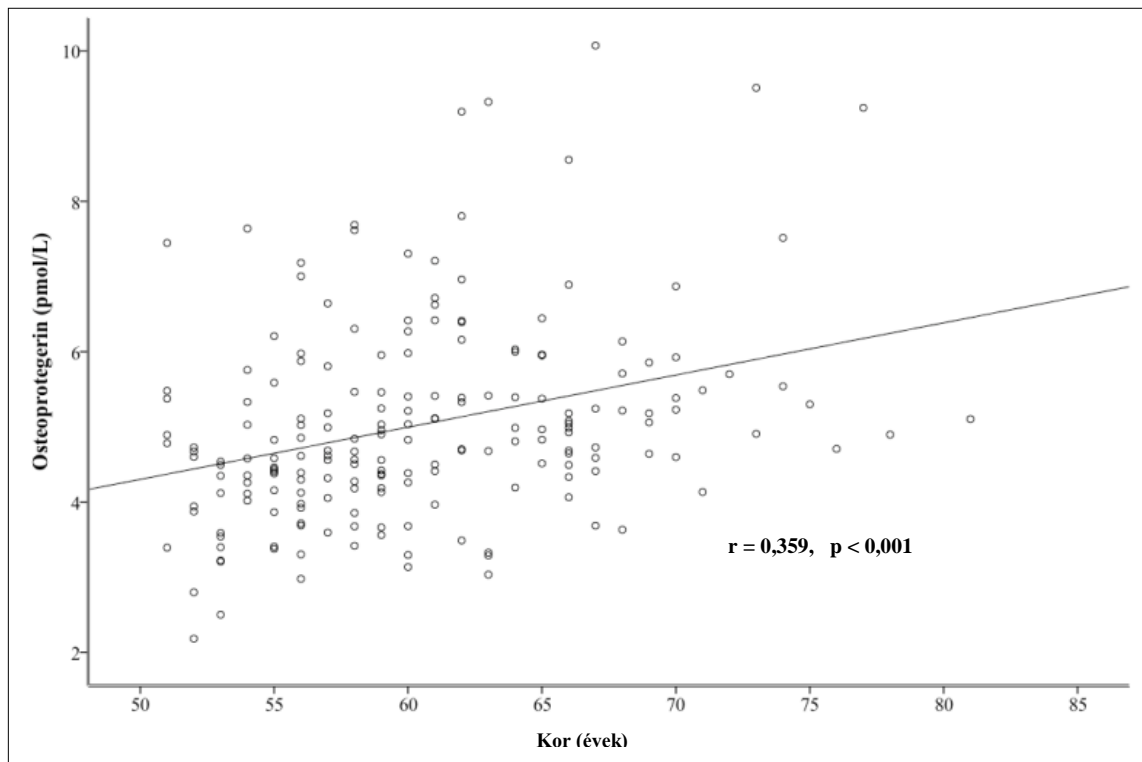
## 5.2. Osteoprotegerint befolyásoló tényezők vizsgálata

Az OPG és a vizsgált paraméterek (életkor, BMI, sRANKL, sRANKL/OPG arány, E2, T, SHGB, FEI, FTI, PTH, 25OHD, Osteocalcin, CTx, PINP, LS (L1-L4) BMD, FN BMD, cystatin C, kreatinin, MDRD-eGFR, cystatin C-eGFR, cystatin C és kreatinin-eGFR) közötti korrelációs analízisek eredményeit az 4. táblázatban foglaltuk össze. Vizsgálataink alapján a OPG szignifikánsan korrelált az életkorról, a cystatin C-vel, E2-vel, sRANKL/OPG aránnyal, valamint az FTI-vel. Továbbá, a cystatin C szignifikánsan korrelált az életkorról ( $r = 0,377$ ,  $p < 0,001$ ), kreatininnel ( $r = 0,487$ ,  $p < 0,001$ ), MDRD-eGFR-el ( $r = -0,524$ ,  $p < 0,001$ ), E2-vel ( $r = 0,222$ ,  $p = 0,003$ ), P1NP-vel ( $r = 0,151$ ,  $p = 0,040$ ) és OPG-vel ( $r = 0,298$ ,  $p < 0,001$ ). Annak ellenére, hogy az OPG nem korrelált a szérumban kreatininnel vagy az MDRD-eGFR-el, mégis szignifikáns korrelációt mutat a cystatin C-eGFR-el, valamint a cystatin C és kreatinin-eGFR-el. Továbbá, csak az idősödő férfi csoportban találtunk szignifikáns korrelációt az OPG és cystatin C ( $r = 0,322$ ,  $p = 0,002$ ), valamint az E2 között ( $r = 0,211$ ,  $p = 0,043$ ) (5. táblázat). A középkorú férfiaknál nem mutatott szignifikáns korrelációt a szérumban OPG és sRANKL koncentráció a többi vizsgált paraméter között (életkor, BMI, LS BMD, FN BMD, PTH, 25OHD, Osteocalcin, CTx, P1NP, cystatin C) (4. táblázat).

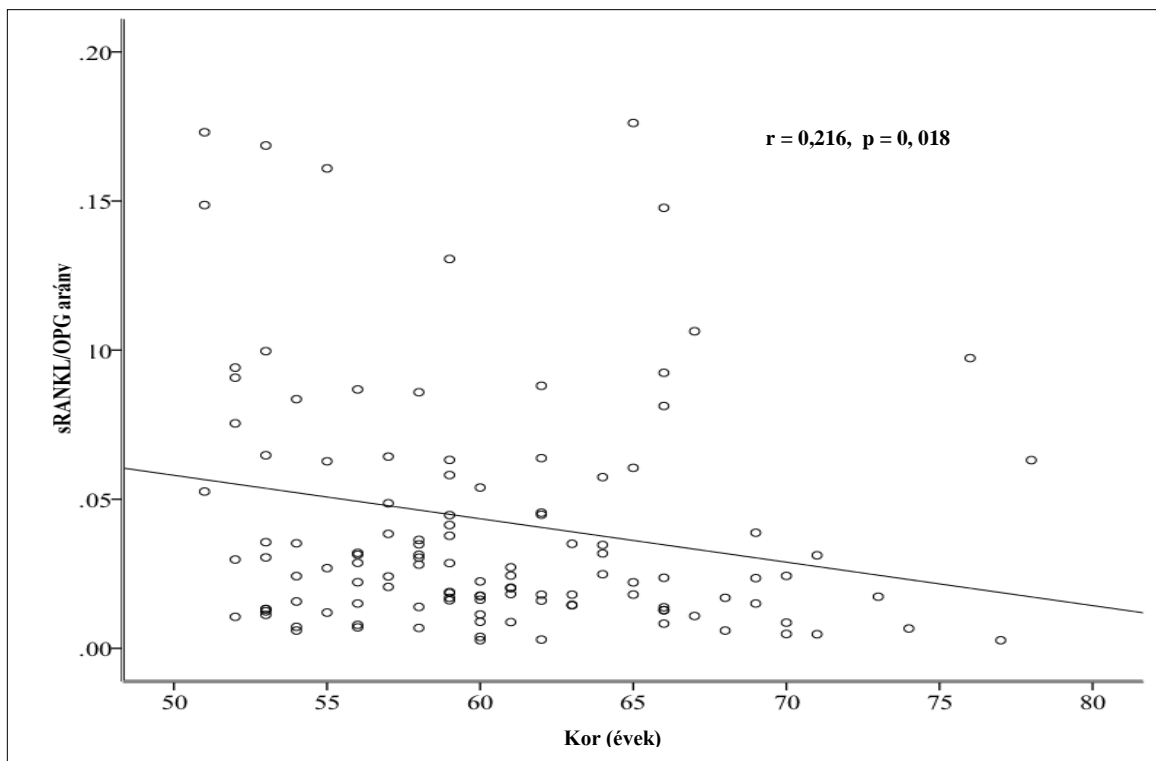
### 4. táblázat. A szérumban OPG és a vizsgált paraméterek közötti Spearman féle korrelációs analízis.

	Összes férfi (n=194)		Középkorú férfiak (életkor ≤ 59 év, n = 98)		Idősödő férfiak (életkor > 59 év, n= 96)	
	r	p	r	p	r	p
Életkor	0,359	< 0,001	0,165	0,105	0,050	0,631
BMI	0,031	0,672	0,057	0,580	- 0,036	0,725
sRANKL	- 0,034	0,713	0,019	0,885	- 0,038	0,774
sRANKL/OPG arány	- 0,234	0,010	- 0,204	0,116	- 0,199	0,131
E2	0,160	0,028	0,164	0,110	0,211	0,043
T	- 0,025	0,729	0,106	0,302	- 0,064	0,540
SHGB	0,070	0,342	0,199	0,052	0,060	0,568
FEI	- 0,072	0,323	- 0,084	0,414	0,048	0,648
FTI	- 0,230	0,001	- 0,142	0,167	- 0,169	0,106
PTH	- 0,076	0,300	- 0,172	0,093	- 0,009	0,930
25OHD	- 0,123	0,091	- 0,115	0,085	- 0,030	0,774
Osteocalcin	- 0,102	0,161	- 0,037	0,717	- 0,040	0,706
CTx	- 0,100	0,171	- 0,095	0,358	- 0,053	0,611
PINP	- 0,043	0,553	- 0,006	0,951	- 0,044	0,667
LS (L1-L4) BMD	0,026	0,716	- 0,041	0,689	0,010	0,923
FN BMD	- 0,074	0,307	- 0,071	0,485	- 0,001	0,995
Cystatin C	0,298	< 0,001	0,022	0,832	0,322	0,002
Kreatinin	0,038	0,618	- 0,085	0,415	0,132	0,239
MDRD-eGFR	- 0,071	0,351	0,083	0,428	- 0,142	0,207
Cystatin C-eGFR	- 0,343	< 0,001	- 0,031	0,766	- 0,335	0,001
Cystatin C és kreatinin-eGFR	- 0,231	0,003	0,023	0,834	- 0,262	0,020

Vizsgálataink alapján a szérumban lévő OPG koncentráció az életkor előrehaladásával emelkedést (3. ábra), valamint a sRANKL/OPG arány csökkenését mutat (4. ábra).



