

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ  
ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ ΝΟΣΩΝ**

**Διευθυντής: Αναπληρωτής καθηγητής Γ.Ν. Κουκούλης**

---

**Τίτλος θέματος**

**Συγκριτική μελέτη, σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες,  
της in vivo επίδρασης στο σύστημα των κυτταροκινών  
οστεοπροτεγερίνης-RANKL  
φαρμακευτικών παραγόντων με διαφορετική δράση  
στο δίπολο οστεοκλάστης - οστεοβλάστης**

**ΑΘΑΝΑΣΙΟΥ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑΚΗ  
ΙΑΤΡΟΥ  
ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΟΥ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2008**

716  
A

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ  
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 7310/1

Ημερ. Εισ.: 08-09-2009

Δωρεά:

Ταξιδιωτικός Κωδικός: Δ

616.716

ΑΝΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000083668

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ  
ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ ΝΟΣΩΝ**

**Διευθυντής: Αναπληρωτής καθηγητής Γ.Ν. Κουκούλης**

---

08-09-2008

**Τίτλος θέματος**

**Συγκριτική μελέτη, σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες,  
της in vivo επίδρασης στο σύστημα των κυτταροκινών  
οστεοπροτεγερίνης-RANKL  
φαρμακευτικών παραγόντων με διαφορετική δράση  
στο δίπολο οστεοκλάστης - οστεοβλάστης**

**ΑΘΑΝΑΣΙΟΥ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑΚΗ  
ΙΑΤΡΟΥ  
ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΟΥ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2008**

## Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

<i>Γεώργιος Κουκούλης</i>	Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας
<i>Λάζαρος Σακκάς</i>	Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας-Ρευματολογίας
<i>Ιωάννης Στεφανίδης</i>	Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας-Νεφρολογίας

## Η ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

<i>Νικόλαος Σταθάκης</i>	Καθηγητής Παθολογίας
<i>Ιωάννης Μεσήνης</i>	Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας
<i>Δημήτριος Αρβανίτης</i>	Καθηγητής Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας,
<i>Γεώργιος Κουκούλης</i>	Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας
<i>Ιωάννης Στεφανίδης</i>	Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας-Νεφρολογίας
<i>Λάζαρος Σακκάς</i>	Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας-Ρευματολογίας
<i>Σπύρος Ποταμιάνος</i>	Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας-Γαστρεντερολογίας

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ  
ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΜΑΛΙΖΟΣ**

**ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΤΟΜΕΑ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ  
ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΣΤΑΘΑΚΗΣ**

*Στη σύζυγο μου Αθηνά  
και τα παιδιά μου  
Δημήτρη και Γιάννη*

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>Κατάλογος Συντομογραφιών</b>	11
<b>Κατάλογος Πινάκων και Σχημάτων</b>	13
<b>Πρόλογος</b>	15
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	17
<b>1 Εισαγωγή</b>	19
<b>2 Φυσιολογία του οστικού μεταβολισμού – δείκτες</b>	20
2.1 Κύκλος οστικής ανακατασκευής – κύτταρα που συμμετέχουν	20
2.2 Φυσιολογία οστικού σχηματισμού – απορρόφησης και παραγωγής αντιστοιχών δεικτών	24
2.2.1 Οστικός σχηματισμός	24
2.2.2 Οστική απορρόφηση	26
2.2.3 Φυσιολογία και δείκτες οστικού μεταβολισμού	27
2.2.4 Αμινοτελικό προπεπτίδιο κολλαγόνου τύπου 1 (PINP)	28
2.2.5 Καρβοξυ-τελοπεπτιδικός δεσμός κολλαγόνου (CTX)	28
2.3 Ο ρόλος των ορμονών	30
2.4 Ο ρόλος των τοπικών κυτταροκινών και προσταγλανδινών	31
2.5 Ο ρόλος των τοπικών αυξητικών παραγόντων	32
2.6 Σύστημα RANKL – RANK – OPG	33
2.6.1 Εισαγωγή	33
2.6.2 Γενετική	38
2.6.3 Παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση RANKL και OPG <i>in vitro</i>	39
<b>3 Οστεοπόρωση</b>	40
3.1 Ορισμός	40
3.2 Ταξινόμηση	40
3.3 Διάγνωση	42
3.3.1 Μέτρηση οστικής πυκνότητας	42
3.3.2 Κλινική χρησιμότητα των δεικτών οστικού μεταβολισμού στην παρακολούθηση αποτελεσματικότητας της θεραπείας	43
3.3.3 Διαγνωστικές εφαρμογές του συστήματος OPG / RANKL / RANK	44
<b>4 Μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση</b>	49
4.1 Επιδημιολογία – κοινωνικοοικονομικές επιπτώσεις	49
4.2 Θεραπευτική προσέγγιση	49
4.1.1 Παραθορμόνη	50
TRTD (PTH 1-34)	50
Παραθορμόνη 1-84	57
4.1.2 Διφωσφονικά	57
4.1.3 Ασβέστιο	61





<b>5 Φυσιοπαθολογία της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης</b>	63
5.1 Μηχανισμοί οστικής απώλειας	63
5.2 Ο ρόλος ορμονών, τοπικών κυτοκινών, προσταγλανδινών και αυξητικών παραγόντων	64
5.3 Το σύστημα OPG-RANKL-RANK στην παθογένεση οστικών νοσημάτων	65
5.4 Άλλες επιδράσεις του συστήματος OPG-RANKL-RANKs	69
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	71
<b>1 Σκοπός</b>	73
<b>2 Ασθενείς και Μέθοδοι</b>	74
2.1 Ασθενείς	74
2.1.1 Μονάδα στρατολόγησης ασθενών	74
2.1.2 Κριτήρια εισαγωγής – αποκλεισμού	74
2.1.3 Ομάδες	74
2.2 Μέθοδοι	75
2.2.1 OPG	77
2.2.2 RANKL	78
2.2.3 PINP	79
2.2.4 CTX	79
2.2.5 Λοιπές μετρήσεις	80
2.2.6 Στατιστική ανάλυση	81
<b>3 Αποτελέσματα</b>	83
3.1 Ανεπιθύμητες ενέργειες	83
3.2 Διαφορές μεταξύ των ομάδων	84
3.3 Συσχετίσεις	91
<b>4 Συζήτηση</b>	95
<b>5 Συμπεράσματα</b>	102
<b>6 Περίληψη</b>	103
<b>7 Summary</b>	105
<b>8 Βιβλιογραφία</b>	107



## Κατάλογος Συντομογραφιών

	<b>Ελληνικοί όροι</b>
a/a	απλή ακτινογραφία
ΑΕ	ανεπιθύμητες ενέργειες
A/Θ	ακτινοθεραπεία
ΑΦ	αλκαλική φωσφατάση
Θ.Ο.Υ.	θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης
ΟΜΣΣ	οσφυϊκή μοίρα σπονδυλικής στήλης
ΣΔ	σακχαρώδης διαβήτης
ΣΣ	σπονδυλική στήλη
ΤΚΕ	ταχύτητα καθίζησης ερυθρών
ΥπερΘ	υπερθυρεοειδισμός
ΥΠΠΘ	υπερπαραθυρεοειδισμός
X/Θ	χημειοθεραπεία
	<b>Ξενόγλωσσοι όροι</b>
BGP	οστεοκαλσίνη
BMD	οστική πυκνότητα
BMI	δείκτης μάζας σώματος
BMP	οστική μορφογενετική πρωτεΐνη
Ca	ασβέστιο
CGRP	πεπτίδιο που σχετίζεται με το γονίδιο της καλσιτονίνης
COLIA-1	γονίδιο του κολλαγόνου τύπου 1
Cr	κρεατινίνη
CRP	C-αντιδρώσα πρωτεΐνη
CSF	παράγων διέγερσης των αποικιών
CTX	καρβοξυ-τελοπεπτιδικός δεσμός κολλαγόνου
DEXA	απορροφησιμετρία ακτίνων X διπλής ενέργειας
DPD	δεοξυπυριδινολίνη
DNA	δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
E <sub>2</sub>	οιστραδιόλη
ELISA	συνδεδεμένη με ένζυμο ανοσοαπορροφητική μέθοδος
ESH	εκτατική σκελετική υπερφωσφατασία
ESR	οιστρογονικός υποδοχέας
FEO	οικογενής εκτατική οστεόλυση
FGF	αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών
GH	αυξητική ορμόνη
HDL	υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες
HPLC	υγρή χρωματογραφία υψηλής ανάλυσης
ICTP	καρβοξυτελικό τελοπεπτίδιο κολλαγόνου τύπου 1
IGF	ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγων
IGFBP	δεσμευτική σφαιρίνη των ινσουλινόμορφων αυξητικών παραγόντων
IL	ιντερλευκίνη
IOF	Διεθνές Ίδρυμα Οστεοπόρωσης
KOM	κορυφαία οστική μάζα
LDL	χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες
M-CSF	παράγων διέγερσης αποικιών των μακροφάγων
mRNA	αγγελιοφόρο ριβονουκλεϊκό οξύ

NSAIDs	μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη
NTX	N-τελοπεπτιδικός δεσμός κολλαγόνου
OPG	οστεοπροτεγερίνη
P	φωσφόρος
PG	προγεστερόνη
PGs	προσταγλανδίνες
pQCT	ποσοτική αξονική τομογραφία
PINP	αμινοτελικό προπεπτίδιο κολλαγόνου τύπου 1
PICP	καρβοξυτελικό προπεπτίδιο κολλαγόνου τύπου 1
PTH	παραθορμόνη
PTHrP	πρωτεΐνη προσομοιάζουσα στην παραθορμόνη
PYD	πυριδινολίνη
RANK	υποδοχέας ενεργοποιητής του πυρηνικού παράγοντα Κβ
RANKL	συνδέτης του RANK
Re	υποδοχέας
rhPTH	ανθρώπινη ανασυνδυασμένη παραθορμόνη
RIA	ραδιοανοσολογική μέθοδος
RR	σχετικός κίνδυνος
sRANKL	διαλυτός RANKL
sOPG	διαλυτή OPG
T	τεστοστερόνη
TGF	αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης
TNF	παράγοντας νέκρωσης όγκων
TPTD	τεριπαρατίδη
TRAIL	συνδέτης που προάγει την TNF σχετιζόμενη απόπτωση
TRAP	όξινη φωσφατάση ανθεκτική στο τρυγικό οξύ
VDR	υποδοχέας της βιταμίνης D

## Κατάλογος Πινάκων και Σχημάτων

### Πίνακες

α/α	σελίδα	
1	31	Βιοχημικοί δείκτες οστικού μεταβολισμού.
2	37	Επίδραση των κυτταροκινών στο σκελετό.
3	45-6	Ρόλος του συστήματος OPG-RANKL-RANK στον οστικό μεταβολισμό, το ανοσοποιητικό σύστημα και την αγγειακή βιολογία.
4	49	Διάγνωση της οστεοπόρωσης με βάση την μέτρηση της οστικής πυκνότητας.
5	50	Χαρακτηριστικά τύπων πρωτοπαθούς οστεοπόρωσης.
6	51	Αίτια δευτεροπαθούς οστεοπόρωσης.
7	112	Ανεπιθύμητες εκδηλώσεις από την αγωγή στις τρεις ομάδες ασθενών.
8	113	Δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών των τριών ομάδων.
9	113	Επίπεδα του σωματικού βάρους και του δείκτη μάζας σώματος στις τρεις ομάδες ασθενών πριν την έναρξη της αγωγής και 3 και 6 μήνες αργότερα.
10	114	Επίπεδα ασβεστίου, λευκωματίνης, διορθωμένου ασβεστίου και φωσφόρου ορού στις τρεις ομάδες ασθενών πριν την έναρξη της αγωγής και 3 και 6 μήνες αργότερα.
11	116	Μεταβολή της παραθορμόνης ορού (pg/ml), στις τρεις ομάδες ασθενών πριν την έναρξη της αγωγής και 3 και 6 μήνες αργότερα.
12	117	Επίπεδα της ολικής ΑΦ, του αμινοτελικού προπεπτιδίου του προκολλαγόνου τύπου 1 (PINP) και του καρβοξυ-τελοπεπτιδικού τελοπεπτιδίου του κολλαγόνου (CTX) στον ορό στις τρεις ομάδες ασθενών πριν την έναρξη της αγωγής και 3 και 6 μήνες αργότερα.
13	120	Επίπεδα της οστεοπροτεγερίνης (OPG), του συνδέτη του υποδοχέα του ενεργοποιητή του πυρηνικού παράγοντα κΒ (RANKL) στον ορό και του λόγου τους στις τρεις ομάδες ασθενών πριν την έναρξη της αγωγής και 3 και 6 μήνες αργότερα.
14	125	Συσχετίσεις μεταξύ του ολικού (Ca) και διορθωμένου (CCa) ασβεστίου, των δεικτών οστικού μεταβολισμού (CTX, PINP, ΑΦ, PTH), της OPG, του RANKL και του λόγου τους, της ηλικίας, της ηλικίας εμμηνόπαυσης και των σωματομετρικών χαρακτηριστικών στο σύνολο των ασθενών στην έναρξη της μελέτης.
15	126	Συσχετίσεις μεταξύ της OPG, του RANKL και του λόγου τους και της οστικής πυκνότητας στο σύνολο των ασθενών στην έναρξη της μελέτης.

## Σχήματα

α/α	σελίδα	
1	26	Σχηματική απεικόνιση του κύκλου οστικής ανακατασκευής.
2	28	Σύνθεση τροποκολλαγόνου.
3	29	Δεσμοί N-τελοπεπτιδίων στο οστικό κολλαγόνο.
4	34	Ισομερείς μορφές του δεσμού ασπαρτικού-γλυκίνης που εντοπίζεται στο α-1 τελοπεπτίδιο (CTX).
5	35	Μηχανισμοί ρύθμισης της ομοιοστασίας του Ca.
6	44	Φυσιολογικός ρόλος του συστήματος RANKL-RANK-OPG στον οστικό μεταβολισμό.
7	115	Μεταβολές του ολικού ασβεστίου ορού στις τρεις ομάδες ασθενών κατά τη διάρκεια της μελέτης.
8	115	Μεταβολές του διορθωμένου ασβεστίου ορού στις τρεις ομάδες ασθενών κατά τη διάρκεια της μελέτης.
9	116	Μεταβολές της παραθορμόνης ορού στις τρεις ομάδες ασθενών κατά τη διάρκεια της μελέτης.
10	118	Μεταβολές της ακλαλικής φωσφατάσης ορού στις τρεις ομάδες ασθενών κατά τη διάρκεια της μελέτης.
11	118	Μεταβολές του PINP ορού στις τρεις ομάδες ασθενών κατά τη διάρκεια της μελέτης.
12	119	Μεταβολές του CTX ορού στις τρεις ομάδες ασθενών κατά τη διάρκεια της μελέτης.
13	121	Μεταβολές της οστεοπροτεγερίνης ορού στις τρεις ομάδες ασθενών κατά τη διάρκεια της μελέτης.
14	121	Μεταβολές του sRANKL ορού στις τρεις ομάδες ασθενών κατά τη διάρκεια της μελέτης.
15	122	Μεταβολές του λόγου OPG / sRANKL στις τρεις ομάδες ασθενών κατά τη διάρκεια της μελέτης.

## Πρόλογος

Η οστεοπόρωση αποτελεί το συχνότερο μεταβολικό νόσημα των οστών με σοβαρές κοινωνικές και οικονομικές επιπτώσεις. Δεδομένου ότι αφορά κατ' εξοχήν σε άτομα μεγάλης ηλικίας, η διαρκής επιμήκυνση του χρόνου διαβίωσης και η επακόλουθη συνεχής αύξηση της επίπτωσης της έχουν οδηγήσει στην εκδήλωση ιδιαίτερου ενδιαφέροντος για την αποτελεσματική αντιμετώπιση της, από Διεθνείς και Εθνικούς φορείς, την ιατρική κοινότητα αλλά και πολλές φαρμακευτικές εταιρείες.

Για να μπορέσει όμως να αντιμετωπιστεί αποτελεσματικά η νόσος είναι απαραίτητη η κατανόηση της παθογένειας της. Στον τομέα αυτό έχουν γίνει μεγάλα βήματα προόδου τα τελευταία έτη, αλλά υπάρχουν ακόμα αρκετά πεδία που δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως. Ένα απ' αυτά είναι και το σύστημα των κυτταροκινών (cytokines) οστεοπροτεγερίνης – RANKL – RANK, το οποίο συμμετέχει ενεργά στον οστικό μεταβολισμό. Η κλινική σημασία των μεταβολών του εν λόγω συστήματος υπό την επίδραση φαρμακευτικών παραγόντων που επηρεάζουν τον οστικό μεταβολισμό αποτέλεσε και θέμα της παρούσης διατριβής.

Παράγοντες που με οδήγησαν στην επιλογή του συγκεκριμένου θέματος ήταν αφενός η προαναφερθείσα μεγάλη και διαρκώς αυξανόμενη επίπτωση της νόσου που συνοδεύεται από έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον για την αποσαφήνιση της παθογένειας της και αφετέρου τα ερεθίσματα που δέχτηκα από την κλινική όπου εκπαιδεύτηκα. Η Ενδοκρινολογική Κλινική του Ιπποκρατείου Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης έχει μια μακρά παράδοση ιδιαίτερης ενασχόλησης με τα μεταβολικά νοσήματα των οστών. Έχει αναπτύξει ένα από τα μεγαλύτερα Ιατρεία παθήσεων του μεταβολισμού των οστών στη Βόρεια Ελλάδα και αποτελεί κέντρο αναφοράς γι' αυτές. Συμμετέχει ενεργά σε όλες τις επιστημονικές εκδηλώσεις που σχετίζονται με τις σκελετικές παθήσεις εντός και εκτός συνόρων και διενεργεί πολλά ερευνητικά πρωτόκολλα πάνω σ' αυτό το θέμα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Κουκούλη Γεώργιο, επιβλέποντα αυτής της διατριβής, για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση του σ' όλες τις φάσεις εξέλιξης αυτής της προσπάθειας. Οι συμβουλές και οι παρεμβάσεις του ήταν πάντα καίριες και ουσιαστικές και βοήθησαν στην εμπρόθεσμη ολοκλήρωση της διατριβής.

Επίσης ευχαριστώ τους αναπληρωτές καθηγητές κ. Σακκά Λάζαρο και κ. Στεφανίδη Ιωάννη, μέλη της τριμελούς επιτροπής, για τη βοήθεια τους στην ολοκλήρωση της διατριβής.

Ιδιαίτερος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον διευθυντή της Ενδοκρινολογικής Κλινικής του Ιπποκρατείου Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης, κ. Αβραμίδα Αβραάμ, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για την ευκαιρία που έδωσε να εμβαθύνω στα μεταβολικά νοσήματα των οστών. Από το υλικό της κλινικής αντλήθηκαν κατά ένα πολύ μεγάλο μέρος οι ασθενείς που συμμετείχαν σ' αυτή τη διατριβή. Η συμβολή του στην ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας υπήρξε καθοριστική.

Θερμά ευχαριστώ τον εκλεκτό φίλο κ. Γουλή Δημήτριο, ενδοκρινολόγο, λέκτορα Α.Π.Θ., για την ουσιαστική του βοήθεια στην επιλογή του θέματος, την επίβλεψη της στατιστικής επεξεργασίας των αποτελεσμάτων και τη συγγραφή της διατριβής.

Καθοριστική ήταν η βοήθεια του εκλεκτού συναδέλφου και φίλου Πολύζου Στέργιου, ενδοκρινολόγου, στη συλλογή των δειγμάτων και τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Θερμά ευχαριστώ τον φίλο και συνεργάτη μου κ. Γέρου Σπύρο, βιοπαθολόγο, διευθυντή των εργαστηρίων «Ανάλυση», για τη μεσολάβηση του στην προμήθεια των αντιδραστηρίων και την υπεύθυνη και αξιόπιστη επεξεργασία των δειγμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Roche Diagnostics και ιδιαίτερα τον κ. Καταραχιά Ιωάννη για την παραχώρηση των αντιδραστηρίων για τις μετρήσεις ασβεστίου, φωσφόρου, ολικής ΑΦ, PINP και CTX.



## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο σκελετός είναι ένας ζωντανός ιστός ο οποίος ανανεώνεται συνεχώς μέσα από μια διαδικασία διαρκούς ανακατασκευής. Οστεοβλάστες και οστεοκλάστες συνιστούν το βασικό κυτταρικό δίπολο οστεοσύνθεσης-οστεοαποδόμησης, του οποίου η ισόρροπη και αρμονική λειτουργία αποτελεί προϋπόθεση για τη διατήρηση σταθερού του όγκου του σκελετού.

Στη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου, ο σκελετός του αρχικά αυξάνεται βαθμιαία, μέχρι την επίτευξη της κορυφαίας οστικής μάζας (KOM) περίπου στην ηλικία των 25-30 ετών και στη συνέχεια αρχίζει μια αργή αλλά προοδευτική απώλεια οστικής μάζας, που στις γυναίκες επιταχύνεται σημαντικά τα πρώτα τρία ως πέντε έτη μετά την εμμηνόπαυση.

Το 40-80% των διαφορών στο ρυθμό οστικής ανακατασκευής, την κορυφαία οστική μάζα και τον επακόλουθο ρυθμό οστικής απώλειας μεταξύ των ανθρώπων καθορίζεται γενετικά. Το υπόλοιπο 20-60% επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες και συγκεκριμένα από τις διατροφικές συνήθειες (επαρκής πρόσληψη ασβεστίου και βιταμίνης D)<sup>1,2</sup>, τη φυσική δραστηριότητα και τις έξεις του ατόμου (κάπνισμα, υπερκατανάλωση αλκοόλ και καφέ). Γονίδια που έχουν προταθεί ως υπεύθυνα για την αυξημένη προδιάθεση για οστεοπόρωση περιλαμβάνουν το γονίδιο του υποδοχέα της βιταμίνης D (VDR)<sup>3,4</sup>, της α1 αλυσίδας του κολλαγόνου τύπου 1 (COL1A1)<sup>5</sup>, των οιστρογονικών υποδοχέων α και β<sup>6</sup>, του αυξητικού παράγοντα μεταμόρφωσης-β (TGF-β) και της απολιποπρωτεΐνης E, της οστικής μορφογενετικής πρωτεΐνης 2 (BMP-2)<sup>7</sup>, της πρωτεΐνης 5, που σχετίζεται με τον υποδοχέα των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (low-density-lipoprotein receptor-related protein 5 – LRP-5)<sup>8</sup>. Ωστόσο, δεν έχει, προς το παρόν, εντοπιστεί ένα μοναδικό γονίδιο στο οποίο να μπορεί να αποδοθεί η νόσος. Φαίνεται ότι πρόκειται για πολυγονιδιακή νόσο ή υπό τον όρο οστεοπόρωση υπάγονται διάφορες νοσολογικές οντότητες που επηρεάζονται από διαφορετικά γονίδια.

Η οστεοπόρωση είναι η πιο συχνή μεταβολική πάθηση του σκελετού. Οφείλεται σε διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ οστικού σχηματισμού και απορρόφησης που οδηγεί σε βαθμιαία απώλεια οστού. Είναι κύριος παράγων κινδύνου για κάταγμα, το οποίο συνοδεύεται από σημαντική νοσηρότητα, θνητότητα και κόστος<sup>9</sup>.

## 2. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΟΣΤΙΚΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ

### 2.1 Κύκλος οστικής ανακατασκευής – κύτταρα που συμμετέχουν

Η οστική ανακατασκευή αποτελεί τον τρόπο με τον οποίο ο σκελετός, επιτυγχάνοντας μια τμηματική αντικατάσταση του παλαιού οστού με νέο, διορθώνει τις μικροφθορές που υφίσταται από την καθημερινή καταπόνηση και διατηρεί την μηχανική του αντοχή. Στην διαδικασία αυτή συμμετέχουν οι οστεοβλάστες, οι οστεοκλάστες και τα οστεοκύτταρα, των οποίων ο ρόλος αποσαφηνίστηκε τα τελευταία έτη<sup>10,11</sup>.

**Οστεοβλάστες**<sup>12</sup>. Προέρχονται από αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα που είναι πολυδύναμα και μπορούν επίσης να διαφοροποιηθούν σε μυϊκά κύτταρα, λιποκύτταρα, χονδροκύτταρα. Με τη δράση διαφόρων κυτταροκινών δημιουργείται ένας πληθυσμός πρόδρομων κυττάρων που έχουν μερικώς διαφοροποιηθεί μπορούν πλέον να διαφοροποιηθούν μόνο σε οστεοβλάστες. Οι προ-οστεοβλάστες είναι παρόντες στο περιόστεο και το στρώμα του μυελού. Η διαδικασία της ωρίμανσης των κυττάρων της οστεοβλαστικής σειράς ελέγχεται από γονίδια (Cbfa-1), μεταγραφικούς παράγοντες (Runx-2) και κυτταροκίνες (οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες – BMPs).

Οι ώριμοι οστεοβλάστες έχουν κυβοειδή διαμόρφωση, και διαθέτουν εκτενές ενδοπλασματικό δίκτυο και σύστημα Golgi, χαρακτηριστικά των κυττάρων που συνθέτουν και εκκρίνουν πρωτεΐνες. Στην κυτταρική τους μεμβράνη περιέχουν άφθονη πυροφωσφορική υδρολάση και ΑΦ και έχουν υποδοχείς για διάφορες ορμόνες (παραθορμόνη, αυξητική ορμόνη, καλσιτριόλη, οιστρογόνα) και αυξητικούς παράγοντες (IGF-1, IGF-2, TGF-β).

Είναι υπεύθυνοι για τον σχηματισμό νέου οστού και στη συνέχεια την επιμετάλλωση της θεμέλιας ουσίας του. Στην πράξη αποτελούν μικροσκοπικά εργοστάσια παραγωγής των πρώτων υλών του οστού, δηλαδή του κολλαγόνου τύπου I και μη κολλαγονικών πρωτεϊνών (πρωτεογλυκάνες, γλυκοπρωτεΐνες, οστεοκαλσίνη, οστεονεκτίνη). Επιλέον παράγουν ένζυμα (ΑΦ), αυξητικούς παράγοντες (IGF-1, IGF-2, TGF-β) και κυτοκίνες (ιντερλευκίνη-1 και -6, OPG, RANKL) με τις οποίες ελέγχουν την ωρίμανση και δραστηριότητα των οστεοκλαστών. Η επιμετάλλωση της νεοσχηματιζόμενης θεμέλιας ουσίας καθυστερεί αρκετές ημέρες, ώστε να υπάρχει επαρκής χρόνος για τη σύζευξη (cross-linking) των ινών του κολλαγόνου, ώστε να επιτυγχάνεται η μέγιστη δυνατή αντοχή.

Καθώς η οστεοβλαστική παραγωγή κολλαγόνου και μη κολλαγονικών πρωτεϊνών ολοκληρώνεται, κάποιοι από τους οστεοβλάστες ενταφιάζονται μέσα στη θεμέλια ουσία και μετατρέπονται σε οστεοκύτταρα<sup>13</sup>. Η πλειοψηφία των οστεοβλαστών παραμένουν στην οστική επιφάνεια και απλώνονται ως αποπλατυσμένα καλυπτήρια κύτταρα ή υφίστανται προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση). Τα καλυπτήρια κύτταρα παραμένουν συνδεδεμένα με τα οστεοκύτταρα, τα οποία μπορεί να είναι απαραίτητα για τη μετάδοση του σήματος ενεργοποίησης κατά την ανακατασκευή.

**Οστεοκλάστες**<sup>12</sup>. Σχετίζονται με τα μονοκύτταρα/μακροφάγα και προέρχονται από τις μονάδες σχηματισμού αποικιών των κοκκιοκυτάρων/μακροφάγων [granulocyte/macrophage-forming colony units (CFU-GM)]. Ο παράγων διέγερσης των αποικιών των μακροφάγων [Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)] είναι απαραίτητος για να αρχίσει η διαφοροποίηση των οστεοκλαστών. Τα προγονικά κύτταρα (progenitors) των οστεοκλαστών συναντώνται στο μυελό, το σπλήνα και σε μικρούς αριθμούς στην κυκλοφορία. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, πρόδρομες (precursors) μορφές των οστεοκλαστών πιθανώς μεταναστεύουν στα οστά από εξωμυελικές θέσεις αιμοποίησης.

Ο σχηματισμός των οστεοκλαστών προϋποθέτει την αλληλεπίδραση με κύτταρα της οστεοβλαστικής σειράς, είτε ως επικοινωνία κυττάρου με κύτταρο είτε μέσω RANKL/RANK, όπως περιγράφεται παρακάτω. Οι οστεοβλάστες μπορεί επιπλέον να αποτελούν την πηγή του M-CSF που απαιτείται για την οστεοκλαστογένεση. Παράγοντες με τους οποίους οι οστεοβλάστες παρεμποδίζουν την οστεοκλαστογένεση περιλαμβάνουν την οστεοπροτεγερίνη (OPG), η οποία μπλοκάρει την αλληλεπίδραση οστεοβλάστη/οστεοκλάστη, την IL-18 και την πρωτεΐνη Sca, που αναστέλλει το σχηματισμό οστεοκλαστών και την οστική απορρόφηση, επιτρέποντας αυτοκρινική ή παρακρινική ρύθμιση της οστεοκλαστικής λειτουργίας<sup>14</sup>.

Πολλές ορμόνες και τοπικοί παράγοντες μπορούν να προάγουν ή να αναστείλουν την οστεοκλαστογένεση δρώντας στους οστεοβλάστες. Διεγέρτες αποτελούν η καλσιτριόλη, η PTH, ο TNF- $\alpha$ , η προσταγλανδίνη E<sub>2</sub>, και οι ιντελευκίνες IL-1, IL-6 και IL-11. Στους αναστολείς συγκαταλέγονται διάφορες ιντερλευκίνες (IL-4,-12,-13,-18) και η ιντερφερόνη- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ).

Η λειτουργική διαφοροποίηση των οστεοκλαστών προαπαιτεί την έκφραση διαφόρων γονιδίων. Εξάλειψη των C-SRC, C-FOS και PU-1 γονιδίων οδηγεί σε οστεοπετρωπικό φαινότυπο, σχετιζόμενο με ανεπαρκή σχηματισμό ή δραστηριότητα των οστεοκλαστών<sup>15</sup>. Πρωτεΐνες απαραίτητες για τη λειτουργία των οστεοκλαστών είναι οι υποδοχείς της ιντεγκρίνης για την προσκόλληση της ζώνης στεγανοποίησης (sealing), μια ATP-άση υδρογόνου-καλίου για την έκκριση ιόντων υδρογόνου και η καθεψίνη K, μια πρωτεάση κλειδί για την αποδόμηση της θεμέλιας ουσίας.

Το τελευταίο βήμα ενεργοποίησης των οστεοκλαστών, ώστε να αρχίσει η διαδικασία της οστικής απορρόφησης, πιθανώς απαιτεί δέσμευση των ιντεγκρινών σε πρωτεΐνες στην επιφάνεια του επιμεταλλωμένου οστού που είτε είναι ήδη παρούσες είτε εκκρίνονται από τους οστεοκλάστες. Η διάρκεια ζωής των οστεοκλαστών πιθανώς περιορίζεται μέσω προγραμματισμένου θανάτου (απόπτωση). Οιστρογόνα και TGF- $\beta$  θεωρείται ότι μειώνουν την οστική απορρόφηση διεγείροντας την απόπτωση.

Οι οστεοκλάστες είναι μεγάλα, πολυπύρρηνα κύτταρα που απορροφούν οστό διαλύοντας το μέταλλο και αποδομώντας τη θεμέλια ουσία. Οι ενεργοί οστεοκλάστες συνήθως έχουν 2 -5 πυρήνες, αλλά μπορεί να έχουν περισσότερους (ως 100). Έχουν άφθονο κυτταρόπλασμα, πολλαπλά συστήματα Golgi, και πολλά

μιτοχόνδρια. Οι ενεργοί οστεοκλάστες την ώρα της οστικής απορρόφησης είναι στερεά προσκολλημένοι στο οστό με μια μεμβρανική ζώνη που είναι σχετικά κενή από υποκυτταρικά σωματίδια. Ονομάζεται «καθαρή» ζώνη (the "clear" zone), αν και πιο δόκιμος όρος είναι ζώνη στεγανοποίησης (the "sealing" zone). Η ζώνη στεγανοποίησης περιβάλλει μια περιοχή μεταξύ της έντονα κροσσωτής μεμβράνης του οστεοκλάστη, που ονομάζεται «πτυχωτό όριο» ("ruffled border"), και της οστικής επιφάνειας. Στην περιοχή αυτή διενεργείται η απορρόφηση. Το κυτταρόπλασμα των κροσσών του οστεοκλάστη είναι πλούσιο σε ακτίνη. Εντός της στεγανοποιημένης περιοχής από τους κροσσούς του οστεοκλάστη εκκρίνονται οστεολυτικά ένζυμα (λυσosomal ένζυμα, κολλαγενάση, όξινη ΑΦ, υδρολάσες) και ιόντα H<sup>+</sup>. Η οξινόπιση του περιβάλλοντος ευνοεί τη δράση των οστεολυτικών ενζύμων.

Οι οστεοκλάστες συχνά συναντώνται σε ομάδες, είτε στην επιφάνεια όπου σχηματίζουν τα βοθρία του Howship, είτε μέσα στο φλοιώδες οστό διανοίγοντας κανάλι ώστε να δημιουργηθούν οι αυλοί του Havers. Η διάρκεια ζωής του οστεοκλάστη είναι 3-4 εβδομάδες. Οι οστεοκλάστες χάνουν πυρήνες με τη διαδικασία της απόπτωσης καθώς γίνονται ανενεργοί.

**Οστεοκύτταρα.** Πρόκειται για ώριμους οστεοβλάστες που αφού συνθέσουν θεμέλια ουσία, ενταφιάζονται εντός της και μετατρέπονται σε οστεοκύτταρα. Οι οστεοβλάστες και τα οστεοκύτταρα συνδέονται μεταξύ τους με πολλές κυτταρικές προσεκβολές που βρίσκονται μέσα σε σωληνίσκους εντός του οστού. Αυτό το συγκύτιο των διασυνδεδεμένων κυττάρων είναι πιθανώς καθοριστικό για την αντίληψη των μηχανικών φορτίσεων.

Η φόρτιση του σκελετού έχει ως αποτέλεσμα την άσκηση μηχανικής πίεσης (stress) κατά μήκος των σωληνίσκων και γύρω από τα βοθρία στα οποία τα οστεοκύτταρα έχουν ενταφιαστεί. Η μηχανική πίεση πιστεύεται ότι διεγείρει την παραγωγή νιτρικού οξειδίου και προσταγλανδινών, τα οποία μπορεί να διαμεσολαβούν την απάντηση στη μηχανική φόρτιση<sup>16</sup>. Προσφάτως έχει διαπιστωθεί ότι τα οστεοκύτταρα παράγουν τονικά την σκληροστίνη, μια πρωτεΐνη που αναστέλλει τον οστικό σχηματισμό. Πίεση και καταστροφή των οστεοκυττάρων συνεπεία μηχανικών φορτίσεων, οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή σκληροστίνης και ενεργοποίηση της διαδικασίας οστικής ανακατασκευής, ώστε να επιδιορθωθεί η βλάβη<sup>17</sup>.

Το οστό υποδιαιρείται σε εκατομμύρια μικροσκοπικές βασικές δομικές μονάδες (Basic Structural Units – BSU). Η BSU αποτελεί τη στοιχειώδη ανατομική μονάδα του οστού. Στο φλοιώδες οστό συμπίπτει με τον οστεώνα του συστήματος Havers, που αποτελείται από ένα κεντρικό σωλήνα (το σωλήνα του Volkmann) και γύρω του ομόκεντρα διατεταγμένα πετάλια επιμεταλλωμένης θεμέλιας ουσίας. Στο σπογγώδες οστό, η BSU αναλογεί σε μια οστεοδοκίδα ή τμήμα αυτής. Η BSU, όταν ενεργοποιείται ονομάζεται βασική λειτουργική μονάδα (Basic Metabolic Unit – BMU). Κάθε τέτοια μονάδα περιέχει μια ομάδα κυττάρων – οστεοβλαστών, οστεοκλαστών και άλλων – που συνεργάζονται ώστε να ολοκληρώσουν ένα κύκλο οστικής ανακατασκευής. Σε κάθε κύκλο διακρίνονται πέντε φάσεις (Σχήμα 1):



**Φάση ηρεμίας.** Η BMU ταυτίζεται με τη BSU. Η ελεύθερη επιφάνεια της μονάδας καλύπτεται από αποπλατυσμένα καλυπτήρια (επενδυματικά) κύτταρα, τα οποία είναι μεταβολικά ανενεργά.

**Φάση ενεργοποίησης.** Αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα και προ-οστεοκλάστες διεγείρονται από κυτταροκίνες που παράγουν οι οστεοβλάστες κι άλλα κύτταρα, συντήκονται σε πολυπύρηνια γιγαντοκύτταρα, τους ώριμους οστεοκλάστες και προσελκύονται στην επιφάνεια της BMU. Η φάση αυτή και στους δύο τύπους οστού διαρκεί μόνο λίγες ημέρες, περίπου 5-7.

**Φάση οστικής απορρόφησης.** Οι επιστρατευμένοι στην οστική επιφάνεια οστεοκλάστες απορροφούν προοδευτικά την επιμεταλλωμένη θεμέλια ουσία, αδειάζοντας το περιεχόμενο της BMU. Στο φλοιώδες οστό δημιουργείται ένα κωνικό μέτωπο μέσα στο συμπαγές σύστημα Havers, σαν τούνελ. Στο σπογγώδες δημιουργείται ένα βοθρίο στην επιφάνεια της οστεοδοκίδας (βοθρίο του Howship). Η φάση αυτή διαρκεί 3-4 εβδομάδες στο σπογγώδες οστό και 6-10 εβδομάδες στο φλοιώδες.

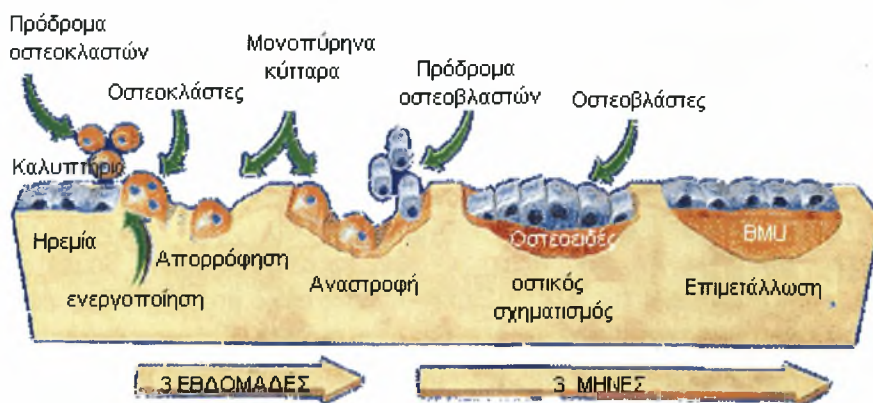
**Φάση κυτταρικής αναστροφής.** Οι οστεοκλάστες αποκολλώνται και απομακρύνονται από τον πυθμένα της BMU και τη θέση τους παίρνουν ώριμοι οστεοβλάστες. Η πιθανότερη εξήγηση για το φαινόμενο της αναστροφής είναι ότι, κατά τη φάση της αποδόμησης του οστού από τους οστεοκλάστες, απελευθερώνονται οι αποθηκευμένοι εκεί αυξητικοί παράγοντες (IGF-1, TGF- $\beta$ ). Οι παράγοντες αυτοί διεγείρουν τη διαφοροποίηση των αρχέγονων μεσεγγυματικών κυττάρων σε προ-οστεοβλάστες και οστεοβλάστες. Η φάση αυτή διαρκεί μόνο λίγες ημέρες (7 στο φλοιώδες και 5 στο σπογγώδες οστό).

**Φάση οστικού σχηματισμού.** Οι οστεοβλάστες, που έχουν συσσωρευθεί στον πυθμένα της κοιλότητας που δημιούργησαν οι οστεοκλάστες, εναποθέτουν προοδευτικά οστεοειδές σε ποσότητα ίση με αυτή που απορροφήθηκε. Στο φλοιώδες οστό, τα σχηματιζόμενα πετάλια διαμορφώνονται ομόκεντρα γύρω από κεντρικό αγγείο που αναπτύσσεται μέσα στον κώνο, ενώ στο σπογγώδες καλύπτεται πλήρως το βοθρίο. Πολλοί διακρίνουν τη φάση αυτή σε δύο υποφάσεις: την αρχική φάση, κατά την οποία παράγεται το οστεοειδές και την αψότερη, κατά την οποία το οστεοειδές επιμεταλλώνεται. Η φάση αυτή διαρκεί 2-3 μήνες στο σπογγώδες οστό και 6 μήνες στο φλοιώδες.

Μετά το πέρας της φάσης οστικού σχηματισμού η BMU αδρανοποιείται, επιστρώνεται πάλι από καλυπτήρια κύτταρα και παραμένει ως BSU.

Για να διατηρείται η οστική μάζα σταθερή είναι απαραίτητο να υπάρχει μια αρμονική συνεργασία μεταξύ οστεοβλαστών και οστεοκλαστών, μια ισορροπία μεταξύ απορρόφησης και σχηματισμού. Η συνεργασία αυτή ονομάζεται φαινόμενο σύζευξης και αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για να ολοκληρωθεί σωστά ο κύκλος οστικής ανακατασκευής. Η διατάραξη αυτής της συνεργασίας ονομάζεται αποσύζευξη και οδηγεί σε ελαττωματική ανακατασκευή και απώλεια οστού<sup>11</sup>.

# ΟΣΤΙΚΗ ΑΝΑΚΑΤΑΣΚΕΥΗ



**Σχήμα 1. Σχηματική απεικόνιση του κύκλου οστικής ανακατασκευής.** Η αρχική φάση ηρεμίας ακολουθείται από τη φάση της ενεργοποίησης όπου πρόδρομοι οστεοκλάστες, δεχόμενοι ερεθίσματα, μέσω κυτταροκινών, από τους οστεοβλάστες και άλλα κύτταρα ωριμάζουν, ενεργοποιούνται και προσκολλώνται στην επιφάνεια του οστού. Στη συνέχεια έρχεται η φάση της οστικής απορρόφησης που οδηγεί σε δημιουργία μιας κοιλότητας στην οστική επιφάνεια και κατόπιν η φάση της αναστροφής, όπου οι οστεοκλάστες αδρανοποιούνται ενώ οι προ-οστεοβλάστες διαφοροποιούνται σε ώριμους οστεοβλάστες και αναλαμβάνουν δράση. Ακολουθεί η φάση του οστικού σχηματισμού, κατά την οποία η δράση των οστεοβλαστών οδηγεί στην πλήρωση της κοιλότητας με νέο οστό και την επιμετάλλωσή του. Κατόπιν το οστό επανέρχεται στη φάση ηρεμίας, ολοκληρώνοντας τον κύκλο της ανακατασκευής. Ο χρόνος που απαιτείται για να σχηματίσουν οι οστεοβλάστες νέο οστό είναι πολύ μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο που χρειάζονται οι οστεοκλάστες για να το απορροφήσουν.

## 2.2. Φυσιολογία οστικού σχηματισμού–απορρόφησης

### 2.2.1. Οστικός σχηματισμός

Η οστεοσύνθεση αρχίζει με τους οστεοβλάστες, οι οποίοι συνθέτουν κολλαγόνο τύπου 1 και άλλες πρωτεΐνες, όπως η οστεοκαλσίνη, που συμπλέκονται εξωκυτταρίως για να σχηματίσουν το οστεοειδές που αποτελεί το οργανικό υπόστρωμα πάνω στο οποίο γίνεται η εναπόθεση αλάτων (επιμετάλλωση)<sup>18</sup>. Οι οστεοβλάστες περιέχουν αλκαλική φωσφατάση (ΑΦ) προσδεμένη στις κυτταρικές τους μεμβράνες. Αυτή η ΑΦ είναι λειτουργικά παραπλήσια αλλά αντιγονικά διακριτή από την ηπατική και πλακουντική ΑΦ<sup>19</sup>.

Το κολλαγόνο τύπου 1 αποτελεί την κύρια δομική πρωτεΐνη των οστών. Σχηματίζεται από τον συνδυασμό α-1 και α-2 αλυσίδων οι οποίες συντίθενται στους οστεοβλάστες.

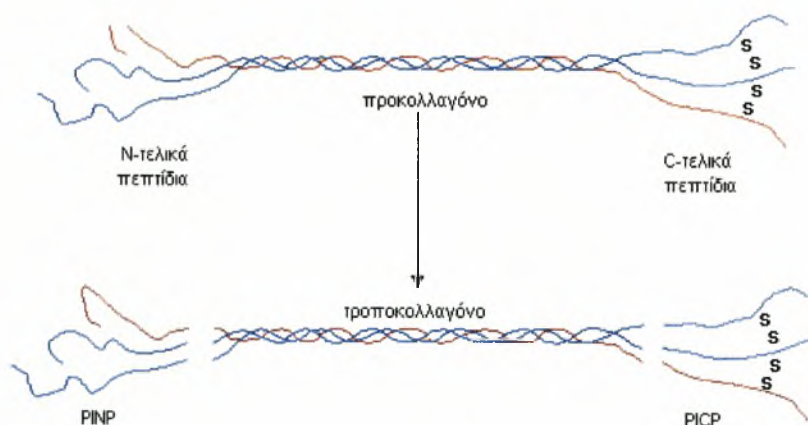
Μετά τη σύνθεση, πολλά από τα αμινοξέα προλίνης και λυσίνης στις αλυσίδες κολλαγόνου υδροξυλιώνονται σε υδροξυπρολίνη και υδροξυλυσίνη, αντίστοιχα. Ακολουθεί διαπλοκή μιας α-2 με δύο α-1 αλυσίδες, με αποτέλεσμα το σχηματισμό



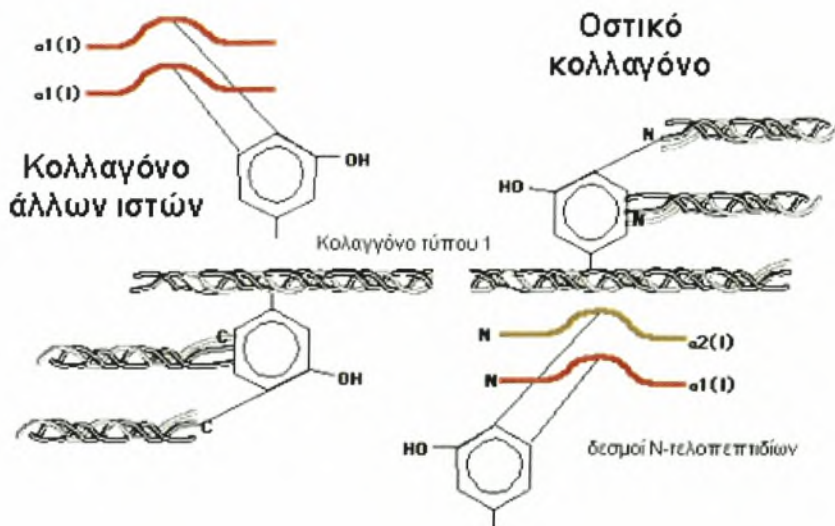
μιας ελικοειδούς κατασκευής γνωστής ως προκολλαγόνο, από το οποίο αποκόπτονται τα αμινοτελικά (PINP) και καρβοξυτελικά (PICP) άκρα των πεπτιδικών αλυσίδων του, οπότε προκύπτει το μόριο του τροποκολλαγόνου το οποίο διατηρεί την ελικοειδή δομή (Σχήμα 2). Τα μη ελικοειδή τμήματα στα αμινο- και καρβοξυτελικά άκρα είναι γνωστά ως περιοχές του N-τελοπεπτιδίου και C-τελοπεπτιδίου αντίστοιχα.

Τα μόρια του τροποκολλαγόνου ευθυγραμμίζονται το ένα δίπλα στο άλλο για να σχηματίσουν ένα ινίδιο κολλαγόνου. Τελικά, οι πλευρικές αλυσίδες τριών αμινοξέων υδροξυλυσίνης, από διαφορετικά μόρια τροποκολλαγόνου, συμπλέκονται για να δημιουργήσουν ένα δακτύλιο πυριδινίου, σχηματίζοντας μ' αυτό τον τρόπο τους δεσμούς (crosslinks) πυριδινολίνης (PYD) που συνδέουν τρία διαφορετικά μόρια τροποκολλαγόνου<sup>20</sup>. Οι δεσμοί δεοξυπυριδινολίνης (DPD) είναι μια παραλλαγή των δεσμών πυριδινολίνης. Σχηματίζονται όταν δύο αλυσίδες υδροξυλυσίνης συμπλέκονται με μια αλυσίδα λυσίνης<sup>21</sup>. Στα οστά του ανθρώπου η αναλογία PYD / DPD είναι 2:3. Δεσμοί πυριδινολίνης σχηματίζονται και σε άλλους τύπους κολλαγόνου, με εξαίρεση το κολλαγόνο του δέρματος<sup>21,22</sup>.

Υπάρχουν τρεις τύποι δεσμών πυριδινολίνης που είναι χαρακτηριστικοί του οστικού κολλαγόνου. Ένας είναι ο DPD, που συναντάται σε μεγάλες ποσότητες μόνο στο οστό και την οδοντίνη<sup>21-23</sup>. Ο δεύτερος είναι ο δεσμός πυριδινολίνης στην περιοχή του N-τελοπεπτιδίου (NTX) που συνδέει τις α-1 αλυσύς με τις α-2 αλυσύς σε αντίθεση με άλλους ιστούς όπου συνδέονται α-1 αλυσίδες (Σχήμα 3)<sup>24</sup>. Ο τρίτος, ειδικός για το οστό, επίτοπος (τοποθεσία) είναι ένα κλάσμα του α-1 πεπτιδίου με έναν ισομερισμένο δεσμό μεταξύ του ασπαρτικού και της γλυκίνης.



**Σχήμα 2. Σύνθεση τροποκολλαγόνου.** Το 1<sup>ο</sup> βήμα στη σύνθεση του κολλαγόνου τύπου 1 είναι η παραγωγή των πολυπεπτιδίων α-1 και α-2. Αφού πολλές προλίνες και λυσίνες στις αλυσίδες του κολλαγόνου υδροξυλιωθούν σε υδροξυπρολίνη και υδροξυλυσίνη, ένα α-2 (κόκκινο χρώμα) και δύο α-1 (μπλε χρώμα) πολυπεπτιδία περιελίσσονται μεταξύ τους, ώστε να σχηματίσουν μια ελικοειδή δομή γνωστή ως προκολλαγόνο(επάνω). Στη συνέχεια, τα αμινο- και καρβοξυ- τελικά των αλυσίδων του προκολλαγόνου αποκόπτονται οδηγώντας στο σχηματισμό του τροποκολλαγόνου (κάτω).



**Σχήμα 3.** Δεσμοί N-τελοπεπτιδίων στο οστικό κολλαγόνο. Ένας τύπος δεσμού πυριδινολίνης που είναι ειδικός για το οστικό κολλαγόνο είναι ο δεσμός στην αμινοτελική περιοχή του πεπτιδίου (NTX). Αυτοί οι δεσμοί, στο οστικό κολλαγόνο, ενώνουν  $\alpha$ -1 με  $\alpha$ -2 μόρια (κάτω δεξιά, καφέ και κόκκινο αντίστοιχα) Αντίθετα σε άλλους ιστούς, συναντώνται κυρίως δεσμοί μεταξύ  $\alpha$ -1 και  $\alpha$ -1 μορίων (άνω αριστερά).

### 2.2.2. Οστική απορρόφηση

Όπως προαναφέρθηκε, η οστική απορρόφηση προκαλείται από τους οστεοκλάστες, που προέρχονται από αρχέγονα κύτταρα του αιμοποιητικού και έχουν όξινη φωσφατάση προσδεμένη στις κυτταρικές τους μεμβράνες. Δραστηκότητα όξινης φωσφατάσης συναντάται και σε άλλους ιστούς, όπως στον προστατικό αδένα, αλλά στην περίπτωση των οστεοκλαστών χαρακτηρίζεται από την αντίσταση της στο ταρτρικό οξύ (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP).