3. ábra. Szérumban lévő OPG koncentráció és életkor *dot-plot* diagram közepkorú és idősödő férfiaknál



4. ábra. sRANKL/OPG arányok és életkor *dot-plot* diagram közepkorú és idősödő férfiaknál

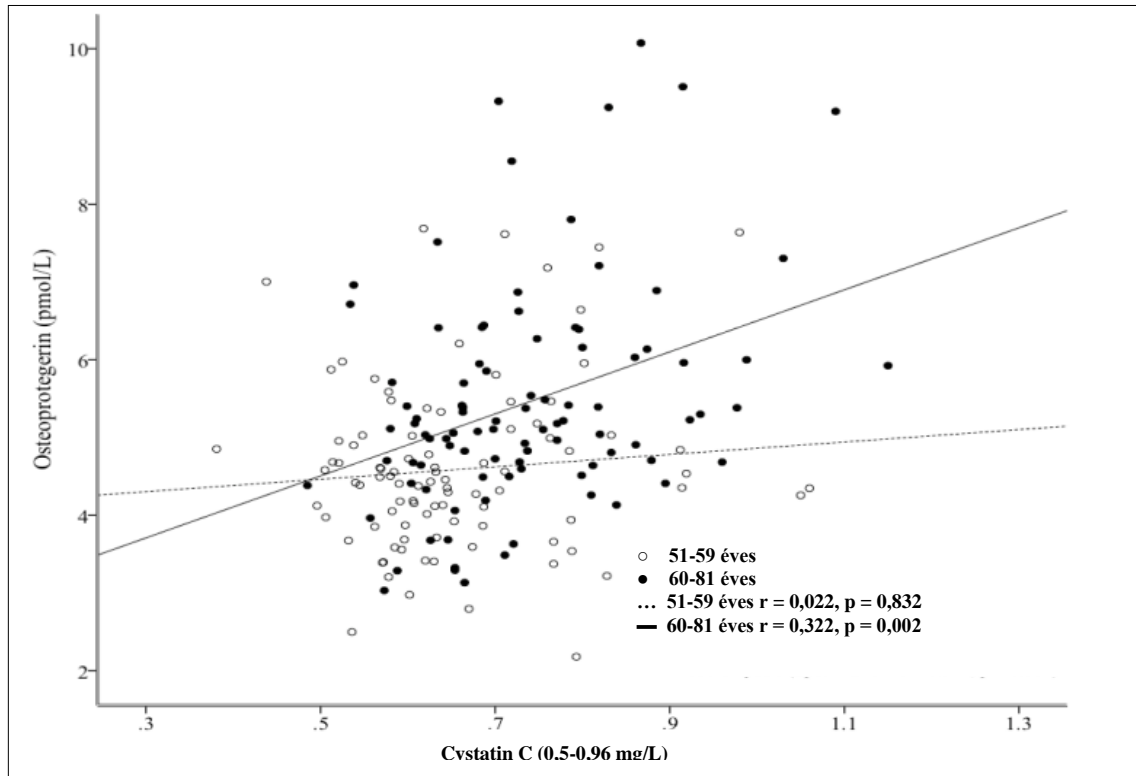
Többváltozós lineáris regressziós analízist végeztünk a szérumban lévő OPG koncentráció statisztikailag szignifikáns előrejelzőinek meghatározására. Regressziós modellbe helyezve az életkort, cystatin C-t, FTI-t és az E2-t, azt találtuk, hogy az életkor (standard regressziós együttható ( $\beta$ ) = 0,232,  $p$  = 0,002), cystatin C (standard regressziós együttható ( $\beta$ ) = 0,182,  $p$  = 0,015), FTI (standard regressziós együttható ( $\beta$ ) = -0,178,  $p$  = 0,012) és E2 (standard regressziós együttható ( $\beta$ ) = 0,166,  $p$  = 0,021) szignifikáns előrejelzői a szérumban lévő OPG koncentrációnak (5. táblázat).

**5. táblázat. Többváltozós regressziós modell a szérumban lévő OPG koncentráció előrejelzőivel**

	Osteoprotegerin	
	$\beta$	$p$
Életkor	0,232	0,002
17 $\beta$ -oestradiol	0,166	0,021
Szabad tesztoszteron index	-0,178	0,012
Cystatin C	0,182	0,015

Regressziós modellbe helyettesítve az idősödő férfiaknál talált két szignifikanciát mutató változót (cystatin C-t és E2-t), azt találtuk, hogy csak a cystatin C volt az egyetlen szignifikáns előrejelzője a szérumban lévő OPG koncentrációnak (standard regressziós együttható ( $\beta$ ) = 0,345;  $p$  = 0,002).

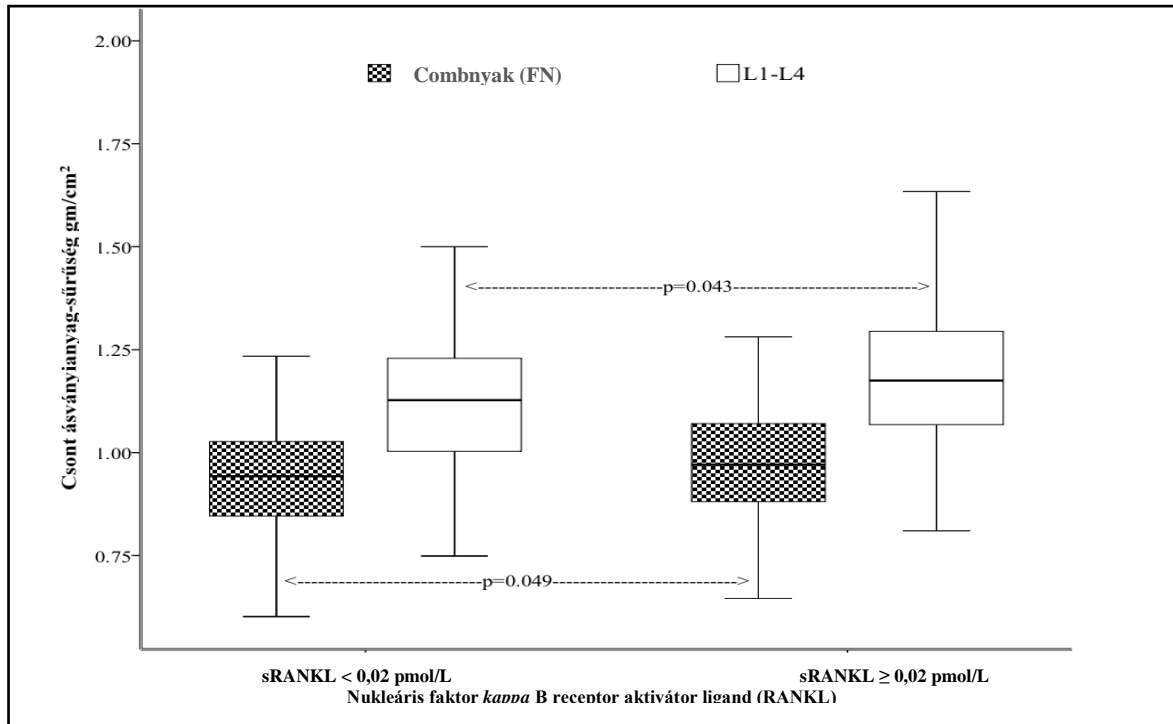
A szérumban lévő OPG és cystatin C koncentrációk kapcsolatát a középkorú és idősödő férfiaknál a 5. ábrával szemléltetjük. Vizsgálataink alapján a cystatin C és az OPG közötti összefüggés szorosabb a kor előrehaladtával.



**5. ábra. Szérumban lévő OPG és cystatin C *dot-plot* diagram középkorú és idősödő férfiaknál**

Összehasonlítva azokat az egyéneket, akiknél alacsonyabb szérumban lévő 25OHD koncentrációt találtunk ( $25\text{OHD} < 75 \text{ nmol/L}$ ), azokkal az egyénekkal, akiknél a 25OHD koncentráció az egészségileg kívánatos tartományban van ( $25\text{OHD} \geq 75 \text{ nmol/L}$ ) nem mutatott összefüggést a szérumban lévő OPG és sRANKL koncentrációk, valamint a sRANKL/OPG arányok tekintetében.

A sRANKL < 0,02 pmol/L, (n = 74), valamint a sRANKL ≥ 0,02 pmol/L, (n = 120) tekintetében való csoportok összehasonlításakor nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget a vizsgált paraméterek között, kivéve az LS BMD [1,190 gm/cm<sup>2</sup> (0,810 gm/cm<sup>2</sup>-1,892 gm/cm<sup>2</sup>) vs 1,143 gm/cm<sup>2</sup> (0,749 gm/cm<sup>2</sup>-1,855 gm/cm<sup>2</sup>), p = 0,043], és az FN BMD [0,984 gm/cm<sup>2</sup> (0,646 gm/cm<sup>2</sup>-1,281 gm/cm<sup>2</sup>) vs 0,949 gm/cm<sup>2</sup> (0,602 gm/cm<sup>2</sup>-1,331 gm/cm<sup>2</sup>); p = 0,049] (6. ábra).



6. ábra. A combnyak (FN) és L1-L4 lumbalis gerinc (LS) BMD eredményeinek *box and whiskers* plot elemzése azoknál az egyéneknél, akiknél a sRANKL < 0,02 pmol/L (n = 74) és azoknál, akiknél a sRANKL ≥ 0,02 pmol/L (n = 120).