Οι οστεοκλάστες προσκολλώνται στην οστική επιφάνεια και εκκρίνουν οξύ και υδρολυτικά ένζυμα (κυρίως καθεψίνη K και λυσιλ-υδροξυλάση) που απορροφούν το υποκείμενο οστό, απελευθερώνοντας μέταλλα και τμήματα του κολλαγόνου. Ένα μέρος από το κολλαγόνο αποδομείται πλήρως στις μικρότερες χημικές μονάδες του, με αποτέλεσμα την αποκοπή υπολειμμάτων ελεύθερης πυριδινολίνης (PYD) και δεοξυπυριδινολίνης (DPD) που απεκκρίνονται στα ούρα. Ένα άλλο μέρος του οστικού κολλαγόνου αποδομείται ατελώς με αποτέλεσμα την αποκοπή δεσμών πυριδινολίνης συνδεδεμένων με κλάσματα των αμινοτελικών άκρων (NTX) των  $\alpha$ -1 και  $\alpha$ -2 αλυσίδων, που επίσης απεκκρίνονται στα ούρα<sup>24-26</sup>.

Η οστική απορρόφηση που προκαλείται από την παραθορμόνη, οφείλεται αποκλειστικά στην προκαλούμενη από τους οστεοκλάστες αποδόμηση (cleavage) του οστικού κολλαγόνου, με τη δράση της κολλαγενάσης. Σε επίμυες με μετάλλαξη του κολλαγόνου τύπου 1 που το καθιστά ανθεκτικό στις δράσεις της κολλαγενάσης, η PTH προκαλεί εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα οστικής απορρόφησης<sup>27</sup>.

### 2.2.3. Μεταβολικοί δείκτες οστικής ανακατασκευής

Τα μεταβολικά προϊόντα που προκύπτουν κατά τη διαδικασία του οστικού σχηματισμού και απορρόφησης, που περιγράφηκαν προηγουμένως, μπορούν να χρησιμεύσουν ως δείκτες του οστικού μεταβολισμού (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Βιοχημικοί δείκτες οστικού μεταβολισμού.

Δείκτες οστικού σχηματισμού	Δείκτες οστικής απορρόφησης
Οστικό κλάσμα ΑΦ ορού	Ca/Κρεατινίνη ούρων 24ώρου
Οστεοκαλσίνη ορού (bone Gla-protein)	Υδροξυπρολίνη ούρων
Καρβοξυτελικό προπεπτίδιο του κολλαγόνου τύπου 1 (PICP) στον ορό	Όξινη φωσφατάση ανθεκτική στο τρυγικό οξύ (TRAP) ορού
Αμινοτελικό προπεπτίδιο του κολλαγόνου τύπου 1 (PINP) στον ορό	PYD-crosslinks ούρων DPD-crosslinks ούρων NTX-crosslinks ορού-ούρων CTX-crosslinks ορού-ούρων C-crosslinks ορού (ICTP)

Τα επίπεδα στο αίμα της οστικής ΑΦ, της οστεοκαλσίνης και του καρβοξυτελικού και αμινοτελικού προπεπτιδίου του προκολλαγόνου τύπου I (PICP και PINP, αντίστοιχα), αντικατοπτρίζουν το ρυθμό οστικής σύνθεσης:

- η οστική ΑΦ αντανακλά την κυτταρική δραστηριότητα των οστεοβλαστών<sup>28</sup>.
- η οστεοκαλσίνη αντανακλά το ρυθμό σύνθεσης οστεοκαλσίνης από τους οστεοβλάστες.
- το καρβοξυτελικό ή το αμινοτελικό προπεπτίδιο του προκολλαγόνου τύπου I αντανακλά μεταβολές στη σύνθεση νέου κολλαγόνου.

Αντίστοιχα, τα επίπεδα στο αίμα στις όξινης φωσφατάσης και στα ούρα του ασβεστίου, της υδροξυπρολίνης και των δεσμών κολλαγόνου (crosslinks) υποδηλώνουν το βαθμό οστικής απορρόφησης. Ειδικότερα:

- η συγκέντρωση της οστικής όξινης φωσφατάσης στον ορό αντανακλά τη δραστηριότητα των οστεοκλαστών.
- η απέκκριση του ασβεστίου στα ούρα παρέχει μια εκτίμηση του ρυθμού αποδόμησης του οστού, αλλά εξαρτάται και από το νεφρικό κατώφλι (threshold) για το ασβέστιο (που καθορίζεται εν μέρει από την παραθορμόνη).
- η απέκκριση υδροξυπρολίνης στα ούρα αντανακλά την αποδόμηση του κολλαγόνου στο οστό, αλλά επηρεάζεται και από την αποδόμηση του κολλαγόνου σε άλλες θέσεις (χόνδρο, δέρμα) και τη διαιτητική πρόσληψη κολλαγόνου<sup>29</sup>.
- η απέκκριση δεσμών κολλαγόνου στα ούρα αντανακλά την οστική απορρόφηση χωρίς να επηρεάζεται από τη διαιτητική πρόσληψη κολλαγόνου. Συνεπώς, αυτές

οι ουσίες είναι καλύτεροι δείκτες οστικής απορρόφησης από το ασβέστιο και την υδροξυπρολίνη ούρων. Επιπρόσθετα, η δεοξυπυριδινολίνη (DPD), οι N-τελοπεπτιδικοί δεσμοί πυριδινολίνης που συνδέουν α-1 με α-2 πολυπεπτίδιο (NTX), και ο C-τελοπεπτιδικός δεσμός με μια ισομερή σύνδεση μεταξύ ασπαρτικού και γλυκίνης (CTX) αποτελούν ειδικούς δείκτες οστικής απορρόφησης γιατί προέρχονται σχεδόν αποκλειστικά από τον καταβολισμό του οστικού κολλαγόνου.

#### **2.2.4. Αμινοτελικό προπεπτίδιο κολλαγόνου τύπου 1 (PINP)**

Τα επίπεδα του PINP στον ορό καθορίζονται κυρίως από το μεταβολισμό του προκολλαγόνου κατά το σχηματισμό της οργανικής θεμέλιας ουσίας των οστών, χωρίς να συμβάλλουν σ' αυτά το δέρμα και οι άλλοι συνδετικοί ιστοί<sup>30</sup>.

Το κυκλοφορούν PINP υπάρχει σε μια τριμερή και μια μονομερή μορφή. Η τριμερής μορφή είναι θερμικά ασταθής και στους 37°C μετατρέπεται στη σταθερή μονομερή μορφή<sup>31</sup>. Τα αντι-PINP αντισώματα, που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό του PINP με μεθόδους RIA και ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay), αναγνωρίζουν και τις δύο μορφές. Ωστόσο, μόνο η τεχνική ELISA μετρά επαρκώς τη μονομερή PINP μορφή<sup>32</sup>.

Τα επίπεδα του PINP στον ορό αντικατοπτρίζουν κυρίως το ρυθμό σύνθεσης νέου κολλαγόνου από τους οστεοβλάστες και τους ινοβλάστες<sup>33</sup> και σε πολύ μικρό βαθμό το ρυθμό οστικής αποδόμησης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ένα μέρος του PINP που ενσωματώνεται στο οστό, ως μη διαλυτή υδροξυπρολίνη, απελευθερώνεται κατά τη διαδικασία αποδόμησης του οστού. Πάντως, τα επίπεδα στον ορό του PINP φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητος δείκτης από τα επίπεδα του PICP για τη σύνθεση του οστικού κολλαγόνου<sup>34</sup>.

Τα επίπεδα του PINP στον ορό αυξάνονται με την ηλικία και στα δύο φύλα και στους ηλικιωμένους σχετίζονται με το βαθμό σωματικής δραστηριότητας<sup>35</sup>. Η σίτιση ή η κirkάδια διακύμανση δεν επηρεάζουν, πρακτικά, τη μέτρηση του στον ορό<sup>36</sup>.

Ο προσδιορισμός των επιπέδων του PINP μπορεί να γίνει με ανταγωνιστική RIA<sup>37</sup>, με ηλεκτροανοσολογική μέθοδο<sup>38</sup> και με ELISA<sup>39</sup>, με τη χρήση ειδικών πολυκλωνικών αντι-PINP αντισωμάτων. Με τις δύο τελευταίες μεθόδους ανιχνεύονται και οι δύο μοριακές μορφές του PINP, ενώ με την RIA τα ίδια αντισώματα ανιχνεύουν μόνο την υψηλού μοριακού βάρους τριμερή μορφή<sup>32</sup>.

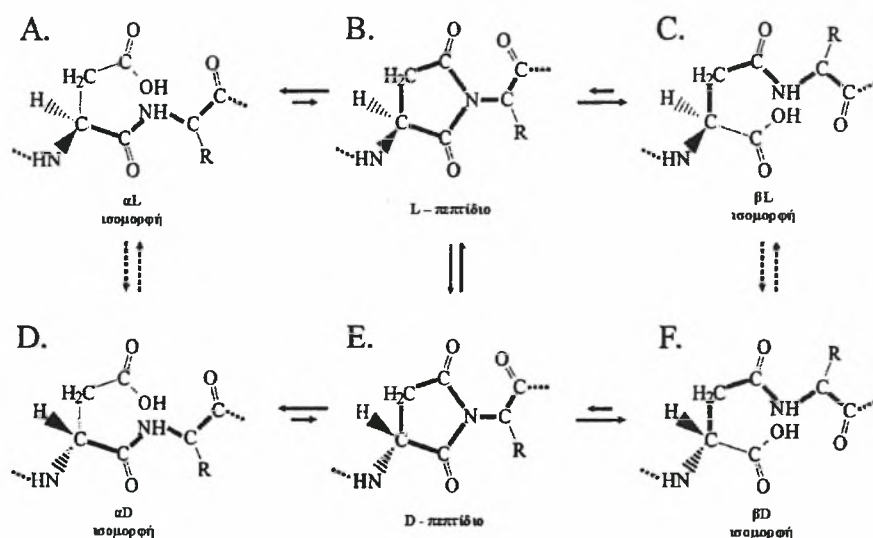
#### **2.2.5. Καρβοξυ-τελοπεπτιδικός δεσμός κολλαγόνου (CTX)**

Μπορεί να προσδιοριστεί, με ανοσολογικές μεθόδους, στον ορό και τα ούρα. Αρχικά προσδιορίστηκε στα ούρα<sup>40</sup> αλλά στη συνέχεια, κάποιιο περιορισμοί αυτής της μεθόδου, μεταξύ των οποίων η μεγάλη νυχθημερινή διακύμανση, η ανάγκη διόρθωσης της απέκκρισης της προς την απέκκριση κρεατινίνης, η δυσκολία της ακριβούς συλλογής των ούρων και η αδυναμία ποσοτικού προσδιορισμού του CTX



σε πολύ αραιά ούρα, ώθησαν στην ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού του CTX στον ορό <sup>41</sup>. Με μέθοδο ELISA διπλού αντισώματος «σάντουιτς» προσδιορίζεται ένα κλάσμα οκτώ αμινοξέων του C-τελοπεπτιδίου <sup>42</sup>.

Υπάρχουν διάφορες ισομερείς μορφές του δεσμού ασπαρτικού-γλυκίνης που εντοπίζεται στο α-1 τελοπεπτιδίο (CTX)<sup>43</sup>. Η αL μορφή είναι η φυσική και αντιπροσωπεύει το νεοσχηματισθέν οστό, ενώ τρεις άλλες ισομορφές, οι βL, βD και αD αυξάνονται αναλογικά καθώς το οστό παλιώνει (Σχήμα 4). Δηλαδή, ο β-ισομερισμός του δεσμού αυτού είναι μια ηλικιοεξαρτώμενη διαδικασία, που δυνητικά θα μπορούσε να επιτρέψει τη μέτρηση κλασμάτων από κολλαγόνο με διαφορετικούς ρυθμούς μεταβολισμού <sup>44</sup>. Η αύξηση του λόγου της φυσικής προς τις ηλικιοεξαρτώμενες ισομορφές του CTX στα ούρα έχει σχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο κατάγματος, ανεξάρτητα από την οστική πυκνότητα <sup>45</sup>. Η μέθοδος Crosslaps μετρά στον ορό μόνο τη β-ισομερή μορφή του CTX, ενώ η μέθοδος στα ούρα προσδιορίζει την α- και β-ισομερή μορφή. Έτσι, η μέθοδος CTX στον ορό είναι πιο ειδική για το ώριμο οστό. Έχει αναφερθεί ότι το CTX ορού μπορεί να διακρίνει το ρυθμό οστικού μεταβολισμού μεταξύ νεαρών γυναικών διαφόρων ηλικιακών ομάδων, ενώ το CTX των ούρων όχι <sup>46</sup>. Επίσης, βρέθηκε ότι το CTX του ορού είναι πιο ειδικό και σε κάποιους άλλους υποπληθυσμούς <sup>47</sup>. Υπάρχουν πάντως μελέτες που βρήκαν τα επίπεδα CTX ορού και ούρων εξίσου αξιόπιστα ως δείκτες οστικής απορρόφησης <sup>48</sup>.



**Σχήμα 4. Ισομερείς μορφές του δεσμού ασπαρτικού-γλυκίνης που εντοπίζεται στο α-1 τελοπεπτιδίο (CTX).**

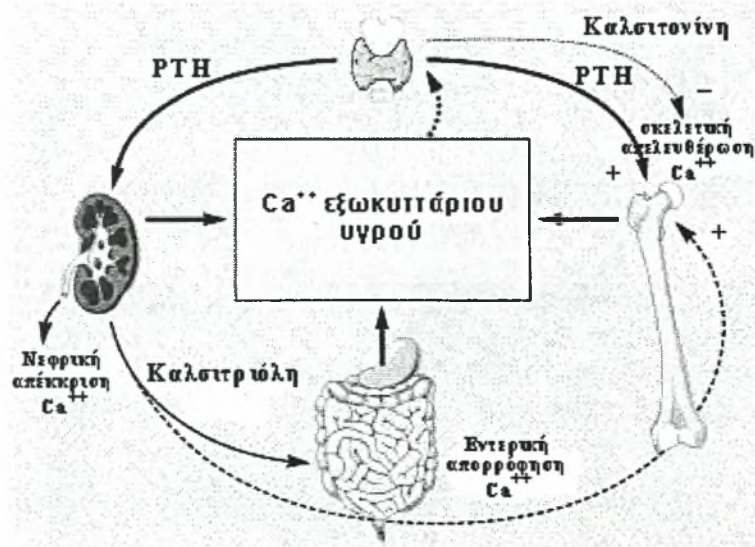
Τα επίπεδα του CTX στον ορό εμφανίζουν μεγάλη νυκθημερινή διακύμανση, με την κορύφωση να παρατηρείται τις πρώτες πρωινές ώρες (2-6π.μ.) και τις χαμηλότερες τιμές μεταξύ 12π.μ.-3μ.μ. <sup>49</sup>. Η μέγιστη και η ελάχιστη τιμή μπορεί να απέχουν ± 60% από τον μέσο όρο του 24ωρου. Ο κirkάδιος ρυθμός αμβλύνεται πολύ κατά τη νηστεία, με αποκλίσεις όχι μεγαλύτερες από 10% της μέσης τιμής αν και άλλες μελέτες δεν επιβεβαίωσαν το ανωτέρω <sup>36</sup>. Για την αποφυγή των προλεχθεισών επιδράσεων συνιστάται το δείγμα για τον προσδιορισμό του CTX

ορού να προέρχεται από πρωινή αιμοληψία μετά από ολονύκτια νηστεία, ενώ για το CTX ούρων από τη δεύτερη πρωινή ούρηση μετά από ολονύκτια νηστεία<sup>49</sup>. Το CTX στον ορό παραμένει σταθερό στους 4°C για μια ημέρα και για επτά ημέρες σε πλάσμα με EDTA. Για μακρόχρονη αποθήκευση (άνω των τριών μηνών) συνιστάται φύλαξη στους -70°C. Η συγκέντρωση του CTX μετά την απόψυξη είναι συγκρίσιμη μεταξύ ορού και πλάσματος (ηπαρινισμένου ή με EDTA). Η διακύμανση των τιμών στην ίδια μέτρηση (intra-assay CV) είναι 2-4% και μεταξύ δύο διαδοχικών μετρήσεων (inter-assay CV) 3-10%.

Τα επίπεδα ορού του CTX αυξάνονται με την ηλικία και στα δύο φύλα<sup>35</sup>, αλλά η μακροχρόνια διακύμανση τους είναι μικρότερη από εκείνη του CTX ούρων<sup>50</sup>. Αποβάλλεται από τους νεφρούς και επομένως τα επίπεδα του αναμένονται αυξημένα σε νεφρική ανεπάρκεια. Ωστόσο, αυτό δεν φαίνεται να περιορίζει την κλινική τους χρησιμότητα σε νεφροπαθείς ασθενείς<sup>51,52</sup>.

### 2.3. Ο ρόλος των ορμονών στον οστικό μεταβολισμό

**Ασβεστιοτρόπες ορμόνες.** Η παραθορμόνη και η βιταμίνη D παρεμβαίνουν καθοριστικά στην ρύθμιση της ομοιόστασης του ασβεστίου και του οστικού μεταβολισμού. Η παραθορμόνη τείνει να διατηρήσει φυσιολογικό το ιονισμένο Ca στον ορό αυξάνοντας την οστική απορρόφηση (απελευθέρωση Ca από τα οστά), τη νεφρική επαναρρόφηση Ca και την εντερική απορρόφηση Ca έμμεσα, μέσω αυξημένης σύνθεσης ενεργού D3 (καλσιτριόλης) (Σχήμα 5).



Σχήμα 5. Μηχανισμοί ρύθμισης της ομοιοστασίας του Ca.

Η αύξηση του Ca ορού προκαλεί αύξηση της έκκρισης της καλσιτονίνης, ενώ η μείωση του επιφέρει το αντίθετο αποτέλεσμα. Η καλσιτονίνη αναστέλλει τη λειτουργία των οστεοκλαστών και την οστική απορρόφηση.

**Οιστρογόνα.** Η ανεπάρκεια οιστρογόνων οδηγεί σε αυξημένη απορρόφηση και ταχεία απώλεια οστού<sup>53</sup>. Ο μηχανισμός με τον οποίο συμβαίνει αυτό δεν είναι

πλήρως αποσαφηνισμένος. Άμεσες επιδράσεις στη λειτουργία των οστεοκλαστών και αλλαγές στην έκκριση συγκεκριμένων κυτταροκινών φαίνεται να συμβάλλουν. Ο ρυθμός της οστικής απώλειας επιβραδύνεται σταδιακά αν και αρκετά χρόνια μετά την εμμηνόπαυση η οστική απώλεια σχετίζεται με σχετικά υψηλά επίπεδα δεικτών οστικής απορρόφησης σε πολλές γυναίκες. Η ανεπάρκεια οιστρογόνων μπορεί επίσης να παίζει σημαντικό ρόλο και στους άνδρες<sup>54,55</sup>. Φαίνεται ότι τα οιστρογόνα είναι τα κύρια στεροειδή του φύλου που ρυθμίζουν την οστική απορρόφηση, ενώ τόσο τα οιστρογόνα όσο και η τεστοστερόνη είναι σημαντικά για τον οστικό σχηματισμό<sup>56</sup>.

**Ανδρογόνα.** Μελέτες σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες δείχνουν ότι τα χαμηλά επίπεδα των ανδρογόνων ορού συμβάλλουν στην οστική απώλεια που προκαλείται από την ανεπάρκεια οιστρογόνων<sup>57</sup>. Στις γυναίκες, τα ανδρογόνα μπορεί να διεγείρουν άμεσα τον οστικό σχηματισμό,<sup>58</sup> ενώ η αρωματοποίηση τους σε οιστρογόνα ενδεχομένως οδηγεί σε αναστολή της οστικής αποδόμησης.

**Προγεσταγόνα.** Τα οστικά κύτταρα έχουν προγεστερονικούς υποδοχείς, αλλά υπάρχουν λίγα στοιχεία σχετικά με τη θετική επίδραση της προγεστερόνης στο ρυθμό οστικού μεταβολισμού *in vivo*<sup>59</sup>. Επιπλέον, η ιδιότητα της προγεστερόνης να αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών, δυνατόν να συνοδεύεται από αρνητική επίδραση στον οστικό μεταβολισμό.

**Θυρεοειδικές ορμόνες.** Οι θυρεοειδικές ορμόνες αυξάνουν την οστεοκλαστική δραστηριότητα. Έτσι, αυξάνεται η οστική απορρόφηση και λόγω του φαινομένου της σύζευξης συμπαρασύρεται και ο οστικός σχηματισμός.

**Γλυκορτικοειδή.** Φυσιολογικές ποσότητες γλυκοκορτικοειδών δεν επηρεάζουν την οστική μάζα. Αντίθετα η περίσσεια γλυκορτικοειδών συνδέεται με σημαντική οστική απώλεια κυρίως μέσω καταστολής των οστεοβλαστών<sup>60</sup>.

## 2.4. Ο ρόλος των τοπικών κυτοκινών και προσταγλανδινών

Η δομή του σκελετού και η οστική ανακατασκευή ελέγχεται από τοπικούς παράγοντες, πολλοί από τους οποίους παράγονται από τον γειτονικό μυελό ή από τα ίδια τα οστικά κύτταρα. Στους παράγοντες αυτούς περιλαμβάνονται κυτταροκίνες, προστανοειδή και αυξητικοί παράγοντες. Η παραδοχή ότι οι παράγοντες αυτοί παίζουν ρόλο στην παθογένεση της οστεοπόρωσης, υποστηρίζεται από το γεγονός ότι οι συγκεντρώσεις των διαφόρων ορμονών στον ορό λίγο διαφέρουν μεταξύ οστεοπορωτικών ασθενών και συνομίλων υγιών ατόμων του ίδιου φύλου.

Πολλές κυτταροκίνες επηρεάζουν τη λειτουργία των οστικών κυττάρων, όπως φαίνεται στον πίνακα 2. Στην οστεοπόρωση εστιάζουμε κυρίως σε μια αύξηση των κυτταροκινών που διεγείρουν την οστική απορρόφηση, αλλά και σε μείωση των κυτταροκινών που αναστέλλουν την απορρόφηση.

**Πίνακας 2.** Επίδραση των κυτταροκινών στο σκελετό.

Κυτταροκίνη	Οστική απορρόφηση	Οστικός σχηματισμός	Σύνθεση προσταγλανδινών
IL-1	+	-	+
TNF-α	+	-	+
IL-4	-	-	-
IL-6	+	+	+
IL-7	+	?	?
IL-11	+	+	?
IL-13	-	?	-
IL-18	-	?	?
Ανασταλτικός παράγων λευχαιμίας	-	+	+
Ιντερφερόνη - γ	-	-	-

Η **ιντερλευκίνη-1 (IL-1)** και ο **παράγων-α νέκρωσης όγκων (TNF-α)** είναι ισχυροί διεγέρτες της οστικής απορρόφησης και ταυτόχρονα αναστέλλουν τον οστικό σχηματισμό. Η κύρια πηγή παραγωγής τους στο σκελετό είναι πιθανόν τα κύτταρα του μυελού και συγκεκριμένα τα μακροφάγα. IL-1 παράγεται επίσης από τα οστικά κύτταρα <sup>61</sup>.

Η **ιντερλευκίνη-6 (IL-6)** είναι η κύρια κυτταροκίνη που παράγεται από τους οστεοβλάστες. Διεγέρτες της οστικής απορρόφησης, όπως η PTH, η προσταγλανδίνη E<sub>2</sub> και η IL-1 αυξάνουν την παραγωγή IL-6 από τους οστεοβλάστες <sup>62</sup>. Η IL-6 διεγείρει την οστεοκλαστογένεση και την οστική απορρόφηση, κυρίως μέσω ενός προσταγλανδινο-εξαρτώμενου μηχανισμού <sup>63</sup>.

Οι **προσταγλανδίνες (PGs)**, και κυρίως η PGE<sub>2</sub>, είναι ισχυροί ρυθμιστές της λειτουργίας των οστικών κυττάρων <sup>64</sup>. Πολλοί τοπικοί και συστηματικοί παράγοντες που ρυθμίζουν τον οστικό μεταβολισμό επηρεάζουν και τη σύνθεση PGs στο σκελετό (πίνακας 3). Η υπερπαραγωγή PGs μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη οστική απορρόφηση, ενώ ανεπαρκής παραγωγή τους μπορεί να μειώσει την απάντηση του οστικού σχηματισμού τόσο στη μηχανική φόρτιση όσο και στη διαδικασία οστικής ανακατασκευής.

Ένα νέο σύστημα κυτταροκινών, που εμπλέκεται άμεσα στη φυσιολογική λειτουργία του οστικού μεταβολισμού, είναι το σύστημα RANKL – RANK – OPG, το οποίο θα αναλυθεί εκτενέστερα παρακάτω.

## 2.5. Ο ρόλος των τοπικών αυξητικών παραγόντων

Δύο κύριες κατηγορίες αυξητικών παραγόντων, που παράγονται από τα οστικά κύτταρα, θα μπορούσαν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της οστεοπόρωσης. Οι ινσουλινομορφοί αυξητικοί παράγοντες (IGFs) και οι



δεσμευτικές τους πρωτεΐνες φαίνεται ότι είναι οι σημαντικότεροι για τη διατήρηση της διαφοροποίησης και λειτουργίας των οστεοβλαστών<sup>65</sup>. Η οικογένεια του παράγοντα-β μεταμόρφωσης των όγκων (TGF-β) / οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών (BMPs) περιλαμβάνει ισχυρά μιτογόνα των πρόδρομων μορφών των οστικών κυττάρων, αλλά μερικά μέλη της οικογένειας είναι πιο σημαντικά κατά την εμβρυϊκή διαφοροποίηση<sup>66</sup>.

**Ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγων 1 (IGF-1).** Η μείωση με την ηλικία της συγκέντρωσης του στον ορό παραλληλίζεται με τη μείωση της περιεκτικότητας στο σκελετό τόσο του IGF-1 όσο και του IGF-2<sup>67</sup>. Οι IGFs πιθανώς ενέχονται στην παθογένεση της ιδιοπαθούς οστεοπόρωσης χαμηλού ρυθμού οστικού μεταβολισμού (low-turnover) που παρατηρείται σε άνδρες και προεμμηνόπαυσιακές γυναίκες<sup>68</sup>.

Ο TGF-β αναστέλλει την οστική απορρόφηση και μπορεί να παίζει ρόλο ως παράγων σύζευξης. Πιθανώς εκκρίνεται από τα οστικά κύτταρα κατά την οστική απορρόφηση, μειώνοντας τη δραστηριότητα των οστεοκλαστών μέσω επιτάχυνσης της απόπτωσης τους<sup>69</sup>, ενώ στη συνέχεια αρχίζει τον οστικό σχηματισμό διεγείροντας τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των πρόδρομων οστεοβλαστών.

## 2.6. Σύστημα RANKL – RANK – OPG

### 2.6.1. Εισαγωγή

Η προέλευση των οστεοκλαστών από πρόδρομα κύτταρα της σειράς των μακροφάγων/μονοκυττάρων γίνεται με μια αλληλουχία γεγονότων που περιλαμβάνουν πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση, σύντηξη, ώστε να σχηματιστούν πολυπύρηντοι ώριμοι οστεοκλάστες και ενεργοποίηση. Αυτή η διαδικασία ελέγχεται σε κάθε βήμα από ορμόνες και τοπικές κυτοκίνες. Ιντερλευκίνες (IL-1, IL-4, IL-6, IL-7, IL-11, IL-17), ο TNF-α, ο TGF-β, η προσταγλανδίνη E<sub>2</sub> και ορμόνες της συστηματικής κυκλοφορίας συνεργάζονται στον έλεγχο των οστεοκλαστών<sup>70</sup>.

Η πρόσφατη ανακάλυψη του συνδέτη (ligand) του υποδοχέα ενεργοποίησης του πυρηνικού παράγοντα κB (RANKL)<sup>71</sup>, μιας κυτοκίνης βασικής για την οστεοκλαστογένεση έχει οδηγήσει σε καλύτερη κατανόηση της βιολογίας του οστεοκλάστη και της παθογένεσης των μεταβολικών νοσημάτων των οστών. Πρόκειται για ένα νέο σύστημα τριών κυτοκινών, που θεωρείται θεμελιώδες για τη φυσιολογική λειτουργία του οστικού μεταβολισμού και του οποίου διαταραχές εμπλέκονται σε πολλά μεταβολικά νοσήματα των οστών. Τα τρία μέλη της οικογένειας αυτής απαρτίζουν το σύστημα RANKL – RANK – OPG (οστεοπροτεγερίνη). Ειδικότερα:

♦ Ο RANK (Receptor Activator of Nuclear factor κB) είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας που ενεργοποιεί τον πυρηνικό παράγοντα κB, ένα μεταγραφικό παράγοντα καθοριστικό για την διαφοροποίηση και ενεργοποίηση των κυττάρων που τον εκφράζουν. Αποτελείται από 616 αμινοξέα και εκφράζεται σε μια σειρά κυττάρων, όπως οι οστεοκλάστες, τα T- και B-κύτταρα, τα δενδριτικά κύτταρα

και οι ινοβλάστες. Το γονίδιο του υποδοχέα του παράγοντα των αποικιών των μακροφάγων (C-fms), ο υποδοχέας του παράγοντα διέγερσης των αποικιών των μονοκυττάρων-μακροφάγων [macrophage colony-stimulating factor (M-CSF receptor ή CSF-1)] και ο RANK εκφράζονται διαδοχικά κατά τη διαδικασία ωρίμανσης του οστεοκλάστη<sup>72</sup>. Ο RANK ενεργοποιείται τόσο από τον RANKL όσο και από διεγερτικά αντισώματα.

In vitro και in vivo μελέτες δείχνουν ότι ο RANK αποτελεί κύριο ρυθμιστικό παράγοντα της οστεοκλαστογένεσης, όντας ο υποδοχέας του RANKL στην επιφάνεια των οστεοκλαστών. Χορήγηση διαλυτού RANK ή αντισωμάτων εξουδετερωτικών του RANK αναστέλλουν, ενώ αντίθετα διεγερτικά αντισώματα προάγουν την οστεοκλαστογένεση των πρόδρομων κυτταρικών σειρών<sup>73, 74</sup>. Η εξάλειψη του RANK, σε διαγονιδιακά ποντίκια (RANK knockout mice), συνοδεύτηκε από φαινότυπο ανάλογο με αυτό που χαρακτηρίζει την εξάλειψη του RANKL (οστεοπέτρωση, μειωμένη οδοντοφυΐα και έλλειψη λεμφαδένων) χωρίς να διαταράσει την επούλωση των καταγμάτων<sup>75</sup>.

Ο τρόπος της ενδοκυττάριας μετάδοσης του σήματος μετά τη σύνδεση του RANKL στο RANK και την ενεργοποίηση του τελευταίου, δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένος. Μεταγωγείς σημάτων, όπως οι παράγοντες που σχετίζονται με τον υποδοχέα του TNF (TRAFs, TNF receptor-associated factors), και ειδικότερα ο παράγων TRAF-6 και ο c-Src, δεσμεύονται σε ειδικές θέσεις στο κυτταροπλασματικό τμήμα του RANK<sup>76</sup> και πιθανώς διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη μετάδοση του σήματος<sup>77, 78</sup>. Φαίνεται ότι ο RANK, μέσω αλληλεπίδρασης με τον TRAF-6, ενεργοποιεί τον πυρηνικό υποδοχέα κB (NF-κB) και στη συνέχεια διεγείρεται μιας κινάσης, η NF-kappaB-inducing kinase (NIK)<sup>76, 79</sup>. Η οδός αυτή μπορεί επίσης να ενεργοποιηθεί μέσω του παράγοντα c-Src και της οικογένειας των Src κινασών, που προάγουν τη δράση της αντιαποπτωτικής κινάσης phosphatidylinositol 3-kinase-dependent Akt (Akt / PKB). Τα δύο αυτά συστήματα δεν είναι ανεξάρτητα, αλλά υπάρχει μια αλληλεπίδραση μεταξύ TRAF-6 και c-Src<sup>80</sup>. Παράλληλα με την οδό του NF-κB, ο RANK πιθανώς ενεργοποιεί και την οδό της c-Jun αμινοτελικής κινάσης (c-Jun N-terminal kinase -JNK) μέσω αλληλεπίδρασης με την περιοχή δέσμευσης του TRAF-2<sup>79</sup>.

◆ Ο RANKL είναι η πρωτεΐνη που συνδέεται με τον RANK και τον διεγείρει (γνωστή και ως ODF ή TRANCE). Ανακαλύφθηκε κατά την προσπάθεια να εντοπιστεί ένας συνδέτης (ligand) για την OPG.

Υπάρχουν δύο ισομορφές του RANKL που προκύπτουν από εναλλακτική κατάτμηση (alternate splicing) κατά τη σύνθεση του: μια μεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II (ισομορφή 1, 317 αμινοξέα, MB 35,5kD) και ένα εκκρινόμενο διαλυτό μόριο (ισομορφή 2, 244 αμινοξέα, MB 27,7kD) που στερείται την κυτταροπλασματική και διαμεμβρανική περιοχή. Και οι δύο μορφές είναι βιοδραστικές αλλά η μεμβρανική, που είναι η πιο συνήθης, φαίνεται ότι είναι η ομοιοστατική μορφή, ενώ η διαλυτή είναι ενδεικτική παθολογικών καταστάσεων.<sup>71, 81</sup>

Στον σκελετό, ο RANKL παράγεται κυρίως από τα κύτταρα της οστεοβλαστικής σειράς, αλλά και άλλα κύτταρα του οστού (κύτταρα του μυελού, οστεοκλάστες, χονδροκύτταρα, μεσεγχυματικά κύτταρα του περιοστέου) καθώς και από ενδοθηλιακά κύτταρα και ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα. Εκτός του οστού, η κυτοκίνη έχει ανιχνευθεί σε πολλούς άλλους ιστούς, όπως ο εγκέφαλος, η καρδιά, ο νεφρός, οι σκελετικοί μύες και το δέρμα.

Ο RANKL είναι αναγκαίος και επαρκής για την οστεοκλαστογένεση<sup>71</sup>. In vitro, δρα προάγοντας τη διαφοροποίηση, την επιβίωση και την σύντηξη των πρόδρομων κυττάρων των οστεοκλαστών, ώστε να παραχθούν ώριμοι οστεοκλάστες. Επιπρόσθετα, παρατείνει τη ζωή των ώριμων οστεοκλαστών εμποδίζοντας την απόπτωση τους<sup>74</sup>. Γενικά, ο RANKL, σε συνεργασία με τον M-CSF, υποστηρίζει την παραγωγή και δράση των οστεοκλαστών σε όλα τα επίπεδα<sup>82-85</sup>. Οι παρατηρήσεις αυτές συμπληρώνονται από in vivo μελέτες σε πειραματόζωα, στις οποίες η χορήγηση διαλυτού RANKL (sRANKL) προκάλεσε υπερασβεσταιμία και σοβαρή οστεοπόρωση, μέσω αύξησης της οστεοκλαστικής δραστηριότητας<sup>71</sup>. Αντίθετα, η εξάλειψη του RANKL σε διαγονιδιακά ποντίκια (RANKL knockout mice), συνοδεύτηκε από αυξημένη οστική μάζα (οστεοπέτρωση) και μειωμένη έκφυση οδόντων, λόγω απουσίας ώριμων οστεοκλαστών<sup>86</sup>. Το γεγονός ότι ο διεγέρτης των οστεοκλαστών RANKL εκφράζεται στους οστεοπαραγωγούς οστεοβλάστες, δείχνει ότι η οστική απορρόφηση και ο οστικός σχηματισμός συνδέονται μέσω του παράγοντα αυτού.

♦ Η **οστεοπροτεγερίνη (OPG)** είναι υποδοχέας του RANKL που κυκλοφορεί στο πλάσμα, ιδιότητα για την οποία ονομάστηκε «διαλυτός». Η OPG συνδέεται με RANKL και μειώνοντας την συγκέντρωση του τον εμποδίζει να ενεργοποιήσει τον RANK, ασκώντας έτσι αντιοστεοκλαστική δράση (υποδοχέας «δόλωμα» - ανταγωνιστικός του RANK στη δέσμευση του RANKL)<sup>81,87</sup>. Εκτός από τη διαλυτή, έχει βρεθεί και μορφή της OPG, η οποία εκφράζεται στην επιφάνεια των δενδριτικών κυττάρων.

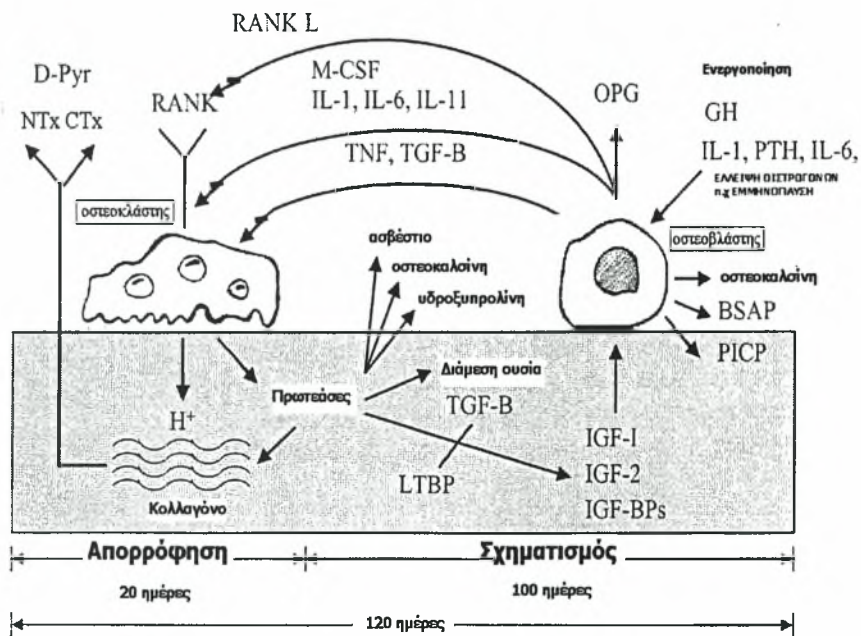
Ο όρος οστεοπροτεγερίνη προήλθε από την προστατευτική του επίδραση του σε πειραματόζωα, όσον αφορά την οστική απώλεια (osteoprotect)<sup>87</sup>. Είναι μια γλυκοπρωτεΐνη 401 αμινοξέων, η οποία ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων του TNF. Σε αντίθεση, με τους RANKL και RANK, των οποίων η παραγωγή γίνεται, κατά κύριο λόγο, στα οστά, η OPG παράγεται από πολλά κύτταρα του σώματος. Στα οστά, η παραγωγή της γίνεται στα κύτταρα της οστεοβλαστικής σειράς (προοστεοβλάστες και κυρίως ώριμους οστεοβλάστες). Εκτός από την αντιοστεοκλαστική της δράση, η OPG εξουδετερώνει ένα παράγοντα που προκαλεί απόπτωση κυρίως των καρκινικών αλλά και κάποιων φυσιολογικών κυττάρων (ηπατοκύτταρα, νευρικά, θύμου), τον TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand).

Μελέτες έδειξαν ότι ποντίκια με εξάλειψη του γονιδίου της OPG (OPG knockout mice) εμφανίζουν βαριά οστεοπόρωση και επασβεστώσεις του μέσου χιτώνα των αγγείων<sup>88</sup>. Η χορήγηση σ' αυτά OPG αναστρέφει την οστεοπόρωση, ενώ δεν είναι ξεκάθαρο αν αναστρέφει<sup>89</sup> ή όχι<sup>90</sup> τις αγγειακές επασβεστώσεις. Αντίθετα, υπερέκφραση του γονιδίου της OPG σε διαγονιδιακά πειραματόζωα, ή



χορήγηση OPG σε φυσιολογικά ζώα οδηγεί σε οστεοπέτρωση<sup>87,91</sup>. Οι παρατηρήσεις αυτές θέτουν το θεωρητικό υπόβαθρο για τη χρήση της OPG ως παράγοντα καταστολής της οστικής απορρόφησης.

Η σχετική έκφραση του RANKL και της OPG είναι καθοριστικές παράμετροι για τη ρύθμιση δραστηριότητας των οστεοκλαστών και τη συνέχιση του κύκλου του οστικού μεταβολισμού. Οι προοστεοβλάστες και οι ώριμοι οστεοβλάστες εκφράζουν RANKL, ο οποίος δεσμεύει τον RANK στην επιφάνεια των πρόδρομων οστεοκλαστών με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή του. Η μετάδοση του σήματος οδηγεί σε διαφοροποίηση και σύντηξη των πρόδρομων μορφών, ώστε να σχηματιστούν ώριμοι οστεοκλάστες. Καθώς ο οστεοβλάστης ωριμάζει, αυξάνεται η παραγωγή OPG και μειώνεται η παραγωγή RANKL με αποτέλεσμα την αναστολή της δραστηριότητας των οστεοκλαστών και τελικά την απόπτωση τους. Αυτό επιτρέπει στους ώριμους οστεοβλάστες να ξαναγεμίσουν το κενό που δημιούργησαν οι οστεοκλάστες στην επιφάνεια ανακατασκευής<sup>92</sup> (Σχήμα 6).



**Σχήμα 6. Φυσιολογικός ρόλος του συστήματος RANKL-RANK-OPG στον οστικό μεταβολισμό.** Απεικονίζεται σχηματικά ένας οστεοβλάστης και ένας οστεοκλάστης, δύο κύτταρα με ακριβώς αντίθετη δράση στο σκελετό, τα οποία όμως επικοινωνούν μεταξύ τους και συνεργάζονται, μέσω παρακρινικών παραγόντων, για να ολοκληρωθεί ένας κύκλος οστικού μεταβολισμού. Στη φάση της οστικής απορρόφησης ο οστεοβλάστης εκκρίνει RANKL, ο οποίος διεγείρει τον υποδοχέα RANK στην επιφάνεια του οστεοκλάστη με αποτέλεσμα την αύξηση της δραστηριότητάς του και την απορρόφηση οστού. Στη συνέχεια έρχεται η φάση του οστικού σχηματισμού κατά την οποία ο οστεοβλάστης εκκρίνει OPG, η οποία δεσμεύει τον RANKL εμποδίζοντας τη σύνδεση του στον RANK του οστεοκλάστη. Έτσι, ο οστεοκλάστης απενεργοποιείται και ο οστεοβλάστης μπορεί πλέον ανενόχλητος να δημιουργήσει νέο οστό στην κοιλότητα που είχε δημιουργήσει πριν ο οστεοκλάστης.

Εκτός από το ερειστικό σύστημα, το σύστημα OPG-RANKL-RANK παίζει ρυθμιστικό ρόλο και στο ανοσοποιητικό σύστημα και την αγγειακή βιολογία (πίνακας 3).

**Πίνακας 3.** Ρόλος του συστήματος OPG-RANKL-RANK στον οστικό μεταβολισμό, το ανοσοποιητικό σύστημα και την αγγειακή βιολογία.

<b>Ερειστικό σύστημα</b>
Οι οστεοβλάστες και τα πρόδρομα τους (κύτταρα στρώματος) εκφράζουν τον συνδέτη του υποδοχέα ενεργοποιητή του πυρηνικού παράγοντα κΒ (RANKL) σε μια κυτταρική μορφή και μια μικρότερη μορφή που δημιουργείται με δράση της πρωτεάσης μετατροπικό ένζυμο του παράγοντα νέκρωσης όγκων $\alpha$ (TNF $\alpha$ -converting enzyme – TACE). Ο RANKL διεγείρει τον υποδοχέα RANK στα πρόδρομα των οστεοκλαστών και τους ώριμους οστεοκλάστες και ενεργοποιεί ενδοκυττάριας οδούς που προάγουν την διαφοροποίηση και ενεργοποίηση των οστεοκλαστών (οδοί του NF-κΒ και της c-Jun αμινοτελικής κινάσης) καθώς και την κυτταροσκελετική αναδιοργάνωση και επιβίωση τους (οδός Act / PKB), με αποτέλεσμα αύξηση της οστικής απορρόφησης και οστική απώλεια. Τα κύτταρα στρώματος και οι οστεοβλάστες εκκρίνουν οστεοπροτεγερίνη (OPG) που δρα ως υποδοχέας-δόλωμα και δεσμεύει τον RANKL παρεμποδίζοντας έτσι τη σύνδεση του στο RANK.
Την έκφραση RANKL:
<i>αυξάνουν:</i> IL-1, IL-11, IL-17, TNF- $\alpha$ , PTH, προσταγλανδίνη E <sub>2</sub> , γλυκοκορτικοειδή
<i>μειώνουν:</i> IL-4, TGF- $\beta$ , 17 $\beta$ -οιστραδιόλη
Την παραγωγή OPG:
<i>αυξάνουν:</i> IL-1, IL-13, IL-18, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , BMP-2, 17 $\beta$ -οιστραδιόλη, λεπτίνη, μηχανική φόρτιση
<i>μειώνουν:</i> PTH, προσταγλανδίνη E <sub>2</sub> , γλυκοκορτικοειδή, κυκλοσπορίνη A
<b>Ανοσοποιητικό σύστημα</b>
Ο RANKL εκφράζεται και εκκρίνεται από ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα. Ο RANKL που προέρχεται από τα T-λεμφοκύτταρα μπορεί να ενεργοποιήσει τον RANK στους οστεοκλάστες, με αποτέλεσμα πρόκληση οστικής απώλειας σε φλεγμονώδεις οστικές νόσους, σε T-λεμφοκύτταρα (μετάδοση σήματος με ενδοκυττάρια οδό NF-κΒ) και σε αντιγονο-παρουσιαστικά δενδριτικά κύτταρα (οδοί NF-κΒ και c-Jun αμινοτελικής κινάσης), με αποτέλεσμα αύξηση της δραστηριότητας και επιβίωσης και των δύο τύπων ανοσοποιητικών κυττάρων. Τα δενδριτικά κύτταρα μπορούν να ρυθμίζουν αυτές τις διαδικασίες εκκρίνοντας OPG.
Την έκφραση RANKL:
<i>αυξάνουν:</i> IL-1, IL-7, IL-17, TNF- $\alpha$
<i>Μειώνει:</i> 17 $\beta$ -οιστραδιόλη

Την παραγωγή OPG:
αυξάνει: συνδέτης CD40
<b>Αγγειακό σύστημα</b>
Ο RANKL εκφράζεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία επίσης εκφράζουν τον ειδικό υποδοχέα RANK (μετάδοση σήματος μέσω οδού Act / PKB). Οι αλληλεπιδράσεις RANKL / RANK καθορίζουν την επιβίωση των κυττάρων αυτών. Ο RANKL μπορεί να δεσμεύεται από την OPG, που εκκρίνεται από τα ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα. Ο φυσιολογικός ρόλος του συστήματος OPG-RANKL-RANK στο αγγειακό τοίχωμα και οι αλληλεπιδράσεις με άλλους συνδέτες είναι υπό διερεύνηση.
Την έκφραση RANKL:
αυξάνουν: IL-1, TNF- $\alpha$
μειώνουν: IL-4, TGF- $\beta$ , 17 $\beta$ -οιστραδιόλη
Την παραγωγή OPG:
αυξάνουν (λεία μυϊκά κύτταρα): PDGF-BB
αυξάνουν (ενδοθηλιακά κύτταρα): IL-1, TNF- $\alpha$
μειώνουν (λεία μυϊκά κύτταρα): γλυκοκορτικοειδή, κυκλοσπορίνη A, τρογλιταζόνη

### 2.6.2. Γενετική

Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον RANK (TNFRSF11A) έχει εντοπιστεί στο μακρό σκέλος του χρωμοσώματος 18 (18q 21.2-21.3). Μεταλλάξεις που προκαλούν αύξηση της έκφρασης του γονιδίου έχουν ενοχοποιηθεί για την πρόκληση οστεολυτικών διαταραχών, όπως η οικογενής διατακτική οστεόλυση (familial expansile osteolysis – FEO)<sup>93,94</sup>, η εκτακτική σκελετική υπερφωσφατασία (expansile skeletal hyperphosphatasia - ESH)<sup>93</sup> και μια, πρώιμης έναρξης, οικογενής μορφή νόσου του Paget<sup>95</sup>. Πάντως, για τη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων σποραδικής ή οικογενούς νόσου του Paget δεν ευθύνονται μεταλλάξεις του γονιδίου TNFRSF11A<sup>96</sup>.

Πολυμορφισμοί του εκκινητή (promoter) του γονιδίου που κωδικοποιεί τον RANKL (TNFSF11) φαίνεται να σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο χαμηλής οστικής πυκνότητας<sup>97,98</sup>.

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την οστεοπροτεγερίνη (TNFRSF11B) εντοπίστηκε στο μακρό σκέλος του χρωμοσώματος 8 (8q 24.2). Απενεργοποιητικές μεταλλάξεις του γονιδίου της OPG ευθύνονται για την εμφάνιση της νεανικής νόσου του Paget (juvenile Paget's disease ή hereditary hyperphosphatasia ή hyperostosis corticalis deformans juvenilis)<sup>96,99</sup>. Εξάλειψη ολόκληρου του γονιδίου έχει ως αποτέλεσμα την απουσία της πρωτεΐνης OPG, την αύξηση των επιπέδων του αδέσμευτου RANKL και την εκδήλωση βαρείας νόσου. Επίσης, μεταλλάξεις στα εξόνια 2 και 3 του γονιδίου της OPG συνοδεύονται από αλλαγές στη δομή του μορίου, που μειώνουν την ικανότητα δέσμευσης του με τον RANKL και προκαλούν την εκδήλωση βαρείας ή μέτριας νόσου. Τέλος, μεταλλάξεις στο εξόνιο 5 μειώνουν τη

σταθερότητα της OPG και σχετίζονται με ηπιότερο φαινότυπο. Συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί του γονιδίου της OPG (αλληλίο G1181) ίσως αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης σποραδικής και οικογενούς νόσου του Paget<sup>100, 101</sup>. Πάντως, μεταλλάξεις του γονιδίου της OPG έχουν αποκλεισθεί σε ασθενείς με ν.Paget<sup>100</sup>.

Κάποιοι πολυμορφισμοί του γονιδίου της OPG, ιδίως στην περιοχή του εκκινήτη του γονιδίου, αυξάνουν τον κίνδυνο για την εμφάνιση οστεοπόρωσης σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες<sup>102, 103</sup>, ιδίως όταν συνδυάζονται με συγκεκριμένους γονότυπους του RANK και του οιστρογονικού υποδοχέα (ESR1)<sup>104</sup>. Εξάιρεση αποτελεί μια μελέτη σε ηλικιωμένες γυναίκες από τη Σουηδία, που δεν βρήκε συσχέτιση των πολυμορφισμών της OPG με την οστική πυκνότητα και την εμφάνιση καταγμάτων<sup>105</sup>, ενώ για τους άνδρες υπάρχουν αντικρουόμενες παρατηρήσεις<sup>97, 102</sup>.

### 2.6.3. Παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση RANKL και OPG *in vitro*<sup>106</sup>

Μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν μοντέλα κυττάρων στρώματος ή οστεοβλαστών αποκάλυψαν διάφορους ορμονικούς και αυτοκρινικούς/παρακρινικούς μηχανισμούς, με τους οποίους ρυθμίζεται η παραγωγή των OPG και RANKL. Ωστόσο, τα δεδομένα αυτά δεν συμπίπτουν πάντα με τα *in vivo* ευρήματα.

Διεγέρτες της οστεοκλαστογένεσης, όπως οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-1b, IL-6, IL-11, IL-17, TNF-α και η προσταγλανδίνη E<sub>2</sub>, αυξάνουν την έκφραση του mRNA του RANKL και ελαττώνουν την αντίστοιχη της OPG στους οστεοβλάστες. Η IL-1 και ο TNF-α διεγείρουν την παραγωγή M-CSF, αυξάνοντας έτσι την δεξαμενή των πρόδρομων οστεοκλαστών, ενώ αυξάνουν άμεσα και την παραγωγή RANKL<sup>107</sup>. Από τις συστηματικές ορμόνες, η PTH, η καλσιτριόλη (1,25 διυδροξυβιταμίνη D<sub>3</sub>) και τα γλυκοκορτικοειδή και επίσης διεγείρουν την παραγωγή του RANKL<sup>108-110</sup> και αναστέλλουν της OPG<sup>108, 111</sup>. Αντίθετα, κυτοκίνες που αναστέλλουν την οστεοκλαστογένεση όπως οι IL-13, INF-γ, TGF-b1 και η 17β-οιστραδιόλη δρουν με τον ακριβώς αντίθετο τρόπο<sup>111-114</sup>.

Μεταβολές του λόγου RANKL / OPG είναι καθοριστικές για την παθογένεση οστικών νόσων που οφείλονται σε αυξημένη οστική απορρόφηση. Φυσικά, στη ρύθμιση της βιολογίας των οστεοκλαστών ενέχονται και άλλοι παράγοντες και σήματα (π.χ. IL-1, IL-6, TNF-α) που μπορεί να δρουν και ανεξάρτητα από τον RANKL και την OPG<sup>70</sup>.



### 3. ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗ

#### 3.1. Ορισμός

Οστεοπόρωση είναι η νόσος που χαρακτηρίζεται από χαμηλή οστική μάζα και διαταραχή της μικροαρχιτεκτονικής του οστίτη ιστού, με αποτέλεσμα αυξημένη ευθραυστότητα των οστών και αυξημένο κίνδυνο κατάγματος<sup>115</sup>.

Αυτός ο ορισμός της οστεοπόρωσης προϋποθέτει ότι η διάγνωση τίθεται κυρίως ιστολογικά. Στην πράξη, ωστόσο, αντιμετωπίζει κανείς μειωμένη οστική πυκνότητα ή οστεοπενία χωρίς να εξετάζει την ιστολογία του οστού. Έτσι, η διάγνωση της οστεοπενίας ή οστεοπόρωσης πρακτικά τίθεται με βάση τη μέτρηση της οστικής πυκνότητας και την ύπαρξη ή όχι κατάγματος, όπως φαίνεται στον πίνακα 4:

**Πίνακας 4.** Διάγνωση της οστεοπόρωσης με βάση την μέτρηση της οστικής πυκνότητας.

Κατηγορία	Οστική μάζα	T-score
<b>Φυσιολογικό</b>	Τιμή οστικής πυκνότητας (BMD) ή περιεκτικότητας του οστού σε μέταλλα (BMC) μέχρι μια σταθερή απόκλιση (SD) κάτω από το μέσο όρο υγιών νεαρών ατόμων	< -1
<b>Οστεοπενία</b>	Τιμή BMD ή BMC περισσότερο από 1 και λιγότερο από 2,5 SD κάτω από το μέσο όρο υγιών νεαρών ατόμων	> -1 και < -2,5
<b>Οστεοπόρωση</b>	Τιμή BMD ή BMC περισσότερο από 2,5 SD κάτω από το μέσο όρο υγιών νεαρών ατόμων	> -2,5
<b>Εγκατεστημένη οστεοπόρωση</b>	Τιμή BMD ή BMC περισσότερο από 2,5 SD κάτω από το μέσο όρο υγιών νεαρών ατόμων και παρουσία ενός ή περισσότερων καταγμάτων	> -2,5

#### 3.2. Ταξινόμηση

Η οστεοπόρωση διακρίνεται στην πρωτοπαθή ή ιδιοπαθή, τη δευτεροπαθή και τη νεανική (juvenile).

Η πρωτοπαθής με τη σειρά της διακρίνεται σε τύπου I (μετεμμηνοπαυσιακή) και τύπου II (γεροντική) οστεοπόρωση. Τα χαρακτηριστικά των δύο τύπων αναφέρονται συνοπτικά στον Πίνακα 5.



**Πίνακας 5.** Χαρακτηριστικά τύπων πρωτοπαθούς οστεοπόρωσης.

	<b>Τύπος I</b>	<b>Τύπος II</b>
<b>Φυσιοπαθολογία</b>		
αιτιολογία	εμμηνόπαυση	γήρας δευτεροπαθής υπερπαραθυρεοειδισμός
κύρια ορμονική διαταραχή	έλλειψη οιστρογόνων	ελάττωση 1,25 (OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> αύξηση PTH
<b>Κλινική εικόνα</b>		
ηλικία εμφάνισης	50-65 ετών	> 75 ετών
φύλο	Γ:Α 6:1	Γ:Α 2:1
απώλεια τύπου οστού	σπογγώδες	φλοιώδες και σπογγώδες
θέση καταγμάτων	κερκίδα σπονδυλική στήλη	μηριαίο σπονδυλική στήλη
<b>Βιοχημική εικόνα</b>		
PTH	ελαττωμένη	αυξημένη
απορρόφηση Ca	φυσιολογική	ελαττωμένη

Η τύπου I οστεοπόρωση χαρακτηρίζεται από αυξημένη οστεοκλαστική δραστηριότητα και επομένως αυξημένη οστική απορρόφηση. Αντίθετα, η τύπου II χαρακτηρίζεται κυρίως από μειωμένη οστεοβλαστική δραστηριότητα δηλαδή μειωμένο οστικό σχηματισμό, αν και ο συνυπάρχων δευτεροπαθής υπερπαραθυρεοειδισμός αυξάνει και την οστεοκλαστική δραστηριότητα.

Η κλασική αυτή διάκριση σε τύπου I και τύπου II οστεοπόρωση δεν ισχύει απόλυτα στην κλινική πράξη, καθώς η μια μεταπίπτει μετά από κάποιο χρονικό διάστημα στην άλλη και συχνά υπάρχουν μικτές εικόνες.

Ως δευτεροπαθής χαρακτηρίζεται η οστεοπόρωση όταν οφείλεται σε συγκεκριμένες παθήσεις ή φάρμακα που προκαλούν οστική απώλεια (Πίνακας 6).

**Πίνακας 6.** Αίτια δευτεροπαθούς οστεοπόρωσης.

<b>Υπογοναδικές καταστάσεις</b>	<b>Γενετικές παθήσεις</b>
Νευρογενής ανορεξία	Κυστική ίνωση
Αμηνόρροια αθλητριών	Αιμοχρωμάτωση
σ. Turner	Ατελής οστεογένεση
Υπερπρολακτιναμία	Ομοκυστινουρία
Πρώιμη ωοθηκική ανεπάρκεια	Υποφωσφατασία σ. Marfan
<b>Άλλες ενδοκρινικές παθήσεις</b>	<b>Άλλα αίτια</b>
Υπερθυρεοειδισμός	Αλκοολισμός
Υπερπαραθυρεοειδισμός σ. Cushing (υπερκορτιζολισμός)	Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια
Επινεφριδική ανεπάρκεια	Συμφορ. καρδιακή ανεπάρκεια
Σακχαρώδης διαβήτης τύπου I	Αποφρακτική πνευμονοπάθεια
Υπουποφυσισμός	Χρόνια μεταβολική οξέωση
<b>Παθήσεις γαστρεντερικού</b>	Σαρκοείδωση
	Μεταμόσχευση οργάνου

σ. δυσασορρόφησης Γαστρεκτομή Κοιλιοκάκη Φλεγμονώδης νόσος εντέρου Πρωτοπαθής χολική κίρρωση	Γενικευμένη κακοήθεια Αμυλοείδωση Ακινητοποίηση
<b>Αιματολογικές παθήσεις</b>	<b>Φάρμακα</b>
Αιμοφιλία Μεσογειακή αναιμία Δρεπανοκυτταρική αναιμία Λευχαιμίες – λεμφώματα Πολλαπλούν μυέλωμα Συστηματική μαστοκύτωση	Κορτικοστεροειδή Υπερδοσολογία θυροξίνης Ηπαρίνη Κυκλοσπορίνη Λίθιο Βαρφαρίνη Θειαζιδικά διουρητικά Χημειοθεραπευτικά
<b>Ρευματολογικές παθήσεις</b>	
Συστημ. ερυθματώδης λύκος Ρευματοειδής αρθρίτιδα Αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα	

Η ιδιοπαθής νεανική οστεοπόρωση είναι μια σπάνια πάθηση, που προσβάλλει κυρίως παιδιά ηλικίας 8-14 ετών, είναι αγνώστου αιτιολογίας και στην συντριπτική πλειοψηφία των ασθενών αναστρέφεται αυτόματα.

### 3.3. Διάγνωση

Η διάγνωση της οστεοπόρωσης στην κλινική πράξη μπορεί να τεθεί με κλινικά κριτήρια (οστικά άλγη συνεπεία καταγμάτων, απώλεια ύψους), με ακτινολογικά κριτήρια (αραίωση των δοκίδων, διαφόρου βαθμού παραμόρφωση και καθίζηση σπονδύλων στις απλές ακτινογραφίες) και με τη μέτρηση της οστικής πυκνότητας<sup>116</sup>. Ωστόσο, τα συμπτώματα συχνότατα απουσιάζουν καθώς η οστεοπόρωση είναι μια ασυμπτωματική νόσος πριν την εμφάνιση κάποιου κατάγματος. Επίσης, στις απλές ακτινογραφίες η οστεοπόρωση είναι εμφανής μόνο όταν ο βαθμός οστικής απώλειας είναι πολύ μεγάλος (άνω του 30%). Επομένως, η κλινική εικόνα και οι απλές ακτινογραφίες δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη διάγνωση και την εκτίμηση της βαρύτητας της οστεοπόρωσης στα πρώιμα τουλάχιστον στάδια.

#### 3.3.1. Μέτρηση οστικής πυκνότητας

Η μέτρηση της οστικής πυκνότητας (Bone mineral density - BMD) με τη μέθοδο της οστικής πυκνομετρίας διπλής δέσμης φωτονίων (Dual Energy X-ray Absorptiometry – DEXA) αποτελεί σήμερα τον επικρατέστερο τρόπο εκτίμησης της οστικής μάζας.

Η οστική πυκνότητα δίνει στατική εκτίμηση της οστικής μάζας μια δεδομένη χρονική στιγμή. Δεν μπορεί να προβλέψει τον ρυθμό οστικής απώλειας και επομένως τη μελλοντική οστική πυκνότητα. Επιπλέον, η μείωση του κινδύνου κατάγματος δεν ταυτίζεται πάντα με μια αντίστοιχη αύξηση της BMD<sup>117-119</sup>. Έτσι, η αύξηση της BMD που παρατηρείται με την χορήγηση αντιοστεοπορωτικών παραγόντων ευθύνεται για ένα μικρό μόνο ποσοστό της αντικαταγματικής τους δράσης (8-20%). Συγκεκριμένα, το ποσοστό κινδύνου κατάγματος που εξηγείται από

την αλλαγή της οστικής πυκνότητας είναι 16% για την αλενδρονάτη (μελέτη FIT), 28% για τη RIS (μελέτη VERT) και μόλις 4% για τη ραλοξιφαίνη (μελέτη MORE). Τέλος, για να είναι αξιόπιστη οποιαδήποτε μεταβολή στην οστική μάζα με την μέθοδο της οστικής πυκνομετρίας, πρέπει να παρέλθει τουλάχιστον ένα έτος από την προηγούμενη μέτρηση και την έναρξη κάποιας θεραπευτικής παρέμβασης<sup>120</sup>, λόγω των μικρών ρυθμών μεταβολής της. Ωστόσο, η αντικαταγματική δράση παρατηρείται πρώιμα, χωρίς να έχει επιτευχθεί ακόμα σημαντική αλλαγή στην οστική μάζα.

Για τους λόγους που αναφέρθηκαν είναι φανερό ότι η μέτρηση της οστικής πυκνότητας με DEXA δεν αποτελεί τον ιδανικότερο τρόπο αξιολόγησης της αποτελεσματικότητας μιας αγωγής στην κλινική πράξη. Τα κενά αυτά πιθανώς μπορούν να καλυφθούν με τη χρήση των δεικτών οστικού μεταβολισμού<sup>116</sup>.

### **3.3.2. Κλινική χρησιμότητα των δεικτών οστικού μεταβολισμού στην παρακολούθηση αποτελεσματικότητας της θεραπείας**

Μετά από χορήγηση οστεοαναβολικών, δηλαδή παραγόντων που διεγείρουν την σύνθεση οστού, οι δείκτες οστικού σχηματισμού αυξάνουν<sup>121, 122</sup>, ενώ οι δείκτες οστικής απορρόφησης αυξάνονται μετά από χορήγηση TPTD<sup>121</sup> αλλά ελαττώνονται μετά από χορήγηση στροντίου<sup>122</sup>.

Οι συγκεντρώσεις στον ορό ή τα ούρα των περισσότερων δεικτών οστικού μεταβολισμού πέφτουν κατά τη διάρκεια αγωγής με σκευάσματα που αναστέλλουν την οστεοκλαστική δραστηριότητα<sup>123</sup>. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι επηρεάζεται το δίπολο στεοβλάστη-οστεκλάστη λόγω του φαινομένου της σύζευξης. Όσο μεγαλύτερη είναι η πτώση των οστικών δεικτών μετά την έναρξη της αντιαπορροφητικής αγωγής τόσο μεγαλύτερη είναι η βελτίωση της οστικής πυκνότητας<sup>124</sup>.

**PINP.** Αγωγή με φάρμακα που διεγείρουν την οστεοσύνθεση θεωρείται αποτελεσματική όταν επιτυγχάνει αύξηση των επιπέδων του PINP τουλάχιστον κατά 40%. Φαίνεται να είναι ο δείκτης με την πρωιμότερη και εντονότερη αύξηση, τουλάχιστον μετά TPTD, γι' αυτό προτείνεται από πολλούς ως ο καταλληλότερος για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της αγωγής<sup>125, 126</sup>. Ωστόσο, ο προσδιορισμός του φαίνεται να έχει θέση και σε θεραπεία με αντιοστεοκλαστικά φάρμακα<sup>127</sup>. Σε ασθενείς υπό αγωγή με ραλοξιφαίνη το PINP μειώνεται κατά 40% περίπου μετά από ένα έτος θεραπείας και η μείωση αυτή συσχετίζεται με τη μείωση του κινδύνου κατάγματος μετά τρία έτη αγωγής<sup>128</sup>. Επίσης, η αντικαταγματική δράση της αλενδρονάτης φαίνεται να είναι μεγαλύτερη στις οστεοπορωτικές και μη γυναίκες με τα υψηλότερα επίπεδα PINP πριν την έναρξη της αγωγής<sup>129</sup>. Ως όριο απάντησης του PINP σε μια θεραπεία θεωρείται μια αύξηση πάνω από 10μg/l<sup>126</sup>.

Η χρησιμότητα του PINP ως δείκτη οστικού μεταβολισμού έχει αποδειχθεί σε ασθενείς με υπερπαραθυρεοειδισμό, υποβιταμίνωση D<sup>39</sup>, νόσο Paget<sup>130</sup> και μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση<sup>131</sup>. Τέλος, σε αιμοκαθαίρομενους ασθενείς το PINP ίσως αποτελεί τον καλύτερο δείκτη οστεοβλαστικής λειτουργίας<sup>132</sup>.

**CTX.** Το CTX του ορού όσο και το CTX των ούρων εμφανίζουν μειώσεις  $\geq 70\%$  από την αρχική τιμή μετά από χορήγηση διφωσφονικών και περίπου 50% μετά από θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης<sup>133</sup>. Μείωση κατά 45% του CTX ούρων αντιστοιχεί με μείωση των καταγμάτων κατά 7%<sup>134</sup>. Η μείωση του CTX ορού είναι ορατή ήδη από τις δύο πρώτες εβδομάδες αγωγής με οιστρογόνα<sup>135</sup> ή τις τρεις πρώτες εβδομάδες αγωγής με διφωσφονικά<sup>136</sup>, ενώ η μέγιστη επίδραση εμφανίζεται μετά από 3-6 μήνες θεραπείας<sup>134, 135, 137</sup>. Τα επίπεδα του CTX ορού νηστείας φαίνεται να είναι καλύτεροι κλινικοί δείκτες ανταπόκρισης από την DPD και το NTX ούρων στη χορήγηση διφωσφονικών<sup>138</sup>. Η συγκέντρωση του CTX ορού συσχετίζεται με τον κίνδυνο κατάγματος<sup>139, 140</sup> και πιθανώς με την οστική πυκνότητα μετά από 1-2 έτη θεραπείας<sup>141</sup>.

### **3.3.3. Διαγνωστικές εφαρμογές του συστήματος RANKL – RANK – OPG**

Τα επίπεδα του RANKL και της OPG μπορούν να προσδιοριστούν στον ορό. Επειδή τα μόρια αυτά παράγονται σε διαφορετικούς ιστούς, τα επίπεδα τους στον ορό δεν είναι ειδικοί δείκτες του σκελετού. Διάφοροι παράγοντες όπως η ηλικία, η νεφρική λειτουργία και τυχόν αγγειακή νόσος επηρεάζουν τα επίπεδα τους<sup>142-144</sup>.

#### **Προσδιορισμός της OPG**

Η OPG κυκλοφορεί ως μονομερές, ως ομοδιμερές και ως σύμπλοκο δεσμευμένη με το RANKL. Βιολογικά δραστική μορφή θεωρείται η ομοδιμερής, αλλά αφθονότερη είναι η μονομερής μορφή, η οποία ίσως αποτελεί προϊόν αποδόμησης της ομοδιμερούς<sup>145</sup>. Οι εμπορικές μέθοδοι έχουν σχεδιαστεί ώστε να ανιχνεύουν όλες τις μορφές της κυκλοφορούσας OPG.

Για τη μέτρηση της OPG ορού χρησιμοποιείται τεχνική ELISA με τη χρήση δύο αντισωμάτων (τεχνική τύπου «σάντουιτς»). Στον πυθμένα της μικροπλάκας προσκολλάται ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ενώ για την ανίχνευση της συνδεδεμένης με το πρώτο αντίσωμα OPG χρησιμοποιείται πολυκλωνικό αντίσωμα. Οι φυσιολογικές τιμές αναφοράς (normal reference ranges) ποικίλουν ανάλογα με την εταιρία παρασκευής των αντιδραστηρίων. Οι διαφορές στις τιμές αναφοράς, μεταξύ των διαφόρων εταιριών, μπορεί να αντανακλούν τη χρήση διαφορετικών πληθυσμών αναφοράς, ή να οφείλονται σε διαφορές στο μόριο της OPG που χρησιμοποιείται για το σχεδιασμό της πρότυπης καμπύλης αναφοράς της μεθόδου.

Οι κατασκευαστές ισχυρίζονται ότι η OPG είναι σταθερή στους  $-20^{\circ}\text{C}$  στον ορό και στο πλάσμα (με EDTA, κιτρικό ή ηπαρίνη) και στους  $4^{\circ}\text{C}$  για 14 ημέρες. Αναφέρεται ότι τρεις κύκλοι παγώματος-ξεπαγώματος (freeze-thaw cycles) δεν επηρέασαν τη συγκέντρωση της OPG στον ορό ή το πλάσμα με EDTA ή κιτρικό, ενώ βρέθηκε σημαντική μείωση των τιμών στο ηπαρινισμένο πλάσμα. Ωστόσο, μια ανεξάρτητη αναφορά ισχυρίζεται ότι η αποθήκευση του δείγματος στους  $-70^{\circ}\text{C}$  για πάνω από 6 μήνες οδήγησε σε σημαντική μείωση της OPG ορού<sup>146</sup>. Υπό το πρίσμα των ανωτέρω αντιφατικών παρατηρήσεων κρίνεται σκόπιμο ο διαχωρισμός του ορού ή του πλάσματος να γίνεται το ταχύτερο δυνατό, τα δείγματα να καταψύχονται για το μικρότερο δυνατό διάστημα στους  $-70^{\circ}\text{C}$  και να μην υπόκεινται στη διαδικασία παγώματος-ξεπαγώματος.



Υπάρχει διαφορά στην ευαισθησία των ELISA που διατίθενται στο εμπόριο για τον προσδιορισμό της OPG. Τα χαμηλότερα όρια προσδιορισμού της OPG των διαφόρων μεθόδων κυμαίνονται μεταξύ 0,01 και 0,4 pmol/L.

Με μια ανοσο-PCR μέθοδο, που να ανιχνεύει ειδικά την ομοδιμερή OPG<sup>147</sup>, διαπιστώθηκε ότι σε σύγκριση με μάρτυρες, η συγκέντρωση της ομοδιμερούς OPG ήταν 3,3 φορές υψηλότερη στους οστεοπορωτικούς ασθενείς, ενώ η ολική OPG ήταν μόνο 1,5 φορά υψηλότερη. Η μέθοδος αυτή δεν είναι εμπορικά διαθέσιμη.

### **Προσδιορισμός του RANKL ορού (sRANKL).**

Για τη μέτρηση του sRANKL στον ορό ή το πλάσμα χρησιμοποιείται τεχνική ELISA με τη χρήση δύο αντισωμάτων (τεχνική τύπου «σάντουιτς»). Στον πυθμένα της μικροπλάκας προσκολλώνται μόρια OPG, ενώ για την ανίχνευση του συνδεδεμένου με την OPG sRANKL χρησιμοποιείται πολυκλωνικό αντίσωμα<sup>148</sup>. Η ευαισθησία της αρχικής μεθόδου δεν ήταν αρκετή ώστε να ανιχνεύει τον sRANKL σε ένα ποσοστό φυσιολογικών ατόμων, καθώς η συγκέντρωση του στα άτομα αυτά είναι τυπικά κάτω από 1 pmol/l. Η ευαισθησία της μεθόδου αυξήθηκε με τη χρήση διαφορετικού δεύτερου αντισώματος και μεθόδου ανίχνευσης. Το κατώτερο όριο ανίχνευσης για την τρέχουσα μέθοδο είναι 0,08 pmol/l.

Θα πρέπει να παρατηρηθεί ότι και με τις υπάρχουσες μεθόδους τα επίπεδα του sRANKL παραμένουν συχνά μη ανιχνεύσιμα τόσο σε φυσιολογικά άτομα<sup>149</sup> όσο και σε ασθενείς<sup>149-153</sup>.

Υπάρχουν κάποιες διαφωνίες σχετικά με τη σταθερότητα του sRANKL στον ορό και το πλάσμα. Σε μια μελέτη, ο sRANKL ήταν σταθερός μέχρι και τέσσερις κύκλους παγώματος-ξεπαγώματος στον ορό και το ηπαρινισμένο πλάσμα<sup>148</sup>. Αντίθετα, άλλη μελέτη έδειξε ότι η συλλογή του δείγματος σε Li-ηπαρίνη και η αποθήκευση για πάνω από 6 μήνες στους -70°C οδήγησε σε σημαντική απώλεια του sRANKL.

### **Προαναλυτική μεταβλητότητα OPG και sRANKL**

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των μετρήσεων της OPG και του sRANKL στο περιφερικό αίμα, εκτός από τη μέθοδο που χρησιμοποιείται, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη και άλλοι πιθανοί παράγοντες επηρεασμού. Αν και οι παράγοντες αυτοί έχουν εκτενώς μελετηθεί, όσον αφορά την επίδραση τους, σε μετρήσεις κλασικών δεικτών οστικού μεταβολισμού, λίγα είναι γνωστά σχετικά με την επίδραση τους στις μετρήσεις της OPG και του sRANKL<sup>154</sup>. Στους παράγοντες αυτούς περιλαμβάνονται ορισμένοι που μπορούν να ελεγχθούν όπως ο κερκάρδιος ρυθμός, ο εμμηνορυσιακός κύκλος και η επίδραση της άσκησης και άλλοι που δεν ελέγχονται, όπως η ηλικία, το φύλο, η εμμηνόπαυση ή η συνύπαρξη άλλων παθήσεων που επηρεάζουν τα επίπεδα της OPG και του sRANKL.

**Συσχέτιση της OPG με τους δείκτες οστικού μεταβολισμού, τις ορμόνες του φύλου και την οστική πυκνότητα.**

Διάφορες επιδημιολογικές μελέτες έχουν εκτιμήσει τη σχέση των επιπέδων του

OPG με τον οστικό μεταβολισμό και την οστική πυκνότητα. Σχετικά με τη σχέση των επιπέδων OPG ορού και των δεικτών οστικού μεταβολισμού τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα. Έχουν περιγραφεί αρνητικές όσο και θετικές συσχετίσεις μεταξύ OPG και δεικτών οστικού μεταβολισμού<sup>155-159</sup>, ενώ υπάρχουν μελέτες που δεν δείχνουν καμία συσχέτιση<sup>153, 160</sup>. Ειδικότερα, σε Ισλανδούς άνδρες και γυναίκες, παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ OPG και οστεοκαλσίνης ορού, ενώ αρνητική συσχέτιση με την 5β-TRAP, δηλαδή ένα δείκτη οστικής απορρόφησης που βρέθηκε μόνο στις γυναίκες της μελέτης<sup>158</sup>. Σε μεσήλικες άνδρες, η OPG ορού και ο λόγος RANKL/OPG επίσης σχετιζόταν με την οστεοκαλσίνη ορού<sup>161</sup>. Σε μια άλλη μελέτη σε άνδρες, η ολική δεοξυπυριδινολίνη ούρων, δείκτης οστικής απορρόφησης, και η PTH ήταν αντιστρόφως ανάλογα με την OPG ορού<sup>155</sup>. Αντίθετα σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, παρατηρήθηκε σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ της OPG και δεικτών οστικού σχηματισμού και απορρόφησης στον ορό, αλλά όχι με δείκτες οστικής απορρόφησης στα ούρα ή την PTH<sup>156</sup>. Τέλος, σε Κινέζες διαφόρων ηλικιακών ομάδων, παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση της OPG ορού με τα NTX ούρων και αρνητική συσχέτιση του RANKL και του λόγου RANKL / OPG με την οστεοκαλσίνη ορού<sup>159</sup>.

Στις δύο τελευταίες μελέτες παρατηρήθηκε ασθενώς θετική συσχέτιση ( $r \sim 0,2$ ) μεταξύ της OPG και της  $E_2$  ορού, ενώ σε άλλες μελέτες, βρέθηκε αρνητική συσχέτιση<sup>161, 162</sup>. Ισχυρή θετική συσχέτιση βρέθηκε επίσης μεταξύ των επιπέδων της  $E_2$  και του λόγου RANKL / OPG<sup>161</sup>. Οι ανωτέρω παρατηρήσεις δεν επιβεβαιώθηκαν σε πρόσφατες μελέτες στις οποίες δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ της OPG<sup>163</sup> ή του λόγου OPG/RANKL<sup>153</sup> και της  $E_2$  ορού. Στους άνδρες, τα επίπεδα της τεστοστερόνης ορού δεν βρέθηκαν να σχετίζονται με την OPG ορού σε μια μελέτη<sup>161</sup>, ενώ σε άλλη έδειξαν αρνητική συσχέτιση με τον δείκτη ελεύθερων ανδρογόνων<sup>163</sup>.

Τα βιβλιογραφικά δεδομένα είναι αντικρουόμενα όσον αφορά τη μεταβολή των επιπέδων της OPG ορού μετά χορήγηση  $E_2$  ή την καταστολή της ενδογενούς παραγωγής της. Σε γυναίκες στις οποίες ανεστάλλει η λειτουργία των ωοθηκών, με χορήγηση  $E_2$  παρατηρήθηκε αύξηση της OPG ορού<sup>164</sup>, ενώ η συνδυασμένη χορήγηση  $17\beta-E_2$  και οξικής νορεθιστερόνης για ένα έτος σε πρόσφατα μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες συνοδεύθηκε από μείωση της OPG και του sRANKL<sup>165</sup>. Αντίθετα, η χρήση από του στόματος αντισυλληπτικών έχει σχετισθεί με αυξημένα επίπεδα της OPG ορού και αμετάβλητα του sRANKL<sup>166</sup>. Σε ηλικιωμένους άνδρες, στα επίπεδα της OPG ορού παρατηρήθηκε θετική επίδραση μετά εξωγενή χορήγηση  $E_2$  και αρνητική μετά χορήγηση τεστοστερόνης. Οι άνδρες αυτοί έγιναν οξέως υπογοναδικοί (με χορήγηση ενός GnRH αγωνιστή) και έλαβαν ταυτόχρονα αναστολέα της αρωματάσης, ώστε να ανασταλλεί η ενδογενής περιφερική σύνθεση οιστραδιόλης<sup>167</sup>. Οι παρατηρούμενες διαφορές στα ευρήματα των διαφόρων μελετών μπορεί να οφείλονται στον τύπο των χορηγούμενων σκευασμάτων, τη διάρκεια της χορήγησης τους ή σε ιδιαιτερότητες των μελετούμενων πληθυσμών.

Η σχέση οστικής πυκνότητας και επιπέδων OPG ορού μελετήθηκε και στα δύο φύλα. Η OPG ορού βρέθηκε να σχετίζεται θετικά με την οστική πυκνότητα (BMD) στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες<sup>156</sup> αλλά όχι στους άνδρες<sup>155</sup>, ενώ άλλη μελέτη σε μεσήλικες άνδρες έδειξε αρνητική συσχέτιση με την BMD στην σπονδυλική

στήλη <sup>161</sup>. Τέλος, σε μια Ιαπωνική μελέτη παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ της OPG και της BMD σε ασθενείς με μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση, που αποδόθηκε σε αντισταθμιστική αύξηση της OPG ώστε να προληφθεί η περαιτέρω οστική απώλεια <sup>168</sup>. Μεταγενέστερες μεγαλύτερες μελέτες, τόσο σε γυναίκες όσο και σε άνδρες, έδειξαν ισχυρή θετική συσχέτιση της OPG ορού με την ηλικία <sup>158, 159, 162, 163</sup>, αλλά όχι με την οστική πυκνότητα <sup>158, 159, 162</sup>, ενώ σε άλλη μελέτη βρέθηκε θετική συσχέτιση με την ηλικία, την ηλικία εμμηνόπαυσης και με την οστική πυκνότητα <sup>153</sup>. Ο sRANKL αναφέρεται να έχει αρνητική συσχέτιση με την ηλικία και καμία συσχέτιση με την οστική πυκνότητα όπως και ο λόγος RANKL/OPG <sup>159</sup>.

Όσον αφορά το ρόλο του φύλου, οι προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες βρέθηκε να έχουν υψηλότερα επίπεδα OPG ορού από συνομήλικους άνδρες. Αυτή διαφορά δεν παρατηρήθηκε μεταξύ μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών και συνομηλίκων τους ανδρών <sup>160</sup>. Τα ανωτέρω ευρήματα ενισχύουν την πιθανότητα η οιστρογονική επάρκεια να επηρεάζει τη σχέση μεταξύ της OPG ορού και του οστικού μεταβολισμού. Σύμφωνα με αυτή την άποψη είναι και η μελέτη του Fahrleitner-Pammer, που έδειξε θετική συσχέτιση μεταξύ OPG και οστικού μεταβολισμού μόνο σε μετεμμηνοπαυσιακές αλλά όχι σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες <sup>157</sup>.

### **Μεταβολές των επιπέδων της OPG και του sRANKL μετά χορήγηση διαφόρων θεραπευτικών παραγόντων**

Θεραπείες που τροποποιούν τον οστικό μεταβολισμό είναι λογικό να επηρεάζουν την παραγωγή OPG και RANKL. Έτσι, τα επίπεδα OPG και sRANKL στον ορό μπορεί να χρησιμεύσουν ως δείκτες θεραπευτικής ανταπόκρισης. Αρκετές μελέτες έχουν εκτιμήσει την *in vitro* επίδραση διαφόρων φαρμάκων στην έκφραση των κυτταροκινών αυτών.

**Οιστρογόνα.** *In vitro*, η 17-β οιστραδιόλη αυξάνει την παραγωγή OPG σε κύτταρα οστεοβλαστικής σειράς τόσο επίμυον <sup>113</sup> όσο και ανθρώπων <sup>112</sup>, ενώ η τεστοστερόνη την αναστέλλει <sup>169</sup>. Η *in vivo* επίδραση της θεραπείας με ορμόνες του φύλου στα επίπεδα της OPG στον ορό είναι λιγότερο ξεκάθαρη, καθώς ορισμένες μελέτες δείχνουν θετική, άλλες αρνητική και κάποιες καθόλου συσχέτιση μεταξύ τους, όπως αναφέρθηκε εκτενέστερα ανωτέρω.

**Διφωσφονικά.** Τα διφωσφονικά *in vitro* επηρεάζουν την παραγωγή της OPG. Τα ενδοφλέβια χορηγούμενα διφωσφονικά, παμιδρονάτη και ζολενδρονικό οξύ, αυξάνουν την έκφραση του OPG-mRNA σε ανθρώπινους οστεοβλάστες <sup>170</sup>. Ωστόσο, η OPG δεν μεταβλήθηκε μετά διητή θεραπεία με ετιδρονάτη σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα, παρά την σημαντική μείωση των δεικτών οστικού μεταβολισμού <sup>171</sup>. Επίσης, σε μια κλινική μελέτη, η χορήγηση τιλουδρονάτης προκάλεσε μείωση της OPG σε ασθενείς με *v.Paget*, αλλά καμία μεταβολή σε ασθενείς με οστεοπόρωση <sup>172</sup>. Αντίθετα, σε πρόσφατη μελέτη, η OPG αυξήθηκε σημαντικά μετά θεραπεία με παμιδρονάτη σε ασθενείς με *v.Paget* ενώ ο RANKL έδειξε τάση μείωσης και ο λόγος OPG / sRANKL μειώθηκε σημαντικά <sup>173</sup>. Οι συγγραφείς μάλιστα πρότειναν η αποτελεσματικότητα των αμινοδιφωσφονικών στη

ν.Paget να αξιολογείται από τις μεταβολές της OPG και του RANKL. Τέλος σε οστεοπορωτικούς ασθενείς, η χορήγηση αλενδρονάτης ή RIS προκάλεσε μια σημαντική αύξηση των επιπέδων της OPG ορού στους 6 και 12 μήνες θεραπείας, ενώ τα επίπεδα του sRANKL δεν μεταβλήθηκαν<sup>174</sup>. Ενδιαφέρον είναι ότι στους 12 μήνες αγωγής, τα επίπεδα της OPG ορού συσχετίστηκαν θετικά με τη μεταβολή της BMD και η συσχέτιση αυτή ήταν εντονότερη από την αρνητική συσχέτιση που εμφάνιζε η μείωση του CTX ορού με τη μεταβολή της BMD<sup>174</sup>. Η ραλοξιφαίνη φαίνεται να αυξάνει τα επίπεδα της OPG ορού σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες<sup>175</sup>.

Από τα ανωτέρω συνάγεται ότι υπάρχει σύγχυση στη βιβλιογραφία όσον αφορά τις μεταβολές της OPG και του sRANKL στην αντιοστεοκλαστική θεραπεία. Είναι ενδεχόμενο οι μεταβολές στο κυτταρικό επίπεδο να μην αντανακλώνται στις μεταβολές των δεικτών στην περιφερική κυκλοφορία. Είναι επίσης ενδεχόμενο η συνεπεία της θεραπείας επιβράδυνση του οστικού μεταβολισμού (bone turnover) και κατ' επέκταση η ελάττωση των οστεοβλαστών που κατεξοχήν παράγουν αυτές τις κυτταροκίνες, να επηρεάζει τα επίπεδα της OPG και του sRANKL.

Την άποψη αυτή ενισχύει η παρατήρηση ότι σημαντική μεταβολή της OPG ορού παρατηρήθηκε κυρίως σε μελέτες στις οποίες οι μετρήσεις έγιναν εντός λίγων ημερών από την έναρξη της θεραπείας, δηλαδή πριν αρχίσει να μειώνεται ο ρυθμός οστικού μεταβολισμού<sup>167</sup>.

**Ανάλογα παραθορμόνης.** Η συνεχής έγχυση PTH αυξάνει την έκφραση του RANKL και μειώνει της OPG σε οστεοβλάστες, *in vitro*<sup>108</sup>, ενώ η διακεκομμένη έγχυση της δεν μεταβάλλει το λόγο OPG / sRANKL<sup>176</sup>. Αυτές οι παρατηρήσεις βοηθούν την κατανόηση της αναβολικής επίδρασης της διακεκομμένης χορήγησης PTH. Σε γυναίκες με οστεοπόρωση από κορτικοειδή, η διακεκομμένη θεραπεία με PTH 1-34 προκάλεσε μια ταχεία, σημαντική αύξηση του sRANKL μέσα σε ένα μήνα από την έναρξη της, ενώ η OPG ορού μειώθηκε ελαφρά μετά από 6 μήνες θεραπείας<sup>177</sup>. Η επίδραση της ενδογενούς PTH στην OPG και sRANKL είναι λιγότερο ξεκάθαρη. Σε μια μικρή μελέτη 20 ασθενών με υπερπαραθυρεοειδισμό, η OPG ορού δεν μεταβλήθηκε σημαντικά μετά την παραθυρεοειδεκτομή<sup>178</sup>. Ωστόσο, η ίδια ερευνητική ομάδα βρήκε σημαντικά μειωμένο λόγο RANKL/OPG mRNA σε λαγόνιες οστικές βιοψίες των ασθενών<sup>179</sup>.

Επί του παρόντος, δεν συνιστάται η μέτρηση του διαλυτού RANKL και OPG για τη διάγνωση, πρόγνωση κινδύνου ή παρακολούθηση θεραπείας σκελετικών ή αγγειακών παθήσεων στην καθημερινή κλινική πράξη<sup>106</sup>.



## 4. ΜΕΤΕΜΜΗΝΟΠΑΥΣΙΑΚΗ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗ

### 4.1. Επιδημιολογία – κοινωνικοοικονομικές επιπτώσεις

Η οστεοπόρωση είναι μια συχνή πάθηση. Εκτιμάται ότι πάνω από 1,3 εκατομμύρια οστεοπορωτικά κατάγματα συμβαίνουν κάθε χρόνο στις ΗΠΑ. Περίπου μισά απ' αυτά είναι σπονδυλικά, ένα τέταρτο είναι κατάγματα ισχίου και ένα τέταρτο κατάγματα Colles'. Ο κίνδυνος θανάτου αυξάνεται σε ασθενείς με οστεοπορωτικά κατάγματα <sup>180</sup>.

Αν και ο κίνδυνος όλων των καταγμάτων αυξάνει δραματικά με την ηλικία, τα οστεοπορωτικά κατάγματα δεν περιορίζονται μόνο στους ηλικιωμένους. Ο εκτιμώμενος ισόβιος κίνδυνος κατάγματος του ισχίου για μια λευκή γυναίκα ηλικίας 50 ετών είναι περίπου 16% (έναντι 5% των ανδρών), ενώ ο συνολικός ισόβιος κίνδυνος για οστεοπορωτικό κάταγμα σε οποιαδήποτε θέση φτάνει το 40-50% για τις γυναίκες <sup>180, 181</sup>. Ο αντίστοιχος κίνδυνος στους άνδρες είναι 13-22%.

Περίπου 30% των γυναικών άνω των 50 ετών έχουν χαμηλή οστική μάζα και ο αριθμός αυτός αυξάνεται με την ηλικία. Χαμηλή οστική πυκνότητα στη σπονδυλική στήλη παρατηρείται περίπου στο 15% των γυναικών στην 6<sup>η</sup> δεκαετία της ζωής τους και σχεδόν στο 50% των γυναικών στην 8<sup>η</sup> και 9<sup>η</sup> δεκαετία.

Το εκτιμώμενο κόστος των οστεοπορωτικών καταγμάτων στις ΗΠΑ το 1995 ήταν 13,8 δις δολάρια <sup>182</sup>, ενώ είναι πολλαπλάσιο σήμερα κι αναμένεται να αυξάνεται εκθετικά τις επόμενες δεκαετίες. Η αύξηση της συχνότητας της οστεοπόρωσης και των επιπλοκών της σε σύγκριση με τις προηγούμενες δεκαετίες αποδίδεται στην αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης, την καθιστική ζωή και την έλλειψη άσκησης.

### 4.2. Θεραπευτική προσέγγιση

Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της οστεοπόρωσης έχουν ως στόχο να μεταβάλλουν τη ισορροπία μεταξύ οστικού σχηματισμού και απορρόφησης ώστε να δημιουργηθεί θετικό ισοζύγιο. Ανάλογα με το μηχανισμό δράσης τους διακρίνονται σε:

**Οστεοαναβολικά**, που διεγείρουν τη δραστηριότητα των οστεοβλαστών και επομένως αυξάνουν τον οστικό σχηματισμό. Περιλαμβάνουν την ΤΡΤΔ (ανθρώπινη ανασυνδυσασμένη ΡΤΗ 1-34) και την παραθορμόνη (ανθρώπινη ανασυνδυσασμένη ΡΤΗ 1-84).

**Αντιοστεοκλαστικά**, που αναστέλλουν τη δραστηριότητα και επιβίωση των οστεοκλαστών και επομένως την οστική απορρόφηση. Περιλαμβάνουν τα διφωσφονικά, τη θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης (Θ.Ο.Υ.), τη ραλοξιφένη, την καλσιτονίνη.

**Διπλού μηχανισμού δράσης**, που διεγείρουν τον οστικό σχηματισμό και ταυτόχρονα καταστέλλουν την οστική απορρόφηση. Τέτοια δράση πιθανώς ασκεί το ρανελικό στρόντιο.

### 4.1.1. Παραθορμόνη

#### Τεριπαρατίδη (PTH 1-34 – TPTD)

##### Εισαγωγή

Είναι γνωστό ότι, η χρόνια συνεχής έκθεση σε αυξημένα επίπεδα PTH, όπως π.χ. σε ασθενείς με υπερπαραθυρεοειδισμό, ασκεί καταβολική επίδραση στον σκελετό, οδηγώντας σε οστεοπόρωση, που προσβάλλει κυρίως το φλοιώδες οστό αφήνοντας σχετικά ανεπηρέαστο το σπογγώδες. Αντιθέτως, η διακεκομμένη χορήγηση PTH φαίνεται ότι έχει αναβολική δράση, οδηγώντας σε αύξηση οστικής μάζας.

Η τεριπαρατίδη (TPTD) ή ανασυνδυασμένη ανθρώπινη παραθορμόνη (recombinant human PTH – rhPTH 1-34) είναι ένα πολυπεπτίδιο αποτελούμενο από τα 34 πρώτα αμινοξέα του αμινοτελικού άκρου της φυσικής PTH (PTH 1-84), δηλαδή το τμήμα που θεωρείται υπεύθυνο για την άσκηση της βιολογικής δράσης της ορμόνης.

##### Μηχανισμός δράσης

Οι υποδοχείς της PTH περιλαμβάνουν:

- τον τύπου 1 υποδοχέα της (PTH / PTHrP Rc ή PTH-1 Rc)
- τον τύπου 2 υποδοχέα (PTH-2Rc) και
- ένα υποθετικό καρβοξυτελικό υποδοχέα (carboxy-terminal PTH-Rc).

Η αναβολική δράση της PTH ασκείται μέσω του PTH-1Rc. Η rhPTH 1-34 δεσμεύεται στον PTH-1Rc στην επιφάνεια των οστεοβλαστών και αυξάνει την παραγωγή cAMP μέσω διέγερσης G-πρωτεΐνης. Η διέγερση του οστικού σχηματισμού γίνεται με άμεση δράση στους οστεοβλάστες σε όλα τα επίπεδα. Ειδικότερα η PTH:

- ✓ προάγει την διαφοροποίηση καλυπτήριων κυττάρων και προ-οστεοβλαστών
- ✓ διεγείρει την δραστηριότητα των οστεοβλαστών
- ✓ παρατείνει την διάρκεια ζωής τους, αναστέλλοντας την απόπτωση τους

Η PTH διεγείρει την τοπική παραγωγή κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων. Έτσι αυξάνει την έκφραση IGF-1 από τα οστικά κύτταρα και διεγείρει την τοπική απελευθέρωση του, που προάγει την σύνθεση κολλαγόνου<sup>183</sup>. Αντίστροφα, τα anti-IGF-1 αντισώματα μπλοκάρουν την αναβολική δράση της PTH. Αλλά και η τοπική συγκέντρωση IGF-2 βρέθηκε σε οστικές βιοψίες ότι αυξάνει με την θεραπεία, τόσο στο σπογγώδες όσο και στο φλοιώδες οστό. Η τοπική αυτή παραγωγή IGF-2 ίσως διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο, καθώς θεωρείται ο σημαντικότερος IGF για το ανθρώπινο οστό. Άλλες κυτταροκίνες, που αυξάνονται τοπικά στο οστό με την διακεκομμένη χορήγηση PTH, είναι οι BMPs.

Επίσης η TPTD πιθανόν διεγείρει την έκφραση γονιδίων ουσιωδών για την ομαλή ανάπτυξη του σκελετού, όπως του cbfa-1, PPARγ, Runx2, osteorix, όπως φάνηκε in vitro σε κύτταρα της οστεοβλαστικής σειράς<sup>184</sup>.

Η αύξηση του όγκου του οστού θεωρείται αποτέλεσμα δύο διαφορετικών μηχανισμών:

- σχηματισμού οστού χωρίς απορρόφηση (modeling) σε «ήρεμες» (quiescent) οστικές επιφάνειες
- απορρόφησης και εν συνεχεία σχηματισμού οστού (remodeling) σε «ενεργές» θέσεις οστικής ανακατασκευής, με τον σχηματισμό να υπερέχει σημαντικά της απορρόφησης

Και οι δύο διεργασίες είναι εμφανείς κατά τον 6ο μήνα θεραπείας.

Η αύξηση του ρυθμού ανακατασκευής παραδοσιακά σχετιζόταν με αυξημένο κίνδυνο κατάγματος (υπερθυρεοειδισμός, υπερπαραθυρεοειδισμός). Ωστόσο, ίσως έχει θετική επίδραση στον σκελετό, μειώνοντας τη συσσώρευση μικροκακώσεων μέσω ταχύτερης αντικατάστασης του παλαιού οστού από νέο.

Από ιστολογικές μελέτες αλλά και μελέτες με σύγχρονες απεικονιστικές τεχνικές όπως η micro-CT, φαίνεται ότι η rhPTH όχι μόνο αυξάνει την οστική πυκνότητα, αλλά βελτιώνει και την μικροαρχιτεκτονική του οστού<sup>185</sup>. Έτσι, στο σπογγώδες οστό αυξάνει ο αριθμός και το πάχος των δοκίδων αλλά και η σύνδεση (connectivity) μεταξύ τους, ενώ βελτιώνεται και η μορφολογία τους προς μια περισσότερο πεταλιοειδή (plate-like) δομή. Στο φλοιώδες αυξάνει το πάχος του φλοιού αλλά και η εγκάρσια διάμετρος του οστού, λόγω περιοστικής αλλά και ενδοοστικής εναπόθεσης, με αποτέλεσμα μεγαλύτερη μηχανική αντοχή (για οστά με την ίδια οστική πυκνότητα το μεγαλύτερο μέγεθος συνεπάγεται μεγαλύτερη αντοχή). Αύξηση παρατηρείται και στον αριθμό των πόρων (porosity) του φλοιώδους οστού, η οποία είναι μέγιστη τον 6ο μήνα αγωγής. Ωστόσο αυτή δεν θεωρείται ότι επιβαρύνει τις μηχανικές ιδιότητες του οστού. Η χορήγηση της rhPTH δεν σχετίζεται με εμφάνιση οστεομαλακίας ή υφαντού (woven) οστού.

Μετά θεραπεία με rhPTH η οστική μάζα αυξάνει περισσότερο στις θέσεις σπογγώδους οστού παρά στο φλοιώδες. Δεδομένου ότι η rhPTH διεγείρει στον οστικό σχηματισμό, αυτό πιθανώς οφείλεται στον ταχύτερο ρυθμό ανακατασκευής που εμφανίζει το σπογγώδες οστό.

### **Φαρμακοκινητική**

Μετά την υποδόρια ένεση του, το φάρμακο απορροφάται ταχέως. Η μέγιστη συγκέντρωση της rhPTH στο αίμα παρατηρείται 30 λεπτά αργότερα. Στην συνέχεια παρατηρείται προοδευτική μείωση και 3 ώρες μετά δεν είναι ανιχνεύσιμη. Ο μεταβολισμός και η κάθαρση, όπως και με την φυσική PTH, γίνονται κυρίως από το ήπαρ, τον νεφρό και τον σκελετό. Ο χρόνος ημίσειας ζωής του μορίου είναι περίπου 10 λεπτά.

### **Δοσολογία –τρόπος χορήγησης**

Η TPTD έχει χορηγηθεί σε δόση 20μg, 25μg και 40μg ημερησίως στα πλαίσια προκλινικών και κλινικών δοκιμών. Επίσης έχει χορηγηθεί πειραματικά και σε εβδομαδιαία υποδόρια ένεση σε διάφορες δόσεις<sup>186, 187</sup>. Στις δοκιμές αυτές, η

αύξηση της οστικής πυκνότητας και η μείωση του κινδύνου κατάγματος ήταν δοσοεξαρτώμενες. Όμως, και η συχνότητα των ανεπιθύμητων ενεργειών αυξανόταν με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Έτσι, η δόση με την οποία έχει εγκριθεί και κυκλοφορεί το φάρμακο στην αγορά είναι τα 20μg ημερησίως.

Η χορήγηση της ουσίας γίνεται με υποδόρια ένεση στην κοιλιά ή στον μηρό, με τρόπο ανάλογο της ινσουλίνης. Η χρονική στιγμή εκτέλεσης της ένεσης συνιστάται να είναι σταθερή, κατά προτίμηση το πρωί και δεν επηρεάζεται από τον χρόνο λήψης της τροφής. Δεν έχουν αναφερθεί αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα.

Λόγω τεχνικών δυσκολιών στην χρήση του σκευάσματος, ιδίως από ηλικιωμένα άτομα, καταβάλλονται προσπάθειες να βρεθεί ένας βολικότερος τρόπος χορήγησης του. Δεδομένου ότι ως πεπτιδική ορμόνη δεν μπορεί να χορηγηθεί από το στόμα, έχει δοκιμαστεί πειραματικά, με ενθαρρυντικά αρχικά αποτελέσματα, η απορρόφηση μέσω πνευμόνων<sup>188</sup>, ενώ και η διαδερμική χορήγηση PTH 1-34, με εφαρμογή αυτοκόλλητου 30μg (macroflux patch) στο βραχίονα, είχε ανάλογη βιοχημική επίδραση με την υποδόρια ένεση<sup>189</sup>. Επίσης, έχει δοκιμαστεί η ημερήσια ενδορρινική χορήγηση PTH 1-34. Και αυτή ήταν καλά ανεκτή, ασφαλής και αύξησε ταχέως και δοσοεξαρτώμενα την οστική πυκνότητα στη σπονδυλική στήλη μετά 3 μήνες θεραπείας<sup>190</sup>.

Μια εναλλακτική προσέγγιση μπορεί στο μέλλον να αποτελέσει η χρήση ασβεσπιολυτικών παραγόντων (calciolytics), που δεσμεύουν τους αισθητήρες ασβεστίου (ασβεστιοστάτη) στα παραθυρεοειδικά κύτταρα διεγείροντας την έκκριση της ενδογενούς PTH, η οποία θα μπορούσε να δρα αναβολικά στο σκελετό<sup>191</sup>. Επίσης μελετάται η χρήση αναλόγων PTH που θα διεγείρουν μόνο τον PTH-1R, ασκώντας εκλεκτικά μόνο την οστεοαναβολική δράση της ορμόνης.

### **Αποτελεσματικότητα**

Οι δείκτες οστικού μεταβολισμού αυξάνονται από τους πρώτους μήνες αγωγής: αρχικά οι δείκτες οστικού σχηματισμού (μέγιστη διέγερση στους πρώτους τρεις μήνες) και στη συνέχεια και οι δείκτες οστικής απορρόφησης, ενώ η βελτίωση της δομής του οστού γίνεται εμφανής μετά 12-24 μήνες<sup>192</sup>. Η απάντηση στην αγωγή φαίνεται ότι είναι ανεξάρτητη από την ηλικία, την αρχική οστική πυκνότητα, τον αριθμό ή την θέση των καταγμάτων<sup>193</sup>.

**Μεταβολές των δεικτών οστικού μεταβολισμού.** Η TPTD, όπως αναφέρθηκε, χαρακτηρίζεται από αύξηση του οστικού σχηματισμού τόσο στις θέσεις οστικής ανακατασκευής όσο και σε «ήρεμες» επιφάνειες, που δεν λαμβάνουν μέρος στην διαδικασία της ανακατασκευής την συγκεκριμένη χρονική περίοδο. Λόγω της σύζευξης σχηματισμού-απορρόφησης, ο ρυθμός οστικής ανακατασκευής επιταχύνεται, με αποτέλεσμα οι δείκτες οστικής απορρόφησης, τόσο στο αίμα όσο και στα ούρα, να αυξάνονται<sup>194</sup>. Το μέγεθος της αύξησης ξεπερνά το 100% της αρχικής τιμής και οι δείκτες οστικού σχηματισμού αυξάνουν ταχύτερα και πρωιμότερα συγκριτικά με τους δείκτες απορρόφησης<sup>195-199</sup>. Η μεταβολή των δεικτών σχηματισμού παρατηρείται ήδη από τις πρώτες 28 ημέρες μετά την έναρξη της θεραπείας<sup>200</sup>. Αυτό μπορεί να αντανακλά τις άμεσες μεταβολικές επιδράσεις της



TPTD, που παρατηρούνται πριν την επιτάχυνση του ρυθμού οστικής ανακατασκευής. Ένα άλλο χαρακτηριστικό της μεταβολής των δεικτών είναι η τάση να επιτυγχάνουν τη μέγιστη αύξηση εντός των πρώτων 12 μηνών αγωγής και εν συνεχεία να υποχωρούν βαθμιαία στους επόμενους 12-24 μήνες. Δεν είναι γνωστό αν αυτό αντιπροσωπεύει μια μορφή ταχυφυλαξίας στα πεπτίδια της PTH, με αποτέλεσμα μειωμένη σκελετική απάντηση με το πέρασμα του χρόνου<sup>200</sup>.