### 5.3. DEQAS és HunMen minták vizsgálata

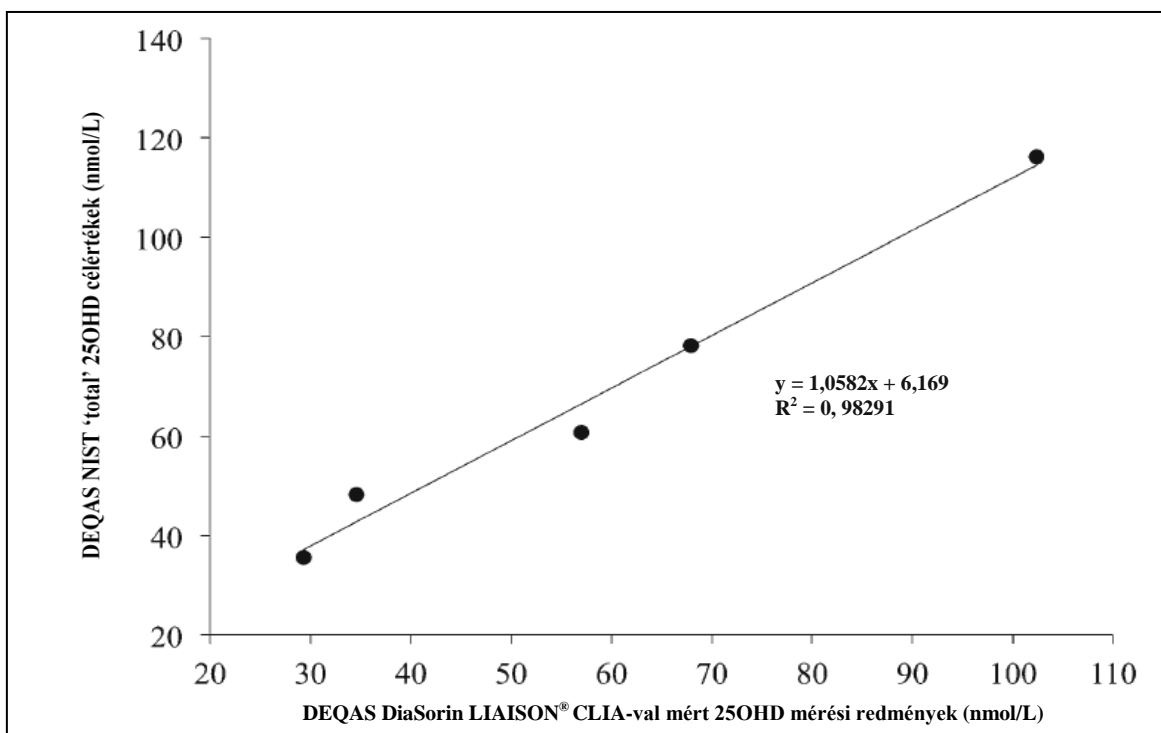
Az EQA céljából érkezett öt DEQAS minta (sorszám: 481-485) 25OHD koncentrációk meghatározására kerültek a laboratóriumban alkalmazott DiaSorin LIAISON<sup>®</sup> 25OHD total CLIA módszerrel. A DiaSorin LIAISON<sup>®</sup> 25OHD total CLIA módszerrel mért öt DEQAS minta 25OHD koncentrációkat, a DEQAS NIST 'total' 25OHD célértékeket, és a DEQAS-ban résztvevő laboratóriumok (n = 247) által DiaSorin LIAISON<sup>®</sup> 25OHD total CLIA-val mért DEQAS minták 25OHD átlagértékeit a 6. táblázat tartalmazza.

#### 6. táblázat. A HunMen tanulmány 25OHD mérési eredményeinek standardizálására alkalmazott DEQAS adatok

DEQAS minták sorszáma (2015. október)	Saját 25OHD mérési eredmények (DiaSorin LIAISON <sup>®</sup> 25OHD total) (nmol/L)	NIST 'total' 25OHD célértékek (nmol/L)	25OHD átlagértékek (DiaSorin LIAISON <sup>®</sup> 25OHD total) (nmol/L) (n = 247)
481	57,0	60,8	63,0
482	29,3	35,6	32,7
483	102,4	116,2	110,9
484	67,9	78,2	72,5
485	34,6	48,2	38,3

#### 5.4. A 25-hidroxi-D-vitamin mérési adatok standardizációja

A 2015. októberi körben érkezett öt DEQAS minta (sorszám: 481-485) DiaSorin LIAISON<sup>®</sup> 25OHD total CLIA - val mért 25OHD koncentrációk és a DEQAS NIST 'total' 25OHD célértékek közötti lineáris regressziós kapcsolatot a 7. ábrán mutatjuk be.

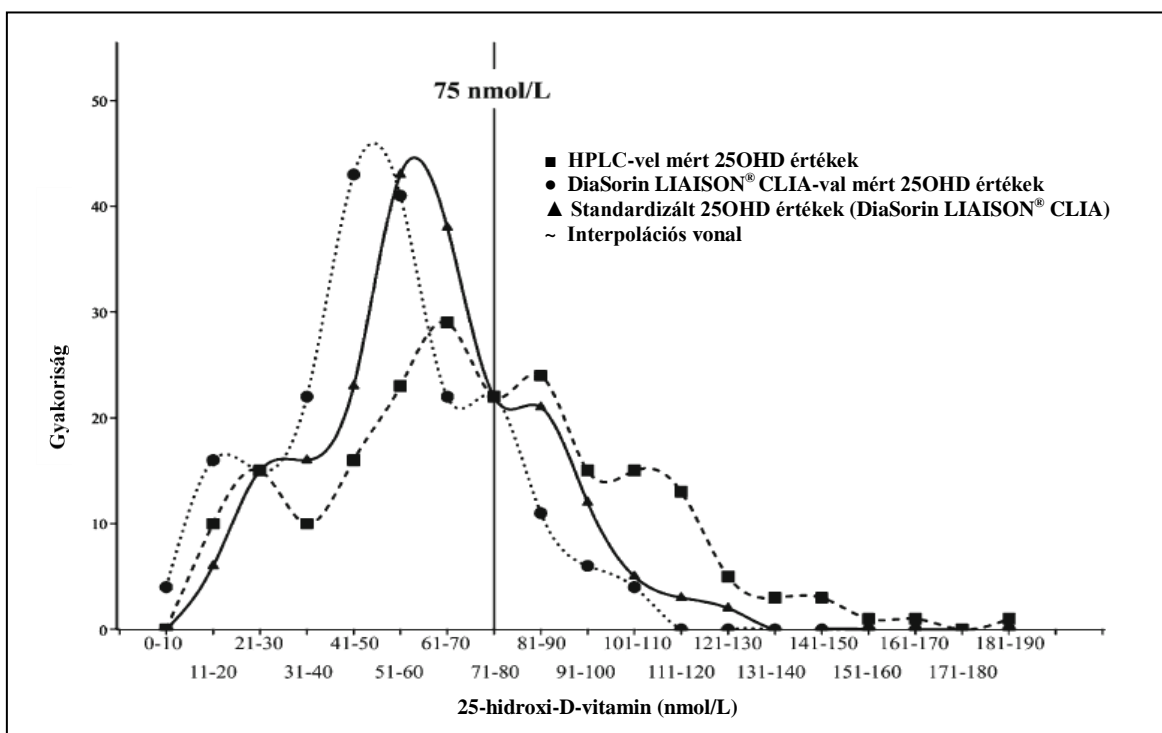


**7. ábra. A DEQAS NIST 'total' 25OHD célértékek (nmol/L) és a DEQAS DiaSorin LIAISON<sup>®</sup> CLIA-val mért 25OHD értékek (nmol/L) lineáris regressziós kapcsolata**

Ezt követően a HunMen tanulmány 25OHD értékeit korigáltuk, a korrekcióhoz az öt DEQAS minta (sorszám: 481-485) NIST célértékeket és a DEQAS minták DiaSorin LIAISON<sup>®</sup> 25OHD total CLIA - val mért 25OHD koncentrációk kapcsolatából származó lineáris regressziós egyenletet alkalmaztuk ( $y = 1,0582x + 6,169$ ).

A HunMen tanulmányban meghatározott 25OHD mérési eredményeket a különböző módszerek alkalmazásával a 8. ábrán mutatjuk be.

A HunMen tanulmányban az eredetileg HPLC-vel mért 25OHD átlagértékek a DiaSorin LIAISON® 25OHD total CLIA - val való újramérés során jelentősen megváltoztak, 73 nmol/L-ről 53 nmol/L-re, ami a DEQAS NIST 'total' 25OHD célértékkel való standardizációt követően 62 nmol/L-re változott (8. ábra).



**8. ábra. A HunMen tanulmányban meghatározott 25OHD koncentrációk a különböző módszerek alkalmazásával**

A DEQAS adatokkal képzett standardizációs mesterképlettel korrigáltuk a D-vitamin elégtelenségben szenvedők arányát a HunMen kohorszban, így az eredetileg közölt, HPLC-vel mért D-vitamin elégtelenség (25OHD <75 nmol/L) előfordulási gyakorisága a standardizációt követően jelentősen megemelkedett 53%-ról 72%-ra (8. ábra, 7. táblázat).

**7. táblázat. A HunMen kohorsz mintákra alkalmazott DEQAS NIST 25OHD korrekciós hatás**

	<b>Összes évszak (n=206)</b>	<b>Tavaszi (n=59)</b>	<b>Nyári (n=96)</b>	<b>Ősz (n=21)</b>	<b>Tél (n=30)</b>
HPLC-vel mért 25OHD, nmol/L (átlag,tartomány)	73 (11-185)	67 (11-164)	83 (17-185)*	63 (16-144)	58 (12-113)
DiaSorin LIAISON® CLIA-val mért 25OHD, nmol/L (átlag, tartomány)	53 (8-110)	43 (8-110)	62 (16-104)*	53 (11-109)	40 (8-75)
DEQAS NIST standardizált 25OHD, nmol/L (átlag, tartomány)	62 (15-123)	52 (15-123)	72 (23-116)*	62 (18-122)	48 (15-86)
HPLC-vel mért 25OHD <75 nmol/L (%)	53% (n = 109)	64% (n = 38)	40% (n = 38)	62% (n = 13)	66% (n = 20)
DiaSorin LIAISON® CLIA-val mért 25OHD <75 nmol/L (%)	84% (n = 173)	95% (n = 56)	73% (n = 70)	86% (n = 18)	97% (n = 29)
DEQAS NIST standardizált 25OHD <75 nmol/L (%)	72% (n = 148)	86% (n = 51)	57% (n = 55)	71% (n = 15)	90% (n = 27)

**\*p < 0,01 nyári és más évszakok között**

A HunMen kohorszban az évszakokra vonatkozó adatok elemzésénél is statisztikailag szignifikáns különbséget találtunk ( $p < 0,01$ ) a nyári és más évszakok között, mind a DiaSorin LIAISON® CLIA-val mért, mind a standardizált 25OHD értékekre vonatkozóan, a korábban közölt HPLC-vel mért eredményekkel való összehasonlításakor (7. táblázat). Továbbá, a standardizációt követően a HunMen 25OHD adatok jobban hasonlítottak a környező országokbeli D-vitamin ellátottsági adatokkal [88].

## 6. MEGBESZÉLÉS

### 6.1. Osteoprotegerint befolyásoló tényezők a HunMen tanulmányban és saját mérési eredményeink összehasonlítása irodalmi adatokkal

Összehasonlítottuk a jelen értekezésben vizsgált paraméterek és az irodalomban fellelhető mérési adatok statisztikai eredményeit, amelyeket a 8. táblázatban foglaltuk össze.