Σε μια πρόσφατη μελέτη ιστομορφομετρίας σε ασθενείς που έλαβαν PTH 1-34, η πρώιμη μεταβολή των δεικτών οστικού σχηματισμού (PICP ορού και οστικής ΑΦ) αλλά όχι των δεικτών οστικής απορρόφησης, σχετίστηκε με βελτίωση της οστικής δομής στους 22 μήνες, όπως αυτή εκτιμήθηκε με βιοψίες λαγόνιας ακρολοφίας<sup>201</sup>.

Η μέτρηση του PINP στους 3 μήνες αγωγής συσχετίζεται καλύτερα από τους άλλους δείκτες με την αύξηση της οστικής πυκνότητας στην σπονδυλική στήλη στους 18 μήνες. Επομένως, αυτός θεωρείται ο καλύτερος δείκτης αποτελεσματικότητας της συγκεκριμένης θεραπείας<sup>125</sup>. Ωστόσο, και στα άτομα που δεν αυξάνουν την BMD μετά θεραπεία με TPTD το PINP φαίνεται ότι αυξάνεται σημαντικά (>10mg/l), αν και λιγότερο απ' ό,τι στα άτομα με αύξηση της BMD<sup>202</sup>.

Από πολλούς προτείνεται η μέτρηση του PINP ορού στον 1-3 μήνες από την έναρξη της θεραπείας με TPTD για αξιολόγηση της συμμόρφωσης και της ανταπόκρισης στην θεραπεία. Θετική απάντηση (αύξηση πάνω από 10μg/l) έχει παρατηρηθεί σε 80% περίπου των ατόμων που έλαβαν τη συγκεκριμένη αγωγή. Σε ασθενείς με αύξηση μικρότερη ή ίση με 10μg/l πρέπει να ελέγχεται η συμμόρφωση, η σωστή αποθήκευση και η σωστή τεχνική λήψης του φαρμάκου, καθώς και η παρουσία άλλων παθήσεων ή καταστάσεων που θα μπορούσαν να περιορίσουν τη θεραπευτική απάντηση<sup>126</sup>.

**Μεταβολές οστικής πυκνότητας.** Πολλές μελέτες έχουν τεκμηριώσει την αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Η οστική πυκνότητα αυξάνει σημαντικά στην σπονδυλική στήλη (>10%), λιγότερο στο ισχίο (3-4%) όπου η αύξηση εμφανίζεται πιο όψιμα, ενώ στην κερκίδα παραμένει σταθερή ή εμφανίζει ήπια μείωση<sup>121</sup>. Η τελευταία αποδίδεται στην αύξηση της διαμέτρου του οστού, που δίνει μια “ψευδή” εικόνα μείωσης της BMD και στην συνυπάρχουσα αύξηση του αριθμού πόρων (porosity). Ωστόσο η αύξηση του αριθμού πόρων δεν φαίνεται να επηρεάζει την μηχανική αντοχή, καθώς εντοπίζεται κυρίως ενδοφλοιϊκά, όπου η μηχανική επίδραση είναι μικρή και αντισταθμίζεται από την αύξηση του όγκου του φλοιώδους οστού<sup>203</sup>. Η pQCT έχει δείξει ευεργετική μεταβολή της αρχιτεκτονικής και στην κερκίδα ασθενών υπό αγωγή με TPTD<sup>204</sup>.

Σε γυναίκες με μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση και κάταγμα, που δεν είχαν λάβει στο παρελθόν αντιοστεοπορωτική αγωγή (Fracture Prevention Trial), η χορήγηση 40μg έναντι 20μg TPTD μετά διάστημα 19 μηνών αύξησε την BMD κατά 13,7% στην σπονδυλική στήλη έναντι 9,7% και 3,6 στο ισχίο έναντι 2,6%<sup>121</sup>.

Η θεραπεία με TPTD εμφανίζει την ίδια θετική επίδραση στην BMD σπονδυλικής στήλης και ισχίου, αλλά και τις ίδιες ανεπιθύμητες ενέργειες σε άνδρες με ιδιοπαθή οστεοπόρωση ή υπογοναδισμό<sup>198</sup>, σε οστεοπόρωση από κορτικοειδή<sup>205</sup>



και σε πρόληψη της οστεοπόρωσης που προκαλείται από θεραπευτική χορήγηση GnRH αναλόγων<sup>197</sup>.

Σε σύγκριση με την αλενδρονάτη σε δόση 10mg, η TPTD σε δόση 40μg μετά 14 μήνες θεραπείας σε γυναίκες με μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση, αύξησε περισσότερο την οστική πυκνότητα στην σπονδυλική στήλη (12,2% vs 5,6%), το ισχίο (4,7% vs 2,5%) και την BMC (15,1 vs 6,6%) ενώ μείωσε την BMD στην κερκίδα κατά 3,4% έναντι αύξησης 0,2% της αλενδρονάτης. Όπως αναμενόταν η επίδραση των δύο φαρμάκων στους δείκτες οστικού μεταβολισμού ήταν αντίθετη<sup>199</sup>. Σε άλλες μελέτες σύγκρισης των δύο φαρμάκων τα αποτελέσματα ήταν ανάλογα για την σπονδυλική στήλη, ενώ στο ισχίο η παραθορμόνη φαίνεται να είναι περισσότερο<sup>206</sup> ή λιγότερο<sup>207</sup> αποτελεσματική από την αλενδρονάτη. Εδώ η διαφορά φαίνεται να εξαρτάται και από την διάρκεια λήψης της αγωγής, καθώς η αύξηση της οστικής πυκνότητας του ισχίου με την παραθορμόνη είναι μεγαλύτερη όψιμα, μετά το πρώτο έτος θεραπείας.

Η αποτελεσματικότητα της θεραπείας με TPTD ίσως υποεκτιμάται όταν αυτή κρίνεται μόνο με την μεταβολή της οστικής πυκνότητας, που προσδιορίζει η DEXA, διότι:

- η κρυστάλλωση (επιμετάλλωση) του οστού είναι μικρότερη, ιδίως τους πρώτους 6 –12 μήνες θεραπείας, επειδή το οστό είναι νεαρότερο λόγω ταχύτερου ρυθμού ανακατασκευής
- η αύξηση της διαμέτρου των φλοιωδών οστών, λόγω περιοριστικής εναπόθεσης νεοσχηματισμένου οστού με την αγωγή, αυξάνει την ισχύ του οστού χωρίς αυτό να απεικονίζεται στην μέτρηση της BMD<sup>208</sup>
- η DEXA υπολογίζει μόνο την ποσότητα του οστού, ενώ αδυνατεί να αξιολογήσει την εξίσου σημαντική για την μηχανική αντοχή μικροαρχιτεκτονική του

Καλύτερη εκτίμηση της αρχιτεκτονικής του σπογγώδους οστού παρέχεται με την ποσοτική αξονική τομογραφία (pQCT), η οποία απεικονίζει το σώμα του σπονδύλου, παρακάμπτοντας σφάλματα από οστεόφυτα και επασβεστώσεις κοιλιακής αορτής. Υπάρχει πλέον σε ερευνητικό επίπεδο και η δυνατότητα εκτίμησης της μικροαρχιτεκτονικής με «εικονική» βιοψία του οστού χρησιμοποιώντας υπερευαίσθητες τεχνικές, όπως η Μαγνητική Τομογραφία υψηλής ανάλυσης (high resolution ή micro-MRI) και η τρισδιάστατη Ποσοτική Αξονική Τομογραφία (3D pQCT).

Υπάρχει σημαντική διακύμανση της απάντησης του σκελετού στην PTH από άτομο σε άτομο. Κανένας βιοχημικός δείκτης ούτε ο δείκτης μάζας σώματος (BMI) ή η BMD βρέθηκε να ευθύνονται γι' αυτή την ετερογένεια<sup>209</sup>. Πάντως, πάνω από 90% (91-94%) των ασθενών που λαμβάνουν αγωγή με TPTD σε δόση 20μg ημερησίως, εμφανίζουν σημαντική αύξηση στην οστική τους πυκνότητα στη σπονδυλική στήλη (πάνω από 3%). Τα χαρακτηριστικά των ασθενών που δεν απαντούν στη θεραπεία (nonresponders) δεν φαίνεται να διαφέρουν απ' αυτά των ατόμων που απαντούν (responders). Έτσι, προς το παρόν δεν έχουν εντοπιστεί τα χαρακτηριστικά εκείνα που θα βοηθούσαν στην αναγνώριση των ατόμων που δεν θα ανταποκριθούν στην αγωγή<sup>202</sup>.

**Μείωση του κινδύνου κατάγματος.** Στην Fracture Prevention Trial <sup>121</sup>, στις δόσεις των 40μg και 20μg TPTD, η μείωση του κινδύνου σπονδυλικού κατάγματος ήταν 69% vs 65% και μη σπονδυλικού 54% vs 53%, αντίστοιχα. Ανάλογη μείωση του κινδύνου κατάγματος έχει βρεθεί και σε ασθενείς με οστεοπόρωση από κορτικοειδή <sup>205</sup>.

Η αντικαταγματική επίδραση της TPTD είναι ανεξάρτητη από το ρυθμό οστικού μεταβολισμού κατά την έναρξη της αγωγής <sup>210</sup>.

**Κλινική βελτίωση.** Η ποιότητα ζωής εμφανίζεται βελτιωμένη μετά από θεραπεία με PTH 1-34 <sup>211</sup> ενώ η μείωση του άλγους στην πλάτη ανήλθε σε 26% <sup>121</sup>. Διενεργούνται ήδη προκλινικές δοκιμές σε πειραματόζωα, με σκοπό να εκτιμήσουν την επίδραση της PTH στη συντόμευση του χρόνου επούλωσης καταγμάτων ισχίου.

### **Ανοχή – ανεπιθύμητες ενέργειες**

Γενικά, το φάρμακο είναι καλά ανεκτό. Ως συχνότερες ανεπιθύμητες ενέργειες αναφέρονται η ζάλη (2,6%), κράμπες των κάτω άκρων (2%), και σπανιότερα ναυτία, κεφαλαλγία και αρθραλγίες. Από την προσωπική μας εμπειρία, επί ύπαρξης συμπτωμάτων, η μετατόπιση της ώρας ένεσης του φαρμάκου προ της κατάκλισης, συχνά μετριάξει τις ενοχλήσεις. Η χορήγηση σ' αυτές τις περιπτώσεις φαίνεται να είναι εξίσου αποτελεσματική, παρότι δεν μιμείται τον φυσιολογικό κερκάρδιο ρυθμό έκκρισης της PTH.

Η χορήγηση PTH 1-34 συνοδεύεται από ήπιες βιοχημικές μεταβολές οι οποίες αναστρέφονται με τη διακοπή της αγωγής. Από τις βιοχημικές παραμέτρους έχει παρατηρηθεί:

- παροδική αύξηση του ασβεστίου ορού 4-6 ώρες μετά την ένεση στην πλειοψηφία των ασθενών, συνήθως εντός φυσιολογικών ορίων. Επίμονη ήπια υπερασβεστιαμία αναφέρεται σε ποσοστό 11% στη δόση των 20μg.
- μέση αύξηση του ασβεστίου ούρων 24ωρου κατά 30mg/dl (συνήθως εντός φυσιολογικών ορίων – δεν προκαλεί κλινικό πρόβλημα)
- αύξηση του ουρικού οξέος ορού κατά 13-25%
- δική μας πρόσφατη μελέτη έχει δείξει μια ήπια διαταραχή του μεταβολισμού γλυκόζης σε ασθενείς που έλαβαν TPTD ως θεραπεία της οστεοπόρωσης <sup>212</sup>

Η λειτουργία των παραθυρεοειδών δεν φαίνεται να καταστέλλεται από την rhPTH ως και μετά 3 έτη θεραπείας <sup>213</sup>. Επίσης δεν παρατηρούνται επασβεστώσεις των μαλακών μορίων. Η αρτηριακή πίεση και η συχνότητα καρδιαγγειακών συμβαμάτων δε μεταβάλλεται στους ασθενείς υπό αγωγή με rhPTH.

Σχετική ανησυχία όσον αφορά την ασφάλεια της rhPTH, είχε προκληθεί μετά τη διαπίστωση αυξημένης συχνότητας οστεοσαρκώματος, σε επίμνες στους οποίους χορηγήθηκαν ισοβίως μεγάλες δόσεις του φαρμάκου (3 ως 60 φορές μεγαλύτερες από τη χορηγούμενη δόση στους ανθρώπους) <sup>214</sup>. Λόγω αυτής της παρατήρησης διακόπηκαν πρώιμα όλες οι κλινικές μελέτες με την TPTD το 1998, μεταξύ των οποίων και η Fracture Prevention Trial. Η εμφάνιση νεοπλασμάτων των οστών στους επίμνες φαίνεται ότι σχετίζεται άμεσα με τη δόση αλλά και τη διάρκεια της

θεραπείας <sup>215</sup>. Ωστόσο, πολλές μελέτες που ακολούθησαν, τόσο σε πειραματόζωα (ποντίκια, πιθήκους) όσο και σε ανθρώπους με τις συνήθεις θεραπευτικές δόσεις, δεν έδειξαν αυξημένη επίπτωση οστεοσαρκώματος <sup>121</sup>. Εξάλλου, οι ασθενείς με χρόνια υπερπαραθυρεοειδισμό, πρωτοπαθή ή δευτεροπαθή, δεν εμφανίζουν αυξημένη συχνότητα οστεοσαρκώματος. Σε καμία μελέτη δεν βρέθηκε αύξηση της συχνότητας άλλης κακοήθειας μετά αγωγή με tPTH.

Ενδιαφέρον είναι ότι η PTH 1-84 βρέθηκε σε μια μελέτη να προκαλεί πολύ χαμηλότερα ποσοστά καρκινογένεσης στους επίμυες, σε όλες τις δόσεις, σε σύγκριση με την PTH 1-34. Και τα δύο πεπτίδια περιέχουν την αμινοτελική περιοχή που ενεργοποιεί τον υποδοχέα PTH-1R προκαλώντας τις αναβολικές επιδράσεις. Σε αντίθεση όμως με την PTH 1-34, η PTH 1-84 περιέχει την καρβοξυτελική περιοχή που ενεργοποιεί διαφορετικό υποδοχέα. Η δέσμευση αυτού του υποδοχέα ίσως παίζει ρόλο στην αποφυγή της καρκινογένεσης <sup>216</sup>.

### Ενδείξεις – Αντενδείξεις χορήγησης της TPTD

Ασθενείς κατάλληλοι για θεραπεία με TPTD είναι:

- γυναίκες με σοβαρή μετεμμηνοπαυσιακή – γεροντική οστεοπόρωση
  - άνδρες με οστεοπόρωση ιδιοπαθή ή λόγω υπογοναδισμού
  - άτομα με οστεοπόρωση από κορτικοειδή
- ιδίως εάν έχουν σοβαρή οστεοπόρωση, με πολλαπλούς παράγοντες κινδύνου για κάταγμα, ή ιστορικό οστεοπορωτικού κατάγματος ή υπέστησαν κάταγμα υπό αγωγή με αντιοστεοκλαστικά.

Σε πάσχοντες από χρόνια νεφρική ανεπάρκεια και σοβαρή οστεοπόρωση η TPTD δεν έχει δοκιμαστεί θεραπευτικά. Πιθανώς η χρονίως αυξημένη PTH, που έχουν τα άτομα αυτά λόγω δευτεροπαθούς υπερπαραθυρεοειδισμού, να δρα ανταγωνιστικά στον οστικό μεταβολισμό.

Ασθενείς πιθανόν υψηλού κινδύνου για ανάπτυξη οστεοσαρκώματος, στους οποίους προτείνεται να αποφεύγεται η θεραπεία με TPTD είναι άτομα με v. Paget, ανεξήγητη αύξηση της ΑΦ, ανοιχτές επιφύσεις (παιδιά, νέοι) και ιστορικό εξωτερικής ακτινοβολίας του σκελετού (θεραπεία λεμφώματος, Α/Θ μετά καρκίνο μαστού - έχει αναφερθεί οστεοσάρκωμα στέρνου ως και 20 έτη μετά). Επίσης η αγωγή δεν ενδείκνυται σε άτομα με ιστορικό κακοηθειών των οστών ή οστικές μεταστάσεις άλλων νεοπλασμάτων, άλλες μεταβολικές νόσους των οστών (υπερθυρεοειδισμό, υπερπαραθυρεοειδισμό κ.τ.λ), προϋπάρχουσα υπερασβεστιαμία, πρόσφατη ή ενεργό νεφρολιθίαση, αιματολογικές κακοήθειες και καρκίνο μαστού και προστάτη, διότι έχουν βρεθεί υποδοχείς PTH σε μονοκύτταρα και σε καρκινικά κύτταρα μαστού και προστάτη. Δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα σχετικά με την λήψη της TPTD από ασθενείς με ηπατική, νεφρική ή καρδιαγγειακή νόσο. Συνιστάται προσοχή κατά την χορήγηση της σε ασθενείς που λαμβάνουν δακτυλίτιδα.

## **Παραθορμόνη 1-84**

Πρόκειται για ανθρώπινη συνθετική παραθορμόνη που αποτελείται από 84 αμινοξέα, όπως και το ακέραιο μόριο της φυσικής PTH. Χορηγείται σε δόση 100μg με τρόπο ανάλογο εκείνου της TPTD (μια υποδόρια ένεση ημερησίως). Η μεταβολή των δεικτών οστικού μεταβολισμού είναι ανάλογη αυτής που παρατηρείται με την PTH 1-34 <sup>217</sup>. Η PTH 1-84 έχει αποδειχθεί αποτελεσματική στη θεραπεία της οστεοπόρωσης σε μελέτες τόσο σε πειραματόζωα <sup>218, 219</sup> όσο και σε ανθρώπους <sup>207, 220</sup>.

## **Άλλα πεπτιδικά τμήματα του μορίου της PTH**

Άλλα τμήματα του μορίου της PTH (PTH 1-38) ή του πεπτιδίου που σχετίζεται με την PTH (PTHrP 1-36) καθώς και ανάλογα της PTH (SDZ-PTH-893) βρίσκονται επίσης υπό δοκιμή και φαίνεται ότι επίσης ασκούν ευεργετική επίδραση στην οστική μάζα. Φαίνεται πως όλες αυτές οι ουσίες δρουν μέσω ενός κοινού PTH / PTHrP υποδοχέα. Συγκριτικές μελέτες μεταξύ αυτών των ανάλογων πεπτιδίων έχουν διεξαχθεί σε μοντέλα πειραματόζωων και δείχνουν κάποιες διαφορές υπέρ του ενός ή του άλλου, που πιθανόν είναι δοσοεξαρτώμενες <sup>221-224</sup>.

### **4.1.2. Διφωσφονικά**

#### **Εισαγωγή**

Είναι πυροφωσφορικά ανάλογα που αναστέλλουν την οστική απορρόφηση και σε μικρότερο βαθμό τον οστικό σχηματισμό με αποτέλεσμα σε τρεις ως έξι μήνες να επιτυγχάνεται μια νέα ισορροπία μεταξύ των δύο παραμέτρων της οστικής ανακατασκευής.

Η μείωση του ρυθμού οστικής ανακατασκευής έχει ευεργετικές επιδράσεις στην οστική ισχύ και συγκεκριμένα: 1) αυξάνει την οστική πυκνότητα, μέσω μείωσης του μεγέθους της επιφάνειας ανακατασκευής, 2) διατηρεί την μικροαρχιτεκτονική του σπογγώδους οστού, 3) μειώνει τον αριθμό των κοιλοτήτων απορρόφησης, που συσσωρεύουν μηχανικό στρες με κίνδυνο την εμφάνιση μηχανικής ανεπάρκειας σε έντονη φόρτιση, 4) αυξάνει το βαθμό επιμετάλλωσης του οστού και 5) μειώνει τον αριθμό των πόρων (porosity) <sup>225, 226</sup>.

#### **Μηχανισμός δράσης**

Τα διφωσφονικά αναστέλλουν την οστική απορρόφηση μέσω μηχανισμών που διαφέρουν από τους μηχανισμούς των άλλων αντιοστεοκλαστικών <sup>227</sup>. Προσκολλώνται στις οστικές επιφάνειες, ιδίως αυτές όπου γίνεται ενεργός οστική απορρόφηση και ενσωματώνονται στους κρυστάλλους υδροξυαπατίτη. Όταν ο οστεοκλάστης κατά τη διαδικασία της οστικής ανακατασκευής διαβρώσει το οστό, τα διφωσφονικά φαγοκυτταρώνονται από τους οστεοκλάστες και μετατρέπονται εντός τους σε τοξικά ανάλογα του ATP τα οποία εμποδίζουν την δημιουργία της κυματιστής παρυφής (ruffled border), την προσκόλληση τους στην οστική επιφάνεια και την παραγωγή πρωτονίων, που είναι απαραίτητα για την οστεόλυση.



Εκτός από τον αναφερθέντα, έχουν διαπιστωθεί *in vitro* και άλλοι μηχανισμοί αναστολής της ενεργοποίησης των οστεοκλαστών, που δεν εξαρτώνται από την απελευθέρωση διφωσφονικών στην οστική επιφάνεια. Ειδικότερα παρατηρείται:

- μείωση του αριθμού των οστεοκλαστών, πιθανώς μέσω αναστολής πολλαπλασιασμού των πρόδρομων τους <sup>228</sup> ή προαγωγής της απόπτωσης των ώριμων οστεοκλαστών <sup>229</sup>. Ο κυτταρικός μηχανισμός προαγωγής της απόπτωσης μπορεί να σχετίζεται με την ικανότητα των διφωσφονικών να αναστέλλουν τη σύνθεση της γερανυλγερανιόλης, ενός προϊόντος που παράγεται κατά τη διαδικασία σύνθεσης της χοληστερόλης <sup>230</sup>
- αναστολή της παραγωγής IL-6 <sup>231</sup>
- διέγερση παραγωγής των πρόδρομων μορφών των οστεοβλαστών <sup>232</sup>
- αναστολή της σύνθεσης χοληστερόλης από τον ώριμο οστεοκλάστη μέσω αναστολής του ενζύμου φαρνεσυλ-διφωσφορική συνθετάση <sup>233</sup>

Παρά τις δομικές ομοιότητες, τα διφωσφονικά εμφανίζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, όσον αφορά την αποτελεσματικότητα και την τοξικότητα τους. Οι διαφορές αυτές πιθανώς σχετίζονται με τις μικροδιαφορές στο μηχανισμό δράσης των διαφόρων διφωσφονικών. Η αλενδρονάτη, η ρισενδρονάτη (RIS) και η ιμπανδρονάτη αποτελούν τους ισχυρότερους από του στόματος εκπροσώπους της κατηγορίας, ενώ η ετιδρονάτη και η τιλουδρονάτη είναι πολύ ασθενέστερες, πιθανώς λόγω διαφορετικού μηχανισμού δράσης. Τα πιο ισχυρά διφωσφονικά φαίνεται να δρουν κυρίως αναστέλλοντας τη σύνθεση χοληστερόλης, ενώ τα λιγότερο ισχυρά προκαλώντας απόπτωση των οστεοκλαστών <sup>233</sup>. Αλλά και μεταξύ των ισχυρών διφωσφονικών έχουν εντοπιστεί διαφορές στον τρόπο δράσης. Η RIS, για παράδειγμα, συνδέεται στον υδροξυαπατίτη λιγότερο ισχυρά από την αλενδρονάτη και την ιμπανδρονάτη <sup>234</sup>, ενώ αναστέλλει την φαρνεσυλ-διφωσφορική συνθετάση πολύ ισχυρότερα από τα τελευταία <sup>235</sup>.

Υπάρχουν επίσης διαφορές μεταξύ των διφωσφονικών όσον αφορά τη δεύτερη δράση τους στο οστό, δηλαδή την αναστολή της μετάλλωσης και την πρόκληση οστεομαλακίας. Η ετιδρονάτη, για παράδειγμα, αναστέλλει εξίσου την οστική απορρόφηση και τη μετάλλωση (1:1). Η αναλογία αυτή για την αλενδρονάτη είναι 1:1000, δηλαδή η δόση του φαρμάκου που αναστέλλει τη μετάλλωση του οστού είναι 1000 φορές μεγαλύτερη αυτής που αναστέλλει την οστική απορρόφηση. Η αντίστοιχη αναλογία για τη RIS είναι σχεδόν 1:10000. Επομένως, η αλενδρονάτη και η RIS είναι πρακτικά απίθανο να προκαλέσουν οστεομαλακία όταν χορηγούνται θεραπευτικά για μεγάλο διάστημα <sup>236</sup>.

### **Φαρμακοκινητική**

Η απορρόφηση των διφωσφονικών από το γαστρεντερικό είναι πτωχή, μόλις 1-5% της χορηγούμενης από στόματος δόσης, και μεγιστοποιείται όταν ο ασθενής είναι νηστικός <sup>237</sup>. Περίπου 80% του απορροφούμενου διφωσφονικού καθαίρεται από τους νεφρούς, ενώ το υπόλοιπο 20% είναι αυτό που προσλαμβάνεται από το σκελετό. Η σχετική πρόσληψη του διφωσφονικού αυξάνεται σε καταστάσεις αυξημένου ρυθμού οστικού μεταβολισμού, οπότε λιγότερο φάρμακο απεκκρίνεται



στους νεφρούς. Ο χρόνος ημίσειας ζωής τους στο πλάσμα είναι περίπου μια ώρα, ενώ η διάρκεια παραμονής τους στο σκελετό μπορεί να είναι ισόβια<sup>237</sup>.

### Δοσολογία – τρόπος χορήγησης

Τα τελευταία έτη έχει επικρατήσει η εβδομαδιαία/μηνιαία χορήγηση των διφωσφονικών έναντι της καθημερινής, καθώς επιτυγχάνει καλύτερη συμμόρφωση λόγω δοσολογικής ευκολίας<sup>238</sup>, ανάλογη αποτελεσματικότητα, με κριτήριο τους δείκτες οστικού μεταβολισμού ή την οστική πυκνότητα<sup>239, 240</sup>, ενώ η συχνότητα ανεπιθύμητων ενεργειών, ιδίως από το ανώτερο πεπτικό, είναι η ίδια ή χαμηλότερη.

Δύο αμινοδιφωσφονικά είναι διαθέσιμα σε εβδομαδιαία μορφή χορήγησης: η αλενδρονάτη σε δόση 70mg και η RIS σε δόση 35mg και ένα σε μηνιαία: η ιμπανδρονάτη σε δόση 150mg.

Μια εναλλακτική θεραπευτική επιλογή αποτελεί η χορήγηση ενδοφλεβίως του ζολενδρονικού οξέος άπαξ ετησίως. Χορηγείται ως ενδοφλέβια έγχυση 5mg σε διάρκεια 15 λεπτών και εμφανίζει παρατεταμένη δράση, καλύπτοντας τον ασθενή για 12 μήνες.

### Αποτελεσματικότητα

Τα από στόματος διφωσφονικά, ιδίως η αλενδρονάτη και η RIS έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικά στην πρόληψη και τη θεραπεία της οστεοπόρωσης. Η BMD στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης και το ισχίο αυξάνει με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Τόσο η αλενδρονάτη όσο και η RIS έχουν αποδείξει ότι μειώνουν τον κίνδυνο σπονδυλικών και μη σπονδυλικών καταγμάτων.

**Μεταβολές των δεικτών οστικού μεταβολισμού.** Το PINP, η 5β-TRAP και το CTX ορού φαίνεται να είναι οι καλύτεροι δείκτες παρακολούθησης της θεραπείας με αλενδρονάτη. Οι μεταβολές της 5β-TRAP και του CTX ορού στους 3 μήνες αγωγής προκρίνουν τις μεταβολές της BMD στους 12 μήνες<sup>241</sup>. Το CTX ορού πιθανώς εμφανίζει καλύτερη κλινική πρόγνωση σε σύγκριση με τους άλλους δείκτες<sup>242</sup>.

Η μείωση της οστικής απορρόφησης με τη RIS αντικατοπτρίζεται πρώιμα στη μείωση των δεικτών οστικού μεταβολισμού, με μείωση του CTX ούρων κατά 60% και του NTX ούρων κατά 51% σε 3-6 μήνες<sup>134</sup>. Η μείωση των δεικτών διατηρείται πέντε έτη μετά την έναρξη της αγωγής<sup>243</sup>. Δοσοεξαρτώμενη καταστολή του οστικού μεταβολισμού έχει φανεί και με το ζολενδρονικό οξύ<sup>244</sup>.

**Μεταβολές της οστικής πυκνότητας.** Μετά από χορήγηση αλενδρονάτης, 10mg ημερησίως για τρία έτη σε οστεοπορωτικές γυναίκες, η BMD αυξάνεται στη σπονδυλική στήλη και τον αυχένα του μηριαίου<sup>245</sup>. Η προληπτική χορήγηση της σε μετεμηνοπαυσιακές γυναίκες χωρίς οστεοπόρωση επίσης αυξάνει την BMD και στις δύο θέσεις<sup>246, 247</sup>.

Σε γυναίκες με εγκατεστημένη οστεοπόρωση που έλαβαν 5mg RIS ημερησίως για τρία έτη, η BMD αυξήθηκε στη σπονδυλική στήλη κατά 5,4% και στον αυχένα του μηριαίου κατά 1,6%<sup>248</sup>. Ανάλογα, σε γυναίκες με οστεοπόρωση χωρίς προηγούμενο κάταγμα, η BMD αυξήθηκε κατά 5,3% στη σπονδυλική στήλη και κατά 2,5% στον αυχένα του μηριαίου<sup>249</sup>. Η χορήγηση RIS σε γυναίκες με

φυσιολογική οστική μάζα, επίσης αύξησε την BMD κατά 1,4% στη σπονδυλική στήλη και διατήρησε την οστική πυκνότητα στο ισχίο<sup>250</sup>. Η RIS είναι επίσης αποτελεσματική στην πρόληψη της οστεοπόρωσης από κορτικοειδή<sup>251</sup>. Η ιμπαδρονάτη<sup>122, 252</sup> και το ζολεδρονικό εμφανίζουν επίσης ικανοποιητική αποτελεσματικότητα.<sup>244</sup>

Η δραστηριότητα της αλενδρονάτης<sup>253</sup> και της RIS<sup>243</sup> όσον αφορά τη μείωση του κινδύνου κατάγματος, φαίνεται ότι διατηρείται για μεγάλο χρονικό διάστημα, ως και μετά δέκα και πέντε έτη αγωγής αντίστοιχα.

**Μείωση του κινδύνου κατάγματος.** Ο κίνδυνος σπονδυλικού κατάγματος μειώνεται με τα διφωσφονικά κατά 30-50% περίπου. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι η RIS μειώνει τα κλινικά σπονδυλικά αλλά και τα μη σπονδυλικά κατάγματα<sup>254</sup> και μάλιστα εντός μόλις 6 μηνών από την έναρξη της θεραπείας<sup>255</sup>, ενώ αποδεικνύεται αποτελεσματική ακόμη και στους υψηλού κινδύνου<sup>256, 257</sup> αλλά και τους ηλικιωμένους (>80 ετών) ασθενείς<sup>258, 259</sup>. Σε ασθενείς με εγκατεστημένη οστεοπόρωση, ο κίνδυνος νέου σπονδυλικού κατάγματος μειώνεται κατά 49% και ο κίνδυνος μη σπονδυλικού κατάγματος κατά 39% μετά τρία έτη αγωγής<sup>248</sup>. Η μείωση του κινδύνου κατάγματος αυξάνεται σε 59% τα επόμενα δύο έτη<sup>243</sup>. Σε ασθενείς με οστεοπόρωση χωρίς προηγούμενο κάταγμα, έχει αναφερθεί μείωση του κινδύνου σπονδυλικού κατάγματος που φτάνει το 75%<sup>249</sup>. Η μείωση της οστικής απορρόφησης με τη RIS (μείωση CTX ούρων 60%, NTX ούρων 51% σε 3-6 μήνες), εξηγεί ένα μεγάλο μέρος της αντικαταγματικής της δράσης μετά 3 έτη<sup>134</sup>. Η σχέση μεταξύ μείωσης των δεικτών και μείωσης του κινδύνου κατάγματος δεν είναι γραμμική, αλλά φαίνεται ότι από ένα επίπεδο πτώσης των δεικτών (55-60% για το CTX - 35-40% για το NTX) και πέρα, υπάρχει πολύ μικρή μείωση του κινδύνου κατάγματος.

Η σύγκριση των δύο διφωσφονικών που χορηγούνται εβδομαδιαίως δείχνει ότι η αλενδρονάτη προκαλεί μεγαλύτερες αυξήσεις στη BMD και μεγαλύτερες μειώσεις των οστικών δεικτών από ότι η RIS<sup>260</sup>, χωρίς όμως να διαφέρει όσον αφορά τη μείωση του κινδύνου κατάγματος και τις ανεπιθύμητες ενέργειες.

### **Ανοχή – Ανεπιθύμητες ενέργειες (ΑΕ)**

Οι συχνότερες ανεπιθύμητες ενέργειες των από στόματος χορηγούμενων διφωσφονικών, ειδικά όταν αυτά δίνονται σε υψηλές δόσεις, αφορούν το πεπτικό<sup>261</sup>. Συχνότερες είναι η διαβρωτική οισοφαγίτιδα και οι γαστρικές διαβρώσεις και έλκη που οφείλονται σε άμεση ερεθιστική επίδραση των ουσιών στον οισοφάγο και το στομάχο αντίστοιχα. Για την ελαχιστοποίηση του κινδύνου αυτού, συνιστάται να αποφεύγεται η κατάκλιση για μισή ώρα μετά τη λήψη του δισκίου, ώστε να αποκλείεται η μηχανική παλινδρόμηση του φαρμάκου και η πρόκληση βλάβης. Η πιθανότητα εμφάνισης ΑΕ από το πεπτικό αυξάνεται όταν τα διφωσφονικά συγχωρηγούνται με μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα. Οι ΑΕ από το πεπτικό για την αλενδρονάτη πιθανώς είναι συχνότερες απ' ότι για τη RIS<sup>261</sup>. Υπάρχουν ωστόσο μελέτες που υποστηρίζουν ότι η συχνότητα των ΑΕ δεν αυξάνεται με τη χορήγηση RIS<sup>262, 263</sup> ή ακόμη και αλενδρονάτης<sup>262</sup>. Η χορήγηση διφωσφονικών αντενδείκνυται όταν υπάρχει ενεργή νόσος του ανωτέρου πεπτικού.

Η ενδοφλέβια χορήγηση παμιδρονάτης ή ζολενδρονικού οξέος μπορεί να προκαλέσει, παροδικά, συμπτωματολογία που μοιάζει με γρίπη (flu-like febrile illness), λεμφοπενία και ήπια, παροδική υπασβεστιαμία τις πρώτες ημέρες μετά την έγχυση. Η παρενέργεια αυτή μπορεί να παρατηρηθεί σε μικρότερο βαθμό και με τα από στόματος διφωσφονικά, είναι δε εντονότερη επί ανεπάρκειας βιταμίνης D. Γι' αυτό, ανεξαρτήτως της οδού χορήγησης του διφωσφονικού, είναι σημαντικό να συγχωρηγείται βιτ. D και ασβέστιο για την πρόληψη της εμφάνισης υπασβεστιαμίας στη αρχή της αγωγής.

Πολύ σπάνια έχουν αναφερθεί με όλα τα διφωσφονικά οφθαλμικές ανεπιθύμητες ενέργειες όπως θόλωση της όρασης, επιπεφυκίτιδα, ραγοειδίτιδα και σκληρίτιδα<sup>264</sup>. Η παμιδρονάτη και το ζολενδρονικό έχουν συσχετιστεί με πρόκληση νεφρικής ανεπάρκειας<sup>265, 266</sup>.

Τα τελευταία έτη υπάρχει ανησυχία για το ενδεχόμενο η μακροχρόνια σημαντικού βαθμού καταστολή του οστικού μεταβολισμού, με τα διφωσφονικά και κυρίως με την αλενδρονάτη, που έχει την πιο έντονη επίδραση στον οστικό μεταβολισμό, να είναι επιβλαβής για το οστό. Διατυπώνεται η άποψη ότι η πολύ καθυστερημένη ή ανεπαρκής επούλωση των μικροβλαβών καταπόνησης των οστών μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία «παγωμένου» οστού (frozen bone) και να αυξήσει τον κίνδυνο κατάγματος<sup>267, 268</sup>. Πρόσφατα, σε άτομα που λαμβάνουν γλυκοκορτικοειδή ή χημειοθεραπεία, κυρίως για πολλαπλούν μυέλωμα ή καρκίνο του μαστού, έχει αναφερθεί οστεονέκρωση των γνάθων μετά την εξαγωγή δοντιών κυρίως με την παμιδρονάτη και το ζολενδρονικό οξύ<sup>269</sup>. Ως αντίλογος αυτών των φόβων προβάλλεται η δεκαετής αποτελεσματική και ασφαλής συνεχής χορήγηση αλενδρονάτης<sup>253</sup>, ενώ η διακοπή τους έδειξε βαθμιαία αύξηση των δεικτών οστικής απορρόφησης (αύξηση NTX ούρων κατά 20-25%), κάτι που δεν θα συνέβαινε επί «παγωμένου» οστού, και αντίστοιχη μείωση της οστικής πυκνότητας. Επίσης, σε ασθενείς που μετά από αγωγή με αλενδρονάτη χορηγήθηκε TPTD, οι δείκτες οστικού μεταβολισμού αυξήθηκαν<sup>270</sup> αν και η αύξηση των δεικτών ήταν μικρότερη συγκριτικά με εκείνη που παρατηρήθηκε σε ασθενείς που πριν ελάμβαναν ραλοξιφαίνη. Τέλος, υπάρχουν μελέτες οστικής βιοψίας που περιγράφουν φυσιολογικό οστό μετά 5 και 10 έτη θεραπείας με αλενδρονάτη<sup>271</sup>.

#### 4.1.3. Ασβέστιο

Η επαρκής πρόσληψη ασβεστίου μειώνει την οστική απώλεια στους ενήλικες<sup>272</sup>. Το ισοζύγιο του ασβεστίου εξαρτάται από την ημερήσια πρόσληψη του και γίνεται θετικό όταν αυτή υπερβαίνει τα 1000mg σε προεμμηνοπαυσιακές και τα 1500mg σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες.

Πολλές προοπτικές, τυχαιοποιημένες μελέτες, έχουν αποδείξει τη σημασία της επαρκούς πρόσληψης ασβεστίου για την πρόληψη της οστικής απώλειας<sup>273-275</sup> ενώ έχει αναφερθεί και μικρή αύξηση της οστικής πυκνότητας<sup>276</sup>. Ωστόσο, δεν έχει αποδειχθεί ότι η χορήγηση ασβεστίου μειώνει τον κίνδυνο κατάγματος<sup>277</sup>.

Αν και η ιδανική ποσότητα ημερήσιας πρόσληψης ασβεστίου δεν έχει ακόμη ξεκαθαριστεί, οι κατευθυντήριες οδηγίες του NIH προτείνουν ημερήσια πρόσληψη τουλάχιστον 1000mg για τις προεμμηνόπαυσιακές γυναίκες και τους άνδρες και 1500mg για τις μετεμμηνόπαυσιακές γυναίκες που δεν λαμβάνουν οιστρογόνα. Πάντως, η συνολική πρόσληψη ασβεστίου δεν πρέπει να ξεπερνά τα 2000mg ημερησίως λόγω του κινδύνου ανεπιθύμητων ενεργειών<sup>278</sup>. Οι προαναφερθείσες δοσολογίες αφορούν το στοιχειακό ασβέστιο. Η πλειοψηφία των σκευασμάτων ασβεστίου που κυκλοφορούν ως συμπληρώματα διατροφής έχουν ανθρακικό ασβέστιο, το οποίο περιέχει 40% στοιχειακό ασβέστιο, δηλαδή ένα δισκίο 500mg αποδίδει 200mg στοιχειακό ασβέστιο στον οργανισμό.



## 5. ΦΥΣΙΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΜΕΤΕΜΜΗΝΟΠΑΥΣΙΑΚΗΣ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗΣ

Η μειωμένη οστική μάζα μπορεί να είναι συνέπεια μιας χαμηλής κορυφαίας οστικής μάζας, είτε αυξημένης, συγκριτικά, οστικής απορρόφησης ή μειωμένου σχηματισμού στα πλαίσια της διαδικασίας οστικής ανακατασκευής. Και οι τρεις ανωτέρω μηχανισμοί μπορεί να συμβάλλουν, σε διαφορετικό βαθμό ο καθένας, στην οστεοπόρωση του κάθε ασθενούς<sup>279</sup>. Η οστική απώλεια που σχετίζεται με την ηλικία και την εμμηνόπαυση είναι βασικοί παθογενετικοί μηχανισμοί, αλλά ο ρόλος τους στην εμφάνιση της νόσου ποικίλλει, όπως δείχνουν οι μεγάλες αποκλίσεις στην οστική πυκνότητα ηλικιωμένων ατόμων της ίδιας ηλικίας<sup>280</sup>.

### 5.1. Μηχανισμοί οστικής απώλειας στην οστεοπόρωση

Όπως προαναφέρθηκε, η οστική απώλεια μπορεί να συμβεί λόγω αυξημένης οστικής απορρόφησης, είτε λόγω μειωμένου οστικού σχηματισμού. Έχει, πλέον, τεκμηριωθεί ότι η οστεοπόρωση σχετίζεται με αύξηση της οστικής απορρόφησης που οδηγεί σε απώλεια οστικών δοκίδων στο σπογγώδες και αυξημένο αριθμό πόρων (πορότητα-porosity) στο φλοιώδες οστό. Ωστόσο, οι οστικές βιοψίες σε οστεοπορωτικούς ασθενείς δεν δείχνουν καθαρά μια αύξηση των ενεργών επιφανειών απορρόφησης<sup>281</sup>. Έτσι, εκτός από την αυξημένη οστική απορρόφηση πρέπει να συνυπάρχει και μείωση, συγκριτικά, του οστικού σχηματισμού για να προκληθεί οστική απώλεια.

Η αύξηση του αριθμού των θέσεων οστικής απορρόφησης οδηγεί σε παροδική μείωση της οστικής μάζας. Σε φυσιολογικές συνθήκες, η αύξηση της οστικής απορρόφησης ακολουθείται από μια αντισταθμιστική αύξηση του οστικού σχηματισμού που οδηγεί σε αποκατάσταση της οστικής μάζας. Ωστόσο, αν η αύξηση της απορρόφησης προκαλέσει διατρήσεις στα δοκιδώδη πέταλα ή διακοπή της συνέχειας στις οστικές δοκίδες, χάνεται το καλούπι για τον σχηματισμό νέου οστού με συνέπεια η μείωση της οστικής μάζας να είναι μη αναστρέψιμη.

Ο όρος οστεοπόρωση υψηλού ρυθμού οστικού μεταβολισμού ("high turnover" osteoporosis) έχει χρησιμοποιηθεί για να περιγράψει ασθενείς στους οποίους κυριαρχεί η οστική απορρόφηση, ενώ χαμηλού ρυθμού οστικού μεταβολισμού ("low turnover" osteoporosis) έχει αποδοθεί σε ασθενείς όπου επικρατεί ο μειωμένος οστικός σχηματισμός. Ωστόσο, η σχετική συμβολή της αυξημένης οστικής απορρόφησης και του μειωμένου οστικού σχηματισμού πιθανόν αντιπροσωπεύουν ένα συνεχές φαινόμενο που μπορεί να αλλάζει στην πορεία της νόσου. Βιοψίες ασθενών με προχωρημένη οστεοπόρωση δείχνουν συνήθως μειωμένη οστεοβλαστική δραστηριότητα, αλλά αυτό μπορεί να είναι το τελικό στάδιο μιας διαδικασίας που ξεκίνησε με αυξημένη οστική απορρόφηση.

Για την αντοχή των οστών, σημαντικός είναι ο ρόλος του βαθμού επιμετάλλωσης του οστεοειδούς. Όμως, η συνάρτηση μεταξύ βαθμού επιμετάλλωσης και οστικής αντοχής δεν είναι γραμμική. Όσο αυξάνει ο βαθμός επιμετάλλωσης, αυξάνεται η σκληρότητα του οστού, όχι όμως και η ικανότητα του να αντιστέκεται στις



μηχανικές φορτίσεις. Η αύξηση της επιμετάλλωσης, πάνω από το 65% περίπου του φυσιολογικού, ακολουθείται από μείωση της αντοχής των οστών.

## 5.2. Ο ρόλος ορμονών, τοπικών κυτταροκινών, προσταγλανδινών και αυξητικών παραγόντων

Η παραγωγή πολλών ορμονών μεταβάλλεται με την ηλικία ή την εμμηνόπαυση. Ωστόσο, για καμιά ορμόνη δεν παρατηρούνται διαφορές της συγκέντρωσης στο ορό, μεταξύ οστεοπορωτικών και υγιών ατόμων συγκρίσιμων ως προς την ηλικία και το χρόνο από την εμμηνόπαυση.

**Ασβεστιοτρόπες ορμόνες.** Διαταραχές των ορμονών αυτών συνήθως προκαλούν οστεοπόρωση (υπερπαραθυρεοειδισμός) ή ραχίτιδα και οστεομαλακία (ανεπάρκεια της βιταμίνης D). Οι χαρακτηριστικές διαταραχές του ισοζυγίου ασβεστίου και φωσφόρου διακρίνουν την οστεοπόρωση που προκαλείται από τις διαταραχές των ανωτέρω ορμονών (δευτεροπαθής οστεοπόρωση), από την ιδιοπαθή οστεοπόρωση.

Ηπιότερος βαθμός υπερέκκρισης PTH ή ανεπάρκειας βιταμίνης D μπορεί να συμβάλλει στη παθογένεση της οστεοπόρωσης. Μειωμένη διατροφική πρόσληψη ασβεστίου και βιταμίνης D και μειωμένη έκθεση στον ήλιο μπορεί να οδηγήσει σε δευτεροπαθή υπερπαραθυρεοειδισμό, που αναμφίβολα παίζει ρόλο στη σχετιζόμενη με την ηλικία απώλεια οστού<sup>273</sup>.

Η καλσιτονίνη αναστέλλει την οστική απορρόφηση και έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία της οστεοπόρωσης. Ωστόσο, ενώ ο ρυθμός οστικού μεταβολισμού μειώνεται όταν χορηγείται εξωγενώς καλσιτονίνη<sup>282</sup>, τα επίπεδα της ενδογενούς ορμόνης δεν φαίνεται να είναι καθοριστικά για την εμφάνιση οστεοπόρωσης.

**Ορμόνες φύλου.** Η ανεπάρκεια οιστρογόνων κατέχει κεντρικό ρόλο στην παθογένεση της οστεοπόρωσης τόσο στις γυναίκες όσο και στους άνδρες, καθώς οδηγεί σε αυξημένη απορρόφηση και ταχεία απώλεια οστού<sup>53</sup>. Στην πρόκληση οστεοπόρωσης σε συνθήκες οιστρογονικής ανεπάρκειας φαίνεται ότι ενέχονται διάφορες κυτοκίνες και αυξητικοί παράγοντες<sup>69,283</sup>.

**Θυρεοειδικές ορμόνες.** Ασθενείς με υπερθυρεοειδισμό ή αυτοί που θεραπεύονται με υψηλές δόσεις θυροξίνης έχουν υψηλό ρυθμό οστικού μεταβολισμού και πιθανόν χαμηλή οστική πυκνότητα<sup>284</sup>. Δεν υπάρχουν, ωστόσο, δεδομένα που να συνηγορούν υπέρ ενός γενικότερου ρόλου των θυρεοειδικών ορμονών στην παθογένεση της οστεοπόρωσης.

**Γλυκορτικοειδή.** Η περίσσεια γλυκορτικοειδών είναι συχνή αιτία οστεοπόρωσης<sup>60</sup>. Συνηθέστερη αιτία υπερκορτιζολαιμίας είναι η θεραπευτική χορήγηση μεγάλων δόσεων κορτικοειδών, ενώ η ενδογενής υπερέκκριση κορτιζόλης είναι σπάνια. Κυρίαρχη παθοφυσιολογική διαταραχή στην πρόκληση οστεοπόρωσης από γλυκορτικοειδή είναι η αναστολή του οστικού σχηματισμού, λόγω καταστολής των οστεοβλαστών σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης και της λειτουργίας τους (πολλαπλασιασμό, μετανάστευση, διαφοροποίηση και διάρκεια ζωής). Αυτή σχετίζεται με μεταβολές στην παραγωγή τοπικών αυξητικών παραγόντων, μεταξύ των οποίων οι ινσουλινομορφοί αυξητικοί παράγοντες (IGFs) και οι δεσμευτικές

τους πρωτεΐνες και προσταγλανδινών. Στην αυξημένη οστική αποδόμηση συμβάλλουν η μειωμένη εντερική απορρόφηση και η αυξημένη νεφρική απέκκριση ασβεστίου που προκαλούν τα κορτικοειδή. Αποτέλεσμα αυτών των δράσεων είναι η πρόκληση αρνητικού ισοζυγίου ασβεστίου και δευτεροπαθώς η αυξημένη έκκριση παραθορμόνης, η οποία αυξάνει την οστεοκλαστική δραστηριότητα και την οστική απορρόφηση. Η μειωμένη παραγωγή οιστρογόνων και ανδρογόνων λόγω της κατασταλτικής επίδρασης των κορτικοειδών στα επινεφρίδια και τις γονάδες, προάγει την οστική αποδόμηση. Δεν πρέπει επίσης να παραβλέπεται η αρνητική επίδραση της υποκείμενης φλεγμονώδους νόσου για την οποία λαμβάνονται τα κορτικοειδή.

Η αυξημένη ενδογενής παραγωγή κορτικοειδών σε παθήσεις όπως η μείζων κατάθλιψη, ο αλκοολισμός και η νευρογενής ανορεξία, θεωρείται ότι ενέχεται στην μειωμένη οστική πυκνότητα που παρατηρείται στους πάσχοντες απ' αυτές.

**Τοπικές κυτοκίνες, προσταγλανδίνες και αυξητικοί παράγοντες.** Αυξημένη παραγωγή τοπικά ιντερλευκινών, κυρίως IL-1 και IL-6 και άλλων κυτταροκινών όπως ο TNF-α αλλά και προσταγλανδινών, συμβάλλουν στην απορρόφηση οστού τοπικά κι επομένως στην πρόκληση οστεοπόρωσης. Αντίθετα, η παρουσία αυξητικών παραγόντων θεωρείται ευεργετική για τον οστικό σχηματισμό και η έλλειψη τους σχετίζεται με οστική απώλεια.

### 5.3. Το σύστημα RANKL-RANK-OPG στην παθογένεση οστικών νοσημάτων

**Οστεοπόρωση.** Η μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση χαρακτηρίζεται από αυξημένη οστική απορρόφηση λόγω ανεπάρκειας οιστρογόνων. Υπάρχουν αρκετές ενδείξεις ότι στην παθογένεση της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης συμμετέχει το σύστημα RANKL-RANK-OPG. Τα οιστρογόνα και η ραλοξιφαίνη, εκλεκτικός διεγέρτης των υποδοχέων των οιστρογόνων, διεγείρουν την παραγωγή της OPG από τους οστεοβλάστες<sup>112, 285</sup>. Αυτό συμφωνεί με την παρατήρηση ότι οι μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα RANKL σε κύτταρα του μυελού των οστών και λεμφοκύτταρα σε σύγκριση με προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες ή μετεμμηνοπαυσιακές που λαμβάνουν οιστρογόνα<sup>286</sup>. Επιπλέον, η έκφραση του RANKL παρουσιάζει αντιστρόφως ανάλογη σχέση με τα επίπεδα της 17β οιστραδιόλης στον ορό και ανάλογη με δείκτες οστικής απορρόφησης<sup>286</sup>. Η δραστηριότητα της c-jun αμινοτελικής κινάσης, ενός ενδοκυττάριου σήματος που έπεται της ενεργοποίησης του RANK, καταστέλλεται από την 17β οιστραδιόλη<sup>287</sup>.

Παραδόξως και αντίθετα προς τα προσδοκόμενα, τα επίπεδα της OPG ορού βρέθηκαν αυξημένα σε οστεοπορωτικές γυναίκες και γυναίκες με αυξημένο ρυθμό οστικού μεταβολισμού σε σύγκριση με μάρτυρες<sup>168, 288</sup>. Το εύρημα αυτό αποδόθηκε σε αντισταθμιστική αύξηση της παραγωγής OPG με στόχο να εξισορροπηθεί η αυξημένη οστική απορρόφηση που χαρακτηρίζει την οστεοπόρωση. Η ανωτέρω παρατήρηση δεν επιβεβαιώθηκε σε όλες τις μελέτες. Ορισμένες μελέτες έδειξαν χαμηλότερα επίπεδα OPG ορού σε οστεοπορωτικές ασθενείς<sup>153</sup>, ενώ σε άλλες δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση μεταξύ οστικής μάζας και της OPG<sup>143, 160</sup>.

Τα επίπεδα του RANKL στον ορό φαίνεται να μην διαφέρουν μεταξύ ατόμων με χαμηλή οστική μάζα και αγγειακή νόσο και μαρτύρων<sup>289</sup>, αν και η σύγκριση πάσχει από μεθοδολογικά προβλήματα, καθώς συχνά τα επίπεδα του sRANKL είναι μη ανιχνεύσιμα, τόσο σε φυσιολογικά άτομα όσο και σε ασθενείς με διάφορες παθήσεις<sup>153</sup>.

Η σχέση μεταξύ OPG / sRANKL και οστεοπορωτικού κατάγματος δεν είναι, επίσης, ξεκαθαρισμένη. Χαμηλή OPG ορού έχει σχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο για σπονδυλικό κάταγμα<sup>153,157</sup>, ανεξάρτητα από την οστική πυκνότητα και τους δείκτες οστικού μεταβολισμού<sup>153</sup>, ενώ σε άλλες βρέθηκε αυξημένος κίνδυνος κατάγματος καρπού και ισχίου στις γυναίκες με την υψηλότερη OPG ορού<sup>143,290</sup>. Ενδιαφέρον είναι ότι, μια προοπτική μελέτη 906 ατόμων έδειξε ότι τα χαμηλότερα επίπεδα sRANKL είναι ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης μη τραυματικού κατάγματος με δεκαπλάσιο σχετικό κίνδυνο για το κατώτερο και μέσο σε σύγκριση με το υψηλότερο τριτημόριο<sup>152</sup>.

Η οστεοπόρωση από γλυκοκορτικοειδή χαρακτηρίζεται από αυξημένη οστική απορρόφηση και μειωμένο οστικό σχηματισμό. Η έκθεση σε γλυκοκορτικοειδή, *in vitro*, αυξάνει την έκφραση του sRANKL και αναστέλλει την παραγωγή OPG από τους οστεοβλάστες<sup>109</sup>. Παρατηρήσεις *in vivo*, δείχνουν ότι τα επίπεδα της OPG ορού είναι ελαττωμένα σε ασθενείς που λαμβάνουν γλυκοκορτικοειδή και αντίστοιχα ο λόγος sRANKL / OPG αυξημένος<sup>291</sup>. Το σύστημα RANKL-RANK-OPG είναι επίσης διαταραγμένο σε οστεοπόρωση μετά από μεταμόσχευση λόγω της χρήσης ανοσοκατασταλτικών<sup>292</sup>.

**Πώρωση κατάγματος.** Η έκφραση του RANKL και της OPG κατά τη διαδικασία της επούλωσης ενός κατάγματος, μελετήθηκε σε ένα μοντέλο επίμυων με κάταγμα κνήμης. Η έκφραση της OPG παρουσίασε δύο αιχμές αύξησης στις 24 ώρες και τις 7 ημέρες μετά το κάταγμα, συμπίπτοντας με τον εντονότερο σχηματισμό χόνδρου στα διαστήματα αυτά. Η έκφραση του RANKL από την άλλη, κορυφώθηκε την 3<sup>η</sup> και 14<sup>η</sup> ημέρα, όταν τα επίπεδα OPG μειωνόταν<sup>293</sup>. Μελέτη πώρωσης κατάγματος κνήμης σε ανθρώπους, έδειξε μείωση της OPG ορού, με την κατώτερη τιμή στις 8 εβδομάδες μετά το κάταγμα και αρνητική συσχέτιση των επιπέδων της με τους δείκτες οστικού σχηματισμού, οστεοκαλσίνη και PINP<sup>294</sup>. Τα ευρήματα αυτά συνηγορούν υπέρ της άποψης ότι ο λόγος OPG / sRANKL συσχετίζεται με τη διαδικασία πώρωσης του κατάγματος χωρίς να υπάρχει απαραίτητα σχέση αιτίας-αποτελέσματος. Επιπρόσθετα, διαγονιδιακά ποντίκια με εξάλειψη του RANK (RANK knockout mice) παρουσιάζουν φυσιολογική επούλωση των καταγμάτων<sup>75</sup>.

**Υπερπαραθυρεοειδισμός.** Αυξημένα επίπεδα παραθορμόνης, όπως στον πρωτοπαθή υπερπαραθυρεοειδισμό, διεγείρουν την οστική απορρόφηση και προκαλούν οστική απώλεια, ενώ διακεκομμένη θεραπεία με ανάλογα PTH αυξάνει την οστική πυκνότητα. Η συνεχής έκθεση σε αυξημένη PTH αυξάνει το λόγο RANKL/OPG στα κύτταρα του στρώματος του μυελού επίμυων και προάγει την διαφοροποίηση των οστεοκλαστών, ενώ η διακεκομμένη έκθεση διεγείρει την έκφραση γονιδίων αναβολικών αυξητικών παραγόντων<sup>176</sup>. Η επίδραση των αναλόγων PTH στο σύστημα RANKL-RANK-OPG δεν έχει μελετηθεί σε ανθρώπους.



**Φλεγμονώδεις οστικές νόσοι.** Οι κύριες σκελετικές επιπλοκές της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, όπως οι περιαρθρικές διαβρώσεις και η παρα-αρθρική οστεοπόρωση, οφείλονται σε αυξημένη οστική απορρόφηση που προκαλείται από παράγοντες του φλεγμονώδους περιβάλλοντος που παράγονται από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού (T- και B- λεμφοκύτταρα και μακροφάγα), όπως κυτταροκίνες (IL-1, IL-6, IL-7, IL-11, IL-17, TNF- $\alpha$ ) και χημοκίνες. Τα ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα, εκφράζοντας αυξημένα επίπεδα RANKL, έχουν την ικανότητα να τροποποιούν τις λειτουργίες των δενδριτικών κυττάρων και να ενεργοποιούν άμεσα τους οστεοκλάστες<sup>295</sup>.

Όπως φάνηκε σε μοντέλα πειραματόζων με ρευματοειδή αρθρίτιδα, οι κυτταροκίνες τροποποιούν την έκφραση RANKL και OPG με επακόλουθο την αύξηση του λόγου RANKL / OPG, που ευνοεί την σκελετική βλάβη<sup>295,296</sup>. Οι IL-1, IL-7 και IL-17 αυξάνουν το λόγο RANKL / OPG, ενώ η IL-4 αναστέλλει την IL-17 και τον RANKL<sup>296</sup>. Σε ανθρώπους, αυξημένα επίπεδα της OPG ορού έχουν βρεθεί σε ενήλικες με οροθετική ρευματοειδή αρθρίτιδα<sup>297</sup> και σε παιδιά με νεανική ιδιοπαθή αρθρίτιδα<sup>298</sup>. Ωστόσο, οι μετρήσεις αυτές δεν σχετιζόταν με τους δείκτες ενεργότητας της νόσου, την ΤΚΕ και την C-αντιδρώσα πρωτεΐνη.

Η θεραπεία ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα με μονοκλωνικό αντι-TNF $\alpha$  αντίσωμα ομαλοποιεί τα επίπεδα του sRANKL και της OPG<sup>299</sup>. Παρόμοιος ρόλος, δηλαδή αυτός του μεσολαβητή της οστικής απώλειας, έχει αποδοθεί στον RANKL σε ασθενείς με αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα και ψωριασική αρθρίτιδα καθώς και σε μοντέλα πειραματόζων με σηπτική αρθρίτιδα ή περιοδοντική λοίμωξη<sup>300</sup>. Η δέσμευση του RANKL, μετά θεραπεία με OPG, προλαμβάνει την οστική αποδόμηση σε ένα μοντέλο αρθρίτιδας εξαρτώμενης από τα T-λεμφοκύτταρα (adjuvant arthritis) στους επίμυες, ενώ η φλεγμονώδης διαδικασία παραμένει ανεπηρέαστη<sup>295</sup>. Σε άλλες μελέτες πειραματόζων, η συνδυασμένη δέσμευση του RANKL και της IL-1 ή του TNF $\alpha$  οδήγησε σε καταστολή τόσο της οστικής απώλειας όσο και της φλεγμονής, δείχνοντας την προοπτική συνδυασμένης ή διαδοχικής δέσμευσης κυτταροκινών προκειμένου να ελεγχθεί η νόσος<sup>301</sup>. Παρομοίως, η δέσμευση του RANKL από την OPG προλαμβάνει την οστική και την οδοντική απώλεια σε μοντέλα πειραματόζων με περιοδοντική νόσο, χωρίς να επηρεάζει την ανοσιακή διαδικασία<sup>300</sup>.

**Οστική νόσος σε πολλαπλούν μυέλωμα.** Οι οστεολυτικές βλάβες και η υπερασβεσταιμία αποτελούν τυπικά χαρακτηριστικά του πολλαπλού μυελώματος. Τα κύτταρα της κακοήθειας αυτής μέσω πολύπλοκων μηχανισμών επηρεάζουν το σύστημα RANKL-RANK-OPG<sup>302</sup>. Συγκεκριμένα, αυξάνουν την έκφραση του RANKL και συγχρόνως καταστέλλουν την παραγωγή OPG από μεσεγχοματικά κύτταρα του στρώματος (τα πρόδρομα των οστεοβλαστών) μέσω διακυτταρικής (cell-to-cell) επίδρασης ή έκκρισης της dickkopf-1, ενός αναστολέα της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης<sup>303</sup>. Έτσι, σε περιοχές γειτονικές στις διηθήσεις από πλασματοκύτταρα, παρατηρείται αυξημένος λόγος RANKL / OPG, που προάγει την διαφοροποίηση και ενεργοποίηση των οστεοκλαστών<sup>303</sup>. Επιπλέον, τα κύτταρα του μυελώματος εκφράζουν τον RANKL του οποίου η ανοσοδραστικότητα σχετίζεται θετικά με τον αριθμό των οστεολυτικών βλαβών<sup>304</sup>. Η άμεση έκφραση του RANKL από τα κύτταρα του μυελώματος φαίνεται να ποικίλλει μεταξύ διαφόρων μοντέλων κυτταρικών συστημάτων<sup>303,304</sup>.

Η έκφραση της πρωτεογλυκάνης συνδεκάνης-1 (syndecan-1) στην επιφάνεια των πλασματοκυττάρων, επιτρέπει στα κύτταρα του μυελώματος να εσωτερικεύουν και να αποδομούν στα λυσοσωμάτια τους την OPG<sup>305</sup>. Ο μηχανισμός αυτός οδηγεί σε τοπική απενεργοποίηση της OPG και συμβάλλει στα χαμηλά επίπεδα της OPG ορού<sup>306</sup>, που δεν επαρκούν ώστε να εξισορροπήσουν τα αυξημένα επίπεδα του sRANKL σε ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα<sup>307</sup>. Έτσι, ο λόγος sRANKL / OPG στον ορό αυξάνει και σχετίζεται με τους δείκτες οστικής απορρόφησης, τις οστεολυτικές βλάβες και τους δείκτες παρακολούθησης της νόσου<sup>307</sup>. Η θεραπεία με OPG, σε επίμυες με μυέλωμα, προλαμβάνει την ανάπτυξη λυτικών οστικών βλαβών<sup>308</sup>. Πρόσφατα, η θεραπεία αυτή δοκιμάστηκε και σε ανθρώπους με καλά αποτελέσματα<sup>302, 309</sup>.

**Σκελετικές μεταστάσεις.** Τα νεοπλασματικά κύτταρα που μεθίστανται στο οστό χρησιμοποιούν τον μηχανισμό των τοπικών κυτταροκινών για να διεγείρουν τους οστεοκλάστες, βοηθώντας έτσι την επέκτασή τους. Διάφορες κακοήθειες που προσβάλλουν τον σκελετό (καρκίνος μαστού, καρκίνος προστάτη, νευροβλάστωμα, επιθηλιακά καρκινώματα) εκφράζουν την κυτταρική μορφή του RANKL<sup>310</sup>, εκκρίνουν μια διαλυτή μορφή του RANKL<sup>311</sup> ή διεγείρουν τα κύτταρα στρώματος του μυελού να αυξήσουν το λόγο RANKL / OPG μέσω διακυτταρικών (cell-to-cell) αλληλεπιδράσεων<sup>312</sup>, με τελικό αποτέλεσμα την τοπική ενεργοποίηση της οστικής απορρόφησης μέσω των οστεοκλαστών.

Σε αντίθεση με τα ανωτέρω, στον καρκίνο του προστάτη όπου οι οστικές μεταστάσεις είναι κυρίως σκληρωτικές κι όχι λυτικές, έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα OPG ορού σε σύγκριση με την καλοήγη υπερπλασία προστάτη ή την κακοήθεια με έλλειψη μεταστάσεων στα οστά<sup>313</sup>. In vitro, τα καρκινικά κύτταρα από τις οστικές μεταστάσεις εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα OPG και sRANKL συγκρινόμενα με εκείνα της πρωτοπαθούς εστίας του νεοπλάσματος<sup>314</sup>. Τα ανωτέρω σε συνδυασμό με παρατηρήσεις από άλλες μελέτες<sup>315-317</sup> συνηγορούν για την πιθανή χρήση της OPG ορού ως καρκινικού δείκτη για παρακολούθηση της πορείας του καρκίνου του προστάτη. Η OPG φαίνεται, in vitro, να δρα ως παράγων επιβίωσης των κυττάρων ορισμένων κακοήθων όγκων, γεγονός που μπορεί να σχετίζεται με τη δέσμευση και εξουδετέρωση του συνδέτη που προκαλεί την εξαρτώμενη από τον TNF απόπτωση (TNF-related apoptosis-inducing ligand – TRAIL)<sup>318</sup>. Ωστόσο, η θεραπεία με OPG, όταν αυτή ενέθηκε ταυτόχρονα με κύτταρα σαρκώματος σε επίμυες, μείωσε τα οστικά άλγη και πρόλαβε την σχετιζόμενη με τον πόνο νευροχημική αναδιοργάνωση του νωτιαίου μυελού<sup>319</sup>.

Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι, in vitro, η OPG προάγει την επιβίωση δύο κυτταρικών σειρών από κύτταρα καρκίνου του μαστού<sup>320</sup>. Όμως, οι συγκεντρώσεις της OPG στον ορό δεν φαίνεται να σχετίζονται με την παρουσία οστικών μεταστάσεων καρκίνου του μαστού και δεν επηρεάζονται από τη θεραπευτική χρήση της αναστροζόλης, ενός αναστολέα της αρωματάσης<sup>321</sup>.

**Χυμική υπερασβεσταιμία της κακοήθειας.** Η χυμική υπερασβεσταιμία των συμπαγών νεοπλασμάτων οφείλεται στην έκκριση από τα κύτταρα τους, ενός πεπτιδίου που παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με μόριο της παραθορμόνης (PTHrP, PTH related peptide). Η PTHrP διεγείρει από τα κύτταρα του όγκου την έκκριση του



διαλυτού RANKL στο οστικό μικροπεριβάλλον και ελαττώνει το λόγο RANKL/OPG με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των οστεοκλαστών και την απελευθέρωση ασβεστίου στην κυκλοφορία<sup>311, 322</sup>.

**Άλλες οστικές νόσοι.** Στη σποραδική νόσο του Paget τυπικό ιστοπαθολογικό εύρημα αποτελούν οι εστίες αυξημένης οστεοκλαστικής δραστηριότητας. Τα κύτταρα στρώματος στις προσβεβλημένες περιοχές υπερεκφράζουν τον RANKL<sup>323</sup> και οι οστεοκλάστες των ασθενών με νόσο του Paget υπεραπαντούν στον RANKL<sup>324</sup>, με αποτέλεσμα τη ρύθμιση σε υψηλότερο επίπεδο (up regulation) του διπλού RANKL / RANK στις εστίες της νόσου<sup>323</sup>. Σε μια κλινική μελέτη βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα OPG ορού σε ασθενείς με νόσο του Paget σε σύγκριση με μάρτυρες<sup>172</sup>, ενώ σε μια άλλη τόσο τα επίπεδα της OPG όσο και του RANKL ήταν σημαντικά αυξημένα, ιδίως στην πολυοστική της μορφή, και σχετιζόταν θετικά με τους δείκτες οστικού μεταβολισμού, ενώ ο λόγος sRANKL / OPG ήταν τριπλάσιος αυτού των υγιών μαρτύρων<sup>173</sup>.

Ορισμένες σπάνιες οστικές παθήσεις, όπως η οικογενής διατακτική οστεόλυση, η διατακτική σκελετική υπερφωσφατασία και η ιδιοπαθής υπερφωσφατασία (νεανική v. Paget) σχετίζονται με μεταλλάξεις του γονιδίου του RANK ή της OPG όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

#### **5.4. Το σύστημα RANKL-RANK-OPG στην παθογένεση αγγειακών και άλλων νοσημάτων**

Τα περισσότερα πειραματόζωα με έλλειψη OPG εμφανίζουν αγγειακές επασβεστώσεις του μέσου χιτώνα των νεφρικών αρτηριών και της αορτής<sup>88</sup> επιπλέον της οστεοπόρωσης. Οι επασβεστώσεις αυτές προλαμβάνονται σε διαγονιδιακά πειραματόζωα στα οποία υπερεκφράζεται το γονίδιο της OPG από το μέσο της κύησης, αλλά όχι μετά από παρεντερική χορήγηση OPG μετά τη γέννηση<sup>90</sup>. Σε πειραματική πρόκληση ανεπάρκειας OPG παρατηρείται εμφάνιση όχι μόνο οστεοπόρωσης, αλλά και αγγειακών επασβεστώσεων. Είναι ενδιαφέρον ότι, η χορήγηση OPG σε πειραματόζωα προλαμβάνει τις αγγειακές επασβεστώσεις που προκαλούνται από τη βαρφαρίνη ή από υψηλές δόσεις βιταμίνης D<sup>89</sup>. Παρά την ευεργετική αυτή επίδραση, ο μηχανισμός με τον οποίο η OPG προστατεύει το αγγειακό τοίχωμα παραμένει αδιευκρίνιστος. Η OPG, και σε μικρότερο βαθμό ο RANKL, εκφράζονται στα λεία μυϊκά κύτταρα του αγγειακού τοιχώματος<sup>325</sup> και τα ενδοθηλιακά κύτταρα<sup>326, 327</sup>. Κάποιες μελέτες υποδηλώνουν ότι ο RANKL και η OPG πιθανώς ρυθμίζουν την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει την ακεραιότητα του αγγειακού αυλού<sup>326</sup>. Ωστόσο, δεν είναι ξεκάθαρο αν αυτή η επίδραση της OPG οφείλεται σε δέσμευση του RANKL ή άλλων συνδετών.

Σε κλινικές μελέτες, σε ανθρώπους, αναζητήθηκε η σχέση της OPG ορού και του sRANKL με τις επασβεστώσεις των αγγείων στο πλαίσιο της αθηροσκλήρωσης. Τα ευρήματα αυτών των μελετών έρχονται σε αντίθεση με τα δεδομένα από τα πειραματόζωα. Θα πρέπει όμως να ληφθεί υπόψη ότι στην ανθρώπινη αθηρωμάτωση, οι επασβεστώσεις παρατηρούνται στον έσω χιτώνα και όχι τον μέσο

των πειραματοζώων. Ειδικότερα, ασθενείς με στεφανιαία νόσο έχουν, παραδόξως, υψηλότερα επίπεδα OPG και χαμηλότερα sRANKL στον ορό απ'ότι τα υγιή άτομα<sup>142, 328</sup>. Σημειωτέον, ο σχετικός κίνδυνος καρδιαγγειακής θνητότητας σε ασθενείς με υψηλότερα επίπεδα OPG ορού είναι αυξημένος κατά 3-4 φορές<sup>143, 144</sup>. Επίσης, αυξημένο πάχος του έσω-μέσου χιτώνα των καρωτίδων έχει σχετιστεί με αυξημένα επίπεδα OPG ορού<sup>329</sup>. Αντίθετα, η παρουσία και η ηχογένεια των υποκλινικών καρωτιδικών πλακών, σε άλλη μελέτη σχετιζόταν αντίστροφα με τα επίπεδα OPG ορού<sup>330</sup>. Τέλος, σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια η OPG ορού ήταν υψηλότερη σ' αυτούς με τον υψηλότερο δείκτη αορτικής επασβέστωσης<sup>331</sup>, ενώ ενδιαφέρον είναι ότι η υψηλή OPG ορού βρέθηκε να σχετίζεται με άνοια αγγειακής αιτιολογίας, νόσο του Alzheimer<sup>332</sup> και την εμφάνιση μικροαγγειακών επιπλοκών στο διαβήτη<sup>333</sup>.

Τα χαμηλά επίπεδα ανδρογόνων μπορεί να σχετίζονται με το ρόλο της OPG στην αύξηση του καρδιαγγειακού κινδύνου καθώς σε ηλικιωμένους άνδρες παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ της OPG ορού και των επιπέδων των ελεύθερων ανδρογόνων<sup>163</sup>. Πολυμορφισμοί του εκκινητή του γονιδίου της OPG πάντως δεν φαίνεται να σχετίζονται με την επασβέστωση της αορτής ή την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου στους ανθρώπους<sup>334</sup>. Έτσι, ενώ σε μοντέλα πειραματοζώων τα δεδομένα συνηγορούν υπέρ ενός προστατευτικού ρόλου της OPG στο αγγειακό σύστημα, ο ρόλος της στους ανθρώπους δεν είναι αποσαφηνισμένος. Απαιτείται περισσότερη έρευνα προκειμένου να αποκρυπτογραφηθούν οι επιδράσεις των RANKL και OPG στο αγγειακό σύστημα και να εκτιμηθεί η αξία των επιπέδων τους στη περιφερική κυκλοφορία ως δεικτών καρδιαγγειακής νόσου<sup>106</sup>.

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## 1. ΣΚΟΠΟΣ

Η μελέτη του συστήματος RANKL-RANK-OPG συγκεντρώνει κατά τα τελευταία έτη το ενδιαφέρον των ερευνητών όπως αποδεικνύεται από τη μεγάλη και συνεχώς αυξανόμενη σχετική βιβλιογραφία. Ο ρόλος της μέτρησης της OPG και του RANKL στην καθημερινή κλινική πράξη δεν έχει ακόμη καθορισθεί με ακρίβεια. Έχει προταθεί ότι τα επίπεδα της OPG στον ορό συσχετίζονται καλά με τα επίπεδα της στον οστίτη ιστό. Η δυνατότητα ελέγχου της μετεμμηνοπαυσιακής γυναίκας με έναν απλό προσδιορισμό της OPG και του sRANKL, αποφεύγοντας τη χρήση πολυπλοκότερων διαγνωστικών μεθόδων, ίσως θα μπορούσε να οδηγήσει σε απλούστευση του ελέγχου για οστεοπόρωση και της παρακολούθησης της αποτελεσματικότητας της όποιας θεραπευτικής επιλογής.

Η παρούσα μελέτη έχει ως ερευνητικό στόχο να εκτιμήσει σε γυναίκες με μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση:

1. τα επίπεδα του βιολογικά αντιθετικού συστήματος κυτταροκινών RANKL-OPG.
2. τη μεταβολή των επιπέδων του sRANKL και της OPG μετά από χορήγηση φαρμάκων τα οποία επηρεάζουν τον οστικό μεταβολισμό με διαφορετικούς μηχανισμούς.



## 2. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1. Ασθενείς

#### 2.1.1. Μονάδα στρατολόγησης ασθενών

Η στρατολόγηση των ασθενών έγινε στο Εξωτερικό Ιατρείο Οστεοπόρωσης της Ενδοκρινολογικής Κλινικής του Ιπποκράτειου Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης. Η Ενδοκρινολογική Κλινική αποτελεί κέντρο αναφοράς για τα μεταβολικά νοσήματα των οστών στην Βόρειο Ελλάδα. Στο Εξωτερικό της Ιατρείο παρακολουθούνται πάνω από 25.000 ασθενείς. Οι ασθενείς καταχωρούνται σε βάση δεδομένων και η ηλεκτρονική καρτέλα του κάθε ασθενούς ενημερώνεται συστηματικά σε κάθε επίσκεψη.

Για την επιλογή των ασθενών της παρούσας μελέτης εξετάστηκαν όλοι οι νέοι ασθενείς που προσήλθαν στο Εξωτερικό Ιατρείο κατά το διάστημα από τον Ιούνιο του 2003 ως και τον Απρίλιο του 2004, οπότε ολοκληρώθηκε η στρατολόγηση των ατόμων που απαρτίζουν τις ομάδες της μελέτης. Επιλέχθηκαν άτομα που πληρούσαν τις προϋποθέσεις ένταξης σε κάποια από τις ομάδες και παρακολουθήθηκαν επί έξι μήνες.

#### 2.1.2. Κριτήρια ένταξης – αποκλεισμού

Η επιλογή των ασθενών έγινε με βάση το ιστορικό, την κλινική εικόνα και τον αδρό εργαστηριακό έλεγχο. Κριτήριο ένταξης ήταν η παρουσία οστεοπενίας ή οστεοπόρωσης σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Από τη μελέτη αποκλείστηκαν οι ασθενείς οι οποίες πληρούσαν μια από τις ακόλουθες συνθήκες:

- ιστορικό λήψης το τελευταίο βμηνο οποιασδήποτε αγωγής που επηρεάζει τον οστικό μεταβολισμό
- μειωμένη ή έντονη σωματική δραστηριότητα.
- δείκτη μάζας σώματος  $<18$  ή  $>30$   $\text{kg/m}^2$
- ιστορικό ή διαταραχή της νεφρικής λειτουργίας
- ιστορικό ενδοκρινοπαθειών που επηρεάζουν τον οστικό μεταβολισμό (υπερπαραθυρεοειδισμός, σακχαρώδης διαβήτης, διαταραχές λειτουργίας του θυρεοειδούς)
- ιστορικό άλλων παθήσεων που είναι γνωστό ή πιθανό να επηρεάζουν τις μετρήσεις (νόσος του Paget, κακοήθειες, ρευματολογικά νοσήματα κτλ)
- ιστορικό λήψης διφωσφονικών στο παρελθόν με δεδομένο ότι ο χρόνος ημίσειας ζωής αυτών των φαρμάκων στα οστά ξεπερνά τα 10 έτη
- ιστορικό μακροαγγειοπάθειας (στεφανιαία νόσος ή αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο)
- αλλεργία στο χορηγούμενο φαρμακευτικό παράγοντα ή τα έκδοχα του

#### 2.1.3. Ομάδες ασθενών

Στη μελέτη εντάχθηκαν συνολικά 74 μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με οστεοπενία ή οστεοπόρωση (T-score  $< -1,5$ ), με μέση ηλικία τα  $61,4 \pm 1,0$  έτη και

μέση ηλικία εμμηνόπαυσης τα  $47,0 \pm 0,5$  έτη. Οι ασθενείς διαιρέθηκαν σε τρεις ομάδες.

Στην Ομάδα 1, που αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου, συμπεριλήφθηκαν 30 γυναίκες με μέση ηλικία τα  $55,9 \pm 1,3$  έτη και μέση ηλικία εμμηνόπαυσης τα  $46,5 \pm 0,7$  έτη.

Στην Ομάδα 2 συμπεριλήφθηκαν 21 γυναίκες με μέση ηλικία τα  $64,7 \pm 1,5$  έτη και μέση ηλικία εμμηνόπαυσης τα  $48,6 \pm 1,1$  έτη, οι οποίες έλαβαν ρισενδρονάτη (RIS) 35 mg μια φορά την εβδομάδα για έξι μήνες.

Τέλος, στην Ομάδα 3 εντάχθηκαν 23 γυναίκες με μέση ηλικία τα  $65,4 \pm 1,6$  έτη και μέση ηλικία εμμηνόπαυσης τα  $46,2 \pm 1,1$  έτη με εγκατεστημένη οστεοπόρωση (T-score < -2,5), οι οποίες έλαβαν τεριπαρατίδη (TPTD) 20 mg ημερησίως για το ίδιο χρονικό διάστημα.

Το διαιτολόγιο κάθε συμμετέχουσας αναλύθηκε όσον αφορά στην καθημερινή πρόσληψη ασβεστίου και όπου ήταν απαραίτητο προστέθηκε ανθρακικό ασβέστιο, ώστε η συνολική ημερήσια προσλαμβανόμενη δόση του ασβεστίου να είναι για κάθε γυναίκα 1200mg.

## 2.2. Προσδιορισμοί

Σε κάθε ασθενή, πριν την έναρξη της αγωγής και 3 και 6 μήνες αργότερα έγινε προσδιορισμός στο αίμα των παρακάτω παραμέτρων:

- των επιπέδων του ολικού ασβεστίου, των λευκωμάτων, του διορθωμένου ως προς το επίπεδο λευκωματίνης ασβεστίου, του φωσφόρου και της παραθορμόνης.
- των επιπέδων OPG ορού
- των επιπέδων sRANKL
- των δεικτών οστικού σχηματισμού (ολικής ΑΦ και PINP ορού)
- των δεικτών οστικής απορρόφησης (CTX ορού)

Σε κάθε επίσκεψη οι ασθενείς προσκόμιζαν τις συσκευασίες της αγωγής των προηγούμενων μηνών για αξιολόγηση της συμμόρφωσης τους. Αυτή ελέγχθηκε στην ομάδα RIS με την καταμέτρηση του αριθμού των δισκίων RIS που καταναλώθηκαν στο διάστημα μεταξύ των επισκέψεων, ενώ στην ομάδα 3 αξιολογήθηκε με τη μέτρηση του υπολειπόμενου φαρμάκου στις χρησιμοποιούμενες πένες TPTD.

Επίσης σε κάθε επίσκεψη, καταγράφονταν οι ανεπιθύμητες ενέργειες (ΑΕ) που ανέφερε ο ασθενής (κλινικές ΑΕ) και τυχόν αποκλίσεις από τις φυσιολογικές τιμές κατά τον τακτικό βιοχημικό έλεγχο (βιοχημικές ΑΕ). Σε περίπτωση κλινικής υποψίας κατάγματος, αυτό επιβεβαιωνόταν με ακτινολογικό έλεγχο.

Οι αιμοληψίες γινόταν το πρωί με τις ασθενείς νηστικές. Ακολουθούσε άμεση φυγοκέντρηση και ο ορός φυλασσόταν στους  $-36^{\circ}\text{C}$  μέχρι τη στιγμή της μέτρησης. Ο χρόνος αποθήκευσης των ορών ήταν μεταξύ 12 και 22 μηνών.

Η οστική πυκνότητα της σπονδυλικής στήλης εκτιμήθηκε με τη μέθοδο της οστεοπυκνομετρίας με διπλή δέσμη φωτονίων (DEXA) πριν την έναρξη της αγωγής και βάση των αποτελεσμάτων αυτής οι ασθενείς διακρίθηκαν σε οστεοπενικές ή οστεοπορωτικές.

### Κριτήρια επιλογής δείκτη οστικής απορρόφησης – σχηματισμού

Το PINP ορού προτιμήθηκε ως δείκτης οστικού σχηματισμού διότι:

- τα επίπεδα του στον ορό καθορίζονται κυρίως από το μεταβολισμό του προκολλαγόνου των οστών και δεν επηρεάζονται πρακτικά από το δέρμα και τους άλλους συνδετικούς ιστούς<sup>30</sup>
- η μέτρηση του φαίνεται να είναι πιο ειδική από του PICP για τη σύνθεση του οστικού κολλαγόνου<sup>34</sup>
- η κατάσταση σίτισης ή η κηράδια διακύμανση πρακτικά δεν επηρεάζουν τη μέτρηση
- θεωρείται ο καλύτερος δείκτης αποτελεσματικότητας της θεραπείας με TPTD, καθώς η τιμή του στους τρεις μήνες αγωγής φάνηκε να σχετίζεται καλύτερα από τους άλλους δείκτες με την αύξηση της οστικής πυκνότητας στην σπονδυλική στήλη στους 18 μήνες<sup>125</sup>
- ο προσδιορισμός του φαίνεται να έχει θέση και σε θεραπεία με αντιοστεοκλαστικά<sup>127, 128, 241</sup>

Το CTX ορού είναι μια ακριβής, βολική μέθοδος μέτρησης της οστικής απορρόφησης και μπορεί να προβλέψει τον ρυθμό οστικής απώλειας και τον κίνδυνο μελλοντικού κατάγματος σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες<sup>335</sup>.

Η μέτρηση του CTX στον ορό προτιμήθηκε από τον προσδιορισμό του CTX στα ούρα λόγω:

- των μεθοδολογικών προβλημάτων του δεύτερου (μεγάλη νυχθημερινή διακύμανση, ανάγκη διόρθωσης προς την απέκκριση κρεατινίνης, δυσκολία ακριβούς συλλογής των ούρων, αδυναμία ποσοτικού προσδιορισμού του CTX σε πολύ αραιά ούρα)
- της μικρότερης διακύμανσης<sup>50</sup> και μεγαλύτερης ειδικότητας που εμφανίζει ο πρώτος, τουλάχιστον σε ορισμένους υποπληθυσμούς, ώστε να είναι καλύτερη η διάκριση μεταξύ ομάδας ελέγχου και ατόμων με οστεοπόρωση ή πρωτοπαθή υπερπαραθυρεοειδισμό<sup>46, 47</sup>.

Προτιμήθηκε από τους άλλους δείκτες οστικής απορρόφησης διότι:

- είναι δείκτης ειδικός για το οστικό κολλαγόνο
- υψηλά επίπεδα του σχετίζονται καλά με τον κίνδυνο κατάγματος σπονδυλικού και μη, όπως φάνηκε στη μελέτη EPIDOS<sup>139, 336</sup>, τη μελέτη OFELY<sup>140</sup> και άλλες μελέτες<sup>337</sup>
- απεικονίζει γρήγορα την επίδραση της αγωγής στον οστικό μεταβολισμό, ήδη από τις δύο με τρεις πρώτες εβδομάδες αγωγής<sup>135, 136</sup>, ενώ η μέγιστη επίδραση εμφανίζεται μετά από 3-6 μήνες θεραπείας<sup>120, 134, 137</sup>
- οι μεταβολές του σχετίζονται ικανοποιητικά με την αύξηση της οστικής πυκνότητας μετά από αγωγή<sup>241</sup>
- φαίνεται να πλεονεκτεί των άλλων δεικτών, ως δείκτης πρόβλεψης της

μεταβολής της οστικής μάζας, λόγω εντονότερης απάντησης στην αγωγή και της μικρότερης διακύμανσης της μεθόδου. Έτσι, σχετίστηκε με τις μεταβολές της BMD σε χορήγηση ορμονικής υποκατάστασης σε αντίθεση με την οστική ΑΦ και το NTX ορού και ούρων<sup>338</sup>. Επίσης, φαίνεται να εμφανίζει καλύτερη κλινική ανταπόκριση από την DPD και το NTX ούρων στη χορήγηση διφωσφονικών<sup>47, 138</sup> έχοντας τη μεγαλύτερη προγνωστική αξία, σχεδόν 100%, μεταξύ των δεικτών<sup>242</sup>.

Δεδομένου ότι υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι, στην καθημέρα κλινική πράξη η μέτρηση της οστικής ΑΦ δεν πλεονεκτεί από τον προσδιορισμό της ολικής ΑΦ επί απουσίας ηπατικής νόσου<sup>339</sup>, προσδιορίστηκε κι αυτή ως ένας επιπλέον δείκτης οστικού μεταβολισμού.

### **Κριτήρια επιλογής αντιοστεοκλαστικού – οστεοαναβολικού παράγοντα**

Τα διφωσφονικά αποτελούν τους ισχυρότερους και ευρύτερα χρησιμοποιούμενους αντιοστεοκλαστικούς παράγοντες. Μεταξύ των διφωσφονικών επιλέχθηκε να χορηγηθεί η RIS καθώς εμφανίζει αποτελεσματικότητα ανάλογη της αλενδρονάτης στη μείωση του κινδύνου κατάγματος σε σπονδυλική στήλη και ισχίο, αλλά με λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες<sup>261</sup>. Επιπλέον, η RIS έχει προκαλέσει ταχύτερη κλινική ανταπόκριση από τα άλλα διφωσφονικά (μείωση του κινδύνου μη σπονδυλικών καταγμάτων ήδη από τους 6 πρώτους μήνες αγωγής)<sup>255</sup>, γεγονός που την καθιστά καταλληλότερη για την εξάμηνης διάρκειας μελέτη των ασθενών μας.

Κατά την έναρξη του πρωτοκόλλου ο μόνος διαθέσιμος οστεοαναβολικός παράγων ήταν η TPTD και έτσι δεν τέθηκε θέμα επιλογής.

#### **2.2.1. Μέθοδος μέτρησης της OPG**

**Περιγραφή της μεθόδου.** Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ανθρώπινης οστεοπροτεγερίνης εφαρμόστηκε η ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA. Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα αντιδραστηρίων ELISA του εμπορικού οίκου RayBiotech, Inc., USA. Κάθε δείγμα μετρήθηκε εις διπλούν και όλα τα δείγματα μετρήθηκαν την ίδια ημέρα, ώστε να αποφευχθεί η επίδραση της διακύμανσης μεταξύ των μετρήσεων σε διαφορετικούς χρόνους.

Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς έγινε με δείγματα (standards) γνωστής συγκέντρωσης. Ο προσδιορισμός των τιμών των άγνωστων δειγμάτων έγινε με αντιστοίχιση της οπτικής τους απορρόφησης πάνω στην πρότυπη καμπύλη.

Όλα τα αντιδραστήρια αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα και ακολούθως σε κάθε μία από τις 96 θέσεις (well) της πλάκας μικροτιτλοποίησης τοποθετήθηκαν 100 μl του προς εξέταση ορού και ακολούθησε επώαση στους 40°C για 18-24 ώρες. Σκοπός του σταδίου αυτού ήταν η σύνδεση της ανθρώπινης οστεοπροτεγερίνης που περιεχόταν στον ορό με το ειδικό αντίσωμα που ήταν δεσμευμένο στον πυθμένα των θέσεων μέτρησης της πλάκας. Με το πέρας της επώασης απορρίφθηκε το περιεχόμενο κάθε θέσης και η πλάκα πλύθηκε τετράκις με 200 μl του ειδικού διαλύματος πλύσης του συστήματος των αντιδραστηρίων. Στη



συνέχεια προστέθηκαν 100 μl του ειδικού αντι-αντισώματος που δεσμεύεται στο αντίσωμα έναντι της ανθρώπινης οστεοπροτεγερίνης σε κάθε θέση που υπήρχε εξεταζόμενος ορός και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Μετά πλύση τετράκις με 200 μl του ειδικού διαλύματος πλύσης προστέθηκαν 100 μl του ενζύμου στρεπταβιδίνη, το οποίο έχει την ιδιότητα να συνδέεται στο σύμπλοκο αντισώματος-αντι-αντισώματος που έχει προκύψει μέσα σε κάθε θέση. Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 45', πλύση πεντάκις με 100 μl υποστρώματος του ενζύμου. Μετά επώαση της πλάκας σε θερμοκρασία δωματίου για 30' και διακοπή της αντίδρασης με 50 μl ειδικού διαλύματος σε κάθε θέση, έγινε η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας σε ειδικό φωτόμετρο για πλάκες ELISA, σε μήκος κύματος 450 nm.

**Ευαισθησία της μεθόδου.** Η ελάχιστη ανιχνεύσιμη δόση της ανθρώπινης οστεοπροτεγερίνης σε δείγμα ορού για τη μέθοδο είναι μικρότερη του 1 pg/ml.

**Ειδικότητα της μεθόδου.** Η μέθοδος δεν παρουσιάζει διασταυρούμενη αντίδραση με τους παρακάτω παράγοντες:

Ανθρώπινη αγγειογενίνη, BDNF, BLC, ENA-78, FGF-4, IL-1a, IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12p70, IL-12p40, IL-13, IL-15, IL-309, IP-10, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, Leptin, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MDC, MIP-1a, MIP-1β, MIP-1δ, PARC, PDGF, RANTES, SCF, TARC, TGF-β, TIMP-1, TIMP-2, TNF-a, TNF-β, TPO.

### 2.2.2. Μέθοδος μέτρησης του RANKL

**Περιγραφή της μεθόδου.** Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του RANKL στον ορό των ασθενών (hs RANKL) χρησιμοποιήθηκε η ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA του εμπορικού οίκου PerproTech EC Ltd, U.K. Κάθε δείγμα μετρήθηκε εις διπλούν και όλα τα δείγματα μετρήθηκαν την ίδια ημέρα.

Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς έγινε με δείγματα (standards) γνωστής συγκέντρωσης. Ο προσδιορισμός των τιμών των άγνωστων δειγμάτων έγινε με αντιστοίχιση της οπτικής τους απορρόφησης πάνω στην πρότυπη καμπύλη.

Όλα τα αντιδραστήρια αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα και ακολούθως σε κάθε μία από τις 96 θέσεις (well) της πλάκας μικροτιτλοποίησης έγινε προσθήκη 100 μl του μονοκλωνικού αντισώματος έναντι του hs RANKL (συγκέντρωση 1 μg/ml) και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 18-24 ώρες. Με το πέρας της επώασης απορρίφθηκε το περιεχόμενο κάθε θέσης και η πλάκα πλύθηκε τετράκις με 300 μl του ειδικού διαλύματος πλύσης (wash buffer), το οποίο περιείχε 0,05% Tween-20 σε PBS, με στόχο την απομάκρυνση της περίσσειας του αντισώματος. Ακολούθησε προσθήκη σε κάθε θέση 300 μl διαλύματος 1% BSA σε PBS και η πλάκα επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 1 ώρα. Ακολούθησε πλύση όπως αναφέρθηκε προηγουμένως και στη συνέχεια, έγινε η προσθήκη 100 μl του προς εξέταση δείγματος. Η πλάκα επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 2 ώρες και μετά από πλύση, προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια των hs RANKL, σε κάθε θέση της πλάκας έγινε προσθήκη 100 μl δευτέρου αντισώματος που αναπτύχθηκε έναντι του πρώτου αντισώματος. Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες, νέο πλύσιμο της πλάκας και προσθήκη σε κάθε θέση 100 μl του ειδικού ενζύμου (avidin



peroxidase). Μετά επώαση της πλάκας σε θερμοκρασία δωματίου για 30' και απομάκρυνση της περίσσειας των ελευθέρων στοιχείων προστέθηκαν 100 μl του ειδικού υποστρώματος του ενζύμου (ABTS Liquid Substrate solution). Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας έγινε σε ειδικό μηχάνημα φωτομέτρησης πλακών ELISA στο μήκος κύματος 450 nm, με βοηθητικό τα 650 nm.

**Ευαισθησία της μεθόδου.** Η χαμηλότερη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση των sRANKL στον ορό με τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε κυμαίνεται μεταξύ 0,016-2,000 ng/ml (16-2000 pg/ml).

**Ειδικότητα της μεθόδου.** Η μέθοδος δεν παρουσιάζει διασταυρού-μενη αντίδραση με τους παρακάτω παράγοντες: 4-1BBL, s CD40L, Eotaxin-3, s FASL, IL-20, s RANKR, TNFa, TNFβ, s TRAIL, TWEAK

### 2.2.3. Μέθοδος μέτρησης του PINP

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ανθρώπινου ολικού PINP σε δείγμα ορού εφαρμόστηκε η ανοσολογική μέθοδος ηλεκτροχημειοφωταύγειας "ECLIA". Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα αντιδραστηρίων Elecsys total PINP, του εμπορικού οίκου Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany.

Τα αποτελέσματα προσδιορίστηκαν από μια καμπύλη βαθμονόμησης η οποία παράγεται ειδικά για κάθε αναλυτή, μέσω μίας διαδικασίας βαθμονόμησης 2 σημείων και μιας πρότυπης καμπύλης που λαμβάνεται μέσω γραμμικού κώδικα των αντιδραστηρίων.

#### **Χαρακτηριστικά της μεθόδου**

Τιμές αναφοράς σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες 15,3-58,59 ng/ml

Τιμές αναφοράς σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες 20,25-76,31 ng/ml

Αναλυτική ευαισθησία (κατώτατο όριο ανίχνευσης) < 5 ng/ml (μg/l). Εύρος μέτρησης 5-1200 ng/ml

Αναλυτική ειδικότητα. Διασταυρούμενη αντίδραση < 1% με τις παρακάτω αναλυόμενες ουσίες: β-CrossLaps, N-MID οστεοκαλσίνη, παραθορμόνη (PTH) και 25-OH βιταμίνη D.

### 2.2.4. Μέθοδος μέτρησης των β- CrossLaps

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των β-καρβοξυτελικών τελοπεπτιδίων (β-CTX) στον ορό εφαρμόστηκε η ανοσολογική μέθοδος ηλεκτροχημειοφωταύγειας "ECLIA". Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα αντιδραστηρίων Elecsys β-crosslaps/serum, του εμπορικού οίκου Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany.

Τα αποτελέσματα προσδιορίστηκαν από μια καμπύλη βαθμονόμησης η οποία παράγεται ειδικά για κάθε αναλυτή, μέσω μίας διαδικασίας βαθμονόμησης 2 σημείων και μια πρότυπης καμπύλης που λαμβάνεται μέσω γραμμικού κώδικα των αντιδραστηρίων.

#### **Χαρακτηριστικά της μεθόδου**

Τιμές αναφοράς σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες 0.163 ng/ml -0.436 ng/ml

Τιμές αναφοράς σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες 0.330 ng/ml -0.882 ng/ml

Αναλυτική ευαισθησία (κατώτατο όριο ανίχνευσης) < 0,01 ng/ml. Εύρος μέτρησης

0,01-6,00 ng/ml.

Αναλυτική ειδικότητα. Δεν παρατηρείται διασταυρούμενη αντίδραση με: οστεοκαλσίνη, παραθορμόνη (PTH) και οστική ΑΦ.

### 2.2.5. Λοιπές μέθοδοι μέτρησης

**PTH.** Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ακέραιας PTH στον ορό εφαρμόστηκε η ανοσολογική μέθοδος ηλεκτροχημειο-φωταύγειας 'ECLIA'. Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα αντιδραστηρίων Elecsys PTH, του εμπορικού οίκου Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany.

Η μέθοδος Elecsys για τον προσδιορισμό της άθικτης PTH χρησιμοποιεί την αρχή της διπλής ανοσοσήμενσης ("σάντουιτς"), κατά την οποία ένα βιοτινυλιωμένο μονοκλωνικό αντίσωμα αντιδρά με το N-τελικό τμήμα (1-37) και ένα μονοκλωνικό αντίσωμα σημασμένο με ένα σύμπλοκο ρουθηνίου αντιδρά με το C-τελικό τμήμα (38-84). Οι επίτοποι που αναγνωρίζονται από τα αντισώματα αντιστοιχούν στις περιοχές αμινοξέων 26-32 και 55-64. 50 µl δείγματος επωάζονται με ένα βιοτινυλιωμένο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του PTH και έναν μονοκλωνικό ειδικό αντίσωμα έναντι της PTH, σημασμένο με σύμπλοκο ρουθηνίου. Κατόπιν προστίθενται μικροσφαιρίδια σεσημασμένα με στρεπταβιδίνη και έτσι σχηματίζεται ένα σύμπλοκο σάντουιτς το οποίο δεσμεύεται στην στερεά φάση μέσω της αλληλεπίδρασης βιοτίνης-στρεπταβιδίνης.

Τα αποτελέσματα προσδιορίζονται από μια καμπύλη βαθμονόμησης η οποία παράγεται ειδικά για κάθε αναλυτή, μέσω μίας διαδικασίας βαθμονόμησης 2 σημείων και μια πρότυπης καμπύλης που λαμβάνεται μέσω γραμμικού κώδικα των αντιδραστηρίων.

#### **Χαρακτηριστικά της μεθόδου**

Τιμές αναφοράς 15-65 pg/ml

Αναλυτική ευαισθησία (κατώτατο όριο ανίχνευσης) < 1,2 pg/ml (0,127 pmol/l).

Εύρος μέτρησης 1,2-5000 pg/ml ή 0,127-530 pmol/l

Αναλυτική ειδικότητα. Δεν παρατηρείται διασταυρούμενη αντίδραση με: οστεοκαλσίνη, τμήμα PTH 1-37, οστική ΑΦ και β-CrossLaps.

#### **Ασβέστιο**

Το ολικό ασβέστιο ορού προσδιορίστηκε χρωματομετρικά με τη μέθοδο κατά Schwarzenbach με σύμπλοκο ο-κρεσολοφθαλεΐνης. Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα αντιδραστηρίων COBAS INTEGRA Calcium (Ca), του εμπορικού οίκου Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany.

#### **Χαρακτηριστικά της μεθόδου**

Τιμές αναφοράς : 8,4 mg/dl -10,2 mg/dl (2,1-2,55 mmol/l)

Αναλυτική ευαισθησία (κατώτατο όριο ανίχνευσης) < 0,04 mg/dl (0,01 mmol/l).

Εύρος μέτρησης 0-20 mg/dl (0-5 mmol/l)

#### **Διορθωμένο ασβέστιο**

Το διορθωμένο ασβέστιο (CCa) υπολογίστηκε με βάση την ακόλουθη εξίσωση: Διορθωμένο [Ca] = Ολικό [Ca] + (0,8 x (4,5 - [λευκωματίνη])), όπου οι συγκεντρώσεις ασβεστίου και λευκωματίνης ορού εκφράστηκαν σε mg/dL και g/dL, αντίστοιχα.

### **Φωσφόρος**

Ο φωσφόρος ορού προσδιορίστηκε χρωματομετρικά με τη μέθοδο τελικού σημείου με μέτρηση τυφλού δείγματος. Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα αντιδραστηρίων COBAS INTEGRA Phosphate (P), του εμπορικού οίκου Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany.

Τιμές αναφοράς : 2,7 mg/dl – 4,5 mg/dl

### **Ολική αλκαλική φωσφατάση (ΑΦ)**

Η ολική ΑΦ ορού προσδιορίστηκε με χρωματομετρική ανάλυση σύμφωνα με τυποποιημένη ενζυμική μέθοδο. Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα αντιδραστηρίων COBAS INTEGRA Alkaline Phosphatase IFCC, του εμπορικού οίκου Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany.

#### **Χαρακτηριστικά της μεθόδου**

Τιμές αναφοράς : γυναίκες 35-104 IU/l – άνδρες 40-129 IU/l

Αναλυτική ευαισθησία < 2 IU/l. Εύρος μέτρησης 2-1500 IU/l

### **Γλυκόζη νηστείας**

Η γλυκόζη νηστείας ορού προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της εξοκινάσης (αντιδραστήρια Olympus System, Ireland) χρησιμοποιώντας αναλυτή Olympus AU600. Ο συντελεστής μεταβλητότητας intra-assay ήταν 0,70% στα 58,9 mg/dl, 0,54% στα 112,9 mg/dl και 0,51% στα 294,6 mg/dl. Ο συντελεστής μεταβλητότητας inter-assay ήταν αντίστοιχα 1,25%, 0,97% και 1,11%.

#### **2.2.6. Στατιστική ανάλυση**

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS 13.0 για Windows (SPSS Inc., Illinois, USA). Τα δεδομένα περιγράφονται ως συχνότητες για τις κατηγορικές μεταβλητές και ως μέσοι όροι  $\pm$  SE (Standard Error - τυπικό σφάλμα) για τις ποσοτικές μεταβλητές. Με τη δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov, για έλεγχο της κανονικότητας των κατανομών, βρέθηκε ότι όλες οι ποσοτικές μεταβλητές είχαν κανονική κατανομή, γεγονός που επέτρεψε να χρησιμοποιηθούν στις αναλύσεις παραμετρικές δοκιμασίες.

Για τη διερεύνηση των συσχετίσεων μεταξύ των ποσοτικών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος συσχέτισης του Pearson.

Για την διερεύνηση της στατιστικής σημαντικότητας μεταξύ των ομάδων (between the groups) εφαρμόστηκε η δοκιμασία one-way ANOVA (Analysis of Variance – Ανάλυση της Διακύμανσης). Σε όποια μεταβλητή υπήρξε στατιστική σημαντικότητα ακολούθησε post-hoc ανάλυση για ακριβή εντόπιση της σημαντικότητας μεταξύ των επιμέρους ομάδων. Στην post-hoc ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η διόρθωση κατά Bonferroni, όταν η δοκιμασία ομοιογένειας των διακυμάνσεων (Test of Homogeneity of Variances) έδειξε ταύτιση των διακυμάνσεων, ενώ χρησιμοποιήθηκε η διόρθωση κατά Tamhane, όταν η δοκιμασία ομοιογένειας των διακυμάνσεων έδειξε διαφορές μεταξύ των διακυμάνσεων.

Η ανάλυση των συνδιακύμανσεων (Analysis of Covariances, ANCOVA) χρησιμοποιήθηκε στις περιπτώσεις εκείνων των μεταβλητών, όπου υπήρξε στατιστική σημαντικότητα στο χρόνο 0 μεταξύ των ομάδων, ώστε να διευκρινισθεί αν αυτή η αρχική διαφορά επηρέασε ή όχι τις υπάρχουσες σημαντικότητες μεταξύ των ομάδων στους χρόνους 3 μήνες και 6 μήνες.