### 8. táblázat. Irodalmi adatok korrelációs együtthatókkal a szérums OPG koncentrációk és a vizsgált paraméterek közötti összefüggésben férfiaknál

Szerzők	Életkor	BMD	T	E2	FEI	FTI	PTH	25OHD	Kreatinin	Csont-markerek
Szulec és mtsai [7]	r=0,41 p=0,0001	n.s.	n.s.	n.s.	<sup>a</sup> r=0,18 p<0,02	<sup>a</sup> r=0,31 p=0,0001	r=-0,23 p<0,01	n.s.	n.s.	<sup>b</sup> r=-0,20 p<0,01
Khosla és mtsai [8]	r=0,39 p<0,001	<sup>c</sup> r=0,17 p<0,05	r=-0,16 p<0,05	n.s.	<sup>d</sup> n.s.	<sup>e</sup> r=-0,27 p<0,001	-	-	-	<sup>f</sup> r=0,16 p<0,05
Khosla és mtsai [9]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<sup>g</sup> r=0,26 p<0,001
Kudlacek és mtsai [10]	<sup>i</sup> p<0,05	n.s.	r=0,1 p<0,05	-	-	-	r=-0,17 p<0,0001	n.s.	-	<sup>h</sup> n.s.
Trofimov és mtsai [12]	r=0,42 p<0,001	n.s.	n.s.	n.s.	-	-	-	-	-	-
Oh és mtsai [13]	n.s.	<sup>j</sup> r=0,25 p=0,020	n.s.	r=-0,319 p=0,004	-	-	-	-	-	-
Indridason és mtsai [14]	<sup>k</sup> p<0,05	<sup>l</sup> r=-0,13 p<0,05 <sup>m</sup> r=-0,11 p<0,05	-	-	<sup>n</sup> r=0,15 p<0,05	<sup>o</sup> r=0,09 p<0,001	n.s.	n.s.	<sup>p</sup> -	<sup>q</sup> r=-0,09 p<0,05
Mazziotti és mtsai [15]	r=0,37 p=0,002	-	-	-	-	-	-	-	<sup>r</sup> r=0,46 p<0,05	<sup>s</sup> r=0,47 p<0,05
Stern és mtsai [16]	r=0,552 p<0,001	<sup>t</sup> p<0,05	-	-	-	-	-	-	-	-
Samelson és mtsai [17]	<sup>u</sup> p<0,05	<sup>v</sup> n.s.	-	-	-	-	-	-	<sup>w</sup> p<0,05	-
Jorgensen és mtsai [18]	r=0,52 p<0,001	<sup>x</sup> p=0,001	-	-	-	-	-	-	-	-
Szulec és mtsai [19]	-	<sup>y</sup> r=-0,28 p<0,001	-	-	-	-	-	-	-	<sup>z</sup> r=-0,10 p<0,05 <sup>aa</sup> r=0,25 p<0,001 <sup>ab</sup> r=0,14 p<0,05
Jelen tanulmány	r=0,359 p<0,001	n.s.	n.s.	r=0,160 p=0,028	n.s.	r=-0,230 p=0,001	n.s.	n.s.	<sup>ac</sup> n.s.	n.s.

**Magyarázat:** n.s.: statisztikailag nem szignifikáns, (a): életkor és testtömeg illesztett > 40 éves életkor, (b): életkor illesztett vizelet total deoxyypyridinolin (DPD) > 40 éves életkor, (c): közép-radius  $\geq$  50 éves életkor, (d): fiziológias E2  $\geq$  50 éves életkor, r = -0,18 (p<0,05) (e): fiziológias T  $\geq$  50 éves életkor, r = -0,27 (p<0,001) (f): vizelet I típusú kollagén N-terminális telopeptid (NTx), (g): vizelet szabad DPD, (h): vizelet NTx és DPD, (i): statisztikailag szignifikáns pozitív korreláció, de az „r” érték nincs megemlítve, (j): lumbalis gerinc (LS), (k): osteocalcin (OC), (l): össz.testtömeg, (m): csipő, (n,o): számított szabad szexhormon koncentráció, (p): statisztikailag nem szignifikáns cystatin C, (q): szérums I típusú kollagén C-terminális telopeptid (CTx), (r): 65 és 84 év közötti férfiak és nők csoportja, (s): szérums CTx a 65 és 84 év közötti férfiak és nők csoportjában (n=52), (t): LS (statisztikailag szignifikáns pozitív korreláció, de az „r” érték nincs megemlítve), (u): idősebb életkor (Trend, p<0,05), az emelkedő OPG koncentrációval (v): életkor-illesztett FN BMD, ami nem mutat különbséget az OPG quartilisek között, (w): csökkent glomeruláris filtrációs ráta (GFR), (Trend, p<0,05), az emelkedő OPG quartilisekkel (x): életkor-illesztett csökkent distalis alkar BMD (Trend, p=0,001) emelkedő OPG koncentrációkkal, (y): teljes (distalis radius és tibia) BMD medián feletti OPG koncentrációkkal, (z): OC és I. típusú kollagén N-terminális propeptid (PINP) medián alatti OPG koncentrációkkal, (aa): vizelet DPD és (ab): szérums CTx medián feletti OPG koncentrációkkal, (ac): statisztikailag nem szignifikáns a kreatininnal és a GFR-el, de a cystatin C-vel r = 0,298 (p<0,001).

Eredményeink azt mutatják, hogy a vizsgált férfi kohorszban, az életkor előrehaladásával emelkedik a szérum OPG koncentráció és a sRANKL/OPG arány csökken.

Az OPG és életkor közötti összefüggés tekintetében eredményeink összhangban vannak a más szerzők által közzétett adatokkal [7-10,12,14-19]. A **8. táblázatban** felsoroltak alapján, különböző befolyásoló tényezők vizsgálata során az OPG pozitív korrelációja az életkorról talán az egyetlen megállapítás, illetve konszenzus napjainkig a különböző tanulmányok között, egyetlen kivétellel, amit Oh és munkatársai találtak [13], ahol nincs korreláció az OPG és az életkor között. Ennek az lehet az oka, hogy korlátozott számú esetet (n = 80) és viszonylag alacsonyabb életkorúakat vizsgáltak.

Ami az OPG és BMD, valamint OPG és a csont ásványi-anyagcsere biokémiai markereivel való összefüggését illeti, a jelenleg közzétett tanulmányok eredményei szerint statisztikailag szignifikáns pozitív, negatív és nem szignifikáns eredményeket mutattak be (**8. táblázat**). A nem szignifikánsnak talált eredményeink is további tanulmányok elvégzését szorgalmazzák. Ismerve, hogy az OPG mRNS különböző szövetekben expresszálódik, beleértve a tüdőt, vesét és szívet, így többféle szövet járul hozzá a keringő OPG-hez, aminek következtében az OPG meghatározása a csont mikro környezetében a legkívánatosabb [89].

Az E2 és OPG közötti statisztikailag szignifikáns pozitív korrelációra vonatkozó megállapításunk hasonló Szulc és munkatársaival, valamint Indridason és munkatársaival, ami megerősíti azt a megállapítást, hogy az E2 növeli az OPG mRNS és fehérje termelést a humán oestrogén-érzékeny osteoblastikus sejtvonalban [4]. Továbbá, Khosla és munkatársai bebizonyították, hogy az oestrogén kezelés növeli a szérum OPG koncentrációkat időskorú férfiakban [9].

A testosteron és az OPG közötti negatív korrelációra vonatkozó megállapításunk támogatja két korábbi tanulmány megállapítását és nem ért egyet két másik korábbi tanulmánnyal [5,7,8,14], azonban a testosteron és az OPG közötti negatív korrelációt támogatja az a megállapítás, amit Khosla és munkatársai igazoltak, hogy in vivo körülmények között a testosteron terápiában részesült csoportban alacsonyabb az OPG koncentráció [9].

Az a megállapításunk, hogy a sRANKL nem korrelál az életkorról hasonló a korábbi tanulmányokkal [11-13,15,16,18].

Kétváltozós analízist alkalmazva, nem találtunk összefüggést a sRANKL és BMD között. Ez a megállapítás összhangban van a Trofimov és munkatársai, valamint Oh és

munkatársai megállapításaival, de nem ért egyet a Stern és munkatársai megállapításaival, akik arról számoltak be, hogy inverz összefüggés van sRANKL és BMD között [12,13,16]. Ennek ellenére statisztikailag magasabb FN és LS BMD-t tapasztaltunk azoknál az egyéneknél, akiknél a sRANKL kimutatható volt ( $sRANKL \geq 0,02$  pmol/L). Bár a statisztikai szignifikancia határát csak súrolja a jelenség, ez a megállapítás talán részben magyarázatot adhat az alacsonyabb kockázatú, nem traumás törésekre azoknál az egyéneknél, akik a magasabb szérumsRANKL koncentrációjú csoportban voltak a Schett és munkatársai által leírt tanulmányban [11]. Meg kell jegyeznünk, hogy Schett és munkatársai megállapították, hogy nincs összefüggés a sRANKL és a csont ultrahangos adatok között, valamint nem végeztek BMD méréseket a vizsgált populációban [11]. Jorgensen és munkatársai megállapításai szerint nincs statisztikailag szignifikáns különbség a BMD-ben, azoknál az egyéneknél, akiknél a sRANKL  $< 0,02$  pmol/L és azoknál, akiknél a sRANKL  $\geq 0,02$  pmol/L [18]. Annak ellenére, hogy a jelenleg használatos immunkémiai módszereknek alacsonyabb a sRANKL kimutathatósági határunk, mint az elődjeiknek, szükséges lenne a kimutathatósági határ módszertanának fejlesztése. Talán a még érzékenyebb mérési módszerek bevezetése segítene meghatározni a sRANKL  $< 0,02$  pmol/L koncentrációkat, ami valószínűleg segítene feltárni az alacsony sRANKL és az ismert előrejelzők közötti összefüggéseket. Eddig egyetlen tanulmány volt, amely a sRANKL/OPG arány kapcsolatát elemezte az életkorral és nem talált szignifikanciát ebben a tekintetben, ellentétben a mi tanulmányunkkal, ahol negatív korrelációt találtunk a sRANKL/OPG arány és életkor között. Ezen megállapításunk minden bizonnyal más szerzők általi validálásra vár.

Annak ellenére, hogy irodalmi adatok szerint a PTH-nak szuppresszív hatása van az OPG termelésre, jelen tanulmányban nem találtunk korrelációt a PTH és OPG között [90,91]. A mi eredményeink összhangban vannak Indridason és munkatársai által talált eredményekkel, ellentétben Szulc és munkatársai, továbbá Kudlacek és munkatársai által kapott eredményekkel [7,10,14].