Για τη διερεύνηση της στατιστικής σημαντικότητας των τμών κάθε ομάδας χωριστά στους διαφορετικούς χρόνους εφαρμόστηκε η δοκιμασία ανάλυσης της διακύμανσης με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (repeated measures ANOVA - General Linear Model). Κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων αυτών επιλέχθηκε η διακύμανση της σφαιρικότητας, όταν το Mauchly's test απέδειξε την σφαιρικότητα της κατανομής, ενώ στην αντίθετη περίπτωση επιλέχθηκε η διακύμανση μετά διόρθωση κατά Huynh-Feldt. Σε όποια μεταβλητή υπήρξε στατιστική σημαντικότητα χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία student's ανά ζεύγη (paired T-test), για την ακριβή εντόπιση της σημαντικότητας μεταξύ των επιμέρους χρονικών στιγμών κάθε ποσοτικής μεταβλητής, ξεχωριστά για κάθε ομάδα.

Σε κάθε δοκιμασία το επίπεδο της  $p$  τιμής δύο κατευθύνσεων (two-tailed  $p$  value) που ορίστηκε ως στατιστικά σημαντικό ήταν μικρότερο του 0,05.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1. Ανεπιθύμητες ενέργειες

Στην ομάδα ελέγχου δεν αναφέρθηκαν ανεπιθύμητες ενέργειες. Στην ομάδα της RIS επτά από τις ασθενείς (33,3%) εμφάνισαν ΑΕ. Σε 6 από τις ασθενείς αυτές ήταν κλινικές ΑΕ και περιελάμβαναν οπισθοστερνικό καύσος (3 ασθενείς), επιγαστραλγία (2 ασθενείς) και οστικά άλγη (1 ασθενής). Μια ασθενής εμφάνισε ήπια υπερασβεσταιμία (Πίνακας 7).

Στην ομάδα της TPTD 3 ΑΕ εμφάνισαν 11 από τις 23 ασθενείς (39,1%). Σε 9 από τις ασθενείς αυτές ήταν κλινικές ΑΕ και περιελάμβαναν ζάλη και ναυτία για λίγες ώρες μετά την εκτέλεση της ένεσης (4 ασθενείς), οστικά άλγη, κυρίως στη ράχη και τις αρθρώσεις (3 ασθενείς), εξάψεις για λίγες ώρες μετά την εκτέλεση της ένεσης (1 ασθενής) και ένα επεισόδιο κωλικού λόγω νεφρολιθίασης σε άλλη 1 ασθενή. Δύο ασθενείς εμφάνισαν υπερασβεσταιμία (Πίνακας 7). Στην περίπτωση της ζάλης και της ναυτίας, τα συμπτώματα των ασθενών μετριάστηκαν με μεταφορά της ώρας λήψης του φαρμάκου το βράδυ πριν την κατάκλιση. Καμία ασθενής δεν διέκοψε την αγωγή λόγω ΑΕ, με εξαίρεση την ασθενή με το επεισόδιο νεφρολιθίασης, όπου η αγωγή διακόπηκε προσωρινά για 10 ημέρες μέχρι να παρέλθει ο κωλικός.

Η υπερασβεσταιμία, η μόνη βιοχημική ΑΕ που παρατηρήθηκε, σε όλες τις περιπτώσεις ήταν παροδική και καμία από τις ασθενείς δεν διέκοψε τη θεραπεία.

**Πίνακας 7.** Ανεπιθύμητες εκδηλώσεις από την αγωγή στις τρεις ομάδες ασθενών.

Ανεπιθύμητες Ενέργειες	Ομάδα 1 (n=30)	Ομάδα 2 (n=21)	Ομάδα 3 (n=23)
Οστικά άλγη	1 (3,3%)	1 (4,8%)	3 (13,1%)
Ζάλη	1 (3,3%)	0 (0,0%)	2 (8,7%)
Ναυτία	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (8,7%)
Οπισθοστερνικό καύσος	1 (3,3%)	3 (14,3%)	0 (0,0%)
Επιγαστραλγία	1 (3,3%)	2 (9,5%)	0 (0,0%)
Εξάψεις	1 (3,3%)	0 (0,0%)	1 (4,3%)
Κωλικός	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (4,3%)
Υπερασβεσταιμία	0 (0,0%)	1 (4,8%)	2 (8,7%)
<b>Σύνολο</b>	<b>5 (16,6 %)</b>	<b>7 (33,3%)</b>	<b>11 (39,1%)</b>

Δύο ασθενείς, μια στην ομάδα της TPTD και μια στην ομάδα ελέγχου υπέστησαν κάταγμα κατά τη διάρκεια της μελέτης. Στην πρώτη περίπτωση το κάταγμα συνέβη στον τρίτο μήνα αγωγής, ήταν μετατραυματικό, συνεπεία τροχαίου και δεν συσχετίστηκε με τη νόσο ή την αγωγή. Το δεύτερο συνέβη στο δεύτερο μήνα παρακολούθησης, προέκυψε χωρίς άσκηση εξωτερικής δύναμης και θεωρήθηκε



κάταγμα ευθραυστότητας. Λόγω του αναμενόμενου επηρεασμού των τιμών των δεικτών οστικού μεταβολισμού (PTH, ολική ΑΦ, PINP, CTX) και πιθανώς και των OPG και sRANKL συνεπεία του κατάγματος και της επακόλουθης διαδικασίας πώρωσης, οι ασθενείς αυτοί εξαιρέθηκαν από το πρωτόκολλο.

### 3.2. Διαφορές μεταξύ των ομάδων

Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών των τριών ομάδων φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 8. Η ηλικία των ασθενών στην ομάδα ελέγχου ήταν μικρότερη των άλλων δύο ομάδων. Τα λοιπά δημογραφικά χαρακτηριστικά δεν διέφεραν μεταξύ των τριών ομάδων.

Η συμμόρφωση με τις οδηγίες για την φαρμακευτική αγωγή και την πρόσληψη ασβεστίου ήταν ικανοποιητική και στις τρεις ομάδες ασθενών. Έτσι στην Ομάδα 1 (ομάδα ελέγχου) η συμμόρφωση ήταν 95%, στην Ομάδα 2 (ομάδα RIS) 89% ενώ στην Ομάδα 3 (ομάδα TPTD) 93%.

**Πίνακας 8.** Δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών των τριών ομάδων.

	Ομάδα 1	Ομάδα 2	Ομάδα 3	τιμή <i>p</i>
<b>Ηλικία</b> (έτη)	55,9 ± 1,3	64,7 ± 1,5 <sup>a</sup>	65,4 ± 1,6 <sup>b</sup>	0,001
<b>Ηλικία</b> <b>Εμμηνόπαυσης</b> (έτη)	46,5 ± 0,7	48,6 ± 1,1	46,2 ± 1,1	0,152
<b>Βάρος</b> (kg)	67,7 ± 1,4	69,0 ± 2,1	67,1 ± 2,3	0,77
<b>BMI</b> (kg/m <sup>2</sup> )	26,3 ± 0,7	28,2 ± 1,0	28,1 ± 1,0	0,22
<b>BMD</b> (g/cm <sup>2</sup> )	0,832 ± 0,020	0,764 ± 0,019	0,784 ± 0,021	0,097

Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ:

<sup>a</sup> ομάδων 1 και 2, <sup>b</sup> ομάδων 1 και 3

Κατά τη διάρκεια της μελέτης δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά το βάρος και ο δείκτης μάζας σώματος των ασθενών των τριών ομάδων όπως φαίνεται στον πίνακα 9 αντίστοιχα.

**Πίνακας 9.** Επίπεδα του σωματικού βάρους και του δείκτη μάζας σώματος στις τρεις ομάδες ασθενών πριν την έναρξη της αγωγής και 3 και 6 μήνες αργότερα.

	Ομάδα 1	Ομάδα 2	Ομάδα 3	τιμή <i>p</i>
<b>Βάρος (kg)</b>				
έναρξη	67,7 ± 1,4	69,0 ± 2,1	67,1 ± 2,3	0,770
3 μήνες	66,0 ± 1,8	68,6 ± 2,0	66,2 ± 2,1	0,612
6 μήνες	66,6 ± 1,9	68,6 ± 2,3	66,6 ± 2,3	0,772
<b>τιμή <i>p</i></b>	0,457	0,378	0,224	

<b>Δείκτης Μάζας Σώματος (kg/m<sup>2</sup>)</b>				
έναρξη	26,3 ± 0,7	28,2 ± 1,0	28,1 ± 1,0	0,220
3 μήνες	26,1 ± 1,0	28,0 ± 0,9	27,7 ± 0,9	0,348
6 μήνες	26,3 ± 1,0	28,3 ± 1,1	27,9 ± 1,0	0,352
<b>τιμή p</b>	0,196	0,456	0,186	

Κατά τη διάρκεια της μελέτης το ολικό ασβέστιο ορού αυξήθηκε βαθμιαία στην ομάδα της TPTD, και ανάλογα αυξήθηκε και το διορθωμένο ασβέστιο δεδομένου ότι η λευκωματίνη του ορού δε μεταβλήθηκε. Στις άλλες δύο ομάδες δεν παρατηρήθηκαν αξιόλογες μεταβολές στις τρεις παραμέτρους. Ο φωσφόρος ορού δε μεταβλήθηκε σημαντικά στις ασθενείς των τριών ομάδων. Οι μεταβολές της λευκωματίνης, του ολικού και του διορθωμένου ασβεστίου και του φωσφόρου ορού φαίνονται στον Πίνακα 10.

**Πίνακας 10.** Επίπεδα ασβεστίου, λευκωματίνης, διορθωμένου ασβεστίου και φωσφόρου ορού στις τρεις ομάδες ασθενών πριν την έναρξη της αγωγής και 3 και 6 μήνες αργότερα.

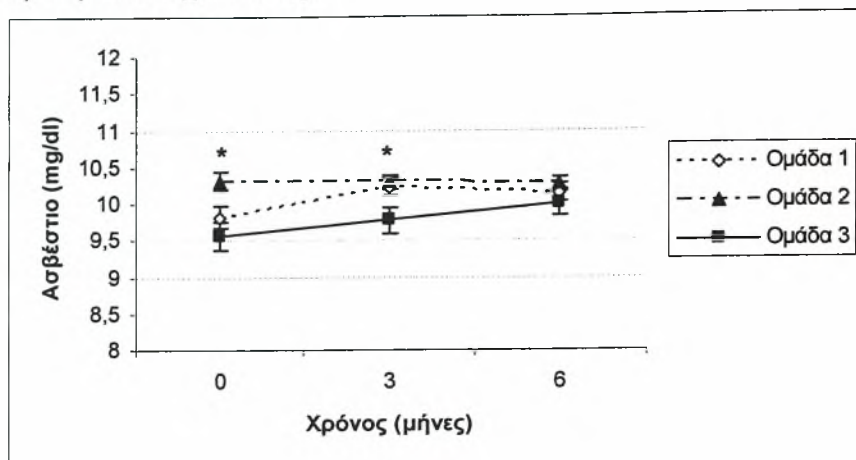
	<b>Ομάδα 1</b>	<b>Ομάδα 2</b>	<b>Ομάδα 3</b>	<b>τιμή p</b>
<b>Ασβέστιο ορού (mg/dl)</b>				
έναρξη	9,8 ± 0,2	10,3 ± 0,1 <sup>α</sup>	9,6 ± 0,2 <sup>γ</sup>	0,01
3 μήνες	10,2 ± 0,1	10,3 ± 0,1	9,8 ± 0,2 <sup>γ</sup>	0,024
6 μήνες	10,1 ± 0,1	10,3 ± 0,1	10,0 ± 0,2 <sup>ε</sup>	0,354
<b>τιμή p</b>	0,992	0,942	0,047	
<b>Λευκωματίνη ορού (mg/dl)</b>				
έναρξη	4,5 ± 0,1	4,6 ± 0,1	4,4 ± 0,1	0,063
3 μήνες	4,6 ± 0,1	4,7 ± 0,1	4,4 ± 0,1 <sup>γ</sup>	0,003
6 μήνες	4,6 ± 0,1	4,6 ± 0,1	4,4 ± 0,1 <sup>β,γ</sup>	0,001
<b>τιμή p</b>	0,996	0,348	0,69	
<b>Διορθωμένο ασβέστιο ορού (mg/dl)</b>				
έναρξη	9,4 ± 0,1	9,8 ± 0,1 <sup>α</sup>	9,3 ± 0,2 <sup>γ</sup>	0,019
3 μήνες	9,7 ± 0,1	9,7 ± 0,1	9,4 ± 0,2	0,126
6 μήνες	9,7 ± 0,1	9,8 ± 0,1	9,7 ± 0,2 <sup>ε,στ</sup>	0,776
<b>τιμή p</b>	0,978	0,686	0,007	
<b>Φωσφόρος ορού (mg/dl)</b>				
έναρξη	3,9 ± 0,1	3,6 ± 0,1 <sup>α</sup>	3,9 ± 0,1 <sup>γ</sup>	0,016
3 μήνες	4,0 ± 0,2	3,6 ± 0,1	4,1 ± 0,1 <sup>γ</sup>	0,04
6 μήνες	4,1 ± 0,1	3,8 ± 0,1	4,0 ± 0,1	0,225
<b>τιμή p</b>	0,213	0,580	0,367	

Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ:

<sup>α</sup> ομάδων 1 και 2, <sup>β</sup> ομάδων 1 και 3, <sup>γ</sup> ομάδων 2 και 3, <sup>δ</sup> 0 και 3 μηνών, <sup>ε</sup> 0 και 6 μηνών, <sup>στ</sup> 3 και 6 μηνών

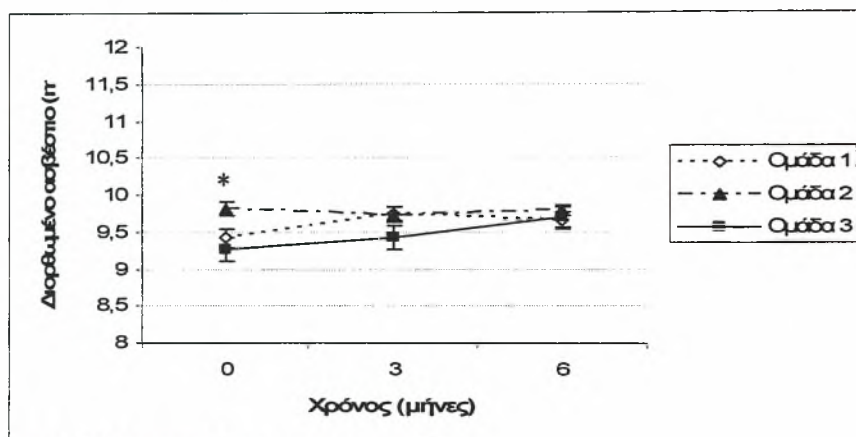
Οι μεταβολές του ολικού και διορθωμένου ασβεστίου απεικονίζονται και διαγραμματικά στα Σχήματα 7 και 8.

**Σχήμα 7.** Μεταβολές του ολικού ασβεστίου ορού στις τρεις ομάδες ασθενών κατά τη διάρκεια της μελέτης.



\*  $p < 0.05$  μεταξύ των τριων ομάδων.

**Σχήμα 8.** Μεταβολές του διορθωμένου ασβεστίου ορού στις τρεις ομάδες ασθενών κατά τη διάρκεια της μελέτης.



\*  $p < 0.05$  μεταξύ των τριων ομάδων.

Η παραθορμόνη (PTH) αυξήθηκε βαθμιαία στους ασθενείς των ομάδων ελέγχου και RIS και μειώθηκε στους ασθενείς της ομάδας της TPTD, όπως φαίνεται στον Πίνακα 11 και απεικονίζεται στο Σχήμα 9.

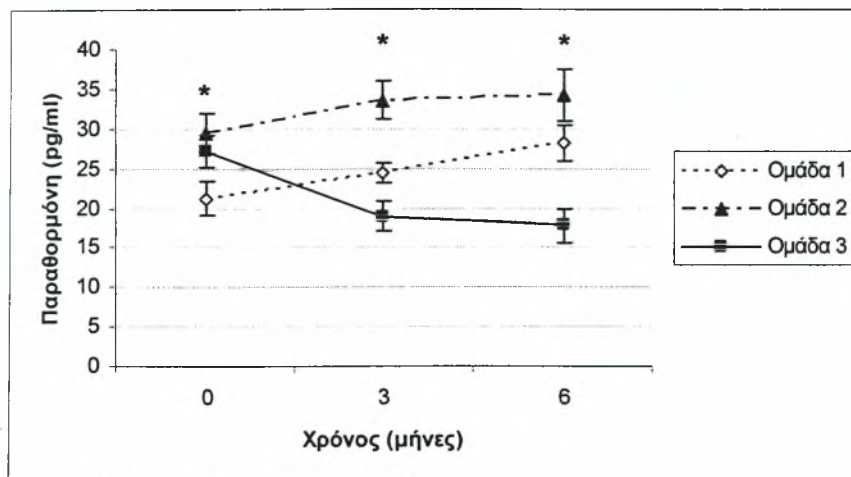
**Πίνακας 11.** Μεταβολή της παραθορμόνης ορού (pg/ml), στις τρεις ομάδες ασθενών πριν την έναρξη της αγωγής και 3 και 6 μήνες αργότερα.

	Ομάδα 1	Ομάδα 2	Ομάδα 3	τιμή $p$
έναρξη	21,2 ± 2,2	29,5 ± 2,5 <sup>α</sup>	27,2 ± 2,0 <sup>β</sup>	0,026
3 μήνες	24,4 ± 1,1	33,6 ± 2,4 <sup>α,δ</sup>	19,0 ± 1,9 <sup>γ,δ</sup>	< 0,001
6 μήνες	28,2 ± 2,2 <sup>ε,στ</sup>	34,2 ± 3,3 <sup>ε</sup>	17,7 ± 2,0 <sup>β,γ,ε</sup>	< 0,001
τιμή $p$	0,005	0,044	< 0,001	

Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ:

<sup>α</sup> ομάδων 1 και 2, <sup>β</sup> ομάδων 1 και 3, <sup>γ</sup> ομάδων 2 και 3, <sup>δ</sup> 0 και 3 μηνών, <sup>ε</sup> 0 και 6 μηνών, <sup>στ</sup> 3 και 6 μηνών

**Σχήμα 9.** Μεταβολές της παραθορμόνης ορού στις τρεις ομάδες ασθενών κατά τη διάρκεια της μελέτης.



\*  $p < 0.05$  μεταξύ των τριων ομάδων.

Οι δείκτες οστικού μεταβολισμού, δηλαδή η ολική ΑΦ, PINP και CTX, μειώθηκαν βαθμιαία στους ασθενείς της ομάδας της RIS και αυξήθηκαν στους ασθενείς της ομάδας της TPTD, ενώ μόνο η ΑΦ αυξήθηκε σημαντικά στην ομάδα ελέγχου, όπως φαίνεται στον Πίνακα 12 και απεικονίζεται στα Σχήματα 10, 11 και 12, αντίστοιχα.

**Πίνακας 12.** Επίπεδα της ολικής ΑΦ, του αμινοτελικού προπεπτιδίου του προκολλαγόνου τύπου 1 (PINP) και του καρβοξυ-τελοπεπτιδικού τελοπεπτιδίου του κολλαγόνου (CTX) στον ορό στις τρεις ομάδες ασθενών πριν την έναρξη της αγωγής και 3 και 6 μήνες αργότερα.

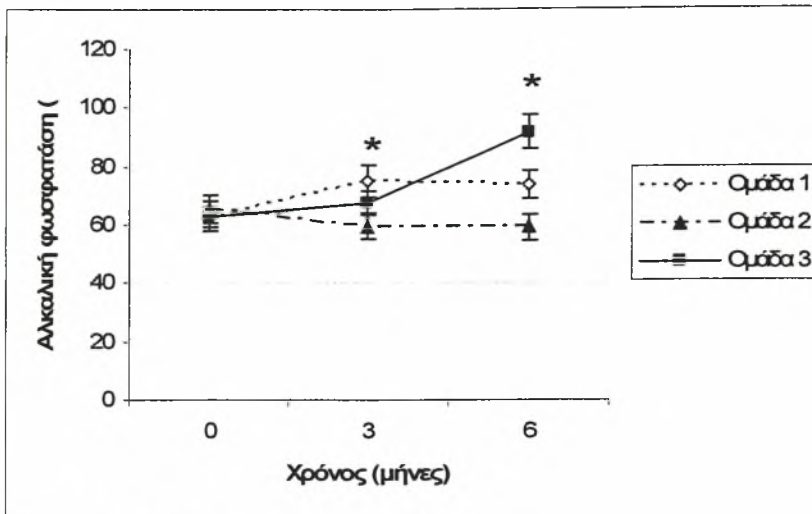
	Ομάδα 1	Ομάδα 2	Ομάδα 3	τιμή $p$
<b>Ολική αλκαλική φωσφατάση ορού (IU/l)</b>				
έναρξη	62,7 ± 3,4	65,4 ± 5,0	63,0 ± 5,0	0,898
3 μήνες	74,9 ± 5,3 <sup>δ</sup>	59,6 ± 4,2 <sup>δ</sup>	67,5 ± 3,9	0,07
6 μήνες	73,7 ± 5,0 <sup>ε</sup>	59,2 ± 4,4 <sup>ε</sup>	91,7 ± 6,0 <sup>γ,ε,στ</sup>	< 0,001
τιμή $p$	0,016	0,015	< 0,001	
<b>PINP ορού (ng/ml)</b>				
έναρξη	55,0 ± 4,0	43,7 ± 4,2	40,6 ± 3,6 <sup>β</sup>	0,023
3 μήνες	68,4 ± 6,3	28,5 ± 3,8 <sup>α,δ</sup>	81,3 ± 6,6 <sup>γ,δ</sup>	< 0,001
6 μήνες	66,5 ± 6,0	31,9 ± 4,9 <sup>α,ε</sup>	184,0 ± 17,5 <sup>β,γ,ε,στ</sup>	< 0,001
τιμή $p$	0,883	< 0,001	< 0,001	
<b>CTX ορού (ng/ml)</b>				
έναρξη	0,331 ± 0,034	0,227 ± 0,025	0,264 ± 0,028	0,063
3 μήνες	0,381 ± 0,042	0,170 ± 0,026 <sup>α,δ</sup>	0,417 ± 0,041 <sup>γ,δ</sup>	< 0,001
6 μήνες	0,409 ± 0,050	0,164 ± 0,027 <sup>α,ε</sup>	0,805 ± 0,081 <sup>β,γ,ε,στ</sup>	< 0,001
τιμή $p$	0,556	< 0,001	< 0,001	

Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ:

<sup>α</sup> ομάδων 1 και 2, <sup>β</sup> ομάδων 1 και 3, <sup>γ</sup> ομάδων 2 και 3, <sup>δ</sup> 0 και 3 μηνών, <sup>ε</sup> 0 και 6 μηνών, <sup>στ</sup> 3 και 6 μηνών

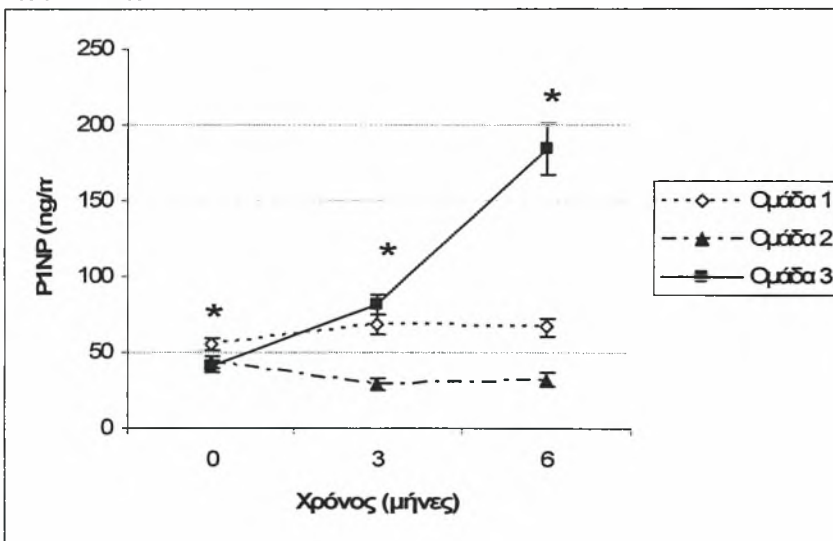
Μετά από ανάλυση ANCOVA προκύπτει ότι η τιμή του PINP κατά την έναρξη δεν επηρέασε σημαντικά ( $p=0,528$ ) την μεταβολή του στους 3 και 6 μήνες μεταξύ των ομάδων.

**Σχήμα 10.** Μεταβολές της αλκαλικής φωσφατάσης ορού στις τρεις ομάδες ασθενών κατά τη διάρκεια της μελέτης.



\*  $p < 0.05$  μεταξύ των τριων ομάδων.

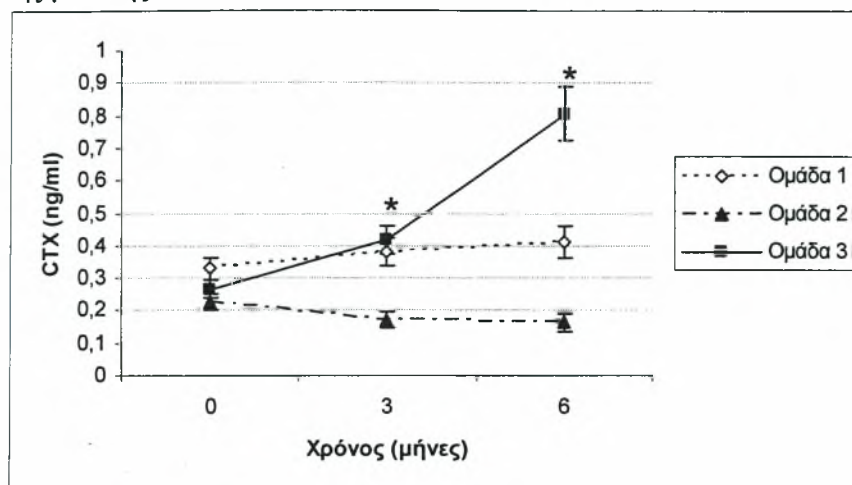
**Σχήμα 11.** Μεταβολές του PINP ορού στις τρεις ομάδες ασθενών κατά τη διάρκεια της μελέτης.



\*  $p < 0.05$  μεταξύ των τριων ομάδων.



**Σχήμα 12.** Μεταβολές του CTX ορού στις τρεις ομάδες ασθενών κατά τη διάρκεια της μελέτης



\*  $p < 0.05$  μεταξύ των τριων ομάδων.

Η OPG ορού δε μεταβλήθηκε σημαντικά στους ασθενείς των τριών ομάδων κατά τη διάρκεια της μελέτης, ενώ τα επίπεδα του RANKL μειώθηκαν σημαντικά και στις τρεις ομάδες χωρίς να διαφέρουν μεταξύ τους, με συνέπεια αντίστοιχη αύξηση του λόγου τους, όπως φαίνεται στον Πίνακα 13 και απεικονίζεται στα Σχήματα 13, 14 και 15, αντίστοιχα.

**Πίνακας 13.** Επίπεδα της οστεοπροτεγερίνης (OPG), του συνδέτη του υποδοχέα του ενεργοποιητή του πυρηνικού παράγοντα κΒ (RANKL) στον ορό και του λόγου τους στις τρεις ομάδες ασθενών πριν την έναρξη της αγωγής και 3 και 6 μήνες αργότερα.

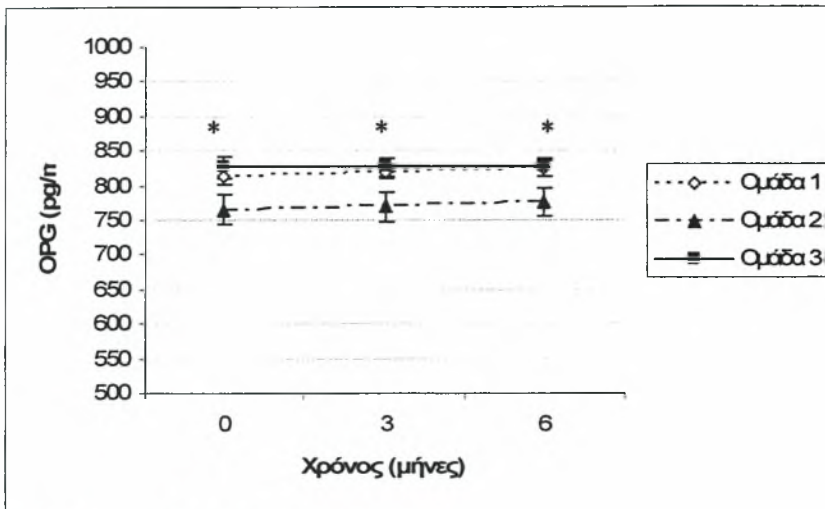
	Ομάδα 1	Ομάδα 2	Ομάδα 3	τιμή $p$
<b>OPG ορού (pg/ml)</b>				
έναρξη	814,37 ± 12,38	765,70 ± 20,27	827,00 ± 15,69 <sup>γ</sup>	0,028
3 μήνες	818,76 ± 9,68	769,74 ± 21,22	826,22 ± 12,05 <sup>γ</sup>	0,022
6 μήνες	825,76 ± 11,83	775,79 ± 19,99 <sup>α</sup>	826,74 ± 13,13 <sup>γ</sup>	0,036
τιμή $p$	0,838	0,904	0,972	
<b>RANKL ορού (ng/ml)</b>				
έναρξη	0,208 ± 0,012	0,251 ± 0,017	0,229 ± 0,020	0,173
3 μήνες	0,185 ± 0,014 <sup>δ</sup>	0,227 ± 0,014 <sup>δ</sup>	0,210 ± 0,018 <sup>δ</sup>	0,231
6 μήνες	0,157 ± 0,014 <sup>ε,στ</sup>	0,213 ± 0,015 <sup>ε</sup>	0,194 ± 0,017 <sup>ε,στ</sup>	0,06
τιμή $p$	< 0,001	0,001	< 0,001	
<b>OPG / sRANKL</b>				
έναρξη	4336,3 ± 274,2	3420,9 ± 312,1	4253,9 ± 364,7	0,104
3 μήνες	4806,6 ± 343,0 <sup>δ</sup>	3710,3 ± 317,5 <sup>δ</sup>	4630,2 ± 391,0 <sup>δ</sup>	0,088
6 μήνες	5886,2 ± 492,7 <sup>ε,στ</sup>	4017,4 ± 343,3 <sup>ε,στ</sup>	4957,5 ± 396,1 <sup>ε,στ</sup>	0,013
τιμή $p$	< 0,001	< 0,001	< 0,001	

Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ:

<sup>α</sup> ομάδων 1 και 2, <sup>β</sup> ομάδων 1 και 3, <sup>γ</sup> ομάδων 2 και 3, <sup>δ</sup> 0 και 3 μηνών, <sup>ε</sup> 0 και 6 μηνών, <sup>στ</sup> 3 και 6 μηνών

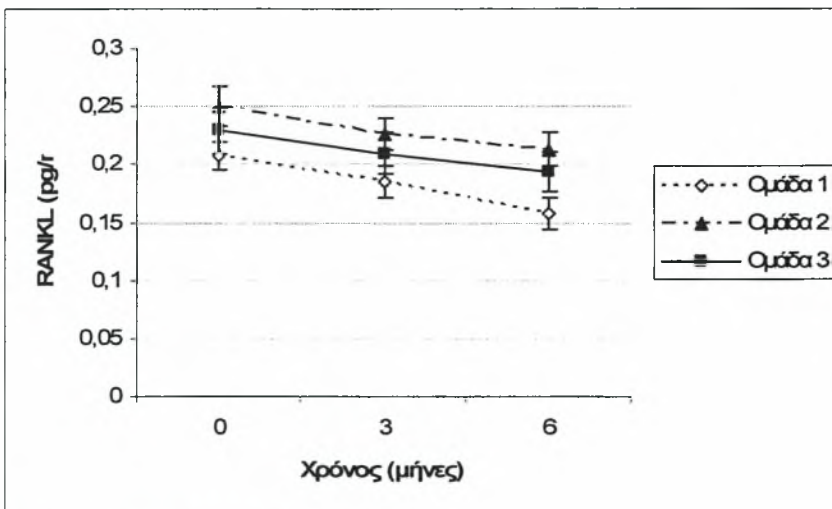
Μετά από ανάλυση ANCOVA προκύπτει ότι η τιμή της OPG κατά την έναρξη επηρέασε σημαντικά ( $p < 0,001$ ) την μεταβολή της στους 3 και 6 μήνες μεταξύ των ομάδων. Η αρχική διαφορά ηλικίας μεταξύ των ομάδων δεν επηρέασε την μεταβολή της OPG στους 3 και τους 6 μήνες.

**Σχήμα 13.** Μεταβολές της οστεοπροτεγερίνης ορού στις τρεις ομάδες ασθενών κατά τη διάρκεια της μελέτης.



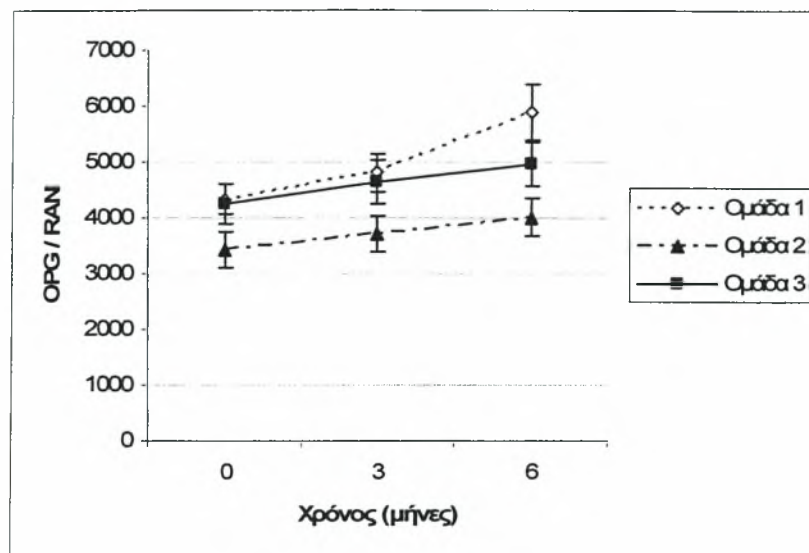
\*  $p < 0.05$  μεταξύ των τριων ομάδων.

**Σχήμα 14.** Μεταβολές του sRANKL ορού στις τρεις ομάδες ασθενών κατά τη διάρκεια της μελέτης.



\*  $p < 0.05$  μεταξύ των τριων ομάδων.

**Σχήμα 15.** Μεταβολές του λόγου OPG / sRANKL στις τρεις ομάδες ασθενών κατά τη διάρκεια της μελέτης.



\*  $p < 0.05$  μεταξύ των τριων ομάδων.

### 3.3 Συσχετίσεις

Τα επίπεδα της OPG, του sRANKL, του λόγου OPG/sRANKL, της PTH και των δεικτών οστικού μεταβολισμού (ολική ΑΦ, PINP και CTX) κατά την έναρξη της μελέτης συσχετίστηκαν με την ηλικία, την ηλικία εμμηνόπαυσης, τα έτη ζωής από την εμμηνόπαυση, το βάρος, τον δείκτη μάζας σώματος και την οστική πυκνότητα (BMD) στο σύνολο των ασθενών (Πίνακες 14, 15).

Έγινε συσχέτιση επίσης των επιπέδων της OPG, του sRANKL και του λόγου OPG / sRANKL κατά την έναρξη της μελέτης με τους βιοχημικούς δείκτες, δηλαδή το ασβέστιο, ολικό και διορθωμένο, την PTH, την ολική ΑΦ, το PINP και το CTX ορού.

Ο λόγος OPG / sRANKL στο σύνολο των ασθενών βρέθηκε να σχετίζεται αρνητικά με την ηλικία εμμηνόπαυσης ( $r=-0,232$ ,  $p=0,048$ ). Ο λόγος OPG / sRANKL κατά την έναρξη της μελέτης σχετιζόταν επίσης θετικά με την BMD ( $r=0,282$ ,  $p=0,034$ ). Δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ OPG, RANKL ή του λόγου τους με άλλα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών (ηλικία, βάρος, BMI).

Πριν την έναρξη της αγωγής ο sRANKL εμφάνιζε θετική συσχέτιση με το ολικό Ca ( $r=0,446$ ,  $p < 0,001$ ) και το διορθωμένο Ca ( $r=0,476$ ,  $p < 0,001$ ) και ο λόγος OPG / sRANKL αρνητική συσχέτιση με το ολικό Ca ( $r=-0,417$ ,  $p < 0,001$ ) και το διορθωμένο Ca ( $r=-0,437$ ,  $p < 0,001$ ). Τόσο η OPG και ο sRANKL, όσο και ο λόγος OPG / sRANKL δεν βρέθηκε να σχετίζονται με την PTH, την ολική ΑΦ, το PINP και το CTX ορού κατά την έναρξη της μελέτης στο σύνολο των ασθενών.

Στο σύνολο των ασθενών μας (n=74) κατά την έναρξη της μελέτης, εμφάνιζαν αρνητική συσχέτιση με το δείκτη μάζας σώματος τόσο ο δείκτης οστικού σχηματισμού PINP ( $r=-0,242$ ,  $p=0,042$ ) όσο και ο δείκτης οστικής απορρόφησης CTX ορού ( $r=-0,239$ ,  $p=0,045$ ). Αντίθετα θετική συσχέτιση με το δείκτη μάζας σώματος εμφάνιζε η PTH ( $r=0,245$ ,  $p=0,038$ ) ενώ η ολική ΑΦ δεν εμφάνιζε συσχέτιση ( $r=-0,218$ ,  $p=0,064$ ).

Οι δείκτες οστικού μεταβολισμού PINP και CTX εμφάνιζαν έντονα αρνητική συσχέτιση με την ηλικία ( $r=-0,348$ ,  $p=0,003$  και  $r=-0,344$ ,  $p=0,003$  αντίστοιχα), ενώ η ολική ΑΦ δεν σχετιζόταν με την ηλικία αλλά σχετιζόταν θετικά με την ηλικία εμμηνόπαυσης ( $r=0,296$ ,  $p=0,01$ ).

Κατά την έναρξη της μελέτης, στο σύνολο των ασθενών η ολική ΑΦ συσχετιζόταν θετικά με το PINP ( $r=0,234$ ,  $p=0,048$ ) και με το CTX ( $r=0,291$ ,  $p=0,013$ ) ενώ το PINP εμφάνιζε θετική συσχέτιση με το CTX ( $r=0,706$ ,  $p < 0,001$ ).

**Πίνακας 14.** Συσχετίσεις μεταξύ του ολικού (Ca) και διορθωμένου (CCa) ασβεστίου, των δεικτών οστικού μεταβολισμού (CTX, PINP, ΑΦ, PTH), της OPG, του RANKL και του λόγου τους, της ηλικίας, της ηλικίας εμμηνόπαυσης και των σωματομετρικών χαρακτηριστικών στο σύνολο των ασθενών στην έναρξη της μελέτης.

	Ca	CCa	CTX	PINP	PTH	ΑΦ	OPG	RANKL	OPG/sRANKL	εμμηνόπαυση	ηλικία	βάρος	BMI
Ca	r	1											
CCa	p	0,958											
CTX	r	0,000	1										
PINP	r	0,051	0,076	1									
PTH	p	0,670	0,526		1								
ΑΦ	r	0,080	0,146	0,706		1							
OPG	r	0,503	0,221	0,000			1						
RANKL	r	0,210	0,072	0,962	0,025	0,837		1					
OPG/sRANKL	p	0,075	0,072	0,962	0,837	0,837			1				
Εμμηνόπαυση	r	0,171	0,128	0,291	0,234	0,839	0,209	0,058		1			
Ηλικία	r	0,145	0,276	0,013	0,048	0,839	0,086	0,627	0,099		1		
Βάρος	r	0,025	0,059	0,084	0,086	0,209	0,086	0,627	0,406	0,406		1	
BMI	p	0,834	0,621	0,482	0,473	0,076	0,076	0,627	0,357	0,357	0,000		1
	r	0,446	0,476	0,037	-0,013	0,183	0,183	-0,015	0,002	0,002	0,000	0,000	
	p	0,000	0,000	0,756	0,913	0,121	0,899	0,406	0,357	0,357	0,000	0,000	0,905
	r	-0,417	-0,437	-0,037	0,018	-0,100	-0,027	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	1
	p	0,000	0,000	0,760	0,879	0,401	0,821	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	
	r	0,600	0,600	0,600	0,563	0,791	0,010	0,545	0,545	0,545	0,055	0,055	1
	p	-0,344	-0,344	-0,344	-0,348	0,177	-0,008	0,068	0,068	0,068	0,115	0,115	0,253
	r	0,003	0,003	0,003	0,003	0,135	0,949	0,566	0,566	0,566	0,331	0,331	0,030
	p	-0,181	-0,181	-0,174	-0,174	0,139	-0,203	-0,072	-0,072	-0,072	0,119	0,119	-0,225
	r	0,132	0,147	0,243	0,243	0,085	0,085	0,550	0,550	0,550	0,318	0,318	0,063
	p	0,082	0,103	-0,239	-0,242	0,245	-0,218	-0,038	-0,038	-0,038	0,108	0,108	0,598
	r	0,489	0,386	0,045	0,042	0,038	0,064	0,748	0,748	0,748	0,367	0,367	0,324
	p	0,000	0,000	0,045	0,042	0,038	0,064	0,748	0,748	0,748	0,367	0,367	0,005
													0,000



**Πίνακας 15.** Συσχετίσεις μεταξύ της OPG, του RANKL και του λόγου τους και της οστικής πυκνότητας στο σύνολο των ασθενών στην έναρξη της μελέτης.

		<b>BMD</b>	<b>T-score</b>	<b>OPG</b>	<b>RANKL</b>	<b>OPG/sRANKL</b>
<b>BMD</b>	<i>r</i>	1				
	<i>p</i>					
<b>T-score</b>	<i>r</i>	0,652	1			
	<i>p</i>	0,000				
<b>OPG</b>	<i>r</i>	0,097	-0,025	1		
	<i>p</i>	0,475	0,857			
<b>RANKL</b>	<i>r</i>	-0,250	-0,156	-0,099	1	
	<i>p</i>	0,061	0,254	0,406		
<b>OPG/sRANKL</b>	<i>r</i>	<b>0,282</b>	0,123	0,357	-0,905	1
	<i>p</i>	<b>0,034</b>	0,372	0,002	0,000	

#### 4. Συζήτηση

Στη μελέτη μας αυτή είχαμε ως στόχο να εκτιμήσουμε τη μεταβολή των επιπέδων της OPG, του sRANKL και του λόγου τους στην περιφέρεια, μετά από χορήγηση παραγόντων με αντίθετη επίδραση στο δίπολο οστεοβλάστη – οστεοκλάστη, όπως είναι η RIS και η TPTD, σε μια προσπάθεια να αξιολογήσουμε την απάντησή τους στη θεραπεία.

Τα επίπεδα της OPG στον ορό πρακτικά δεν μεταβλήθηκαν στην ομάδα ελέγχου ούτε στις ομάδες με την αντιοστεοκλαστική και την οστεοαναβολική αγωγή. Αντίθετα, τα επίπεδα του sRANKL μειώθηκαν και στις τρεις ομάδες ασθενών της μελέτης μας. Ο λόγος OPG/RANKL, που θεωρείται ότι αντανακλά τη συνολική επίδραση των δύο κυτταροκινών στην οστεοκλαστική δραστηριότητα, αυξήθηκε ακολουθώντας τις μεταβολές του sRANKL.

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχει μεγάλη ανομοιογένεια στα ευρήματα των μελετών που αφορούν τα επίπεδα αίματος των OPG και sRANKL, ιδίως στο πεδίο της οστεοπόρωσης. Για το φαινόμενο αυτό πιθανώς ευθύνονται

α) το ενδεχόμενο τα επίπεδα της OPG και του sRANKL να μην αντανακλούν τη δραστηριότητα αυτών των κυτταροκινών τοπικά στο οστικό μικροπεριβάλλον. Η άποψη αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι σε ασθενείς με υπερπαραθυρεοειδισμό, η OPG ορού δεν μεταβλήθηκε σημαντικά μετά παραθυρεοειδεκτομή<sup>178</sup>, παρόλο που ο λόγος RANKL / OPG mRNA σε λαγόνιες οστικές βιοψίες ασθενών μετά παραθυρεοειδεκτομή ήταν μειωμένος<sup>179</sup>.

β) το ενδεχόμενο μέρος των επιπέδων της OPG και του sRANKL στην κυκλοφορία να προέρχεται από μη σκελετικές πηγές. Επιπλέον, είναι άγνωστη η αναλογία παραγωγής των κυτταροκινών αυτών από τους διάφορους ιστούς που τις εκφράζουν, σε διαφορετικές παθολογικές καταστάσεις.

γ) οι διαφορετικές μέθοδοι προσδιορισμού που χρησιμοποιούνται στις διάφορες μελέτες, μεταξύ των οποίων δεν έχουν γίνει συγκριτικές μελέτες. Ακόμη, και η ίδια μέθοδος έχει τροποποιηθεί σταδιακά στα πλαίσια βελτίωσης της, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η σύγκριση των αποτελεσμάτων. Η OPG κυκλοφορεί ως μονομερές, ως ομοδιμερές και ως σύμπλοκο δεσμευμένη με το RANKL. Οι εμπορικά διαθέσιμες μέθοδοι έχουν σχεδιαστεί ώστε να ανιχνεύουν όλες τις μορφές της κυκλοφορούσας OPG, αν και βιολογικά δραστική μορφή θεωρείται η ομοδιμερής ενώ, αφθονότερη είναι η μονομερής μορφή<sup>145</sup>. Στη δική μας μελέτη η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ανιχνεύει όλες τις μορφές της κυκλοφορούσας OPG.

Ο λόγος OPG / sRANKL είναι μάλλον πιο αξιόπιστος δείκτης από την τιμή της OPG. Εξάλλου, ο λόγος των δύο αυτών κυτταροκινών με την αντίθετη δράση στον οστεοκλάστη καθορίζει τελικά την οστεοκλαστική δραστηριότητα. Ωστόσο, η μέτρηση του sRANKL στον ορό έχει κάποιους περιορισμούς. Η συγκέντρωσή του σε φυσιολογικά άτομα είναι τυπικά κάτω από 1 pmol/l. Αλλά και σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, ένα αξιόλογο ποσοστό των ασθενών έχει μη ανιχνεύσιμα επίπεδα sRANKL στον ορό<sup>149-153</sup>. Αν και έχουν αναπτυχθεί νεότερες μέθοδοι με βελτιωμένη ευαισθησία, αυτό πιθανώς εξακολουθεί να δημιουργεί μεθοδολογικά προβλήματα εν μέρει τουλάχιστον.

Ο sRANKL, όπως αναφέρθηκε, κυκλοφορεί σε διαλυτή μορφή. Όμως, στο μεγαλύτερο ποσοστό του είναι δεσμευμένος στην επιφάνεια των κυττάρων (μεμβρανική μορφή), η οποία δεν ανιχνεύεται στην κυκλοφορία. Η συγκέντρωση του RANKL στην επιφάνεια των κυττάρων έχει προσδιοριστεί *in vivo* με κυτταρομετρία ροής<sup>286</sup>. Σ' αυτή τη μελέτη, προ- και μετ-εμμηνοπαυσιακών γυναικών, η συγκέντρωση του RANKL στα κύτταρα του μυελού των οστών ήταν υψηλότερη στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες που δεν ελάμβαναν αγωγή σε σύγκριση με τις αντίστοιχες που έπαιρναν οιστραδιόλη ή τις προεμμηνοπαυσιακές. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή δεν είναι πρακτική, καθώς απαιτεί οστεομυελική βιοψία αντί απλής αιμοληψίας και επιπλέον δεν δίνει τη δυνατότητα κατάψυξης του δείγματος, ώστε να μελετηθεί αργότερα. Έτσι, δεν είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί για εκτίμηση ασθενών σε διαφορετικά χρονικά σημεία, όπως στη δική μας μελέτη.

Η εβδομαδιαία λήψη 35mg RIS, στη δική μας μελέτη, δεν μετέβαλε τα επίπεδα της OPG στον ορό. Παρόμοια ήταν τα ευρήματα και άλλων μελετών με διαφορετικά διφωσφονικά. Έτσι, μετά διετή αγωγή με επιδρονάτη σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα<sup>171</sup> και τιλουδρονάτη σε ασθενείς με οστεοπόρωση<sup>172</sup>, η OPG ορού παρέμεινε αμετάβλητη. Είναι ενδεχόμενο η αύξηση της κυτταρικής έκκρισης της OPG και του sRANKL από τους οστεοβλάστες, μετά από αγωγή με διφωσφονικά, να καλύπτεται από ελάττωση του αριθμού των οστεοβλαστών λόγω μείωσης του οστικού μεταβολισμού. Μάλιστα, ο Khosla και συν. υποστηρίζουν ότι σε όσες μελέτες παρατηρήθηκε μεταβολή των επιπέδων της OPG, οι μετρήσεις έγιναν εντός λίγων ημερών από την έναρξη της θεραπείας, δηλαδή πριν αρχίσει να μειώνεται ο ρυθμός οστικού μεταβολισμού<sup>167</sup>. Σε αντίθεση όμως με τα δικά μας ευρήματα σε άλλες μελέτες διαπιστώθηκε μεταβολή της OPG. Ο Martini και συν. έδειξαν αύξηση της με την παμιδρονάτη σε ασθενείς με v.Paget<sup>173</sup>, ενώ οι Dobnig και συν., πρόσφατα, ανέφεραν σημαντική μείωση της OPG ορού στην ομάδα ελέγχου και αύξηση σε ομάδα ασθενών που ελάμβαναν RIS 5 mg ημερησίως<sup>174</sup>.

Στην ομάδα της TPTD τα επίπεδα OPG επίσης δεν μεταβλήθηκαν στη διάρκεια της παρατήρησης. Σε ασθενείς με οστεοπόρωση από γλυκοκορτικοειδή που έλαβαν TPTD, ο Buxton και συν. ανέφεραν ελαφρά μείωση μετά 6 μήνες θεραπείας<sup>177</sup>. Βέβαια, η λήψη κορτικοειδών από μόνη της μειώνει την OPG ορού<sup>291,292,340</sup>, οπότε η μεταβολή αυτή που ο Buxton απέδωσε στην TPTD μπορεί να οφείλεται, τουλάχιστον εν μέρει, στη δράση των κορτικοειδών<sup>291</sup>. Απ' όσο γνωρίζουμε στη βιβλιογραφία, αυτή είναι η μόνη εργασία σχετικά με τη μεταβολή της OPG μετά αγωγή με TPTD εκτός από την παρούσα μελέτη. Η συγκεκριμένη μελέτη διέφερε από τη δική μας στο ότι αφορούσε οστεοπόρωση από γλυκοκορτικοειδή και όχι μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση, ενώ η ομάδα της PTH 1-34 και η ομάδα ελέγχου έπαιρναν συγχρόνως και Θ.Ο.Υ. Σημειωτέον ότι η δόση της TPTD ήταν 40mg, δηλαδή διπλάσια από τη χορηγούμενη στις δικές μας ασθενείς. Επιπρόσθετα, τα δείγματα ορού είχαν φυλαχθεί πάνω από 5 έτη πριν αναλυθούν και είχαν υποβληθεί σε απόψυξη-επανάψυξη δύο φορές. Ένδειξη για μη σημαντική επίδραση της PTH στα επίπεδα της OPG ορού αποτελεί και η παρατήρηση ότι σε περιπτώσεις υπερπαραθυρεοειδισμού μετά παραθυρεοειδεκτομή δεν μεταβλήθηκαν τα επίπεδα της<sup>178</sup>. Φυσικά η συνεχώς αυξημένη ενδογενής PTH στον υπερπαραθυρεοειδισμό ασκεί εντονότερη και πιθανώς διαφορετική βιολογική δράση από τη διακεκομμένη χορήγηση PTH 1-34.

Σε αντίθεση με μελέτες που αναφέρουν μεγάλο ποσοστό ασθενών με μη ανιχνεύσιμα επίπεδα RANKL στον ορό<sup>152, 153</sup>, στο υλικό μας δεν υπήρξε ούτε μια ασθενής με μη ανιχνεύσιμα επίπεδα sRANKL. Όπως προαναφέρθηκε, τα επίπεδα του sRANKL μειώθηκαν μη ειδικά και στις τρεις ομάδες ασθενών της μελέτης μας. Συγκεκριμένα, στην ομάδα της RIS τα επίπεδα sRANKL μειώθηκαν στο διάστημα της εξάμηνης θεραπείας.