Ellentétben azzal az irodalmi megállapítással, hogy az  $1,25(OH)_2D$ -vitamin stimulálja az OPG termelést, az *in vivo* tanulmányokban egészséges férfiaknál, beleértve a mi tanulmányunkat is, nem találtak korrelációt a  $25(OH)D$ , mint a szervezet D-vitamin ellátottságának jelzője és az OPG között [7,10,14,92,93].

Összefoglalva, a különböző tanulmányok megállapításai közötti különbözőségek azzal magyarázhatóak (legalábbis részben), hogy különböző vizsgálati módszerek voltak

alkalmazva, néhány esetben több évtizedes fagyasztott minták kerültek feldolgozásra, különböző felvételi kritériumokat használtak a kohorszok kiválasztásánál, valamint a vizsgált mintaszám és talán a vizsgált egyének korösszetétele is különbözött.

A csökkent fehérje clearance szerepe, mint lehetséges oka a korfüggő OPG emelkedésnek néhány korábbi tanulmányban említésre került [15,17,19]. Mazziotti és munkatársai szignifikánsan pozitív korrelációt találtak a kreatinin és OPG között, de Samelson és munkatársai emelkedő OPG-t és szignifikánsan csökkenő GFR-t találtak [15,17]. Ez a megállapítás ellentétben van a Szulc és munkatársai eredményeivel, ahol nem találtak korrelációt az OPG és kreatinin között [19]. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy nincs korreláció az OPG és az eGFR között az MDRD egyenlet használatakor, viszont szignifikánsan negatív korrelációt találtunk a CKD-EPI cystatin C és CKD kreatinin – cystatin C egyenlet alkalmazásával. Ez a megállapítás illusztrálhatja az eGFR számításához használt egyenlet típusának fontosságát. Továbbá, a kombinált kreatinin-cystatin C egyenlet használata jobbnak bizonyul, mint önmagában ezen markerek egyikén alapuló egyenlet alkalmazása [84,85]. Erős pozitív korrelációt találtunk az OPG és cystatin C között, ellentétben Indridason és munkatársaival [14]. Bár az általunk alkalmazott vizsgálati módszer nem volt azonos az Indridason és munkatársai által használt módszerrel, ez a különbség önmagában nem magyarázza a két tanulmány megfigyelései közötti különbséget. Ugyanakkor kimutatták, hogy a szérumban OPG koncentráció pozitív korrelációt mutat a krónikus veseelégtelenségben szenvedő férfi betegeknél [94].

Annak ellenére, hogy a vizsgálat résztvevői egy jól meghatározott kohorsz tagjai voltak, mégis vannak korlátai a tanulmányunknak. A HunMen tanulmányt elsősorban nem ennek a tanulmánynak a céljára tervezték és a 206 résztvevő mintáiból csak 194 vizsgálati minta állt rendelkezésre a szérumban OPG és sRANKL koncentrációk meghatározására [82]. Nem tudtuk vizsgálni a biológiailag hatékony szabad nemi hormonok OPG-re való hatását, helyette statisztikai elemzéssel számoltuk ki a szabad nemi hormon indexeket.

Bár a cystatin C (mint vesefunkciós marker, vagy mint az osteoclastogenesis inhibitora) hatásmechanizmusa a szérumban OPG koncentrációval nem tisztázódott teljes mértékben jelen tanulmány eredményeképpen, mégis azt találtuk, hogy egy jelentős összefüggést mutat a szérumban OPG koncentrációval. Ezek a statisztikai elemzések szerinti megállapítások megerősítéseket és további alap és klinikai vizsgálatokat, továbbá ok és okozati összefüggések feltárását igénylik [95].

A tanulmányunk eredményei azt mutatták, hogy a vizsgált középkorú és idősödő férfiakból álló kohorszban, az életkoron túl (ami a legerősebb előrejelző faktor) a cystatin C, szabad testosteron index és az oestradiol szintén az OPG jelentős előrejelzői. Továbbá, a cystatin C és az OPG közötti összefüggés egyértelműbb a kor előrehaladtával.

Összefoglalva, a cystatin C az OPG jelentős előrejelzője függetlenül az életkortól, szabad testosteron indextől és az oestradioltól [95].

## **6.2. A 25-hidroxi-D-vitamin mérési adatok standardizációja**

A 25-hidroxi-D-vitamin laboratóriumi standardizációja még mindig kihívást jelent. A D-vitamin Standardizációs Program (VDSP) elsődleges fókusza a 25OHD meghatározások standardizációjára két alapvető protokollon alapszik: az egyik a jelenlegi és a jövőben alkalmazandó 25OHD meghatározásokon, a másik a korábbi felmérésekből vagy tanulmányokból származó 25OHD értékek standardizációja [96,97].

Cashman és munkatársai a szérum 25OHD értékek standardizációjára 2008–2010-ben az „Irish National Adult Nutrition Survey” felmérésben a VDSP protokollja alapján a régi mintákból ismételten meghatározták a 25OHD koncentrációkat LC-MS/MS-el [98].

Sempos és munkatársai a mérések idejére vonatkozó DEQAS ALTM-től való eltéréssel korrigálták a korábbi 25OHD értékeket, és azt feltételezték, hogy ezzel a módszerrel nem valósítható meg a standardizálás [38].

Sarafin és munkatársai a „Canadian Health Measures Survey” felmérésben standardizálták a 25OHD értékeket [39]. A standardizálás két lépésben történt, először az eredetileg mért mintákat az újonnan rendelkezésre álló immunkémiai módszerrel újramérték, második lépésben, ötven ismert 25OHD koncentrációjú szérum mintát, amit a NIST és Ghent referencia laboratóriumi módszerrel mértek, ismételten újramérték a jelenleg rendelkezésre álló immunkémiai módszerrel.

Később, Cashman és munkatársai a 25OHD értékek standardizációjára a VDSP protokollt alkalmazták az északi populációra. Mindkét tanulmányban egy meghatározott szérum mintahalmazt választottak ki biobankból, amit LC-MS/MS módszerrel újra analizáltak, és a régi, illetve újonnan kapott 25OHD értékekből származó kalibrációs egyenletet alkalmazták a mindkét tanulmányban levő teljes adathalmazra [40].

A VDSP protokolljában tett standardizációs javaslatok követése nem csekély feladat, mivel a tanulmány ideje alatt Magyarországon nem volt olyan rutin diagnosztikai laboratórium,

ahol a 25OHD meghatározásokat LC-MS/MS módszerrel végeznék, így a korábban fagyasztott minták újramérése nem volt kivitelezhető.

Megközelítésünk alapján, a laboratórium által mért 25OHD eredmények korrekciójához, minden DEQAS vizsgálati körnél a NIST célértéktől való eltérések figyelembe vételével a regressziós analízis elvégzésére és alkalmazására lenne szükség. Továbbá, a DEQAS programban való részvételi díj egészen méltányos, így a mi megközelítésünkkel bátorítani tudjuk a résztvevő laboratóriumokat, hogy könnyedén korrigálni tudják az elsődlegesen kapott 25OHD értékeiket.

A tanulmányunk korlátai közé tartozhat, hogy a vizsgálatokat a 6 évig fagyasztva tárolt mintákból végeztük. Módszerünk validálásához és a számítások pontosságához további szérum minták lennének szükségesek. A tanulmányunk kapcsán megjelent szakértői kommentár költséghatékonyan vélte a megközelítésünket, de felhívta a figyelmünket, hogy egy definitív módon előválogatott 40 DEQAS minta adatait átölelő mesterképlet használata tovább pontosítaná a standardizációs törekvésünket [99].

Az általunk javasolt standardizáció következeképpen az eredetileg közölt, HPLC-vel mért HunMen kohorsz D-vitamin ellátottsági adatok revideálásra kerültek és a D-vitamin-elégtelenségben szenvedők aránya 53%-ról 72%-ra változott [100].

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az OPG/RANKL/RANK rendszer kulcsfontosságú szabályozója az osteoclastogenesisnek és jelentős közvetítő tényező az oestradiol, testosteron, parathormon, D-vitamin és a csontforgalom között. Számos irodalmi adat számol be az OPG és RANKL vizsgálatáról egészséges férfiakban, de csak részben tisztázott a kapcsolatuk a háttérben működő befolyásoló molekuláris szereplőkkel, mint például a cystatin C csontanyagcserével való kapcsolata.

Munkánk során a HunMen kohorszban meghatároztuk az OPG és sRANKL koncentrációkat, továbbá ezen markerek kapcsolatát elemeztük az életkorral, cystatin C-vel, csontanyagcsere biokémiai markerekkel, továbbá a 25-hidroxi-D-vitaminnal, parathormonnal, nemi hormonokkal (17 $\beta$ -oestradiol és testosteron), valamint a csontásványianyag-sűrűség mérési adataival. Vizsgálataink alapján az OPG szignifikánsan korrelált az életkorral, a cystatin C-vel, oestradiollal és a szabad testosteron indexszel. Összehasonlítva a középkorú (életkor:  $\leq 59$  év,  $n = 98$ ) és az idősödő férfiak (életkor  $> 59$  év,  $n = 96$ ) vizsgálati paramétereit, szignifikánsan magasabb szérumszintű OPG koncentrációt találtunk az idősödő férfi csoportban levőknél és jelentősen alacsonyabb sRANKL koncentrációkat, illetve alacsonyabb sRANKL/OPG arányt.

Összefoglalva, a vizsgált kohorszban, az életkoron túl (ami a legerősebb előrejelző faktor), a cystatin C az OPG jelentős előrejelzője függetlenül az életkortól, az FTI-től és az E2-től, valamint a cystatin C és az OPG közötti összefüggés egyértelműbb a kor előrehaladtával.

Továbbá, a DEQAS adatokkal képzett standardizációs mesterképlettel a HunMen tanulmány 25OHD értékeit korrigáltuk. A korrekcióhoz a DEQAS NIST célértékek és a DEQAS minták DiaSorin LIAISON<sup>®</sup> CLIA módszerrel mért 25OHD koncentrációk kapcsolatából származó lineáris regressziós egyenletet alkalmaztuk. A HunMen tanulmányban az eredetileg HPLC-vel mért 25OHD átlagértékek a DiaSorin LIAISON<sup>®</sup> CLIA módszerrel való újramérés során 73 nmol/L-ről 53 nmol/L-re, majd a DEQAS NIST célértékkel való standardizációt követően 62 nmol/L-re változott, továbbá az eredetileg közölt, HPLC-vel mért D-vitamin elégtelenség (25OHD  $< 75$  nmol/L) előfordulási gyakorisága a standardizációt követően jelentősen megemelkedett 53%-ról 72%-ra.

A DEQAS adatok használatával az általunk javasolt módon képzett mesterképlet alkalmazásával költséghatékonyan standardizálni lehet a rutin diagnosztikai laboratóriumokban különböző módszerekkel meghatározott 25OHD értékeket.

## 8. SUMMARY

In addition to being a key regulator of osteoclastogenesis, the OPG/RANKL/RANK system is reported as being a significant mediator between factors such as estradiol, testosterone, parathyroid hormone, vitamin D, and bone turnover. Data on OPG and RANKL levels in healthy men is accumulating. Nonetheless, based on published data, it may well be generalized that the association between OPG/RANKL and its predictors is lacking consensus. Furthermore, the association of cystatin C with OPG and RANKL has only been limitedly investigated in the healthy, where no significant correlation was found.

We determined serum OPG and sRANKL levels and examined its relationship with cystatin C, age, 25-hydroxyvitamin D, parathyroid hormone, biochemical markers of bone turnover, total testosterone, total 17 $\beta$ -estradiol and L1–L4 and femur neck BMD data available from 194 randomly selected ambulatory men belonging to the HunMen cohort. OPG correlated significantly with age, cystatin C, E2 and FTI. Compared to the middle-aged (age  $\leq$  59 years, n = 98), older men (age > 59 years, n = 96) had significantly higher serum OPG and lower sRANKL levels. The results of this study demonstrated that in addition to age (which was the stronger predictor), other modifiable factors such as cystatin C, FTI and E2 were also significant predictors of OPG, and that the association between cystatin C and OPG was more evident in the elderly age group. As such, cystatin C is a significant predictor of OPG independently of age, FTI and E2 [95].

We reanalyzed samples belonging to the HunMen cohort using the automated DiaSorin LIAISON<sup>®</sup> total 25OHD chemiluminescence immunoassay. The HunMen 25OHD values were corrected using the linear regression equation derived from the analysis of relationship between our DiaSorin LIAISON<sup>®</sup> CLIA measured total 25OHD values and the DEQAS NIST total target values for all five of the DEQAS samples. The mean total 25OHD value changed from 73 nmol/L, with the original HPLC methodology, to 53 nmol/L as measured by the DiaSorin LIAISON<sup>®</sup> CLIA platform, and following NIST total target value bias standardization to 62 nmol/L. As such, the originally reported prevalence of hypovitaminosis D (25OHD <75 nmol/L), as measured by HPLC, increased significantly from 53 to 72%, following standardization of the DiaSorin LIAISON<sup>®</sup> CLIA platform measured values. In conclusion, a simple approach readily applicable at the point of conception of the 25OHD values, at the routine diagnostic laboratory where the measurements are primarily done, could perhaps be a practical solution to the anomaly surrounding non-standardized 25OHD values [100].

## 9. AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ TUDOMÁNYOS MEGÁLLAPÍTÁSAI, GYAKORLATI JELENTŐSÉGE

- Eredményeink azt mutatják, hogy a vizsgált férfi kohorszban, az életkor előrehaladásával emelkedik a szérum OPG koncentráció és a sRANKL/OPG arány csökken.
- A vizsgált férfi kohorszban, az életkoron túl, ami a legerősebb előrejelző faktor, a cystatin C, FTI és E2 szintén az OPG jelentős befolyásoló tényezői, illetve a cystatin C és az OPG közötti összefüggés egyértelműbb a kor előrehaladtával.
- Vizsgálataink azt mutatják, hogy nincs korreláció az OPG és az eGFR között az MDRD egyenlet használatakor, viszont szignifikánsan negatív korrelációt találtunk a CKD-EPI cystatin C és CKD kreatinin – cystatin C egyenlet alkalmazásával.
- A csont ásványianyag-sűrűség mérési adatainak elemzése során statisztikailag magasabb FN és LS BMD-t tapasztaltunk azoknál az egyéneknél, akiknél a sRANKL kimutatható volt ( $sRANKL \geq 0,02$  pmol/L).
- Ellentétben azzal az irodalmi megállapítással, hogy az  $1,25(OH)_2D$ -vitamin stimulálja az OPG termelést, nem találtunk korrelációt a 25OHD, mint a szervezet D-vitamin ellátottságának jelzője és az OPG között.
- Annak ellenére, hogy irodalmi adatok szerint a PTH-nak szuppresszív hatása van az OPG termelésre, jelen tanulmányban nem találtunk korrelációt a PTH és OPG között.
- A DEQAS adatok használatával az általunk javasolt módon képzett mesterképlet alkalmazásával költséghatékonyan standardizálni lehet a rutin diagnosztikai laboratóriumokban különböző módszerekkel meghatározott 25OHD értékeket.

## 10. IRODALOMJEGYZÉK

### 10.1. Az értekezésben hivatkozott közlemények jegyzéke

1. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*. 2001;142:5050–5055.
2. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science*. 2000;289:1504–1508.
3. Vega D, Maalouf NM, Sakhaee K. Clinical review: the role of receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK)/RANK ligand/osteoprotegerin: clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92:4514–4521.
4. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology*. 1999;140(9):4367–4370.
5. Hofbauer LC, Hicok KC, Chen D, Khosla S. Regulation of osteoprotegerin production by androgens and anti-androgens in human osteoblastic lineage cells. *Eur J Endocrinol*. 2002;147(2):269–273.
6. Hofbauer LC, Heufelder AE. The role of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand and osteoprotegerin in the pathogenesis and treatment of metabolic bone diseases. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:2355–2363.
7. Szulc P, Hofbauer LC, Heufelder AE, Roth S, Delmas PD. Osteoprotegerin serum levels in men: correlation with age, estrogen, and testosterone status. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:3162–3165.
8. Khosla S, Arrighi HM, Melton LJ III, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Dunstan C, Riggs BL. Correlates of osteoprotegerin levels in women and men. *Osteoporos Int*. 2002;13:394–399.
9. Khosla S, Atkinson EJ, Dunstan CR, O'Fallon WM. Effect of estrogen versus testosterone on circulating osteoprotegerin and other cytokine levels in normal elderly men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(4):1550–1554.
10. Kudlacek S, Schneider B, Woloszczuk W, Pietschmann P, Willvonseder R. Serum levels of osteoprotegerin increase with age in a healthy adult population. *Bone*. 2003;32:681–686.
11. Schett G, Kiechl S, Redlich K, Oberhollenzer F, Weger S, Egger G, Mayr A, Jocher J, Xu Q, Pietschmann P, Teitelbaum S, Smolen J, Willeit J. Soluble RANKL and risk of nontraumatic fracture. *JAMA*. 2004;291:1108–1113.

12. Trofimov S, Pantsulaia I, Kobylansky E, Livshits G. Circulating levels of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand/osteoprotegerin/macrophage-colony stimulating factor in a presumably healthy human population. *Eur J Endocrinol.* 2004;150(3):305–311.
13. Oh KW, Rhee EJ, Lee WY, Kim SW, Baek KH, Kang MI, Yun EJ, Park CY, Ihm SH, Choi MG, Yoo HJ, Park SW. Circulating osteoprotegerin and receptor activator of NF-kappaB ligand system are associated with bone metabolism in middle-aged males. *Clin Endocrinol.* 2005;62:92–98.
14. Indridason OS, Franzson L, Sigurdsson G. Serum osteoprotegerin and its relationship with bone mineral density and markers of bone turnover. *Osteoporos Int.* 2005;16:417–423.
15. Mazziotti G, Amato G, Sorvillo F, Piscopo M, Rizzo MR, Lalli E, Iride L, Cioffi M, Molinari AM, Paolisso G, Carella C. Increased serum osteoprotegerin values in long-lived subjects: different effects of inflammation and bone metabolism. *Eur J Endocrinol.* 2006;154(3):373–377.
16. Stern A, Laughlin GA, Bergstrom J, Barrett-Connor E. The sex-specific association of serum osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappaB legend with bone mineral density in older adults: the Rancho Bernardo study. *Eur J Endocrinol.* 2007;156:555–562.
17. Samelson EJ, Broe KE, Demissie S, Beck TJ, Karasik D, Kathiresan S, Kiel DP. Increased plasma osteoprotegerin concentrations are associated with indices of bone strength of the hip. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:1789–1795.
18. Jorgensen L, Vik A, Emaus N, Brox J, Hansen JB, Mathiesen E, Vestergaard P. Bone loss in relation to serum levels of osteoprotegerin and nuclear factor-kappaB ligand: the Tromsø Study. *Osteoporos Int.* 2010;21(6):931–938.
19. Szulc P, Hawa G, Boutroy S, Vilayphiou N, Schoppet M, Chapurlat R, Hofbauer LC. Cortical bone status is associated with serum osteoprotegerin concentration in men: the STRAMBO study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(7):2216–2226.
20. Brage M, Lie A, Ransjö M, Kasprzykowski F, Kasprzykowska R, Abrahamson M, Grubb A, Lerner UH. Osteoclastogenesis is decreased by cysteine proteinase inhibitors. *Bone.* 2004;34:412–424.
21. Brage M, Abrahamson M, Lindström V, Grubb A, Lerner UH. Different cysteine proteinases involved in bone resorption and osteoclast formation. *Calcif Tissue Int.* 2005;76:439–447.