Από τη βιβλιογραφία, τα επίπεδα sRANKL δεν μεταβλήθηκαν σε οστεοπορωτικούς που έλαβαν αλενδρονάτη 10mg ή RIS 5mg καθημερινά<sup>174</sup> ενώ έδειξαν μια τάση για μείωση στους ασθενείς με v.Paget υπό παμιδρονάτη<sup>175</sup>.

Στην ομάδα της TPTD επίσης παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων sRANKL. Το εύρημα μας είναι αντίθετο με εκείνο άλλης μελέτης, όπου διαπιστώθηκε σημαντική αύξηση του sRANKL από τον πρώτο μήνα έναρξης της αγωγής, αλλά αφορούσε σε ασθενείς υπό αγωγή με γλυκοκορτικοειδή<sup>177</sup>. Παρόμοια πρωίμη αύξηση (στη διάρκεια του πρώτου μηνός) παρατηρήσαμε και εμείς, σε άλλη μας μελέτη, σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες που δεν ελάμβαναν οποιαδήποτε άλλη αγωγή. Οι ανωτέρω παρατηρήσεις υποδηλώνουν ότι η TPTD πιθανώς αυξάνει τα επίπεδα του sRANKL κατά την αρχική φάση χορήγησης.

Για τη σταδιακή πτώση του RANKL με παρόμοιο τρόπο στους ασθενείς όλων των ομάδων δεν έχουμε εξήγηση. Κακή συντήρηση των δειγμάτων ή ανεπαρκής ψύξη έχει αποκλειστεί, καθώς κάτι τέτοιο θα επηρέαζε όλα τα δείγματα, με αποτέλεσμα χαμηλά ως μη ανιχνεύσιμα επίπεδα RANKL σε όλα τα χρονικά σημεία. Αν ευθυνόταν ο μεγάλος χρόνος συντήρησης των δειγμάτων πριν την μέτρηση τους, τα παλαιότερα δείγματα θα επηρεαζόταν περισσότερο, με αποτέλεσμα αύξηση των τιμών στη διάρκεια του εξαμήνου. Κάποιο λάθος στη συλλογή και φυγοκέντρηση των δειγμάτων επίσης αποκλείστηκε, καθώς η στρατολόγηση των ασθενών έγινε σε διάστημα πολλών μηνών, δηλαδή κάποιος ασθενής ολοκλήρωνε το εξάμηνο παρακολούθησης τη στιγμή που κάποιος άλλος στρατολογούνταν, επομένως τα δείγματα δεν θα εμφάνιζαν αυτή τη συμμετρική διαφορά στα τρία χρονικά στιγμιότυπα. Λάθη ή διαφορές κατά την απόψυξη και επεξεργασία των δειγμάτων επίσης αποκλείστηκαν, καθώς τα δείγματα αποψύχθηκαν και αναλύθηκαν ταυτόχρονα, χωρίς να έχουν διαχωριστεί σε ομάδες αναλόγως του χρονικού στιγμιότυπου λήψης του δείγματος. Η μείωση αυτή είναι προφανώς ανεξάρτητη από οποιαδήποτε θεραπευτική παρέμβαση και συνέβη σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα για να ενοχοποιηθεί η πρόοδος της ηλικίας.

Η ολική ΑΦ αυξήθηκε, ενώ τα επίπεδα PINP και CTX ορού παρέμειναν αμετάβλητα κατά τη διάρκεια των έξι μηνών της μελέτης στην Ομάδα ελέγχου. Και οι τρεις δείκτες μειώθηκαν σημαντικά στην ομάδα RIS και αυξήθηκαν σημαντικά στην Ομάδα 3. Η PTH αυξήθηκε βαθμιαία στους ασθενείς των Ομάδων 1 και 2 και μειώθηκε στους ασθενείς της Ομάδας 3.

Στην ομάδα ελέγχου η ολική ΑΦ εμφάνισε αύξηση κατά 19,5% στους 3 μήνες και 17,5% στους 6 μήνες, το PINP αύξηση 24,4% στους 3 μήνες και 20,9% στους 6 μήνες, ενώ το CTX ορού αύξηση 15,1% στους 3 μήνες και 23,6% στους 6 μήνες. Δηλαδή στην ομάδα ελέγχου παρατηρήθηκε μια ήπια, μη στατιστικά σημαντική αύξηση του ρυθμού οστικού μεταβολισμού και επομένως των δεικτών τόσο οστικού σχηματισμού όσο και απορρόφησης, αναμενόμενη για γυναίκες στην μετεμμηνοπαυσιακή περίοδο<sup>341</sup>. Η PTH παρουσίασε επίσης αύξηση κατά 15,1% στους 3 μήνες και 33,0% στους 6 μήνες, κάτι που επίσης είναι συμβατό με τις αλλαγές που επέρχονται στον οστικό μεταβολισμό με την εμμηνόπαυση.

Στην ομάδα της RIS από τους δείκτες οστικού μεταβολισμού, η ολική ΑΦ παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση κατά 8,9% στους 3 μήνες και 9,5% στους 6 μήνες αγωγής. Φαίνεται λοιπόν ότι, η ολική ΑΦ προσφέρεται για παρακολούθηση των ασθενών υπό αγωγή με RIS, καθώς μεταβάλλεται σημαντικά ήδη από τους 3 πρώτους μήνες αγωγής. Το PINP και το CTX εμφανίζουν ανάλογη ποσοτική μείωση.



Στη μελέτη μας το CTX ορού μετά αγωγή με RIS 35mg εμφάνισε στατιστικά σημαντική μείωση κατά 25,1% στους 3 μήνες και 27,8% στους 6 μήνες. Η μείωση αυτή ήταν μικρότερη σε σύγκριση με τα ως τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα για τα διφωσφονικά <sup>120, 174, 260, 341, 342</sup>. Βέβαια οι μελέτες αυτές αφορούσαν κυρίως την αλενδρονάτη <sup>120, 174, 341, 342</sup> ή την παμιδρονάτη <sup>47, 138</sup> ή το CTX ούρων σε ασθενείς υπό RIS <sup>134</sup>. Οι μόνες που προσδιόρισαν το CTX ορού υπό RIS ήταν αυτή του Dobnig και συν., που αφορούσε ασθενείς που έλαβαν RIS 5 mg ημερησίως και εμφάνισαν μείωση του CTX κατά 43% στους 12 μήνες <sup>174</sup> και η μελέτη FACT, όπου συγκρίθηκε η εβδομαδιαία χορήγηση αλενδρονάτης 70mg και RIS 35mg και αναφέρθηκε μείωση του CTX κατά 54,7% στους 12 μήνες με RIS 35mg <sup>260</sup>.

Στη μελέτη μας το PINP εμφάνισε μείωση 34,8% στους 3 μήνες και 27,0% στους 6 μήνες αγωγής με RIS 35mg. Η μείωση αυτή ήταν στατιστικά σημαντική στους 3 μήνες αγωγής. Η μεταβολή του PINP σε ασθενείς με μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση υπό αγωγή με RIS (35mg εβδομαδιαίως) έχει μελετηθεί επίσης στην μελέτη FACT, όπου παρατηρήθηκε μείωση του δείκτη κατά 48% μετά 12 μήνες αγωγής <sup>260</sup>. Μια άλλη μελέτη χορήγησης RIS 35mg για την πρόληψη της οστικής απώλειας, σε ασθενείς με καρκίνο μαστού υπό χημειοθεραπεία, αναφέρει μείωση του PINP κατά 26,6% στους 12 μήνες αγωγής. Φαίνεται λοιπόν ότι το PINP είναι καλός δείκτης παρακολούθησης και της αγωγής με αντιοστεοκλαστικά. Αντίστοιχες ή μεγαλύτερες μειώσεις του δείκτη έχουν αναφέρει και άλλες μελέτες με κλοδρονάτη (μείωση PINP ως 46% μετά ένα έτος αγωγής) <sup>127</sup> και αλενδρονάτη 5mg <sup>241</sup> και 10 mg ημερησίως <sup>341, 343</sup>.

Όσον αφορά την PTH αυτή αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά κατά 13,9% στους 3 μήνες και 15,9% στους 6 μήνες. Η αύξηση αυτή ίσως οφείλεται στην υπασβεσταιμική δράση της RIS, η οποία αντιρροπείται με την μικρή αυτή αύξηση της έκκρισης PTH. Πάντως στην δική μας μελέτη δεν διαπιστώθηκαν μεταβολές στα επίπεδα τόσο του ολικού όσο και του διορθωμένου ασβεστίου στο αίμα. Τέλος, τα επίπεδα φωσφόρου στον ορό δεν επηρεάστηκαν από αυτή τη μικρή αύξηση της PTH. Η αύξηση της PTH μετά από λήψη RIS έχει αναφερθεί στη μελέτη των Zegels και συν., όπου χορήγηση μεγάλων δόσεων RIS 20mg καθημερινά για 14 μόλις ημέρες οδήγησε σε σημαντική αύξηση της PTH που παρέμενε για ένα μήνα μετά τη διακοπή της αγωγής <sup>344</sup>.

Στην ομάδα της TPTD η ολική ΑΦ παρουσίασε αύξηση 7,1% στους 3 μήνες και 45,6% στους 6 μήνες, το PINP αύξηση 50,1% στους 3 μήνες και 353,2% στους 6 μήνες, ενώ το CTX ορού αύξηση 58,0% στους 3 μήνες και 204,9% στους 6 μήνες. Και οι τρεις δείκτες εμφάνισαν πιο έντονη αύξηση στο διάστημα μεταξύ 3 και 6 μηνών αγωγής. Τα δεδομένα μας επιβεβαιώνουν την ισχύουσα άποψη ότι το PINP είναι ο καλύτερος δείκτης για την παρακολούθηση ασθενών υπό αγωγή με TPTD <sup>125</sup>. Ανάλογες αυξήσεις έχουν αναφερθεί και σε άλλες μελέτες με την PTH 1-34 <sup>343, 345</sup>, ενώ με την συνθετική PTH 1-84 η αύξηση του PINP ήταν μικρότερη, μόλις 150% στους 12 μήνες <sup>207</sup>. Ωστόσο και το CTX, που παραδοσιακά χρησιμοποιείται ως δείκτης παρακολούθησης της θεραπείας με αντιοστεοκλαστικά, φαίνεται να αποτελεί άριστο δείκτη αποτελεσματικότητας και της TPTD, με αυξήσεις που πλησιάζουν σε μέγεθος αυτές του PINP <sup>346</sup>. Ανάλογες αυξήσεις έχουν αναφερθεί και σε άλλες μελέτες με την PTH 1-34 <sup>345</sup>, ενώ με την συνθετική PTH 1-84 η αύξηση του CTX ήταν μικρότερη, περίπου 100% στους 12 μήνες αγωγής <sup>347</sup>. Τέλος, η ολική ΑΦ εμφανίζει μικρότερη και βραδύτερη αύξηση, που γίνεται σημαντική μόνο στους 6 μήνες αγωγής. Ωστόσο, λόγω του χαμηλού κόστους της και του γεγονότος ότι είναι πολύ πιο προσιτή στην καθημερινή κλινική πράξη, αποτελεί μια βολική εξέταση ρουτίνας για αξιολόγηση της απάντησης των ασθενών στην TPTD όπως συνέβη και στους ασθενείς υπό RIS <sup>346</sup>.



Εναλλακτικά, καλός δείκτης παρακολούθησης της οστεοαναβολικής αγωγής με TPTD φαίνεται να είναι και η ενδογενής PTH. Τα επίπεδα της μειώθηκαν κατά 30,1% ήδη από τους 3 μήνες και έφτασαν το 34,9% στους 6 μήνες. Ανάλογη καταστολή της ενδογενούς PTH παρατηρήθηκε οξέως μετά από έγχυση PTH 1-34 σε φυσιολογικές<sup>348</sup> και οστεοπορωτικές γυναίκες<sup>349</sup>.

Η ελάττωση των επιπέδων της ενδογενούς PTH πιθανώς οφείλεται σε μειωμένη έκκριση της, λόγω κατασταλτικής δράσης της ανασυνδυασμένης PTH 1-34. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι, πρώτον, η έστω διακεκομμένη ημερήσια χορήγηση μόλις 20μg PTH 1-34 είναι αρκετή ώστε να αναστείλει την έκκριση από τους παραθυροειδείς αδένες της ενδογενούς ορμόνης. Δεύτερον, το αμινικό τμήμα 1-34 του ακέραιου μορίου της ενδογενούς PTH είναι πιθανώς το τμήμα που ασκεί την αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση στους παραθυροειδείς. Ο προσδιορισμός της ενδογενούς ακέραιας PTH 1-84 ως δείκτη αποτελεσματικότητας της θεραπείας με TPTD δεν έχει προταθεί από άλλους ερευνητές μέχρι τώρα, ωστόσο φαίνεται να αποτελεί μια καλή εναλλακτική λύση, αφού ο προσδιορισμός του PINP και του CTX δεν είναι ευχερής στην κλινική πράξη<sup>350</sup>. Σε αντίθεση με την ολική ΑΦ, εδώ η απάντηση είναι εμφανής ήδη στους 3 πρώτους μήνες, γεγονός που δίνει τη δυνατότητα πρωιμότερης αξιολόγησης της θεραπείας.

Στις ασθενείς της μελέτης μας ο λόγος OPG / sRANKL βρέθηκε να σχετίζεται αρνητικά με την ηλικία εμμηνόπαυσης ( $r=-0,232$ ,  $p=0,048$ ). Δεν υπήρχε ωστόσο συσχέτιση ούτε της κάθε κυτταροκίνης χωριστά, ούτε του λόγου τους με την ηλικία, σε αντίθεση με αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές για ισχυρή θετική συσχέτιση της OPG με την ηλικία<sup>158,159,162</sup>. Ωστόσο, όλες αυτές οι μελέτες αφορούσαν ένα πολύ μεγαλύτερο αριθμό υγιών ατόμων με ευρύτατη ηλικιακή κατανομή και μάλιστα κάποιες αφορούσαν άτομα και των δύο φύλων<sup>158,162</sup>. Σε μια άλλη μελέτη μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών έχει αναφερθεί θετική συσχέτιση της OPG τόσο με την ηλικία όσο και με την ηλικία εμμηνόπαυσης<sup>153</sup>. Ο sRANKL έχει αναφερθεί να έχει αρνητική συσχέτιση με την ηλικία<sup>159</sup>.

Δεν εντοπίσαμε επίσης συσχέτιση των επιπέδων OPG, RANKL ή OPG / sRANKL με το βάρος ή τον δείκτη μάζας σώματος (BMI). Ανάλογα ευρήματα αναφέρθηκαν και σε άλλες μελέτες σε ηλικιωμένους άνδρες<sup>163</sup>, ενώ αντίθετα σε υγιείς Κορεάτισσες κάθε ηλικίας βρέθηκε θετική συσχέτιση της OPG με το BMI, δηλαδή υψηλότερα επίπεδα της κυτταροκίνης στα παχύσαρκα άτομα<sup>351</sup>.

Στο υλικό μας, ο λόγος OPG / sRANKL κατά την έναρξη της μελέτης σχετιζόταν θετικά με την BMD ( $r=0,282$ ,  $p=0,034$ ) αλλά όχι οι OPG και sRANKL χωριστά. Σε άλλες μελέτες μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών έχει αναφερθεί αρνητική συσχέτιση μεταξύ OPG και BMD, που αποδόθηκε σε αντισταθμιστική αύξηση της OPG ώστε να προληφθεί η περαιτέρω οστική απώλεια<sup>168</sup>, θετική συσχέτιση της OPG με την BMD<sup>153, 156</sup> ή και απουσία συσχέτισης με τη BMD<sup>158, 159, 162</sup>. Ο sRANKL και ο λόγος OPG / sRANKL επίσης έχει αναφερθεί ότι δεν σχετίζεται με την BMD<sup>159</sup>.

Στο σύνολο των ασθενών μας ( $n=74$ ), τα επίπεδα OPG, sRANKL και ο λόγος OPG / sRANKL κατά την έναρξη της μελέτης δεν σχετιζόταν με τους δείκτες οστικού μεταβολισμού. Στη βιβλιογραφία υπάρχει μεγάλη διχογνωμία σχετικά με το θέμα αυτό, καθώς ευρήματα ανάλογα με τα δικά μας έχουν αναφερθεί και σε άλλες μελέτες<sup>153, 160</sup>, ενώ άλλες έχουν περιγράψει τόσο αρνητικές όσο και θετικές συσχετίσεις με τους δείκτες οστικού μεταβολισμού<sup>155-159</sup>. Με βάση τα ευρήματα μας πάντως, ούτε η OPG ούτε ο

sRANKL ούτε ο λόγος τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση του ρυθμού οστικού μεταβολισμού ή της αποτελεσματικότητας κάποιας οστεοαναβολικής ή αντιοστεο-κλαστικής αγωγής. Όσον αφορά την PTH, στο δικό μας υλικό δεν υπήρχε συσχέτιση με την OPG σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Rogers και συν<sup>156</sup> και αντίθετα με την μελέτη των Szulc και συνεργατών που έδειξε αρνητική συσχέτιση<sup>155</sup>.

Οι δείκτες οστικού μεταβολισμού στις οστεοπενικές ή οστεοπορωτικές γυναίκες της μελέτης μας σχετίζονται αρνητικά με το δείκτη μάζας σώματος, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο ρυθμός οστικού μεταβολισμού είναι μειωμένος στα υπέρβαρα άτομα. Ενδεχομένως αυτό να δικαιολογεί εν μέρει το μικρότερο κίνδυνο εμφάνισης οστεοπόρωσης που διατρέχουν τα άτομα με αυξημένο δείκτη μάζας σώματος. Στη διεθνή βιβλιογραφία επιβεβαιώνεται αυτή η αρνητική συσχέτιση των δεικτών τόσο οστικού σχηματισμού όσο και οστικής απορρόφησης με το BMI σε υγιείς περι- και μετ-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες<sup>352-355</sup>, ενώ η απώλεια βάρους σχετίζεται με αύξηση των δεικτών οστικού μεταβολισμού<sup>356,357</sup>. Αντιθέτως, φαίνεται ότι η PTH αυξάνεται όσο αυξάνεται ο δείκτης μάζας σώματος. Σύμφωνα με τη παρατήρηση μας αυτή, είναι και τα ευρήματα άλλων μελετών<sup>353</sup>.

Στο υλικό μας βρέθηκε επίσης αρνητική συσχέτιση των δεικτών με την ηλικία, δηλαδή φαίνεται ότι όσο η ηλικία αυξάνεται ο ρυθμός οστικού μεταβολισμού ελαττώνεται, κάτι που συμβαδίζει με τη επικρατούσα άποψη για την διαφορετική παθοφυσιολογία μεταξύ μετεμμηνοπαυσιακής (υψηλού ρυθμού οστικού μεταβολισμού) και γεροντικής (χαμηλού ρυθμού οστικού μεταβολισμού) οστεοπόρωσης.

Η συμμόρφωση των ασθενών σε όλες τις ομάδες ήταν ιδιαίτερα ικανοποιητική, σαφώς μεγαλύτερη από την αναφερόμενη στη διεθνή βιβλιογραφία<sup>358-361</sup>. Αυτό αποδόθηκε στην επίμονη και λεπτομερή διευκρίνιση στους ασθενείς της ανάγκης τυπικής λήψης της αγωγής και στη στενή παρακολούθηση τους. Ανάλογη επίδραση της στενής παρακολούθησης στη συμμόρφωση των ασθενών έχει αναφερθεί και σε άλλες μελέτες<sup>362,363</sup>.

## Περιορισμοί της μελέτης

Δεν είναι ξεκάθαρο επί του παρόντος ποιοι παράγοντες μπορεί να επηρεάζουν την προαναλυτική μεταβλητότητα (preanalytical variability) των μετρήσεων της OPG και του sRANKL. Είναι πιθανόν παράγοντες όπως ο χρόνος της αιμοληψίας, η αποθήκευση των δειγμάτων, και η μέθοδος συλλογής να επηρεάζουν το αποτέλεσμα των μετρήσεων. Η σταθερότητα του sRANKL έχει αμφισβητηθεί. Άλλοι προβάλλουν τη συλλογή των δειγμάτων σε EDTA ως πιο σταθερή<sup>146</sup>, ενώ άλλοι προτείνουν τη συλλογή ορού<sup>148</sup>.

Ο χρόνος αποθήκευσης των δειγμάτων στον καταψύκτη ήταν αρκετά μεγάλος (από 12 μήνες ως 22 μήνες), αλλά χωρίς να επηρεάζει τις μετρήσεις σύμφωνα με τις προδιαγραφές του κατασκευαστή των αντιδραστηρίων. Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες στη βιβλιογραφία τόσο για την OPG όσο και για τον sRANKL<sup>146</sup> που υποστηρίζουν ότι η κατάψυξη για πάνω από 6 μήνες μειώνει τα επίπεδα των κυτταροκινών αυτών στον ορό. Πρακτικά, εφόσον το πρωτόκολλο απαιτούσε αιμοληψίες σε χρόνους που απείχαν μεταξύ τους 6 μήνες, ήταν αδύνατο να μην υπερβούμε αυτό το χρονικό όριο. Πάντως, λόγω και της μεγάλης καθυστέρησης στην επεξεργασία των δειγμάτων, ως συνέπεια των δυσχερειών στη χρηματοδότηση των αντιδραστηρίων, το χρονικό διάστημα των 6 μηνών ξεπεράστηκε για όλα τα δείγματα. Εφόσον ισχύει αυτό που υποστηρίζουν οι συγκεκριμένες μελέτες, δεν είναι γνωστό αν τα επίπεδα των κυτταροκινών συνεχίζουν να μειώνονται μετά το εξάμηνο

και με τι ρυθμό. Εκτιμώ πάντως ότι ο βαθμός που επηρεάστηκαν τα δείγματα από τη μακρόχρονη κατάψυξη ήταν περίπου ο ίδιος και γι' αυτά που πάρθηκαν πρώτα και γι' αυτά που πάρθηκαν τελευταία, οπότε η αναλογία των επιπέδων των μετρούμενων παραγόντων μεταξύ των μετρήσεων δεν επηρεάστηκε σημαντικά.

Η θερμοκρασία κατάψυξης των δειγμάτων ήταν κατά μέσο όρο στους  $-36^{\circ}\text{C}$ , δηλαδή αρκετά χαμηλότερη από τους  $-20^{\circ}\text{C}$  που θεωρεί ο κατασκευαστής ως επαρκή κατάψυξη. Οι δύο προαναφερθείσες μελέτες<sup>146,148</sup> προτείνουν κατάψυξη στους  $-70^{\circ}\text{C}$ , συνθήκες συντήρησης που δεν πληρούσε κανένας χώρος κατάψυξης στο Νοσοκομείο μας.

Σύμφωνα με τον κατασκευαστή τρεις κύκλοι απόψυξης-επανάψυξης (freeze-thaw cycles) για την OPG και τέσσερις για το RANKL δεν επηρεάζουν το αποτέλεσμα των μετρήσεων. Μια πιο συντηρητική άποψη προτείνει να αποφεύγεται η απόψυξη και επανάψυξη των δειγμάτων<sup>364</sup>. Στην δική μας μελέτη τα δείγματα αποψύχθηκαν μόνο αμέσως πριν μετρηθούν.

Σύμφωνα με το Πρωτόκολλο της διατριβής έπρεπε να μελετηθούν 60 μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με οστεοπενία ή οστεοπόρωση. Οι γυναίκες έπρεπε κατανεμηθούν τυχαία σε τέσσερις ομάδες, από τις οποίες στη μια οι ασθενείς έπρεπε να λάβουν θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης (Θ.Ο.Υ.). Στην πορεία της μελέτης η ομάδα αυτή εξαιρέθηκε από το Πρωτόκολλο και οι ασθενείς που αντιστοιχούσαν σ' αυτή κατανεμήθηκαν ομοιόμορφα στις άλλες τρεις ομάδες. Ο λόγος της τροποποίησης αυτής ήταν η ανακοίνωση των αποτελεσμάτων της WHI<sup>365,366</sup>, που οδήγησε σε μεγαλύτερη επιφυλακτικότητα ιατρών και ασθενών απέναντι στη Θ.Ο.Υ. και άλλαξε τις ενδείξεις χρησιμοποίησης της παγκοσμίως με αποτέλεσμα να γίνει ιδιαίτερα δυσχερής και ηθικά αστήρικτη η ένταξη ασθενών σ' αυτή τη θεραπευτική ομάδα.

Οι ασθενείς της ομάδας ελέγχου στη μελέτη μας είχαν σημαντικά μικρότερη μέση ηλικία από τις ασθενείς των άλλων δύο ομάδων. Αυτό ήταν συνέπεια της επιλογής μας να χορηγούμε τυχαιοποιημένα κάποιο θεραπευτικό παράγοντα στις ασθενείς με οστεοπόρωση, για λόγους ηθικής αλλά και διότι η TPTD επιτρέπεται να χορηγείται μόνο σε ασθενείς με σοβαρή οστεοπόρωση. Ωστόσο, οι διαφορές της ηλικίας κατά την έναρξη της μελέτης δεν επηρέασαν τα επίπεδα της OPG ή του sRANKL στους 3 και 6 μήνες όταν διενεργήθηκε ανάλυση ANCOVA.

Στη μελέτη μας υπήρχε ανομοιογένεια, αν και μη στατιστικά σημαντική, μεταξύ των τριών ομάδων, όσον αφορά το βαθμό οστεοπόρωσης των ασθενών στην έναρξη της μελέτης. Η ομάδα της TPTD αποτελούνταν αποκλειστικά από γυναίκες με εγκατεστημένη οστεοπόρωση (T-score < 2,5) ενώ οι ομάδες RIS και ελέγχου περιελάμβαναν άτομα με οστεοπενία ή οστεοπόρωση (T-score < -1,5). Λόγοι αυτής της ανομοιογένειας ήταν αφενός η νομοθεσία στη χώρα μας, που επιτρέπει τη χορήγηση της TPTD μόνο σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με εγκατεστημένη οστεοπόρωση και αφετέρου η άποψη ότι γυναίκες με τόσο σοβαρή μορφή της νόσου δεν έπρεπε να αφεθούν ακάλυπτες.

Δύο ασθενείς, μια στην ομάδα της TPTD και μια στην ομάδα ελέγχου, υπέστησαν κάταγμα κατά τη διάρκεια της μελέτης και εξαιρέθηκαν. Στην πρώτη περίπτωση το κάταγμα συνέβη στον τρίτο μήνα αγωγής, ήταν τραυματικό, συνεπεία τροχαίου και δεν σχετίστηκε με τη νόσο ή την αγωγή. Το δεύτερο, συνέβη στο δεύτερο μήνα παρακολούθησης, ήταν μη τραυματικό και παρότι η ασθενής ήταν οστεοπενική στη μέτρηση της οστικής πυκνότητας, θεωρήθηκε κάταγμα ευθραυστότητας.

## 5. Συμπεράσματα

Στόχος της μελέτης ήταν να εκτιμηθεί η μεταβολή των επιπέδων και του λόγου της OPG και του sRANKL στην περιφερική κυκλοφορία μετά από χορήγηση παραγόντων με εκλεκτική δράση στον οστεοβλάστη (TPTD) και οστεοκλάστη (RIS).

Η χορήγηση TPTD και RIS υπήρξε ασφαλής και καλά ανεκτή από τους ασθενείς.

Η χορήγηση TPTD κατέστειλε σημαντικά την ενδογενή παραγωγή iPTH από τους 3 πρώτους μήνες της αγωγής.

Τα επίπεδα της OPG στον ορό δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά με κανένα από τους δύο φαρμακευτικούς παράγοντες συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Αντίθετα, τα επίπεδα του sRANKL μειώθηκαν σημαντικά και στις τρεις ομάδες ασθενών της μελέτης μας. Η εν λόγω μεταβολή επηρέασε αντίστοιχα προς τα πάνω τον λόγο OPG / RANKL, που θεωρείται ότι αντανakλά τη συνολική επίδραση των δύο κυτταροκινών στην οστεοκλαστική δραστηριότητα.

Οι δείκτες οστικού μεταβολισμού που επιλέχθηκαν (PINP και CTX) εξέφρασαν αξιόπιστα τις μεταβολές του οστικού μεταβολισμού που προκλήθηκαν τόσο από την TPTD όσο και τη RIS. Συγκρίσιμες με τους ανωτέρω δείκτες μεταβολές παρουσίασε και η ολική ΑΦ.

Η μη μεταβολή των επιπέδων της OPG στην κυκλοφορία πιθανώς οφείλεται σε αδυναμία έκφρασης στην περιφέρεια τυχόν μεταβολών της σε επίπεδο οστικού μικροπεριβάλλοντος ή σε αδυναμία των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν (χαμηλή ευαισθησία) να αναγνωρίσουν τις μεταβολές.

Συμπερασματικά, τα επίπεδα της OPG και του sRANKL του ορού δεν αποτελούν ευαίσθητους δείκτες των μεταβολών που συντελούνται στη δραστηριότητα του διπόλου οστεοβλάστη – οστεοκλάστη.



## 6. Περίληψη

Το σύστημα RANKL-RANK-OPG διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στον οστικό μεταβολισμό και συγκεντρώνει κατά τα τελευταία έτη το ενδιαφέρον των ερευνητών. Ο RANKL, που εκφράζεται από προ-οστεοβλάστες και κύτταρα του στρώματος, συνδέεται στον RANK, που εκφράζεται από κύτταρα της οστεοκλαστικής σειράς, προκαλώντας διαφοροποίηση των προ-οστεοκλαστών και διεγερση της δραστηριότητας των ώριμων οστεοκλαστών. Οι επιδράσεις του RANKL εξισορροπούνται από την οστεοπροτεγερίνη (OPG), ένα διαλυτό εξουδετερωτικό υποδοχέα-δόλωμα. Θεραπείες που τροποποιούν τον ρυθμό οστικού μεταβολισμού αναμένεται να επηρεάσουν την παραγωγή OPG και RANKL.

Στόχος της μελέτης ήταν να εκτιμηθεί η μεταβολή των επιπέδων και του λόγου της OPG και του sRANKL στην περιφερική κυκλοφορία μετά από χορήγηση παραγόντων που επηρεάζουν τον οστικό μεταβολισμό με διαφορετικούς μηχανισμούς [δράση στον οστεοβλάστη (TPTD) έναντι δράσης στον οστεοκλάστη (RIS)].

Μελετήθηκαν εβδομηντατέσσερις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με οστεοπενία ή οστεοπόρωση. Οι ασθενείς διαιρέθηκαν σε τρεις ομάδες (ελέγχου – RIS – TPTD). Προσδιορίστηκαν τα επίπεδα ενδογενούς PTH, OPG και sRANKL καθώς και δεικτών οστικού σχηματισμού (PINP, ολική ΑΦ) και απορρόφησης (CTX) στον ορό κατά την έναρξη της μελέτης και μετά από τρεις και έξι μήνες αγωγής.

Η χορήγηση TPTD και RIS υπήρξε ασφαλής και καλά ανεκτή από τους ασθενείς. Τα επίπεδα PINP και CTX ορού παρέμειναν αμετάβλητα κατά τη διάρκεια των έξι μηνών της μελέτης στην ομάδα ελέγχου, μειώθηκαν σημαντικά στην ομάδα της RIS, αντανακλώντας τη μείωση του ρυθμού οστικού μεταβολισμού με τον παράγοντα αυτό και αυξήθηκαν σημαντικά στην ομάδα της TPTD, αντανακλώντας την αύξηση του ρυθμού οστικού μεταβολισμού που προκαλεί η TPTD. Τα επίπεδα της OPG στον ορό δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά με κανένα από τους δύο φαρμακευτικούς παράγοντες συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Αντίθετα, τα επίπεδα του sRANKL μειώθηκαν σημαντικά και στις τρεις ομάδες ασθενών της μελέτης μας. Ο λόγος OPG / RANKL, που θεωρείται ότι αντανακλά τη συνολική επίδραση των δύο κυτταροκινών στην οστεοκλαστική δραστηριότητα, αυξήθηκε βαθμιαία και στις τρεις ομάδες, ως συνέπεια της μείωσης των επιπέδων του sRANKL.

Η μη μεταβολή των επιπέδων της OPG και του sRANKL στην κυκλοφορία πιθανώς οφείλεται σε αδυναμία έκφρασης στην περιφέρεια τυχόν μεταβολών τους σε επίπεδο οστικού μικροπεριβάλλοντος ή σε αδυναμία των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν (χαμηλή ευαισθησία) να αναγνωρίσουν τις μεταβολές.

Τα δεδομένα μας συνηγορούν ότι, ούτε η OPG, ο RANKL και ο λόγος τους δεν μπορούν να υποκαταστήσουν τους γνωστούς δείκτες οστικού μεταβολισμού στην παρακολούθηση της απάντησης στην αντιοστεοπορωτική θεραπεία.

Παρά την επικρατούσα αντίληψη ότι, καταλληλότεροι για την παρακολούθηση της αντιοστεοκλαστικής θεραπείας είναι οι δείκτες οστικής απορρόφησης και για την οστεοπαραγωγική οι δείκτες οστικού σχηματισμού, τα δεδομένα μας δείχνουν ότι και οι δύο δείκτες που επιλέχθησαν (PINP και CTX) είναι εξίσου αξιόπιστοι για την αξιολόγηση της δράσης τόσο της TPTD όσο και της RIS. Εναλλακτικά, στην καθημερινή κλινική πράξη και στις δύο περιπτώσεις μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένας αδρός, αλλά προσιτός



και φθηνός δείκτης η μεταβολή της ολικής ΑΦ (εφόσον δεν συνυπάρχει ηπατική νόσος). Επιπλέον, η iPTH ορού που καταστέλλεται πρώιμα, ήδη από τους 3 μήνες, κατά τη διάρκεια αγωγής με TPTD, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για αξιολόγηση της δραστηριότητας, της θεραπείας και της συμμόρφωσης των ασθενών.

## 7. Summary

RANKL-RANK-OPG system plays a crucial role in bone metabolism and constitutes a major research field during the last years. RANKL is expressed by preosteoblasts and stromal cells and binds to RANK, which is expressed by cells of the osteoclast lineage. RANKL induces differentiation and fusion of osteoclast precursor cells and stimulates the activity of the mature osteoclast. The effects of RANKL are counteracted by osteoprotegerin (OPG), a soluble neutralizing decoy receptor. Drugs that modify bone turnover are expected to influence the production of OPG and RANKL. We aimed to evaluate the changes of OPG and RANKL levels in circulation, following administration of drugs that affect bone metabolism through different mechanisms [action upon osteoblast: teriparatide (TPTD) and action upon osteoclast: risedronate (RIS)].

Seventy-four postmenopausal women with osteopenia or osteoporosis were included in the study. The women were divided into three groups (controls – RIS – TPTD). Serum levels of iPTH, OPG, RANKL, as well as markers of bone formation (PINP, total ALP) and resorption (CTX) were measured before, three and six months after treatment.

Both TPTD and RIS administration was safe and well tolerated by the patients; as a consequence, compliance was very satisfactory. Serum PINP and CTX remained unchanged during the six months of the study in the control group, decreased significantly in RIS-treated patients, reflecting suppression of bone turnover, while increased significantly in TPTD-treated patients, reflecting stimulation of bone turnover. Serum levels of OPG remained unchanged as compared to the control group. On the other hand, sRANKL levels were decreased significantly during the six months of the study in all three studied groups. The OPG / RANKL ratio, thought to reflect the net effect of both cytokines on osteoclast activity, increased gradually in all three groups, as a consequence of decreased sRANKL levels.

The lack of changes in OPG and sRANKL levels in systematic circulation probably suggests different kinetics of these substances in circulation as compared to bone microenvironment; another explanation could be low sensitivity of the methods used to recognize such subtle changes.

In conclusion, our data suggest that neither serum OPG or sRANKL nor their ratio can substitute the established bone markers in the monitoring of anti-osteoporotic treatment response.

Despite the prevailing aspect that bone resorption markers should be preferred in order to monitor antiresorptive treatment and bone formation markers in order to monitor osteoanabolic treatment, our data show that both serum PINP and CTX are reliable markers of both RIS and TPTD action in women with postmenopausal osteoporosis. Serum total ALP, a non-specific marker of low cost and wide availability, can be used as an alternative (as long as liver function is normal) for both agents in case a more sophisticated bone marker is not available for TPTD-treated women.



## 8. Βιβλιογραφία

1. Matkovic V, Kostial K, Simonovic I, al e. Bone status and fracture rates in two regions of Yugoslavia. *Am J Clin Nutr* 1979;32:540.
2. Johnston CJ, Miller J, Slemenda C, al e. Calcium supplementation and increases in bone mineral density in children. *N Engl J Med* 1992;327:82.
3. Riggs B. Vitamin D-receptor genotypes and bone density. *N Engl J Med* 1997;337:125.
4. Feskanich D, Hunter D, Willett W, al e. Vitamin D receptor polymorphism and the risk of bone fractures in women. *Epidemiology* 1998;9:535.
5. Brown M, Haughton M, Grant S, Gunnell A. Genetic control of bone density and turnover: role of the collagen 1alpha1, estrogen receptor, and vitamin D receptor genes. *J Bone Miner Res* 2001;16:758.
6. Shearman A, Karasik D, Gruenthal K, al e. Estrogen receptor beta polymorphisms are associated with bone mass in women and men: the Framingham Study. *J Bone Miner Res* 2004;19:773.
7. Stykarsdottir U, Cazier J, Kong A, al e. Linkage of Osteoporosis to Chromosome 20p12 and Association to BMP2. *PLoS Biol* 2003;1:E:69.
8. Boyden L, Mao J, Belsky J, al e. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med* 2002;346:1513.
9. Wolinsky F, Fitzgerald J, Stump T. The effect of hip fracture on mortality, hospitalization, and functional status: a prospective study. *Am J Public Health* 1997;87(3):398-403.
10. Raisz L. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin Chem* 1999;45:1353-8.
11. Hadjidakis D, Androulakis I. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1092:385-96.
12. Manolagas S. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000;21(2):115-37.
13. Aarden E, Burger E, Nijweide P. Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem* 1994;55(3):287-99.
14. Choi S, Devlin R, Menea C, Chung H, Roodman G, Reddy S. Cloning and identification of human Sca as a novel inhibitor of osteoclast formation and bone resorption. *J Clin Invest* 1998;102(7):1360-8.
15. Grigoriadis A, Wang Z, Cecchini M, et al. c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science* 1994;266(5184):443-8.
16. Klein-Nulend J, Burger E, Semeins C, Raisz L, Pilbeam C. Pulsating fluid flow stimulates prostaglandin release and inducible prostaglandin G/H synthase mRNA expression in primary mouse bone cells. *J Bone Miner Res* 1997;12(1):45-51.
17. Ott S. Sclerostin and Wnt signaling--the pathway to bone strength. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(12):6741-3.
18. Calvo M, Eyre D, Gundberg C. Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocr Rev* 1996;17:333-68.
19. Gomez B, Ardakani S, Ju J, al e. Monoclonal antibody assay for measuring bone-specific alkaline phosphatase activity in serum. *Clin Chem* 1995;41:1560-6.
20. Horgan D, King N, Kurth L, Kuypers R. Collagen crosslinks and their relationship to the thermal properties of calf tendons. *Arch Biochem Biophys* 1990;281:21-6.
21. Eyre D, Koob T, Van Ness K. Quantitation of hydroxyypyridinium crosslinks in collagen by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 1984;137:380-8.

22. Robins S. Collagen crosslinks in metabolic bone disease. *Acta Orthop Scand* 1995;66:171-5.
23. Eyre D, Dickson I, Van Ness K. Collagen cross-linking in human bone and articular cartilage. *Biochem J* 1988;252:495-500.
24. Hanson D, Weis M, Bollen A-M, al e. A specific immunoassay for monitoring human bone resorption: quantitation of type I collagen cross-linked N-telopeptides in urine. *J Bone Miner Res* 1992;7:1251-8.
25. Taylor A, Lueken S, Libanati C, Baylink D. Biochemical markers of bone turnover for the clinical assessment of bone metabolism. *Rheum Dis Clin North Am* 1994;20:589-607.
26. Garnero P, Gineyts E, Arbault P, al e. Different effects of bisphosphonate and estrogen therapy on free and peptide-bound bone cross-links excretion. *J Bone Miner Res* 1995;10:641-9.
27. Zhao W, Byrne M, Boyce B, Krane S. Bone resorption induced by parathyroid hormone is strikingly diminished in collagenase-resistant mutant mice. *J Clin Invest* 1999;103:517.
28. Garnero P, Delmas P. Assessment of the serum levels of bone alkaline phosphatase with a new immunoradiometric assay in patients with metabolic bone disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1046-53.
29. Eyre D. New biomarkers of bone resorption. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;74:470A.
30. Jensen L, Olesen H, Risteli J, al e. External thoracic duct-venous shunt in conscious pigs for long term studies of connective tissue metabolism in lymph. *Lab Anim Sci* 1990;40(6):620-4.
31. Brandt J, Krogh N, Jensen C. Thermal instability of the trimeric structure of the N-terminal propeptide of human procollagen type I in relation to assay technology. *Clin Chem* 1999;45(1):47-53.
32. Jensen C, Hansen M, Brandt J, al e. Quantification of the N-terminal propeptide of human procollagen type I (PINP): comparison of ELISA and RIA with respect to different molecular forms. *Clin Chim Acta* 1998;269:20-41.
33. Ebeling P, Peterson J, Riggs B. Utility of type I procollagen propeptide assays for assessing abnormalities in metabolic bone diseases. *J Bone Miner Res* 1992;7:1243-50.
34. Hannon R, Blumsohn A, Naylor K, Eastell R. Response of biochemical markers of bone turnover to hormone replacement therapy: impact of biological variability. *J Bone Miner Res* 1998;13:1124-33.
35. Chen J, Cameron I, Cumming R, et al. Effect of age-related chronic immobility on markers of bone turnover. *J Bone Miner Res* 2006;21(2):324-31.
36. Clowes J, Hannon R, Yap T, Hoyle N, Blumsohn A, Eastell R. Effect of feeding on bone turnover markers and its impact on biological variability of measurements. *Bone* 2002;30(6):886-90.
37. Melkko J, Kauppila S, Niemi S, al e. Immunoassay for intact amino-terminal propeptide of human type I procollagen. *Clin Chem* 1996;42:947-54.
38. Fay T, Jacobs I, Teisner B, al e. Two fetal antigens (FA1 and FA2) and endometrial proteins (PP12 and PP14) isolated from amniotic fluid: characterization and the distribution in fetal and maternal tissues. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1988;29:73-85.
39. Orum O, Hansen M, Jensen C, al e. Procollagen type I N-terminal propeptide (PINP) as an indicator of type I collagen metabolism: ELISA development, reference interval, and hypovitaminosis D induced hyperparathyroidism. *Bone* 1996;19:157-63.
40. Bonde M, Qvist P, Fledelius C, al e. Immunoassay for quantifying type I collagen



- degradation products in urine evaluated. *Clin Chem* 1994;40:2022-5.
41. Leary E, McLaughlin M, Swezey D, Foster A. Performance of  $\beta$ -Crosslaps/Serum on the Elecsys 2010 in comparison with six serum and urine bone resorption markers in microtiter assay format. *Clin Chem* 2000;46:A145.
  42. Rosenquist C, Fledelius C, Christgau S, al e. Serum CrossLaps One Step ELISA. First application of monoclonal antibodies for measurement in serum of bone-related degradation products from C-terminal telopeptides of type I collagen. *Clin Chem* 1998;44:2281.
  43. Fledelius C, Johnsen A, Cloos P, al e. Characterization of urinary degradation products derived from type I collagen. Identification of a beta-isomerized Asp-Gly sequence within C-terminal telopeptide ( $\alpha$ 1) region. *J Biol Chem* 1997;272:9755-63.
  44. Cloos P, Fledelius C. Collagen fragments in urine derived from bone resorption are highly racemized and isomerized: a biological clock of protein aging with clinical potential. *Biochem J* 2000;345:473-80.
  45. Garnero P, Cloos P, Sornay-Rendu E, Qvist P, Delmas P. Type I collagen racemization and isomerization and the risk of fracture in postmenopausal women: the OFELY prospective study. *J Bone Miner Res* 2002;17(5):826-33.
  46. Traba M, Calero H, Mendez-Davila C, al e. Different behaviors of serum and urinary CrossLaps ELISA in the assessment of bone resorption in healthy girls. *Clin Chem* 1999;45:682-3.
  47. Woitge H, Pecherstorfer M, Li Y, et al. Novel serum markers of bone resorption: clinical assessment and comparison with established urinary indices. *J Bone Miner Res* 1999;14(5):792-801.
  48. Kawana K, Takahashi M, Hoshino H, Kushida K. Comparison of serum and urinary C-terminal telopeptide of type I collagen in aging, menopause and osteoporosis. *Clin Chim Acta* 2002;316(1-2):109-15.
  49. Qvist P, Christgau S, Pedersen B, Schlemmer A, Christiansen C. Circadian variation in the serum concentration of C-terminal telopeptide of type I collagen (serum CTx): effects of gender, age, menopausal status, posture, daylight, serum cortisol, and fasting. *Bone* 2002;31(1):57-61.
  50. Takahashi M, Kawana K, Nagano A. Biological variability of biochemical markers of bone turnover in healthy women. *Endocr Res* 2002;28(3):257-64.
  51. Urena P, Vernejoul M. Circulating biochemical markers of bone remodeling in uremic patients. *Kidney Int* 1999;55:2141-56.
  52. Okuno S, Inaba M, Kitatani K, Ishimura E, Yamakawa T, Nishizawa Y. Serum levels of C-terminal telopeptide of type I collagen: a useful new marker of cortical bone loss in hemodialysis patients. *Osteoporos Int* 2005;16(5):501-9.
  53. Ettinger B, Pressman A, Sklarin P, al e. Associations between low levels of serum estradiol, bone density, and fractures among elderly women: the Study of Osteoporotic Fractures. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2239.
  54. Smith E, Boyd J, Frank G, al e. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med* 1994;331:1056.
  55. Greendale G, Edelstein S, Barrett-Connor E. Endogenous sex steroids and bone mineral density in older women and men: the Rancho Bernardo Study. *J Bone Miner Res* 1997;12:1833.
  56. Falahati-Nini A, Riggs B, Atkinson E, al e. Relative contributions of testosterone and estrogen in regulating bone resorption and formation in normal elderly men. *J Clin Invest* 2000;106(12):1553-60.
  57. Slemenda C, Longcope C, Peacock M, al e. Sex steroids, bone mass, and bone loss. *J Clin Invest* 1996;97:14.

58. Raisz L, Wiita B, Artis A, et al. Comparison of the effects of estrogen alone and estrogen plus androgen on biochemical markers of bone formation and resorption in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:37.
59. Prior J, Vigna Y, Wark J, et al. Premenopausal ovariectomy-related bone loss: a randomized, double-blind, one-year trial of conjugated estrogen or medroxyprogesterone acetate. *J Bone Miner Res* 1997;12:1851.
60. Mazziotti G, Angeli A, Bilezikian J, Canalis E, Giustina A. Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update. *Trends Endocrinol Metab* 2006;17(4):144-9.
61. Lorenzo J, Sousa S, van den Brink-Webb S, Korn J. Production of both interleukin-1 alpha and beta by newborn mouse calvarial cultures. *J Bone Miner Res* 1990;5:77.
62. Horowitz M. Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects. *Science* 1993;260:626.
63. Tai H, Miyaura C, Pilbeam C, et al. Transcriptional induction of cyclooxygenase-2 in osteoblasts is involved in interleukin-6-induced osteoclast formation. *Endocrinology* 1997;138:2372.
64. Kawaguchi H, Pilbeam C, Harrison J, Raisz L. The role of prostaglandins in the regulation of bone metabolism. *Clin Orthop* 1995;313:36.
65. Canalis E. Insulin-like growth factors and osteoporosis. *Bone* 1997;21:215.
66. Centrella M, Horowitz M, Wozney J, McCarthy T. Transforming growth factor- $\beta$  gene family members and bone. *Endocr Rev* 1994;15:27.
67. Boonen S, Aerssens J, Dequeker J, et al. Age-associated decline in human femoral neck cortical and trabecular content of insulin-like growth factor I - potential implications for age-related (type II) osteoporotic fracture occurrence. *Calcif Tissue Int* 1997;61:173.
68. Reed B, Zerwekh J, Sakhaee K, et al. Serum IGF 1 is low and correlated with osteoblastic surface in idiopathic osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1995;10:1218.
69. Hughes D, Dai A, Tiffée J, et al. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF- $\beta$ . *Nat Med* 1996;2:1132.
70. Teitelbaum S. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000;289:1504-8.
71. Lacey D, Timms E, Tan H, et al. Osteoprotegerin (OPG) ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93:165-76.
72. Arai F, Miyamoto T, Ohneda O, et al. Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B (RANK) receptors. *J Exp Med* 1999;190:1741-54.
73. Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, et al. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;253(2):395-400.
74. Hsu H, Lacey D, Dunstan C, et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(7):3540-5.
75. Dougall W, Glaccum M, Charrier K, et al. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev* 1999;13:2412-24.
76. Galibert L, Tometsko M, Anderson D, Cosman D, Dougall W. The involvement of multiple tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factors in the signaling mechanisms of receptor activator of NF- $\kappa$ B, a member of the TNFR superfamily. *J Biol Chem* 1998;273(34):34120-34127.
77. Wong B, Josien R, Lee S, Vologodskaya M, Steinman R, Choi Y. The TRAF family of signal transducers mediates NF- $\kappa$ B activation by the TRANCE receptor. *J Biol Chem* 1998;273:28355-9.
78. Lomaga M, Yeh W, Sarosi I, et al. TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev* 1999;13:1015-24.

79. Darnay B, Ni J, Moore P, Aggarwal B. Activation of NF- $\kappa$ B by RANK requires tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6 and NF- $\kappa$ B-inducing kinase. Identification of a novel TRAF6 interaction motif. *J Biol Chem* 1999;274:7724-31.
80. Wong B, Besser D, Kim N, et al. TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. *Mol Cell* 1999;4:1041-9.
81. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3597-602.
82. Fujikawa Y, Sabokbar A, Neale S, Itonaga I, Torisu T, Athanasou N. The effect of macrophage-colony stimulating factor and other humoral factors (interleukin-1, -3, -6, and -11, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and granulocyte macrophage-colony stimulating factor) on human osteoclast formation from circulating cells. *Bone* 2001;28:261-7.
83. Quinn J, Neale S, Fujikawa Y, McGee J, Athanasou N. Human osteoclast formation from blood monocytes, peritoneal macrophages, and bone marrow cells. *Calcif Tissue Int* 1998;62:527-31.
84. Matsuzaki K, Udagawa N, Takahashi N, et al. Osteoclast differentiation factor (ODF) induces osteoclast-like cell formation in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;246:199-204.
85. Burgess T, Qian Y, Kaufman S, et al. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol* 1999;145:527-38.
86. Kong Y, Yoshida H, Sarosi I, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999;397:315-23.
87. Simonet W, Lacey D, Dunstan C, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89:309-19.
88. Bucay N, Sarosi I, Dunstan C, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998;12:1260-8.
89. Price P, June H, Buckley J, Williamson M. Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1601-16.
90. Min H, Morony S, Sarosi I, et al. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *J Exp Med* 2000;192:463-74.
91. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 1998;139:1329-37.
92. Gori F, Hofbauer L, Dunstan C, Spelsberg T, Khosla S, Riggs B. The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally regulated. *Endocrinology* 2000;141:4768-76.
93. Whyte M, Hughes A. Expansile skeletal hyperphosphatasia is caused by a 15-base pair tandem duplication in TNFRSF11A encoding RANK and is allelic to familial expansile osteolysis. *J Bone Miner Res* 2002;17(1):26-9.
94. Johnson-Pais T, Singer F, Bone H, McMurray C, Hansen M, Leach R. Identification of a novel tandem duplication in exon 1 of the TNFRSF11A gene in two unrelated patients with familial expansile osteolysis. *J Bone Miner Res* 2003;18(2):376-80.
95. Nakatsuka K, Nishizawa Y, Ralston S. Phenotypic characterization of early onset Paget's disease of bone caused by a 27-bp duplication in the TNFRSF11A gene. *J Bone Miner Res* 2003;18(8):1381-5.
96. Whyte M. Paget's disease of bone and genetic disorders of RANKL/OPG/RANK/NF-kappaB signaling. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1068:143-64.