22. Muscogiuri G, Altieri B, Annweiler C, Balercia G, Pal HB, Boucher BJ, Cannell JJ, Foresta C, Grübler MR, Kotsa K, Mascitelli L, März W, Orio F, Pilz S, Tirabassi G, Colao A. Vitamin D and chronic diseases: the current state of the art. *Arch Toxicol.* 2017;91(1):97–107.
23. Dawson-Hughes B, Harris SS, Krall EA, Dallal GE. Effect of calcium and vitamin D supplementation on bone density in men and women 65 years of age or older. *N Engl J Med.* 1997;337:670–676.
24. Chapuy MC, Pamphile R, Paris E, Kempf C, Schlichting M, Arnaud S, Garnero P, Meunier PJ. Combined calcium and vitamin D3 supplementation in elderly women: confirmation of reversal of secondary hyperparathyroidism and hip fracture risk: the Decalys II study. *Osteoporos Int.* 2002;13:257–264.
25. Trivedi DP, Doll R, Khaw KT. Effect of four monthly oral vitamin D3 (cholecalciferol) supplementation on fractures and mortality in men and women living in the community: randomised double blind controlled trial. *BMJ.* 2003;326:469.
26. Sanders KM, Stuart AL, Williamson EJ, Simpson JA, Kotowicz MA, Young D, Nicholson GC. Annual high-dose oral vitamin D and falls and fractures in older women: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2010;303:1815–1822.
27. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, Murad MH, Weaver CM, Endocrine Society. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96:1911–1930.
28. Vieth R. What is the optimal vitamin D status for health? *Prog Biophys Mol Biol.* 2006;92:26–32.
29. Dawson-Hughes B, Mithal A, Bonjour JP, Boonen S, Burckhardt P, Fuleihan GE, Josse RG, Lips P, Morales-Torres J, Yoshimura N. IOF position statement: vitamin D recommendations for older adults. *Osteoporos Int.* 2010;21(7):1151–1154.
30. Judge J, Birge S, Gloth F 3rd, Heaney RP, Hollis BW, Kenny A, Kiel DP, Saliba D, Schneider DL, Vieth R. Recommendations abstracted from the American Geriatrics Society consensus statement on vitamin D for prevention of falls and their consequences. *J Am Geriatr Soc.* 2014;62(1):147–152.
31. McDonnell SL, Baggerly C, French CB, Baggerly LL, Garland CF, Gorham ED, Lappe JM, Heaney RP. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations  $\geq 40$  ng/ml are associated with  $> 65\%$  lower cancer risk: pooled analysis of randomized trial and prospective cohort study. *PLoS One.* 2016;11:e0152441.

32. Spedding S, Vanlint S, Morris H, Scragg R. Does vitamin D sufficiency equate to a single serum 25-hydroxyvitamin D level or are different levels required for non-skeletal diseases? *Nutrients*. 2013;5:5127–5139.
33. Grant WB. 25-hydroxyvitamin D and breast cancer, colorectal cancer, and colorectal adenomas: case-control versus nested case-control studies. *Anticancer Res*. 2015;35:1153–1160.
34. Garland CF, Kim JJ, Mohr SB, Gorham ED, Grant WB, Giovannucci EL, Baggerly L, Hofflich H, Ramsdell J, Zeng K, Heaney RP. Meta-analysis of all-cause mortality according to serum 25-hydroxyvitamin D. *Am J Pub Health*. 2014;104:e43–e50.
35. Ross AC, Taylor CL, Yaktine AL, Del Valle HB. *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D*. Institute of Medicine, Washington DC, The National Academies Press, 2011.
36. Vogeser M, Kyriatsoulis A, Huber E, Kobold U. Candidate Reference Method for the Quantification of Circulating 25-Hydroxyvitamin D3 by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry*. 2004;50:8:1415–1417.
37. Binkley N, Sempos CT, Vitamin D Standardization Program (VDSP). Standardizing vitamin D assays: the way forward. *J Bone Miner Res*. 2014;29:1709–1714.
38. Sempos CT, Durazo-Arvizu RA, Binkley N, Jones J, Merkel JM, Carter GD. Developing vitamin D dietary guidelines and the lack of 25-hydroxyvitamin D assay standardization: the everpresent past. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2015;S0960–0760(15):30059–30055.
39. Sarafin K, Durazo-Arvizu R, Tian L, Phinney KW, Tai S, Camara JE, Merkel J, Green E, Sempos CT, Brooks SP. Standardizing 25-hydroxyvitamin D values from the Canadian Health Measures Survey. *Am J Clin Nutr*. 2015;102:1044–1050.
40. Cashman KD, Dowling KG, Škrabáková Z, Kiely M, Lamberg-Allardt C, Durazo-Arvizu RA, Sempos CT, Koskinen S, Lundqvist A, Sundvall J, Linneberg A, Thuesen B, Husemoen LL, Meyer HE, Holvik K, Grønberg IM, Tetens I, Andersen R. Standardizing serum 25-hydroxyvitamin D data from four Nordic population samples using the vitamin D standardization program protocols: shedding new light on vitamin D status in Nordic individuals. *Scand J Clin Lab Invest*. 2015;75:549–561.
41. Cashman KD, Kiely M, Kinsella M, Durazo-Arvizu RA, Tian L, Zhang Y, Lucey A, Flynn A, GibneyMJ, VesperHW, PhinneyKW, Coates PM, Picciano MF, Sempos CT. Evaluation of vitamin D standardization program protocols for standardizing serum

- 25-hydroxyvitamin D data: a case study of the program's potential for national nutrition and health surveys. *Am J Clin Nutr.* 2013;97:1235–1242.
42. [www.deqas.org](http://www.deqas.org). Accessed on 22 January 2019.
  43. Lakatos P. Adhezióv folyamatok a csontmátrixban: az integrinek szerepe. *In A kalciumháztartás és a csontszóvet anyagcsere-betegségei.* Medicina, Budapest, 1999, p 40–46.
  44. Kadlecsek Sz, Lakatos P. A csontanyagcsere sejtszintú szabályozása. *Ca és Csont.* 2001;4(2):54–60.
  45. Ji C, Casinghino S, Chang DJ, Chen Y, Javed A, Ito Y, Hiebert SW, Lian JB, Stein GS, McCarthy TL, Centrella M. CBFA (AML/PEBP2) related elements in the TGF-beta type I receptor promoter and expression with osteoblast differentiation. *J Cell Biochem.* 1998;69:353–363.
  46. Sasaki-Iwaoka H, Maruyama K, Endoh H, Komori T, Kato S, Kawashima A. Trans-acting enhancer modulates estrogen-mediated transcription of reporter genes in osteoblasts. *J Bone Miner Res.* 1999;14(2):248–255.
  47. Gao YH, Shinki T, Yuasa T, Kataoka-Enomoto H, Komori T, Suda T, Yamaguchi A. Potential role of cbfa1, an essential transcriptional factor for osteoblast differentiation, in osteoclastogenesis: regulation of mRNA expression of osteoclast differentiation factor (ODF). *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;252(3):697–702.
  48. Aarden EM, Burger EH, Nijweide PJ. Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem.* 1994;55(3):287–299.
  49. Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, Saito S, Inoue K, Kamatani N, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest.* 1999;103(9):1345–1352.
  50. Brodsky B, Persikov AV. Molecular structure of the collagen triple helix. *Adv Protein Chem.* 2005;70:301–339.
  51. Elma KS, Amina V, Almira HD. The utility of procollagen type 1 N-terminal propeptide for the bone status assessment in postmenopausal women. *Bosn J Basic Med Sci.* 2013;13(4):259–265.
  52. Margaret T. Bone Architecture: Collagen Structure and Calcium/Phosphorus Maps. *J Biol Phys.* 2008;34(1-2):39–49.

53. Martin TJ, Rodan GA. Coupling of bone resorption and formation during bone remodeling. *In* Osteoporosis. Marcus R, David F, Jennifer K. Eds. 2nd ed. Volume 2. Academic Press, San Diego, California, 2001, p 361–372.
54. Fonyó A. csontszövet élettana; a kalcium- és foszfátforgalom hormonális szabályozása. *In* Élettan gyógyszerészhallgatók részére (Harmadik, átdolgozott és bővített kiadás). Medicina, Budapest, 2008, p 485–496.
55. Nagy Zs. A csontsejtek együttműködése. *In* Metabolikus csontbetegségek. Lakatos P, Takács I. Szerk. Medintel, Budapest, 2006, 36-51.
56. Yamaguchi K, Kinoshita M, Goto M, Kobayashi F, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K. Characterization of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor. *J Biol Chem.* 1998;273:5117–5123.
57. Gonzalez EA. The role of cytokines in skeletal remodelling: possible consequences for renal osteodystrophy. *Nephrol Dial Transplant.* 2000;15(7):945–950.
58. Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Yano K, Morinaga T, Higashio K. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;253(2):395–400.
59. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res.* 2000;15:2–12.
60. Aubin JE, Bonny E. Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Osteoporos Int.* 2000;11:905–913.
61. Grimaud E, Soubigou L, Couillaud S, Coipeau P, Moreau A, Passuti N, Gouin F, Redini F, Heymann D. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis. *Am J Pathol.* 2003;163:2021–2031.
62. Endres DB, Rude RK. Mineral and Bone Metabolism. *In* Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Eds. 4th ed. Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, 2006, p 1891–1965.
63. Lakatos P, Speer G. A D-vitamin biológiai és klinikai hatásai. *Lege Artis Medicinæ.* 2002;12:8–17.
64. Gardiner EM, Baldock PA, Thomas GP, Sims NA, Henderson NK, Hollis B, White CP, Sunn KL, Morrison NA, Walsh WR, Eisman JA. Increased formation and decreased resorption of bone in mice with elevated vitamin D receptor in mature cells of the osteoblastic lineage. *FASEB J.* 2000;14(13):1908–1916.

65. Shibata T, Shira-Ishi A, Sato T, Masaki T, Masuda A, Hishiya A, Ishikura N, Higashi S, Uchida Y, Saito MO, Ito M, Ogata E, Watanabe K, Ikeda K. Vitamin D hormone inhibits osteoclastogenesis in vivo by decreasing the pool of osteoclast precursors in bone marrow. *J Bone Miner Res.* 2002;17:622–629.
66. Ádám V. A lipidek anyagcseréje. *In Orvosi Biokémia* (3. kiadás). Medicina, Budapest, 2006, p 218–219.
67. Holick MF. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clinic Proceedings.* 2006;81;353–373.
68. VanHouten J, Dann P, McGeoch G, Brown EM, Krapcho K, Neville M, Wysolmerski JJ. The calcium-sensing receptor regulates mammary gland parathyroid hormone-related protein production and calcium transport, *J Clin Invest.* 2004;113:598–608.
69. Arnaud CD, Kolb FO. The calciotropic hormones and metabolic bone disease. *In Basic and clinical endocrinology.* Greenspan F. Ed. Appleton & Lange, Norwalk, California, 1991, p 247–323.
70. Bland R. Steroid hormone receptor expression and action in bone. *Clinical Science.* 2000;98:217–240.
71. Szabó A, Vásárhelyi B. Csont, kötőszövet és izomszövet laboratóriumi vizsgálata. *In Bevezetés a laboratóriumi medicinába* (Második bővített kiadás). Semmelweis Kiadó, Budapest, 2015, p 293–297.
72. Ha-Young K, Subburaman M. Role and Mechanisms of Actions of Thyroid Hormone on the Skeletal Development. *Bone Res.* 2013;1(2):146–161.
73. Garai J. Mellékpajzsmirigy, D-vitamin, a csontrendszer endocrin szabályozása és funkciózavarai. *In Kóréletti alapok.* Székely M. Szerk. Medicina, Budapest, 2013, p 348–349.
74. Brand HS, Lerner UH, Grubb A, Beertsen W, Nieuw Amerongen AV. Family 2 cystatins inhibit osteoclast-mediated bone resorption in calvarial bone explants. *Bone.* 2004;35(3):689–696.
75. Bhattoa HP. Laboratóriumi vizsgálatok. *In Metabolikus csontbetegségek.* Lakatos P, Takács I. Szerk. Medintel, Budapest, 2006, 102–114.
76. Jehoon L, Samuel V. Current recommendations for laboratory testing and use of bone turnover markers in management of osteoporosis. *Ann Lab Med.* 2012;32:105–112.
77. Hlaing TT, Compston JE. Biochemical markers of bone turnover - uses and limitations. 2014;51:189–202.