97. Hsu Y, Niu T, Terwedow H, et al. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men. *Hum Genet* 2006;118(5):568-77.
98. Mencej S, Prezelj J, Kocijancic A, Ostanek B, Marc J. Association of TNFSF11 gene promoter polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal women. *Maturitas* 2006;Epub ahead of print.
99. Whyte M, Obrecht S, Finnegan P, et al. Osteoprotegerin deficiency and juvenile Paget's disease. *N Engl J Med* 2002;347:175-84.
100. Wuyts W, Van Wesenbeeck L, Morales-Piga A, et al. Evaluation of the role of RANK and OPG genes in Paget's disease of bone. *Bone* 2001;28(1):104-7.
101. Daroszewska A, Hocking L, McGuigan F, et al. Susceptibility to Paget's disease of bone is influenced by a common polymorphic variant of osteoprotegerin. *J Bone Miner Res* 2004;19(9):1506-11.
102. Yamada Y, Ando F, Niino N, Shimokata H. Association of polymorphisms of the osteoprotegerin gene with bone mineral density in Japanese women but not men. *Mol Genet Metab* 2003;80(3):344-9.
103. Tasker P, Albagha O, Masson C, Reid D, Ralston S. Association between TNFRSF1B polymorphisms and bone mineral density, bone loss and fracture. *Osteoporos Int* 2004;15(11):903-8.
104. Choi J, Shin A, Park S, et al. Genetic polymorphisms of OPG, RANK, and ESR1 and bone mineral density in Korean postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 2005;77(3):152-9.
105. Brandstrom H, Gerdhem P, Stiger F, et al. Single nucleotide polymorphisms in the human gene for osteoprotegerin are not related to bone mineral density or fracture in elderly women. *Calcif Tissue Int* 2004;74(1):18-24.
106. Hofbauer L, Schoppet M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA* 2004;292(4):490-5.
107. Hofbauer L, Lacey D, Dunstan C, Spelsberg T, Riggs B, Khosla S. Interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ , but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone* 1999;25:255-9.
108. Lee S, Lorenzo J. Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology* 1999;140:3552-61.
109. Hofbauer L, Gori F, Riggs B, et al. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology* 1999;140:4377-81.
110. Kitazawa S, Kajimoto K, Kondo T, Kitazawa R. Vitamin D3 supports osteoclastogenesis via functional vitamin D response element of human RANKL gene promoter. *J Cell Biochem* 2003;89:771-7.
111. Takai H, Kanematsu M, Yano K, et al. Transforming growth factor- $\beta$  stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *J Biol Chem* 1998;273:27091-6.
112. Hofbauer L, Khosla S, Dunstan C, Lacey D, Spelsberg T, Riggs B. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 1999;140:4367-70.
113. Saika M, Inoue D, Kido S, Matsumoto T. 17 $\beta$ -Estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor- $\alpha$ . *Endocrinology* 2001;142:2205-12.

114. Murakami T, Yamamoto M, Ono K, et al. 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;252:747-52.
115. Kanis J, Melton LI, Christiansen C, et al. The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1994;9:1137.
116. Kanis J. Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. *Lancet* 2002;359(9321):1929-36.
117. Delmas P, Seeman E. Changes in bone mineral density explain little of the reduction in vertebral or nonvertebral fracture risk with anti-resorptive therapy. *Bone* 2004;34(4):599-604.
118. Sarkar S, Reginster J, Crans G, et al. Relationship between changes in biochemical markers of bone turnover and BMD to predict vertebral fracture risk. *J Bone Miner Res* 2004;19:394.
119. Heaney R. BMD: the problem. *Osteoporos Int* 2005;16(9):1013-5.
120. Christgau S, Bitsch-Jensen O, Hanover Bjarnason N, et al. Serum CrossLaps for monitoring the response in individuals undergoing antiresorptive therapy. *Bone* 2000;26(5):505-11.
121. Neer R, Arnaud C, Zanchetta J, et al. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 2001;344(19):1434-41.
122. Meunier P, Roux C, Seeman E, et al. The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 2004;350(5):459-68.
123. Srivastava A, Vliet E, Lewiecki E, et al. Clinical use of serum and urine bone markers in the management of osteoporosis. *Curr Med Res Opin* 2005;21(7):1051-26.
124. Garnero P, Shih W, Gineyts E, et al. Comparison of new biochemical markers of bone turnover in late postmenopausal osteoporotic women in response to alendronate treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:1693-700.
125. Chen P, Satterwhite J, Licata A, et al. Early changes in biochemical markers of bone formation predict BMD response to teriparatide in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2005;20(6):962-70.
126. Eastell R, Krege J, Chen P, Glass E, Reginster J. Development of an algorithm for using PINP to monitor treatment of patients with teriparatide. *Curr Med Res Opin* 2006;22(1):61-6.
127. Tahtela R, Seppanen J, Laitinen K, Katajamaki A, Risteli J, Valimaki M. Serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b in monitoring bisphosphonate treatment with clodronate: a comparison with urinary N-terminal telopeptide of type I collagen and serum type I procollagen amino-terminal propeptide. *Osteoporos Int* 2005;16(9):1109-16.
128. Reginster J, Sarkar S, Zegels B, et al. Reduction in PINP, a marker of bone metabolism, with raloxifene treatment and its relationship with vertebral fracture risk. *Bone* 2004;34(2):344-51.
129. Bauer D, Garnero P, Hochberg M, et al. Pretreatment levels of bone turnover and the antifracture efficacy of alendronate: the fracture intervention trial. *J Bone Miner Res* 2006;21(2):292-9.
130. Alvarez L, Peris P, Pons F, et al. Relationship between biochemical markers of bone turnover and bone scintigraphic indices in assessment of Paget's disease activity. *Arthritis Rheum* 1997;40(3):461-8.
131. Dominguez Caberra C, Sosa Henriques M, Traba M, et al. Biochemical markers of bone formation in the study of postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int*



1998;8(2):147-51.

132. Ueda M, Inaba M, Okuno S, et al. Clinical usefulness of the serum N-terminal propeptide of type I collagen as a marker of bone formation in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2002;40(4):802-9.

133. Christgau S, Rosenquist C, Alexandersen P, et al. Clinical evaluation of the Serum CrossLaps One Step ELISA, a new assay measuring the serum concentration of bone-derived degradation products of type I collagen C-telopeptides. *Clin Chem* 1998;44(11):2290-300.

134. Eastell R, Barton I, Hannon R, Chines A, Garnero P, Delmas P. Relationship of early changes in bone resorption to the reduction in fracture risk with risedronate. *J Bone Miner Res* 2003;18(6):1051-6.

135. Bjarnason N, Christiansen C. Early response in biochemical markers predicts long-term response in bone mass during hormone replacement therapy in early postmenopausal women. *Bone* 2000;26(6):561-9.

136. Tanko L, Mouritzen U, Lehmann H, et al. Oral ibandronate: changes in markers of bone turnover during adequately dosed continuous and weekly therapy and during different suboptimally dosed treatment regimens. *Bone* 2003;32(6):687-93.

137. Okabe R, Inaba M, Nakatsuka K, et al. Significance of serum CrossLaps as a predictor of changes in bone mineral density during estrogen replacement therapy; comparison with serum carboxyterminal telopeptide of type I collagen and urinary deoxypyridinoline. *J Bone Miner Res* 2004;22(2):127-31.

138. Rosen H, Moses A, Garber J, et al. Serum CTX: a new marker of bone resorption that shows treatment effect more often than other markers because of low coefficient of variability and large changes with bisphosphonate therapy. *Calcif Tissue Int* 2000;66(2):100-3.

139. Chapurlat R, Garnero P, Breart G, Meunier P, Delmas P. Serum type I collagen breakdown product (serum CTX) predicts hip fracture risk in elderly women: the EPIDOS study. *Bone* 2000;27(2):283-6.

140. Garnero P, Sornay-Rendu E, Claustrat B, Delmas P. Biochemical markers of bone turnover, endogenous hormones and the risk of fractures in postmenopausal women: the OFELY study. *J Bone Miner Res* 2000;15(8):1526-36.

141. Christgau S, Bitsch Jensen O, Bjarnasson N, et al. Serum CrossLaps provides a rapid assessment of therapy response compared to BMD measurements. *J Bone Miner Res* 1999;14:S200.

142. Jono S, Ikari Y, Shioi A, et al. Serum osteoprotegerin levels are associated with the presence and severity of coronary artery disease. *Circulation* 2002;106:1192-4.

143. Browner W, Lui L, Cummings S. Associations of serum osteoprotegerin levels with diabetes, stroke, bone density, fractures, and mortality in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:613-37.

144. Kiechl S, Schett G, Wenning G, et al. Osteoprotegerin is a risk factor for progressive atherosclerosis and cardiovascular disease. *Circulation* 2004;109:2175-80.

145. Chen D, Sarikaya N, Gunn H, Martin S, Young J. ELISA methodology for detection of modified osteoprotegerin in clinical studies. *Clin Chem* 2001;47(4):747-9.

146. Chan B, Buckley K, Durham B, Gallagher J, Fraser W. Effect of anticoagulants and storage temperature on the stability of receptor activator for nuclear factor- $\kappa$ B ligand and osteoprotegerin in plasma and serum. *Clin Chem* 2003;49(12):2083-5.

147. Furuya D, Kaneko R, Yagihashi A, et al. Immuno-PCR assay for homodimeric osteoprotegerin. *Clin Chem* 2001;47(1475-1477).

148. Hawa G, Brinskelle-Schmal N, Glatz K, Maitzen S, Woloszczuk W. Immunoassay for soluble RANKL (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand) in serum. *Clin Lab* 2003;49(9-

10)):461-3.

149. Hegedus D, Ferencz V, Lakatos P, et al. Decreased bone density, elevated serum osteoprotegerin, and b-cross-laps in Wilson disease. *J Bone Miner Res* 2002;17:1961-7.
150. Naylor K, Rogers A, Fraser R, Hall V, Eastell R, Blumsohn A. Serum osteoprotegerin as a determinant of bone metabolism in a longitudinal study of human pregnancy and lactation. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5361-5.
151. Szalay F, Hegedus D, Lakatos P, et al. High serum osteoprotegerin and low RANKL in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2003;38:395-400.
152. Schett G, Kiechl S, Redlich K, et al. Soluble RANKL and risk of nontraumatic fracture. *JAMA* 2004;291(9):1108-13.
153. Mezquita-Raya P, de la Higuera M, Garcia D, et al. The contribution of serum osteoprotegerin to bone mass and vertebral fractures in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2005;16(11):1368-74.
154. Hannon R, Eastell R. Preanalytical variability of biochemical markers of bone turnover. *Osteoporos Int* 2000;11(Suppl 6):S30-S44.
155. Szulc P, Hofbauer L, Heufelder A, Roth S, Delmas P. Osteoprotegerin serum levels in men: correlation with age, estrogen, and testosterone status. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(7):3162-5.
156. Rogers A, Saleh G, Hannon R, Greenfield D, Eastell R. Circulating estradiol and osteoprotegerin as determinants of bone turnover and bone density in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(10):4470-5.
157. Fahrleitner-Pammer A, Dobnig H, Piswanger-Soelkner C, et al. Osteoprotegerin serum levels in women: correlation with age, bone mass, bone turnover and fracture status. *Wien Klin Wochenschr* 2003;115(9):291-7.
158. Indridason O, Franzson L, Sigurdsson G. Serum osteoprotegerin and its relationship with bone mineral density and markers of bone turnover. *Osteoporos Int* 2005;16(4):417-23.
159. Liu J, Zhao H, Ning G, et al. Relationships between the changes of serum levels of OPG and RANKL with age, menopause, bone biochemical markers and bone mineral density in Chinese women aged 20-75. *Calcif Tissue Int* 2005;76(1):1-6.
160. Khosla S, Arrighi H, Melton IL, et al. Correlates of osteoprotegerin levels in women and men. *Osteoporos Int* 2002;13(5):394-9.
161. Oh K, Rhee E, Lee W, et al. Circulating osteoprotegerin and receptor activator of NF-kappaB ligand system are associated with bone metabolism in middle-aged males. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005;62(1):92-8.
162. Kudlacek S, Schneider B, Woloszczuk W, Pietschmann P, Willvonseder R, Metabolism ASGoNVoB. Serum levels of osteoprotegerin increase with age in a healthy adult population. *Bone* 2003;32(6):681-6.
163. Gannage-Yared M, Fares F, Semaan M, Khalife S, Jambart S. Circulating osteoprotegerin is correlated with lipid profile, insulin sensitivity, adiponectin and sex steroids in an ageing male population. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006;64(6):652-8.
164. Uemura H, Yasui T, Umino Y, et al. Circulating osteoprotegerin in women during GnRH-agonist treatment and their relationships with mineral components and biomarkers of bone turnover. *Bone* 2003;33:860-6.
165. Crisafulli A, Altavilla D, Squadrito G, et al. Effects of the phytoestrogen genistein on the circulating soluble receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand-osteoprotegerin system in early postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(1):188-92.
166. Hofbauer L, Schoppet M, Schuller P, Viereck V, Christ M. Effects of oral contraceptives on circulating osteoprotegerin and soluble RANK ligand serum levels in healthy young women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;60:214-9.

167. Khosla S, Atkinson E, Dunstan C, O'Fallon W. Effect of estrogen versus testosterone on circulating osteoprotegerin and other cytokine levels in normal elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1550-4.
168. Yano K, Tsuda E, Washida N, et al. Immunological characterization of circulating osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor: increased serum concentrations in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1999;14(4):518-27.
169. Hofbauer L, Hicok H, Chen D, Khosla S. Regulation of osteoprotegerin production by androgens and anti-androgens in human osteoblastic lineage cells. *Eur J Endocrinol* 2002;147:269-73.
170. Viereck V, Emons G, Lauck V, et al. Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;291:680-6.
171. Valleala H, Mandelin J, Laasonen L, Koivula M, Risteli J, Kontinen Y. Effect of cyclical intermittent etidronate therapy on circulating osteoprotegerin levels in patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Endocrinol* 2003;148(5):527-30.
172. Alvarez L, Peris P, Guanabens N, et al. Serum osteoprotegerin and its ligand in Paget's disease of bone: relationship to disease activity and effect of treatment with bisphosphonates. *Arthritis Rheum* 2003;48(3):824-8.
173. Martini G, Gennari L, Merlotti D, et al. Serum OPG and RANKL levels before and after intravenous bisphosphonate treatment in Paget's disease of bone. *Bone* 2007;40(2):457-63.
174. Dobnig H, Hofbauer L, Viereck V, Obermayer-Pietsch B, Fahrleitner-Pammer A. Changes in the RANK ligand/osteoprotegerin system are correlated to changes in bone mineral density in bisphosphonate-treated osteoporotic patients. *Osteoporos Int* 2006;17(5):693-703.
175. Messalli E, Mainini G, Scaffa C, et al. Raloxifene therapy interacts with serum osteoprotegerin in postmenopausal women. *Maturitas* 2006;Epub ahead of print.
176. Locklin R, Khosla S, Turner R, Riggs B. Mediators of the biphasic responses of bone to intermittent and continuously administered parathyroid hormone. *J Cell Biochem* 2003;89:180-90.
177. Buxton E, Yao W, Lane N. Changes in serum receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand, osteoprotegerin, and interleukin-6 levels in patients with glucocorticoid-induced osteoporosis treated with human parathyroid hormone (1-34). *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(7):3332-6.
178. Stilgren L, Hegedus L, Beck-Nielsen H, Abrahamsen B. Osteoprotegerin levels in primary hyperparathyroidism: effect of parathyroidectomy and association with bone metabolism. *Calcif Tissue Int* 2003;73:210-6.
179. Stilgren L, Rettmer E, Eriksen E, Hegedus L, Beck-Nielsen H, Abrahamsen B. Skeletal changes in osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand mRNA levels in primary hyperparathyroidism: effect of parathyroidectomy and association with bone metabolism. *Bone* 2004;35:256-65.
180. Johnell O, Kanis J, Oden A, et al. Mortality after osteoporotic fractures. *Osteoporos Int* 2004;15(1):38-42.
181. Melton LI, Chrischilles E, Cooper C, et al. How many women have osteoporosis? *J Bone Miner Res* 1992;7:1005.
182. Ray N, Chan J, Thamer M, Melton Lr. Medical expenditures for the treatment of osteoporotic fractures in the United States in 1995: report from the National Osteoporosis Foundation. *J Bone Miner Res* 1997;12(1):24-35.
183. Canalis E, Giustina A, Bilezikian J. Mechanisms of anabolic therapies for osteoporosis. *N Engl J Med* 2007;357(9):905-16.



184. Wang B, Dai C, Quan J, et al. Parathyroid hormone regulates osteon and expression predominantly through protein signaling in osteoblast-like cells. *J Endocrinol Invest* 2006;29(2):101-8.
185. Jiang Y, Zhao J, Mitlak B, Wang O, Genant H, Eriksen E. Recombinant human parathyroid hormone (1-34) [teriparatide] improves both cortical and cancellous bone structure. *J Bone Miner Res* 2003;18(11):1932-41.
186. Fujita T, Inoue T, Morii, H, Morita R, et al. Effect of an intermittent weekly dose of human parathyroid hormone (1-34) on osteoporosis: a randomized double-masked prospective study using three dose levels. *Osteoporos Int* 1999;9(4):296-306.
187. Okimoto N, Tsurukami H, Okazaki Y, et al. Effects of a weekly injection of human parathyroid hormone (1-34) and withdrawal on bone mass, strength, and turnover in mature ovariectomized rats. *Bone* 1998;22(5):523-31.
188. Pfutzner A, Flacke F, Pohl R, et al. Pilot study with technosphere/PTH(1-34)--a new approach for effective pulmonary delivery of parathyroid hormone (1-34). *Horm Metab Res* 2003;35(5):319-23.
189. Gopalakrishnan V, Hwang S, Loughrey H, et al. Administration of ThPTH to humans using Macroflux® transdermal technology results in the rapid delivery of biologically active PTH. *J Bone Miner Res* 2004;19:460.
190. Matsumoto T, Shiraki M, Hagino H, Iinuma H, Nakamura T. Daily nasal spray of hPTH(1-34) for 3 months increases bone mass in osteoporotic subjects: a pilot study. *Osteoporos Int* 2006;17(10):1532-8.
191. Nemeth E. Calcimimetic and calcilytic drugs: just for parathyroid cells? *Cell Calcium* 2004;35(3):283-9.
192. Lane N, Sanchez S, Genant H, Jenkins D, Arnaud C. Short-term increases in bone turnover markers predict parathyroid hormone-induced spinal bone mineral density gains in postmenopausal women with glucocorticoid-induced osteoporosis. *Osteoporos Int* 2000;11(5):434-42.
193. Marcus R, Wang O, Satterwhite J, Mitlak B. The skeletal response to teriparatide is largely independent of age, initial bone mineral density, and prevalent vertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2003;18(1):18-23.
194. Kurland E, Cosman F, McMahon D, Rosen C, Lindsay R, Bilezikian J. Parathyroid hormone as a therapy for idiopathic osteoporosis in men: effects on bone mineral density and bone markers. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3069-76.
195. Lindsay R, Nieves J, Formica C, et al. Randomised controlled study of effect of parathyroid hormone on vertebral-bone mass and fracture incidence among postmenopausal women on oestrogen with osteoporosis. *Lancet* 1997;350(9077):550-5.
196. Lane N, Sanchez S, Modin G, Genant H, Pierini E, Arnaud C. Parathyroid hormone treatment can reverse corticosteroid-induced osteoporosis. Results of a randomized controlled clinical trial. *J Clin Invest* 1998;102(8):1627-33.
197. Finkelstein J, Klibanski A, Arnold A, Toth T, Hornstein M, Neer R. Prevention of estrogen deficiency-related bone loss with human parathyroid hormone-(1-34): a randomized controlled trial. *JAMA* 1998;280(12):1067-73.
198. Orwoll E, Scheele W, Paul S, et al. The effect of teriparatide [human parathyroid hormone (1-34)] therapy on bone density in men with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2003;18(1):9-17.
199. Body J, Gaich G, Scheele W, et al. A randomized double-blind trial to compare the efficacy of teriparatide [recombinant human parathyroid hormone (1-34)] with alendronate in postmenopausal women with osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(10):4528-35.
200. Hodsman A, Bauer D, Dempster D, et al. Parathyroid hormone and teriparatide for

- the treatment of osteoporosis: a review of the evidence and suggested guidelines for its use. *Endocr Rev* 2005;26(5):688–703.
201. Dobnig H, Sipos A, Jiang Y, et al. Early changes in biochemical markers of bone formation correlate with improvements in bone structure during teriparatide therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(7):3970-7.
202. Gallagher J, Rosen C, Chen P, Misurski D, Marcus R. Response rate of bone mineral density to teriparatide in postmenopausal women with osteoporosis. *Bone* 2006:Epub ahead of print.
203. Sato M, Westmore M, Ma Y, et al. Teriparatide [PTH(1-34)] strengthens the proximal femur of ovariectomized nonhuman primates despite increasing porosity. *J Bone Miner Res* 2004;19(4):623-9.
204. Zanchetta J, Bogado C, Ferretti J, et al. Effects of teriparatide [recombinant human parathyroid hormone (1-34)] on cortical bone in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2003;18(3):539-43.
205. Rehman Q, Lang T, Arnaud C, Modin G, Lane N. Daily treatment with parathyroid hormone is associated with an increase in vertebral cross-sectional area in postmenopausal women with glucocorticoid-induced osteoporosis. *Osteoporos Int* 2003;14(1):77-81.
206. Finkelstein J, Hayes A, Hunzelman J, Wyland J, Lee H, Neer R. Effects of parathyroid hormone, alendronate, or both in men with osteoporosis. *N Engl J Med* 2003;2003:1216-26.
207. Black D, Greenspan S, Ensrud K, et al. The effects of parathyroid hormone and alendronate alone or in combination in postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 2003;349(13):1207-15.
208. Parfitt A. Parathyroid hormone and periosteal bone expansion. *J Bone Miner Res* 2002;17:1741-3.
209. Rosen C. What's new with PTH in osteoporosis: where are we and where are we headed? *Trends Endocrinol Metab* 2004;15(5):229-33.
210. Delmas P, Licata A, Reginster J, et al. Fracture risk reduction during treatment with teriparatide is independent of pretreatment bone turnover. *Bone* 2006;39(2):237-43.
211. Oglesby A, Minshall M, Shen W, Xie S, Silverman S. The impact of incident vertebral and non-vertebral fragility fractures on health-related quality of life in established postmenopausal osteoporosis: results from the teriparatide randomized, placebo-controlled trial in postmenopausal women. *J Rheumatol* 2003;30(7):1579-83.
212. Anastasilakis A, Goulis D, Koukoulis G, Slavakis A, Kita M, Avramidis A. Acute and chronic effect of teriparatide on glucose metabolism in women with established osteoporosis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2007;115(2):108-11.
213. Cosman F, Nieves J, Woelfert L, Gordon S, Shen V, Lindsay R. Parathyroid responsiveness in postmenopausal women with osteoporosis during treatment with parathyroid hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(3):788-90.
214. Barbehenn E, Lurie P, Wolfe S. Osteosarcoma risk in rats using PTH 1-34. *Trends Endocrinol Metab* 2001;12(9):383.
215. Vahle J, Long G, Sandusky G, Westmore M, Ma Y, Sato M. Bone neoplasms in F344 rats given teriparatide [rhPTH(1-34)] are dependent on duration of treatment and dose. *Toxicol Pathol* 2004;32(4):426-38.
216. Wilker C, Jolette J, Smith S, et al. A no observable carcinogenic effect dose level identified in Fischer 344 rats following daily treatment with PTH(1-84) for 2 years: role of the C-terminal PTH receptor? *J Bone Miner Res* 2004;19:98.
217. Hodsmen A, Hanley D, Ettinger M, et al. Safety and efficacy of human parathyroid hormone (1– 84) in increasing bone mineral density in postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5212-20.



218. Rhee Y, Won Y, Baek M, Lim S. Maintenance of increased bone mass after recombinant human parathyroid hormone (1-84) with sequential zoledronate treatment in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 2004;19(6):931-7.
219. Whitfield J, Morley P, Willick G, et al. Comparison of the ability of recombinant human parathyroid hormone, rhPTH-(1-84), and hPTH-(1-31)NH<sub>2</sub> to stimulate femoral trabecular bone growth in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 1997;60(1):26-9.
220. Greenspan S, Bone H, Ettinger M, et al. Effect of recombinant human parathyroid hormone (1-84) on vertebral fracture and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2007;146(5):326-39.
221. Fox J. Developments in parathyroid hormone and related peptides as bone-formation agents. *Curr Opin Pharmacol* 2002;2(3):338-44.
222. Frolik C, Cain R, Sato M, et al. Comparison of recombinant human PTH(1-34) (LY333334) with a C-terminally substituted analog of human PTH-related protein(1-34) (RS-66271): In vitro activity and in vivo pharmacological effects in rats. *J Bone Miner Res* 1999;14(2):163-72.
223. Horwitz M, Tedesco M, Sereika S, Hollis B, Garcia-Ocana A, Stewart A. Direct comparison of sustained infusion of human parathyroid hormone-related protein-(1-36) [hPTHrP-(1-36)] versus hPTH-(1-34) on serum calcium, plasma 1,25-dihydroxyvitamin D concentrations, and fractional calcium excretion in healthy human volunteers. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(4):1603-9.
224. Stewart A, Cain R, Burr D, Jacob D, Turner C, Hock J. Six-month daily administration of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein peptides to adult ovariectomized rats markedly enhances bone mass and biomechanical properties: a comparison of human parathyroid hormone 1-34, parathyroid hormone-related protein 1-36, and SDZ-parathyroid hormone 893. *J Bone Miner Res* 2000;15(8):1517-25.
225. Dufresne T, Chmielewski P, Manhart M, Johnson T, Borah B. Risedronate preserves bone architecture in early postmenopausal women in 1 year as measured by three-dimensional microcomputed tomography. *Calcif Tissue Int* 2003;73:423-32.
226. Hernandez C, Beaupre G, Marcus R, Carter D. A theoretical analysis of the contributions of remodelling space, mineralization and bone balance to changes in bone mineral density during alendronate treatment. *Bone* 2001;29:511-6.
227. Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of action. *Endocr Rev* 1998;19(1):80-100.
228. Nishikawa M, Yamamoto M, Murakami T, Akatsu T, Kugai N, Nagata N. A third-generation bisphosphonate, YM175, inhibits osteoclast formation in murine cocultures by inhibiting proliferation of precursor cells via supporting cell-dependent mechanisms. *J Bone Miner Res* 1998;13(6):986-95.
229. Reszka A, Halasy-Nagy J, Masarachia P, Rodan G. Bisphosphonates act directly on the osteoclast to induce caspase cleavage of mst1 kinase during apoptosis. A link between inhibition of the mevalonate pathway and regulation of an apoptosis-promoting kinase. *J Biol Chem* 1999;274(49):34967-73.
230. van Beek E, Lowik C, van der Pluijm G, Papapoulos S. The role of geranylgeranylation in bone resorption and its suppression by bisphosphonates in fetal bone explants in vitro: A clue to the mechanism of action of nitrogen-containing bisphosphonates. *J Bone Miner Res* 1999;14(5):722-9.
231. Tokuda H, Kozawa O, Harada A, Uematsu T. Tiludronate inhibits interleukin-6 synthesis in osteoblasts: inhibition of phospholipase D activation in MC3T3-E1 cells. *J Cell Biochem* 1998;69(3):252-9.
232. Giuliani N, Pedrazzoni M, Negri G, Passeri G, Impicciatore M, Girasole G. Bisphosphonates stimulate formation of osteoblast precursors and mineralized nodules in

- murine and human bone marrow cultures in vitro and promote early osteoblastogenesis in young and aged mice in vivo. *Bone* 1998;22(5):455-61.
233. Halasy-Nagy J, Rodan G, Reszka A. Inhibition of bone resorption by alendronate and risedronate does not require osteoclast apoptosis. *Bone* 2001;29(6):553-9.
234. Nancollas G, Tang R, Phipps R, et al. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: Differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone* 2005;Epub ahead of print.
235. Dunford J, Thompson K, Coxon F, et al. Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;296(2):235-42.
236. Chavassieux P, Arlot M, Reda C, Wei L, Yates A, Meunier P. Histomorphometric assessment of the long-term effects of alendronate on bone quality and remodeling in patients with osteoporosis. *J Clin Invest* 1997;100(6):1475-80.
237. Fleisch H. Pharmacokinetics. In: Fleisch H, ed. *Bisphosphonates in Bone Disease: From the Laboratory to the Patient*. Berne: University of Berne; 1993:50.
238. Kendler D, Kung A, Fuleihan G-H, et al. Patients with osteoporosis prefer once weekly to once daily dosing with alendronate. *Maturitas* 2004;48(3):243-51.
239. Rizzoli R, Greenspan S, Bone Gr, et al. Two-year results of once-weekly administration of alendronate 70 mg for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2002;17(11):1988-96.
240. Brown J, Kendler D, McClung M, et al. The efficacy and tolerability of risedronate once a week for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 2002;71(2):103-11.
241. Nenonen A, Cheng S, Ivaska K, et al. Serum TRACP 5b is a useful marker for monitoring alendronate treatment: comparison with other markers of bone turnover. *J Bone Miner Res* 2005;20(10):1804-12.
242. Ravn P, Clemmesen B, Christiansen C. Biochemical markers can predict the response in bone mass during alendronate treatment in early postmenopausal women. *Bone* 1999;24(3):237-44.
243. Sorensen O, Crawford G, Mulder H, et al. Long-term efficacy of risedronate: a 5-year placebo-controlled clinical experience. *Bone* 2003;32(2):120-6.
244. Black D, Delmas P, Eastell R, et al. Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 2007;356(18):1809-22.
245. Liberman U, Weiss S, Broll J, et al. Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 1995;333(22):1437-43.
246. McClung M, Clemmesen B, Daifotis A, et al. Alendronate prevents postmenopausal bone loss in women without osteoporosis. A double-blind, randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 1998;128(4):253-61.
247. Hosking D, Chilvers C, Christiansen C, et al. Prevention of bone loss with alendronate in postmenopausal women under 60 years of age. Early Postmenopausal Intervention Cohort Study Group. *N Engl J Med* 1998;338(8):485-92.
248. Harris S, Watts N, Genant H, et al. Effects of risedronate treatment on vertebral and nonvertebral fractures in women with postmenopausal osteoporosis: a randomized controlled trial. *JAMA* 1999;282(14):1344-52.
249. Heaney R, Zizic T, Fogelman I, et al. Risedronate reduces the risk of first vertebral fracture in osteoporotic women. *Osteoporos Int* 2002;13(6):501-5.
250. Mortensen L, Charles P, Bekker P, Digennaro J, Johnston CJ. Risedronate increases bone mass in an early postmenopausal population: two years of treatment plus one year of follow-up. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(2):396-402.

251. Cohen S, Levy R, Keller M, et al. Risedronate therapy prevents corticosteroid-induced bone loss: a twelve-month, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Arthritis Rheum* 1999;42(11):2309-18.
252. Reginster J, Adami S, Lakatos P, et al. Efficacy and tolerability of once-monthly oral ibandronate in postmenopausal osteoporosis: 2-year results from the MOBILE study. *Ann Rheum Dis* 2005.
253. Bone H, Hosking D, Devogelaer J, et al. Ten years' experience with alendronate for osteoporosis in postmenopausal women. *N Engl J Med* 2004;350(12):1189-99.
254. Boonen S, Laan R, Barton I, Watts N. Effect of osteoporosis treatments on risk of non-vertebral fractures: review and meta-analysis of intention-to-treat studies. *Osteoporos Int* 2005;16(10):1291-8.
255. Harrington J, Ste-Marie L, Brandi M, et al. Risedronate rapidly reduces the risk for nonvertebral fractures in women with postmenopausal osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 2004;74(2):129-35.
256. Watts N, Josse R, Hamdy R, et al. Risedronate prevents new vertebral fractures in postmenopausal women at high risk. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(2):542-9.
257. Kanis J, Barton I, Johnell O. Risedronate decreases fracture risk in patients selected solely on the basis of prior vertebral fracture. *Osteoporos Int* 2005;16(5):475-82.
258. McClung M, Geusens P, Miller P, et al. Effect of risedronate on the risk of hip fracture in elderly women. Hip Intervention Program Study Group. *N Engl J Med* 2001;344(5):333-40.
259. Boonen S, McClung M, Eastell R, El-Hajj Fuleihan G, Barton I, Delmas P. Safety and efficacy of risedronate in reducing fracture risk in osteoporotic women aged 80 and older: implications for the use of antiresorptive agents in the old and oldest old. *J Am Geriatr Soc* 2004;52(11):1832-9.
260. Rosen C, Hochberg M, Bonnick S, et al. Treatment with once-weekly alendronate 70 mg compared with once-weekly risedronate 35 mg in women with postmenopausal osteoporosis: a randomized double-blind study. *J Bone Miner Res* 2005;20(1):141-51.
261. Anastasilakis A, Goulis D, Kita M, Avramidis A. Oral bisphosphonate adverse effects in 849 patients with metabolic bone diseases. *Hormones (Athens)* 2007;6(3):233-41.
262. Kherani RB, Papaioannou A, Adachi JD. Long-term tolerability of the bisphosphonates in postmenopausal osteoporosis: a comparative review. *Drug Saf* 2002;25(11):781-90.
263. Taggart H, Bolognese MA, Lindsay R, et al. Upper gastrointestinal tract safety of risedronate: a pooled analysis of 9 clinical trials. *Mayo Clin Proc* 2002;77(3):262-70.
264. Fraunfelder F, Fraunfelder F. Bisphosphonates and ocular inflammation. *N Engl J Med* 2003;348:1187.
265. Markowitz G, Appel G, Fine P, et al. Collapsing focal segmental glomerulosclerosis following treatment with high-dose pamidronate. *J Am Soc Nephrol* 2001;12(6):1164-72.
266. Markowitz G, Fine P, Stack J, et al. Toxic acute tubular necrosis following treatment with zoledronate. *Kidney Int* 2003;64(1):281-9.
267. Odvina C, Zerwekh J, Rao D, Maalouf N, Gottschalk F, Pak C. Severely suppressed bone turnover: a potential complication of alendronate therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(3):1294-301.
268. Ott S. Long-term safety of bisphosphonates. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:1897-9.
269. Woo S, Hande K, Richardson P. Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonates. *N Engl J Med* 2005;353:100.



270. Ettinger B, San Martin J, Crans G, Pavo I. Differential effects of teriparatide on BMD after treatment with raloxifene or alendronate. *J Bone Miner Res* 2004;19(5):745-51.
271. Black D, Schwartz A, Ensrud K, et al. Effects of continuing or stopping alendronate after 5 years of treatment: the Fracture Intervention Trial Long-term Extension (FLEX): a randomized trial. *JAMA* 2006;296(24):2927-38.
272. Cumming R, Nevitt M. Calcium for prevention of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 1997;12(9):1321-9.
273. Chapuy M, Arlot M, Duboeuf F, et al. Vitamin D3 and calcium to prevent hip fractures in the elderly women. *N Engl J Med* 1992;327(23):1637-42.
274. Reid I, Ames R, Evans M, Gamble G, Sharpe S. Effect of calcium supplementation on bone loss in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1993;328(7):460-4.
275. Recker R, Hinders S, Davies K, et al. Correcting calcium nutritional deficiency prevents spine fractures in elderly women. *J Bone Miner Res* 1996;11(12):1961-6.
276. Riggs B, O'Fallon W, Muhs J, O'Connor M, Kumar R, Melton Lr. Long-term effects of calcium supplementation on serum parathyroid hormone level, bone turnover, and bone loss in elderly women. *J Bone Miner Res* 1998;13(2):168-74.
277. Cumming R, Cummings S, Nevitt M, et al. Calcium intake and fracture risk: results from the study of osteoporotic fractures. *Am J Epidemiol* 1997;145(10):926-34.
278. Whiting S, Wood R. Adverse effects of high-calcium diets in humans. *Nutr Rev* 1997;55(1):1-9.
279. Melton LI, Khosla S, Atkinson E, et al. Relationship of bone turnover to bone density and fractures. *J Bone Miner Res* 1997;12:1083.
280. Feik S, Thomas C, Clement J. Age-related changes in cortical porosity of the midshaft of the human femur. *J Anat* 1997;191:407.
281. Parfitt A, Villanueva A, Foldes J, Rao D. Relations between histologic indices of bone formation: implications for the pathogenesis of spinal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1995;10:466.
282. Boonen S, Broos P, Verbeke G, et al. Calcitropic hormones and markers of bone remodeling in age-related (type II) femoral neck osteoporosis: alterations consistent with secondary hyperparathyroidism-induced bone resorption. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1997;52:M286.
283. Bismar H, Diel I, Ziegler R, Pfeilschifter J. Increased cytokine secretion by human bone marrow cells after menopause or discontinuation of estrogen replacement. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:3351.
284. Jodar Gimeno E, Munoz-Torres M, Escobar-Jimenez F, et al. Identification of metabolic bone disease in patients with endogenous hyperthyroidism: role of biological markers of bone turnover. *Calcif Tissue Int* 1997;61:370.
285. Viereck V, Grundker C, Blaschke S, et al. Raloxifene concurrently stimulates osteoprotegerin and inhibits interleukin-6 production by human trabecular osteoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:4206-13.
286. Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal A, Boyle W, Lacey D, Riggs B. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J Clin Invest* 2003;111(8):1221-30.
287. Shevde N, Bendixen A, Dienger K, Pike J. Estrogens suppress RANK-ligand induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun suppression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:7829-34.
288. Grigorie D, Neacsu E, Marinescu M, Popa O. Circulating osteoprotegerin and leptin levels in postmenopausal women with and without osteoporosis. *Rom J Intern Med* 2003;41:409-15.
289. Pennisi P, Signorelli S, Riccobene S, et al. Low bone density and abnormal bone

- turnover in patients with atherosclerosis of peripheral vessels. *Osteoporos Int* 2004;15:389-95.
290. Jorgensen H, Kusk P, Madsen B, Fenger M, Lauritzen J. Serum osteoprotegerin (OPG) and the A163G polymorphism in the OPG promoter region are related to peripheral measures of bone mass and fracture odds ratios. *J Bone Miner Res* 2004;22:132-8.
291. Sasaki N, Kusano E, Ando Y, Yano K, Tsuda E, Asano Y. Glucocorticoid decreases circulating osteoprotegerin (OPG): possible mechanism for glucocorticoid induced osteoporosis. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16(3):479-82.
292. Fahrleitner A, Prenner G, Leb G, et al. Serum osteoprotegerin is a major determinant of bone density development and prevalent vertebral fracture status following cardiac transplantation. *Bone* 2003;32(1):96-106.
293. Kon T, Cho T, Aizawa T, et al. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res* 2001;16:1004-14.
294. Rogers A, Beaumont R, Veitch S, et al. Change in serum OPG after tibial shaft fracture in adults. *J Bone Miner Res* 2003;18(Suppl 2):S280.
295. Kong Y, Feige U, Sarosi I, et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 1999;402:304-9.
296. Lubberts E, van den Bersselaar L, Oppers-Walgreen B, et al. IL-17 promotes bone erosion in murine collagen-induced arthritis through loss of the receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand/osteoprotegerin balance. *J Immunol* 2003;170:2655-62.
297. Feuerherm A, Borset M, Seidel C, et al. Elevated levels of osteoprotegerin (OPG) and hepatocyte growth factor (HGF) in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2001;30:229-34.
298. Masi L, Simonini G, Piscitelli E, et al. Osteoprotegerin (OPG)/RANK-L system in juvenile idiopathic arthritis: is there a potential modulating role for OPG/RANK-L in bone injury? *J Rheumatol* 2004;31:986-91.
299. Ziolkowska M, Kurowska M, Radzikowska A, et al. High levels of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand in serum of rheumatoid arthritis patients and their normalization after anti-tumor necrosis factor alpha treatment. *Arthritis Rheum* 2002;46:1744-53.
300. Teng Y, Nguyen H, Gao X, et al. Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *J Clin Invest* 2000;106:R59-R67.
301. Zwerina J, Hayer S, Tohidast-Akrad M, et al. Single and combined inhibition of tumor necrosis factor, interleukin-1 and RANKL pathways in tumor necrosis factor-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:277-90.
302. Sezer O, Heider U, Zavrski I, Kuhne C, Hofbauer L. RANK ligand and osteoprotegerin in myeloma bone disease. *Blood* 2003;101:2094-8.
303. Giuliani N, Bataille R, Mancini C, et al. Myeloma cells induce imbalance in the osteoprotegerin / osteoprotegerin ligand system in the human bone marrow environment. *Blood* 2001;98:3527-33.
304. Heider U, Langelotz C, Jacob C, et al. Expression of receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand on bone marrow plasma cells correlates with osteolytic bone disease in patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2003;9:1436-40.
305. Standal T, Seidel C, Hjertner O, et al. Osteoprotegerin is bound, internalized and degraded by multiple myeloma cells. *Blood* 2002;100:3002-7.
306. Seidel C, Hjertner O, Abildgaard N, et al. Serum osteoprotegerin levels are reduced in patients with multiple myeloma with lytic bone disease. *Blood* 2001;98:2269-71.
307. Terpos E, Szydlo R, Apperley J, et al. Soluble receptor activator of nuclear factor



- $\kappa$ B ligand-osteoprotegerin ratio predicts survival in multiple myeloma: proposal for a novel prognostic index. *Blood* 2003;102:1064-9.
308. Croucher P, Shipman C, Lippitt J, et al. Osteoprotegerin inhibits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. *Blood* 2001;98:3534-40.
309. Pearce R, Sordillo E, Yaccoby S, et al. Multiple myeloma disrupts the TRANCE/osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:11581-6.
310. Michigami T, Ihara-Watanabe M, Yamazaki M, Ozono K. Receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL) is a key molecule of osteoclast formation for bone metastasis in a newly developed model of human neuroblastoma. *Cancer Res* 2001;61:1637-44.
311. Nagai M, Kyakumoto S, Sato N. Cancer cells responsible for humoral hypercalcemia express mRNA enclosing a secreted form of ODF/TRANCE that induces osteoclast formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;269:532-6.
312. Thomas R, Guise T, Yin J, et al. Breast cancer cells interact with osteoblasts to support osteoclast formation. *Endocrinology* 1999;140(10):4451-8.
313. Brown J, Vessella R, Kostenuik P, Dunstan C, Lange P, Corey E. Serum osteoprotegerin levels are increased in patients with advanced prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:2977-83.
314. Brown J, Corey E, Lee Z, et al. Osteoprotegerin and rank ligand expression in prostate cancer. *Urology* 2001;57:611-6.
315. Jung K, Lein M, von Hosslin K, et al. Osteoprotegerin in serum as a novel marker of bone metastatic spread in prostate cancer. *Clin Chem* 2001;47:2061-3.
316. Jung K, Stephan C, Semjonow A, Lein M, Schnorr D, Loening S. Serum osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand as indicators of disturbed osteoclastogenesis in patients with prostate cancer. *J Urol* 2003;170:2302-5.
317. Eaton C, Wells J, Holen I, Croucher P, Hamdy F. Serum osteoprotegerin (OPG) levels are associated with disease progression and response to androgen ablation in patients with prostate cancer. *Prostate* 2004;57:304-10.
318. Holen I, Croucher P, Hamdy F, Eaton C. Osteoprotegerin (OPG) is a survival factor for human prostate cancer cells. *Cancer Res* 2002;62:1619-23.
319. Honore P, Luger N, Sabino M, al e. Osteoprotegerin blocks bone cancer-induced skeletal destruction, skeletal pain and pain-related neurochemical reorganization of the spinal cord. *Nat Med* 2000;6:521-8.
320. Neville-Webbe H, Cross N, Eaton C, et al. Osteoprotegerin (OPG) produced by bone marrow stromal cells protects breast cancer cells from TRAIL-induced apoptosis. *Breast Cancer Res Treat* 2004;86:271-82.
321. Martinetti A, Bajetta E, Ferrari L, et al. Osteoprotegerin and osteopontin serum values in postmenopausal advanced breast cancer patients treated with anastrozole. *Endocr Relat Cancer* 2004;11:7719.
322. Oyajobi B, Anderson D, Traianedes K, al e. Therapeutic efficacy of a soluble receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B-IgG Fc fusion protein in suppressing bone resorption and hypercalcemia in a model of humoral hypercalcemia of malignancy. *Cancer Res* 2001;61:2572-8.
323. Mena C, Reddy S, Kurihara N, al e. Enhanced RANK ligand expression and responsivity of bone marrow cells in Paget's disease of bone. *J Clin Invest* 2000;105:1833-8.
324. Neale S, Schulze E, Smith R, Athanasou N. The influence of serum cytokines and growth factors on osteoclast formation in Paget's disease. *QJM* 2002;95:233-40.
325. Hofbauer L, Shui C, Riggs B, et al. Effects of immunosuppressants on receptor

- activator of NF- $\kappa$ B ligand and osteoprotegerin production by human osteoblastic and coronary artery smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;280:334-9.
326. Malyankar U, Scatena M, Suchland K, et al. Osteoprotegerin is an  $\alpha_v\beta_3$ -induced, NF- $\kappa$ B-dependent survival factor for endothelial cells. *J Biol Chem* 2000;275:20959-62.
327. Collin-Osdoby P, Rothe L, Anderson F, Nelson M, Maloney W, Osdoby P. Receptor activator of NF- $\kappa$ B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 2001;276:20659-72.
328. Schoppet M, Sattler A, Schaefer J, Herzum M, Maisch B, Hofbauer L. Increased osteoprotegerin serum levels in men with coronary artery disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1024-8.
329. Erdogan B, Aslan E, Bagis T, et al. Intima-media thickness of the carotid arteries is related to serum osteoprotegerin levels in healthy postmenopausal women. *Neurol Res* 2004;26:658-61.
330. Vik A, Mathiesen E, Noto A, Sveinbjornsson B, Brox J, Hansen J. Serum osteoprotegerin is inversely associated with carotid plaque echogenicity in humans. *Atherosclerosis* 2006;Epub ahead of print.
331. Nitta K, Akiba T, Uchida K, et al. The progression of vascular calcification and serum osteoprotegerin levels in patients on long-term hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 2003;42:303-9.
332. Emanuele E, Peros E, Scioli G, et al. Plasma osteoprotegerin as a biochemical marker for vascular dementia and Alzheimer's disease. *Int J Mol Med* 2004;13:849-53.
333. Knudsen S, Foss C, Poulsen P, Andersen N, Mogensen C, Rasmussen L. Increased plasma concentrations of osteoprotegerin in type 2 diabetic patients with microvascular complications. *Eur J Endocrinol* 2003;149:39-42.
334. Rhee E, Oh K, Jung C, et al. The relationship between four single nucleotide polymorphisms in the promoter region of the osteoprotegerin gene and aortic calcification or coronary artery disease in Koreans. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006;64(6):689-97.
335. Garnero P, Borel O, Delmas P. Evaluation of a fully automated serum assay for C-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen in osteoporosis. *Clin Chem* 2001;47(4):694-702.
336. Garnero P, Hausherr E, Chapuy M, et al. Markers of bone resorption predict hip fracture in elderly women: the EPIDOS Prospective Study. *J Bone Miner Res* 1996;11:1531-8.
337. Gerdhem P, Ivaska K, Alatalo S, et al. Biochemical markers of bone metabolism and prediction of fracture in elderly women. *J Bone Miner Res* 2004;19(3):386-93.
338. Rosen H, Parker R, Greenspan S, et al. Evaluation of ability of biochemical markers of bone turnover to predict a response to increased doses of HRT. *Calcif Tissue Int* 2004;74(5):415-23.
339. Woitge H, Seibel M, Ziegler R. Comparison of total and bone specific alkaline phosphatase in skeletal and non-skeletal diseases. *Clin Chem* 1996;42:1796.
340. Sato T, Tominaga Y, Iwasaki Y, et al. Osteoprotegerin levels before and after renal transplantation. *Am J Kidney Dis* 2001;38((4 Suppl 1)):S175-7.
341. Fink E, Cormier C, Steinmetz P, Kindermans C, Le Bouc Y, Souberbielle J. Differences in the capacity of several biochemical bone markers to assess high bone turnover in early menopause and response to alendronate therapy. *Osteoporos Int* 2000;11(4):295-303.
342. Greenspan S, Rosen H, Parker R. Early changes in serum N-telopeptide and C-telopeptide cross-linked collagen type 1 predict long-term response to alendronate therapy in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(10):3537-40.

343. McClung M, San Martin J, Miller P, et al. Opposite Bone remodeling effects of teriparatide and alendronate in increasing bone mass. *Arch Intern Med* 2005;165:1762-8.
344. Zegels B, Eastell R, Russell R, et al. Effect of high doses of oral risedronate (20 mg/day) on serum parathyroid hormone levels and urinary collagen cross-link excretion in postmenopausal women with spinal osteoporosis. *Bone* 2001;28(1):108-12.
345. Deal C, Omizo M, Schwartz E, et al. Combination teriparatide and raloxifene therapy for postmenopausal osteoporosis: results from a 6-month double-blind placebo-controlled trial. *J Bone Miner Res* 2005;20(11):1905-11.
346. Anastasilakis AD, Goulis DG, Polyzos SA, et al. Head-to-head comparison of risedronate versus teriparatide on bone turnover markers in women with postmenopausal osteoporosis: a randomized trial. *Int J Clin Pract* 2008;Epub ahead of print.
347. Black D, Bilezikian J, Ensrud K, et al. One year of alendronate after one year of parathyroid hormone (1-84) for osteoporosis. *N Engl J Med* 2005;353(6):555-65.
348. Kinyamu H, Gallagher J, Petranick K, Ryschon K. Effect of parathyroid hormone (hPTH[1-34]) infusion on serum 1,25-dihydroxyvitamin D and parathyroid hormone in normal women. *J Bone Miner Res* 1996;11(10):1400-5.
349. Cosman F, Shen V, Herrington B, Lindsay R. Response of the parathyroid gland to infusion of human parathyroid hormone-(1-34) [PTH-(1-34)]: demonstration of suppression of endogenous secretion using immunoradiometric intact PTH-(1-84) assay. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73(6):1345-51.
350. Anastasilakis AD, Polyzos SA, Goulis DG, et al. Endogenous intact PTH is suppressed during teriparatide (rhPTH 1-34) administration in postmenopausal women with established osteoporosis. *Endocr J* 2008;epud ahead of print.
351. Oh E, Rhee E, Oh K, et al. Circulating osteoprotegerin levels are associated with age, waist-to-hip ratio, serum total cholesterol, and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy Korean women. *Metabolism* 2005;54(1):49-54.
352. Revilla M, Villa L, Sanchez-Atrio A, Hernandez E, Rico H. Influence of body mass index on the age-related slope of total and regional bone mineral content. *Calcif Tissue Int* 1997;61(2):134-8.
353. Rico H, Arribas I, Casanova F, Duce A, Hernandez E, Cortes-Prieto J. Bone mass, bone metabolism, gonadal status and body mass index. *Osteoporos Int* 2002;13(5):379-87.
354. Cifuentes M, Johnson M, Lewis R, et al. Bone turnover and body weight relationships differ in normal-weight compared with heavier postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2003;14(2):116-22.
355. Papakitsou E, Margioris A, Dretakis K, et al. Body mass index (BMI) and parameters of bone formation and resorption in postmenopausal women. *Maturitas* 2004;47(3):185-93.
356. Ricci T, Heymsfield S, Pierson RJ, Stahl T, Chowdhury H, Shapses S. Moderate energy restriction increases bone resorption in obese postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 2001;73(2):347-52.
357. Shapses S, Von Thun N, Heymsfield S, et al. Bone turnover and density in obese premenopausal women during moderate weight loss and calcium supplementation. *J Bone Miner Res* 2001;16(7):1329-36.
358. Arden N, Earl S, Fisher D, Cooper C, Carruthers S, Goater M. Persistence with teriparatide in patients with osteoporosis: the UK experience. *Osteoporos Int* 2006;17:1626-9.
359. Cramer J, Amonkar M, Hebborn A, Altman R. Compliance and persistence with bisphosphonate dosing regimens among women with postmenopausal osteoporosis. *Curr Med Res Opin* 2005;21(9):1453-60.
360. McCombs J, Thiebaud P, McLaughlin-Miley C, Shi J. Compliance with drug

- therapies for the treatment and prevention of osteoporosis. *Maturitas* 2004;48(3):271-87.
361. Hamilton B, McCoy K, Taggart H. Tolerability and compliance with risedronate in clinical practice. *Osteoporos Int* 2003;14(3):259-62.
362. Clowes J, Peel N, Eastell R. The impact of monitoring on adherence and persistence with antiresorptive treatment for postmenopausal osteoporosis: a randomized controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(3):1117-23.
363. Papaioannou A, Ioannidis G, Adachi J, et al. Adherence to bisphosphonates and hormone replacement therapy in a tertiary care setting of patients in the CANDOO database. *Osteoporos Int* 2003;14(10):808-13.
364. Rogers A, Richard E. Circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor  $\kappa$ B ligand: clinical utility in metabolic bone disease assessment. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(11):6323-31.
365. Rossouw J, Anderson G, Prentice R, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002;288(3):321-33.
366. Chlebowski R, Hendrix S, Langer R, et al. Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial. 2003.