78. Horváth Cs. A csontmennyiség vizsgálat. *In* Metabolikus csontbetegségek. Lakatos P, Takács I. Szerk. Medintel, Budapest, 2006, 69–70.
79. Balogh Á, Bhattoa HP. A postmenopausalis osteoporosis (PMOP) definíciója. *In* Postmenopausalis osteoporosis: megelőzés és terápia. Medicina, Budapest, 2004, p 20–21.
80. Takács I, Benkő I, Toldy E, Wikonkál N, Szekeres L, Bodolay E, Kiss E, Jambrik Z, Szabó B, Merkely B, Valkusz Zs, Kovács T, Szabó A, Grigoreff O, Nagy Zs, Demeter J, Horváth H. Cs, Bittner N, Várbiro Sz, Lakatos P. Hazai konszenzus a D-vitamin szerepéről a betegségek megelőzésében és kezelésében. *Orvosi Hetilap Suppl.* 2012;153:5–26.
81. Wagner D, Hanwell H, Vieth R. An evaluation of automated methods for measurement of serum 25-hydroxyvitamin D. *Clinical Biochemistry.* 2009;42:1549–1556.
82. Bhattoa HP, Nagy E, More C, Kappelmayer J, Balogh A, Kalina E, Antal-Szalmas P. Prevalence and seasonal variation of hypovitaminosis D and its relationship to bone metabolism in healthy Hungarian men over 50 years of age. The HunMen Study. *Osteoporos Int.* 2013;24:179–186.
83. Levey AS, Coresh J, Greene T, Stevens LA, Zhang YL, Hendriksen S, Kusek JW, Van Lente F. Using standardized serum creatinine values in the modification of diet in renal disease study equation for estimating glomerular filtration rate. *Ann Intern Med.* 2006;145:247–254.
84. Inker LA, Schmid CH, Tighiouart H, Eckfeldt JH, Feldman HI, Greene T, Kusek JW, Manzi J, Van Lente F, Zhang YL, Coresh J, Levey AS. Estimating glomerular filtration rate from serum creatinine and cystatin C. *N Engl J Med.* 2012;367:20–29.
85. Teo BW, Sabanayagam C, Liao J, Toh QC, Saw S, Wong TY, Sethi S. Comparison of CKD-EPI cystatin C and creatinine glomerular filtration rate estimation equations in Asian Indians. *Int J Nephrol.* 2014;746497.
86. Carter GD. Accuracy of 25-hydroxyvitamin D assays: confronting the issues. *Curr Drug Targets.* 2011;12:19–28.
87. Tai SS, Bedner M, PhinneyKW. Development of a candidate reference measurement procedure for the determination of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 25-hydroxyvitamin D<sub>2</sub> in human serum using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* 2010;82:1942–1948.

88. Pludowski P, Grant WB, Bhattoa HP, Bayer M, Povoroznyuk V, Rudenka E, Ramanau H, Varbiro S, Rudenka A, Karczmarewicz E, Lorenc R, Czech-Kowalska J, Konstantynowicz J. Vitamin D status in Central Europe. *Int J Endocrinol.* 2014;589587.
89. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* 1997;89:309–319.
90. Onyia JE, Miles RR, Yang X, Halladay DL, Hale J, Glasebrook A, McClure D, Seno G, Churgay L, Chandrasekhar S, Martin TJ. In vivo demonstration that parathyroid hormone 1–38 inhibits the expression of osteoprotegerin in bone with the kinetics of an immediate early gene. *J Bone Miner Res.* 2000;15:863–871.
91. Lee SK, Lorenzo JA. Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology.* 1999;140:3552–3561.
92. Horwood NJ, Elliott J, Martin TJ, Gillespie MT. Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells. *Endocrinology.* 1998;139:4743–4746.
93. Murakami T, Yamamoto M, Ono K, Nishikawa M, Nagata N, Motoyoshi K, Akatsu T. Transforming growth factor- $\beta$ 1 increases mRNA levels of osteoclastogenesis inhibitory factor in osteoblastic/stromal cells and inhibits the survival of murine osteoclast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;252:747–752.
94. Shaarawy M, Fathy SA, Mehany NL, Hindy OW. Circulating levels of osteoprotegerin and receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand in patients with chronic renal failure. *Clin Chem Lab Med.* 2007;45:1498–1503.
95. Kulcsar-Jakab E, Petho Z, Pap Z, Kalina E, Foldesi R, Balogh A, Antal-Szalmas P, Bhattoa HP. Cystatin C as a potential predictor of osteoprotegerin levels in healthy men. A cross-sectional, observational study. *BMC Musculoskeletal Disorders.* 2015;16(1):227.

96. Sempos CT, Vesper HW, Phinney KW, Thienpont LM, Coates PM. Vitamin D status as an international issue: national surveys and the problem of standardization. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 2012;243:32–40.
97. Thienpont LM, Stepman HCM, Vesper HW. Standardization of measurements of 25-hydroxyvitamin D3 and D2. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 2012;243:41–49.
98. Cashman KD, Muldowney S, McNulty B, Nugent A, FitzGerald AP, Kiely M, Walton J, Gibney MJ, Flynn A. Vitamin D status of Irish adults: findings from the National Adult Nutrition Survey. *Br J Nutr.* 2013;109:1248–1256.
99. Sempos CT, Durazo-Arvizu RA, Carter GD. Cost effective measures to standardize serum 25(OH)D values from completed studies. *Osteoporos Int.* 2017;28(5):1503-1505.
100. Jakab E, Kalina E, Petho Z, Pap Z, Balogh A, Grant WB, Bhattoa HP. Standardizing 25-hydroxyvitamin D data from the HunMen cohort. *Osteoporos Int.* 2017 May;28(5):1653-1657.

## 10.2. Saját közlemények jegyzéke



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**  
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400  
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/325/2018.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Jakab Éva  
Neptun kód: JEVA  
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Jakab, É.**, Kalina, E., Pethő, Z., Pap, Z., Balogh, Á., Grant, W. B., Bhattoa, H. P.: Standardizing 25-hydroxyvitamin D data from the HunMen cohort. *Osteoporosis Int.* 28 (5), 1653-1657, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/DOI 10.1007/s00198-017-3924-4>  
IF: 3.856
2. **Kulcsár-Jakab, É.**, Pethő, Z., Pap, Z., Kalina, E., Földesi, R., Balogh, Á., Antal-Szalmás, P., Bhattoa, H. P.: Cystatin C as a potential predictor of osteoprotegerin levels in healthy men, a cross-sectional, observational study. *BMC Musculoskelet. Disord.* 16 (277), 1-7, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12891-015-0684-1>  
IF: 1.684





### További közlemények

3. Pethő, Z., **Kulcsár-Jakab, É.**, Kalina, E., Balogh, Á., Pusztai, A., Gulyás, K., Horváth, Á., Szekanecz, Z., Bhattoa, H. P.: Vitamin D status in men with psoriatic arthritis: a case-control study.  
*Osteoporosis Int.* 26 (7), 1965-1970, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00198-015-3069-2>  
IF: 3.445
4. Pethő, Z., **Kulcsár-Jakab, É.**, Onyeka, U., Molnár, Z., Kalina, E., Balogh, Á., Paragh, G., Antal-Szalmás, P., Káplár, M., Bhattoa, H. P.: Az országspecifikus FRAX-algoritmus által meghatározott 10 éves csípő- és major osteoporoticus törések valószínűségének vizsgálata 2-es típusú diabeteses férfiak csoportjában.  
*LAM KID.* 4 (4), 155-161, 2014.

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 8,985**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 5,54**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2018.10.11.



## **11. TÁRGYSZAVAK / KEYWORDS**

25-hidroxi-D-vitamin / 25-hydroxyvitamin D

Csontanyagcsere / Bone metabolism

Cystatin C / Cystatin C

DEQAS / DEQAS

HunMen / HunMen

NIST / NIST

Osteoprotegerin / Osteoprotegerin

RANKL / Receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand

Standardizáció / Standardization

## **12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Szeretettel és tisztelettel köszönöm témavezetőmnek, Dr. Bhattoa Harjit Pal egyetemi docens úrnak a kutatásom kivitelezésében és a dolgozatom elkészítésében nyújtott maximális szakmai és emberi támogatását, valamint iránymutatását. Ugyanakkor köszönöm bizalmát és a lehetőséget, hogy megismerhettem a kutatói munka szépségeit.

Szeretném megköszönni Dr. Kappelmayer János professzor úrnak, hogy a Debreceni Egyetem ÁOK Laboratóriumi Medicina Intézetében végezhettem a tudományos munkámat.

Köszönettel tartozom munkahelyi vezetőmnek, Dr. Csernák Zsolt főorvos úrnak, hogy tanulmányaimhoz háttérrel biztosított és támogatott.

Köszönöm a Debreceni Egyetem ÁOK Laboratóriumi Medicina Intézet dolgozóinak, valamint a Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika Csontdenzitometria Szakrendelés dolgozóinak a vizsgálatok kivitelezésében nyújtott segítséget.

Köszönöm munkatársaimnak, a SYNLAB Budapest Szent János Kórház Laboratórium és Magán Vértvételi Hely dolgozóinak türelmét és támogatását.

Hálásan köszönöm Édesanyámnak és nővéremnek, valamint minden kedves családtagomnak és a barátaimnak, hogy mindig mellettem álltak és önzetlenül támogattak.

### **13. FÜGGELÉK**

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények.