



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

---

**ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΠΑΘΗΣΕΩΝ ΜΥΟΣΚΕΛΕΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ**

**«Θ.ΓΑΡΟΦΑΛΙΔΗΣ»**

**Γ.Ν.Α. Κ.Α.Τ.**

**ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΣΜΗΝΗ ΔΟΝΤΑ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ Η. ΣΤΕΦΑΝΟΠΟΥΛΟΥ**

**ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΟΥ**

**ΤΙΤΛΟΣ:**

**«Ο ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΤΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ 23 (FGF23)  
ΣΤΗΝ ΟΜΟΖΥΓΟ β-ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑ»**

**ΑΘΗΝΑ, 15 ΟΚΤΩΒΡΙΟΥ 2018**



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

---

**ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΠΑΘΗΣΕΩΝ ΜΥΟΣΚΕΛΕΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ**

**«Θ.ΓΑΡΟΦΑΛΙΔΗΣ»**

**Γ.Ν.Α. Κ.Α.Τ.**

**ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΣΜΗΝΗ ΔΟΝΤΑ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ Η. ΣΤΕΦΑΝΟΠΟΥΛΟΥ**

**ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΟΥ**

**ΤΙΤΛΟΣ:**

**«Ο ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΤΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ 23 (FGF23)  
ΣΤΗΝ ΟΜΟΖΥΓΟ β-ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑ»**

**ΑΘΗΝΑ, 15 ΟΚΤΩΒΡΙΟΥ 2018**

- **Ημερομηνία αιτήσεως υποψηφίου:**  
21 Οκτωβρίου 2011
- **Ημερομηνία ορισμού 3μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**  
14 Νοεμβρίου 2011
- **Αρχικά μέλη της 3μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**  
Κα. Κασσή Ευανθία (Επιβλ.)  
Κος. Παπαϊωάννου Νικόλαος  
Κος. Χρονόπουλος Ευστάθιος
- **Μεταβολές στην αρχική σύνθεση της 3μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**  
23-12-2011: Αντικατάσταση του κ. Χρονόπουλου Ευσταθίου από τον κ. Παπαβασιλείου Αθανάσιο.  
17-09-2018: Αντικατάσταση λόγω συνταξιοδότησης του κ. Παπαϊωάννου Νικολάου από την κα. Δοντά Ισμήνη.
- **Ημερομηνία ορισμού του θέματος της Διατριβής:**  
15 Φεβρουαρίου 2012
- **Ημερομηνία Καταθέσεως της Διδακτορικής Διατριβής:**  
15 Οκτωβρίου 2018
- **Πρόεδρος της Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ:**  
Καθηγητής Πέτρος Π. Σφηκάκης
- **Μέλη της 7μελούς εξεταστικής επιτροπής:**  
Κασσή Ευανθία (Επιβλ.), Δοντά Ισμήνη (Καθ), Παπαβασιλείου Αθανάσιος (Καθ), Χρονόπουλος Ευστάθιος (Αν.Καθ), Κουλοχέρη Σταυρούλα (Αν.Καθ), Τριανταφυλλόπουλος Ιωάννης (Επικ.Καθ), Αγγελούση Άννα (Επικ.Καθ)
- **ΒΑΘΜΟΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: ΑΡΙΣΤΑ**



## Ο όρκος του Ιπποκράτη

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἴστορας ποιούμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν ὄρκον τόνδε καὶ συγγραφὴν τήνδε. Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωυτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξειν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ συγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοις τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί. Διαιτημασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξειν. Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε. Ὅμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἀγνῶς δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν. Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε. Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπηίης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρητα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ συγχέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιорκοῦντι, τάναντία τουτέων.

## **Σύντομο Βιογραφικό σημείωμα υποψηφίου:**

### **ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΑΥΤΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ:**

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ.....: ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΣΤΕΦΑΝΟΠΟΥΛΟΣ  
ΟΝΟΜΑ ΠΑΤΡΟΣ.....: ΗΛΙΑΣ  
ΟΝΟΜΑ ΜΗΤΡΟΣ.....: ΜΑΡΙΑ  
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΕΩΣ.....: 7 Σεπτεμβρίου 1977  
ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΕΩΣ.....: ΑΘΗΝΑ  
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΚΑΤΟΙΚΙΑΣ.....: ΕΡΜΟΥ 50, ΝΕΑ ΜΑΚΡΗ 19005  
ΤΗΛΕΦΩΝΟ.....: 2294069140 & 6979779215  
Email.....: dsteph@endo.gr

### **ΣΠΟΥΔΕΣ / ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΑΠΑΣΧΟΛΗΣΗ:**

**1992–1995:** 11ο Γενικό Λύκειο Αθηνών. Απολυθής με γενικό βαθμό «Άριστα» (19 4/11).

**2005 :** Πτυχίο Ιατρικής από την Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών / Βαθμός Πτυχίου: 8.3.

**2005–2007:** 2-Ετής άσκηση ως ειδικευόμενος ιατρός στην Παθολογία.  
Παθολογική Κλινική ΕΣΥ / ΓΝΝΘΑ «Η Σωτηρία».

**2008–2012:** 4-Ετής άσκηση ως ειδικευόμενος ιατρός στην Ενδοκρινολογία.  
Τμήμα Ενδοκρινολογίας, Μεταβολισμού & Διαβήτη  
ΓΝΑ «Κοργιαλένιο – Μπενάκειο», Ελληνικός Ερυθρός Σταυρός.

**2010-2011:** Παρακολούθηση «Ετησίου Σεμιναρίου Ανδρολογίας».  
Ελληνική Ανδρολογική Εταιρεία - Π.Γ.Ν.Μαιευτήριο «Ελενα Βενιζέλου».

**Σεπτ.2012:** Απόκτηση Τίτλου ιατρικής Ειδικότητας στην Ενδοκρινολογία.  
Δ/ση Δημόσιας Υγείας Περιφέρειας Αττικής - Υπουργείο Υγείας.

**2010-2012:** Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών «Μεταβολικά Νοσήματα των Οστών» - Εργαστήριο Έρευνας παθήσεων Μυοσκελετικού Συστήματος «Θ.Γαροφαλίδης», ΕΚΠΑ – Ιατρική Σχολή. Βαθμός τίτλου 9.4.  
Επιστ. Υπεύθυνος: Καθηγητής Γεώργιος Λυρίτης.

**2012 έως σήμερα:** Λειτουργία Ιδιωτικού Ενδοκρινολογικού-Διαβητολογικού Ιατρείου στη Νέα μάκρη, Αττικής.

**2012-2013:** Επιστημονικός Συνεργάτης Εργαστηρίου Έρευνας Παθήσεων Μυοσκελετικού Συστήματος “Θ.Γαροφαλίδης” ΓΝΑ "Κ.Α.Τ." Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών - Ιατρική Σχολή.

**2015-2016:** Εκπαίδευση στις σύγχρονες τεχνικές διάγνωσης ενδοκρινολογικών νοσημάτων μέσω υπερηχοτομογραφίας. Ακτινολογικό Τμήμα ΓΝΑ "Γ.Γεννηματάς".  
Πιστοποίηση για διενέργεια ενδοκρινολογικών υπερήχων (Υπουργείο Υγείας).

• **ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ:**

ΑΓΓΛΙΚΑ: "First Certificate In English"- UNIVERSITY OF CAMBRIDGE.  
Reference Number "916GR0141970", June 1991.

• **ΕΙΔΙΚΑ ΠΡΟΣΩΝΤΑ:**

Χειρισμός Ηλεκτρονικών Υπολογιστών (Software, Hardware).

• **ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ / ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΟ:**

**101** Ανακοινώσεις σε Ελληνικά ιατρικά Συνέδρια & Ημερίδες.

**23** Ανακοινώσεις σε Διεθνή και Παγκόσμια ιατρικά Συνέδρια.

**56** Συμμετοχές σε ιατρικά Σεμινάρια και Εκπαιδευτικές ημερίδες.

**139** Συμμετοχές σε Ελληνικά και Διεθνή Ιατρικά Συνέδρια.

**28** Δημοσιεύσεις σε ελληνικά και διεθνή ιατρικά περιοδικά και συγγράμματα.

**4** Συμμετοχές σε Διεθνείς Πολυκεντρικές Μελέτες φάσης-III με αντικείμενο το Σακχαρώδη Διαβήτη, ως Διαβητολόγος Ερευνητής.

• **ΔΙΔΑΚΤΙΚΟ ΕΡΓΟ:**

- **36** Διαλέξεις & Μαθήματα ως προσκεκλημένος ομιλητής.

- Συμμετοχή με **7** διαλέξεις στη διδασκαλία του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Μεταβολικά Νοσήματα των Οστών» στο Εργαστήριο Έρευνας Παθήσεων Μυοσκελετικού Συστήματος "Θ.Γαροφαλίδης" ΓΝΑ "Κ.Α.Τ." Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών - Ιατρική Σχολή.

• **ΜΕΛΟΣ:**

Ιατρικός Σύλλογος Αθηνών (**Ι.Σ.Α**)

Ελληνική Ενδοκρινολογική Εταιρεία (**Ε.Ε.Ε**)

Ελληνική Διαβητολογική Εταιρεία (**Ε.Δ.Ε**)

Ελληνικό Ίδρυμα Οστεοπόρωσης (**ΕΛ.Ι.ΟΣ**)

Ελληνική Εταιρεία Μελέτης Μεταβολισμού των Οστών (**Ε.Ε.Μ.Μ.Ο**)

Σωματείο Ιατρικής Ενημέρωσης & Εκπαίδευσης "**Αρμονία & Ζωή**"

## **Περίληψη της Διδακτορικής Διατριβής**

Η ομόζυγος β-θαλασσαιμία (βΜΑ) αποτελεί μία κληρονομική αιματολογική νόσο που απαντάται σχετικά συχνά στην Ελλάδα. Χαρακτηρίζεται από εκτεταμένη αιμόλυση, βαριά αναιμία, υπερφόρτωση του οργανισμού με κυτταροτοξικό σίδηρο λόγω συχνών μεταγγίσεων αίματος και πολλαπλές συνοδές επιπλοκές, μέρος των οποίων αποτελεί μία σοβαρή μορφή οστικής νόσου που ταλαιπωρεί την πλειοψηφία των πασχόντων. Μέχρι σήμερα ο μεταβολισμός του φωσφόρου δεν έχει μελετηθεί ικανοποιητικά στους συγκεκριμένους ασθενείς, μολονότι σε μεγάλο αριθμό μελετών υποστηρίζεται η επίδραση των συγκεντρώσεων του κυκλοφορούντος σιδήρου στα επίπεδα και τη δράση του FGF23. Καθώς η βΜΑ αποτελεί μία κατάσταση χρόνιας αιμοσιδήρωσης, είναι πολύ πιθανό στο έδαφος αυτής να ευνοείται η αύξηση της έκκρισης ή/και της δράσης του FGF23 και να ευοδώνεται έτσι η ανάπτυξη φωσφατουρίας, η οποία θα μπορούσε να επιδρά στα παθοφυσιολογικά μονοπάτια της οστικής νόσου της βΜΑ (ONΘ). Η παρούσα διατριβή ερευνά εάν υφίστανται σημαντικές διαφοροποιήσεις στο ακέραιο κλάσμα του FGF23 (iFGF23), στο καρβοξυτελικό θραύσμα αυτού (C-FGF23) και στην πρωτεΐνη Klotho στον ορό των θαλασσαιμικών ασθενών σε σύγκριση με τον υγιή πληθυσμό. Επιπρόσθετα αναζητά πιθανές συσχετίσεις των τριών αυτών παραγόντων με το βαθμό αιμοσιδήρωσης, τη βαρύτητα της ONΘ και το σχήμα αποσιδήρωσης των πασχόντων. Για τον έλεγχο αυτών των ερωτημάτων στρατολογήθηκαν 40 πάσχοντες από βΜΑ και 41 υγιείς μάρτυρες παρόμοιων δημογραφικών χαρακτηριστικών. Από τις συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων παρατηρήθηκε ότι οι πάσχοντες εμφανίζουν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό χαμηλότερα επίπεδα C-FGF23 στον ορό από τους μάρτυρες. Επιπρόσθετα είχαν υψηλότερες τιμές iFGF23 και χαμηλότερες τιμές Klotho, μολονότι αυτές οι διαφορές δεν κατέστησαν στατιστικά σημαντικές. Τέλος, δε φάνηκε να συσχετίζονται σημαντικά ο βαθμός αιμοσιδήρωσης, η βαρύτητα της ONΘ και το σχήμα αποσιδήρωσης με τα επίπεδα των τριών πρωτεϊνικών παραγόντων στον ορό. Αν και τα ως άνω δεδομένα δεν καταδεικνύουν δυναμικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της βΜΑ και του iFGF23, υποστηρίζουν ότι η αιμοσιδήρωση επιδρά στον FGF23, πιθανότατα αναστέλλοντας την πρωτεολυτική του διάσπαση και οδηγώντας σε μείωση των επιπέδων του C-FGF23. Προτείνεται λοιπόν να διενεργηθούν περαιτέρω παρόμοιες μελέτες σε μεγαλύτερους αριθμούς ασθενών, με σκοπό να διαφωτίσουν πλήρως τη συμμετοχή του FGF23 και της πρωτεΐνης Klotho στην ανάπτυξη της ONΘ.



## **Summary**

Homozygous beta-thalassemia ( $\beta$ Th) represents an inherited blood disorder relatively common in Greece. It is characterized by extensive hemolysis, severe anemia and cytotoxic iron deposition in the tissues, due to frequent red-cell transfusions. The disease is accompanied by numerous complications, which include a serious form of bone disease that affects the majority of patients. Phosphorus metabolism has not been studied adequately in thalassemic patients until now. As supported by a large number of studies, the serum levels and action of FGF23 are seriously affected by iron concentration in the circulation. Since  $\beta$ Th is characterized by a high iron burden, it is very possible that this condition could increase the secretion and/or action of FGF23, leading to the development of phosphaturia and thereby affecting the pathogenetic pathways of  $\beta$ Th-bone-disease (TBD). The present dissertation attempts to answer if there are significant differences of intact FGF23 (iFGF23), carboxyl-terminal fragment of FGF23 (C-FGF23) and Klotho protein levels in the serum of patients with  $\beta$ Th compared to the healthy population. In addition, we investigate if any relationship exists between the above factors with the degree of hemosiderosis, the severity of TBD and the iron chelation regimens of the patients. In order to answer these questions, 40  $\beta$ Th-patients and 41 healthy controls of similar demographic characteristics were recruited in a prospective observational case-control study. From the comparisons between the groups it was observed that the thalassemic patients had statistically significantly lower levels of serum C-FGF23 compared to controls. They also had increased iFGF23 and lower Klotho serum levels, but these observations didn't reach statistical significance. There were also no correlations between the severity of hemosiderosis, chelation therapy and severity of TBD with the serum levels of iFGF23, C-FGF23 and Klotho. Although our data cannot document dynamic interactions between  $\beta$ Th and iFGF23, they indicate that the chronic presence of hemosiderosis actually interferes to some extent with the metabolism of FGF23, possibly by inhibiting the proteolytic cleavage of iFGF23 and resulting in reduced C-FGF23 levels in serum. Due to the many particularities of the  $\beta$ Th discussed in detail in the main text, further similar studies should take place in a greater number of patients in order to shed more light on the involvement of FGF23 and Klotho protein in the development of TBD.

## Περιεχόμενα της Διδακτορικής Διατριβής:

### I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Πρόλογος.....	1
1.1. Φυσιολογία και ομοιοστασία του φωσφόρου.....	2
1.2. Οστική ανακατασκευή και σύστημα OPG/RANKL/RANK.....	7
1.3. Φωσφατονίνες και αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών 23 (FGF23)....	13
1.4. Οι υποδοχείς FGFR.....	20
1.5. Πρωτεΐνη Klotho.....	21
1.6. Οι δράσεις του FGF23 στον ανθρώπινο οργανισμό.....	25
1.7. Σύστημα FGF23/Klotho και καταγματικός κίνδυνος.....	30
1.8. Γενικά στοιχεία περί β-Θαλασσαιμίας.....	31
1.8.1. Ορισμός και επιδημιολογικά στοιχεία.....	31
1.8.2. Παθοφυσιολογικά δεδομένα.....	33
1.8.3. β-Θαλασσαιμία και συννοσηρότητα.....	33
1.8.4. Θεραπεία της αιματολογικής νόσου.....	34
1.9. Οστική νόσος στη β-Θαλασσαιμία.....	35
1.9.1. Ορισμός και επιδημιολογικά στοιχεία.....	35
1.9.2. Αιτιοπαθογένεια.....	37
1.9.2.1. Υπερπλασία του ερυθροποιητικού μυελού.....	37
1.9.2.2. Γενετική προδιάθεση.....	38
1.9.2.3. Μειωμένη φυσική δραστηριότητα.....	39
1.9.2.4. Ο ρόλος της αιμοσιδήρωσης.....	39
1.9.2.5. Τοξικότητα των φαρμάκων αποσιδήρωσης.....	39
1.9.2.6. Το σύστημα OPG/RANKL/RANK.....	40
1.9.2.7. Λοιπές κυτταροκίνες και αυξητικοί παράγοντες.....	40
1.9.2.8. Ενδοκρινικές και μεταβολικές διαταραχές.....	41
1.9.3. Διαγνωστική προσέγγιση.....	45
1.9.3.1. Κλινική εικόνα.....	45
1.9.3.2. Ακτινολογική διερεύνηση και απεικονιστικά ευρήματα.....	47
1.9.3.3. Εργαστηριακός έλεγχος.....	49
1.9.4. Σύγχρονη θεραπευτική προσέγγιση.....	50
1.9.4.1. Γενικά μέτρα και τρόπος ζωής.....	50

1.9.4.2. Θεραπεία αιματολογικής νόσου και επιπλοκών αυτής.....	51
1.9.4.3. Έλεγχος υπερασβεστιουρίας.....	54
1.9.4.4. Βιταμίνες και μέταλλα.....	55
1.9.4.5. Αντιοστεοπορωτικά φάρμακα.....	57

## II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

<b>2.1. Σκοπός και στόχοι της μελέτης.....</b>	<b>66</b>
<b>2.2. Η σχέση του FGF23 και της ομοιοστασίας σιδήρου – Κλινικές μελέτες.....</b>	<b>67</b>
<b>2.3. Η σχέση του FGF23 και της ομοιοστασίας σιδήρου – Παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί.....</b>	<b>71</b>
<b>2.4. Υλικό και Μέθοδος.....</b>	<b>72</b>
2.4.1. Σχεδιασμός και Τύπος της μελέτης.....	72
2.4.2. Τόπος διεξαγωγής της μελέτης.....	74
2.4.3. Πληθυσμοί της μελέτης και χαρακτηριστικά αυτών.....	74
2.4.4. Περιγραφή των μετρούμενων κλινικών και εργαστηριακών παραμέτρων.....	75
2.4.5. Περιγραφή των μεθόδων μέτρησης/ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκαν..	78
2.4.6. Στατιστική Ανάλυση.....	82
<b>2.5. Αποτελέσματα.....</b>	<b>83</b>
<b>2.6. Συζήτηση.....</b>	<b>101</b>
<b>2.7. Συμπεράσματα.....</b>	<b>114</b>
<b><u>III. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</u></b>	<b>118</b>

## I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Πρόλογος

Η ξεχωριστή μορφή οστικής νόσου που αναπτύσσεται σε έδαφος ομόζυγου β-θαλασσαιμίας έχει απασχολήσει έντονα την παγκόσμια ιατρική κοινότητα κατά τις τελευταίες δεκαετίες. Σε αυτό συνέβαλλε κατά κύριο λόγο η συνεχής βελτίωση των μεθόδων αντιμετώπισης της αιματολογικής νόσου, εξαιτίας της οποίας το προσδόκιμο επιβίωσης των ασθενών έχει πλέον επιμηκυνθεί εντυπωσιακά. Αποτέλεσμα αυτής της θετικής κατά τα άλλα εξέλιξης, είναι ο σκελετός των ατόμων με β-θαλασσαιμία να υφίσταται για πολύ μεγαλύτερο διάστημα την καταπόνηση της νόσου και του χρόνου σε σχέση με παλαιότερες εποχές. Υπό αυτές τις συνθήκες, τα προβλήματα των οστών έχουν αναχθεί σε μείζον ζήτημα στη συγκεκριμένη ομάδα πασχόντων, καθώς εκδηλώνονται στη συντριπτική πλειοψηφία των ατόμων άνω των 30 ετών. Σε επίπεδο αιτιοπαθογένειας των αλλοιώσεων από τα οστά, κατά τις τελευταίες δεκαετίες έχουν έρθει στο φως πολλά νέα στοιχεία που ξεδιαλύνουν σε σημαντικό βαθμό το ομιχλώδες τοπίο των προηγούμενων εποχών. Αδιαμφισβήτητα όμως υπάρχουν ακόμη ερωτηματικά που παραμένουν αναπάντητα. Μία παράμετρος που μέχρι σήμερα δεν έχει πρακτικά διερευνηθεί επαρκώς, είναι η δυνητική συμμετοχή ορισμένων παραγόντων που επηρεάζουν την ομοιοστασία του φωσφόρου και που πιθανώς να βρίσκονται σε παθολογικά επίπεδα στον ορό των θαλασσαιμικών ασθενών. Στην παρούσα εργασία κυρίως μελετάται αυτή ακριβώς η πιθανή συμμετοχή του φωσφατουρικού αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών 23 (FGF23), καθώς με βάση πρόσφατα δημοσιευμένα δεδομένα που θα παρουσιαστούν στη συνέχεια, έχει παρατηρηθεί ότι τα επίπεδα και η δράση του παράγοντα επηρεάζονται από τη συγκέντρωση σιδήρου στην κυκλοφορία. Από τη στιγμή λοιπόν που η ομόζυγος β-θαλασσαιμία αποτελεί μία κατάσταση χρόνιας αιμοσιδήρωσης, είναι πολύ πιθανό στο έδαφος αυτής να αναπτύσσονται συνθήκες που να ευνοούν την αύξηση της έκκρισης ή/και της δράσης του ως άνω παράγοντα, ευοδώνοντας κατ' επέκταση την ανάπτυξη συνθηκών φωσφατουρίας και επιδρώντας έτσι στα παθοφυσιολογικά μονοπάτια της οστικής νόσου της β-θαλασσαιμίας.

## 1.1. Φυσιολογία και ομοιοστασία του φωσφόρου

Ο φωσφόρος (P) αποτελεί ένα πολύ σημαντικό για τη ζωή ιχνοστοιχείο, καθώς συμμετέχει σε πλήθος βιολογικών διεργασιών. Ενδεικτικά και μόνο επισημαίνεται η απαραίτητη παρουσία του στη διατήρηση της ακεραιότητας των κυτταρικών μεμβρανών, στον κυτταρικό μεταβολισμό ενέργειας, στην πρωτεϊνσύνθεση ως συστατικό των νουκλεϊνικών οξέων, στην κυτταρική σηματοδότηση, στη ρύθμιση της οξεοβασικής ισορροπίας, στην πήξη του αίματος και φυσικά στην ανάπτυξη, μετάλλωση και διατήρηση του σκελετού.<sup>1</sup> Στον ανθρώπινο οργανισμό απαντάται ως επί το πλείστον με τη μορφή φωσφορικών ιόντων τα οποία βρίσκονται κυρίως ενδοκυττάρια. Πιο συγκεκριμένα, το 85% του μετάλλου κατανέμεται στο ερειστικό σύστημα και στους οδόντες (600-700 gr), το 14% σε πλήθος άλλων ιστών (100-200 gr) και μόλις το 1% βρίσκεται εξωκυττάρια, κατά 10% συνδεδεμένο με πρωτεΐνες, κατά το ένα τρίτο ως ενώσεις P με νάτριο (Na), ασβέστιο (Ca) ή μαγνήσιο (Mg) και κατά το υπόλοιπο ποσοστό ως ανόργανη φωσφορική μορφή ( $\text{HPO}_4^{2-}$  ή  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  σε αναλογία 4:1 όταν το pH του πλάσματος ανέρχεται στο 7,4). Συνεπώς, ο P στο πλάσμα κυκλοφορεί τόσο ως οργανική μορφή (φωσφολιπίδια και φωσφορικοί εστέρες) όσο και ως ανόργανη χημική ένωση (ανιόντα πυροφωσφορικού οξέος και ανόργανα φωσφορικά ιόντα), με την ανόργανη ορθοφωσφορική μορφή να είναι αυτή που μετρούμε στην κλινική πράξη.<sup>1,2</sup> Στα οστά, ο P δημιουργεί κατά κύριο λόγο σύμπλοκες δομές μαζί με το Ca κατά την επιμετάλλωση των οστών - τους κρυστάλλους υδροξυαπατίτη - ενώ σε μικρότερο ποσοστό ανιχνεύεται ως άμορφο φωσφορικό ασβέστιο. Στους μαλακούς ιστούς και στις κυτταρικές μεμβράνες λαμβάνει κυρίως τη μορφή των φωσφορικών εστέρων και δευτερευόντως των φωσφοπρωτεϊνών και των ελεύθερων φωσφορικών ιόντων.<sup>1,2</sup> Ως προς το βιοχημικό προσδιορισμό των επιπέδων του P στο πλάσμα, τονίζεται ότι αυτά διαφοροποιούνται ανάλογα με την ηλικία. Έτσι, οι φυσιολογικές του τιμές ανέρχονται στα 4,5-8,3 mg/dl στα βρέφη, στα 3,7-5,4 mg/dl στα παιδιά, στα 3,5-4,7 mg/dl στους εφήβους και στα 2,5-4,5 mg/dl στους ενήλικους. Έχει μάλιστα αποδειχθεί ότι με την πρόοδο της ηλικίας μειώνονται σταδιακά τόσο η απορρόφηση του μετάλλου από το γαστρεντερικό σωλήνα, όσο και η επαναρρόφησή του από τους νεφρούς.<sup>1</sup>

Η ομοιοστασία του P στον οργανισμό αποτελεί μία περίπλοκη διαδικασία στην οποία συμμετέχουν ξεχωριστά όργανα και συστήματα του ανθρώπινου σώματος, καθώς και πολλαπλά ορμονικά και σηματοδοτικά μονοπάτια. Ο γαστρεντερικός

σωλήνας (ΓΕΣ), το ερειστικό σύστημα και οι νεφροί αποτελούν τα κύρια σημεία ελέγχου και διαχείρισης του μετάλλου (Εικόνα-1). Η ακριβής συμμετοχή τους στην όλη διαδικασία περιγράφεται αμέσως παρακάτω:

Οι βασικότεροι φυσιολογικοί ρυθμιστές της **εντερικής απορρόφησης** του P είναι η διατροφική πρόσληψη του μετάλλου, η 1α,25-διϋδροξυ-χοληκαλσιφερόλη [ $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ] ή καλσιτριόλη, η παραθορμόνη (PTH), οι φωσφατονίνες (οι οποίες και θα παρουσιαστούν αναλυτικά στη συνέχεια), καθώς και οι συνθήκες οξεοβασικής ισορροπίας. Σε επίπεδο διατροφικής πρόσληψης, η οποία αποτελεί και τον κυριότερο ρυθμιστή της απορρόφησης του P από το ΓΕΣ, όσο μεγαλύτερη ποσότητα του μετάλλου προσλαμβάνεται με την τροφή, τόσο μειώνεται η επακόλουθη απορρόφησή του από τον εντερικό σωλήνα και το αντίθετο. Σε αύξηση της εντερικής απορρόφησης φωσφορικών οδηγούν επίσης η δράση της καλσιτριόλης, σε μικρότερο βαθμό η δράση της PTH, αλλά και η παρουσία συνθηκών μεταβολικής οξέωσης. Καθημερινά και υπό φυσιολογικές συνθήκες οι ενήλικοι προσλαμβάνουν περίπου 20mg P ανά κιλό σωματικού βάρους, τα 4/5 του οποίου απορροφώνται από το ΓΕΣ - κατά κύριο λόγο στην περιοχή του δωδεκαδακτύλου και της νήστιδας - είτε διακυτταρικά με ενεργό μεταφορά, είτε κυρίως παρακυτταρικά με διάχυση, που αποτελεί και το βασικό μηχανισμό εντερικής απορρόφησης. Η ενεργός μεταφορά διαμεσολαβείται από νατριο-εξαρτώμενους συμμεταφορείς φωσφορικών που ανήκουν στην οικογένεια SLC-34 (Solute Carrier-34). Στην ομοιοστασία του P στον ανθρώπινο οργανισμό συμμετέχουν τρεις βασικοί τέτοιοι συμμεταφορείς τύπου-II, οι NaPiIIa, NaPiIIb και NaPiIIc. Στο ΓΕΣ εκφράζεται κυρίως ο NaPiIIb που είναι ευαίσθητος στη δράση της καλσιτριόλης. Ελάττωση των συγκεντρώσεων P στο αίμα οδηγεί σε αύξηση της σύνθεσης  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  και κατ' επέκταση σε αύξηση της εντερικής απορρόφησης του μετάλλου. Επειδή ο P εκκρίνεται και στον εντερικό αυλό μέσω των χολοπαγκρεατικών και εντερικών υγρών, η ποσότητα η οποία τελικά εισέρχεται στο εξωκυττάριο υγρό σε καθημερινή βάση αντιστοιχεί σε 13mg/kg.<sup>1,2</sup>

Σε επίπεδο **νεφρών** τόση είναι και η ποσότητα που αποβάλλεται καθημερινά στα ούρα σε καταστάσεις φυσιολογικής νεφρικής λειτουργίας και απόλυτης μεταβολικής ισορροπίας φωσφορικών. Βεβαίως, αναλόγως των συνθηκών, η νεφρική επαναρρόφηση του P μπορεί να τροποποιηθεί σημαντικά όπως θα περιγραφεί και στη συνέχεια. Για παράδειγμα, αύξησή της παρατηρείται σε διατροφική ένδεια του μετάλλου και σημαντική μείωση σε αυξημένη διατροφική του πρόσληψη. Ο νεφρός

αποτελεί το βασικότερο όργανο διαχείρισης της ομοιοστασίας του P, με τη νεφρική επαναρρόφηση στα εγγύς εσπειραμένα σωληνάκια να είναι εκείνη που κατέχει τον κυρίαρχο ρόλο στη διατήρηση των συγκεντρώσεων του μετάλλου στο πλάσμα εντός φυσιολογικών πλαισίων. Πιο συγκεκριμένα, το 60-70% της συνολικής επαναρρόφησης των φωσφορικών λαμβάνει χώρα στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, το 15-20% στο εγγύς ευθύ σωληνάριο και το 5-10% στο άπω εσπειραμένο.<sup>2</sup> Η σωληναριακή επαναρρόφηση του P διαμεσολαβείται κατά το 80% από τους νατριο-εξαρτώμενους συμμεταφορείς NaPiIIa και NaPiIIc, κύριοι ρυθμιστές των οποίων θεωρούνται η PTH, ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών 23 (FGF23) και η διατροφική πρόσληψη φωσφορικών. Στα εγγύς εσπειραμένα σωληνάκια υπάρχουν βεβαίως και άλλοι πρωτεϊνικοί μεταφορείς που συμμετέχουν επίσης στη νεφρική επαναρρόφηση του P. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η πρωτεΐνη PiT2 (μέλος της οικογένειας SLC-20) που αναφέρεται και ως τύπου-III συμμεταφορέας νατρίου-φωσφόρου και η δράση της ρυθμίζεται κυρίως από τη διατροφική πρόσληψη του μετάλλου.<sup>1,2</sup>

Ορμονικοί και μη-ορμονικοί παράγοντες συμμετέχουν στη ρύθμιση της όλης διαδικασίας στο νεφρό. Από τους ορμονικούς παράγοντες<sup>1-3</sup>: Η PTH και το σχετικό με την PTH πεπτίδιο (PTHrP) ελαττώνουν την έκφραση των NaPiIIa και NaPiIIc, αναστέλλοντας την επαναρρόφηση του P κυρίως στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο και στο κατιόν σκέλος της αγκύλης του Henle και δευτερευόντως - πολύ ηπιότερα - στο άπω εσπειραμένο. Η καλσιτονίνη (CT) αναστέλλει και αυτή την επαναρρόφηση του μετάλλου στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο και στο κατιόν σκέλος της αγκύλης του Henle. Ο FGF23 ενεργοποιώντας τον υποδοχέα του (FGFR) με τη βοήθεια και της πρωτεΐνης-συνυποδοχέα Klotho, προκαλεί μείωση της έκφρασης των NaPiIIa και NaPiIIc στα εγγύς εσπειραμένα, με παρόμοιο φωσφατουρικό αποτέλεσμα. Η μακροχρόνια αύξηση των επιπέδων της 1,25(OH)<sub>2</sub>D μειώνει επίσης την επαναρρόφηση του P σε επίπεδο νεφρών, κυρίως έμμεσα καταστέλλοντας την PTH. Ανασταλτικές επιδράσεις στην επαναρρόφηση του μετάλλου σε επίπεδο εγγύς σωληναρίων ασκούν και τα γλυκοκορτικοειδή. Από την άλλη μεριά, η ινσουλίνη (INS) και το σύστημα αυξητικής ορμόνης/ινσουλινόμορφου αυξητικού παράγοντα-1 (GH/IGF1) ευοδώνουν την επαναρρόφηση του P στα εγγύς εσπειραμένα, όπως εξάλλου συμβαίνει και με τη δράση των θυρεοειδικών ορμονών (T3, T4) και του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF). Εκτός των ανωτέρω και άλλες ορμόνες - όπως η ντοπαμίνη και η σεροτονίνη - φαίνεται να επιδρούν ηπιότερα και ανεξάρτητα

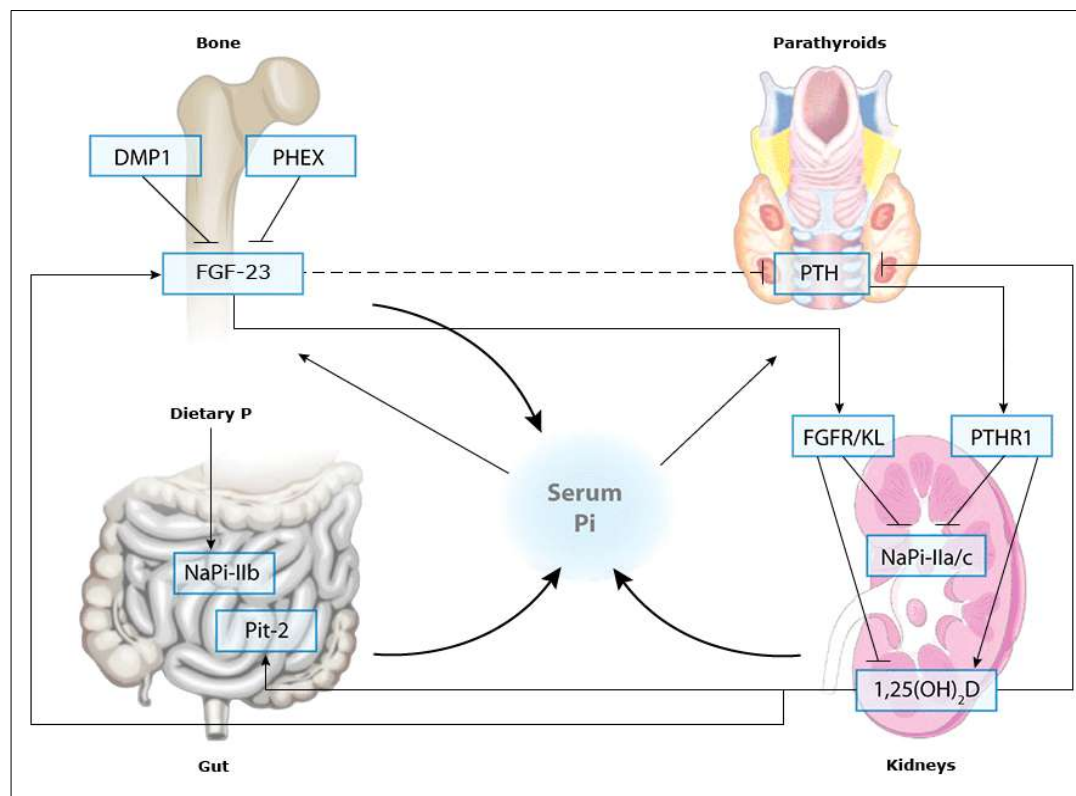
στη νεφρική διαχείριση του P. Σημειώνεται ότι τα διάφορα ορμονικά συστήματα ασκούν τις επιδράσεις τους στις ανόργανες φωσφορικές μορφές του πλάσματος.<sup>3</sup>

Από τους μη-ορμονικούς παράγοντες<sup>1-3</sup> η διατροφική πρόσληψη του μετάλλου ήδη επισημάνθηκε. Πιο συγκεκριμένα, διατροφική ένδεια P ή/και υποφωσφοραιμία οδηγούν σε αυξημένη έκφραση και δράση των NaPiIIa με ασαφή μηχανισμό, ενώ άγνωστες παραμένουν σε μεγάλο βαθμό και οι διαδικασίες με τις οποίες επιδρά η διατροφή στην έκφραση του FGF23 και της καλσιτριόλης. Έχει μάλιστα προταθεί και η παρουσία αισθητήρα φωσφόρου στους παραθυρεοειδείς αδένες, μολονότι αυτός δεν έχει ακόμη αναγνωρισθεί. Οι χρόνιες καταστάσεις υπερασβεστιαμίας ελαττώνουν τη νεφρική επαναρρόφηση του P, ενώ αντίθετα δρα η χρόνια υπασβεστιαμία. Ακόμη, αυξήσεις στον εξωκυττάριο χώρο οδηγούν σε μείωση της νεφρικής επαναρρόφησης του P, ενώ ισχύει και το ακριβώς αντίθετο. Οι συνθήκες οξεοβασικής ισορροπίας επηρεάζουν επίσης σημαντικά, με τη χρόνια μεταβολική οξέωση και την οξεία μεταβολική αλκάλωση να μειώνουν την επαναρρόφηση του μετάλλου και τη χρόνια μεταβολική αλκάλωση να την αυξάνει. Άλλες καταστάσεις που επιδρούν στη νεφρική διαχείριση του P είναι η επαναρρόφηση του Na, η λήψη θειαζιδικών διουρητικών, καθώς και αρκετές μεταβολικές και γενετικές διαταραχές. Τέλος δεν πρέπει να λησμονείται και η χρόνια νεφρική δυσπραγία, που όταν επιφέρει ελάττωση της πειραματικής διήθησης κάτω από το 25% του φυσιολογικού, οδηγεί επίσης σε υπερφωσφοραιμία.<sup>1,2</sup>

Όσον αφορά στη συμμετοχή του **οστίτη ιστού**, περίπου 3mg P για κάθε κιλό σωματικού βάρους αναδιανέμονται καθημερινά - και αναλόγως των συνθηκών - εντός και εκτός του σκελετού, από και προς το εξωκυττάριο υγρό αντίστοιχα.<sup>1,2</sup> Όπως ήδη τονίστηκε, ο P αποτελεί βασικό συστατικό του υδροξυαπατίτη και ως εκ τούτου η διακίνηση αυτή σχετίζεται σημαντικά τόσο με τη δραστηριότητα του ατόμου και τις οστικές φορτίσεις, όσο και με τις συνθήκες μετάλλωσης του σκελετού. Έτσι για παράδειγμα, σε καταστάσεις υπέρμετρα αυξημένης οστικής απορρόφησης παρατηρείται αύξηση των συγκεντρώσεων του μετάλλου στο πλάσμα, ενώ αύξηση της επιμετάλλωσης των οστών θα επιφέρει το αντίθετο αποτέλεσμα. Η τοπική δράση της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP) είναι απολύτως απαραίτητη στην όλη διαδικασία, καθώς προμηθεύει με ελεύθερο P τα οστικά κύτταρα. Έτσι, σε συνθήκες υποφωσφοραιμίας η ενεργότητα της ALP αυξάνει και τα οστικά κύτταρα διατηρούν σταθερή την ενδοκυττάρια συγκέντρωση του μετάλλου. Από την άλλη μεριά, ο



FGF23 ασκεί προστατευτική δράση στα οστικά κύτταρα, αποτρέποντας την υπερβολική αύξηση του P στο εσωτερικό τους, η οποία θα οδηγούσε στον κυτταρικό τους θάνατο.<sup>1</sup>



**Εικόνα 1. Η ρύθμιση της ομοιοστασίας του φωσφόρου.**

Ο διατροφικός φωσφόρος (Pi) απορροφάται στο γαστρεντερικό σύστημα (ΓΕΣ) ενεργητικά ή με διάχυση, περνά στην κυκλοφορία, αποθηκεύεται στο σκελετό και απεκκρίνεται από τους νεφρούς. Η συγκέντρωσή του στον ορό ρυθμίζεται στενά από την παραθορμόνη (PTH) και τη συμμετοχή των νεφρών και των οστών. Η καλσιτριόλη [1,25(OH)<sub>2</sub>D] προάγει την απορρόφησή του από το ΓΕΣ. Η PTH προάγει τη νεφρική απέκκριση του μετάλλου και τη βιοσύνθεση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D στους νεφρούς. Με τη σειρά τους, τα χαμηλά επίπεδα φωσφορικών και η καλσιτριόλη αναστέλλουν άμεσα την παραγωγή PTH στους παραθυρεοειδείς αδένες. Στο σκελετό, η PTH διεγείρει την παραγωγή του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών-23 (FGF23) και αυξάνει την απελευθέρωση φωσφορικών μετά από διέγερση της οστικής απορρόφησης. Ο FGF23 αυξάνει τη νεφρική κάθαρση του φωσφόρου, καταστέλλει τη βιοσύνθεση της καλσιτριόλης και αναστέλλει την έκκριση της παραθορμόνης (PTH). FGFR/KL: Υποδοχέας του FGF23/Klotho. PTH1R: Υποδοχέας της PTH. NaPi-IIa/c: Τύπου IIa και IIc νατριο-εξαρτώμενοι συμμεταφορείς φωσφόρου. Pit-2:

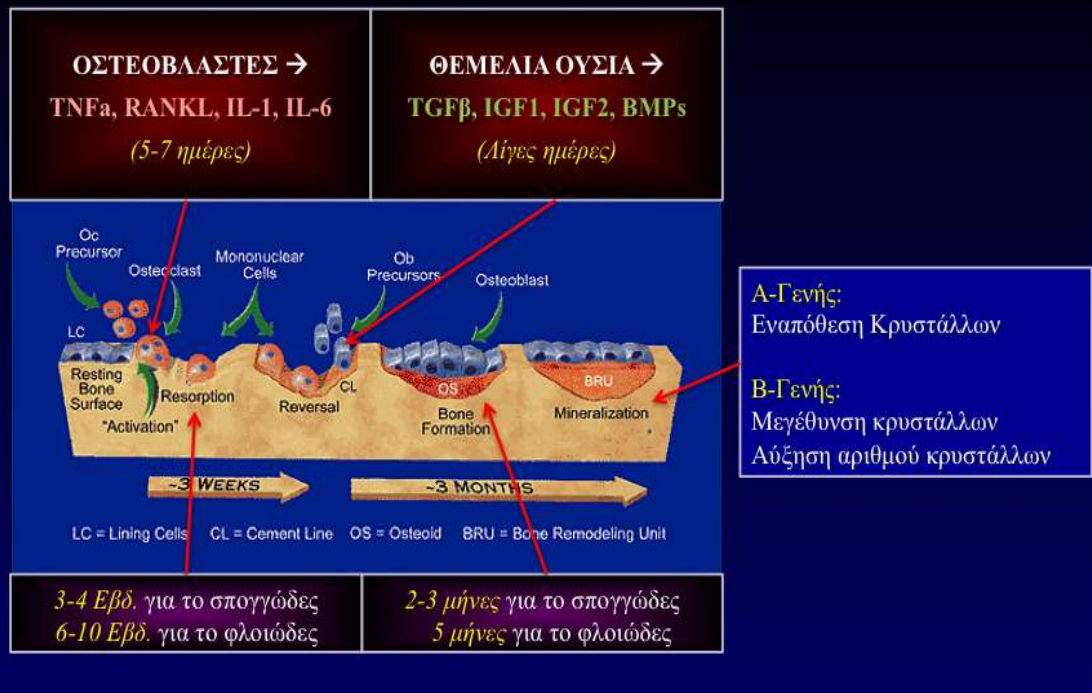
Τύπου-III συµµεταφορέας νατρίου-φωσφόρου. Bone: Οστό. Parthyroids: Παραθυροειδείς αδένες, Gut: ΓΕΣ, Kidneys: Νεφροί. Serum Pi: Φωσφόρος ορού.

*Πηγή: Bergwitz C and Jüppner H. Annu Rev Med. 2010;61:91-104.<sup>4</sup>*

## **1.2. Οστική ανακατασκευή και σύστημα OPG/RANKL/RANK**

Όπως είναι γνωστό, ο οστίτης ιστός δοµείται από κύτταρα και µεσοκυττάρια ουσία. Η µεσοκυττάρια ουσία σχηµατίζεται µε τη σειρά της κυρίως από τους κρυστάλλους του υδροξυαπατίτη - οι οποίοι προσδίδουν τη χαρακτηριστική σκληρότητα και ανθεκτικότητα στο σκελετό - και τη θεµέλια ουσία, η οποία αποτελείται από κολλαγόνο και µη-κολλαγονικές πρωτεΐνες και είναι υπεύθυνη για την ελαστικότητα του οστίτη ιστού. Τους εξειδικευµένους κυτταρικούς πληθυσµούς των οστών απαρτίζουν οι οστεοβλάστες οι οποίοι παράγουν τη θεµέλια ουσία, οι οστεοκλάστες οι οποίες αποδοµούν και απορροφούν το παλαιότερο οστό, και τα οστεοκύτταρα που πρακτικά ελέγχουν και «ενορχηστρώνουν» την όλη διαδικασία, ανταποκρινόµενα σε µηχανικά και χυµικού τύπου ερεθίσµατα.<sup>2</sup> Οι τρεις συγκεκριµένοι τύποι κυττάρων φυσιολογικά συνεργάζονται µεταξύ τους καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής ενός ατόµου, καθοδηγούµενοι από πλήθος µηχανικών, διατροφικών, ορµονικών ή τοπικών παρακρινικών παραγόντων, έτσι ώστε στο ερειστικό σύστηµα να λαµβάνει χώρα µία συνεχής διεργασία αποδόµησης παλαιού και φθαρµένου οστού και αντικατάστασής του από νέο, σφριγηλό και ανθεκτικό ιστό. Το σύνολο των εξειδικευµένων αυτών κυτταρικών λειτουργιών καλείται κατά την ενήλικη ζωή «οστική ανακατασκευή» και λαµβάνει χώρα στη στοιχειώδη ανατοµική µονάδα του οστού, την επονοµαζόµενη «βασική µικροκατασκευαστική µονάδα» (Bone Structural Unit, BSU.) Υπό φυσιολογικές συνθήκες η όλη διαδικασία βρίσκεται σε κατάσταση ισορροπίας («σύζευξη»), έχοντας ως τελικό σκοπό τη συνεχή ανανέωση των οστών και τη διατήρηση της ακεραιότητας του σκελετού. Η περιγραφείσα οµοιοστατική διαδικασία λαµβάνει χώρα σε έναν κύκλο πέντε διακριτών φάσεων, όπως αυτές παρουσιάζονται στην Εικόνα 2.<sup>2,5</sup> Επισηµαίνεται στο σηµείο αυτό ότι ο χρόνος ολοκλήρωσης ενός κύκλου οστικής ανακατασκευής διαφέρει σηµαντικά µεταξύ των διαφορετικών τύπων οστού, ανερχόµενος σε 3-4 µήνες για το σπογγώδες και σε 7 περίπου µήνες για το φλοιώδες.

## ΟΣΤΙΚΗ ΑΝΑΚΑΤΑΣΚΕΥΗ



Εικόνα 2. Οι φάσεις της οστικής ανακατασκευής.

1. Φάση ηρεμίας (resting), χωρίς κυτταρική δραστηριότητα. Χαρακτηρίζεται από την παρουσία ανενεργών αποπλατυσμένων επενδυματικών κυττάρων στην ελεύθερη επιφάνεια της BSU. 2. Φάση ενεργοποίησης (activation), η οποία χαρακτηρίζεται από κινητοποίηση και σύντηξη προ-οστεοκλαστών (Oc-precursors) προς ώριμες πολυπύρηνες οστεοκλάστες. Υποκινητές της διαδικασίας αυτής είναι κυττοκίνες που απελευθερώνονται κυρίως από τους οστεοβλάστες όπως ο TNF $\alpha$ , οι ιντερλευκίνες 1 και 6 (IL-1, IL-6) και ο παράγοντας RANKL (βλ. παρακάτω) 3. Φάση οστικής απορρόφησης (resorption) η οποία αναφέρεται αποκλειστικά στην αποδόμηση του οστού από τις οστεοκλάστες. 4. Φάση κυτταρικής αναστροφής (reversal), πιθανότατα επαγόμενη από αυξητικούς παράγοντες (όπως οι TGF $\beta$ , IGF1, IGF2, BMPs) που απελευθερώνονται από τη θεμέλια ουσία κατά την οστική απορρόφηση. Χαρακτηρίζεται από υποστρόφη και εξαφάνιση των οστεοκλαστών με επιστράτευση των πρόδρομων μορφών των οστεοβλαστών (Ob-precursors). 5. Φάση οστικής παραγωγής και μετάλλωσης (mineralization), η οποία αντικατοπτρίζει την παραγωγική δραστηριότητα των ώριμων οστεοβλαστών (Osteoblasts). Η μετάλλωση διακρίνεται σε πρωτογενή, κατά την οποία γίνεται εναπόθεση κρυστάλλων υδροξυαπατίτη στο νέο οστό, και σε δευτερογενή, κατά την οποία οι κρυσταλλοί

αυξάνουν σε μέγεθος και αριθμό.<sup>3</sup> Τη φάση αυτή πρόκειται να διαδεχτεί μια νέα φάση ηρεμίας. Τονίζεται ότι ο ως άνω διαχωρισμός μεταξύ των φάσεων γίνεται κυρίως για διδακτικούς λόγους, καθώς δεν υφίσταται σε τόσο απόλυτα διακριτό βαθμό σε πραγματικές συνθήκες.

Πηγή: *Τροποποίηση από: Schnitzer T.J. Diagnosis and Treatment for Osteoporosis: Current Status and Expectations for the New Millennium. <https://www.medscape.org/viewarticle/416478>.*

Τελικά, η οστική ανακατασκευή απαντώντας στις εκάστοτε βιολογικές και μηχανικές απαιτήσεις ενός οργανισμού κατά την πορεία της ζωής του, συμμετέχει στην αύξηση του σκελετού, στη διατήρηση της ακεραιότητάς του μέσω της επισκευής των διαφόρων μικρών οστικών καταστροφών, αλλά και στη διατήρηση της οστικής μάζας κάθε τμήματος του σκελετού. Όπως αναμένεται με βάση τα ανωτέρω, ο ρυθμός της οστικής ανακατασκευής επηρεάζει τελικά τόσο την ποιότητα όσο και την αντοχή των οστών. Συνεπώς, οποιαδήποτε διαταραχή αφορά στο μηχανισμό ή/και στο ρυθμό αυτής της διαδικασίας, θα έχει ως αποτέλεσμα την απόκλιση από την κατάσταση ισορροπίας («αποσύζευξη») και τελικά την ανάπτυξη σοβαρών οστικών μεταβολικών νοσημάτων όπως είναι για παράδειγμα η οστεοπόρωση, η οστεοπέτρωση, η νόσος Paget των οστών και πλήθος άλλων παθολογικών σκελετικών καταστάσεων.

Η οστική ανακατασκευή μπορεί να εκτιμηθεί εργαστηριακά με τη βοήθεια των βιοχημικών δεικτών οστικής εναλλαγής (ΒΔΟΕ), οι οποίοι προσδιορίζονται στο αίμα ή/και στα ούρα των ασθενών και διακρίνονται σε δείκτες ενδεικτικούς οστικής παραγωγής και σε δείκτες ενδεικτικούς οστικής απορρόφησης. Οι ΒΔΟΕ που χρησιμοποιούνται ευρέως σήμερα παρατίθενται στον Πίνακα 1.<sup>3,6</sup> Σε κλινικό επίπεδο είναι ιδιαίτερα χρήσιμοι όχι μόνο στη διάγνωση, αλλά κυρίως στην επιλογή ή/και στην παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας των ειδικών θεραπευτικών παρεμβάσεων που εφαρμόζονται για την αντιμετώπιση πλήθους οστικών νοσημάτων. Μία εναλλακτική αλλά επεμβατική μέθοδο εκτίμησης της οστικής ανακατασκευής αποτελεί η βιοψία οστού μετά από διπλή σήμανση με τετρακυκλίνη, η οποία όμως, αν και είναι εξαιρετικά ακριβής και αξιόπιστη, δεν μπορεί να εφαρμοστεί ως εξέταση ρουτίνας στην κλινική πράξη.<sup>7,8</sup>

Δείκτες οστικής παραγωγής	Δείκτες οστικής απορρόφησης
<b>Αίμα</b>	
1. Αλκαλική φωσφατάση (ALP) 2. Οστικό κλάσμα αλκαλικής φωσφατάσης (bALP) 3. Οστεοκαλσίνη (BGP) 4. C-τελικό προπεπτίδιο προκολλαγόνου-I (PICP) 5. N-τελικό προπεπτίδιο προκολλαγόνου-I (PINP)	1. C-Τελοπεπτίδιο κολλαγόνου τύπου I (CTX) 2. N-τελοπεπτίδιο κολλαγόνου τύπου I (NTX) 3. Ανθεκτικό στο τρυγικό άλας κλάσμα όξινης φωσφατάσης (TRAP 5b)
<b>Ούρα</b>	
	1. Ασβέστιο/Κρεατινίνη (Ca/Cr) 2. Υδροξυπρολίνη/Κρεατινίνη (OHP/Cr) 3. Πυριδινολίνη/Κρεατινίνη (PYD/Cr) 4. Δεοξυπυριδινολίνη/Κρεατινίνη (DPD/Cr) 5. CTX/Κρεατινίνη (CTX/Cr) 6. NTX/Κρεατινίνη (NTX/Cr)

**Πίνακας 1. Βιοχημικοί δείκτες οστικής εναλλαγής (ΒΔΟΕ).**

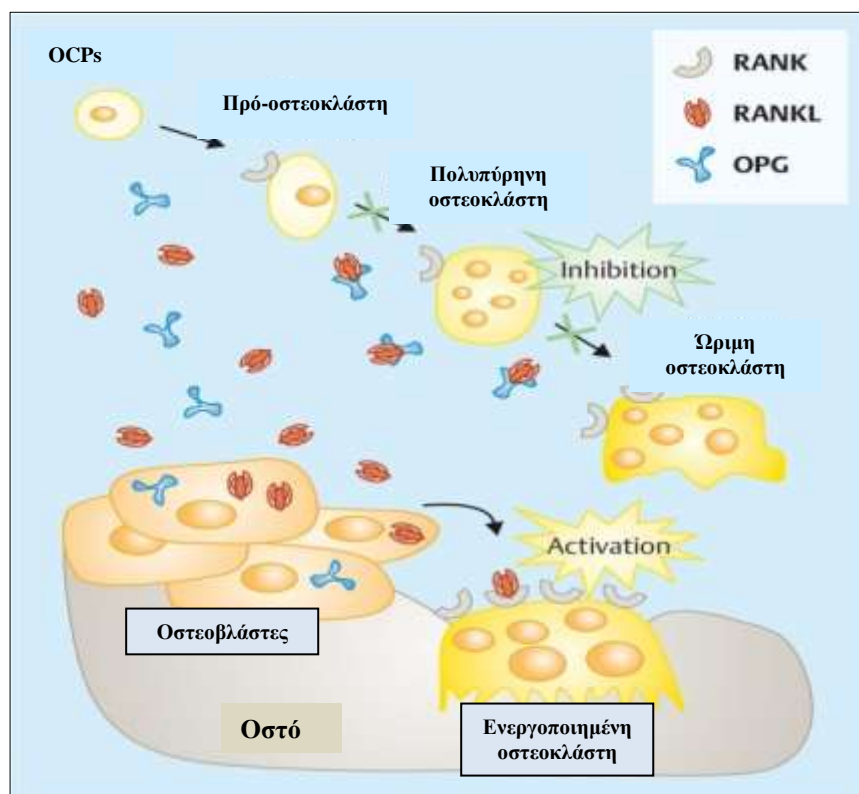
Οι ενδεικτικοί της οστικής παραγωγής βιοχημικοί δείκτες παρατίθενται στην αριστερή στήλη και οι ενδεικτικοί οστικής απορρόφησης στη δεξιά στήλη. Οι δείκτες οστικής απορρόφησης διαχωρίζονται περαιτέρω ανάλογα με τον προσδιορισμό τους στο αίμα ή στα ούρα.

*Πηγή: Τροποποίηση από: Λυρίτης ΓΠ, Μεταβολικά Νοσήματα των οστών. 4<sup>η</sup> Έκδοση.<sup>3</sup>*

**ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ OPG/RANKL/RANK:** Η αναγνώριση του συγκεκριμένου συστήματος από τον Kohls S. στα μέσα της δεκαετίας του 1990 ως του κυρίαρχου τελικού ρυθμιστή της οστεοκλαστογένεσης, αποτέλεσε ένα κομβικό σημείο στη βιολογία των οστών για την κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν τον οστικό μεταβολισμό. Πρόκειται για ένα σύστημα κυτταροκινών (Εικόνα 3), που απαρτίζεται από τρία βασικά πρωτεϊνικά μόρια: **(α)** Την οστεοπροτεγερίνη (Osteoprotegerin, OPG) που θεωρείται ως το μοναδικό διαλυτό, μη μεμβρανικό μέλος της υπερ-οικογένειας των υποδοχέων TNF και η οποία στα οστά συντίθεται και εκκρίνεται από τα κύτταρα της οστεοβλαστικής σειράς. **(β)** Τον υποδοχέα που ενεργοποιεί τον πυρηνικό παράγοντα κΒ (Receptor Activator of Nuclear Factor κB, RANK), ο οποίος

είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη που ανήκει επίσης στην υπερ-οικογένεια των υποδοχέων TNF και εκφράζεται κυρίως σε κύτταρα της σειράς των μονοκύτταρων/μακροφάγων που περιλαμβάνουν και τα προγονικά κύτταρα των οστεοκλαστών (OCPs). (γ) Το συνδέτη του υποδοχέα που ενεργοποιεί τον πυρηνικό παράγοντα κB (Receptor Activator of Nuclear Factor κB Ligand, RANKL), ένα πεπτίδιο το οποίο βρίσκεται είτε συνδεδεμένο με την κυτταρική μεμβράνη ως μεμβρανική πρωτεΐνη τύπου-II, είτε απαντάται ως διαλυτή πρωτεΐνη που προκύπτει μέσω απόσπασης από την προηγούμενη μορφή. Στα οστά εκφράζεται στα κύτταρα της οστεοβλαστικής σειράς.<sup>9-11</sup>

Είναι γεγονός ότι κατά τα τελευταία χρόνια οι γνώσεις μας για τον οστικό μεταβολισμό έχουν εμπλουτιστεί σημαντικά. Στα πλαίσια αυτά έχει καταστεί σαφές ότι η ισορροπία μεταξύ οστικής απορρόφησης και οστικής παραγωγής εξασφαλίζεται σε μεγάλο βαθμό με μηχανισμούς και μονοπάτια μέσω των οποίων τα πρόδρομα κύτταρα των οστεοβλαστών και τα κύτταρα του στρώματος των οστών ελέγχουν το αρχικό βήμα της οστικής ανακατασκευής, που δεν είναι άλλο από την ανάπτυξη και ενεργοποίηση των οστεοκλαστών. Πιο αναλυτικά, η σύνδεση του RANKL - που βρίσκεται στην επιφάνεια των κυττάρων της οστεοβλαστικής σειράς ή απελευθερώνεται από αυτά - με το RANK των OCP's, προάγει (i) τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των τελευταίων προς ώριμες, πολυπύρηνες οστεοκλάστες, (ii) την ενεργοποίηση αυτών των οστεοκλαστών και (iii) την αναστολή της απόπτωσής τους. Με τον τρόπο αυτό ευοδώνεται η οστεοκλαστογένεση, επιτείνεται η οστεοκλαστική δραστηριότητα και προάγεται η απορρόφηση του οστού. Ως αντιρρόπηση στις επιδράσεις αυτές, η εκκρινόμενη από τα πρόδρομα κύτταρα των οστεοβλαστών OPG συνδέεται με το RANKL, παρεμποδίζει τη σύνδεσή του στο RANK και αναστέλλει τις ως άνω διεργασίες, περιορίζοντας τελικά την υπερβολική οστική απορρόφηση (Εικόνα 3).<sup>9,10</sup> Τονίζεται βεβαίως ότι η συγκεκριμένη περιγραφή της λειτουργίας του συστήματος OPG-RANKL-RANK είναι ουσιαστικά ιδιαίτερα απλουστευμένη, καθώς όλο το σύστημα βρίσκεται υπό την περαιτέρω επίδραση κυτταροκινών και ορμονών που ελέγχουν τα επιμέρους σημεία.<sup>9,12,13</sup>



**Εικόνα 3. Φυσιολογική λειτουργία του συστήματος RANKL/RANK/OPG.**

Η σύνδεση του RANKL, που εκκρίνεται από τα κύτταρα της οστεοβλαστικής σειράς ή βρίσκεται προσκολλημένος πάνω σε αυτά, με τον υποδοχέα RANK των πρόδρομων κυττάρων των οστεοκλαστών, προάγει την οστεοκλαστογένεση, αναστέλλει την απόπτωση και ενισχύει τη δραστηριότητα των οστεοκλαστών, ευοδώνοντας τελικά την οστική απορρόφηση. Αντιροποιστικά, η εκκρινόμενη από κύτταρα της οστεοβλαστικής σειράς OPG συνδέεται με το RANKL, παρεμποδίζει τη σύνδεσή του στο RANK και αναστέλλει τις ως άνω διεργασίες. OCPs: Προγονικά κύτταρα οστεοκλαστών. RANK: Υποδοχέας που ενεργοποιεί τον πυρηνικό παράγοντα κΒ RANKL: Συνδέτης του υποδοχέα που ενεργοποιεί τον πυρηνικό παράγοντα κΒ, OPG: Οστεοπροτεγερίνη. Inhibition: Αναστολή. Activation: Ενεργοποίηση.

Πηγή: Τροποποίηση από: Ney JT et al. *Geburtsh Frauenheilk* 2012;72(5):385-91.<sup>14</sup>

Εξαιτίας του θεμελιώδους ρόλου που κατέχει στη φυσιολογία του οστικού μεταβολισμού, το σύστημα OPG/RANKL/RANK εμπλέκεται κατ' επέκταση και στην παθογένεση πολλών οστικών νοσημάτων. Πιο συγκεκριμένα, ποικίλες διαταραχές κυτταροκινών ή ορμονών, αλλαγές στη μηχανική φόρτιση του σκελετού, καθώς και η δράση διαφόρων πρωτεϊνών και φαρμάκων μπορούν να κινητοποιήσουν μηχανισμούς

μέσω των οποίων προκαλείται αποσταθεροποίηση του συστήματος και εκτροπή από την ισορροπία του μέσω μεταβολής της αναλογίας RANKL/OPG. Η εκτροπή του συγκεκριμένου λόγου από το φυσιολογικό οδηγεί με τη σειρά της σε διαταραχή της οστικής ανακατασκευής, όπως για παράδειγμα συμβαίνει τόσο στη μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση όσο και στην οστική νόσο της β-θαλασσαιμίας, καταστάσεις όπου αυξάνεται υπερβολικά η οστική απορρόφηση.<sup>9,15</sup> Τονίζεται ιδιαίτερα το γεγονός ότι και στις δύο αυτές παθολογικές οντότητες παρατηρείται σημαντική αύξηση του παράγοντα RANKL, με ταυτόχρονη σταθεροποίηση (και σπανιότερα ελάττωση) των επιπέδων της OPG. Ειδικά όσον αφορά στην ομόζυγο β-θαλασσαιμία η συγκεκριμένη διαταραχή είναι ιδιαίτερα έντονη, με αποτέλεσμα να παρατηρείται υπέρμετρη αύξηση του λόγου RANKL/OPG. Για το λόγο αυτό η συμμετοχή της συγκεκριμένης δυσλειτουργίας θεωρείται σήμερα ως ένας από τους πλέον κομβικούς παθογενετικούς μηχανισμούς της ανάπτυξης της οστικής νόσου που χαρακτηρίζει την αιματολογική αυτή νόσο.<sup>16,17</sup>

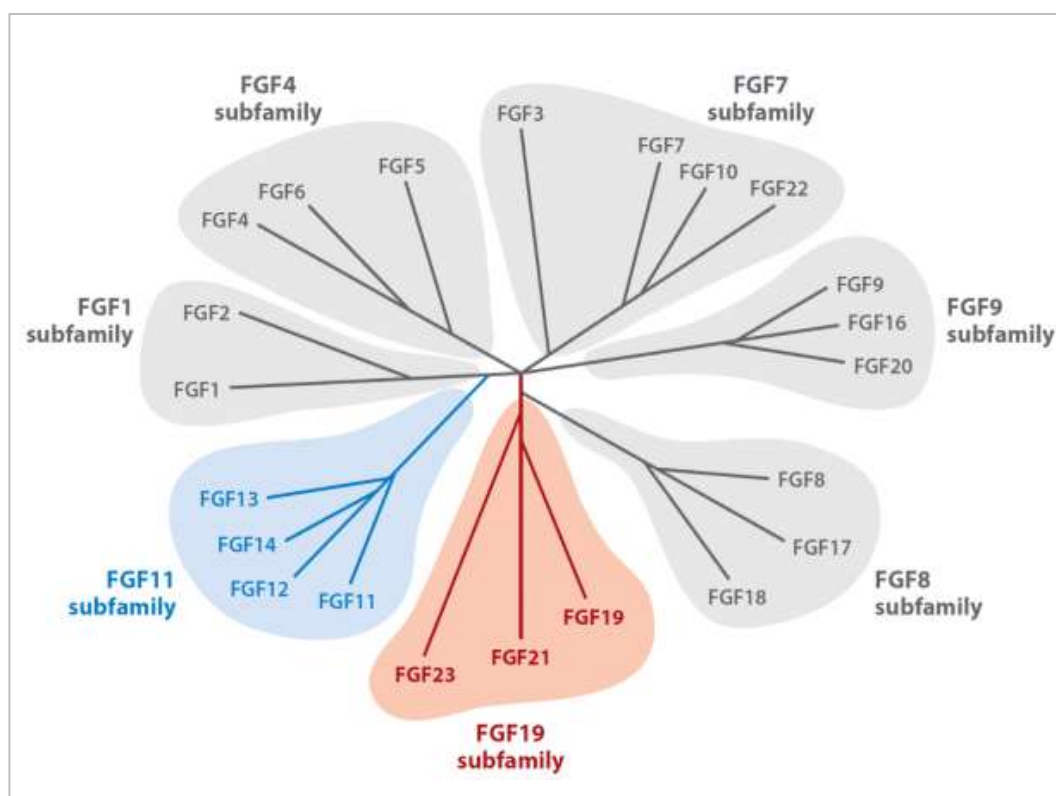
### 1.3. Φωσφατονίνες και αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών 23 (FGF23)

ΦΩΣΦΑΤΟΝΙΝΕΣ: Με τον όρο «φωσφατονίνες» περιγράφεται μία ευρεία ομάδα πεπτιδίων τα οποία κυκλοφορούν στο πλάσμα και επηρεάζουν άμεσα τη συγκέντρωση του P στο αίμα, αυξάνοντας την αποβολή του μετάλλου στα ούρα και ρυθμίζοντας έτσι την ομοιοστασία του, ανεξάρτητα από τα υπόλοιπα ορμονικά συστήματα. Τέσσερις είναι οι βασικές φωσφατονίνες που έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα: Ο **FGF23**, ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών 7 (Fibroblast Growth Factor-7, **FGF7**), η σχετική με φριζάρισμα πρωτεΐνη-4 (Frizzled Related Protein 4, **FRP4**) και η εξωκυττάρια φωσφογλυκοπρωτεΐνη της θεμέλιας ουσίας (Matrix Extracellular Phosphoglyco-protein, **MEPE**). Από αυτές, οι FGF23 και sFRP-4 ασκούν εκτός από τη φωσφατουρική τους δράση και ανασταλτικές επιδράσεις στο ένζυμο 1α-υδροξυλάση.<sup>18</sup>

ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΤΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ: Η υπερ-οικογένεια των αυξητικών παραγόντων των ινοβλαστών (FGFs) στον άνθρωπο αποτελείται από 22 συνολικά πεπτίδια με πλειοτροπικές δράσεις, τα οποία ομαδοποιούνται περαιτέρω σε επτά (7) υπο-οικογένειες, τις FGF-1, FGF-4, FGF-7, FGF-8, FGF-9, FGF-11 και FGF-19 (Εικόνα 4.) Τα πεπτίδια των υπο-οικογενειών FGF-1, FGF-4, FGF-7, FGF-8 και FGF-9 δεσμεύονται στους υποδοχείς των FGFs, τους FGFR (Fibroblast Growth



Factors Receptors), ασκώντας παρακρινείς και αυτοκρινείς δράσεις. Αναφορικά με τη δομή τους, φέρουν μία περιοχή σύνδεσης πλούσια σε ηπαρίνη, η οποία διευκολύνει την προσκόλληση στην κυτταρική επιφάνεια και στη συνέχεια βοηθά τη σύνδεσή τους στους FGFR. Οι παράγοντες FGF19, FGF21 και FGF23 ασκούν ενδοκρινείς δράσεις δεσμευόμενες επίσης στους FGFR. Επειδή δε φέρουν την ως άνω ηπαρινική περιοχή στο μόριό τους απελευθερώνονται πιο εύκολα στην κυκλοφορία, η δε σύνδεσή τους με τους FGFR γίνεται με τη βοήθεια ενός άλλου μορίου, της πρωτεΐνης Klotho, που θα εξετάσουμε στη συνέχεια. Τέλος, τα πεπτίδια της υπο-οικογένειας FGF-11 δε συνδέονται στον υποδοχέα των FGFs και λειτουργούν ως ενδοκυττάριοι διαμεσολαβητές.<sup>19,20</sup>

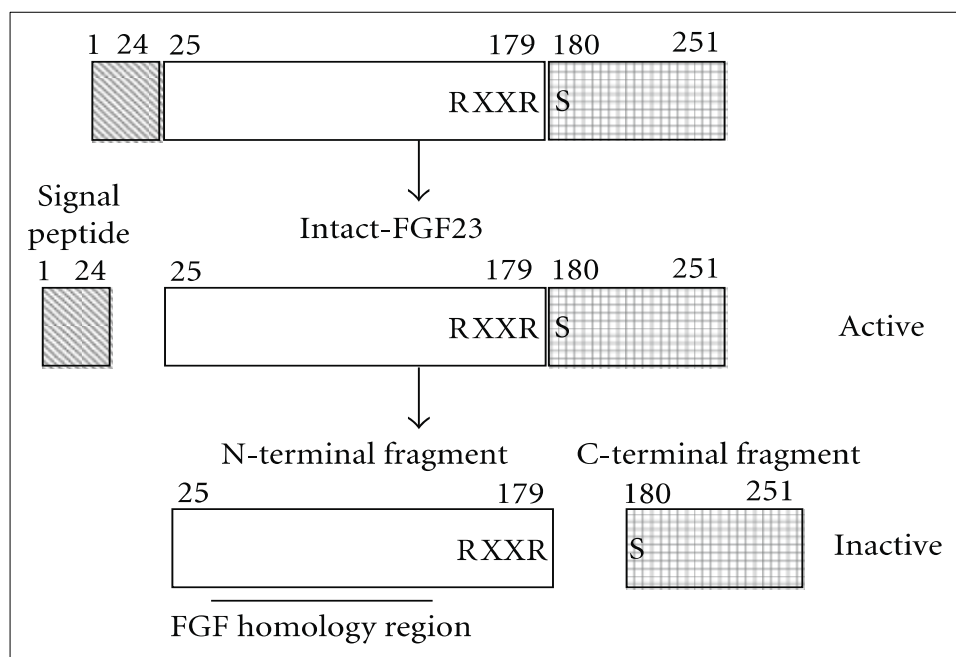


**Εικόνα 4.** Η υπερ-οικογένεια των αυξητικών παραγόντων των ινοβλαστών (FGFs). Στη συγκεκριμένη εικόνα απεικονίζεται αναλυτικά το σύνολο των αυξητικών παραγόντων των ινοβλαστών (22 πεπτιδικά μόρια) και οι επτά υπο-οικογένειες (subfamilies) στις οποίες ανήκουν.

*Πηγή: Hu MC et al. Annu Rev Physiol. 2013;75:503–33.<sup>19</sup>*

ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΤΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ 23: Ο FGF23 κλωνοποιήθηκε για πρώτη φορά το 2000 και μέχρι και την επόμενη χρονιά, διαταραχές της λειτουργίας του συσχετίστηκαν με την ανάπτυξη της κληρονομούμενης με τον αυτοσωματικό επικρατούντα τύπο υποφωσφοραιμικής ραχίτιδας (Autosomal Dominant Hypophosphatemic Rickets, ADHR) και της ογκογενούς οστεομαλακίας (Tumor Induced Osteomalacia, TIO), με υποφωσφοραιμικές δηλαδή παθολογικές καταστάσεις που οφείλονται σε προβληματική νεφρική επαναρρόφηση P.<sup>21</sup> Αναφορικά με τη δομή του, ο FGF23 είναι μία γλυκοπρωτεΐνη 32-kDa που αποτελείται από 251 αμινοξέα. Κωδικοποιείται από το γονίδιο FGF23 που εδράζεται στην περιοχή 12p13 του χρωμοσώματος 12 και αποτελείται από (α) μία υδρόφοβη περιοχή 24 αμινοξέων, (β) μια αμινοτελική περιοχή 154 αμινοξέων με ομολογία για τους FGFs και (γ) μία καρβοξυτελική περιοχή 73 αμινοξέων η οποία θεωρείται μοναδική για τον FGF23 και είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση του μορίου με το σύστημα FGFR-Klotho.

Το ώριμο μόριο που εκκρίνεται στην κυκλοφορία είναι το <sup>25</sup>-FGF23<sup>-251</sup>, το οποίο - όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 5 - προκύπτει μετά από αποκοπή της υδρόφοβης περιοχής των 24 αμινοξέων και συνακόλουθη Ο-γλυκοζυλίωση από το ένζυμο UDP-N-Acetyl-alpha-D-Galactosamine:polypeptide N-Acetylgalactosaminyl-Transferase-3 (GALNT3). Η γλυκοζυλίωση αυτή κατέχει σημαντικό ρόλο, καθώς αποτρέπει την περαιτέρω πρωτεολυτική διάσπαση του δραστικού πλέον μορίου από διαφόρων τύπων πρωτεάσες, όπως είναι η φουρίνη και άλλες που δεν έχουν ακόμη αναγνωριστεί απόλυτα. Η συγκεκριμένη διάσπαση, εφόσον λάβει χώρα, επισυμβαίνει στη θέση <sup>179</sup>Arg-<sup>180</sup>Ser, οπότε και προκύπτουν δύο αδρανή θραύσματα, ένα αμινοτελικό (N-FGF23) και ένα καρβοξυτελικό (C-FGF23) (Εικόνα 5). Σημειώνεται ότι τα καρβοξυτελικά θραύσματα ανταγωνίζονται με το ακέραιο κυκλοφορούν μόριο του δραστικού FGF23 τη σύνδεση στους υποδοχείς FGFR, με αποτέλεσμα να λειτουργούν ως συναγωνιστικοί αναστολείς του συστήματος.<sup>19-22</sup>



**Εικόνα 5. Η δομή του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (FGF23).**

Διακρίνεται το ακέραιο μόριο και τα θραύσματα αυτού, μετά από πρωτεολυτική διάσπαση στη θέση  $^{179}\text{Arg}-^{180}\text{Ser}$ . Intact-FGF23: Ακέραιο/δραστικό μόριο του FGF23, N-terminal fragment: Αμινοτελικό/μη-δραστικό θραύσμα, C-terminal fragment: Καρβοξυτελικό/μη-δραστικό θραύσμα. Signal peptide: Πεπτίδιο σηματοδότησης, Active: Ενεργό, Inactive: Ανενεργό, FGF homology region: Περιοχή με ομολογία για τους FGFs.

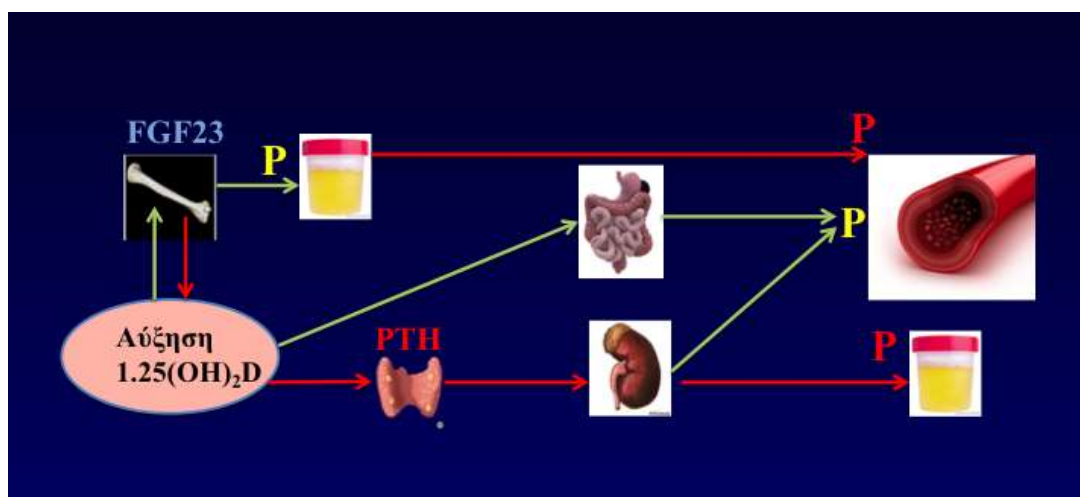
*Πηγή: Saito T et al. Int. J Pediatr Endocrinol 2009;(1):496514.<sup>23</sup>*

Τα οστά αποτελούν τη βασική πηγή προέλευσης του FGF23, καθώς η πρωτεΐνη εκκρίνεται κυρίως από τα οστεοκύτταρα και τα κύτταρα της οστεοβλαστικής σειράς. Σε σημαντικά μικρότερες ποσότητες έχει διαπιστωθεί ότι παράγεται και σε άλλα όργανα, όπως είναι οι σιελογόνοι αδένες, ο στόμαχος, οι γραμμωτοί μύες, η καρδιά, ο εγκέφαλος, ο μαζικός αδένας και το ήπαρ. Όπως θα παρουσιαστεί αναλυτικότερα και στη συνέχεια (κεφάλαιο 1.6), η κύρια δράση του μορίου ασκείται στο νεφρό, όπου μέσω μείωσης της έκφρασης των συµμεταφορέων NaPiIIa και NaPiIIc οδηγεί σε ελάττωση της επαναρρόφησης του P και τελικά σε φωσφατουρία. Επιπλέον ιστούς-στόχους του FGF23 αποτελούν οι παραθυρεοειδείς αδένες, η υπόφυση και το χοριοειδές πλέγμα του εγκεφάλου. Σημειώνεται ότι το ακέραιο δραστικό μόριο μετά την έκκρισή του στην κυκλοφορία διαθέτει χρόνο ημίσειας ζωής 46-58 λεπτά.<sup>19-22</sup>

- **Ρύθμιση της έκκρισης του FGF23:** Η έκκριση του FGF23 στα οστά ρυθμίζεται τόσο από συστηματικούς όσο και από τοπικούς παράγοντες. Αμέσως παρακάτω αναφέρονται τα μέχρι σήμερα γνωστά μόρια και οι καταστάσεις που εμπλέκονται στην όλη διαδικασία.

I. ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ:

**(α) Καλσιτριόλη.** Η  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  αποτελεί τον πιο σημαντικό συστηματικό ρυθμιστικό παράγοντα της σύνθεσης και έκκρισης του FGF23. Έχει τη δυνατότητα να διεγείρει την παραγωγή και την έκκρισή του (i) με άμεση δράση μετά από σύνδεσή της στον υποδοχέα της (Vitamin-D Receptor, VDR), (ii) με άμεση δράση που διαμεσολαβείται ανεξαρτήτως του VDR και (iii) με έμμεση δράση στα κύτταρα των οστών, όπου καταστέλλει τα επίπεδα του αγγελιαφόρου RNA μίας τοπικής διαμεμβρανικής ενδοπεπτιδάσης (PHEX-mRNA), η οποία όπως θα δούμε στη συνέχεια αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή της έκκρισης του FGF23. Γενικότερα, η εξυπηρετούμενη από την καλσιτριόλη αύξηση του FGF23 χρησιμεύει ως ρυθμιστικό ορμονικό σύστημα για την ενίσχυση της νεφρικής κάθαρσης του P σε περιπτώσεις αυξημένης εντερικής απορρόφησης του μετάλλου από την έντονη δράση της βιταμίνης D. Εξάλλου, αυξημένη δράση της  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  επιφέρει και ελάττωση των επιπέδων της PTH, άρα μείωση της νεφρικής απέκκρισης του P, η οποία όμως αντισταθμίζεται και εξισορροπείται από την αύξηση του FGF23 και της φωσφατουρικής του δράσης (Εικόνα 6).<sup>19-21</sup>

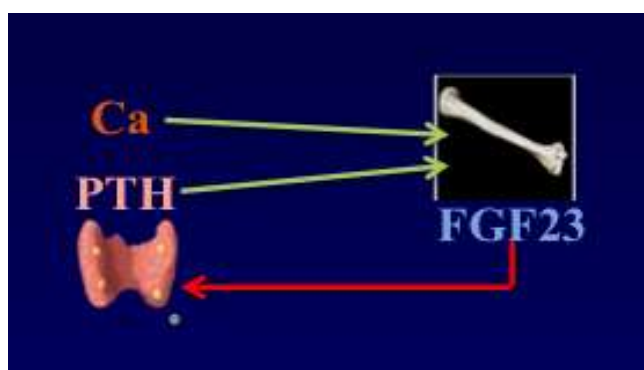


**Εικόνα 6. Καλσιτριόλη και FGF23.**

Η  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  προάγει (πράσινα βέλη) την έκκριση του FGF23 από τα οστά και την απορρόφηση φωσφόρου από το ΓΕΣ, ενώ αντίθετα καταστέλλει (κόκκινα βέλη) την

έκφραση και έκκριση της PTH από τους παραθυρεοειδείς αδένες. Επίσης, ο FGF23 ελαττώνει την παραγωγή της 1,25(OH)<sub>2</sub>D. Καθώς ο FGF23 και η PTH διαθέτουν κατ' εξοχήν φωσφατουρική δράση μειώνοντας τα επίπεδα του φωσφόρου στην κυκλοφορία, οι ως άνω επιδράσεις της καλσιτριόλης δρουν εξισορροπητικά στο συγκεκριμένο σύστημα, διατηρώντας τη φυσιολογική ομοιοστασία του P.

**(β) Φωσφόρος.** Έχει καταδειχτεί ότι η αυξημένη διατροφική πρόσληψη P αυξάνει τα επίπεδα του FGF23 με ασαφή μέχρι στιγμής μηχανισμό. Σε μικρότερο βαθμό, αυξήσεις των επιπέδων του P στο αίμα επιφέρουν ηπιότερες αυξήσεις των συγκεντρώσεων του FGF23. Αντίθετες δράσεις λαμβάνουν χώρα σε περιπτώσεις ελάττωσης της πρόσληψης ή/και των επιπέδων του P. Τέλος, σημειώνεται ότι σε οξεία ενδοφλέβια έγχυση P η έκκριση του FGF23 παραμένει ανεπηρέαστη.<sup>19-21</sup>



**Εικόνα 7.** Αλληλεπιδράσεις μεταξύ ασβεστίου (Ca), παραθορμόνης (PTH) και FGF23. Τα πράσινα βέλη υποδεικνύουν ευοδωτικές και τα κόκκινα ανασταλτικές επιδράσεις.

**(γ) PTH και Ασβέστιο.** Η αύξηση των επιπέδων της PTH, η αυξημένη διατροφική πρόσληψη Ca και η αύξηση των επιπέδων Ca στο αίμα οδηγούν σε αύξηση της παραγωγής και έκκρισης του FGF23 στα οστά. Το αντίθετο ακριβώς συμβαίνει σε μειώσεις της PTH και του Ca (Εικόνα 7). Ο ακριβής μηχανισμός για τα ανωτέρω δεν είναι απόλυτα σαφής, είναι όμως αρκετά πιθανό να εμπλέκονται μονοπάτια που ενεργοποιούνται από την 1,25(OH)<sub>2</sub>D και τον VDR. Ιδιαίτερης προσοχής χρήζει το γεγονός ότι η συνεχής χορήγηση PTH - που έχει ως αποτέλεσμα τη διέγερση της οστικής απορρόφησης - οδηγεί σε αύξηση του FGF23, κάτι που έχει πρακτική σημασία καθώς πρέπει να απομακρυνθεί ο P που προέρχεται από το καταβολιζόμενο

οστό. Αντίθετα, η διακεκομμένη χορήγηση PTH που ευνοεί τον οστικό σχηματισμό, οδηγεί σε μείωση του FGF23 και έτσι ο P διατηρείται για την αύξηση του οστού. Τέλος, σημειώνεται ότι η οποιαδήποτε αύξηση του FGF23 θα οδηγήσει μέσω παλίνδρομης ρύθμισης σε ελάττωση της έκκρισης PTH στους παραθυρεοειδείς αδένες, με σκοπό την εξισορρόπηση του συστήματος ως προς την απώλεια φωσφόρου.<sup>19-21,24,25</sup>

**(δ) Σίδηρος.** Έχει πλέον αποδειχτεί μέσα από ένα σημαντικό αριθμό μελετών ότι η ενδοφλέβια χορήγηση σιδήρου οδηγεί σε αύξηση της έκκρισης και των συγκεντρώσεων του FGF23 στον ορό. Οι κύριοι μηχανισμοί που κινητοποιούνται για να συμβεί αυτό είναι (i) η καταστολή της ενδοπεπτιδάσης PHEX στα οστά, (ii) η σιδηροεξαρτώμενη αναστολή της δράσης των φουρινών οι οποίες διασπών το δραστικό ακέραιο μόριο του FGF23 (iFGF23) και (iii) η διέγερση της δράσης του ενζύμου GALNT3 που ευοδώνει την Ο-γλυκοζυλίωση η οποία σταθεροποιεί το μόριο του FGF23. Σε άλλες μελέτες, χαμηλές συγκεντρώσεις σιδήρου τόσο σε κυτταρικές καλλιέργειες όσο και σε υγιείς πληθυσμούς έχουν συσχετισθεί με αυξημένα επίπεδα του καρβοξυτελικού θραύσματος του FGF23 (C-FGF23). Πιθανολογείται ότι και η ανεπάρκεια σιδήρου μπορεί να αυξάνει την παραγωγή του C-FGF23, όχι όμως και την κυκλοφορούσα ποσότητα του iFGF23, καθώς σε αυτές τις καταστάσεις φαίνεται να ενισχύεται η δράση των φουρινών που διασπών το δραστικό ακέραιο μόριο σε ανενεργά θραύσματα εντός των οστεοκυττάρων.<sup>20-22,26-31</sup>

**(ε) Λοιποί συστηματικοί παράγοντες.** Η λεπτίνη, τα οιστρογόνα, η κορτιζόλη και η μεταβολική οξέωση φαίνεται ότι εμπλέκονται στους μηχανισμούς ρύθμισης της έκκρισης του FGF23 στα οστά, ευοδώνοντάς τη. Παρόλα αυτά, δεν υπάρχουν ακόμη απόλυτα ξεκάθαρα δεδομένα για τις συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις, τόσο σε επίπεδο κλινικής σημαντικότητας όσο και σε επίπεδο μηχανισμών.<sup>20,21,24</sup>

## II. ΤΟΠΙΚΟΙ ΟΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ:

**(α) X-Σχετιζόμενη Ενδοπεπτιδάση που ρυθμίζει το φωσφόρο (Phosphate-regulating neutral Endopeptidase X-linked, PHEX).** Αδρανοποιητικές μεταλλάξεις του γονιδίου PheX που εδράζεται στο χρωμόσωμα-X και αφορούν στην έκφραση της ενδοπεπτιδάσης PHEX, διεγείρουν τη μεταγραφή του FGF23 μέσω ενός μάλλον έμμεσου και ακόμη ασαφούς μηχανισμού. Σημειώνεται ότι η PHEX εκφράζεται σε επίπεδο σκελετού κυρίως στους οστεοβλάστες και στα οστεοκύτταρα.<sup>19-21</sup>

**(β)** Πρωτεΐνη της θεμέλιας ουσίας της Οδοντίνης-1 (Dentin matrix acidic phosphoprotein-1 X-linked, **DMP1**). Αδρανοποιητικές μεταλλάξεις του γονιδίου *Dmp1* που κωδικοποιεί τη **DMP1** ευοδώνουν την έκφραση του **FGF23**, επίσης με έμμεσους μηχανισμούς που παραμένουν εν πολλοίς άγνωστοι. Όπως και η **PHEX**, η **DMP1** εκφράζεται στα οστά στους οστεοβλάστες και στα οστεοκύτταρα και σχετίζεται κυρίως με τη μετάλλωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας.<sup>19-21</sup>

**(γ)** Ενεργοποίηση **μονοπατιών FGF/FGFR**. Η ενεργοποίηση διαφόρων μονοπατιών **FGF/FGFR** φαίνεται ότι μπορεί να επηρεάσει σε τοπικό επίπεδο την έκκριση του **FGF23** από τα οστικά κύτταρα, αλλά η λειτουργική σημασία του φαινομένου παραμένει ασαφής. Η ενεργοποίηση αυτών των μονοπατιών μπορεί να ευοδωθεί (i) από άλλες φωσφατονίνες (**FGF1**, **FGF2** κ.α.), (ii) από άλλου τύπου πρωτεΐνες (διαλυτό κλάσμα της πρωτεΐνης **Klotho**, σύμπλεγμα **FGF1/α<sub>v</sub>β<sub>3</sub>-Ιντεγκρινών** κ.α.) και (iii) μέσω ενδοκυτταρίων ρυθμιστικών μηχανισμών (όπως για παράδειγμα μέσω διέγερσης του γονιδίου **COL1A1** από τον ενδοκυττάριο πυρηνικό παράγοντα **HMW-FGF2**, η οποία εκτός των άλλων φαίνεται να διεγείρει και την αύξηση της έκκρισης του **FGF23**.)<sup>19-21</sup>

**(δ)** Έμμεση επίδραση από **άλλες φωσφατονίνες**, μέσω κοινών μονοπατιών δράσης. Ως χαρακτηριστικά παραδείγματα αναφέρονται η αναστολή της **PHEX** από τη δράση της **MEPE** και ο συναγωνισμός του διαλυτού κλάσματος του **FRP-4** (**sFRP-4**) με τη **DMP1** για το κοινό τους υπόστρωμα, την οστική μορφογενετική πρωτεΐνη-1 (**Bone Morphogenetic Protein-1**, **BMP1**).<sup>19-21</sup>

**(ε)** Μεταβολές στη **μετάλλωση** των οστών. Χαμηλός ρυθμός επιμετάλλωσης οδηγεί σε αύξηση του **FGF23** και το αντίθετο.<sup>19-21</sup>

**(στ.)** Μεταβολές στην ένταση και στο ρυθμό της **οστικής εναλλαγής**. Ο χαμηλός ρυθμός οστικής εναλλαγής ευοδώνει την έκκριση του **FGF23** στα οστά, ενώ ο υψηλός ρυθμός την ελαττώνει.<sup>19-21,31</sup>

#### **1.4. Οι υποδοχείς FGFR**

Οι υποδοχείς **FGFR** ανήκουν στους μεμβρανικούς υποδοχείς του τύπου της τυροσινικής κινάσης. Μετά τη σύνδεσή τους με τους **FGFs** προκαλείται ενεργοποίηση του σηματοδοτικού καταρράκτη **MAPK** (**Mitogen-Activated Protein**

Kinase) με την περαιτέρω συμμετοχή μίας μεγάλης ποικιλίας ενδοκυτταρίων πρωτεϊνών σηματοδότησης όπως είναι οι FRS2 (Fibroblast growth factor receptor substrate-2), Gab1 (GRB2-associated-binding protein-1), Shc (SHC-transforming proteins), PLC (Phospholipase-C) και STAT1 (Signal Transducer and Activator of Transcription-1). Σήμερα αναγνωρίζονται τέσσερις διαφορετικοί τύποι των υποδοχέων αυτών - οι FGFR1 έως FGFR4 - με περαιτέρω ισομορφές. Η κύρια δράση του FGF23 στο νεφρό διαμεσολαβείται κυρίως μέσω της ισομορφής FGFR1c και δευτερευόντως μέσω των FGFR3c και FGFR4. Βασική προϋπόθεση για την επαρκή σύνδεση και προώθηση του σήματος του FGF23 είναι η τοπική παρουσία της πρωτεΐνης Klotho. Μάλιστα, η μέγιστη αποτελεσματική σηματοδότηση φαίνεται να λαμβάνει χώρα μέσω του συμπλέγματος FGF23-FGFR1c-αKlotho.<sup>19,20,22</sup>

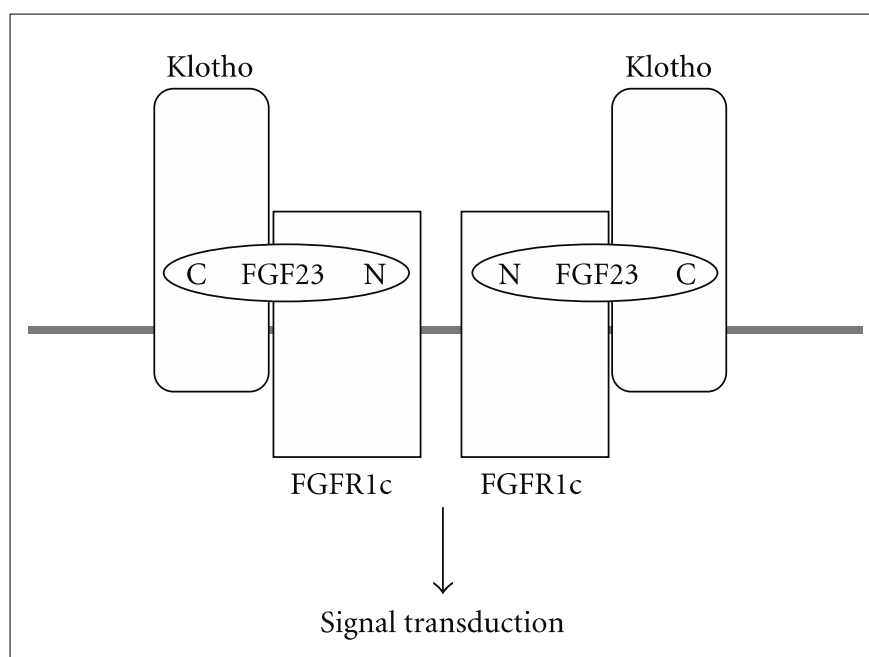
### 1.5. Πρωτεΐνη Klotho

Η πρωτεΐνη “Klotho” λαμβάνει το όνομά της από την αρχαία ελληνική μυθολογία. Κλωθώ ονομαζόταν η πρώτη από τις τρεις Μοίρες, κόρες του Δία που καθόριζαν τις ζωές των ανθρώπων και ήταν επιφορτισμένη με το να «κλώθει» και να γνέθει το νήμα της ζωής. Οι υπόλοιπες δύο ήταν η Λάχεσις που ξετύλιγε το νήμα καθορίζοντας το τι θα συμβεί (τι «θα λάχει») στον καθένα και η Άτροπος, η οποία το έκοβε όταν ερχόταν η ώρα του θανάτου.<sup>33</sup> Ο λόγος που το όνομα της πρωτεΐνης ταυτίστηκε με εκείνο της συγκεκριμένης Μοίρας, είναι το γεγονός ότι οι διάφορες ισομορφές του μορίου της Klotho έχουν συσχετισθεί έντονα με τις διαδικασίες γήρανσης στα θηλαστικά.

Η οικογένεια της Klotho απαρτίζεται από τρία μέλη, τις α-, β- και γ- πρωτεΐνες Klotho. Το πρωτεϊνικό της μόριο στον άνθρωπο αποτελείται από 1.012 αμινοξέα και κωδικοποιείται από το γονίδιο Klotho (KL) που βρίσκεται στη θέση 13q12 του χρωμοσώματος 13. Κύρια περιοχή έκφρασης του μορίου αποτελούν τα άπω εσπειραμένα νεφρικά σωληνάκια. Δευτερευόντως, η Klotho εκφράζεται στους παραθυρεοειδείς αδένες και στο χοριοειδές πλέγμα του εγκεφάλου, ενώ σε ακόμη χαμηλότερα επίπεδα φαίνεται να εκφράζεται στα εγγύς εσπειραμένα σωληνάκια, στην υπόφυση, στον πλακούντα, στους γραμμωτούς μύες, στην ουροδόχο κύστη, στο πάγκρεας, στους όρχεις και στις ωοθήκες.<sup>19,21,34</sup> Από άποψη δομής και λειτουργίας, και τα τρία μέλη της οικογενείας της Klotho ανήκουν στις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες απλής διόδου (τύπου-I), εμφανίζοντας μία πολύ μικρή



ενδοκυττάρια περιοχή 10 αμινοξέων χωρίς ταυτοποιημένη δραστικότητα. Αναφορικά με την εξωκυττάρια περιοχή, αυτή απαρτίζεται από δύο επαναλαμβανόμενες περιοχές β-γλυκοσιδάσης (KL1 και KL2 domains) και είναι εκείνη που διαμεσολαβεί την ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ FGF23 και FGFR, με αποτέλεσμα η σύνδεση των δύο συγκεκριμένων μορίων να επιτυγχάνεται με πολύ υψηλότερη συγγένεια επί παρουσίας της Klotho, από ότι συμβαίνει επί απουσίας της (Εικόνα 8). Πρακτικά λοιπόν, από τη στιγμή που οι FGFRs βρίσκονται σχεδόν παντού στον οργανισμό, η παρουσία της α-Klotho είναι αυτή που καθορίζει τα βασικά όργανα-στόχους του FGF23.<sup>21,34</sup>



**Εικόνα 8: Σχηματική αλληλεπίδραση μεταξύ FGF23, Klotho και FGFR.**

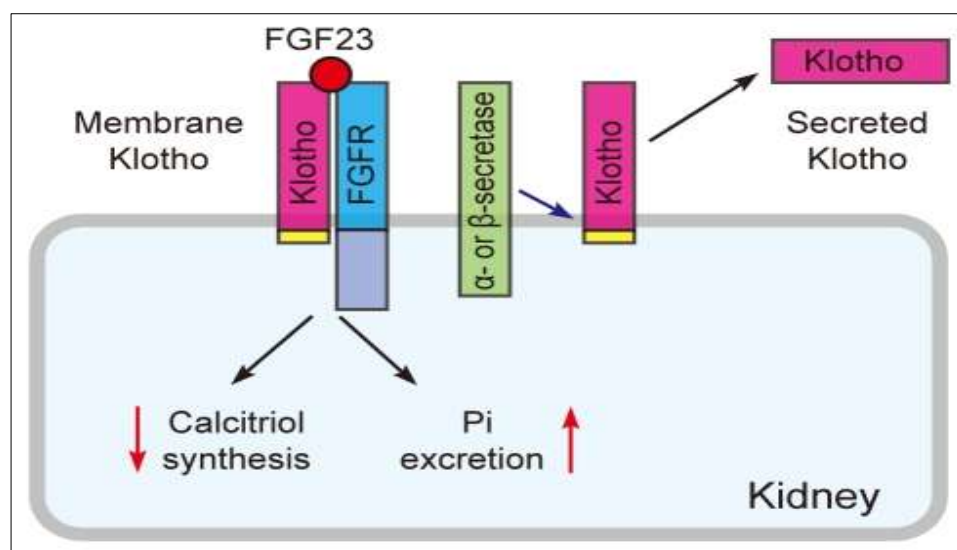
Ο FGF23 μαζί με τον υποδοχέα του FGFRc και την πρωτεΐνη Klotho δημιουργούν ετεροτριμερή πρωτεϊνικά συμπλέγματα. Οι σύμπλοκες αυτές ενεργοποιούν στη συνέχεια ισχυρά τα ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία θα διαμεσολαβήσουν τις δράσεις του FGF23 στα κύτταρα των οργάνων-στόχων. N:Αμινοτελικό άκρο του παράγοντα FGF23, C:Καρβοξυτελικό άκρο του παράγοντα FGF23. Klotho: Πρωτεΐνη Klotho, FGFR1c: Υποδοχέας του FGF23, Signal transduction: Μεταβίβαση σήματος.

*Πηγή: Saito T. και συν. Int J Pediatr Endocrinol 2009;(1):496514.<sup>23</sup>*

Άλλες δράσεις που έχουν αποδοθεί στις πρωτεΐνες Klotho είναι: (α) Η διέγερση της έκκρισης της PTH στους παραθυρεοειδείς αδένες, τόσο έμμεσα μέσω ρύθμισης των επιπέδων FGF23, φωσφόρου και 1,25(OH)<sub>2</sub>D στο αίμα, όσο και άμεσα μέσω της διασύνδεσής της με τον FGFR. (β) Ο έλεγχος και η επίδραση στις διαδικασίες γήρανσης στα θηλαστικά. (γ) Η συμμετοχή της β-Klotho στη ρύθμιση του μεταβολισμού ενεργείας επί συνθηκών νηστείας, ως συνυποδοχέας των FGF15 και FGF21, καθώς και στη διατήρηση της ομοιοστασίας του χολικού οξέος ως συνυποδοχέας των FGF15 και FGF19. (δ) Η δέσμευση της ενδοκυττάριας Klotho στην αντλία Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPάση σε απάντηση στα χαμηλά ενδοκυττάρια επίπεδα Ca, προκειμένου να ευνοηθεί η μετακίνηση της αντλίας στην κυτταρική επιφάνεια. Τονίζεται επίσης στο σημείο αυτό ότι οι επιδράσεις που αποδίδονται αμιγώς στη γ-Klotho - η οποία εκφράζεται κατά κύριο λόγο στο φαιό λιπώδη ιστό και στους οφθαλμούς - παραμένουν εν πολλοίς ασαφείς και αδιευκρίνιστες μέχρι σήμερα.<sup>19,21,34</sup>

Επισημαίνεται ότι η α-Klotho συχνά διασπάται στην κυτταρική επιφάνεια από αγκυροβολημένες σε αυτήν πρωτεάσεις (τις ADAM10 και ADAM17), καθώς και από ορισμένες εκκρινάσες (κυρίως την α- και τη β-εκκρινάση.) Η εξωκυττάρια περιοχή της α-Klotho που αποκόπτεται από τα κύτταρα με τη δράση των προαναφερθέντων ενζύμων εκκρίνεται στη συνέχεια και κυκλοφορεί σε διαλυτή μορφή (s-Klotho) στο αίμα, στα ούρα και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (Εικόνα 9). Μολονότι φαίνεται να ευνοεί και σε αυτή τη μορφή τη δράση του FGF23, αυτό συμβαίνει σε πολύ μικρότερο βαθμό από ότι όταν παραμένει συνδεδεμένη με το διαμεμβρανικό πεπτιδικό μόριο. Άλλες πιθανές δράσεις που κατά καιρούς έχουν αποδοθεί στην s-Klotho, ανεξάρτητες του FGF23 και με άγνωστη φυσιολογική σημαντικότητα είναι οι ακόλουθες: (i) Μείωση της έκκρισης FGF23 στα οστά (Ming Chang Hu και συν, 2013). (ii) Πιθανή ενεργοποίηση του διαύλου TRPV5 στους νεφρούς, που οδηγεί σε αύξηση της επαναρρόφησης Ca. (iii) Σταθεροποίηση του υποδοχέα TRPV6 στο ΓΕΣ, με αποτέλεσμα την ενίσχυση της δράσης της 1,25(OH)<sub>2</sub>D στην απορρόφηση του Ca. (iv) Φωσφατουρική δράση ανεξάρτητη από τον FGF23. (v) Συσχέτιση με την έκκριση της PTH την οποία και είναι πιθανό να ενισχύει, αν και τα δεδομένα παραμένουν ασαφή. (vi) Ρύθμιση της λειτουργίας ορισμένων γλυκοπρωτεϊνών της κυτταρικής επιφανείας. (vii) Αναστολή της σηματοδότησης στα μονοπάτια της INS, του IGF1, του αυξητικού παράγοντα μεταμόρφωσης β (TGF-β) και του Wnt. (viii) Δράση σιαλιδάσης που ρυθμίζει τη λειτουργία των μεμβρανικών διαύλων κατιόντων ασβεστίου και καλίου. (ix) Αντιγηραντικές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές και

αντιοξειδωτικές δράσεις. Παρά τα ανωτέρω, τονίζεται ότι μέχρι σήμερα δεν έχει ταυτοποιηθεί υποδοχέας για την s-Klotho.<sup>19-21,34,35</sup>



**Εικόνα 9. Η παραγωγή του διαλυτού κλάσματος της klotho (secreted klotho).**

Η διαμεμβρανική πρωτεΐνη Klotho (membrane Klotho) σχηματίζει κατά κύριο λόγο ετεροτριμερή σύμπλοκα με τον παράγοντα FGF23 και τον υποδοχέα του FGFR, προκειμένου ο FGF23 να ασκήσει τις ενδοκυττάρειες δράσεις του. Παράλληλα, σε ένα μικρότερο ποσοστό, η εξωκυττάρια περιοχή της Klotho αποκόπτεται από τα κύτταρα με τη βοήθεια του ενζύμου  $\alpha$ - ή  $\beta$ -εκκριτάση ( $\alpha$ - or  $\beta$ -secretase) και ακολούθως εκκρίνεται και κυκλοφορεί σε διαλυτή μορφή (Secreted-Klotho) στα βιολογικά υγρά. Kidney: Νεφρός, Pi excretion: Αποβολή φωσφορικών, Calcitriol synthesis: Σύνθεση καλσιτριόλης.

Πηγή: Kuro-o M. *Korean J Int Med* 2011;26(2):113-122.

Η έκφραση και τα επίπεδα της πρωτεΐνης Klotho ρυθμίζονται ως ακολούθως: (α) Μέσω δράσης της  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  στο νεφρό, η οποία μετά από σύνδεση με τον υποδοχέα της (VDR) ευοδώνει την αύξηση των συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης. (β) Ανάλογη ευοδωτική επίδραση σε επίπεδο νεφρού επιφέρει και η PTH, έμμεσα μέσω διέγερσης του σχηματισμού της  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ . (γ) Μέσω της δράσης του FGF23, ο οποίος από τη μία ελαττώνει την έκφραση της Klotho στο νεφρό και από την άλλη, πιθανότατα, αυξάνει την έκφρασή της στους παραθυροειδείς αδένες. Ο FGF23 φαίνεται ακόμη να ασκεί επιδράσεις και στις συγκεντρώσεις της s-Klotho, τα συγκεκριμένα όμως δεδομένα παραμένουν επί του παρόντος αρκετά ασαφή. (δ)

Τέλος, θετικές επιδράσεις στην έκφραση της Klotho ασκούν οι αυξήσεις των επιπέδων γλυκόζης, P, ιονισμένου Ca, ουρίας και TGF-β στην κυκλοφορία, καθώς και η παρουσία καταστάσεων φλεγμονής και συνθηκών οξειδωτικού stress.<sup>19,21,36</sup>

## 1.6. Οι δράσεις του FGF23 στον ανθρώπινο οργανισμό

### A. Νεφρός.

Ο FGF23 στο νεφρό (Εικόνα 10):

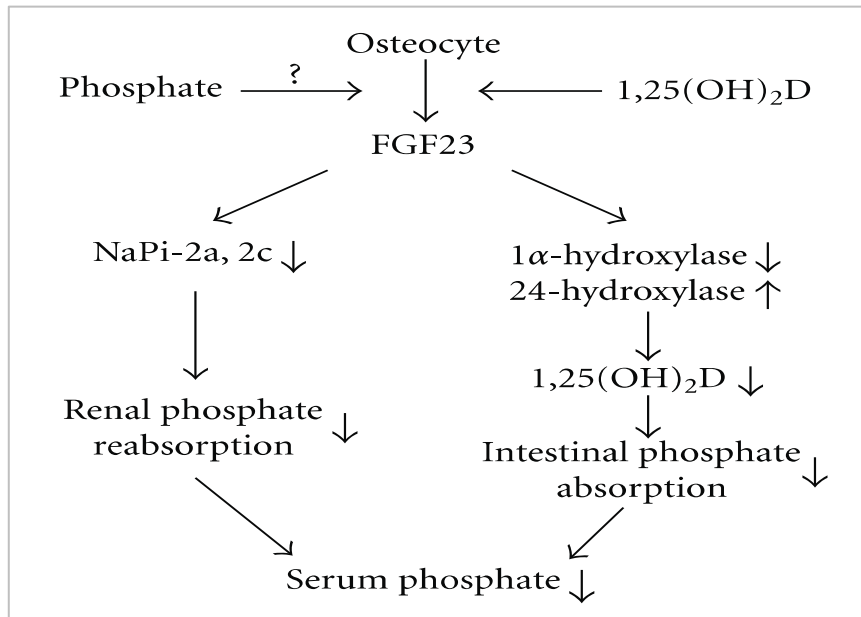
**i.** Καταστέλλει την έκφραση των συµμεταφορέων NaPiIIa, NaPiIIc και πιθανότατα του Pit2. Οι επιδράσεις αυτές οδηγούν σε ελάττωση της επαναπρόσληψης του P στα εγγύς εσπειραµένα σωληνάκια και οδηγούν σε φωσφατουρία. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η α-Klotho παράγεται κυρίως στα άπω εσπειραµένα σωληνάκια, µε αποτέλεσµα εκεί να λαµβάνει χώρα και η σηµατοδότηση του FGF23. Το σύµπλεγμα FGF23/Klotho δρα συνεπώς κατά κύριο λόγο στα άπω εσπειραµένα, προκαλώντας την απελευθέρωση - αγνώστων µέχρι στιγµής - παρακρινικών παραγόντων, οι οποίοι τελικά ασκούν δράση σε επίπεδο συµμεταφορέων στα εγγύς νεφρικά σωληνάκια.<sup>19,21,37</sup>

**ii.** Αναστέλλει την έκφραση της 1α-υδροξυλάσης, προκαλώντας προς τα κάτω ρύθµιση (down-regulation) της έκφρασης του γονιδίου Cyp27b1 στα κύτταρα των εγγύς εσπειραµένων σωληναρίων. Άµεσο αποτέλεσµα αυτής της επίδρασης είναι η ελάττωση της απορρόφησης P από το ΓΕΣ.<sup>19,21,37,38</sup>

**iii.** Ενισχύει την έκφραση της 24-υδροξυλάσης, η οποία µετατρέπει τη δραστική 1,25(OH)<sub>2</sub>D σε πιο αδρανείς µεταβολίτες. Η δράση αυτή διαµεσολαβείται µέσω της προς τα άνω ρύθµισης (up-regulation) της έκφρασης του γονιδίου Cyp24a1 στα κύτταρα των εγγύς εσπειραµένων σωληναρίων.<sup>19,21,37,38</sup>

**iv.** Ελαττώνει την έκφραση της α-Klotho.<sup>19,21,37,38</sup>

**v.** Αυξάνει την επαναρρόφηση του Ca µέσω αύξησης της πυκνότητας των διαύλων TRPV5 στα άπω εσπειραµένα σωληνάκια. Πρόκειται για µία δράση παρόµοια µε εκείνη της PTH, που όµως ασκείται µέσω του συστήµατος FGF23/αKlotho/FGFR. Το αποτέλεσµα είναι να ενεργοποιείται ένας σηµατοδοτικός καταρράκτης ο οποίος περιλαµβάνει τα µονοπάτια ERK1/2, SGK1 (serum glucocorticoid-regulated kinase-1) και WNK4.<sup>19,21,37-39</sup>



**Εικόνα 10: Οι επιδράσεις του FGF23 στο μεταβολισμό του φωσφόρου, διαμέσου της δράσης του στο νεφρό.** Ο FGF23 εκκρινόμενος από το οστεοκύτταρο (Osteocyte) με τη βοήθεια της  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  και των φωσφορικών (phosphate), ελαττώνει την έκφραση των συµμεταφορέων NaPiIIa (NaPi-2a) και NaPiIIc (NaPi-2c), αναστέλλει την έκφραση της 1α-υδροξυλάσης (1α-hydroxylase) και αυξάνει την έκφραση της 24-υδροξυλάσης (24-hydroxylase). Αποτέλεσµα των ανωτέρω είναι η ελάττωση της επαναρρόφησης του φωσφόρου στο νεφρό (renal phosphate reabsorption), η ελάττωση της απορρόφησης του από το ΓΕΣ (intestinal phosphate absorption), η αύξηση της απέκκρισής του από τους νεφρούς και τελικά η ελάττωση της συγκέντρωσης του μετάλλου στον ορό (serum phosphate).

*Πηγή: Saito T. και συν. Int J Pediatr Endocrinol 2009;(1):496514.<sup>23</sup>*

**vi.** Ευοδώνει την επαναρρόφηση νατρίου μέσω άµεσης ρύθµισης της πυκνότητας του συµμεταφορέα  $\text{Na}(+):\text{Cl}(-)$  NCC στα άπω εσπειραµένα σωληνάρια, δράση που ασκείται επίσης από το σύστηµα FGF23/ $\alpha$ -Klotho/FGFR, µε συµµετοχή των σηµατοδοτικών μονοπατιών ERK1/2, SGK1 και WNK. Η επαναρρόφηση του Na θα οδηγήσει τελικά σε αύξηση του όγκου αίµατος και της αρτηριακής πίεσης. Αυτή είναι ίσως και η πιθανότερη εξήγηση της αύξησης της καρδιαγγειακής νοσηρότητας που παρατηρείται στη χρόνια νεφρική νόσο (XNN) και φαίνεται να συσχετίζεται µε τον αυξηµένο FGF23. Ένας πρόσθετος παράγοντας που συνεισφέρει στην ανάπτυξη της συγκεκριµένης επιπλοκής είναι και η ξεχωριστή ενισχυτική επίδραση που ασκεί ο FGF23 στο σύστηµα ρενίνης-αγγειοτενσίνης.<sup>19,21,37-39</sup>

## **B. Παραθυροειδείς αδένες.**

Σε επίπεδο παραθυροειδών αδένων ο FGF23 ασκεί τρεις βασικές επιδράσεις: (i) Αναστέλλει τη σύνθεση και την έκκριση της PTH και ελαττώνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων των αδένων. Αν και τα σχετικά δεδομένα ήταν συγκρουόμενα μέχρι πρότινος, η παραπάνω δράση είναι τελικά αυτή που φαίνεται να επιβεβαιώνεται και που θεωρείται πλέον αποδεκτή. Το κύριο σηματοδοτικό μονοπάτι που εμπλέκεται και που ενεργοποιείται από τον FGF23 είναι το Klotho/FGFR/MAPK. Πιθανώς περαιτέρω ρυθμιστικές παρεμβάσεις να ασκούνται και από την s-Klotho, την 1,25(OH)<sub>2</sub>D και άλλους παράγοντες. (ii) Αυξάνει την έκφραση των υποδοχέων ασβεστίου (CaSR) και βιταμίνης D (VDR), οδηγώντας έμμεσα σε περαιτέρω ελάττωση της εκκρινόμενης PTH. (iii) Προάγει την έκφραση της Klotho στους παραθυροειδείς (σε αντίθεση με ό,τι συμβαίνει στους νεφρούς, όπου ελαττώνει την έκφραση της α-Klotho.)<sup>19-21,37</sup>

## **Γ. Ερειστικό σύστημα.**

Η υπερέκκριση και τα υψηλά επίπεδα του FGF23, ανεξαρτήτως αιτίας που τα προκαλεί, έχουν συσχετισθεί με αρνητικές επιδράσεις στο σκελετό. Οι κυριότερες από αυτές είναι η ανάπτυξη οστεομαλακίας και χαμηλής οστικής μάζας, ενώ πιθανολογείται και συμμετοχή της διαταραχής στην καθυστέρηση της ανάπτυξης των οστών. Οι συγκεκριμένες επιπλοκές αναπτύσσονται κατ' αρχάς έμμεσα, λόγω των προαναφερθέντων επιδράσεων του FGF23 στο P, στο Ca, στην PTH και στην 1,25(OH)<sub>2</sub>D. Επιπλέον όμως, ενισχύονται και από άμεση ανασταλτική επίδραση των υψηλών επιπέδων του FGF23 στη μετάλλωση των οστών, όπως έχουν καταδείξει μελέτες σε κυτταρικές καλλιέργειες και πειραματόζωα.<sup>19-21,37</sup>

## **Δ. Λοιποί ιστοί.**

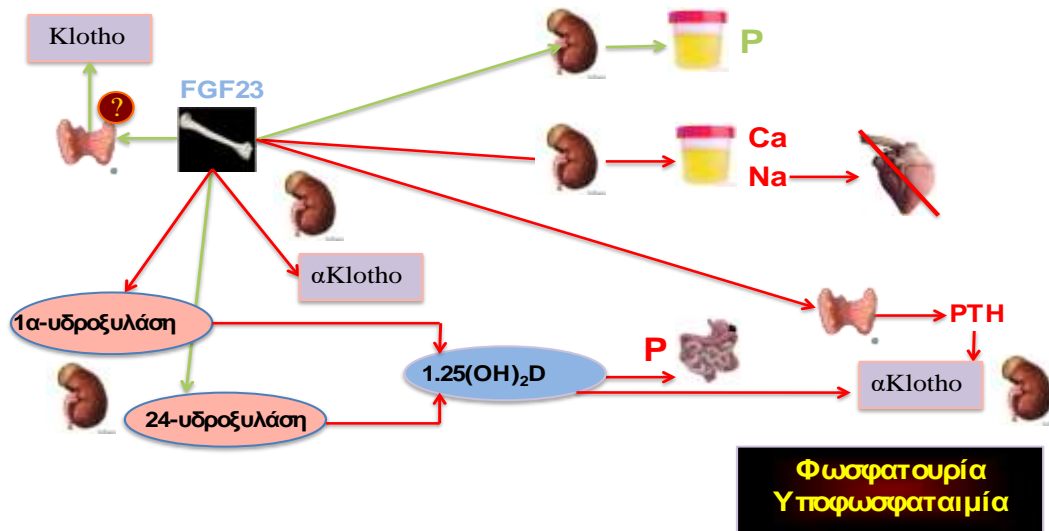
Ο FGF23 εκτός των ανωτέρω, ασκεί και μία πλειάδα πρόσθετων επιδράσεων σε άλλους ιστούς.<sup>19-21,40-42</sup> Επιγραμματικά αναφέρονται:

- Αναστολή του συμμεταφορέα NaPiIIb στο ΓΕΣ, με αποτέλεσμα τον περιορισμό της εξαρτώμενης από τη βιταμίνη D απορρόφησης του P.
- Θετική συσχέτιση των επιπέδων του φωσφατουρικού παράγοντα με το δείκτη μάζας της αριστερής κοιλίας και τον κίνδυνο εμφάνισης αρτηριακής υπέρτασης, υπερτροφίας αριστερής κοιλίας και στεφανιαίας νόσου (βλ. και παραπάνω).
- Πιθανή συσχέτιση με διαταραχές στο μεταβολισμό της γλυκόζης.
- Πιθανή συσχέτιση με το μεταβολισμό της βιταμίνης D στο έμβryo, μέσω

επιδράσεων στην έκφραση του γονιδίου Cyp24a1.

- Ασαφείς/υποθετικές επιδράσεις στον πλακούντα, στην υπόφυση, στο χοριοειδές πλέγμα του εγκεφάλου και στην αιμοποίηση.

### Οι κυριότερες επιδράσεις του FGF23 στον άνθρωπο



**Εικόνα 11.** Γενική θεώρηση των φυσιολογικών δράσεων του FGF23 στον άνθρωπο. Ο FGF23 εκκρίνεται στα οστά και προάγει (πράσινα βέλη) την απέκκριση φωσφόρου (P) από τους νεφρούς, αναστέλλοντας (ερυθρά βέλη) την επαναρρόφησή του στο νεφρό μέσω ελάττωσης της έκφρασης και της δραστηριότητας των συμμεταφορέων NaPiIIa και NaPiIIc στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο. Επιπρόσθετα, μειώνει (ερυθρά βέλη) την εντερική απορρόφηση του διατροφικού φωσφόρου μέσω μείωσης της ενεργότητας των συμμεταφορέων NaPiIb στο ΓΕΣ, μία δράση που διαμεσολαβείται μετά από ελάττωση που επιφέρει ο FGF23 στα επίπεδα της  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ , τόσο μέσω μείωσης της έκφρασης της 1α-υδροξυλάσης στους νεφρούς, όσο και μέσω αύξησης της δράσης της 24-υδροξυλάσης. Σε επίπεδο παραθυρεοειδών αδένων ο FGF23 μειώνει την έκφραση και την απελευθέρωση της PTH και αυξάνει την τοπική παραγωγή της Klotho, ενώ αντίθετα σε επίπεδο νεφρού καταστέλλει την έκφραση της α-Klotho. Επιπρόσθετα, ευοδώνει την επαναρρόφηση νατρίου, κατάσταση που αυξάνει τον κίνδυνο για εμφάνιση υπέρτασης και καρδιαγγειακών επιπλοκών επί χρόνιας παθολογικά αυξημένης επίδρασης του FGF23.



Με βάση τα ανωτέρω καθίσταται σαφές ότι το σύστημα FGF23/Klotho/FGFR κατέχει κομβικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού του Ρ. Ως εκ τούτου, διαταραχές του συγκεκριμένου συστήματος έχουν ως αποτέλεσμα την εκδήλωση σοβαρών νοσημάτων. Η αναλυτική περιγραφή αυτών ξεφεύγει από το σκοπό της παρούσας εργασίας και για το λόγο αυτό θα ακολουθήσει μια απλή μόνο αναφορά:

#### I. Νοσήματα που σχετίζονται με υπερβολική δράση του FGF23.

Εδώ ανήκουν: (α) Η κληρονομούμενη με αυτοσωματικό επικρατούντα χαρακτήρα υποφωσφοραιμική ραχίτιδα (Autosomal Dominant Hypophosphatemic Rickets, ADHR) που οφείλεται σε ενεργοποιητική μετάλλαξη του γονιδίου FGF23, η οποία οδηγεί σε αντίσταση στην πρωτεολυτική διάσπαση του μορίου. (β) Η Χ-φυλοσύνδετη υποφωσφοραιμική ραχίτιδα (X-Linked Hypophosphatemia, XLH) όπου αναπτύσσεται αδρανοποιητική μετάλλαξη στο γονίδιο PHEX. (γ) Η κληρονομούμενη με αυτοσωματικό υπολειπόμενο χαρακτήρα υποφωσφοραιμική ραχίτιδα η οποία σχετίζεται με αδρανοποιητική μετάλλαξη του γονιδίου DMP-1. δ) Η υποφωσφοραιμική ραχίτιδα με συνοδό υπερπαραθυρεοειδισμό, που οφείλεται σε ενεργοποιητική μετάλλαξη του γονιδίου της α-Klotho. (ε) Η πολυστική ινώδης δυσπλασία του συνδρόμου McCune-Albright, όπου αναπτύσσεται ενεργοποιητική μετάλλαξη του γονιδίου GNAS1 και τέλος (στ) η ογκογενής υποφωσφοραιμική οστεομαλακία (Tumor Induced Osteomalacia, TIO) η οποία αποτελεί ένα παρανεοπλασματικό σύνδρομο μεσεγχευματικών όγκων που οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή και έκκριση FGF23 και MEPE. Όπως είναι αναμενόμενο, σε όλες τις παραπάνω καταστάσεις παρατηρούνται - σε άλλοτε άλλο βαθμό - αυξημένα επίπεδα FGF23, υποφωσφοραιμία, φωσφατουρία, χαμηλές τιμές 1,25(OH)<sub>2</sub>D και ανάπτυξη ραχίτιδας ή οστεομαλακίας.<sup>19,21</sup>

#### II. Νοσήματα που σχετίζονται με ανεπαρκή δράση του FGF23.

Εδώ ανήκει η οικογενής υπερφωσφοραιμική ογκογενής ασβέστωση (Hereditary Familial Tumoral Calcinosis, HFTC), η οποία μέχρι σήμερα έχει συσχετιστεί τόσο με αδρανοποιητική μετάλλαξη του γονιδίου GALNT3, όσο και με παρανοηματικές μεταλλάξεις (missense mutations) των γονιδίων FGF23 και Klotho. Το αποτέλεσμα είναι να αναπτύσσονται υπερφωσφοραιμία, ελάττωση της συγκέντρωσης Ρ στα ούρα, αύξηση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D και έκτοπες ασβεστώσεις.<sup>21</sup>



## 1.7. Σύστημα FGF23/Klotho και καταγματικός κίνδυνος

Όπως έχει μέχρι στιγμής παρατηρηθεί, καταστάσεις ανεπάρκειας της πρωτεΐνης **Klotho** συνοδεύονται από χαμηλό ρυθμό οστικής ανακατασκευής, ενώ σε επίμυες φαίνεται να ασκείται και άμεσο αρνητικό αντίκτυπο στους οστεοβλάστες. Από την άλλη μεριά, σε καταστάσεις με υπερέκκριση Klotho παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης PTH στον ορό και αναστολή της οστεοβλαστικής δραστηριότητας.<sup>19,43</sup> Αναφορικά με τον **FGF23**, σε παθολογικές καταστάσεις όπου τα επίπεδα του παράγοντα αυξάνουν υπέρμετρα (όπως συμβαίνει στη χρόνια νεφρική νόσο) έχουν περιγραφεί: (α) διαταραχές της μετάλλωσης των οστών και χαμηλή οστική μάζα από τοπική ελάττωση των συγκεντρώσεων P, (β) διέγερση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών, αλλά ταυτόχρονα και αναστολή της οστεοβλαστικής δραστηριότητας, μέσω πιθανής ενεργοποίησης FGF-μονοπατιών ανεξαρτήτως της παρουσίας Klotho, (γ) αναστολή της οστεοκλαστογένεσης και (δ) πιθανή επίδραση του αυξημένου FGF23 και σε άλλους παράγοντες ρύθμισης της οστικής παραγωγής, όπως για παράδειγμα στην απάντηση του οστεοκυττάρου σε μηχανικά ερεθίσματα.<sup>19,43-49</sup> Με βάση τα ανωτέρω, θα περίμενε κανείς μάλλον αρνητικές επιδράσεις σε επίπεδο οστικής πυκνότητας (Bone Mineral Density, BMD) και πιθανότατα αύξηση του καταγματικού κινδύνου όταν το σύστημα FGF23/Klotho υπερλειτουργεί. Σχετικές μελέτες έχουν λάβει χώρα προσπαθώντας να απαντήσουν σε δύο βασικά ερωτήματα:

### **(Α.) Ποιά είναι η σχέση που αναπτύσσεται μεταξύ επιπέδων FGF23 και BMD.**

Η πρώτη σχετική παρατήρηση που δημοσιεύτηκε το 2008 αφορούσε σε τελικού σταδίου ασθενείς με ΧΝΝ, στους οποίους φάνηκε να μην υπάρχει συσχέτιση των επιπέδων FGF23 με τη BMD στον αυχένα του μηριαίου, στη σπονδυλική στήλη (ΣΣ) και στην κερκίδα.<sup>50</sup> Ένα έτος αργότερα, Σουηδοί ερευνητές μελετώντας ένα δείγμα άνω των 3.000 ασθενών ανακοίνωσαν ότι ο FGF23 δε φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της BMD,<sup>51</sup> ενώ λίγο αργότερα παρουσιάστηκαν αποτελέσματα που για πρώτη φορά καταδείκνυαν την παρουσία αρνητικής συσχέτισης μεταξύ επιπέδων FGF23 και BMD στο ισχίο, με απουσία εντούτοις οποιασδήποτε συσχέτισης μεταξύ FGF23 και BMD σε ΣΣ και κερκίδα.<sup>52</sup> Τέλος, το 2012 οι Desjardins L. και συν. παρουσίασαν νέα στοιχεία για απουσία σχέσης μεταξύ των τιμών του FGF23 και της οστικής μάζας των θωρακικών σπονδύλων.<sup>53</sup>

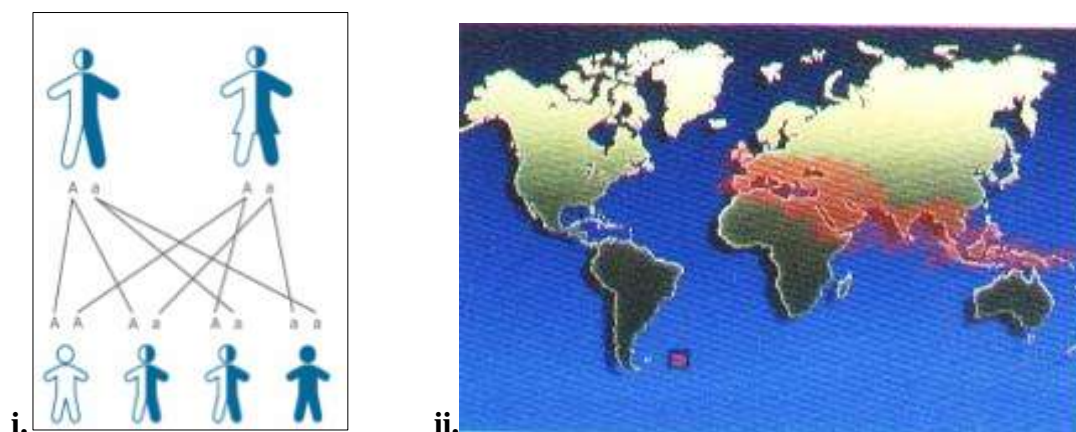
**(B.) Ποιά σχέση αναπτύσσεται μεταξύ FGF23 και καταγματικού κινδύνου.**  
Σε πέντε μελέτες που προσπάθησαν να απαντήσουν στο συγκεκριμένο ερώτημα από το 2012 έως το 2014, τα συμπεράσματα ήταν ότι: (i) Η πιθανότητα σπονδυλικού κατάγματος αυξάνει με την αύξηση των επιπέδων του FGF23 σε ασθενείς με ΧΝΝ.<sup>54</sup> (ii) Σε πολύ μεγάλες αυξήσεις του FGF23 σε έδαφος ΧΝΝ, παρατηρείται υψηλότερος καταγματικός κίνδυνος τόσο για τα σπονδυλικά, όσο και για τα μη-σπονδυλικά οστεοπορωτικά κατάγματα.<sup>55,56</sup> (iii) Πιθανολογείται αρνητική επίδραση του πολύ υψηλού FGF23 στη μετάλλωση, στη μικροαρχιτεκτονική και στη μηχανική του οστού.<sup>55,56</sup> Στον αντίποδα, υπήρξαν εμπεριστατωμένες μελέτες οι οποίες δεν κατόρθωσαν να τεκμηριώσουν τον FGF23 ως παράγοντα κινδύνου για κάταγμα.<sup>57-59</sup> Συμπερασματικά, ίσως μόνο τα πολύ υψηλά επίπεδα του FGF23 να είναι εκείνα που επιδρούν τόσο σημαντικά στο οστό ώστε να αυξηθεί αισθητά ο κίνδυνος για κάταγμα. Απαιτούνται εντούτοις περισσότερες ποιοτικές κλινικές μελέτες για να τεκμηριωθεί με βεβαιότητα οποιαδήποτε τέτοια θεωρία.

## **1.8. Γενικά στοιχεία περί β-Θαλασσαιμίας**

### **1.8.1. Ορισμός και επιδημιολογικά στοιχεία**

Με τον όρο «β-μεσογειακή αναιμία» ή «β-θαλασσαιμία» περιγράφεται η παθολογική εκείνη κατάσταση που χαρακτηρίζεται από κληρονομούμενη - με τον αυτοσωματικό υπολειπόμενο τρόπο κληρονομικότητας - βλάβη των γονιδίων τα οποία είναι υπεύθυνα για την κωδικοποίηση των β-πολυπεπτιδικών αλύσεων της αιμοσφαιρίνης (Εικόνα 12i).<sup>60</sup> Υπενθυμίζεται ότι η αιμοσφαιρίνη (Hb) είναι η κύρια πρωτεΐνη που περιέχουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια και σχετίζεται με τη μεταφορά του οξυγόνου στους ιστούς. Το μόριό της αποτελείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, ανά δύο όμοιες, και κάθε αλυσος συνδέεται με μία ομάδα αίμης, η οποία με τη σειρά της δημιουργείται από έναν πορφυρινικό δακτύλιο που περιβάλλει ένα ιόν σιδήρου. Οι κύριες φυσιολογικές αιμοσφαιρίνες στον άνθρωπο είναι η HbA που αποτελεί την κύρια ( $\geq 95\%$ ) αιμοσφαιρίνη στον ενήλικα και απαρτίζεται από δύο α- και δύο β-αλυσίδες, η HbA2 που σχηματίζεται από δύο α- και δύο δ-αλυσίδες και αντιστοιχεί στο 1.5% έως 3.5% της αιμοσφαιρίνης του ενηλίκου και η HbF που αποτελείται από δύο α- και δύο γ-αλυσίδες και συναντάται κυρίως στην εμβρυϊκή ζωή, καθώς και κατά τους πρώτους μήνες της βρεφικής ζωής.

Αποτέλεσμα της ως άνω περιγραφείσας γενετικής διαταραχής είναι η ανάπτυξη σοβαρής αιμοσφαιρινοπάθειας με ποικίλες γονοτυπικές και φαινοτυπικές μορφές, από το είδος των οποίων εξαρτάται και η τελική δυνατότητα του οργανισμού να παράγει από πρακτικά καθόλου έως και σχετικά ικανοποιητικά επίπεδα β-αλύσεων και φυσιολογικής αιμοσφαιρίνης HbA.<sup>60</sup> Στην πρώτη περίπτωση γίνεται λόγος για τη «μείζονα μορφή» και αντίστοιχα στη δεύτερη για την «ενδιάμεση μορφή» της ομόζυγου β-θαλασσαιμίας. Η β-θαλασσαιμία παρουσιάζει υψηλή επίπτωση κυρίως στις χώρες που βρέχονται από τη Μεσόγειο Θάλασσα, από όπου και πήρε το όνομά της. Πολύ συχνά απαντάται επίσης στις περιοχές του Καυκάσου, στη Μέση Ανατολή, στην Ινδία και στη νοτιοανατολική Ασία (Εικόνα 12ii). Ο συνολικός πληθυσμός των β-θαλασσαιμικών ασθενών εκτιμάται σήμερα στα 100.000 άτομα παγκοσμίως, ενώ σύμφωνα με τα πιο πρόσφατα επιδημιολογικά δεδομένα στην Ελλάδα διαβιούν σήμερα περί τους 3.000 πάσχοντες.<sup>61,62</sup>



**Εικόνα 12. Γενετική μεταβίβαση και γεωγραφική κατανομή της β-θαλασσαιμίας.**

**i. Γενετική μεταβίβαση:** Η β-θαλασσαιμία μεταβιβάζεται με τις αρχές του αυτοσωματικού υπολειπόμενου τύπου κληρονομικότητας. A: Φυσιολογικό γονίδιο (χρωμόσωμα 11, θέση 11p15.5). a: Μεταλλαγμένο γονίδιο, μη ικανό να οδηγήσει σε σύνθεση β-αλύσεων. AA: Φυσιολογική κατάσταση. Aa: Ετεροζυγώτης (ετερόζυγος β-θαλασσαιμία), aa: Ομυζυγώτης (ομόζυγος β-θαλασσαιμία / μείζων ή ενδιάμεση).

*Πηγή: (i) Olivieri NF. N Engl J Med 1999; 341:99-109.<sup>60</sup>*

**ii. Γεωγραφική κατανομή β-θαλασσαιμίας:** Οι περιοχές που βρίσκονται στην κόκκινη ζώνη είναι εκείνες στις οποίες η νόσος εμφανίζει την υψηλότερη επίπτωση.

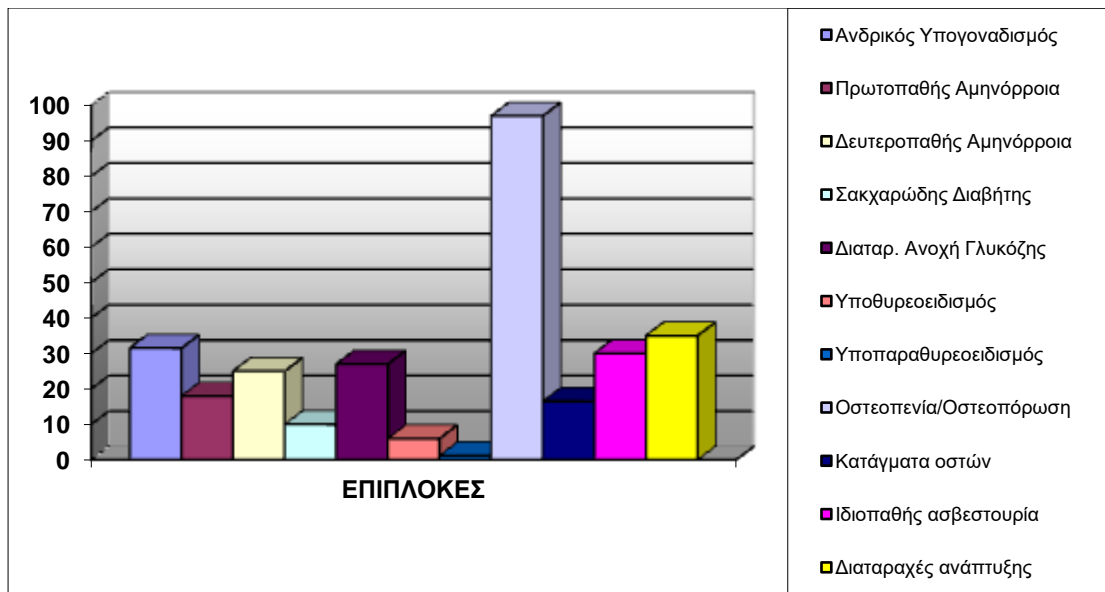
*Πηγή: Cappellini MD και συν. Guidelines for the management of transfusion dependent thalassaemia (TDT). 3rd Edition. Nicosia (CY):TIF;2014.<sup>61</sup>*

### 1.8.2. Παθοφυσιολογικά δεδομένα

Όπως περιγράφηκε αναλυτικά στην προηγούμενη παράγραφο, το βασικό πρόβλημα που αναπτύσσεται στην ομόζυγο β-μεσογειακή αναιμία (βΜΑ) είναι η σχεδόν μηδενική (ή έστω σοβαρά ανεπαρκής) παραγωγή των β-αλύσεων της αιμοσφαιρίνης. Με αυτόν τον τρόπο προκύπτει μια διαταραγμένη αναλογία σε α- και β-αλύσους μέσα στα ερυθροκύτταρα, κατάσταση που οδηγεί σε παραγωγή «μειονεκτικών» κυττάρων, δηλαδή σε ερυθρά αιμοσφαίρια που είναι πολύ ευαίσθητα στο να υπόκεινται τόσο σε ενδομυελική καταστροφή - διαδικασία που είναι γνωστή ως «αναποτελεσματική ερυθροποίηση» - όσο και σε εξωμυελική αιμόλυση. Η αιμόλυση λαμβάνει χώρα κυρίως στο σπλήνα και στο ήπαρ, οδηγώντας σε σταδιακά υπέρμετρη αύξηση του μεγέθους των συγκεκριμένων οργάνων που είναι γνωστή ως «ηπατοσπληνομεγαλία». Όπως είναι αναμενόμενο, με το συγκεκριμένο παθολογικό μηχανισμό σε πλήρη εξέλιξη, αναπτύσσεται στους πάσχοντες από τη νόσο βαρύτερη αναιμία και χρόνια υποξία όλων των ιστών του οργανισμού.<sup>63</sup> Η κατάσταση δε θα ήταν συμβατή με τη ζωή αν δεν υπήρχε η δυνατότητα συχνών μεταγγίσεων με ερυθρά αιμοσφαίρια. Εντούτοις, η απαραίτητη αυτή θεραπευτική παρέμβαση δεν είναι άμοιρη επιπλοκών, με τη βασικότερη απ' όλες να αφορά στην εναπόθεση σιδήρου στους ιστούς. Η περίσσεια σιδήρου (αιμοσιδήρωση) δρα τοξικά στα κύτταρα και στους ιστούς και οδηγεί σε βαρύτερες επιπλοκές από τα περισσότερα όργανα του ανθρωπίνου σώματος. Για το λόγο αυτό, κατά τις τελευταίες δεκαετίες εφαρμόζονται εξειδικευμένα σχήματα αγωγής «αποσιδήρωσης» στους θαλασσαιμικούς ασθενείς, με τη χρήση ειδικών φαρμακευτικών χηλικών παραγόντων.<sup>60,61</sup>

### 1.8.3. β-Θαλασσαιμία και συννοσηρότητα

Οι επιπλοκές που απαντώνται στη βΜΑ είναι πολυάριθμες, συνήθως σοβαρές και οφείλονται κατά κανόνα στην αιμοσιδήρωση, στη χρόνια υποξία, σε λοιμώδεις παράγοντες, αλλά και στις ανεπιθύμητες ενέργειες των ειδικών για τη νόσο φαρμακευτικών σκευασμάτων. Ενδεικτικά αναφέρονται οι σημαντικές καρδιαγγειακές εκδηλώσεις, οι διαταραχές από όλους σχεδόν τους ενδοκρινείς αδένες, η πάρα πολύ συχνά συνυπάρχουσα οστική νόσος (Πίνακας 2), η ευπάθεια στις λοιμώξεις, οι - συνήθως μέτριας βαρύτητας - νεφρικές διαταραχές, η υψηλή επίπτωση της ηπατίτιδας Β και C και η συνοδός χρόνια ηπατοπάθεια.<sup>61</sup>



**Πίνακας 2: Συχνότητα (%) των ενδοκρινικών επιπλοκών και των μεταβολικών διαταραχών που αναπτύσσονται σε ασθενείς με ομόζυγο β-θαλασσαιμία.** Σημαντικές διαφοροποιήσεις από τα ανωτέρω ποσοστά συχνά διαπιστώνονται ανάλογα με την ηλικία και τον αριθμό των ασθενών της εκάστοτε μελέτης, καθώς και ανάλογα με τα θεραπευτικά πρωτόκολλα που ακολουθούνται στις διάφορες μονάδες νοσηλείας παγκοσμίως.

*Πηγή: Τροποποίηση με προσαρμογή στα σύγχρονα ελληνικά δεδομένα από De Sanctis και συν. Clin Endocrinol (Oxf). 1995;42(6):581-6.<sup>64</sup>*

#### 1.8.4. Θεραπεία της αιματολογικής νόσου

Τρεις είναι οι κύριοι άξονες στους οποίους βασίζεται η σύγχρονη θεραπεία της βΜΑ: (α) Οι τακτικές μεταγγίσεις αίματος των ασθενών με πεπλυμένα ερυθρά και με στόχο τη διατήρηση ικανοποιητικών επιπέδων αιμοσφαιρίνης, δηλαδή τιμές Hb  $\geq$  9,0 έως 10,0 g/L.<sup>61</sup> (β) Η εφαρμογή του πλέον ιδανικού σχήματος αποσιδήρωσης για τον κάθε πάσχοντα ξεχωριστά. Οι χηλικοί παράγοντες αποσιδήρωσης κατέχουν κεντρικό ρόλο στη θεραπεία της βΜΑ. Η ανακάλυψη της παρεντερικώς χορηγούμενης δεσφεριοξαμίνης (DFO) στη δεκαετία του 1970 εκτόξευσε το προσδόκιμο επιβίωσης των ασθενών, ενώ από τη δεκαετία του 1990 και έπειτα χρησιμοποιούνται άλλοι δύο από του στόματος χορηγούμενοι παράγοντες, η δεφεριπρόνη (DFP) και η δεφερασιρόξη (DFX). Έτσι, ανάλογα με τις ιδιαιτερότητες του κάθε πάσχοντα, εφαρμόζονται πλέον απόλυτα εξατομικευμένα σχήματα αποσιδήρωσης ως προς το

είδος των φαρμάκων (ή το συνδυασμό αυτών), τις δόσεις και τη συχνότητα χορήγησης.<sup>65-67</sup> Ο ιδανικός στόχος είναι οι ασθενείς να αποβάλλουν σχεδόν ολοκληρωτικά τον περιττό σίδηρο από τους ιστούς και να επιτυγχάνουν φυσιολογικές τιμές φερριτίνης πλάσματος, καθώς και ένα ικανοποιητικό αποτέλεσμα στις εκτιμήσεις της ιστικής εναπόθεσης σιδήρου, όπως αυτή προσδιορίζεται μέσω εξειδικευμένων τεχνικών μαγνητικής τομογραφίας (MRI). (γ) Η πρόληψη και θεραπεία της λοιπής συννοσηρότητας που αναπτύσσεται στους θαλασσαιμικούς ασθενείς και η οποία περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο.<sup>61</sup>

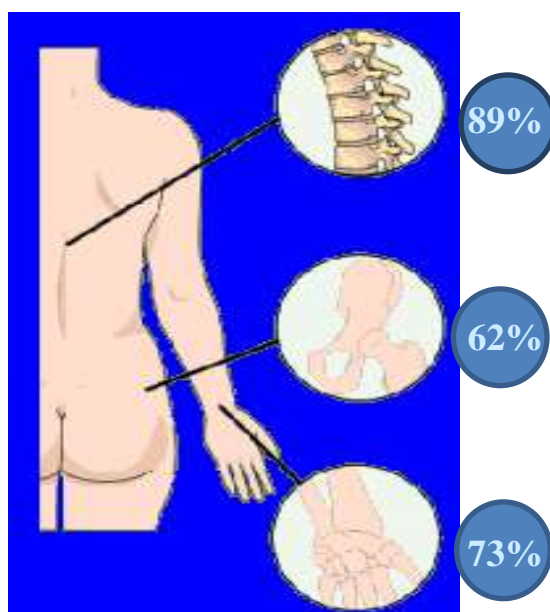
## **1.9. Οστική νόσος στη β-Θαλασσαιμία**

### **1.9.1. Ορισμός και επιδημιολογικά στοιχεία**

Οι επιπλοκές από το σκελετό στη βΜΑ έχουν απασχολήσει έντονα την παγκόσμια επιστημονική κοινότητα, ιδίως κατά τις τελευταίες δεκαετίες. Σε αυτό συνέβαλλε κατά μεγάλο ποσοστό η συνεχής βελτίωση των μεθόδων αντιμετώπισης της αιματολογικής νόσου, εξαιτίας της οποίας η επιβίωση των θαλασσαιμικών έχει πλέον επιμηκυνθεί εντυπωσιακά. Το αποτέλεσμα αυτής της θετικής κατά τα άλλα εξέλιξης είναι οι ασθενείς να υφίστανται για πολύ μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, σε σχέση με παλαιότερες εποχές, τις συνέπειες της νόσου και του χρόνου στα ήδη καταπονημένα τους οστά. Έτσι, στις μέρες μας η οστική νόσος που συνοδεύει τη β-θαλασσαιμία αφορά πλέον στη μεγάλη πλειοψηφία των περιστατικών. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι μόνο η συχνότητα της μειωμένης οστικής πυκνότητας ανέρχεται στο 40-50% των ικανοποιητικά θεραπευόμενων ενηλίκων θαλασσαιμικών παγκοσμίως, ενώ ξεπερνά ακόμη και το 90% στα μεγαλύτερα σε ηλικία ή/και ανεπαρκώς θεραπευόμενα άτομα.<sup>68-70</sup> Η σπονδυλική στήλη φαίνεται να είναι η θέση που πλήττεται περισσότερο συχνά και ακολουθούν το περιφερικό άκρο της κερκίδας και η περιοχή του ισχίου (Εικόνα 13).<sup>71</sup>

Ως προς την επίπτωση των καταγμάτων, ξεχωριστές μελέτες έχουν αναφέρει ότι αυτή κυμαίνεται από 12 % έως 36%, αναλόγως των χαρακτηριστικών των υπό μελέτη πληθυσμών. Μάλιστα, έχει ανακοινωθεί ότι σε ενήλικους ασθενείς με ενδιάμεση β-θαλασσαιμία, το ποσοστό παρουσίας καταγμάτων στο ιστορικό προσεγγίζει ακόμη και το 71%.<sup>68,69,72-74</sup> Έχει δε περιγραφεί ότι εντοπίζονται κυρίως στα άνω άκρα (33-53.3%), με τα σπονδυλικά, πυελικά και ισχιακά κατάγματα να ακολουθούν με σαφώς

μικρότερη συχνότητα.<sup>72,75</sup> Ιδιαίτερο ενδιαφέρον τέλος παρουσιάζει η παρατήρηση ότι οι επιπλοκές από τα οστά εμφανίζονται με σχεδόν παρόμοια συχνότητα μεταξύ των δύο φύλων, ενώ βαρύτερη οστική νόσος φαίνεται να αναπτύσσεται σε ασθενείς με ενδιάμεση ομόζυγο βΜΑ που μεταγγίζονταν κατά υπερβολικά αραιά διαστήματα στο παρελθόν.<sup>76-79</sup>



**Εικόνα 13. Περιοχική συχνότητα μη-αναμενόμενα μειωμένης οστικής πυκνότητας για την ηλικία, σε νέους ενήλικες ασθενείς με μείζονα και ενδιάμεση μορφή ομόζυγου β-θαλασσαιμίας.** Η εκτίμηση της οστικής πυκνότητας έγινε με τη μέθοδο της απορροφησιμετρίας διπλής ενεργειακής δέσμης φωτονίων-X (DXA) και αξιολογήθηκε με βάση τα κριτήρια του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (1994), με βάση τα οποία θεωρήθηκε ως μη αναμενόμενη για την ηλικία κάθε τιμή του Z-Score μικρότερη από -2.0 SDs.

*Πηγή: Τροποποίηση από Dresner Pollack R. Και συν. Br J Haematol. 2000;111(3): 902-907.<sup>71</sup>*

Σε αυτό το σημείο πρέπει να τονίσουμε ότι η οστική νόσος που συνοδεύει τη β-θαλασσαιμία (ONΘ) διαφοροποιείται σαφώς από την κλασική οστεοπόρωση. Βεβαίως, η χαμηλή οστική πυκνότητα, η ελάττωση του πάχους και του αριθμού των οστικών δοκίδων και οι τυπικές οστεοπορωτικές αλλοιώσεις της αρχιτεκτονικής του οστού είναι παρούσες. Οι αλλοιώσεις όμως αυτές αναπτύσσονται σε πολύ νεότερες ηλικίες - συχνά από τη δεύτερη δεκαετία της ζωής - ενώ συνυπάρχουν και πρόσθετες

διαταραχές.<sup>80</sup> Ενδεικτικά αναφέρονται η εμφάνιση οστεομαλακίας σε αρκετά άτομα, οι αλλοιώσεις της φυσιολογικής ανάπτυξης των μακρών οστών, η υπερπλασία του ερυθροποιητικού μυελού με τη συνοδό διόγκωση των σπογγωδών οστών και οι διαταραχές του οστικού μεταβολισμού από τις ποικίλες ενδοκρινικές επιπλοκές της νόσου.<sup>71,81-85</sup>

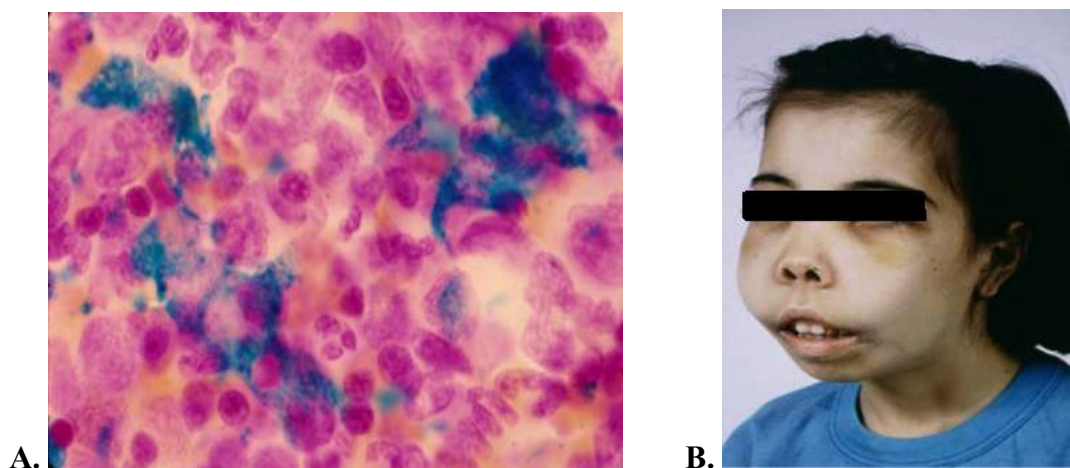
## 1.9.2. Αιτιοπαθογένεια

Η ΟΝΘ εμφανίζει εξαιρετικά πολυπαραγοντική αιτιολογία, γεγονός που την καθιστά ιδιαίτερα πολύπλοκη τόσο ως προς την κατανόηση των παθοφυσιολογικών μονοπατιών που τη διέπουν, όσο και ως προς την προσπάθεια ακριβούς διαγνωστικής προσέγγισης και επιτυχούς θεραπευτικής αντιμετώπισής της. Αμέσως παρακάτω παρουσιάζονται οι βασικοί παθογενετικοί μηχανισμοί που έχουν μέχρι σήμερα ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξή της.

### **1.9.2.1. Υπερπλασία του ερυθροποιητικού μυελού:**

Όπως ήδη επισημάνθηκε, στη βΜΑ ο μυελός των οστών ασθενών διατηρεί την ικανότητα παραγωγής ερυθροκυττάρων, τα οποία όμως καταστρέφονται στη συνέχεια ενδομυελικά ή αιμολύονται στην περιφέρεια. Με το μηχανισμό αυτό αναπτύσσονται συνθήκες χρόνιας ανεπαρκούς οξυγόνωσης των ιστών, στις οποίες ο οργανισμός αντιδρά εκπύσσοντας δυναμικά τον ερυθροποιητικό μυελό, αυξάνοντας τον όγκο του μέχρι και 40 φορές περισσότερο από το φυσιολογικό (Εικόνα 14Α).<sup>69</sup> Κατά το παρελθόν, η συγκεκριμένη συνθήκη ήταν υπεύθυνη για την ανάπτυξη εξεσημασμένων παραμορφώσεων στα πλούσια σε ερυθροποιητικό μυελό οστά, όπως είναι τα σπογγώδη οστά του κρανίου, οι σπόνδυλοι και τα οστά της λεκάνης (Εικόνα 14Β). Στις μέρες μας, με την καθιέρωση του μέτρου των συχνών μεταγγίσεων στα περισσότερα αιματολογικά κέντρα και τη διατήρηση τιμών Hb άνω των 9,0 g/L, ο μυελός καταστέλλεται ικανοποιητικά, αν και ένας βαθμός αυξημένης δραστηριότητας συνεχίζει να υφίσταται. Έτσι, μολονότι οι μακροσκοπικές οστικές παραμορφώσεις έχουν πλέον εκλείψει, η παραμένουσα ήπια έκπτυξη του μυελού είναι ικανή να προκαλέσει με τα χρόνια αραίωση των οστικών δοκίδων, λέπτυνση του φλοιού, καταστροφή της αρχιτεκτονικής των οστών με υποβάθμιση της ποιότητάς τους και τελικά εικόνα οστεοπενίας ή οστεοπόρωσης.<sup>69,79,86,87</sup>





**Εικόνα 14:** Έκπτυξη του ερυθροποιητικού μυελού σε ασθενείς με β-θαλασσαιμία.

(A) Έντονη υπερπλασία ερυθροποιητικού μυελού και εκτεταμένες εναποθέσεις σιδήρου σε βιοψία οστού από ασθενή με ομόζυγο β-θαλασσαιμία.

(B) Εκσεσημασμένες οστικές αλλοιώσεις σε πάσχουσα από βΜΑ.

**Πηγή:** Yaish HM. University of Utah School of Medicine, Department of Pediatrics, Primary Children's Medical Center.

Επιπρόσθετα, με την αντιδραστική έκπτυξη του μυελού των οστών εξηγείται και το «παράδοξο» φαινόμενο της συχνά βαρύτερα εμφανιζόμενης οστικής νόσου μεταξύ των ατόμων που πάσχουν από ενδιάμεση βΜΑ (Λαδής Β. και συν. 2008). Και αυτό γιατί οι συγκεκριμένοι ασθενείς διαθέτουν κάποια ικανότητα παραγωγής β-αλύσεων, με αποτέλεσμα να είναι σε θέση να διατηρούν οριακά ικανοποιητικά επίπεδα αιμοσφαιρίνης για μεγάλα χρονικά διαστήματα, χωρίς την ανάγκη τακτικών μεταγγίσεων. Προκειμένου όμως να επιτευχθεί αυτό, ο ερυθροποιητικός τους μυελός εξωθείται σε έντονη υπερπλασία, διογκώνεται υπερβολικά και προκαλεί μεγαλύτερη καταστροφή στις οστικές δοκίδες από ότι συμβαίνει στους πολύ πιο συχνά μεταγγιζόμενους πάσχοντες με τη μείζονα μορφή της νόσου και τον κατεσταλμένο μυελό.<sup>79</sup> Αυτός είναι εξάλλου και ένας από τους λόγους που πλέον, ακόμη και οι ασθενείς με ενδιάμεση β-θαλασσαιμία, μεταγγίζονται σε πολύ πιο σύντομα χρονικά διαστήματα σε σύγκριση με ό,τι συνέβαινε στο παρελθόν.

#### **1.9.2.2. Γενετική προδιάθεση:**

Παρουσία γενετικών ανωμαλιών που τροποποιούν την έκφραση γονιδίων και διαταράσσουν τον οστικό μεταβολισμό έχουν εντοπιστεί με αυξημένη συχνότητα σε έδαφος βΜΑ. Κατά κύριο λόγο έχουν ενοχοποιηθεί πολυμορφισμοί των γονιδίων COL1A1 και COL1A2 που σχετίζονται με την κωδικοποίηση του κολλαγόνου,

πολυμορφισμοί όπως είναι οι BsmI και FokI που επηρεάζουν τη λειτουργία του υποδοχέα της βιταμίνης D, πολυμορφισμοί που αφορούν στους υποδοχείς των οιστρογόνων (ERα και ERβ) και της καλσιτονίνης (CALC-R), καθώς επίσης και διαταραχές της αλληλουχίας του TGF-β1. Επίσης, τονίζεται για μία ακόμη φορά η σημασία του γονοτύπου και της μορφής (μείζων ή ενδιάμεση) της αιματολογικής νόσου.<sup>68,69,71,82</sup>

#### **1.9.2.3. Μειωμένη φυσική δραστηριότητα:**

Η μειωμένη φυσική δραστηριότητα των ασθενών με βΜΑ αποτελεί έναν επιπρόσθετο παράγοντα που συχνά επηρεάζει αρνητικά τον οστικό τους μεταβολισμό. Η ελλιπής άσκηση στο συγκεκριμένο πληθυσμό πασχόντων είναι στις περισσότερες περιπτώσεις ο κανόνας, πρωτίστως λόγω της συννοσηρότητας που τους ταλαιπωρεί (καρδιακή ανεπάρκεια, κατάγματα, ενδοκρινικές επιπλοκές κλπ.) και δευτερευόντως εξαιτίας της γονικής υπερπροστασίας που λαμβάνει χώρα σε μικρότερες ηλικίες.<sup>78,83</sup>

#### **1.9.2.4. Ο ρόλος της αιμοσιδήρωσης:**

Η υπερβολική εναπόθεση κυτταροτοξικού σιδήρου στον οστίτη ιστό συμμετέχει επίσης στην παθογένεια της ΟΝΘ ως ακολούθως: (α) Ασκει άμεση τοξική επίδραση στους οστεοβλάστες προάγοντας τον κυτταρικό τους θάνατο. (β) Διαταράσσει το σύστημα RANK/RANKL/OPG υπέρ των οστεοκλαστών, αυξάνοντας την έκκριση του RANKL από τα κύτταρα της οστεοβλαστικής σειράς. (γ) Αλληλεπιδρά με τους κρυστάλλους υδροξυαπατίτη οδηγώντας σε αναστολή της τοπικής επιμετάλλωσης, σε παρεμπόδιση της φυσιολογικής ωρίμανσης του οστεοειδούς και σε ανάπτυξη τοπικής οστεομαλακίας.<sup>69,88-92</sup> Εκτός των ανωτέρω, η αιμοσιδήρωση επιδρά δυσμενώς στο σκελετό και με έμμεσους μηχανισμούς, επηρεάζοντας τη λειτουργία άλλων ιστών και οργάνων όπως αναλύεται στη συνέχεια.

#### **1.9.2.5. Τοξικότητα των φαρμάκων αποσιδήρωσης:**

Υπάρχουν μελέτες που καταδεικνύουν τη θετική επίδραση των φαρμάκων αποσιδήρωσης στον οστικό μεταβολισμό, λόγω της ελάττωσης του φορτίου σιδήρου.<sup>69</sup> Εντούτοις, όταν οι παράγοντες αυτοί χρησιμοποιούνται με λάθος τρόπο, χορηγούμενοι σε υψηλές δόσεις και χωρίς καλή αξιολόγηση των πασχόντων, μπορεί να προκαλέσουν σημαντικές διαταραχές από το σκελετό. Χαρακτηριστικά αναφέρονται η εμφάνιση δυσπλασίας με διαταραχές της

ανάπτυξης των μακρών οστών, η πλατυσπονδυλία, η ανάπτυξη αρθροπάθειας, η διαταραχή της φυσιολογικής λειτουργίας του συστήματος OPG/RANKL/RANK υπέρ των οστεοκλαστών, η ελάττωση του πολλαπλασιασμού των οστεοβλαστών και των ινοβλαστών, αλλά και η ανεπάρκεια προστατευτικών για το οστό μετάλλων και ιχνοστοιχείων όπως είναι το Ca, ο P, ο ψευδάργυρος, ο χαλκός και οι βιταμίνες C και D.<sup>61,69,88,93-98</sup>

#### **1.9.2.6. Το σύστημα OPG/RANKL/RANK:**

Οι διαταραχές του συστήματος OPG/RANKL/RANK (Εικόνα 3) κατέχουν κεντρικό ρόλο στην παθογένεια της ΟΝΘ. Πιο αναλυτικά, στους θαλασσαιμικούς πάσχοντες παρατηρείται εκτροπή από τη φυσιολογική ισορροπία της αναλογίας του διαλυτού κλάσματος του RANKL (sRANKL) προς την OPG, με αποτέλεσμα ο λόγος sRANKL/OPG να αυξάνει. Το γεγονός αυτό οφείλεται πρωτίστως στην αύξηση της παραγωγής του RANKL και δευτερευόντως σε πιθανή μικρή μείωση των επιπέδων της OPG. Η προκύπτουσα νέα ισορροπία διαταράσσει δυναμικά την οστική ανακατασκευή, ενισχύοντας υπερβολικά το σκέλος της οστικής απορρόφησης. Αιτιοπαθογενετικά ενοχοποιούνται η αιμοσιδήρωση, παράπλευρες επιδράσεις των φαρμάκων αποσιδήρωσης, η ελάττωση των επιπέδων ανδρογόνων και οιστρογόνων επί συνυπάρχοντος υπογοναδισμού και οι διαταραχές που σχετικά συχνά αναπτύσσονται στον άξονα GH/IGF1.<sup>68,81,99</sup>

#### **1.9.2.7. Λοιπές κυτταροκίνες και αυξητικοί παράγοντες:**

Σημαντικός αριθμός από μελέτες των τελευταίων ετών υποστηρίζουν ότι στον ορό των ασθενών με βΜΑ ανιχνεύονται αυξημένα επίπεδα κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων που ευοδώνουν την οστική απορρόφηση. Φαίνεται μάλιστα τα επίπεδα των παραγόντων αυτών να συσχετίζονται άμεσα τόσο με τη διακύμανση των ΒΔΟΕ που αφορούν στο σκέλος της οστικής απορρόφησης, όσο και με τις τιμές της BMD στη σπονδυλική στήλη των πασχόντων. Οι ουσίες εκείνες που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη αύξηση και έχουν με σαφήνεια ενοχοποιηθεί για την πρόκληση οστικών επιπλοκών στη βΜΑ είναι οι ιντερλευκίνες 1 και 6 (IL-1, IL-6), η σκληροστίνη και οι παράγοντες Dickkopf-1 (Dkk-1) και TNF-α, οι οποίοι προάγουν τον πολλαπλασιασμό και τη δραστηριότητα των οστεοκλαστών, αναστέλλοντας ταυτόχρονα τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών.<sup>69,100,101</sup>

### 1.9.2.8. Ενδοκρινικές και μεταβολικές διαταραχές:

Οι ενδοκρινείς αδένες είναι όργανα με εξαιρετικά αυξημένη ευαισθησία στην κυτταροτοξική επίδραση του πλεονάζοντος φορτίου σιδήρου. Το γεγονός αυτό οδηγεί πολλούς θαλασσαιμικούς στην ανάπτυξη πλήθους ενδοκρινικών επιπλοκών (Πίνακας 2), που επηρεάζουν περαιτέρω τον ήδη διαταραγμένο οστικό τους μεταβολισμό. Οι κυριότερες εξ' αυτών παρατίθενται αμέσως παρακάτω:

(i) Υπογοναδισμός: Σε συνθήκες σημαντικής αιμοσιδήρωσης ή/και μη-επαρκούς αποσιδήρωσης, η λειτουργία τόσο των γοναδοτρόφων κυττάρων της υπόφυσης όσο και των κυττάρων των γονάδων (όρχεις - ωθήκες) εκπίπτει, με αποτέλεσμα να αναπτύσσεται υπογοναδισμός. Σε σχετικές μελέτες αναφέρεται ότι η διαταραχή εμφανίζεται στο 30-55% των ασθενών και των δύο φύλων και συχνά άρχεται από μικρή σχετικά ηλικία.<sup>68,69,102-106</sup> Η ανεπάρκεια των ανδρογόνων στους άνδρες και των οιστρογόνων στις γυναίκες επιδεινώνει δραστικά την ΟΝΘ, καθώς εξαλείφονται οι πολλαπλές ευεργετικές επιδράσεις των συγκεκριμένων ορμονών στον οστικό μεταβολισμό (Πίνακες 3 και 4).<sup>107-114</sup> Παράλληλα, όταν η επιπλοκή εκδηλώνεται σε νεαρές ηλικίες δρα ακόμη πιο επιβαρυντικά, καθώς παραβλάπεται η δυνατότητα απόκτησης της κορυφαίας οστικής μάζας (ΚΟΜ).<sup>68,69,115</sup>

#### **Κυτταρικό Επίπεδο:**

- Αναστολή της διαφοροποίησης και της δραστηριότητας των οστεοκλαστών
- Αύξηση της απόπτωσης των οστεοκλαστών
- Αύξηση του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και της δράσης των οστεοβλαστών
- Επιβράδυνση της απόπτωσης των οστεοβλαστών
- Αλληλεπίδραση με τις ασβεστοτρόπες ορμόνες παραθορμόνη και βιταμίνη-D, με σκοπό της διατήρηση των απαιτούμενων συγκεντρώσεων ασβεστίου στις θέσεις επιμετάλλωσης.

#### **Ιστικό και Κλινικό Επίπεδο:**

- α)** Μείωση της οστικής απορρόφησης και διατήρηση του οστικού σχηματισμού
- β)** Αύξηση οστικής πυκνότητας και ενίσχυση της κορυφαίας οστικής μάζας (ΚΟΜ)
- γ)** Φυσιολογική σκελετική ωρίμανση – μετάλλωση – ανακατασκευή των οστών
- δ)** Κατά μήκος αύξηση οστών
- ε)** Επιτάχυνση ρυθμού αύξησης στην εφηβεία («Growth spurt»)
- στ)** Σύγκλιση των επιφύσεων.
- ζ)** Διατήρηση της οστικής μάζας.

**Πίνακας 3: Οι φυσιολογικές δράσεις των οιστρογόνων στο σκελετό.**<sup>107-111</sup>

Πηγή: Λυρίτης ΓΠ, *Μεταβολικά Νοσήματα των Οστών*. 5<sup>η</sup> Έκδοση.<sup>2</sup>

**Κυτταρικό Επίπεδο:**

- Αρωματοποίηση προς οιστρογόνα
- Μέτρια διέγερση του πολλαπλασιασμού των οστεοβλαστών
- Αύξηση της διαφοροποίησης και αναστολή της απόπτωσης των οστεοβλαστών
- Ευόδωση της σύνθεσης πρωτεϊνών της οστικής θεμέλιας ουσίας
- Αύξηση του ρυθμού απόπτωσης των οστεοκλαστών
- Ευόδωση της ωρίμανσης των χονδροκυττάρων

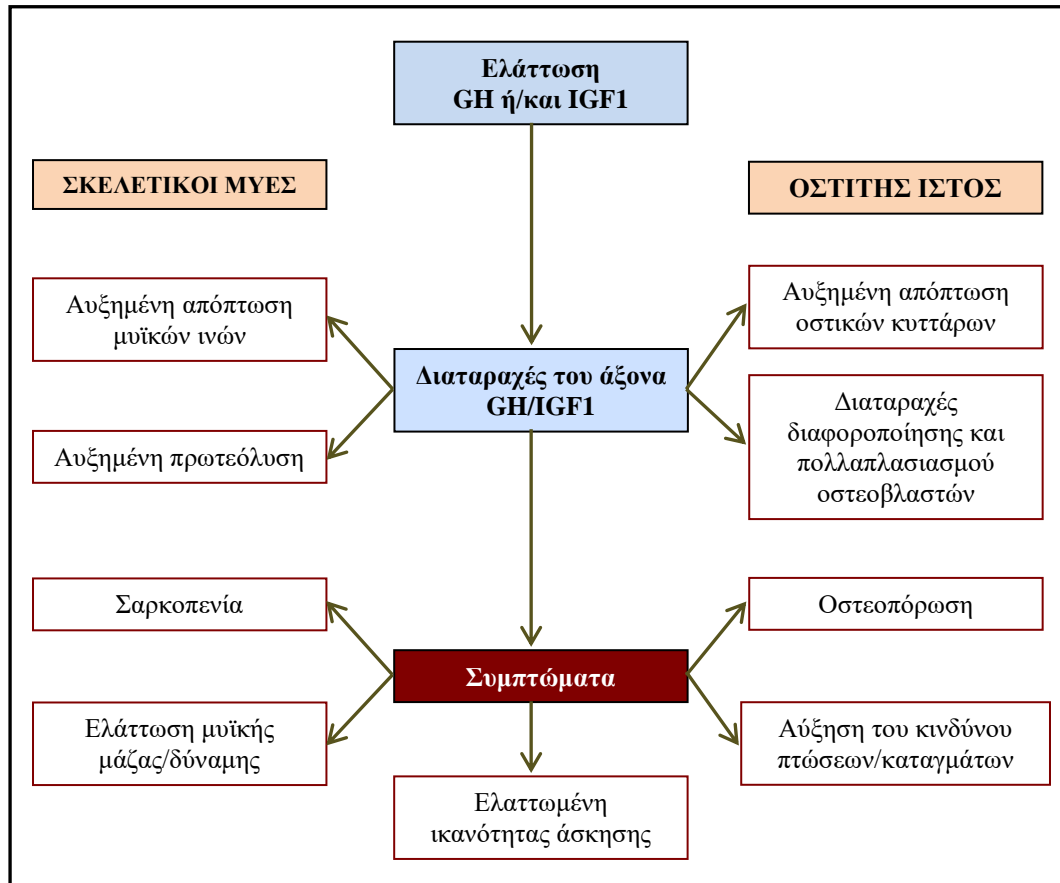
**Ιστικό και Κλινικό Επίπεδο:**

- α) Μείωση της οστικής απορρόφησης
- β) Ενίσχυση της παραγωγής και της περιοστικής εναπόθεση νέου οστού
- γ) Ευόδωση της μετάλλωσης του οστού
- δ) Συμβολή στην κατά μήκος αύξηση και στο αυξημένο μέγεθος των ανδρικών οστών
- ε) Απόκτηση της υψηλής ΚΟΜ που επιτυγχάνεται μετεφηβικά στους άνδρες
- στ) Αύξηση της μυϊκής μάζας και κατ'επέκταση της μηχανικής φόρτισης του σκελετού

**Πίνακας 4: Οι φυσιολογικές δράσεις των ανδρογόνων στο σκελετό.**<sup>107-109,112-114</sup>

*Πηγή: Λυρίτης ΓΠ, Μεταβολικά Νοσήματα των Οστών. 5<sup>η</sup> Έκδοση.<sup>2</sup>*

(ii) Διαταραχή του άξονα GH/IGF1: Οφείλεται σε βλάβη των σωματοτρόπων κυττάρων της υπόφυσης, σε πιθανή συνυπάρχουσα ηπατική δυσπραγία, αλλά και στην αυξημένη έκκριση σωματοστατίνης που ενίοτε διαπιστώνεται στους β-θαλασσαιμικούς. Η συχνότητα της συγκεκριμένης επιπλοκής δεν έχει καθοριστεί μέχρι σήμερα με απόλυτη ακρίβεια. Οι περισσότερες μελέτες αναφέρουν ποσοστά 7,9-15% επί του συνόλου των ασθενών, αν και σαφώς πιο αυξημένες συχνότητες - μέχρι και στο 32% - έχουν επίσης αναφερθεί.<sup>116-124</sup> Εφόσον το σύστημα GH/IGF1 ασκεί ανεπαρκώς τη δράση του, επηρεάζει με ποικίλους μηχανισμούς αρνητικά τη λειτουργία του μυοσκελετικού συστήματος (Εικόνα 15), οδηγώντας σε ελάττωση της έκκρισης OPG και της παραγωγής καλσιτριόλης, σε αναστολή του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και της ωρίμανσης των κυττάρων της οστεοβλαστικής σειράς, σε καταστολή του πολλαπλασιασμού των χονδροκυττάρων στην επιφυσιακή πλάκα, σε ελάττωση της εναπόθεσης θεμέλιας ουσίας σε οστά και χόνδρους, σε γενικότερη αναστολή της φυσιολογικής αύξησης του σκελετού με επιβράδυνση της επιμήκους και ακτινικής ανάπτυξης των οστών και με παρεμπόδιση της εφηβικής επιτάχυνσης της ανάπτυξης, σε αδυναμία απόκτησης ικανοποιητικής ΚΟΜ και σε μείωση της μάζας των γραμμωτών μυών.<sup>116-124</sup>



**Εικόνα 15.** Σχηματική απεικόνιση των μηχανισμών που οδηγούν σε οστεοπόρωση, σαρκοπενία και έκπτωση του επιπέδου φυσικής κατάστασης σε έδαφος ανεπάρκειας του άξονα GH/IGF-1.

*Πηγή: Λυρίτης ΓΠ, Μεταβολικά Νοσήματα των Οστών. 5<sup>η</sup> Έκδοση.<sup>2</sup>*

(iii) Σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ): Ο ΣΔ στη βΜΑ απαντάται στο 7-11% των πασχόντων, εμφανίζει χαρακτηριστικά διαβήτη τύπου-2 και εκδηλώνεται κυρίως από τη δεύτερη δεκαετία της ζωής και έπειτα. Με υψηλότερη συχνότητα απαντώνται οι προδιαβητικές καταστάσεις της διαταραγμένης ανοχής της γλυκόζης (Impaired Glucose Tolerance, IGT) και της διαταραγμένης γλυκόζης νηστείας (Impaired Fasting Glucose, IFG).<sup>125,126</sup> Η επιπλοκή οφείλεται ως επί τω πλείστον στην αιμοσιδήρωση του παγκρέατος και συμμετέχει ενεργά στην παθογένεση της ΟΝΘ με ποικίλους μηχανισμούς. Ενδεικτικά αναφέρονται η ύφεση της οστεοβλαστικής δραστηριότητας, η ελάττωση της ποιότητας της θεμέλιας οστικής ουσίας από τη δράση των προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (AGEs), η παρεμπόδιση επίτευξης ικανοποιητικής ΚΟΜ όταν η επιπλοκή κάνει την εμφάνισή της σε νεαρή ηλικία, η αυξημένη απέκκριση Ca, Mg και P από τα ούρα λόγω της γλυκοζουρίας, καθώς και η

ανάπτυξη διαβητικής νευροπάθειας και οφθαλμοπάθειας που οδηγούν σε ελάττωση της άσκησης, σε ελάττωση της μυϊκής μάζας και σε αύξηση της συχνότητας των πτώσεων.<sup>61,69</sup>

(iv) Υποθυρεοειδισμός: Διαταραχές στη θυρεοειδική λειτουργία αναπτύσσονται στο 10-15% περίπου των ασθενών. Αφορούν σχεδόν εξ' ολοκλήρου σε παρουσία υποκλινικού ή κλινικού υποθυρεοειδισμού και οφείλονται στην τοξική δράση που ασκεί ο σίδηρος στα θυρεοειδοτρόπα κύτταρα της υπόφυσης και στο θυρεοειδή αδένα.<sup>68,69,115</sup> Ο ανεπαρκώς ελεγχόμενος υποθυρεοειδισμός είναι πιθανό να διαταράξει τη φυσιολογική ανάπτυξη των οστών στις μικρότερες ηλικίες, να επηρεάσει αρνητικά το μεταβολισμό του ασβεστίου, αλλά και να επιδεινώσει τυχόν προϋπάρχοντα υπογοναδισμό ή να ευοδώσει την εκδήλωσή του.

(v) Υποπαραθυρεοειδισμός: Αφορά στο 13.5% έως 14.6% των πασχόντων από βΜΑ και μπορεί να οδηγήσει σε ανάπτυξη σοβαρής υπασβεστιαμίας, σε εμφάνιση ή επιδείνωση υπερασβεστουρίας και σε ανεπαρκή σχηματισμό 1,25(OH)<sub>2</sub>D.<sup>127,128</sup>

(vi) Ανεπάρκεια βιταμινών: Η βΜΑ συνυπάρχει συχνά με ηπατική δυσπραγία, διαταραχές της νεφρικής λειτουργίας και δυσασπορρόφηση, οφειλόμενη σε αιμοσιδήρωση του γαστρεντερικού σωλήνα ή ακόμη και σε νευροπάθεια του αυτονόμου νευρικού συστήματος επί αρρυθμιστού ΣΔ. Σε συνδυασμό με τις επιδράσεις των φαρμάκων αποσιδήρωσης, οι ως άνω καταστάσεις έχουν κριθεί υπεύθυνες για την πολύ συχνά εμφανιζόμενη ανεπάρκεια των βιταμινών D και C σε θαλασσαιμικούς πάσχοντες. Ενδεικτικά, τιμές 25OHD < 20 ng/ml έχουν περιγραφεί σε ποσοστά άνω του 42% και μεταξύ 20-29 ng/ml στο 30% Αμερικανών πασχόντων κυρίως ασιατικής και καυκάσιας καταγωγής.<sup>69,88,93,129-131</sup>

(vii) Διαταραγμένη ομοιοστασία μετάλλων: Το ένα τρίτο περίπου των ενηλίκων ασθενών με βΜΑ αναπτύσσει **υπερασβεστιουρία**, συχνά επιπλεκόμενη με νεφρολιθίαση (η οποία εκτιμάται ότι παρουσιάζεται έως και στο 18% των πασχόντων).<sup>87</sup> Μάλιστα, τα ποσοστά αυτά φαίνεται ότι αυξάνουν πολύ περισσότερο όταν χορηγείται ως θεραπεία αποσιδήρωσης η δεφερασιρόξη και ειδικά στις υψηλότερα χρησιμοποιούμενες δόσεις. Η παθογένεια της διαταραχής είναι πολυπαραγοντικής αρχής και για την εκδήλωσή της έχουν ενοχοποιηθεί η χρόνια υποξία, οι συχνές μεταγγίσεις με τη νεφρική υπερδιήθηση που επιφέρουν, η άμεση τοξικότητα του σιδήρου στο νεφρό, τα φάρμακα αποσιδήρωσης, ο τυχόν

συνυπάρχων υποπαραθυροειδισμού, η διαταραχή των επιπέδων της πρωτεΐνης Klotho στον ορό κ.α.)<sup>95,96,132-135</sup> **Υπερφωσφατουρία** έχει επίσης αναφερθεί στη βΜΑ σε πολύ μικρότερα ποσοστά. Έχει συσχετιστεί κυρίως με την αγωγή αποσιδήρωσης, ενώ είναι πιθανό και η ίδια η αιμοσιδήρωση να προδιαθέτει στην εκδήλωσή της, εάν τελικά αποδειχτεί ότι τα χρονίως αυξημένα επίπεδα σιδήρου στον οργανισμό των πασχόντων μπορούν να προάγουν την εμφάνιση φωσφατουρίας μέσω αύξησης του FGF23.<sup>28,80,136</sup> Εκτός των ανωτέρω, **αλβουμινουρία** και **υπερουρικοζουρία** παρατηρούνται επίσης συχνότερα στη βΜΑ από ότι στο γενικό πληθυσμό. Η **υπασβεστιαμία** αποτελεί ακόμη μία εκδήλωση που αναπτύσσεται συχνότερα στην αιματολογική αυτή νόσο και οφείλεται κυρίως στον υποπαραθυροειδισμό. Τέλος, έχουν παρατηρηθεί χαμηλά επίπεδα και άλλων μετάλλων στο αίμα των ασθενών, όπως είναι το **μαγνήσιο**, ο **χαλκός** και ο **ψευδάργυρος**, καταστάσεις που αποδίδονται τόσο στη δράση των σκευασμάτων αποσιδήρωσης, όσο και στη δυσαπορρόφηση του ΓΕΣ.<sup>69,93,137,138</sup>

### 1.9.3. Διαγνωστική προσέγγιση

#### **1.9.3.1. Κλινική εικόνα:**

Η εμφάνιση οστικών διαταραχών από μικρή σχετικά ηλικία αποτελεί μία ιδιαίτερη πραγματικότητα στους ασθενείς με βΜΑ. Οι σημαντικές αλλοιώσεις από το σκελετό και η μειωμένη BMD κάνουν αισθητή την παρουσία τους από τα πρώτα κιόλας έτη της εφηβείας, επηρεάζοντας δραματικά τη δυνατότητα απόκτησης ικανοποιητικής ΚΟΜ. Οι πρώιμες αυτές κλινικές εκδηλώσεις των οστών εμπλουτίζονται περαιτέρω στις επόμενες δεκαετίες, εξαιτίας και της σημαντικής παράτασης του προσδόκιμου επιβίωσης των πασχόντων. Τα σημαντικότερα στοιχεία που συνθέτουν την κλινική εικόνα της ΟΝΘ παρατίθενται στη συνέχεια.<sup>2,71,63,82-85</sup>

**(α) Καθυστέρηση της σωματικής ανάπτυξης.** Οφείλεται κατά κύριο λόγο στις ενδοκρινικές ανεπάρκειες που αναφέρθηκαν παραπάνω, αλλά και σε αρνητικές επιδράσεις των φαρμάκων αποσιδήρωσης. Ο χηλικός παράγοντας που έχει κυρίως ενοχοποιηθεί για τη συγκεκριμένη διαταραχή είναι η δεσφεριοξαμίνη, ιδίως όταν αυτή χορηγείται από πολύ μικρές ηλικίες και σε μεγαλύτερες των απαιτούμενων δόσεις. Πιο συγκεκριμένα, έχει αποδειχτεί ότι η DFO μπορεί να οδηγήσει σε δυσπλασίες εντοπιζόμενες στο επίπεδο των επιφυσιακών πλακών, σε καθυστέρηση της οστικής ηλικίας και κατά συνέπεια σε χαμηλό τελικό ανάστημα.



**(β) Παραμορφώσεις των οστών του κρανίου.** Πρόκειται για μορφολογικές αλλοιώσεις που θεωρούνται χαρακτηριστικές της ανεπαρκώς αντιμετωπιζόμενης θαλασσαιμίας και αφορούν σε ανάπτυξη χαρακτηριστικού προσωπείου «δίκην τρωκτικού», με προέχοντα ζυγωματικά, εισοχή της βάσης της ρινός, διόγκωση της άνω γνάθου και λοξές βλεφαρικές σχισμές (Εικόνα 16B). Οφείλονται κυρίως στην έντονη υπερπλασία και υπέρμετρη επέκταση του ερυθροποιητικού μυελού λόγω της χρόνιας υποξίας και σπάνια απαντώνται στις μέρες μας, καθώς οι ασθενείς διατηρούν πλέον σημαντικά υψηλότερα επίπεδα αιμοσφαιρίνης από ότι συνέβαινε στο παρελθόν.

**(γ) Αλλοιώσεις της σπονδυλικής στήλης.** Η αμφίκυκλη παραμόρφωση και η επιπέδωση των σπονδύλων, η εκφύλιση των μεσοσπονδυλίων δίσκων, η παρουσία σκολίωσης, η κύφωση και τα αυξημένα λόγω οστεοπόρωσης σπονδυλικά κατάγματα, αποτελούν συνήθεις καταστάσεις στους θαλασσαιμικούς ασθενείς (Εικόνα 16A.) Οδηγούν μάλιστα σχετικά συχνά σε οσφυαλγία από πίεση των νευρικών ριζών και σε ήπιας έως μέτριας έντασης μυοσκελετικό άλγος. Τα φαινόμενα αυτά - μολονότι είναι περισσότερο συχνά και πιο εμφανή στους ασθενείς μεγαλύτερων ηλικιών - μπορούν να κάνουν την εμφάνισή τους ακόμη και από τη δεύτερη δεκαετία της ζωής.

**(δ) Οστεοπενία και Οστεοπόρωση.** Η ελάττωση της οστικής μάζας αποτελεί την πιο ευρέως γνωστή οστική επιπλοκή της νόσου. Μπορεί να αφορά σε όλα σχεδόν τα οστά των πασχόντων (Εικόνα 16A), είναι πολύ συχνά αρκετά σοβαρή και οδηγεί - όπως ήδη αναφέρθηκε - σε αυξημένη συχνότητα καταγμάτων τόσο στα οστά του αξονικού, όσο και στα οστά του περιφερικού σκελετού.

**(ε) Άλγος των αρθρώσεων.** Ποικίλες εκδηλώσεις από τις αρθρώσεις με προεξάρχουσα την αρθραλγία απαντώνται συχνότερα στη βΜΑ από ότι στο γενικό πληθυσμό. Είναι συνήθως ήπιας έως μέτριας έντασης φαινόμενα και οφείλονται (i) σε εκφυλιστικές αλλοιώσεις των χόνδρων και των αρθρικών υμένων λόγω συσσώρευσης σιδήρου ή/και ουρικού οξέος σε αυτούς, (ii) σε καταπονήσεις των αρθρικών χόνδρων επί παρουσίας αλλοιωμένων από τη νόσο οστών, (iii) σε μεταβολικές διαταραχές του ίδιου του χόνδρινου ιστού, καθώς και (iv) στη χρήση των φαρμάκων αποσιδήρωσης, ιδίως κατά τις πρώτες εβδομάδες από την έναρξη της χορήγησής τους.<sup>84,85</sup>

### 1.9.3.2. Ακτινολογική διερεύνηση και απεικονιστικά ευρήματα:

(α) *Απλές ακτινογραφίες.* Παθολογικά ευρήματα στα θαλασσαιμικά οστά εντοπίζονται ακτινολογικά από το τέλος κιόλας της βρεφικής ηλικίας. Οι πληροφορίες που αντλούνται από τον απλό απεικονιστικό έλεγχο είναι ιδιαίτερα σημαντικές και ως εκ τούτου αυτός κατέχει βασικό ρόλο στο διαγνωστικό έλεγχο των ασθενών με ΟΝΘ. Οι συχνότερα απεικονιζόμενες σκελετικές αλλοιώσεις των πασχόντων παρουσιάζονται στην Εικόνα 16.<sup>63,139,140</sup>



**Εικόνα 16:** Χαρακτηριστικά ευρήματα στον απλό ακτινολογικό έλεγχο θαλασσαιμικών ασθενών με ΟΝΘ: (Α). *Μακρά οστά:* Οστεοπενία μακρών οστών με αδρή απεικόνιση του συστήματος των οστεοδοκίδων, λείπτυνση του φλοιού, αλλοιώσεις ραχίτιδας με κύρτωση των οστών του αντιβραχίου, αμφίκυρτη διόγκωση δακτυλικών φαλάγγων, αύξηση των μυελικών κοιλοτήτων και διεύρυνση των μεσοδοκιδωδών διαστημάτων από την επέκταση του ερυθροποιητικού μυελού. (Β). *Κρανίο:* Τυπική πάχυνση και διεύρυνση του θόλου του κρανίου, πάχυνση της διπλής με «ψυκτροειδή» παρυφή, υπερπλασία των οστών του προσωπικού κρανίου και της άνω γνάθου με συνοδές αλλοιώσεις της φατνιακής ακρολοφίας (εικόνα «τρωκτικού»), εξάλειψη παραρρινίων κόλπων και ελαττωμένη πνευμάτωση των μαστοειδών αποφύσεων. *Αξονικός σκελετός:* Παρουσία οστεοπενίας με αδρή

διαμόρφωση της σπογγώδους μοίρας, έντονη απεικόνιση του φλοιού και υποφλοιώδεις διαυγάσεις στα οστά του κορμού και της πυέλου. Παραμορφώσεις του σχήματος των σπονδύλων, συχνά με πλατυσπονδυλία και αμφίκοιλη παραμόρφωση αυτών.

*Πηγή: P.E.S.Palmer and M.M.Reeder. The Imaging of Tropical Diseases: With Epidemiological, Pathological and Clinical Correlation. 2<sup>nd</sup> Edition, 2001, British Institute of Radiology / Αρχείο A.Chandrasahsan Johnson, Tulsa, Oklahoma.<sup>139</sup>*

**(β)** Εκτίμηση της οστικής πυκνότητας μέσω απορροφησιμετρίας με διπλή ενεργειακή δέσμη φωτονίων-X (DXA). Η DXA αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο που χρησιμοποιείται σήμερα για τη διάγνωση των διαταραχών της οστικής πυκνότητας στην ΟΝΘ. Εντούτοις, στους πάσχοντες από βΜΑ η τεχνική κρίνεται λιγότερο αξιόπιστη από ότι στο γενικό πληθυσμό αναφορικά με την ακριβή εκτίμηση της απώλειας οστικής μάζας - την οποία συνήθως υπερεκτιμά - λόγω ιδιοτεροτήτων της νόσου, όπως είναι η πιθανή συνυπάρχουσα ραχίτιδα ή οστεομαλακία, η υπερπλασία του ερυθροποιητικού μυελού, το χαμηλό ανάστημα, οι οστικές παραμορφώσεις, αλλά και τα αυξημένα επίπεδα σιδήρου στο ήπαρ και στο μυοκάρδιο.<sup>141-143</sup> Παρόλα αυτά, η DXA χρησιμοποιείται αρκετά συχνά, κυρίως ως μέθοδος παρακολούθησης της εξέλιξης της ΟΝΘ και αξιολόγησης των εκάστοτε θεραπευτικών παρεμβάσεων. Συνιστάται μάλιστα ο πρώτος έλεγχος να εκτελείται λίγο πριν την ενηλικίωση και να συνεκτιμώνται οι μετρήσεις τόσο από την οσφυϊκή μοίρα της ΣΣ, όσο και από το μη-επικρατούν ισχίο. Επανάληψη του ελέγχου συστήνεται ανά έτος ή κατά αραιότερα διαστήματα, με βάση το κάθε περιστατικό.<sup>141-143</sup> Τέλος επισημαίνεται ότι επειδή πολύ συχνά οι ασθενείς με βΜΑ είναι άνδρες κάτω των 50 ετών ή προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, στις περιπτώσεις αυτές θα πρέπει ο έλεγχος να στηρίζεται κυρίως στην εκτίμηση του Z-score έναντι του T-score.<sup>69,141-143</sup>

**(γ)** Ο ρόλος της περιφερικής ποσοτικής υπολογιστικής τομογραφίας (pQCT). Με βάση τα δεδομένα πολυάριθμων και σημαντικών μελετών, η pQCT φαίνεται να υπερέχει σημαντικά έναντι της DXA τόσο ως προς την αξιοπιστία όσο και προς την ακρίβεια εκτίμησης του βαθμού των οστικών βλαβών στη βΜΑ. Σε αυτό συμβάλλουν οι γνωστές ιδιαιτερότητες της μεθόδου στην εκτίμηση της γεωμετρίας και της αντοχής του οστού, η ξεχωριστή εκτίμηση της σπογγώδους και της φλοιώδους

μοίρας, αλλά και η ελαττωμένη παρουσία σιδήρου στα περιφερικά οστά τα οποία μελετώνται στην pQCT.<sup>79,143-145</sup>

(δ) *Μαγνητική τομογραφία (MRI)*. Η MRI ως εξέταση εκλογής για την απεικόνιση του μυελού των οστών, απεικονίζει λεπτομερώς τις οστικές βλάβες που οφείλονται στην υπέρμετρη επέκτασή του. Επιπρόσθετα, μέσω ειδικών καινοτόμων εφαρμογών που έχουν αναπτυχθεί ιδίως κατά την τελευταία εικοσαετία, η MRI παρέχει πλέον ακριβείς πληροφορίες για την εναπόθεση σιδήρου σε όργανα όπως είναι το ήπαρ, η καρδιά και οι ενδοκρινείς αδένες. Μολονότι τα συγκεκριμένα δεδομένα δεν αφορούν άμεσα στο σκελετό, οι πληροφορίες που προσφέρουν είναι πολύτιμες σε επίπεδο μεταβολισμού των οστών, καθώς αφενός μεν ο οστίτης ιστός επηρεάζεται από τη λειτουργική κατάσταση των συγκεκριμένων οργάνων, αφετέρου δε οι τιμές της MRI καθοδηγούν τους θεράποντες ιατρούς ως προς την εξατομίκευση του σχήματος αποσιδήρωσης, το οποίο με τη σειρά του σχετίζεται άμεσα με τη λειτουργία των οστών.<sup>2</sup>

#### **1.9.3.3. Εργαστηριακός έλεγχος:**

Η εργαστηριακή εκτίμηση και παρακολούθηση της ONΘ οφείλει να είναι μακροχρόνια και απόλυτα προσαρμοσμένη στα ιδιαίτερα δεδομένα της βΜΑ και των επιπλοκών αυτής. Ο έλεγχος διενεργείται με σκοπό την πρόληψη, τη διάγνωση, την παρακολούθηση των οστικών διαταραχών και την αξιολόγηση της εκάστοτε εφαρμοζόμενης θεραπείας. Τα επιμέρους στοιχεία του ειδικού εργαστηριακού ελέγχου αποτελούν:<sup>2,68,69</sup> (α) Ο βασικός βιοχημικός έλεγχος που πρέπει να εκτελείται κάθε έξι μήνες - ή και συχνότερα όταν απαιτείται - και να περιλαμβάνει πάντοτε τα επίπεδα Ca, P, Mg και αλβουμίνης στον ορό, καθώς και τις παραμέτρους της ηπατικής και νεφρικής λειτουργίας. Η εκτίμηση των επιπέδων της 25OHD και της φερριτίνης είναι επίσης απαραίτητη. (β) Ο εξειδικευμένος ενδοκρινολογικός έλεγχος που συστήνεται να λαμβάνει χώρα τουλάχιστον κάθε έτος και που αφορά σε αξιολόγηση όλων των αδένων που μπορεί να επηρεαστούν από την αιμοσιδήρωση (βλ. ενότητα 1.9.2.8). (γ) Η συλλογή ούρων 24ώρου για προσδιορισμό των επιπέδων ασβεστίου, κρεατινίνης και λευκωμάτων σε αυτά. (δ) Οι ΒΔΟΕ, οι οποίοι χρησιμοποιούνται στην ONΘ με τα ίδια κριτήρια και τις ίδιες ενδείξεις που ισχύουν και για τις υπόλοιπες διαταραχές του μεταβολισμού των οστών.<sup>2</sup>

#### 1.9.4. Σύγχρονη θεραπευτική προσέγγιση

Όπως ήδη έχει τονιστεί, η ΟΝΘ αποτελεί μια ιδιαίτερα πολύπλοκη κλινική οντότητα, καθώς η ανάπτυξή της αποδίδεται σε πολλαπλές αιτίες και διαταραχές. Κατά συνέπεια, η μεθοδική και ολοκληρωμένη αντιμετώπισή της οφείλει ιδανικά να στρέφεται προς όλες τις παραμέτρους που επηρεάζουν το σκελετό στη συγκεκριμένη αιματολογική νόσο.<sup>138</sup> Στις μέρες μας έχει γίνει πλέον κατανοητό πως η οστική φροντίδα και οι όποιες θεραπευτικές παρεμβάσεις πρέπει να ξεκινούν από νωρίς και να αναπροσαρμόζονται συνεχώς, ανάλογα με τις αλλαγές των κλινικών δεδομένων για τον κάθε πάσχοντα στην πορεία του χρόνου. Η σύγχρονη αυτή θεραπευτική προσέγγιση της οστικής νόσου στη β-θαλασσαιμία περιλαμβάνει τα παρακάτω επίπεδα προληπτικών και θεραπευτικών μέτρων που πρέπει να συνδυάζονται ιδανικά μεταξύ τους.

##### **1.9.4.1. Γενικά μέτρα και τρόπος ζωής:**

Στη βΜΑ είναι αξιοσημείωτος ο βαθμός διατήρησης ή ακόμη και βελτίωσης της οστικής μάζας, όταν οι ασθενείς υιοθετούν έναν υγιεινό τρόπο ζωής και ακολουθούν κατάλληλες οδηγίες διατροφής, άσκησης και συμπεριφορών που βελτιώνουν τον οστικό τους μεταβολισμό. Στα γενικά μέτρα που πρέπει να εφαρμόζονται σε όλους σχεδόν τους θαλασσαιμικούς πάσχοντες, περιλαμβάνονται:<sup>69,137,146,147</sup>

(i) Η καθημερινή επαρκής πρόσληψη γαλακτοκομικών - ει δυνατόν εμπλουτισμένων σε Ca και βιταμίνη D - σε ποσότητες που εμπίπτουν στα πρότυπα του φυσιολογικού πληθυσμού με βάση την ηλικία και κατανεμημένων ομοιόμορφα μέσα στο 24ωρο για καλύτερη απορρόφηση. Παράλληλα, προτείνεται και η ήπια έκθεση σημαντικού τμήματος του δέρματος στον ήλιο για περίπου 20 λεπτά ημερησίως. Με τα ως άνω μέτρα επιδιώκεται η φυσική ενίσχυση του οργανισμού με τα απαραίτητα για το σκελετό μέταλλα και βιταμίνες.

(ii) Περιορισμός της υπερβολικής κατανάλωσης χλωριούχου νατρίου, καφεΐνης, λευκωμάτων και αναψυκτικών τύπου κόλα, τα οποία ως γνωστό σε μεγάλες ποσότητες αυξάνουν την αποβολή ασβεστίου από τα ούρα.

(iii) Περιορισμός της κατανάλωσης αλκοόλ και διακοπή καπνίσματος. Εκτός των υπολοίπων επιπλοκών που μπορεί να προκαλέσουν οι συγκεκριμένες συνήθειες, επηρεάζουν αρνητικά την οστική υγεία, διαταράσσοντας τη φυσιολογική λειτουργία των οστικών κυττάρων και το μεταβολισμό του ασβεστίου.<sup>130,148-151</sup>

(iv) Υιοθέτηση εξατομικευμένων προγραμμάτων άσκησης - σε συνεννόηση με τον αιματολόγο και τον καρδιολόγο - ώστε να ευοδώνεται η οστική παραγωγή. Ιδανικά, η άσκηση θα πρέπει να εκτελείται τουλάχιστον 30 λεπτά ημερησίως για πέντε ημέρες την εβδομάδα. Στο γενικό πληθυσμό, τα οφέλη της άσκησης στην οστεοπόρωση είναι αδιαμφισβήτητα. Στη βΜΑ είναι ακόμη περισσότερα, καθώς εκτός της άμεσης θετικής επίδρασης στον οστικό μεταβολισμό, η άσκηση βελτιώνει την καρδιαγγειακή λειτουργία, αλλά και το ενδοκρινολογικό και μεταβολικό προφίλ των ασθενών, καταστάσεις που με τη σειρά τους επηρεάζουν την οστική υγεία.<sup>68,69,81</sup>

#### **1.9.4.2. Θεραπεία αιματολογικής νόσου και επιπλοκών αυτής**

**I.** Το μέτρο των τακτικών μεταγγίσεων αίματος με στόχο τη διατήρηση της αιμοσφαιρίνης στους θαλασσαιμικούς ασθενείς σε επίπεδα άνω των 9,0-10,5 g/L έχει υιοθετηθεί πλέον από όλα σχεδόν τα κέντρα μεταγγίσεως παγκοσμίως.<sup>61</sup> Εκτός από τα καρδιαγγειακά και αιματολογικά οφέλη που επιτυγχάνονται με αυτόν τον τρόπο, ευνοείται ιδιαίτερα και η οστική υγεία. Πιο συγκεκριμένα, το ερέθισμα της χρόνιας σοβαρής υποξίας παύει να υφίσταται και ο ερυθροποιητικός μυελός των οστών σταματά να διεγείρεται και να διογκώνεται. Έτσι, οι οστικές δοκίδες και τα σπογγώδη οστά δεν υφίστανται τις αλλοιώσεις που αναπτύσσονταν σε παλαιότερες δεκαετίες και κατά συνέπεια η αρχιτεκτονική του οστού και η οστική μάζα διατηρούνται σε πολύ καλύτερα επίπεδα.<sup>68,69,152</sup>

**II.** Η αιμοσιδήρωση αποτελεί τη σοβαρότερη επιπλοκή στη βΜΑ. Οι τακτικές μεταγγίσεις οδηγούν δυστυχώς σε υπερβολική εναπόθεση σιδήρου στους ιστούς, η κυτταροτοξική επίδραση του οποίου καθιστάται υπεύθυνη για την ανάπτυξη δεκάδων σοβαρών έως θανατηφόρων επιπλοκών από πολλαπλά συστήματα.<sup>65,66</sup> Λύση στο πρόβλημα αυτό έδωσαν από τη δεκαετία του 1970 και έπειτα τα φάρμακα αποσιδήρωσης. Όπως ήδη αναφέρθηκε, σήμερα είναι διαθέσιμοι στην κλινική πράξη τρεις ξεχωριστοί χημικοί παράγοντες αποσιδήρωσης, οι DFO, DFP και DFX, ενώ εργαστηριακά αναπτύσσονται ακόμη περισσότεροι. Στόχος είναι η επίτευξη ενός απόλυτα εξατομικευμένου και ιδανικού σχήματος αποσιδήρωσης για κάθε πάσχοντα, ώστε να αποβάλλεται σχεδόν ολοκληρωτικά ο περιττός σίδηρος από τους ιστούς. Οι μεταβολές της φερριτίνης στο αίμα και των τιμών T2\* στις εξειδικευμένες τεχνικές MRI για την εκτίμηση του ιστικού σιδήρου σε ήπαρ και μυοκάρδιο, κατευθύνουν περαιτέρω τους θεράποντες ιατρούς σε συνεχείς κατάλληλες αναπροσαρμογές των συγκεκριμένων σχημάτων θεραπείας.<sup>65-67</sup>

Η απομάκρυνση της περίσσειας σιδήρου εκτός των άλλων και από τον ίδιο τον οστίτη ιστό δρα εξαιρετικά ευνοϊκά στην οστική υγεία, λόγω της ήδη περιγραφείσας βλαπτικής επίδρασης του μετάλλου στα οστικά κύτταρα. Επιπρόσθετα, η επιτυχής αποσιδήρωση οδηγεί σε βελτίωση της λειτουργίας των ενδοκρινών αδένων και σε ικανοποιητική παραγωγή όλων των ορμονών που επηρεάζουν θετικά το μεταβολισμό των οστών. Υπάρχουν πολλές μελέτες και αναφορές περιστατικών κατά τα τελευταία έτη ακόμη και για πλήρη αναστροφή ενδοκρινοπαθειών όπως ο υποθυρεοειδισμός, ο υποπαραθυρεοειδισμός, ο υπογοναδισμός και ο ΣΔ.<sup>153,154</sup> Οι ως άνω παρατηρήσεις επιβεβαιώνονται και από μία σχετικά πρόσφατη μελέτη που ήρθε στο φως το 2014 από τους Casale M. και συν, οι οποίοι μελέτησαν τις θετικές επιδράσεις ενός εκ των φαρμάκων αποσιδήρωσης (DFX) μετά από ελεγχόμενη χορήγησή του για 3 έως 10 έτη, σε επίπεδο ενδοκρινών αδένων και οστών. Εκτός των άλλων διαπίστωσαν στατιστικά σημαντική βελτίωση στη BMD της σπονδυλικής στήλης κατά τη διάρκεια χορήγησης του φαρμάκου ( $p < 0.001$ ), τάση βελτίωση στη BMD του ισχίου που όμως δεν κατόρθωσε να χαρακτηριστεί στατιστικά σημαντική ( $p = 0.2$ ) και μείωση του ποσοστού ασθενών με οστεοπόρωση στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης (ΟΜΣΣ). Επιπλέον, τεκμηρίωσαν ότι οι συγκεκριμένες οστικές επιδράσεις ήταν ανεξάρτητες από επιδράσεις οποιασδήποτε αντιοστεοπορωτικής αγωγής και οφείλονταν αποκλειστικά στην επιτυχή μακροχρόνια αποσιδήρωση.<sup>155</sup>

Από την άλλη μεριά, όπως επισημάνθηκε παραπάνω, δεν είναι σπάνιο φαινόμενο η χωρίς έλεγχο, υπερβολική ή λανθασμένη χρήση των σκευασμάτων αποσιδήρωσης να επιδεινώσει σημαντικά τον οστικό μεταβολισμό και την οστική πυκνότητα. Με βάση τα ανωτέρω, η ορθολογική και εξατομικευμένη χρήση των σκευασμάτων αποσιδήρωσης μετά από αξιολόγηση (α) της κλινικής κατάστασης κάθε αρρώστου, (β) των επιπέδων φερριτίνης στον ορό και (γ) των μετρήσεων στις ειδικές τεχνικές MRI για τον προσδιορισμό της εναπόθεσης σιδήρου στα όργανα, είναι η στρατηγική που προτείνεται σήμερα, αρχικά για να βελτιώσει και στη συνέχεια για να διατηρήσει τόσο το σκελετό, όσο και το σύνολο του οργανισμού των πασχόντων από βΜΑ, στην καλύτερη κατά το δυνατόν κατάσταση.<sup>69,88,93-96</sup>

**III.** Η πρόληψη και η θεραπεία της λοιπής συννοσηρότητας των θαλασσαιμικών ασθενών είναι επίσης μία κομβική παράμετρος που όταν γίνεται επιτυχώς ευνοεί χωρίς καμία αμφιβολία τη σκελετική τους υγεία. Επιπλοκές όπως η καρδιακή ανεπάρκεια - που ευτυχώς στις μέρες μας αναπτύσσεται όλο και λιγότερο συχνά - και η ηπατική δυσπραγία σε έδαφος ηπατικής ίνωσης λόγω της αιμοσιδήρωσης ή λόγω

της μακροχρόνιας επίδρασης ηπατοτρόπων ιών (π.χ. ηπατίτιδες Β και C) αποτελούν δύσκολα ρυθμιζόμενες οντότητες, που εκτός του ότι μπορεί να γίνουν απειλητικές για τη ζωή, επιδρούν αρνητικά και σε επίπεδο οστίτη ιστού. Η παρακολούθηση των πασχόντων από εξειδικευμένους στις ιδιαιτερότητες της νόσου καρδιολόγο και ηπατολόγο κρίνεται σήμερα απαραίτητη.<sup>68,69</sup> Επιπλέον, όπως ήδη τονίστηκε επανειλημμένα, όλες σχεδόν οι ορμονικές ανεπάρκειες οδηγούν σταδιακά σε σημαντικές οστικές βλάβες. Συνεπώς, η επιτυχής ρύθμιση των ενδοκρινικών αυτών διαταραχών ευνοεί εξαιρετικά εκτός των άλλων και την ΟΝΘ. Μία ιδιαίτερη αναφορά θα πρέπει να γίνει για τη συνηθέστερη ενδοκρινική επιπλοκή που απαντάται στη βΜΑ, τον υπογοναδισμό. Έχει πλέον τεκμηριωθεί ότι ο υπογοναδισμός και η αντιμετώπισή του μέσω κατάλληλης ορμονικής υποκατάστασης επιδρούν σημαντικά στη διαμόρφωση της οστικής πυκνότητας και στην επίπτωση καταγμάτων στο γενικό πληθυσμό.<sup>156</sup> Ανάλογες μελέτες σε θαλασσαιμικούς ασθενείς έχουν αποδείξει τα οφέλη της ορμονικής υποκατάστασης στη βελτίωση της οστικής μάζας, αν και δεν υπάρχουν ακόμη σαφή δεδομένα για την επίδραση στην εμφάνιση καταγμάτων.<sup>103</sup> Μία ακόμη ιδιαιτερότητα της νόσου είναι ότι οι υπογοναδικοί πάσχοντες από βΜΑ, μολονότι ευνοούνται σημαντικά από τη χορήγηση της θεραπείας ορμονικής υποκατάστασης (Hormone Replacement Therapy, HRT), δεν κατορθώνουν να βελτιώσουν τη BMD στον ίδιο βαθμό με τους μη-θαλασσαιμικούς ασθενείς με υπογοναδισμό υπό την ίδια αγωγή.<sup>103,157</sup> Επίσης, εξαιτίας της γενικότερης συννοσηρότητας στη β-θαλασσαιμία, τα σχετικά χρησιμοποιούμενα σκευάσματα υποκατάστασης των γοναδικών ορμονών πρέπει να χρησιμοποιούνται με ιδιαίτερη προσοχή. Έτσι, λόγω των ηπατικών, καρδιολογικών και αγγειακών διαταραχών καλό είναι να προτιμώνται οι ασφαλέστερες, διαδερμικά χορηγούμενες μορφές ανδρογόνων και οιστρογόνων και όχι οι POS ή ενδομυϊκές μορφές.<sup>158</sup> Επίσης, η δοσολογία των ορμονών αυτών πρέπει να είναι η μικρότερη δυνατή ανά πάσχοντα, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η θετική επίδραση στα οστά και να ελαχιστοποιείται ο κίνδυνος για περαιτέρω επιπλοκές. Τέλος, οι ενδείξεις και το διάστημα χορήγησης πρέπει επίσης να εκτιμώνται προσεκτικά και να αναπροσαρμόζονται ανά διαστήματα, καθώς διαφοροποιούνται αναλόγως της ηλικίας, της παρουσίας θρομβοφιλίας, του ιστορικού σπληνεκτομής (όταν αυτή προκαλεί μεγάλη αύξηση του αριθμού των θρομβοκυττάρων και υπερπηκτικές καταστάσεις), διαβήτη και λοιπών παθολογικών καταστάσεων.<sup>68,159</sup> Αναφορικά με τη διαταραχή του άξονα GH/IGF-1, επισημαίνεται ότι οι επιδράσεις της χορήγησης ανασυνδυασμένης GH σε ενηλίκους πληθυσμούς



θαλασσαιμικών ασθενών δεν έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα. Ως εκ τούτου, η ορμόνη πρέπει να χορηγείται μόνο εφόσον πληρούνται οι ενδείξεις χρησιμοποίησής της στην παιδική ηλικία.<sup>138</sup>

#### **1.9.4.3. Έλεγχος υπερασβεστιουρίας**

Όπως ήδη αναφέρθηκε στο κεφάλαιο της παθοφυσιολογίας, η υπερασβεστιουρία αποτελεί μία εξαιρετικά συνηθισμένη παθολογική κατάσταση που απαντάται στο ένα τρίτο περίπου των ασθενών με βΜΑ, με το ποσοστό αυτό να αυξάνει σημαντικά όταν ο υπό μελέτη πληθυσμός αφορά σε ενήλικες πάσχοντες θεραπευόμενους με DFXη σε μέτριες και αυξημένες δόσεις. Για τον έλεγχο της διαταραχής προτείνεται κατ' αρχήν η εφαρμογή των διατροφικών μέτρων που μειώνουν των απέκκριση ασβεστίου στα ούρα και αφορούν σε καλή ενυδάτωση, αποφυγή υπερβολικής κατανάλωσης άλατος, λευκωμάτων, καφέ και αναψυκτικών. Ειδικά όσον αφορά στην πρόσληψη Ca, αυτή δε θα πρέπει να περιορίζεται εντελώς, αλλά να κυμαίνεται σε 800-1000 mg ημερησίως, κατά προτίμηση με τις τροφές και κατανεμημένα ομαλά στα γεύματα.<sup>138</sup> Χωρίς λήψη Ca η οστική υγεία θα επιβαρυνθεί σημαντικά, ενώ επιπλέον κινητοποιείται μηχανισμός για την ανάπτυξη υπεροξαλουρίας και το σχηματισμό λίθων οξαλικού.<sup>160</sup> Ταυτόχρονα, δε θα πρέπει να περιορίζεται ούτε η πρόσληψη βιταμίνης D, αλλά να προσλαμβάνεται και αυτή σε δόση ικανή να διατηρεί τα επίπεδα της 25OHD στις κατώτερες φυσιολογικές τιμές.<sup>161</sup>

Όταν τα ως άνω μέτρα δεν επαρκούν και η υπερασβεστιουρία παραμένει, συστήνεται η έναρξη αγωγής με θειαζιδικά διουρητικά. Στην κλινική πράξη σήμερα χρησιμοποιούνται η υδροχλωροθειαζίδη (χορηγούμενη ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό με καλιοσυντηρητικά διουρητικά όπως η αμιλορίδη) και η μπεντροφλου-μεθειαζίδη. Γενικότερα για τα θειαζιδικά διουρητικά, προτείνεται να χορηγούνται μόνο εφόσον υπάρχει απόλυτη ένδειξη και οι δόσεις χορήγησης να είναι οι χαμηλότερες δυνατές. Στη βΜΑ οι ασθενείς συχνά διατηρούν φυσιολογικές ή οριακά χαμηλές τιμές αρτηριακής πίεσης και ο κίνδυνος εμφάνισης υπότασης είναι σημαντικός. Επίσης, είναι απαραίτητο να αξιολογούνται τα επίπεδα νατρίου και καλίου μετά τις πρώτες 2-3 εβδομάδες από την έναρξη του φαρμάκου και ο έλεγχος να επαναλαμβάνεται ανά αραιότερα διαστήματα, καθώς η πιθανότητα εμφάνισης υπονατριάμιας και υποκαλιαιμίας δεν είναι αμελητέα.<sup>162,163</sup> Επισημαίνεται τέλος ότι επί συνύπαρξης υπερασβεστιουρίας με σημαντική οστική νόσο, προτείνεται η εξ' αρχής χορήγηση θειαζίδης, καθώς ακόμη και να ελεγχθεί η ασβεστιουρία με

διατροφικά μέτρα, η οστική νόσος δεν πρόκειται να βελτιωθεί.<sup>164</sup> Τέλος τονίζεται ότι εάν σε έναν ασθενή με υπερασβεστιουρία που πάσχει και από σοβαρή οστική νόσο χορηγηθούν διφωσφονικά ή δενοσουμάμπη (denosumab) ως αντιστεοπορωτική αγωγή, η υπερασβεστιουρία αναμένεται και αυτή να βελτιωθεί μέχρι ενός βαθμού.<sup>165</sup>

#### **1.9.4.4. Βιταμίνες και μέταλλα**

Όπως και στο γενικό πληθυσμό, έτσι και στη βΜΑ τα επαρκή επίπεδα βιταμίνης D και η κατάλληλη πρόσληψη Ca συμβάλλουν σημαντικά στη διατήρηση και βελτίωση της οστικής υγείας και στην πρόληψη της ανάπτυξης οστεομαλακίας. Στους θαλασσαιμικούς πάσχοντες τα επίπεδα της βιταμίνης D είναι πολύ συχνά χαμηλότερα από τα φυσιολογικά, με αποτέλεσμα να απαιτείται σχετικός εργαστηριακός έλεγχος ανά 6-12 μήνες και εξωγενής αναπλήρωση για τη συντήρησή τους.<sup>68,69</sup> Μολονότι δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα που να καθορίζουν τα ιδανικά επίπεδα 25OHD στη βΜΑ, πρόσφατες μελέτες έχουν καταδείξει θετική μη-γραμμική συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων 25OHD και της BMD (Z-Score), με δημιουργία plateau στις συγκεντρώσεις της 25OHD άνω των 15 ng/ml. Αυτά λοιπόν είναι τα επίπεδα που θα πρέπει να θεωρούνται κατά το ελάχιστο απαραίτητα ώστε να μην επιδεινώνεται περαιτέρω η BMD των πασχόντων.<sup>72</sup> Σε άλλες μελέτες συστήνεται φαρμακευτική διόρθωση για επίπεδα κάτω των 20 ng/ml, με προτεινόμενη δόση βιταμίνης D3 τις 2000 IU ημερησίως POS για διάστημα 8 εβδομάδων και εργαστηριακή επανεκτίμηση για πιθανή συνέχιση της χορήγησης. Για συντήρηση των ικανοποιητικών επιπέδων, προτείνεται η καθημερινή πρόσληψη 800-1000 IU βιταμίνης D2 ή D3, ειδικά σε περιοχές με χαμηλή ηλιοφάνεια. Σχήματα με 50.000 IU βιταμίνης D2 POS σε εβδομαδιαία ή μηνιαία χορήγηση έχουν επίσης εφαρμοστεί για αναπλήρωση των ελλειμμάτων ή συντήρηση των ικανοποιητικών επιπέδων αντίστοιχα.<sup>131</sup>

Με βάση τα ανωτέρω, σε γενικές γραμμές η προτεινόμενη ημερήσια πρόσληψη βιταμίνης D δε φαίνεται να διαφοροποιείται σημαντικά από εκείνη που συστήνεται για την κάθε ηλικιακή ομάδα του υγιούς πληθυσμού.<sup>68,69</sup> Στη βΜΑ επιβάλλεται όμως να είμαστε περισσότερο προσεκτικοί, κυρίως λόγω της συνήθους παρουσίας υπερασβεστιουρίας και δυσαπορρόφησης που διαπιστώνονται στους πάσχοντες. Για τον ίδιο εξάλλου λόγο, τα επίπεδα της 25OHD είναι επιθυμητό να βρίσκονται κοντά στα 30 ng/ml και να μην τα ξεπερνούν κατά πολύ.<sup>68,69,150</sup> Τονίζεται τέλος ότι από το σύνολο των σχετικών σκευασμάτων θα πρέπει γενικά να προτιμάται η χοληκαλσιφερόλη (D3), ενώ σε έδαφος ανάπτυξης επιπλοκών από άλλα όργανα (υποπαραθυ-

ραιοειδισμός, ηπατική δυσπραγία, νεφρικές διαταραχές) πιθανώς να απαιτείται προσεκτική χρησιμοποίηση και των περισσότερο ειδικών μεταβολιτών της βιταμίνης D όπως είναι η αλφακαλσιδόλη και η καλσιτριόλη.<sup>166</sup>

Όσον αφορά στην πρόσληψη Ca, ο θεράπων ιατρός οφείλει να αποφασίζει και πάλι με γνώμονα την παθοφυσιολογία και τη συννοσηρότητα της αιματολογικής νόσου. Γενικότερα, οι πάσχοντες πρέπει να παροτρύνονται να λαμβάνουν επαρκείς ποσότητες του μετάλλου στα πρότυπα του υγιούς πληθυσμού και κυρίως με τις τροφές, τόσο λόγω της υπερασβεστουρίας, όσο και λόγω της πιθανής συνύπαρξης βλαβών στο ενδοθήλιο των αγγείων από την εναπόθεση σιδήρου.<sup>138</sup> Εάν παρόλα αυτά το Ca πρέπει να χορηγηθεί φαρμακευτικά, προτιμώνται οι χαμηλές δόσεις αυτού ή η κατάτμηση υψηλότερων δόσεων σε 2-3 επιμέρους λήψεις στο 24ωρο, εκτός των ανωτέρω και για βέλτιστη απορρόφηση από το ΓΕΣ. Μολονότι δεν υπάρχει επίσημη αντένδειξη χορήγησης Ca με συμπληρώματα, ακόμη και σήμερα ορισμένοι ερευνητές επισημαίνουν πιθανή θετική συσχέτιση της χορήγησής του με καρδιαγγειακά συμβάματα.<sup>167</sup> Από την άλλη μεριά, την ίδια στιγμή πολλές άλλες μελέτες δεν έχουν κατορθώσει να αποδείξουν κάποια συσχέτιση.<sup>168,169</sup>

Ακόμη, στους θαλασσαιμικούς ασθενείς παρατηρούνται σε άλλοτε άλλο βαθμό ανεπάρκειες και άλλων μετάλλων, όπως είναι το Mg, ο ψευδάργυρος και ο χαλκός. Ο ρόλος του Mg στον οστικό μεταβολισμό είναι θεμελιώδης και η αλήθεια είναι ότι στη βΜΑ συχνά οι τιμές του είναι παθολογικά χαμηλές ή ανέρχονται στα κατώτερα φυσιολογικά όρια. Αιτιολογικά πιθανολογείται η συμμετοχή της δυσαπορρόφησης από το ΓΕΣ ή/και της δράσης ορισμένων σκευασμάτων αποσιδήρωσης. Κατά συνέπεια, τόσο ο περιοδικός αιματολογικός έλεγχος όσο και η διόρθωση των χαμηλών επιπέδων του μετάλλου κρίνονται απολύτως απαραίτητα.<sup>170</sup> Ο ψευδάργυρος (Zn) είναι ακόμη ένα μέταλλο που επηρεάζει σημαντικά τον οστικό μεταβολισμό και τα επίπεδά του διαταράσσονται συχνά στους ασθενείς με βΜΑ. Μάλιστα, η διόρθωση των ελλειμμάτων Zn έχει φανεί να συμβάλλει σημαντικά στη βελτίωση της οστικής πυκνότητας, αλλά και του μεταβολισμού της γλυκόζης στη συγκεκριμένη ομάδα πασχόντων.<sup>170,171</sup> Συνεπώς, μολονότι μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν ειδικές οδηγίες που να καθορίζουν την ιδανική ημερήσια δόση και τη συχνότητα χορήγησης των παραπάνω συμπληρωμάτων, οι θεράποντες ιατροί θα πρέπει να ενθαρρύνονται να ελέγχουν τους ασθενείς τους κατά περιόδους για τις συγκεντρώσεις των μετάλλων αυτών στον ορό και να παρεμβαίνουν όποτε διαπιστώνονται χαμηλές τιμές. Τέλος,

συνιστάται να λαμβάνεται σε ικανοποιητικά πλαίσια και βιταμίνη C με τις τροφές ή ακόμη και με επιπρόσθετα συμπληρώματα εφόσον διαπιστωθεί έλλειψή της.<sup>150,151</sup>

#### **1.9.4.5. Αντιοστεοπορωτικά φάρμακα**

(i) ΚΑΛΣΙΤΟΝΙΝΗ. Η καλσιτονίνη και τα διφωσφονικά αποτελούν τα πιο καλά μελετημένα ειδικά για την οστεοπόρωση φάρμακα που έχουν χορηγηθεί σε ασθενείς με β-θαλασσαιμία. Η καλσιτονίνη χρησιμοποιήθηκε ευρέως κατά τα παλαιότερα έτη σε διάφορα υποδόρια και ενδορρινικά σχήματα, χωρίς όμως να αποδώσει πραγματικά αξιολογήσιμα αποτελέσματα. Παρόλα αυτά φάνηκε να περιορίζει μέχρι ενός βαθμού την οστική απώλεια, ενώ σημαντική ήταν και η συνεισφορά της στην ελάττωση του οφειλόμενου σε μικροκατάγματα οστικού άλγους.<sup>61,68,69,81</sup> Στα επόμενα χρόνια, με την έλευση των διφωσφονικών, η χρήση της καλσιτονίνης πρακτικά εγκαταλήφθηκε, καθώς η “νέα θεραπεία” εφαρμόστηκε αρκετά γρήγορα σε μεγάλο αριθμό θαλασσαιμικών με σοβαρή οστική νόσο, αποδίδοντας σαφώς καλύτερα αποτελέσματα.

(ii) ΔΙΦΩΣΦΟΝΙΚΑ. Τα συγκεκριμένα φάρμακα αποτελούν ισχυρούς αναστολείς του σκέλους της οστικής απορρόφησης, μειώνοντας δραστικά τη στρατολόγηση, τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, την ενεργότητα και το χρόνο ζωής των οστεοκλαστών.<sup>80</sup> Κατά τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχουν δημοσιευθεί πολλές μελέτες με αντικείμενο την εκτίμηση της συμπεριφοράς και της αποτελεσματικότητας των διαφόρων τύπων διφωσφονικών στις σκελετικές επιπλοκές της νόσου.<sup>172-187</sup> Από αυτές συμπεραίνεται ότι με γνώμονα την τελική αύξηση της οστικής πυκνότητας, η πλέον δραστική κατηγορία είναι εκείνη των ενδοφλεβίως χορηγούμενων αμινο-διφωσφονικών, με αντιπροσώπους το ζολεδρονικό οξύ, την παμιδρονάτη και τη νεριδρονάτη (Πίνακας-5). Η χορήγηση των συγκεκριμένων σκευασμάτων οδήγησε σε αυξήσεις της BMD μέχρι και κατά 50% στην ΟΜΣΣ και έως 40% στις υπόλοιπες θέσεις του σκελετού. Πιο δραστικό όλων φάνηκε να είναι το ζολεδρονικό οξύ, το οποίο και μελετήθηκε από αρκετούς ερευνητές χορηγούμενο σε διαφορετικά σχήματα.<sup>177-181</sup> Από τις POS χορηγούμενες ουσίες, το καλύτερο θεραπευτικό αποτέλεσμα διαπιστώθηκε να εμφανίζει η αλεδρονάτη.<sup>172,182,186</sup> Δυστυχώς, στις περισσότερες από τις ως άνω μελέτες ο αριθμός των συμμετεχόντων ήταν αρκετά μικρός, η ετερογένειά τους πολύ μεγάλη (ως προς την ηλικία, το φύλο, την αγωγή αποσιδήρωσης και τη συννοσηρότητα) και ο χρόνος

παρακολούθησης των ασθενών σχετικά μικρός. Εκείνο που έχει καταστεί σαφές μέχρι σήμερα είναι ότι στους ασθενείς με βΜΑ αναπτύσσεται μεγαλύτερη αντοχή στα συγκεκριμένα φάρμακα από ότι τουλάχιστον συμβαίνει στη μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση. Υπεύθυνη είναι σίγουρα μέχρι ενός βαθμού η πολυπαραγοντική αιτιοπαθεγένεια της οστικής νόσου.<sup>138</sup> Για το λόγο αυτό, από πολλούς μελετητές έχει προταθεί τα διφωσφονικά να χορηγούνται σε σημαντικά μεγαλύτερες από τις κλασικές δόσεις στα άτομα με τη συγκεκριμένη αιματολογική νόσο. Με εξαίρεση λοιπόν την αλεδρονάτη που φαίνεται να αυξάνει τη BMD σε ικανοποιητικό βαθμό στη συνήθη POS δόση των 70 mg εβδομαδιαίως, «επιθετικότερα» σχήματα από τα κλασικά έχουν δοκιμαστεί για τα ενδοφλεβίως χορηγούμενα αμινο-διφωσφονικά. Πιο συγκεκριμένα, το ζολεδρονικό οξύ έχει δείξει τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητά του στις δόσεις των 4mg/3μήνες και 1mg/3μήνες και ιδιαίτερα κατά το πρώτο έτος χορήγησης, με συνοδό σημαντική ελάττωση των ΒΔΟΕ,<sup>177-181</sup> αλλά και με βελτίωση του μυοσκελετικού άλγους όπου αυτό εκτιμήθηκε με ειδικά ερωτηματολόγια.<sup>178,180</sup> Η παμιδρονάτη έχει χορηγηθεί σε μηνιαίες δόσεις των 15, 30, 60 mg και 1mg/Kg για 1 έως 3 έτη συνολικά, επίσης με ικανοποιητικά αποτελέσματα στην αύξηση της BMD στη σπονδυλική στήλη και στο ισχίο, αλλά και στη μείωση των δεικτών οστικής εναλλαγής.<sup>175,183-185</sup> Σχετικά πιο πρόσφατα, η ενδοφλέβια χορήγηση νεριδρονάτης απέδωσε και αυτή ικανοποιητικά αποτελέσματα στην αύξηση της BMD και στη μείωση του πόνου,<sup>187</sup> ενώ τέλος σημειώνεται ότι τόσο η ενδοφλέβια όσο και η ενδομυϊκή χορήγηση κλοδρονάτης απέβη πρακτικά αναποτελεσματική.<sup>172,173</sup>

Τονίζεται επίσης ότι στις δόσεις που έχουν χρησιμοποιηθεί και στα χρονικά διαστήματα που έχουν χορηγηθεί μέχρι σήμερα τα διφωσφονικά στη βΜΑ, δεν έχουν περιγραφεί σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες στις σχετικές μελέτες που έχουν δημοσιευθεί. Εντούτοις, ο πιθανός κίνδυνος εμφάνισης ατύπων καταγμάτων του ισχίου ή οστεονέκρωσης της γνάθου σε μακρά χρήση των φαρμάκων αυτών - λόγω ελάττωσης της οστικής ανακατασκευής - δεν έχει ακόμη διερευνηθεί επαρκώς.<sup>68,69,188</sup>

Εξάλλου, αν και δεν μπορεί να αποδειχθεί αιτιολογική συσχέτιση, δύο επίσημες αναφορές περιστατικών με ανάπτυξη ατύπων καταγμάτων στο ισχίο σε θαλασσαιμικούς ασθενείς που είχαν λάβει προηγουμένως διφωσφονικά έχουν ήδη δημοσιευθεί.<sup>189,190</sup> Επιπρόσθετα, το 2014 ανακοινώθηκαν τρεις περιπτώσεις ασθενών με βΜΑ και προηγηθείσα λήψη διφωσφονικών POS, με παρουσία οστεονέκρωσης γνάθου διαγνωσθείσα σε εξαιρετικά πρώιμο στάδιο.<sup>191</sup> Κατά συνέπεια, οι κατευθύνσεις χορήγησης των συγκεκριμένων σκευασμάτων θα πρέπει να αξιολογούνται ξεχωριστά για κάθε ασθενή και να καθορίζονται με μεγάλη προσοχή. Από τη στιγμή που δεν υπάρχουν επίσημα απόλυτα ειδικές οδηγίες ούτε για το ενδεικνυόμενο χρονικό διάστημα, ούτε και για τα δοσολογικά σχήματα χορήγησης, πολλοί ερευνητές πιστεύουν ότι η πιο λογική προσέγγιση είναι (α) τα διφωσφονικά να χορηγούνται αρχικά με βάση τα διεξοδικά μελετημένα πρότυπα της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης, δηλαδή για 5 συνεχή έτη στην POS μορφή και για 3 συνεχή έτη στα ενδοφλέβια σχήματα (με πιο ασφαλή δόση να θεωρείται εκείνη των 5mg ζολεδρονικού οξέος ετησίως) και (β) τα αποτελέσματα να επαναξιολογούνται ανά τακτά διαστήματα.<sup>188</sup>

Δεδομένα αξιολόγησης της επίδρασης των διφωσφονικών στην πρόληψη και εμφάνιση καταγμάτων στη βΜΑ δυστυχώς δεν έχουν ακόμη δημοσιευθεί. Οι κύριες αιτίες είναι προφανώς ο μικρός αριθμός συμμετεχόντων και το βραχύ διάστημα παρακολούθησης στις μέχρι σήμερα μελέτες, όπως ήδη αναφέρθηκε παραπάνω. Επιπρόσθετα, η συχνότητα καταγμάτων μπορεί να επηρεάζεται και από πρόσθετες εξωγενείς παραμέτρους, όπως είναι η αυξημένη σωματική δραστηριότητα λόγω της σχετικά νεαρής ηλικίας των ασθενών. Τέλος, από τη στιγμή που τα αντιοστεοπορωτικά φάρμακα χορηγούνται σε σημαντικά μικρότερες ηλικίες στη βΜΑ από ότι στο γενικό πληθυσμό, περαιτέρω εξατομικευμένα δεδομένα θα πρέπει να ληφθούν υπόψη για τη χρήση τους ανά ασθενή. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο οικογενειακός προγραμματισμός για τεκνοποίηση, καθώς τα συγκεκριμένα σκευάσματα παραμένουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα στον οργανισμό και δε γνωρίζουμε τις επιδράσεις που μπορεί να ασκούν στα γεννητικά κύτταρα, στην κύηση και στο έμβρυο.<sup>138,192,193</sup>

Ερευνητής/Έτος	Σχεδιασμός Μελέτης	Παρέμβαση	Διάρκεια (Μήνες)	N	Φύλο	Ηλικία
Morabito et al, 2002 [172]	Randomized, parallel arm, placebo-controlled	Alendronate 10mg/d (A) vs IM Clodronate 100mg/10d (B) vs placebo (C)	24	25	6M/19F	26.6 ± 7.1
Results: (A) ↑2.8% LS BMD, ↑5.64% FN BMD All Sign. vs placebo, (B) ⇔ LS and FN BMD vs placebo and baseline						
Pennisi et al, 2003 [174]	Randomized, controlled	Clodronate 300mg/3w vs Cal+Vit.D	24	30	30M	27.44 ± 3.28
Results: ⇔ LS and FN BMD T-Score NS vs baseline / p<0.01 vs Cal+Vit.D						
Voskaridou et al, 2003 [175]	Non-randomized, non-controlled, parallel arm	Pamidronate 30mg/m (A) vs Pamidronate 60mg/m (B)	12	26	6M/20F	35.5
Results: (A) and (B) ↑ LS BMD Z-Score / ⇔ FN and Forearm BMD Z-Score vs baseline						
Gilfillan et al, 2006 [178]	Randomized, double-blind, placebo-controlled	ZA 4mg/3m vs placebo	24	23	15M/6F	(ZA) 27.8 (18.2-40.4) (pl) 27.7 (18.9-43.7)
Results: ↑ 10.2% LS BMD / ↑ 5.2% FN BMD / ↑ 6% Tot.Hip BMD / ↑ 4.6% Tot.BMD - All Sign. vs placebo						
Voskaridou et al, 2006 [179]	Randomized, parallel arm, placebo-controlled	ZA 4mg/6m (A) vs ZA 4mg/3m (B) vs placebo (C)	12	66	22M/44F	(A) 44.1 ± 11.7 (B) 42.6 ± 10.7 (C) 44.9 ± 10.7
Results: (A) ↑ 5.8% LS BMD, ↑4.8% FN BMD NS vs placebo, (B) ↑15.2% LS BMD, ↑11.3% FN BMD Sign. vs placebo						
Otrock et al, 2006 [180]	Open label, non-randomized, controlled	ZA 4mg/3m (A) vs observation (B)	12	28	18M/10F	(A) 22.72 ± 5.85 (B) 19.10 ± 4.07
Results: (A) ↑ LS and FN and Tot.Hip BMD Z-Score vs baseline, (B) ⇔ LS and FN and Tot.Hip BMD Z-Score vs baseline						
Perifanis et al, 2007 [181]	Single arm, non-controlled	ZA 1mg/3m vs placebo	12	29	13M/16F	27.2 ± 7.3
Results: ↑ LS BMD T-Score vs baseline						
Skordis et al, 2008 [182]	Randomized, parallel arm, non-controlled	Alendronate 70mg/w (A) vs Pamidronate 90mg/m (B)	24	53	22M/31F	(A) 33.3 (20-47) (B) 34.4 (25-50)
Results: (A) ⇔ LS and FN BMD Z-Score vs baseline, (B) ↑ LS and FN BMD Z-Score vs baseline						
Patiroglu et al, 2008 [183]	Single arm, non-controlled	Pamidronate 15mg/3m	12	23	11M/12F	7-14
Results: ↑FN BMD Sign vs baseline						
Leung et al, 2009 [184]	Non-randomized, parallel arm, controlled	Pamidronate (A) vs Ca+Alfacalcidol (B) vs Observation (C)	36	39	16M/23F	(A) 18.9 (17.5-22.4) (B) 22.2 (19.0-27.8) (C) 17.7 (16.3-21.3)
Results (Z-Scores): (A) ↑ LS & FN BMD vs baseline, (B) ⇔ LS & FN BMD vs baseline, (C) ⇔ LS & ↓ FN BMD vs baseline						
Chatterjee et al, 2012 [185]	Non-randomized, controlled	Pamidronate 1mg/Kg/m (A) vs observation (B)	36	34	18M/16F	17-43
Results: (A) ↑LS and Tot.Hip BMD Z-Score vs baseline, (B) ⇔LS and Tot.Hip BMD Z-Score vs baseline						
Shirani et al, 2012 [186]	Single arm, Non-controlled	Aledronate 10mg/d	12	120	57M/69F	33 (20-50)
Results: ↑LS and FN BMD T-Score vs baseline						
Forni et al, 2012 [187]	Randomized, open-label, controlled	Neridronate 100mg/90d vs Cal+Vit.D	12	118	51M/67F	32.8 ± 8.1
Results: ↑LS and FN and Tot.Hip BMD vs Cal+Vit.D						

**Πίνακας 5: Κλινικές μελέτες παρέμβασης που αφορούν στη χορήγηση διαφορετικών διφωσφονικών φαρμάκων σε ασθενείς με βΜΑ, από το έτος 2002 μέχρι και σήμερα.** N=Αριθμός συμμετεχόντων, m=μήνες w=εβδομάδες d=ημέρες M=άρρενες F=θήλεα vs=έναντι Sign.=σημαντικό NS=μη-σημαντικό FN=αυχένας μηριαίου LS=σπονδυλική στήλη, BMD=οστική πυκνότητα Cal=ασβέστιο Vit.D=βιταμίνη D.

*Πηγή: Τροποποίηση από: Stefanopoulos και συν, Journal of Frailty, Sarcopenia & Falls 2018;3(1):13-25.<sup>138</sup>*

(iii) ΔΕΝΟΣΟΥΜΑΜΠΗ (DENOSUMAB). Ο μηχανισμός δράσης του Denosumab δημιούργησε εξ' αρχής σημαντικές ελπίδες για τη θεραπεία της ΟΝΘ, καθώς ένας από τους κομβικούς μηχανισμούς παθογένειας της νόσου, όπως ήδη αναφέρθηκε, είναι η αύξηση του λόγου sRANKL/OPG, με αποτέλεσμα την υπέρμετρη ενίσχυση της οστεοκλαστικής λειτουργίας. Έχει μάλιστα παρατηρηθεί ότι παρά τις επιτυχείς προσπάθειες για ομαλοποίηση των επιπέδων Hb, την κατάλληλη ορμονική υποκατάσταση με οιστρογόνα, τεστοστερόνη, GH ή θυροξίνη, τον ικανοποιητικό έλεγχο του ΣΔ και την αποτελεσματική αποσιδήρωση, ο λόγος sRANKL/OPG εξακολουθεί να κυμαίνεται σε παθολογικά υψηλά επίπεδα και οι ασθενείς συνεχίζουν να βρίσκονται σε κατάσταση αποσύζευξης που εκφράζεται ως αυξημένη οστική απορρόφηση και μειωμένη οστική παραγωγή, με αποτέλεσμα τη συνέχιση της απώλειας οστικής μάζας.<sup>103,194,195</sup>

Το Denosumab, ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που συνδεόμενο σταθερά με τον παράγοντα RANKL παρεμποδίζει τη σύνδεσή του στο συνδέτη του RANK, θεωρητικά θα διόρθωνε σημαντικά τη συγκεκριμένη εκτροπή από το φυσιολογικό και θα μείωνε δραστικά την οστική απορρόφηση.<sup>9</sup> Η πρώτη μελέτη για τη δράση του Denosumab στην ΟΝΘ δημοσιεύτηκε το 2014 και μάλιστα με πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα.<sup>196</sup> Σε αυτήν, 30 ασθενείς ηλικίας 17 έως 32 ετών με σοβαρή οστική νόσο έλαβαν το φάρμακο στη συνήθη δόση των 60mg ανά εξάμηνο και μετά από δύο δόσεις αξιολογήθηκαν οι μεταβολές στη BMD και στους ΒΔΟΕ. Διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική βελτίωση της BMD στον αυχένα του μηριαίου κατά 6.0% και ακόμη μεγαλύτερη στην ΟΜΣΣ κατά 9.2%, με επίσης σημαντική μείωση των συγκεντρώσεων των δεικτών οστικής απορρόφησης. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες ήταν ήπιες και κυρίως αφορούσαν σε άλγος στη ράχη και στα άκρα (12%) και σε παρουσία



ναυτίας (10%). Η εκδήλωση υπασβεστιαϊμίας στο 7% των ασθενών ήταν ήπια και ασυμπτωματική και - όπως και στην περίπτωση της ενδοφλέβιας χορήγησης διφωσφονικών - μπορεί να προληφθεί σε σημαντικό βαθμό εάν πριν τη χορήγηση του φαρμάκου ρυθμιστούν κατάλληλα η πρόσληψη Ca και τα επίπεδα της 25OHD. Βεβαίως, η συχνή παρουσία υποπαραθυρεοειδισμού και νεφρικών διαταραχών στη βΜΑ απαιτεί επαγρύπνηση στο συγκεκριμένο θέμα. Τα καλά αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης ώθησαν τους ίδιους ερευνητές να οργανώσουν μέσα στο 2017 μία νέα τυχαιοποιημένη, παρεμβατική κλινική μελέτη φάσης III με σκοπό τη σύγκριση του Denosumab με το δραστικότερο ενδοφλέβιο διφωσφονικό που έχει χρησιμοποιηθεί στη βΜΑ, το ζολεδρονικό οξύ. Συνολικά στρατολογήθηκαν από 10 ασθενείς σε κάθε ομάδα και τα πρώτα αποτελέσματα για τις μεταβολές της BMD και των οστικών δεικτών αναμένεται να ανακοινωθούν στα τέλη του 2018 (Κλινική μελέτη “DOHA” / Δημοσίευτα δεδομένα). Τέλος, στο 22<sup>ο</sup> Πανευρωπαϊκό Αιματολογικό Συνέδριο της «European Hematology Association, (EHA)» το 2017, ανακοινώθηκαν τα πρώτα αποτελέσματα της κλινικής μελέτης των Βοσκαρίδου και συν. που αφορούσαν στη χορήγηση του Denosumab σε 31 θαλασσαιμικούς ασθενείς στη δόση των 60mg ανά εξάμηνο για ένα έτος, σε σύγκριση με χορήγηση placebo σε 30 άλλους θαλασσαιμικούς. Τα αποτελέσματα μετά τις δύο πρώτες δόσεις του φαρμάκου έδειξαν επίσης σημαντικές αυξήσεις στη BMD στην ομάδα του Denosumab τόσο στην ΟΜΣΣ ( $6.02 \pm 5.30\%$ ) όσο και στον αυχένα του μηριαίου, σαφή υπεροχή έναντι του placebo και εξαιρετικό προφίλ ασφάλειας (Voskaridou E. και συν. EHA22, June 2017 / Δημοσίευτα δεδομένα).

Μία παρατήρηση που καλό είναι να επισημανθεί στο σημείο αυτό, είναι ότι στις ανεπιθύμητες ενέργειες του Denosumab αναφέρεται και η πιθανή ήπια αύξηση του κινδύνου εκδήλωσης ορισμένων λοιμώξεων, όπως του ανωτέρου αναπνευστικού, του ουροποιητικού, του δέρματος και των ώτων.<sup>197</sup> Από τη στιγμή που οι πάσχοντες με βΜΑ αποτελούν μία ομάδα με ήπια έως μέτρια αυξημένη ευαισθησία στην εκδήλωση λοιμώξεων,<sup>198,199</sup> έχουν συχνά ιστορικό σπληνεκτομής, καρδιοπάθειας και πολυποίκιλη συννοσηρότητα, η παρατήρηση αυτή θα πρέπει να αξιολογείται πάντα από τους θεράποντες ιατρούς, χωρίς φυσικά να δρα κατ' ανάγκη αποτρεπτικά στη χρησιμοποίηση του φαρμάκου στην οστική νόσο. Εξάλλου, στις μέχρι σήμερα μελέτες δεν υπάρχουν αναφορές για σύνδεση του φαρμάκου με εκδήλωση λοιμώξεων στα άτομα με βΜΑ.

(iv) ΤΕΡΙΠΑΡΑΤΙΔΗ. Η τεριπαρατίδη αποτελεί αυτή τη στιγμή το μοναδικό αναβολικό σκεύασμα που κυκλοφορεί για τη θεραπεία της οστεοπόρωσης. Η χρήση της ωστόσο στην ΟΝΘ δεν έχει ακόμη μελετηθεί επαρκώς, μολονότι αποτελεί μια δελεαστική επιλογή από τη στιγμή που στους συγκεκριμένους ασθενείς συχνά παρατηρούνται πολύ χαμηλές τιμές BMD. Εξάλλου, όπως είδαμε και στο κεφάλαιο της παθογένειας, το σκέλος της οστικής παραγωγής πλήττεται σημαντικά στη συγκεκριμένη αιματολογική νόσο.<sup>188</sup> Από την άλλη, λόγω του μηχανισμού δράσης της, παραμένει ως ερώτημα το κατά πόσο μπορεί να επιδεινώνει σημαντικά ή όχι τυχόν συνυπάρχουσα υπερασβεστιουρία. Επιπλέον, σε αρκετούς μεταγγιζόμενους ασθενείς αναπτύσσονται εστίες σοβαρής εξωμυελικής αιμοποίησης που οδηγούν σε σοβαρά πιεστικά φαινόμενα στη σπονδυλική στήλη και απαιτούν την εφαρμογή ακτινοθεραπείας.<sup>80</sup> Σε αυτές τις περιπτώσεις η χρήση τεριπαρατίδης αντενδείκνυται απόλυτα, εξαιτίας του δυνητικού κινδύνου ανάπτυξης κακοήθους νεοπλασίας από τον οστίτη ιστό.<sup>138</sup> Μέχρι σήμερα, μόνο τρεις εργασίες έχουν δημοσιευτεί για τη χρησιμοποίηση του φαρμάκου σε ισάριθμους θαλασσαιμικούς ασθενείς με βαριά οστική νόσο και παθολογικά κατάγματα και η αλήθεια είναι ότι και στις τρεις τα αποτελέσματα ήταν πολύ ενθαρρυντικά, με αξιοσημείωτες αυξήσεις της BMD στους 12 και 18 μήνες στην ΟΜΣΣ, στον αυχένα του μηριαίου και στο ολικό ισχίο.<sup>200-202</sup> Απαιτούνται βεβαίως σαφώς περισσότερα δεδομένα που να τεκμηριώνουν τόσο την αποτελεσματικότητα όσο και την ασφάλεια της τεριπαρατίδης για τη γενίκευση της χρησιμοποίησής της στη σοβαρή ΟΝΘ.

(v) ΡΑΝΕΛΙΚΟ ΣΤΡΟΝΤΙΟ. Το ρανελικό στρόντιο χρησιμοποιήθηκε ευρέως κατά τα προηγούμενα έτη στην αντιμετώπιση της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης. Για την αποτελεσματικότητά του στην ΟΝΘ διενεργήθηκε μόνο μία τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη μελέτη με σχετικά καλά αποτελέσματα, καθώς διαπιστώθηκε αύξηση στη BMD κυρίως στη ΣΣ, εξομάλυνση των ΒΔΟΕ, μείωση των επιπέδων σκληροστίνης στον ορό και ελάττωση του μυοσκελετικού άλγους.<sup>203</sup> Παρόλα αυτά, δεν υπήρξε συνέχεια, καθώς το φάρμακο έπαψε ουσιαστικά να αποτελεί θεραπευτική επιλογή για τη βΜΑ από τη στιγμή που ήρθαν στο φως νέα δεδομένα για την ασφάλεια της χορήγησής του που είχαν να κάνουν με αύξηση του κινδύνου για εμφάνιση καρδιαγγειακών επιπλοκών.<sup>204</sup> Αυτές οι καταστάσεις το καθιστούν πρακτικά επικίνδυνο για έναν πληθυσμό ασθενών με αυξημένη συχνότητα παρουσίας ποικίλων καρδιαγγειακών και θρομβοφιλικών προβλημάτων. Ούτως ή

άλλως, από τον Αύγουστο του 2017 το ρανελικό στρόντιο έπαψε πλέον να διατίθεται προς θεραπεία και στο γενικό πληθυσμό.

(vi) ΝΕΑ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ.

**A. Αντισώματα έναντι της σκληροστίνης.** Το Romosozumab είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που συνδέεται επιλεκτικά με τη σκληροστίνη αναστέλλοντας τη δράση της. Ανήκει στα αναβολικά φάρμακα, καθώς η χορήγησή του αυξάνει σημαντικά το σκέλος της οστικής παραγωγής και με το μηχανισμό αυτό βελτιώνει θεαματικά στις μέχρι σήμερα μελέτες τη BMD σε σπονδυλική στήλη και ισχίο.<sup>205</sup> Μολονότι δεν έχει ακόμη εξεταστεί η επίδρασή του στη βΜΑ, το επιστημονικό ενδιαφέρον για την πιθανή αποτελεσματικότητά του είναι μεγάλο, από τη στιγμή που στον ορό των θαλασσαιμικών πασχόντων έχουν διαπιστωθεί σημαντικά υψηλότερα επίπεδα σκληροστίνης σε σχέση με το γενικό πληθυσμό.<sup>80,206,207</sup> Βεβαίως, οι σχετικά πρόσφατες αναφορές για πιθανά αυξημένη συχνότητα εμφάνισης καρδιαγγειακών συμβαμάτων σε κλινικές μελέτες φάσης III (μελέτες “ARCH” και “BRIDGE”), εφιστούν την προσοχή για οποιαδήποτε πιθανή μελλοντική χρήση του φαρμάκου στην ΟΝΘ.

**B. Αναστολείς της Ακτιβίνης-α.** Οι ακτιβίνες αποτελούν μέλη της υπεροικογένειας TGF-β και ασκούν πολλαπλές βιολογικές δράσεις στην εμβρυολογία, σε διαφοροποιούμενους ιστούς, σε ενδοκρινείς αδένες, στο αιμοποιητικό, ανοσοποιητικό και μυοσκελετικό σύστημα. Η ακτιβίνη-α είναι μία πρωτεΐνη που εκφράζεται ιδιαίτερα στα οστά, και έχει φανεί ότι αυξάνει στον ορό ασθενών με οστεοπόρωση. Στον άνθρωπο, έχει τεκμηριωθεί ότι προάγει την οστεοκλαστογένεση και τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών, ενώ ταυτόχρονα αναστέλλει τη διαφοροποίηση και τη δράση των οστεοβλαστών.<sup>208,209</sup> Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές, έχουν αναπτυχθεί σκευάσματα που αναστέλλουν τις επιδράσεις της ακτιβίνης-α στα οστά και αναμένεται να βελτιώσουν την οστική κατάσταση ανθρώπων με οστεοπόρωση.

Η εφαρμογή αυτού του τύπου θεραπείας στην ΟΝΘ έχει παρουσιάσει τεράστιο ενδιαφέρον κατά τα τελευταία έτη, καθώς εκτός από τη δράση των νέων αυτών φαρμάκων στα οστά, διαπιστώθηκε ήδη από τις προκλινικές μελέτες σε πειραματικά μοντέλα ζώων παράλληλη σημαντική αύξηση των επιπέδων της Hb.<sup>210-212</sup> Η δράση στον αιμοποιητικό ιστό ασκείται στα τελικά στάδια της διαφοροποίησης των ερυθρών αιμοσφαιρίων, διορθώνοντας ουσιαστικά μέχρι ενός βαθμού την αναποτελεσματική

ερυθροποίηση που συμβαίνει στη νόσο και οδηγώντας σε αύξηση του αριθμού περισσότερο λειτουργικών ερυθροκυττάρων. Με τον τρόπο αυτό μειώνονται οι ανάγκες του οργανισμού σε μεταγγίσεις, κατ'επέκταση μειώνονται η υπερπλασία του ερυθροποιητικού μυελού, η αιμοσιδήρωση και τα επίπεδα φερριτίνης, βελτιώνεται ο υπερσπληνισμός και φυσικά η ποιότητα ζωής. Σε επίπεδο κλινικών μελετών σε ασθενείς με βΜΑ έχουν χορηγηθεί ήδη δύο ξεχωριστά μόρια αναστολέων της ακτιβίνης-α, το *Sotatercept* και το *Luspatercept*, με πολύ καλά αποτελέσματα όσον αφορά στα αιματολογικά δεδομένα, αλλά και στην παρουσία ανεπιθύμητων ενεργειών, οι οποίες φαίνεται να είναι ήπιες και όχι συχνές.<sup>213-215</sup> Στην παρούσα φάση η έρευνα συνεχίζεται μόνο με το *Luspatercept*, για το οποίο βρίσκεται σε εξέλιξη από το 2016 διεθνής πολυκεντρική τυχαιοποιημένη, διπλή-τυφλή μελέτη φάσης III τριετούς διάρκειας (μελέτη “BELIEVE”), με τη συμμετοχή 300 θαλασσαιμικών ασθενών. Από αυτούς, οι 200 λαμβάνουν το φαρμακευτικό παράγοντα σε διάφορες δόσεις με υποδόρια έγχυση κάθε 3 εβδομάδες και οι υπόλοιποι 100 έχουν τυχαιοποιηθεί στην ομάδα του placebo. Τα πρώτα σαφή αποτελέσματα αναμένεται να ανακοινωθούν το 2018 και θα εστιάζουν πρωτίστως στα αιματολογικά δεδομένα. Εντούτοις, ελέγχονται παράλληλα και παράμετροι που αφορούν στις επιδράσεις του φαρμάκου στην οστική κατάσταση των πασχόντων.<sup>216</sup>

## II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 2.1. Σκοπός και στόχοι της μελέτης

Η σύλληψη και ο σχεδιασμός της παρούσας διατριβής στηρίχθηκε σε μία πληθώρα ανακοινώσεων και μελετών των τελευταίων δεκαετιών, στις οποίες διαπιστώθηκε ότι η εξωγενής παρεντερική χορήγηση διαφόρων μορφών σιδήρου οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων του FGF23 και των επιδράσεων αυτού, με αποτέλεσμα να διαταράσσεται ο μεταβολισμός του P και της βιταμίνης D. Μάλιστα, το φαινόμενο είναι τόσο σημαντικό, που ενίοτε αναπτύσσεται ιδιαίτερα σοβαρή κλινικά υποφωσφοραιμία.<sup>26-31</sup> Οι συγκεκριμένες παρατηρήσεις, όπως είναι λογικό, αποκτούν ιδιαίτερο ενδιαφέρον πέραν όλων των άλλων επιστημονικών πεδίων και για τους πάσχοντες από βΜΑ. Τίθεται δηλαδή εύλογα το ερώτημα, πώς ανταποκρίνεται το σύστημα FGF23-Klotho στους πολυμεταγγιζόμενους ασθενείς, στους οποίους τα επίπεδα σιδήρου και φερριτίνης παραμένουν χρονίως υψηλά στο πλάσμα; Και επιπρόσθετα, πώς μπορεί να επιδρά σχετικά η περαιτέρω εφαρμογή των σύγχρονων μεθόδων αποσιδήρωσης, που ενισχύουν κατά διαστήματα την κινητοποίηση αποθηκευμένου σιδήρου (Fe) από τους ιστούς προς την κυκλοφορία; Κάτω από το πρίσμα αυτών των ερωτημάτων ανακύπτει έντονο το ερευνητικό ενδιαφέρον για το κατά πόσο θα μπορούσε τελικά η χρόνια αιμοσιδήρωση να επηρεάζει το σύστημα FGF23-Klotho - και μέσω αυτού το μεταβολισμό του P και της βιταμίνης D - τόσο δυναμικά στους θαλασσαιμικούς ασθενείς, ώστε να προκύπτει ένα νέο πεδίο στην παθοφυσιολογία της ΟΝΘ.

Κατά συνέπεια, ο πρωτογενής στόχος του συγκεκριμένου πονήματος ήταν να διερευνηθεί διεξοδικά εάν, και σε τι βαθμό, υφίστανται στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις των επιπέδων του ακέραιου δραστικού μορίου του FGF23 (iFGF23), του C-FGF23, της πρωτεΐνης Klotho, του P ορού και του P στα ούρα των πασχόντων από βΜΑ σε σχέση με υγιείς μάρτυρες. Επίσης, μελετήθηκε κατά πόσο τα επίπεδα των συγκεκριμένων παραμέτρων σχετίζονται με και επηρεάζονται από τη βαρύτητα της οστικής νόσου, το βαθμό αιμοσιδήρωσης και το φαρμακευτικό σχήμα αποσιδήρωσης των ασθενών.

Σημειώνεται ότι μέχρι σήμερα δεν έχουν διεξαχθεί μελέτες που να ερευνούν τα επίπεδα του FGF23 στο συγκεκριμένο πληθυσμό πασχόντων. Ακόμη και ως προς τα επίπεδα του P στον ορό το τοπίο δεν είναι ξεκάθαρο, καθώς σε άλλες μελέτες αυτά διαπιστώνονται ελαττωμένα σε ποσοστό κοντά στο 20% των συμμετεχόντων, αποδιδόμενα κυρίως στη δράση των φαρμάκων αποσιδήρωσης,<sup>217-219</sup> σε άλλες χωρίς ουσιώδεις διαφορές από την ομάδα μαρτύρων<sup>220</sup> και σε άλλες αυξημένα, αποδιδόμενα σε συνυπάρχοντα υποπαραθυρεοειδισμό παρόντα σε σημαντική αναλογία μεταξύ των ασθενών.<sup>221-222</sup> Τέλος, όσον αφορά στην πρωτεΐνη Klotho, μία μόνο μελέτη έχει δημοσιευθεί, το 2015, στην οποία τα επίπεδα του μορίου της στον ορό των πασχόντων εμφανίζονταν χαμηλότερα σε σχέση με εκείνα των υγιών μαρτύρων.<sup>223</sup>

## 2.2. Η σχέση του FGF23 και της ομοιοστασίας σιδήρου – Κλινικές μελέτες.

Η πρώτη αναφορά για τη διασύνδεση μεταξύ της εξωγενούς χορήγησης Fe και της ανάπτυξης διαταραχών στο μεταβολισμό του P έλαβε χώρα το 1982 στην ιαπωνική βιβλιογραφία από τους Okada M και συν.<sup>224</sup> Αμέσως μετά, το 1983, οι ίδιοι ερευνητές παρατήρησαν εκ νέου σημαντική, παροδική πτώση των τιμών του P ορού κατά τη διάρκεια ενδοφλέβιας σιδηροθεραπείας.<sup>225</sup> Στη δεκαετία του 1990 ακολούθησαν δύο ακόμη εργασίες από τους Sato K και συν. στις οποίες διαπιστώθηκε ότι μετά από παρεντερική χορήγηση Fe διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική μείωση τόσο του P όσο και των επιπέδων 1,25(OH)<sub>2</sub>D στον ορό των ασθενών, παρά τις φυσιολογικές τιμές 25(OH)D, γεγονός που υποδείκνυε ανασταλτική επίδραση του ενδοφλέβια χορηγούμενου Fe και στη δράση της 1α-υδροξυλάσης.<sup>226,227</sup> Στα πιο πρόσφατα χρόνια, νέες σημαντικές μελέτες έχουν πλέον ξεκαθαρίσει ιδιαίτερος το τοπίο των σχετικών παθοφυσιολογικών αλληλεπιδράσεων, κεντρικό κομμάτι των οποίων φαίνεται να αποτελεί η δράση του FGF23. Πιο συγκεκριμένα:

- Η πρώτη κλινική μελέτη που εστίασε στις μεταβολές του FGF23 μετά από ενδοφλέβια χορήγηση Fe δημοσιεύθηκε το 2009 από τους Schouten BJ και συν, οι οποίοι μετά από έγχυση πολυμαλτοζικού Fe (iron polymaltose) σε οκτώ σιδηροπενικές γυναίκες ασθενείς διαπίστωσαν αύξηση των τιμών του FGF23 εντός μίας εβδομάδος από τη την έγχυση και παραμονή των συγκεντρώσεων του μορίου σε αυξημένα επίπεδα έως και πέντε εβδομάδες μετά. Η κατάσταση συσχετίστηκε περαιτέρω και με ελάττωση της νεφρικής επαναρρόφησης του P,

ελάττωση της 1α-υδροξυλίωσης της 25OHD, μείωση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D και τελικά με ανάπτυξη υποφωσφοραιμίας.<sup>28</sup> Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα ήταν σε συμφωνία με εκείνα προηγούμενων *in vitro* μελετών σε καλλιέργειες κυττάρων από αρουραίους και ποντίκια, στις οποίες είχε υποστηριχθεί ότι ο FGF23 μπορεί να επιδρά στο οστό και με άλλο τρόπο εκτός της ρύθμισης του P, ιδίως μετά από χορήγηση Fe.<sup>46,47</sup>

- Την ίδια χρονιά, ανακοινώθηκαν από τους Shimizu Y και συν. τρία νέα περιστατικά σιδηροπενικών ασθενών που μετά από ενδοφλέβια χορήγηση σακχαρικού Fe (Saccharated Ferric Oxide) ανέπτυξαν υποφωσφοραιμία με συνοδά χαμηλά επίπεδα 1,25(OH)<sub>2</sub>D, που αποδόθηκαν σε παροδική αύξηση των επιπέδων FGF23 και σε διαταραχή της νεφρικής επαναρρόφησης P. Επιπρόσθετα, τα συγκεκριμένα εργαστηριακά ευρήματα παρήλθαν λίγες ημέρες μετά τη διακοπή του φαρμάκου.<sup>29</sup>
- Επίσης το 2009, παρουσιάστηκε και πάλι από τους Schouten BJ και συν. η περίπτωση ενός Ευρωπαίου άνδρα που ελάμβανε ενδοφλέβια πολυμαλτοζικό Fe σε τακτική βάση ο οποίος εμφάνισε σημαντική και παρατεταμένη υποφωσφοραιμία, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη οστεομαλακίας και την εκδήλωση παθολογικών καταγμάτων. Και σε αυτόν τον ασθενή διαπιστώθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων του FGF23, τα οποία επανήλθαν στο φυσιολογικό μετά τη διακοπή της σιδηροθεραπείας.<sup>31</sup>
- Νέα σημαντική εργασία για τη μελέτη του φαινομένου δημοσιεύθηκε το 2011 από τους Takeda Y και συν, όπου παρουσιάστηκε η επίδραση της ενδοφλέβιας χορήγησης 40 mg σακχαρικού Fe τρεις φορές εβδομαδιαίως, για συνολικό διάστημα 3 εβδομάδων, σε 27 αιμοκαθαιρούμενους ασθενείς με σιδηροπενική αναιμία. Όπως διαπιστώθηκε, ο FGF23 αυξήθηκε σημαντικά σε όλους τους ασθενείς στις τρεις εβδομάδες χορήγησης, για να επανέλθει στις βασικές του - αυξημένες λόγω της ΧΝΝ - τιμές, δύο εβδομάδες αργότερα. Εντούτοις, τα επίπεδα του P σε αυτήν τη σειρά ασθενών δεν επηρεάστηκαν.<sup>228</sup>
- Δύο χρόνια αργότερα, οι Prats M και συν. δημοσίευσαν τα αποτελέσματα των δικών τους παρατηρήσεων, που αφορούσαν στις μεταβολές του FGF23 μετά από ενδοφλέβια χορήγηση καρβοξυμαλτοζικού Fe (ferric carboxymaltose) σε μη-αιμοκαθαιρούμενους ασθενείς με ΧΝΝ.<sup>229</sup> Διαπίστωσαν λοιπόν ότι τρεις

εβδομάδες μετά από μία και μόνη έγχυση μειώθηκε σημαντικά η συγκεντρωση P στον ορό, η οποία και παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα για περίπου τρεις μήνες. (Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάστηκαν και από τους Schaefer B και συν. το 2016, όπου το ναδίρ του P στον ορό παρατηρήθηκε κατά τη δεύτερη εβδομάδα από τη χορήγηση και ο μέσος χρόνος επανόδου στο φυσιολογικό των επιπέδων P μετά την έγχυση ήταν οι 84 ημέρες.<sup>230</sup>) Παράλληλα, για πρώτη φορά μελετήθηκε η μεταβολή του καρβοξυτελικού άκρου του C-FGF23, οι συγκεντρώσεις του οποίου μειώθηκαν επίσης στατιστικά σημαντικά καθ' όλο το παραπάνω διάστημα. Η παρατήρηση ερχόταν σε σχετική αντίθεση με τις προηγούμενες έως τότε μελέτες, οι οποίες όμως ερευνούσαν τις μεταβολές του ακέραιου μορίου του FGF23 (και όχι του καρβοξυτελικού άκρου αυτού), σε πληθυσμούς αιμοκαθαιρούμενων ασθενών με XNN.<sup>228,231</sup>

- Ακόμη μία κλινική μελέτη που δημοσιεύτηκε επίσης το 2013 από τους Wolf M. και συν. επιβεβαίωσε αυτά τα δεδομένα σε 55 σιδηροπενικές γυναίκες χωρίς XNN, οι οποίες μετά από ενδοφλέβια χορήγηση Fe παρουσίασαν αύξηση των επιπέδων του iFGF23 και πτώση εκείνων του C-FGF23, με παροδική μείωση της συγκέντρωσης του P στον ορό.<sup>232</sup>
- Το 2015 διερευνήθηκε ιδιαίτερος από τους Hardy S. και Vandemergel X. η σοβαρότητα της υποφωσφοραιμίας που αναπτύσσεται μετά από παρεντερική χορήγηση Fe. Επισημάνθηκε ότι όταν ο Fe χορηγείται παρεντερικά - τουλάχιστον υπό τη μορφή του καρβοξυμαλτοζικού Fe - ακολουθείται πολύ συχνά από υποφωσφοραιμία, η οποία παραμένει για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα προκαλώντας ενίοτε σημαντικές κλινικές επιδράσεις και λαμβάνοντας μάλιστα σοβαρή μορφή στο 13% των ασθενών.<sup>233</sup> Πολύ πρόσφατα δημοσιεύθηκε ακόμη μία περίπτωση ασθενούς που έλαβε καρβοξυμαλτοζικό Fe και ανέπτυξε επίσης σοβαρή, συμπτωματική υποφωσφοραιμία, με μείωση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D και έντονη φωσφατουρία, μέσω αύξησης του FGF23.<sup>234</sup> Στο σημείο αυτό σημειώνεται ότι οι Dahlerup JF και συν. ανακοίνωσαν το 2016 πως ο ισομαλτοζικός Fe φαίνεται να προκαλεί αρκετά ηπιότερη υποφωσφοραιμία σε σύγκριση με τον καρβοξυμαλτοζικό.<sup>235</sup>
- Σε μια σειρά επιπλέον μελετών έχει παρουσιαστεί ότι οι χαμηλές τιμές του Fe στον ορό σχετίζονται με αυξημένα επίπεδα C-FGF23 και με φυσιολογικά επίπεδα του



ακέραιου μορίου. Επίσης, έχει υποστηριχθεί ότι η σιδηροπενία πιθανότατα οδηγεί σε αυξημένη πρωτεολυτική διάσπαση του iFGF23 στα αδρανή καρβοξυτελικά και αμινοτελικά του θραύσματα, ενώ αντίθετα η ενδοφλέβια χορήγηση σιδηρούχων σκευασμάτων ελαττώνει τα επίπεδα των θραυσμάτων.<sup>26,30,31</sup>

- Στην πιο πρόσφατη σχετική μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2018 και στην οποία μελετήθηκε η ενδοφλέβια χορήγηση Fe σε 35 μη-αιμοκαθαιρούμενους ασθενείς με ΧΝΝ σταδίων 3 έως 5, διαπιστώθηκε ότι κατά το πρώτο διάστημα της σιδηροθεραπείας επηρεάζονται - μόνο παροδικά - τόσο η παραγωγή όσο και η αποδόμηση του iFGF23, με αποτέλεσμα την υποφωσφοραιμία. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται αύξηση του iFGF23 στις ημέρες 1-6 μετά τη χορήγηση και πτώση του C-FGF23 κυρίως στο πρώτο 24ωρο. Ο δε P παρουσίασε μείωση σε στατιστικά σημαντικό βαθμό από τις δύο κιάλας πρώτες ώρες μετά την έγχυση. Στις υπόλοιπες ημέρες, οι μεταβολές των C-FGF23 και P δεν καθορίστηκαν ως στατιστικά σημαντικές. Η μελέτη πιστοποιεί ότι ο μηχανισμός της υποφωσφοραιμίας σχετίζεται άμεσα με την αύξηση του iFGF23, ενώ η χρόνια φλεγμονή χαμηλού βαθμού δε φάνηκε να εμπλέκεται παθοφυσιολογικά.<sup>236</sup>
- Υπάρχουν βεβαίως και δημοσιεύσεις με αποτελέσματα ακόμη και αντίθετα των προαναφερθέντων, οι οποίες είναι ελάχιστες σε αριθμό. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η σχετικά πρόσφατη μελέτη των Roberts MA. και συν. που το 2016 περιέγραψαν σημαντική μείωση του iFGF23 και του P, με αύξηση του C-FGF23 μετά από χορήγηση ενδοφλεβίου Fe σε αιμοκαθαιρούμενους ασθενείς. Εντούτοις, στη συγκεκριμένη ομάδα ασθενών χορηγήθηκαν πολύ μικρότερες ποσότητες ενδοφλεβίου Fe, καθώς οι συμμετέχοντες δεν ήταν σιδηροπενικοί όπως στις άλλες μελέτες.<sup>237</sup>
- Τέλος, σε μία εργασία που δημοσιεύτηκε το 2012 αναφορικά με την από του στόματος χορήγηση συμπληρωμάτων Fe σε σιδηροπενικούς ασθενείς, αφενός μεν επισημάνθηκε ακόμη μία φορά ότι σε έδαφος σιδηροπενίας παρατηρούνται σχετικά αυξημένα επίπεδα FGF23 στο αίμα, αφετέρου δε διαπιστώθηκε ότι η POS χορήγηση του μετάλλου οδηγεί σε σταδιακή πτώση τους στο επόμενο διάστημα.<sup>238</sup>

### 2.3. Η σχέση του FGF23 και της ομοιοστασίας σιδήρου – Παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί.

Οι ερευνητές που μελέτησαν τις προαναφερθείσες αλληλεπιδράσεις μεταξύ Fe, FGF23 και P, εστίασαν και στη διερεύνηση των πιθανών μηχανισμών μέσω των οποίων αυτές λαμβάνουν χώρα. Οι αρχικές υποθέσεις, οι περισσότερο πιθανοί, αλλά και οι πλέον τεκμηριωμένοι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που έχουν κατά καιρούς προταθεί, παρουσιάζονται αμέσως παρακάτω:

(i) Η ενδοφλέβια χορήγηση Fe καθιστάται εφικτή μόνο με τη χρήση σκευασμάτων που εμπεριέχουν συμπλέγματα του μετάλλου με υδατανθρακικό συνδέτη. Μία από τις αρχικές λοιπόν υποθέσεις ήταν ότι η παρεντερική χορήγηση των υδατανθρακικών αυτών μορίων θα μπορούσε να αυξάνει τις ενδοκυττάριας απαιτήσεις σε P, μειώνοντας έτσι τα επίπεδά του στο πλάσμα. Το φαινόμενο αυτό όντως ισχύει, αλλά είναι πρόσκαιρο και συμβαίνει μέχρι και για 2 ώρες μετά τη λήψη του φαρμάκου. Επιπλέον, συνοδεύεται από μείωση στην κλασματική απέκκριση του P στα ούρα και όχι από αύξηση αυτής, σε αντίθεση με το φαινόμενο που εξετάζουμε.<sup>28</sup>

(ii) Μια δεύτερη αρχική υπόθεση ήταν ότι μετά την έγχυση του Fe προκύπτει αύξηση της ερυθροποίησης, η οποία μπορεί να συσχετιστεί με πτώση του P στον ορό λόγω αυξημένης ενδοκυττάριας μεταφοράς του ιόντος. Εντούτοις, και σε αυτήν την περίπτωση, μόνος του ο συγκεκριμένος μηχανισμός δεν μπορεί να εξηγήσει και την εμφάνιση της φωσφατουρίας.<sup>234</sup>

(iii) Η οξεία ανάπτυξη πιθανής νεφροτοξικότητας μετά από έγχυση Fe - όπως συμβαίνει και με τη λήψη άλλων τοξικών μετάλλων όπως είναι το κάδμιο ή ο υδράργυρος - είχε επίσης προταθεί ως μηχανισμός αρχικά, εντούτοις η υπόθεση αυτή δεν μπόρεσε να τεκμηριωθεί, καθώς οι συγκεντρώσεις αμινοξέων στα ούρα των ασθενών παρέμεναν εντός φυσιολογικών ορίων στην κορύφωση της φωσφατουρίας. Επιπρόσθετα, σε έδαφος οποιασδήποτε οξείας νεφρικής βλάβης, η απώλεια P θα κατέστειλε τις τιμές FGF23 και δε θα της αύξανε, ενώ τέλος και η γρήγορη αναστροφή του φαινομένου δεν είναι τόσο συμβατή με βλάβη σε επίπεδο ουροφόρων σωληναρίων. Πιθανολογήθηκε λοιπόν αρκετά πρώιμα η επαγωγή διαταραχής σε επίπεδο μεταβολισμού του φωσφόρου.<sup>28,229</sup>

(iv) Στα επόμενα λίγα χρόνια τελικά ενοχοποιήθηκε η αυξημένη δράση του παράγοντα FGF23 την οποία επιφέρει η ενδοφλέβια χορήγηση Fe. Με τη σειρά της, η αυξημένη αυτή δράση αποδόθηκε αρχικά α) σε αύξηση της σύνθεσης ή/και της

έκκρισης του μορίου, β) σε πιθανή μειωμένη νεφρική κάθαρση του iFGF23 και τελικά γ) σε επηρεαζόμενη από το Fe μεταβολή της δραστηριότητας των ειδικών πρωτεασών που διασπούν ενζυμικά τον iFGF23 στα οστεοκύτταρα στις μη-δραστικές μορφές του C-FGF23 και N-FGF23. Στην τελευταία υπόθεση συγκλίνουν σταδιακά οι περισσότεροι ερευνητές, υποστηρίζοντας ότι τα υψηλά επίπεδα κυκλοφορούντος Fe αναστέλλουν και τα χαμηλά προάγουν την ενεργότητα των πρωτεασών. Μέσω του μηχανισμού αυτού εξηγούνται περαιτέρω τόσο η αύξηση του iFGF23, όσο και η πτώση των συγκεντρώσεων του C-FGF23 και του P μετά την παρεντερική χορήγηση Fe. Ομοίως, δικαιολογούνται τα δυσανάλογα αυξημένα επίπεδα C-FGF23 σε σχέση με τις φυσιολογικές ή ήπια χαμηλές τιμές iFGF23 που έχουν αναφερθεί σε συνθήκες σιδηροπενίας.<sup>26,28,30,31,229,232,236</sup> δ) Μετα-μεταφραστική ανασταλτική επίδραση του Fe στον Ο-γλυκοζυλίωση του FGF23 που τον προστατεύει από την αποδόμηση, αλλά και πιθανή εξωσκελετική αύξηση της έκκρισης FGF23 από όργανα που μπορούν να εκκρίνουν FGF23 και σχετίζονται με το μεταβολισμό του Fe (όπως είναι το ήπαρ και το λεμφικό σύστημα) έχουν επίσης προταθεί ως πιθανοί μηχανισμοί για την αύξηση του FGF23.<sup>232</sup> ε) Ειδικά όσον αφορά στους πάσχοντες από βΜΑ, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα ευρήματα των David V και Ferro E, οι οποίοι έδειξαν σε ανεξάρτητες μελέτες ότι σε έδαφος αυξημένης δραστηριότητας του παράγοντα HIF-1α (Hypoxia-inducible factor 1-alpha) - συνθήκη που λαμβάνει χώρα στους τακτικά μεταγγιζόμενους ασθενείς, ιδίως στο διάστημα πριν την επερχόμενη μετάγγιση - διεγείρεται η μεταγραφή και η έκκριση του iFGF23.<sup>239,240</sup>

## **2.4. Υλικό και Μέθοδος**

### 2.4.1. Σχεδιασμός και Τύπος της μελέτης:

Για τον έλεγχο των προαναφερθέντων υποθέσεων αποφασίστηκε να διεξαχθεί μία προοπτική μελέτη παρατήρησης τύπου ασθενών-μαρτύρων, εγκάρσιας τομής. Το σχετικό αναλυτικό πρωτόκολλο συντάχθηκε το 2011 και έλαβε έγκριση κατά το ίδιο έτος από το «Επιστημονικό Συμβούλιο» και την «Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας» του Γ.Ν.Α. Ελληνικός Ερυθρός Σταυρός. Ο σχεδιασμός ήταν τέτοιος που η συλλογή του συνόλου των πληροφοριών για κάθε συμμετέχοντα (ιστορικό, κλινική εξέταση, συμπλήρωση ερωτηματολογίων διατροφής και συλλογή βιολογικών δειγμάτων αίματος και ούρων) να ολοκληρώνεται σε δύο επισκέψεις, με

μεσοδιάστημα 8 ημερών. Κατά την πρώτη επίσκεψη οι υποψήφιοι συμμετέχοντες ενημερώνονταν αναλυτικά για το είδος και τους στόχους της μελέτης, καθώς και για τον ακριβή τους ρόλο σε αυτήν. Μετά την υπογραφή του σχετικού εντύπου ενημέρωσης/συγκατάθεσης, σε κάθε ασθενή και μάρτυρα που εντάχθηκαν στο πρωτόκολλο καταγράφονταν τα δημογραφικά και σωματομετρικά τους στοιχεία, καθώς και το πλήρες ιατρικό τους ιστορικό. Επιπρόσθετα, διεκπεραιωνόταν η αιμοληψία με τις συνθήκες και προϋποθέσεις που περιγράφονται σε επόμενο κεφάλαιο, αναλύονταν οι οδηγίες για ορθή συλλογή ούρων 24ώρου και παρέχονταν τα ειδικά ερωτηματολόγια καταγραφής διατροφικών συνηθειών με τις σχετικές γραπτές οδηγίες συμπλήρωσης. Κατά τη δεύτερη επίσκεψη οι συμμετέχοντες στη μελέτη προσκόμιζαν το δοχείο συλλογής ούρων 24ώρου και τα συμπληρωμένα ερωτηματολόγια διατροφής. Στον ίδιο χρόνο αναζητούνταν λεπτομέρειες για πιθανή αστοχία στην ορθή διαδικασία συλλογής των ούρων και επανεξεταζόταν το ιστορικό λήψης φαρμάκων ώστε να επιβεβαιωθεί ότι δεν υπήρξε χορήγηση κάποιας ουσίας κατά το μεσοδιάστημα που θα επηρέαζε τις μετρήσεις.

Τα πλεονεκτήματα της επιλογής του συγκεκριμένου τύπου μελέτης, καθώς και του σχεδιασμού του πρωτοκόλλου αυτής, είναι ότι α) δεν υπήρχαν σοβαροί σχετικοί ηθικοί περιορισμοί, β) δεν απαιτήθηκε κάποιο είδος περαιτέρω παρέμβασης, γ) ακολουθήθηκε μία διαδικασία χωρίς εξαιρετικά μεγάλο κόστος και χωρίς ιδιαίτερα προβλήματα στη στρατολόγηση των ασθενών και των μαρτύρων, δ) η μελέτη αφορούσε σε συλλογή πρόσφατων και έγκυρων πληροφοριών από τους δύο πληθυσμούς, ε) οι συλλογές των βιολογικών δειγμάτων και των λοιπών δεδομένων ελάμβαναν χώρα σε δύο κοντινές χρονικά επισκέψεις, στ) ήταν ευκολότερος ο άμεσος έλεγχος πιθανών συγχυτικών παραγόντων και ζ) πρακτικά δε χάθηκαν συμμετέχοντες, καθώς δεν απαιτούνταν μακρό διάστημα παρακολούθησης αυτών. Από την άλλη μεριά, ο σχεδιασμός της συγκεκριμένης μελέτης απαιτούσε σημαντικό αριθμό ασθενών και μαρτύρων, που λόγω της σχετικά χαμηλής συχνότητας της ομόζυγου βΜΑ δεν ήταν τόσο εύκολο να συγκεντρωθούν. Επιπλέον, εξαιτίας της αναγκαιότητας ελέγχου - και στις δύο ομάδες συμμετεχόντων - εξειδικευμένων εργαστηριακών παραμέτρων που δεν προσδιορίζονται εύκολα στην καθ ημέρα πράξη στη Χώρα μας (iFGF23, C-FGF23, Klotho), αυξήθηκε σημαντικά το συνολικό κόστος της επεξεργασίας των δειγμάτων αίματος.

#### 2.4.2. Τόπος διεξαγωγής της μελέτης:

Η παρούσα διατριβή διενεργήθηκε σε τρία κέντρα: (Α) Στο Εργαστήριο Έρευνας Μυοσκελετικών Παθήσεων «Θ. Γαροφαλίδης» της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών στο Γ.Ν.Α. Κ.Α.Τ., όπου έλαβαν χώρα ο σχεδιασμός της μελέτης, οι τακτικές αξιολογήσεις των κλινικοεργαστηριακών ευρημάτων και η τελική στατιστική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. (Β) Στο Τμήμα Ενδοκρινολογίας Μεταβολισμού και Διαβήτη του Γ.Ν.Α. Ελληνικός Ερυθρός Σταυρός «Κοργιαλένιο-Μπενάκειο», όπου έγινε η διαλογή των συμμετεχόντων, η συλλογή, η επεξεργασία και η ανάλυση των περισσότερων βιολογικών δειγμάτων, καθώς και η φύλαξη στους  $-80^{\circ}\text{C}$  του ορού και του πλάσματος για τις ειδικότερες αναλύσεις. (Γ) Στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, όπου διεκπεραιώθηκαν οι ειδικές αναλύσεις των βιολογικών δειγμάτων των ασθενών και των υγιών μαρτύρων για τους παράγοντες iFGF23, C-FGF23 και την πρωτεΐνη Klotho.

#### 2.4.3. Πληθυσμοί της μελέτης και χαρακτηριστικά αυτών

Για τον έλεγχο των προαναφερθέντων υποθέσεων δημιουργήθηκαν δύο βασικές ομάδες: Η ομάδα των πολυμεταγγιζόμενων ασθενών με βΜΑ, με συνολικό αριθμό συμμετεχόντων (n) στα 40 άτομα (Ομάδα THL, n=40) και η ομάδα των υγιών μαρτύρων με συνολικό αριθμό συμμετεχόντων στα 41 άτομα (Ομάδα NOR, n=41). Οι περισσότεροι από τους **πάσχοντες με βΜΑ** μεταγγίζονταν στο «Δρακοπούλειο» Κέντρο Αιμοδοσίας του Γ.Ν.Α. Ελληνικός Ερυθρός Σταυρός και παρακολουθούνταν στα τακτικά εξωτερικά ιατρεία του Τμήματος Ενδοκρινολογίας, Μεταβολισμού και Διαβήτη του ίδιου νοσοκομείου. Υπήρχαν εντούτοις και ασθενείς από άλλα νοσοκομεία της Αττικής, και πιο συγκεκριμένα από τα τμήματα μεταγγίσεων του Νοσοκομείου «Αγία Σοφία» και του «Λαϊκού» Γ.Ν.Α. Για την είσοδο και συμμετοχή τους στη μελέτη οι ασθενείς έπρεπε να πληρούν ορισμένα βασικά κριτήρια. Επιλέχθηκαν λοιπόν για την ομάδα THL ενήλικοι πάσχοντες από βΜΑ, άνδρες και γυναίκες, Καυκάσιας φυλής και ηλικίας από 18 έως και 49 ετών. Όλοι τους ακολουθούσαν επί τουλάχιστον 15 έτη πρόγραμμα τακτικών μεταγγίσεων με δύο έως και τρεις ασκούς πεπλωμένων και συμπυκνωμένων ερυθρών, χορηγούμενων κάθε 14 έως 28 ημέρες. Επιπλέον, οι ασθενείς ελάμβαναν εξατομικευμένα - και τουλάχιστον από έτους - ένα από τα παρακάτω σχήματα αποσιδήρωσης: (α) υποδόρια έγχυση

δεφериοξαμίνης (DFO), (β) από του στόματος χορήγηση νεότερων ηλικιών παραγόντων αποσιδήρωσης (DFP ή DFX) και (γ) συνδυασμό των ανωτέρω (DFO+DFP). Κριτήρια αποκλεισμού για την ομάδα των πασχόντων αποτέλεσαν η παρουσία κύησης, η χρήση κορτικοστεροειδών κατά το τελευταίο έτος, το πιθανό ιστορικό κατάχρησης ουσιών ή αλκοόλ, η παρουσία κακοήθων νεοπλασιών, η παρουσία χρόνιας νεφρικής νόσου (XNN), η συνύπαρξη πρωτοπαθούς ή δευτεροπαθούς υπερπαραθυρεοειδισμού και οι μεταγγίσεις αίματος κατά αραιότερα από τα ως άνω αναφερθέντα διαστήματα.

Αναφορικά με την ομάδα των **υγιών μαρτύρων** (NOR), επιλέχθηκαν με τυχαίο τρόπο εθελοντές παρόμοιας ηλικίας, εθνικότητας και φύλου με την ομάδα των πασχόντων, οι οποίοι επισκέφθηκαν για εξέταση τα εξωτερικά ιατρεία του Γ.Ν.Α. Ελληνικός Ερυθρός Σταυρός κατά το τελευταίο εξάμηνο του 2011 και πληρούσαν τα απαραίτητα δημογραφικά κριτήρια. Τα κριτήρια αποκλεισμού για τη συμμετοχή στην ομάδα ελέγχου αφορούσαν στην παρουσία ομόζυγου ή ετερόζυγου β-θαλασσαιμίας ή δρεπανοκυτταρικής αναιμίας ή μικροδρεπανοκυτταρικής αναιμίας, καθώς και στην παρουσία κύησης, χρόνιας νεφρικής νόσου, υπερπαραθυρεοειδισμού, κακοήθων νεοπλασιών, χρήσης κορτικοστεροειδών και κατάχρησης ουσιών ή αλκοόλ, όπως περιγράφηκαν παραπάνω και για την ομάδα των ασθενών. Επιπρόσθετα, αποκλείονταν τα άτομα με ιστορικό αιμοχρωμάτωσης, με ιστορικό γνωστής οστικής νόσου, με ιστορικό νεφρολιθίασης, με παρουσία υπερβολικά χαμηλών ή παθολογικά υψηλών επιπέδων φερριτίνης στον ορό, με παθολογικές τιμές Ca ή/και P στον ορό και με παθολογικές τιμές Ca ή/και P στα ούρα 24ώρου.

#### 2.4.4. Περιγραφή των μετρούμενων κλινικών και εργαστηριακών παραμέτρων

Σε κάθε ασθενή και μάρτυρα που εντάχθηκε στη μελέτη αναζητήθηκαν και καταγράφηκαν το έτος γέννησης, το ατομικό ιστορικό νοσημάτων και λήψης φαρμάκων, καθώς και οι συνήθειες και ο τρόπος του ζειν. Επίσης, προσδιορίστηκαν με λεπτομέρεια και καταγράφηκαν τα σωματομετρικά στοιχεία, σύμφωνα με τις διεθνείς συστάσεις. Το βάρος σώματος προσδιορίστηκε με ζυγό SECA σε κατάσταση πρωινής νηστείας και με τον ασθενή να φορά συνολικό ρουχισμό έως 200gr. Το ύψος μετρήθηκε με το αναστημόμετρο της ίδιας συσκευής, ενώ τέλος για κάθε συμμετέχοντα υπολογίστηκε και ο Δείκτης Μάζας-Σώματος [«Body-Mass Index» ή BMI (Βάρος σε Kg / Ύψος σε m<sup>2</sup>)]. Ειδικά για τους θαλασσαιμικούς πάσχοντες ζητήθηκαν πρόσθετα στοιχεία για τον ακριβή τύπο της αιματολογικής τους νόσου

(μείζων ή ενδιάμεση μορφή) και τις λεπτομέρειες των σχημάτων μεταγγίσεων και αποσιδήρωσης που ακολουθούσαν κατά τα τελευταία πέντε έτη. Επιπλέον, τους ζητήθηκε να προσκομίσουν τα αποτελέσματα από τους πρόσφατους - από έτους - ακτινολογικούς ελέγχους α) προσδιορισμού της οστικής πυκνότητας που είχε εκτελεστεί για παρακολούθηση της οστικής τους νόσου και β) προσδιορισμού του βαθμού αιμοσιδήρωσης σε ήπαρ και μυοκάρδιο μέσω ειδικής τεχνικής MRI.

Σε όλους τους συμμετέχοντες διενεργήθηκε πρωινή αιμοληψία (08:00 π.μ.) στις 7 έως 12 ημέρες μετά την τελευταία τους μετάγγιση και κατόπιν ολονύκτιας νηστείας 12 ωρών, χωρίς περίδεση, με σκοπό τον προσδιορισμό στο πλάσμα ή στον ορό του αίματος των επιπέδων iFGF23, C-FGF23, Klotho, 25OHD, παραθορμόνης (iPTH), φερριτίνης (FERR), αλβουμίνης (Alb), Ca, διορθωμένου με βάση τα επίπεδα αλβουμίνης ασβεστίου ( $\Delta$ .Ca), P, Mg, γλυκόζης (Glu), αζώτου ουρίας (BUN), κρεατινίνης (Crea), ασπαραγινικής τρανσαμινάσης (SGOT), τρανσαμινάσης της αλανίνης (SGPT) και αλκαλικής φωσφατάσης (ALP). Οι αναλύσεις του μεγαλύτερου μέρους των ως άνω εργαστηριακών παραμέτρων ολοκληρώνονταν κατά την ημέρα της αιμοληψίας, στο Βιοχημικό και Ενδοκρινολογικό εργαστήριο του Γ.Ν.Α. Ελληνικός Ερυθρός Σταυρός. Εξάιρεση αποτελούσαν τα δείγματα για τους παράγοντες FGF23, C-FGF23 και Klotho, τα οποία φυγοκεντρώνταν εκείνη τη στιγμή στο ενδοκρινολογικό εργαστήριο και το πλάσμα και οι οροί μεταγγίζονταν άμεσα σε κρυοσωληνάρια, τα οποία και αποθηκεύονταν στους  $-80^{\circ}\text{C}$ , σε ειδικό ψυγείο του ίδιου νοσοκομείου. Μετά από την ολοκλήρωση όλων των αιμοληψιών και τη συγκέντρωση του συνόλου των δειγμάτων, ακολούθησε η παραγγελία των κατάλληλων αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό των τριών προαναφερθέντων πρωτεϊνικών παραγόντων. Με την παραλαβή τους, τα δείγματα μεταφέρθηκαν με ειδικό ψυχώμενο δοχείο στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών, όπου και αναλύθηκαν.

Η συλλογή των ούρων 24ώρου διενεργήθηκε με συγκεκριμένες οδηγίες και ενώ οι συμμετέχοντες ακολουθούσαν προσεκτικό διαιτολόγιο για δύο ημέρες (κατά την προηγούμενη ημέρα και κατά το 24ωρο της συλλογής), το οποίο αφορούσε σε συνολική κατανάλωση 2.5 μερίδων γαλακτοκομικών ημερησίως - ή αντίστοιχων συμπληρωμάτων αν η λήψη γαλακτοκομικών δεν ήταν εφικτή - με προσοχή στην υπερβολική λήψη αλατιού, καφέ, τσαγιού και πρωτεϊνών, ουσιών δηλαδή που αυξάνουν την αποβολή ασβεστίου στα ούρα. Ως μερίδα γαλακτοκομικού ορίστηκαν οι ποσότητες γαλακτοκομικών που περιέχουν 300 έως 370 mg Ca. Για τον ίδιο λόγο,

συνεστήθη αποφυγή κάθε έντονης σωματικής άσκησης, καθώς και μη-εκτέλεση της συλλογής εάν συνυπήρχε λοίμωξη. Αμέσως μετά την ολοκλήρωση της συλλογής, τα δοχεία των ούρων παραλαμβάνονταν από το βιοχημικό εργαστήριο και ακολουθούσε η άμεση ανάλυση των δειγμάτων για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ασβεστίου (UCa), φωσφόρου (UP), κρεατινίνης (UCrea), ολικού λευκώματος (UPro) και του λόγου UCa/UCrea σε αυτά.

Επιπλέον, υπολογίστηκαν η σωληναριακή επαναρρόφηση φωσφορικών (Tubular Reabsorption of Phosphate, TRP) και ο ρυθμός μέγιστης σωληναριακής επαναρρόφησης φωσφορικών προς το ρυθμό σπειραματικής διήθησης (Tubular maximum reabsorption rate of Phosphate to Glomerular Filtration Rate, TmP/GFR). Ο παράγοντας TRP αντιπροσωπεύει το κλάσμα των φωσφορικών στο σωληναριακό διήθημα το οποίο επαναρροφάται στα νεφρικά σωληνάρια και όσο η τιμή του μειώνεται, τόσο μία κατάσταση υποφωσφοραιμίας οφείλεται σε νεφρική σωληναριακή διαταραχή. Η παράμετρος TmP/GFR χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της νεφρικής διαμεταφοράς του P και αντιπροσωπεύει το θεωρητικά χαμηλότερο όριο του P στον ορό, κάτω από το οποίο όλα τα διηθούμενα φωσφορικά επαναρροφώνται. Σε καταστάσεις υποφωσφοραιμίας, η ανεύρεση μειωμένου TmP/GFR προσανατολίζει σε πρωτοπαθή νεφρική απώλεια φωσφόρου ή σε πρωτοπαθή και δευτεροπαθή υπερπαραθυρεοειδισμό. Αντίθετα, σε υποφωσφοραιμία λόγω μείωσης της παροχής φωσφορικών, ο λόγος TmP/GFR αυξάνει, υποδεικνύοντας αύξηση της νεφρικής επαναρρόφησης του P. Σε καταστάσεις υπερφωσφοραιμίας, τα μειωμένα επίπεδα TmP/GFR προσανατολίζουν σε αυξημένη παροχή φωσφορικών από το ΓΕΣ, τα κύτταρα ή τα οστά, καταστάσεις που σχετίζονται δηλαδή με μείωση της νεφρικής επαναρρόφησης του P.<sup>241</sup>

Τέλος, έγινε μία σημαντική προσπάθεια να καθοριστούν με ακρίβεια τα θρεπτικά συστατικά που προσλαμβάνουν οι συμμετέχοντες στη συνήθη καθημερινότητά τους, έτσι ώστε α) να επιβεβαιωθεί ότι όλα τα άτομα είχαν παρόμοια πρόσληψη βασικών θρεπτικών συστατικών, β) να ελεγχθούν πιθανές επιδράσεις της διατροφής στα αποτελέσματα των μετρήσεων της μελέτης και γ) να συνδυαστούν και αυτές οι πληροφορίες με τα υπόλοιπα κλινικά, εργαστηριακά και απεικονιστικά δεδομένα που αφορούν στον οστικό μεταβολισμό. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ένα ειδικό ερωτηματολόγιο που προμηθεύονταν οι συμμετέχοντες στην πρώτη τους επίσκεψη. Το ερωτηματολόγιο συμπληρωνόταν κατά το επόμενο διάστημα με βάση μία αρχική σχετική εκπαίδευση και τις αναλυτικές γραπτές οδηγίες που τους παρέχονταν, και



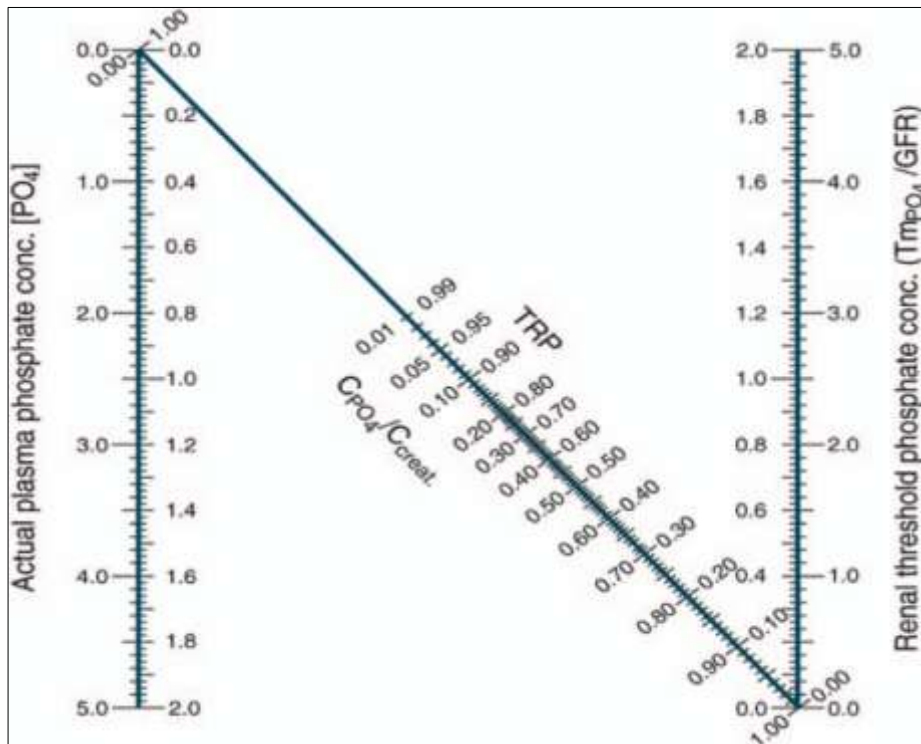
καταγράφονταν σε αυτό με κάθε λεπτομέρεια το σύνολο των τροφών και υγρών που προσελάμβαναν για 7 ημέρες.

#### 2.4.5. Περιγραφή των μεθόδων μέτρησης/ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκαν

Τα δείγματα αίματος όλων των συμμετεχόντων συλλέχθηκαν σε σωληνάρια που περιείχαν Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (K<sub>3</sub>-EDTA) για το διαχωρισμό του πλάσματος, καθώς και σε σωληνάρια κενού που περιείχαν επιταχυντή πήξης και διαχωριστή ορού τύπου γέλης (SST-Gel/clot activator) για το διαχωρισμό του ορού. Τα σωληνάρια EDTA που προορίζονταν για τον υπολογισμό της iPTH ήταν ψυχώμενα. Η προετοιμασία για το πλάσμα απαιτούσε άμεση φυγοκέντρηση 15 λεπτών σε θερμοκρασία 4°C (2-6°C / RCF=2.000 x g), ενώ για το διαχωρισμό του ορού προηγούνταν αναμονή 20-30 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στους 4°C (2-6°C / RCF=2.000 x g). Οι οροί για τους παράγοντες FGF23, C-FGF23 και Klotho μεταγγίζονταν άμεσα σε πλαστικά κρυσωληνάρια, τα οποία και αποθηκεύονταν σε ειδικό ψυγείο στους -80°C που βρισκόταν στον τόπο συλλογής τους.

Οι αναλύσεις των βιολογικών δειγμάτων αίματος για τους παράγοντες iFGF23, C-FGF23 και Klotho διενεργήθηκαν στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Οι συγκεντρώσεις του iFGF23 υπολογίστηκαν σε ορό με τη μέθοδο ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) (Human FGF23 ELISA Kit, EZHFGF23-32K, EMD Millipore Corporation, Missouri, USA) και τα αντίστοιχα αποτελέσματα παρέχονται σε pg/ml. Οι συγκεντρώσεις του C-FGF23 μετρήθηκαν σε ορό με τη μέθοδο ELISA (ELISA kit FGF23 C-Terminal, BI-20702, Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, Wien, Austria) και τα αντίστοιχα αποτελέσματα εκφράζονται σε pg/ml. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης Klotho προσδιορίστηκαν σε ορό με τη μέθοδο ELISA (Human soluble  $\alpha$ -Klotho Assay Kit IBL Immuno-Biological Laboratories Co. Ltd., Takara, Japan) και τα αποτελέσματα παρέχονται σε pg/ml. Αναφορικά με τις αναλύσεις των λοιπών βιολογικών δειγμάτων αίματος και ούρων 24ώρου που διεκπεραιώθηκαν στο Γ.Ν.Α. Ελληνικός Ερυθρός Σταυρός, χρησιμοποιήθηκαν οι κλινικοί αυτόματοι αναλυτές του Βιοχημικού και Ενδοκρινολογικού εργαστηρίου του νοσοκομείου. Οι συγκεντρώσεις της 25OHD προσδιορίστηκαν σε ορό με τη μέθοδο ELISA (EIA OCTEIA Immunodiagnostic Systems Ltd., Boldon, UK) και παρουσιάζονται σε ng/ml. Οι τιμές Ferr μετρήθηκαν σε ορό με τη μέθοδο ELISA (Ferrizyme Kit, Abbott Laboratories, CHI, IL) και

εκφράζονται επίσης σε ng/ml. Η iPTH μετρήθηκε με ανοσοπροσδιορισμό με ηλεκτροχημειοφωταύγεια (ECLIA; Roche PTH, Intact [iPTH]) και οι συγκεντρώσεις της εκφράζονται σε pg/ml. Οι τιμές Glu, BUN, Crea, Ca, Alb, P, Mg, SGOT, SGPT, ALP αξιολογήθηκαν σε χημικό αναλυτή Roche/Hitachi 902 (Roche, Indianapolis, IN) και οι αναλύσεις έγιναν με εμπορικά κιτ αντιδραστηρίων σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι μονάδες μέτρησης που χρησιμοποιούνται είναι mg/dl, εκτός από την Alb που εκφράζεται σε gr/L και τις SGOT, SGPT, ALP που πρέχονται σε U/L. Αναφορικά με τα ούρα 24ώρου επισημαίνεται ότι αμέσως πριν τη συλλογή τους, κάθε συμμετέχοντας τοποθετούσε στο δοχείο συλλογής ως συντηρητικό μέσο τον αναστολέα πρωτεασών «απροτινίνη», τον οποίο είχε προμηθευτεί από το Βιοχημικό εργαστήριο του νοσοκομείου κατά την πρώτη επίσκεψη. Για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων UCa, UP, UCrea και UPro στα ούρα χρησιμοποιήθηκε ο αναλυτής Roche Cobas 8000 Modular Analyzer c502 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) και οι αναλύσεις έγιναν με εμπορικά κιτ αντιδραστηρίων σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ως μονάδες μέτρησης των αντίστοιχων συγκεντρώσεων στα ούρα χρησιμοποιούνται τα mg/24h (για UCa, UP, UCrea) και τα gr/24h (για την UPro.) Η παράμετρος TRP προσδιορίστηκε από τις τιμές P και Crea στον ορό και στα ούρα, με βάση τη μέθοδο που έχει περιγραφεί και δημοσιευθεί από τον R.B.Payne το 1998.<sup>241</sup> Ακολούθως, προσδιορίστηκε ο λόγος TmP/GFR με βάση τις τιμές φωσφόρου πλάσματος και TRP, από το νομόγραμμα των Walton και Bijvoet (Εικόνα 17).<sup>242</sup> Οι τιμές του TmP/GFR εκφράζονται σε mmol/L και η εξαρτώμενη από το φύλο και την ηλικία φυσιολογική τους διακύμανση περιγράφεται σε αναλυτικό πίνακα από τον R.B.Payne.<sup>241</sup>



**Εικόνα 17.** Νομόγραμμα υπολογισμού  $TmP/GFR$  με βάση τη συγκέντρωση φωσφορικών στο πλάσμα ( $PO_4$ ) και την τιμή του  $TRP$ . Στον αριστερό κάθετο άξονα η εσωτερική κλίμακα εκφράζεται σε mmol/L ενώ η εξωτερική σε mg/dl. Η τιμή του  $TmP/GFR$  περιγράφεται στο δεξί κάθετο άξονα, στο σημείο που αυτός τέμνεται από την ευθεία που ενώνει τις τιμές φωσφορικών πλάσματος και  $TRP$ .

Πηγή: Walton RJ, Bijvoet OL. *Lancet* 1975;2:309–10.<sup>242</sup>

Τα περισσότερα από τα άτομα της ομάδας THL προσκόμισαν τα αποτελέσματα του τελευταίου τους πυκνομετρικού οστικού ελέγχου για προσδιορισμό οστικής πυκνότητας με τη μέθοδο DXA (Dual-Energy X-ray Absorptiometry). Οι μετρήσεις είχαν διενεργηθεί σε δύο τύπων πυκνομετρητές: Hologic QDR 4500 Densitometer (Hologic Inc., Bedford, MA) και GE Healthcare Lunar Prodigy Densitometer (GE Healthcare, Madison WI, USA.) Σύμφωνα με τα αποτελέσματα οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σε περαιτέρω υποομάδες, με βάση την τιμή του T-Score και τα κριτήρια του Παγκοσμίου Οργανισμού Υγείας (WHO) σε: Φυσιολογικούς (T-Score  $\geq -1,0$  SD), οστεοπενικούς (T-Score  $< -1,0$  SD και  $> -2,5$  SD) και οστεοπορωτικούς (T-Score  $\leq -2,5$  SD).<sup>243</sup> Διευκρινίζεται ότι (α) δεν ήταν πρακτικά δυνατό να γίνουν νέες μετρήσεις σε έναν και μόνο πυκνομετρητή και (β) η ως άνω κατηγοριοποίηση έγινε κατά συνθήκη και καθαρά για πρακτικούς ερευνητικούς σκοπούς, καθώς ο

ακριβής προσδιορισμός της βαρύτητας της οστικής νόσου στη βΜΑ, μόνο με τις τιμές T-Score από τη DXA, σε άτομα διαφόρων ηλικιών, υπογοναδικών και μη, δε θα ήταν απόλυτα αξιόπιστος.

Εκτός των ανωτέρω, οι περισσότεροι ασθενείς προσκόμισαν και τα αποτελέσματα του τελευταίου τους τομογραφικού ελέγχου για τον ακριβή προσδιορισμό της αιμοσιδήρωσης σε ήπαρ και μυοκάρδιο. Πρόκειται για μία ειδική τεχνική ποσοτικής μαγνητικής τομογραφίας ήπατος-μυοκαρδίου, στην οποία εκτιμάται η απόλυτη συγκέντρωση Fe στα συγκεκριμένα όργανα με βάση την εξίσωση John Wood και συν.<sup>244</sup> Ουσιαστικά αξιολογείται η σταθερά χρόνου T\* (εκφρασμένη σε msec) και οι ασθενείς κατηγοριοποιούνται με βάση τις εργασίες των Angelucci και συν.<sup>245</sup> και Olivieri και συν.<sup>246</sup> σε φυσιολογικούς και σε άτομα με ήπια, μέτρια ή βαριά αιμοσιδήρωση (Πίνακας 6). Τέλος, τα γραπτά αρχεία καταγραφής ημερήσιας πρόσληψης τροφής και υγρών αναλύθηκαν με το σύστημα Science Fit Diet 200A (Science Technologies, Athens, Greece.)

ΟΡΓΑΝΟ	T2* (msec)	ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ
ΗΠΑΡ	>19.1	Φυσιολογικό
	9.1-19.0	Επιτυχής αποσιδήρωση
	4.1-9.0	Ήπια αιμοσιδήρωση
	1.6-4.0	Μέτρια αιμοσιδήρωση
	<1.6	Βαριά αιμοσιδήρωση
ΜΥΟΚΑΡΔΙΟ	>22	Φυσιολογικό
	14-21	Ήπια αιμοσιδήρωση
	8-14	Μέτρια αιμοσιδήρωση
	<8	Βαριά αιμοσιδήρωση

**Πίνακας 6. Ποιοτική ταξινόμηση β-θαλασσαιμικών ασθενών ανάλογα με τη συγκέντρωση σιδήρου σε ήπαρ και μυοκάρδιο, όπως αυτή προσδιορίζεται με βάση τη σταθερά χρόνου T2\* σε ειδική τεχνική MRI.**

*Πηγές:* 1. Angelucci E et al. *Blood* 2005;106(4):1460-5.<sup>245</sup>

2. Olivieri NF and Brittenham GM. *Blood* 1997;89:739-61.<sup>246</sup>

#### 2.4.6. Στατιστική Ανάλυση

- **Υπολογισμός μεγέθους δείγματος:** Η εκτίμηση του απαιτούμενου συνολικού δείγματος έγινε με Power Analysis με το πρόγραμμα G-Power 3.1.5 (Πίνακας 7). Υπολογίστηκε ότι απαιτείται ένα δείγμα τουλάχιστον 40 ατόμων ανά ομάδα ελέγχου, έτσι ώστε να υπάρχει 80% πιθανότητα να αναδειχθεί στατιστικά σημαντική διαφορά σε συγκεντρώσεις FGF23 πάνω από 5 pg/ml ανάμεσα στους ασθενείς με αιμοσιδήρωση σε έδαφος βΜΑ, συγκριτικά με άτομα χωρίς βΜΑ και χωρίς αιμοσιδήρωση, με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας <5% (τεστ διπλής κατεύθυνσης.)

<b>t tests – Means: Difference between two independent means (two groups)</b>	
<b>Analysis:</b>	A priori: Compute required sample size
<b>Input:</b>	Tail(s) = Two
	Effect size d = 0.6250000
	$\alpha$ err prob = 0.05
	Power (1- $\beta$ err prob) = 0.80
	Allocation ratio N2/N1 = 1
<b>Output:</b>	Noncentrality parameter $\delta$ = 2.8641098
	Critical t = 1.9893186
	Df = 82
	Sample size group 1 = 42
	Sample size group 2 = 42
	Total sample size = 84
	Actual power = 0.8079738

**Πίνακας 7. Υπολογισμός μεγέθους δείγματος των ομάδων ελέγχου με Power Analysis (πρόγραμμα G-Power 3.1.5)**

- **Παρουσίαση των μεταβλητών:** Οι τιμές των μεταβλητών παρουσιάζονται χρησιμοποιώντας τον αριθμό των συμμετεχόντων (N), τις μέσες τιμές (median / μ.τ.) και τις τυπικές αποκλίσεις (τ.α.) ή τη διάμεσο και το ενδοτεταρτημοριακό εύρος (IQR) σε περίπτωση που τα δεδομένα δεν ακολουθούν κανονική κατανομή. Στις κατηγορικές μεταβλητές χρησιμοποιούμε τις συχνότητες (v) και τα αντίστοιχα ποσοστά (%).
- **Έλεγχος κανονικότητας κατανομής:** Ο έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής των μετρήσεων έγινε με τη χρήση του Kolmogorov-Smirnov test και την τεχνική Normal Probability Plot.
- **Συγκρίσεις/συσχετίσεις των μεταβλητών:** Οι συγκρίσεις των μεταβλητών ανάμεσα στις δύο ομάδες (NOR και THL) πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το μη-

παραμετρικό τεστ Mann-Whitney, διότι οι βιοχημικοί και οι διατροφικοί δείκτες δεν ακολουθούν κανονική κατανομή. Ομοίως, οι συγκρίσεις των μεταβλητών FGF23, C-FGF23 και Klotho ανάμεσα στις υποομάδες των πασχόντων από βΜΑ που περιγράφονται στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν και αυτές με τη βοήθεια του μη-παραμετρικού τεστ Mann-Whitney, καθώς οι βιοχημικοί και διατροφικοί δείκτες δεν ακολουθούν κανονική κατανομή. Η συσχέτιση ανάμεσα στους βιοχημικούς και διατροφικούς δείκτες μελετήθηκε με τη χρήση του μη-παραμετρικού δείκτη συσχέτισης Spearman. Με τον έλεγχο της αλληλεπίδρασης του μοντέλου ANCOVA ελέγχθηκε εάν η συσχέτιση των οστικών βιοχημικών δεικτών του αίματος με τους διατροφικούς δείκτες είναι ίδια ή αλλάζει, στα φυσιολογικά άτομα και στα άτομα με βΜΑ.

- *Λοιπά στοιχεία:* Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το στατιστικό πακέτο SPSS, version 17.00 (SPSS Inc, Chicago, IL). Όλα τα τεστ είναι διπλής κατεύθυνσης (two-sided). Η τιμή p-value <0,05 καθορίστηκε σαν επίπεδο στατιστικά σημαντικής διαφοράς. Επιπρόσθετα, καταγράφονται και οι οριακές στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $0,05 < P < 0,1$ ) όπου υπάρχουν.

## **2.5. Αποτελέσματα**

Αρχικά, και σύμφωνα με τα προαναφερθέντα κριτήρια εισόδου στη μελέτη, 81 άτομα επιλέχθηκαν για συμμετοχή σε αυτή. Όπως ήδη αναφέρθηκε στην αρχική περιγραφή του πρωτοκόλλου, τα 40 έπασχαν από βΜΑ (ομάδα THL) και τα υπόλοιπα 41 αποτέλεσαν την ομάδα των υγιών μαρτύρων (NOR). Για πέντε άτομα από την ομάδα THL τελικά δεν κατέστη δυνατό να συλλεχθούν πλήρη εργαστηριακά δεδομένα, είτε λόγω αδυναμίας συμμόρφωσης στους κανόνες αιμοληψίας (n=1) και συλλογής ούρων 24ώρου (n=2), είτε εξαιτίας προβλημάτων που προέκυψαν κατά την επεξεργασία των δειγμάτων (n=2). Το ίδιο συνέβη και για δύο άτομα από την ομάδα NOR, με προβλήματα στην επεξεργασία του ορού (n=1) ή στη συλλογή των ούρων (n=1). Επίσης, δύο άτομα από την ομάδα των πασχόντων δεν μπόρεσαν να δώσουν αξιόπιστες πληροφορίες για τα σχήματα αποσιδήρωσης που ακολουθούσαν κατά το τελευταίο έτος και τρία άτομα από την ίδια ομάδα δεν ήταν σε θέση να προσκομίσουν ελέγχους οστικής μάζας, καθώς δεν είχαν ελεγχθεί για περισσότερο από 2 έτη. Τέλος, πλήρη και αξιόπιστη εβδομαδιαία καταγραφή των διατροφικών τους συνηθειών

κατόρθωσαν να συλλέξουν 32 άτομα από την ομάδα NOR και 37 άτομα από την ομάδα THL.

- Από τον έλεγχο των *δημογραφικών δεδομένων*, παρατηρούμε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις 2 ομάδες (THL και NOR) σε σχέση με την ηλικία ( $p=0,794$ ), το φύλο ( $p=0,133$ ), το ύψος ( $p=0,458$ ), το βάρος σώματος ( $p=0,413$ ) και το BMI ( $p=0.261$ ). (Πίνακας 8)

	NOR		THL		p-value
	Median	IQR	Median	IQR	
Ηλικία (έτη)	<b>41,00</b>	10,75	<b>42,00</b>	8,00	0,794
Φύλο [Θ(n%)]	<b>31 (75.6%)</b>	-	<b>24 (60%)</b>	-	0,133
Υψος (cm)	<b>166,50</b>	12,00	<b>165,00</b>	11,00	0,458
Βαρος (Kg)	<b>68,00</b>	10,75	<b>68,00</b>	15,50	0,413
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	<b>24,50</b>	3,68	<b>23,70</b>	6,05	0,261

**Πίνακας 8. Σύγκριση των δεικτών σωματομετρικών δεδομένων ανάμεσα στις ομάδες των θαλασσαιμικών πασχόντων (THL) και των υγιών μαρτύρων (NOR).** Δε διαπιστώνονται στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες ως προς την ηλικία, το φύλο, το ύψος, το βάρος και το δείκτη BMI.

- Ως προς τις *βιοχημικές και ορμονολογικές παραμέτρους*, στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες φάνηκε να υφίστανται για τις τιμές Glu ( $p=0,009$ ), BUN ( $p<0,001$ ), Crea ( $p=0,001$ ), SGOT ( $p=0,002$ ), SGPT( $p=0,031$ ), ALP ( $p=0,003$ ), Ferr ( $p<0,001$ ), iPTH ( $p<0,001$ ), 25OHD ( $p=0,004$ ), UCa ( $p<0,001$ ), UCrea ( $p=0,002$ ), UPro ( $p<0,001$ ), TRP ( $p=0,001$ ), TmP/GFR ( $p=0,005$ ) και UCa/UCrea ( $p=0,05$ ). Πιο συγκεκριμένα, οι τιμές στην ομάδα THL φάνηκε να είναι υψηλότερες για τις παραμέτρους Glu, BUN, SGOT, SGPT, ALP, Ferr, UCa, UCrea, UCa/UCrea, UPro, TRP, TmP/GFR και χαμηλότερες για τις παραμέτρους Crea, iPTH, 25OHD, σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές στην ομάδα NOR. (Πίνακας 9)

	NOR		THL		p-value
	Median	IQR	Median	IQR	
Glu (mg/dl)	<b>86,00</b>	17,00	<b>97,00</b>	22,00	<b>0,009</b>
BUN (mg/dl)	<b>12,00</b>	5,00	<b>18,00</b>	7,00	<b>&lt;0,001</b>
Crea (mg/dl)	<b>0,70</b>	0,20	<b>0,60</b>	0,20	<b>0,001</b>
Ca (mg/dl)	<b>9,50</b>	0,50	<b>9,70</b>	0,80	0,164
P (mg/dl)	<b>3,50</b>	0,70	<b>3,70</b>	0,90	0,200
Mg (mg/dl)	<b>2,10</b>	0,20	<b>2,10</b>	0,30	0,097
Alb (mg/dl)	<b>45,00</b>	4,00	<b>46,00</b>	7,00	0,504
SGOT (IU/L)	<b>16,00</b>	4,00	<b>21,00</b>	14,00	<b>0,002</b>
SGPT (IU/L)	<b>16,00</b>	13,00	<b>20,00</b>	26,00	<b>0,031</b>
ALP (IU/L)	<b>60,00</b>	20,00	<b>72,00</b>	34,00	<b>0,003</b>
Ferr (ng/ml)	<b>32,00</b>	48,00	<b>739,00</b>	1260,00	<b>&lt;0,001</b>
iPTH (pg/ml)	<b>35,00</b>	17,00	<b>19,00</b>	12,00	<b>&lt;0,001</b>
25OHD	<b>34,00</b>	22,00	<b>24,00</b>	12,70	<b>0,004</b>
UCa (mg/24h)	<b>211,00</b>	105,00	<b>317,00</b>	143,00	<b>&lt;0,001</b>
UP (mg/24h)	<b>855,00</b>	467,00	<b>884,00</b>	501,50	0,445
UCrea	<b>1.012,00</b>	284,00	<b>1.200,00</b>	440,00	<b>0,002</b>
UPro (gr/24h)	<b>0,09</b>	0,04	<b>0,15</b>	0,10	<b>&lt;0,001</b>
TRP	<b>0,84</b>	0,07	<b>0,88</b>	0,07	<b>0,001</b>
TmP/GFR(mmol/L)	<b>3,10</b>	0,83	<b>3,55</b>	1,04	<b>0,005</b>
UCa / UCrea	<b>0,22</b>	0,10	<b>0,25</b>	0,13	<b>0,05</b>

Πίνακας 9. Σύγκριση των βασικών βιοχημικών και ορμονικών παραμέτρων ανάμεσα στις ομάδες των θαλασσαιμικών πασχόντων (THL) και των υγιών μαρτύρων (NOR). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές που προκύπτουν από τις επιμέρους συγκρίσεις σημειώνονται με κόκκινο χρώμα.

- *Σύγκριση των συγκεντρώσεων iFGF23, C-FGF23, Klotho μεταξύ των ομάδων:* Η σύγκριση των επιπέδων iFGF23 στον ορό μεταξύ των β-θαλασσαιμικών και των υγιών μαρτύρων δεν ανέδειξε την παρουσία στατιστικά σημαντικής διαφοράς των τιμών στους δύο πληθυσμούς, τόσο με μη-παραμετρική ανάλυση ( $p=0,149$ ), όσο και με το λογαριθμικό μετασχηματισμό των δεδομένων ( $p=0,171$ ). Η σύγκριση των επιπέδων C-FGF23 στον ορό μεταξύ των ατόμων με βΜΑ και των υγιών μαρτύρων



ανέδειξε την παρουσία στατιστικά σημαντικής διαφοράς των τιμών στους δύο πληθυσμούς και με μη-παραμετρική ανάλυση ( $p=0,040$ ) και με λογαριθμικό μετασχηματισμό των δεδομένων ( $p=0,044$ ). Όσον αφορά τέλος στην πρωτεΐνη Klotho, και πάλι δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των συγκρινόμενων πληθυσμών (THL και NOR), ούτε με τη μη-παραμετρική ανάλυση ( $p=0,134$ ), ούτε με το λογαριθμικό μετασχηματισμό των δεδομένων ( $p=0,197$ ) (Πίνακας 10).

		NOR (n=40)		THL (n=37)		p-value
		Median	IQR	Median	IQR	
Μη παραμετρική ανάλυση	C-FGF23 (pg/ml)	<b>9,85</b>	7,24	<b>5,25</b>	12,67	<b>0,040</b>
	iFGF23 (pg/ml)	<b>5,72</b>	9,43	<b>7,86</b>	19,15	0,149
	Klotho (pg/ml)	<b>1.410,00</b>	1.021,07	<b>839,16</b>	1.082,24	0,134
		Mean	SD	Mean	SD	
Λογαριθμικός μετασχηματισμός	C-FGF23 (pg/ml)	<b>1,001</b>	0,330	<b>0,799</b>	0,467	<b>0,044</b>
	iFGF23 (pg/ml)	<b>0,804</b>	0,409	<b>0,948</b>	0,475	0,171
	Klotho (pg/ml)	<b>3,054</b>	0,293	<b>2,958</b>	0,338	0,197

**Πίνακας 10. Σύγκριση των συγκεντρώσεων iFGF23, C-FGF23, Klotho ανάμεσα στις ομάδες των θαλασσαιμικών πασχόντων (THL) και των υγιών μαρτύρων (NOR).** Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές που προκύπτουν σημειώνονται με κόκκινο χρώμα. Παρατηρούμε ότι τα επίπεδα του C-FGF23 στον ορό είναι σε στατιστικά σημαντικό βαθμό χαμηλότερα στην ομάδα των θαλασσαιμικών πασχόντων (THL) σε σύγκριση με την ομάδα των υγιών μαρτύρων (NOR), τόσο με μη-παραμετρική ανάλυση όσο και με λογαριθμικό μετασχηματισμό των δεδομένων. Αντίθετα, δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των προαναφερθέντων ομάδων ούτε για τον FGF23, ούτε για την πρωτεΐνη Klotho.

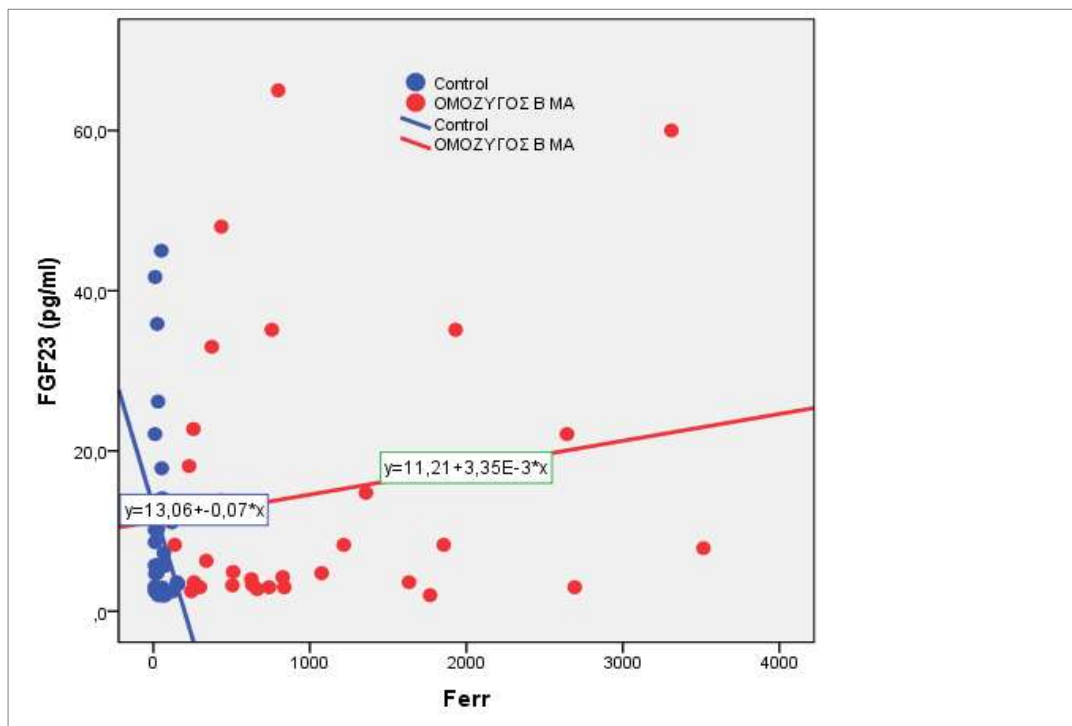
➤ **Συσχετίσεις των συγκεντρώσεων iFGF23, C-FGF23, Klotho με τις τιμές Ferr:**

Στη συσχέτιση των τιμών iFGF23 στον ορό με εκείνες της Ferr, παρατηρείται ότι τείνει να υπάρξει μέτρια αρνητική, οριακά στατιστικά σημαντική συσχέτιση της Ferr με τον iFGF23 μόνο για την ομάδα NOR ( $r = -0,278$ ,  $p=0,086$ ), ενώ δεν υφίσταται συσχέτιση μεταξύ των δύο παραμέτρων για την ομάδα THL. Για τις τιμές του C-FGF23 υπάρχει μέτρια αρνητική, στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τα επίπεδα της Ferr και για τις δύο ομάδες (NOR:  $r = -0,304$ ,  $p=0,050$  και THL:  $r = -0,421$ ,  $p=0,018$ ), όπως και για το σύνολο του πληθυσμού της μελέτης (TOT:  $r = -0,364$ ,  $p=0,002$ .) Για την πρωτεΐνη Klotho δε βρέθηκε να υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση των τιμών της με τα επίπεδα φερριτίνης στον ορό (Πίνακας 11).

		<b>C-FGF23</b>	<b>iFGF23</b>	<b>Klotho</b>
<b>Ferr</b>	TOT	<b>-0,364 (p=0,002)</b>	0,036 (p=0,765)	-0,132 (p=0,275)
	NOR	<b>-0,304 (p=0,050)</b>	-0,278 (p=0,086)	0,000 (p=0,999)
	THL	<b>-0,421 (p=0,018)</b>	0,080 (p=0,668)	0,100 (p=0,593)

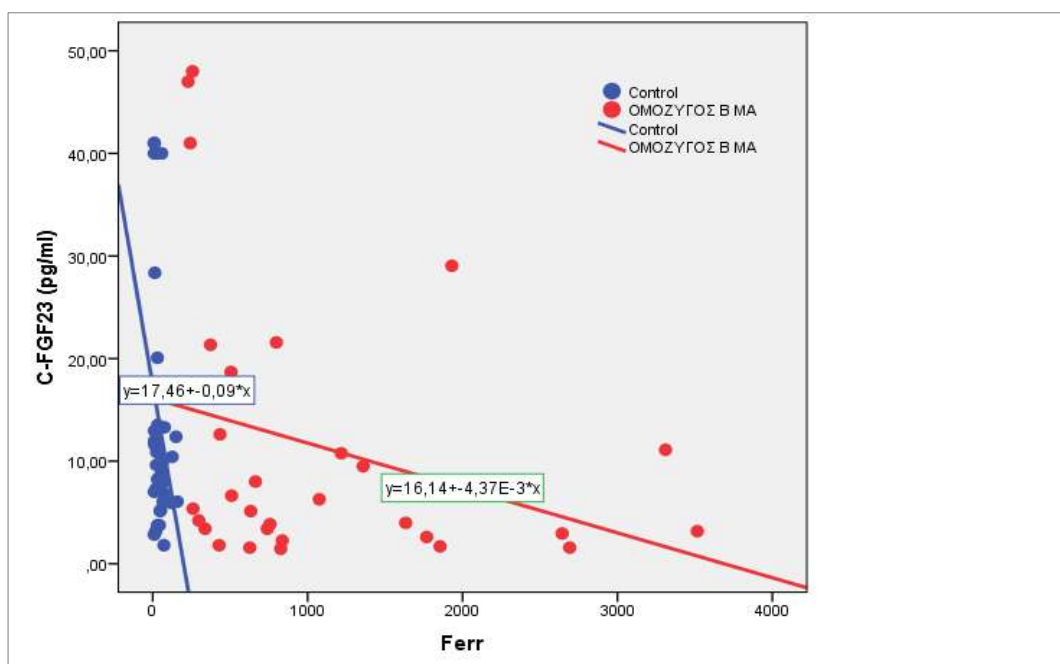
**Πίνακας 11.** Συσχετίσεις των συγκεντρώσεων iFGF23, C-FGF23, Klotho με εκείνες τη Ferr στο σύνολο των συμμετεχόντων (TOT), στην ομάδα των υγιών μαρτύρων (NOR) και στην ομάδα των θαλασσαιμικών πασχόντων (THL). Στατιστικά σημαντική - μέτρια αρνητική - συσχέτιση με τις τιμές φερριτίνης προκύπτει μόνο για τον C-FGF23 σε όλες τις ομάδες.

Σε ένα βήμα παραπέρα, ελέγχθηκε η επίδραση που μπορεί να ασκεί η ίδια η νόσος της βΜΑ στη σχέση που αναπτύσσεται μεταξύ των επιπέδων iFGF23, C-FGF23 και Klotho με εκείνα της Ferr. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα Γραφήματα 1 έως 3 και καταδεικνύουν ότι η συσχέτιση που υφίσταται για κάθε έναν από τους τρεις αυτούς παράγοντες με τη Ferr, δε διαφέρει ανάμεσα στις ομάδες NOR και THL και συνεπώς η παρουσία ή όχι της βΜΑ δε φαίνεται να επηρεάζει αυτήν τη συσχέτιση.



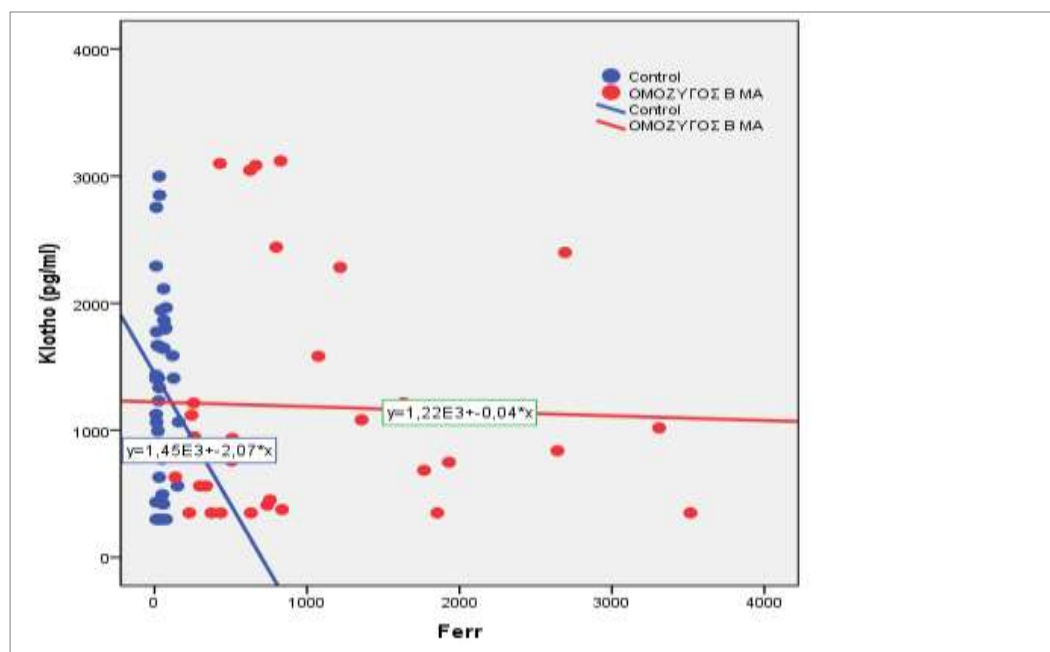
**Γράφημα 1. Η επίδραση της βΜΑ στη σχέση του iFGF23 με τη Ferr.**

Η συσχέτιση του iFGF23 με τη Ferr δε διαφέρει ανάμεσα στις ομάδες NOR και THL, καθώς η όποια αλληλεπίδραση υφίσταται ανάμεσα στην ομάδα (NOR και THL) και τη Ferr, σε σχέση με το δείκτη iFGF23, είναι στατιστικά μη-σημαντική ( $p=0,252$ ). Αυτό σημαίνει ότι η συσχέτιση του iFGF23 με τη Ferr δε διαφέρει ανάμεσα στις ομάδες των φυσιολογικών ατόμων και των ατόμων με βΜΑ.



### Γράφημα 2. Επίδραση της βΜΑ στη σχέση του C-FGF23 με τη Ferr.

Η συσχέτιση του C-FGF23 με τη Ferr δε διαφέρει ανάμεσα στις ομάδες NOR και THL, καθώς η όποια αλληλεπίδραση υφίσταται ανάμεσα στην ομάδα (NOR και THL) και τη Ferr, σε σχέση με το δείκτη C-FGF23, είναι στατιστικά μη-σημαντική ( $p=0,106$ ). Εν κατακλείδι, η συσχέτιση του C-FGF23 με τη Ferr δε διαφέρει ανάμεσα στις ομάδες των φυσιολογικών ατόμων και των ατόμων με βΜΑ.



### Γράφημα 3. Επίδραση της βΜΑ στη σχέση της πρωτεΐνης Klotho με την Ferr.

Η συσχέτιση της πρωτεΐνης Klotho με τη Ferr δε διαφέρει ανάμεσα στις ομάδες NOR και THL, καθώς η όποια αλληλεπίδραση υφίσταται ανάμεσα στην ομάδα (NOR και THL) και τη Ferr, σε σχέση με το δείκτη Klotho, είναι στατιστικά μη-σημαντική ( $p=0,571$ ). Συνεπώς, η συσχέτιση της Klotho με τη Ferr δε διαφέρει ανάμεσα στις ομάδες των φυσιολογικών ατόμων και των ατόμων με βΜΑ.

#### ➤ Συσχετίσεις των συγκεντρώσεων iFGF23, C-FGF23 και Klotho με την 25OHD.

Από τη στιγμή που η βιταμίνη D αποτελεί ρυθμιστή της οστικής εναλλαγής, προάγει την απορρόφηση Ca και P από το ΓΕΣ, καθώς και την επαναρρόφησή τους σε επίπεδο νεφρικών σωληναρίων, ελέγχθηκε η πιθανή παρουσία συσχετίσεων των επιπέδων των iFGF23, C-FGF23 και Klotho με τις τιμές της 25OHD στον ορό των συμμετεχόντων. Από τον έλεγχο που διενεργήθηκε δεν παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση σε κάποια από τις ομάδες (Πίνακας 12).

		<b>C-FGF23</b>	<b>iFGF23</b>	<b>Klotho</b>
<b>25OHD</b>	TOT	0,001 ( p=0,993)	0,026( p=0,833)	0,091( p=0,453)
	NOR	-0,025 ( p=0,880)	0,166( p=0,313)	0,194( p=0,236)
	THL	-0,085 ( p=0,650)	0,041( p=0,828)	-0,171( p=0,357)

**Πίνακας 12.** Συσχετίσεις των συγκεντρώσεων **iFGF23**, **C-FGF23** και πρωτεΐνης **Klotho** με εκείνες της **25OHD** στο σύνολο των συμμετεχόντων (**TOT**), στην ομάδα των υγιών μαρτύρων (**NOR**) και στην ομάδα των θαλασσαιμικών πασχόντων (**THL**). Δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις.

➤ **Συσχέτιση του λόγου *UCa/UCrea* με τη *Ferr*.** Στη συσχέτιση των τιμών του λόγου *UCa/UCrea* (με τη βοήθεια του οποίου ελέγχουμε το μέγεθος της αποβολής Ca στα ούρα) με εκείνες της *Ferr*, παρατηρείται ότι υφίσταται χαμηλή θετική, οριακά στατιστικά σημαντική συσχέτιση της *Ferr* με το λόγο *UCa/UCrea* για το σύνολο του πληθυσμού της μελέτης (**TOT**:  $r=0,219$ ,  $p=0,061$ ), αλλά όχι και για κάποια από τις επιμέρους ομάδες ελέγχου **NOR** ή **THL** (Πίνακας 13).

		<b>UCa / UCrea</b>
<b>Ferr</b>	TOT	0,219 ( p=0,061)
	NOR	0,046 ( p=0,784)
	THL	0,059 ( p=0,730)

**Πίνακας 13.** Συσχέτιση των τιμών *UCa/UCrea* με εκείνες τη *Ferr* στο σύνολο των συμμετεχόντων (**TOT**), στην ομάδα των υγιών μαρτύρων (**NOR**) και στην ομάδα των θαλασσαιμικών πασχόντων (**THL**). Οριακά στατιστικά σημαντική χαμηλή θετική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ των δύο εργαστηριακών παραμέτρων μόνο για την ομάδα **TOT**.

➤ **Σύγκριση των επιπέδων των iFGF23, C-FGF23 και Klotho με βάση το σχήμα αποσιδήρωσης.** Οι ασθενείς για τους οποίους υπήρχαν διαθέσιμα δεδομένα τιμών iFGF23, C-FGF23 και Klotho (N=37), ανάλογα με την αγωγή αποσιδήρωσης που ελάμβαναν κατά το τελευταίο έτος πριν τη συμμετοχή τους στη μελέτη, κατηγοριοποιήθηκαν σε 4 ξεχωριστές υποομάδες ως ακολούθως: Άτομα που ελάμβαναν DFO: Ομάδα 1 (N=3). Άτομα που ελάμβαναν DFP: Ομάδα 2 (N=8). Άτομα που ελάμβαναν DFX: Ομάδα 3 (N=12). Άτομα που ελάμβαναν συνδυαστική θεραπεία με DFP+DFO: Ομάδα 4 (N=15). Σκοπός ήταν να βρεθεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ αυτών των υποομάδων ως προς τα επίπεδα iFGF23, C-FGF23 και Klotho, έτσι ώστε να επισημανθεί οποιαδήποτε πιθανή φαρμακευτική επίδραση στις τιμές των συγκεκριμένων παραμέτρων. Στους Πίνακες 14(α) και 14(β) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα αυτών των συγκρίσεων, από τα οποία προκύπτει ότι δεν υφίστανται στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις ως προς τα επίπεδα των τριών εργαστηριακών δεικτών, τόσο ανάμεσα στα άτομα που ελάμβαναν DFX (3) ή DFO+DFP (4) (τα οποία αποτελούσαν και την πλειοψηφία των ασθενών), όσο και ανάμεσα στα άτομα που ελάμβαναν οποιαδήποτε μονοθεραπεία (1, 2, 3) ή συνδυαστική θεραπεία αποσιδήρωσης (4).

	CHELATION	Median	IQR	p-value
iFGF23 (pg/ml)	3	4,82	11,54	0,283
	4	10,19	29,78	
C-FGF23 (pg/ml)	3	3,59	5,95	0,193
	4	16,29	31,79	
Klotho (pg/ml)	3	1.009,45	2.291,79	0,771
	4	987,17	1.147,79	

**Πίνακας 14(α). Σύγκριση των επιπέδων των παραμέτρων iFGF23, C-FGF23 και Klotho, σε σχέση με το σχήμα αποσιδήρωσης (CHELATION) των θαλασσαιμικών πασχόντων.** Παρατηρούμε ότι δεν υφίστανται στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των ατόμων που λαμβάνουν αγωγή με DFX (3) και συνδυαστική θεραπεία αποσιδήρωσης (4) σε σχέση με τα επίπεδα των iFGF23 (p=0,283), C-FGF23 (p=0,193) και Klotho (p=0,771).

	CHELATION	Median	IQR	p-value
iFGF23 (pg/ml)	1-2-3	7,285	27,2	0.559
	4	10,189	29,8	
C-FGF23 (pg/ml)	1-2-3	4,6782	8,10	0.295
	4	16,2874	31,79	
Klotho (pg/ml)	1-2-3	794,04	1712	0.619
	4	987,17	1148	

**Πίνακας 14(β). Σύγκριση των επιπέδων των παραμέτρων iFGF23, C-FGF23 και Klotho, σε σχέση με το σχήμα αποσιδήρωσης (CHELATION) των θαλασσαιμικών πασχόντων.** Παρατηρούμε ότι δεν υφίστανται στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των ατόμων που λαμβάνουν ως αγωγή αποσιδήρωσης οποιαδήποτε μονοθεραπεία (1-2-3) και συνδυαστική θεραπεία (4) σε σχέση με τα επίπεδα των iFGF23 ( $p=0,559$ ), C-FGF23 ( $p=0,295$ ) και Klotho ( $p=0,619$ ).

- **Σύγκριση των επιπέδων των iFGF23, C-FGF23 και Klotho με βάση τη βαρύτητα της οστικής νόσου.** Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι ασθενείς με βΜΑ κατηγοριοποιήθηκαν περαιτέρω σε φυσιολογικούς (N=4), οστεοπενικούς (N=10) και οστεοπορωτικούς (N=23), με βάση την τιμή του T-Score.<sup>243</sup> Ακολούθησε σύγκριση των επιπέδων των iFGF23, C-FGF23 και Klotho μεταξύ των οστεοπενικών και οστεοπορωτικών ατόμων, τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 15(α). Όπως διαπιστώνουμε, δε φάνηκε να υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις των συγκεντρώσεων των τριών εργαστηριακών παραμέτρων μεταξύ των δύο υποομάδων οστικής νόσου. Επιπλέον, έγινε σύγκριση των επιπέδων των τριών δεικτών μεταξύ των οστεοπορωτικών ασθενών και όλων των υπολοίπων θαλασσαιμικών (φυσιολογικοί και οστεοπενικοί), όπου και πάλι δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των υποομάδων [Πίνακας 15(β)].

	ΟΣΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ	Median	IQR	p-value
iFGF23 (pg/ml)	οστεοπενικοί	8,28	10,3	0,419
	οστεοπορωτικοί	11,05	28,3	
C-FGF23 (pg/ml)	οστεοπενικοί	6,29	7,18	0,815
	οστεοπορωτικοί	4,01	19,31	
Klotho (pg/ml)	οστεοπενικοί	1.018,66	1,477	0,637
	οστεοπορωτικοί	887,83	1548	

**Πίνακας 15(α).** Σύγκριση των δεικτών iFGF23, C-FGF23 και Klotho σε σχέση με τη βαρύτητα της οστικής νόσου. Παρατηρούμε ότι δεν υφίσταται στατιστικά σημαντική διαφορά αναμεσα σε οστεοπενικούς και οστεοπορωτικούς πάσχοντες σε σχέση με τις εργαστηριακές τιμές των iFGF23 ( $p=0,419$ ), C-FGF23 ( $p=0,815$ ) και klotho ( $p=0,637$ ).

	ΟΣΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ	Median	IQR	p-value
iFGF23 (pg/ml)	Φυσιολογικοί+οστεοπενικοί	6,29	10,4	0,288
	οστεοπορωτικοί	11,05	28,3	
C-FGF23 (pg/ml)	Φυσιολογικοί+οστεοπενικοί	5,14	7,59	0,682
	οστεοπορωτικοί	4,01	19,31	
Klotho (pg/ml)	Φυσιολογικοί+οστεοπενικοί	591,10	1.552	0,308
	οστεοπορωτικοί	887,83	1.548	

**Πίνακας 15(β).** Σύγκριση των δεικτών iFGF23, C-FGF23 και klotho σε σχέση με τη βαρύτητα της οστικής νόσου. Παρατηρούμε ότι δεν υφίσταται στατιστικά σημαντική διαφορά αναμεσα στους οστεοπορωτικούς και σε όλους τους υπόλοιπους ασθενείς (οστεοπενικούς και φυσιολογικούς), σε σχέση με τις εργαστηριακές τιμές των iFGF23 ( $p=0,288$ ), C-FGF23 ( $p=0,682$ ) και Klotho ( $p=0,308$ ).



➤ **Συσχέτιση των επιπέδων των iFGF23, C-FGF23 και Klotho με τις τιμές T2\* στην MRI ήπατος/καρδίας.** Για 30 άτομα από την ομάδα των πασχόντων υπήρχαν δεδομένα προσδιορισμού του φορτίου σιδήρου σε ήπαρ και καρδία με MRI από το τελευταίο έτος. Ως εκ τούτου, ελέγχθηκε η πιθανή συσχέτιση της βαρύτητας της αιμοσιδήρωσης - εκφρασμένης με τις τιμές T2\* ήπατος και καρδίας - με τις συγκεντρώσεις των iFGF23, C-FGF23 και Klotho στον ορό των θαλασσαιμικών ασθενών. Και σε αυτήν την περίπτωση δε βρέθηκε να υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των συγκεκριμένων μεγεθών (Πίνακας 16).

		C-FGF23	iFGF23	Klotho
T2* ήπατος	βMA	0,022( p=0,920)	0,030( p=0,888)	-0,213( p=0,319)
T2* καρδίας	βMA	0,216( p=0,310)	-0,195( p=0,361)	-0,080( p=0,710)

**Πίνακας 16. Συσχέτιση των επιπέδων iFGF23, C-FGF23 και Klotho με τις τιμές T2\* ήπατος και καρδίας.** Όπως αποτυπώνεται στον πίνακα, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση α) των τιμών T2\* ήπατος με τα επίπεδα iFGF23 ( $r=0,030$ ,  $p=0,888$ ), C-FGF23 ( $r=0,0022$ ,  $p=0,920$ ) και Klotho ( $r=-0,213$ ,  $p=0,319$ ) και β) των τιμών T2\* καρδίας με τα επίπεδα iFGF23 ( $r=-0,195$ ,  $p=0,361$ ), C-FGF23 ( $r=0,216$ ,  $p=0,310$ ) και Klotho ( $r=-0,080$ ,  $p=0,710$ ).

Αναφορικά τέλος με τις προσλήψεις θρεπτικών συστατικών από τη διατροφή, δε φάνηκε να προκύπτουν στατιστικά σημαντικές διαφορές κατανάλωσης ανάμεσα στις δύο ομάδες (THL και NOR) σε σχέση με όλες τις διατροφικές παραμέτρους, με μόνο το μαγγάνιο (Mn) να παρουσιάζει - μία πρακτικά μη αξιολογήσιμη - τάση για διαφορά ( $p=0,064$ ) (Πίνακας 17).

	NOR		THL		p-value
	Median	IQR	Median	IQR	
Energy (kcal)	1870,79	553,72	1856,98	618,44	0,698
Energy (kJ)	7751,60	2360,49	7799,38	2492,98	0,790
Protein(g)	74,94	20,59	79,37	28,39	0,434
CHO(g)	197,19	88,44	176,12	69,57	0,174
Συνέχεια στη σελίδα 95					

Συνέχεια από τη σελίδα 94					
FAT (g)	98,44	43,53	94,99	37,54	0,994
Caffeine (mg)	126,69	117,34	165,60	128,33	0,277
Alcohol (g)	2,52	4,84	2,95	3,11	0,818
Fiber (g)	16,04	5,38	13,15	7,25	0,101
Water (g)	1.373,53	1.276,26	1.327,47	1.045,69	0,480
Mn (mg)	4,19	3,59	2,86	2,11	0,064
Cu (mg)	1,09	0,65	1,09	0,64	0,715
Zn (mg)	10,60	3,80	9,55	5,15	0,280
Fe (mg)	13,02	6,72	12,58	5,96	0,342
Se (µg)	106,76	24,73	113,28	44,05	0,621
Ca (mg)	994,75	406,45	965,47	465,98	0,291
K (mg)	2.382,93	956,82	2.535,70	1234,28	0,732
Mg (mg)	275,61	80,50	282,80	103,26	0,970
Na (mg)	2.149,44	1322,47	2.203,08	982,34	0,790
P (mg)	1.248,13	496,68	1.326,31	499,68	0,970
vit A (µg)	866,72	360,87	928,86	873,83	0,548
vit B12 (µg)	4,40	2,47	4,22	2,18	0,528
vit B6 (mg)	1,59	0,68	1,75	0,82	0,579
vit C (mg)	95,67	67,07	86,53	107,44	0,732
vit D	124,30	103,46	134,56	143,07	0,579
vit E (mg)	9,15	3,84	7,62	5,47	0,407
vit K	166,39	126,90	131,36	157,07	0,305
vit B1 (mg)	1,52	0,63	1,69	0,84	0,595
vit B3 (mg)	19,88	9,79	22,05	13,18	0,399
Pantothenic acid	4,39	1,70	4,72	2,34	0,301
vit B2 (mg)	2,06	0,70	2,14	1,01	0,767
Folic acid (mg)	371,34	115,95	337,45	190,68	0,390
SFA (g)	31,91	17,95	33,28	13,86	0,687
MUFA (g)	42,59	17,46	42,48	25,17	0,808
PUFA (g)	10,16	5,29	10,91	6,51	0,909
T-CHOL (mg)	230,00	118,47	267,66	154,18	0,102

**Πίνακας 17. Σύγκριση των διατροφικών δεικτών πρόσληψης θρεπτικών συστατικών με τις τροφές ανάμεσα στις ομάδες των θαλασσαιμικών πασχόντων**

(THL) και των υγιών μαρτύρων (NOR). Παρατηρείται απουσία στατιστικά σημαντικών διαφορών ανάμεσα στις ομάδες THL και NOR. Energy=ενέργεια, Protein=πρωτεΐνες, CHO=υδατάνθρακες, FAT=λιπαρά, Caffeine=καφεΐνη, Alcohol=οινόπνευμα, Fiber=φυτικές ίνες, Water=νερό, Mn=μαγγάνιο, Cu=χαλκός, Zn=ψευδάργυρος, Fe=σίδηρος, Se=σελήνιο, Ca=ασβέστιο, K=κάλιο, Mg=μαγνήσιο, Na=νάτριο, P=φωσφόρος, vit=βιταμίνη, Folic acid=φυλλικό οξύ, SFA=κεκορεσμένα λιπαρά, MUFA=μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, PUFA=πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, T-CHOL=ολική χοληστερόλη.

Μελετήθηκε επίσης κατά πόσο μπορεί να συσχετίζεται η διατροφική πρόσληψη συγκεκριμένων θρεπτικών συστατικών (Ca, P, Mg, Vit.D) που επηρεάζουν τον οστικό μεταβολισμό με τα επίπεδα Δ.Ca, P, Mg, 25OHD και PTH στον ορό, για όλες τις ομάδες των συμμετεχόντων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 18 και καταδεικνύουν μόνο (i) μέτρια αρνητική στατιστικά σημαντική συσχέτιση της πρόσληψης P με την 25OHD αίματος για την ομάδα THL ( $r = -0,385$ ,  $p = 0,022$ ) και (ii) υψηλή θετική οριακά στατιστικά σημαντική συσχέτιση της πρόσληψης P με τα επίπεδα P αίματος για την ομάδα NOR ( $r = 0,398$ ,  $p = 0,067$ ).

		Ca	Mg	VitD	P
Δ.Ca (αίμα)	TOT	0,113 ( p=0,401)	0,105( p=0,439)	-0,005( p=0,972)	0,106( p=0,434)
	NOR	0,194 ( p=0,386)	0,151( p=0,501)	-0,023( p=0,919)	0,073( p=0,745)
	THL	0,145 ( p=0,406)	0,057( p=0,746)	-0,038( p=0,827)	0,117( p=0,504)
P (αίμα)	TOT	-0,105 ( p=0,438)	-0,221( p=0,098)	-0,146( p=0,280)	0,084( p=0,534)
	NOR	-0,129 ( p=0,569)	-0,219( p=0,328)	-0,221( p=0,323)	<b>0,398( p=0,067)</b>
	THL	-0,083 ( p=0,637)	-0,221( p=0,202)	-0,142( p=0,416)	-0,079( p=0,652)
Mg (αίμα)	TOT	-0,035 ( p=0,794)	-0,114( p=0,400)	-0,092( p=0,498)	-0,051( p=0,704)
	NOR	0,100 ( p=0,658)	-0,076( p=0,737)	-0,021( p=0,927)	0,138( p=0,540)
	THL	-0,133 ( p=0,446)	-0,127( p=0,466)	-0,155( p=0,373)	-0,129( p=0,461)

		Ca	Mg	VitD	P
<b>25OHD</b>	TOT	-0,137 ( p=0,310)	0,015( p=0,911)	-0,148( p=0,273)	-0,187( p=0,163)
	NOR	-0,042 ( p=0,851)	0,063( p=0,781)	0,000( p=1.000)	0,126( p=0,576)
	THL	-0,294 ( p=0,086)	-0,022( p=0,899)	-0,317( p=0,064)	<b>-0,385( p=0,022)</b>
<b>PTH</b>	TOT	0,156 ( p=0,247)	-0,107( p=0,428)	-0,063( p=0,639)	0,114( p=0,398)
	NOR	-0,097 ( p=0,669)	-0,148( p=0,510)	-0,106( p=0,639)	0,063( p=0,781)
	THL	0,083 ( p=0,635)	-0,131( p=0,454)	-0,107( p=0,542)	0,241( p=0,163)

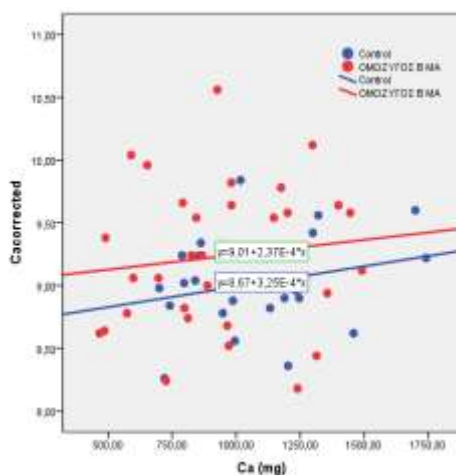
**Πίνακας 18. Συσχέτιση της διατροφικής πρόσληψης θρεπτικών συστατικών που επιδρούν στον οστικό μεταβολισμό (Ca, P, Mg, Vit.D) και σχετικών βιοχημικών παραμέτρων (διορθωμένο Ca με την Alb, P, Mg, 25OHD, PTH) ανά ομάδα.**

Με κόκκινο χρώμα επισημαίνονται οι περισσότερες αξιόλογες συσχετίσεις.

Τέλος, με τα δεδομένα που συλλέξαμε, διερευνήθηκε κατά πόσο η παρουσία της βΜΑ ως νόσου μπορεί να υπεισέρχεται και να επιδρά στη σχέση που υφίσταται μεταξύ των προσλαμβανόμενων θρεπτικών συστατικών που σχετίζονται με το μεταβολισμό των οστών (Ca, P, Mg, Vit.D) και των επιπέδων Δ.Ca, P, Mg, 25OHD, PTH στο αίμα. Σε όλες τις περιπτώσεις δε βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στην ομάδα (THL και NOR) και στην πρόσληψη των ως άνω θρεπτικών θρεπτικών συστατικών σε σχέση με τα επίπεδα των προαναφερθέντων εργαστηριακών παραγόντων στο αίμα. Ενδεικτικά παρατίθενται οι Πίνακες 19-22 και τα Γραφήματα 4-7, τα οποία αφορούν στη διερεύνηση της πιθανής επίδρασης της βΜΑ στη σχέση Δ.Ca με την πρόσληψη Ca, P, Mg, Vit.D. Ανάλογα γραφήματα ενδεικτικά απουσίας στατιστικά σημαντικών ευρημάτων προκύπτουν και κατά τον έλεγχο όλων των υπολοίπων αλληλεπιδράσεων. Πιο αναλυτικά, διαπιστώθηκε ότι:

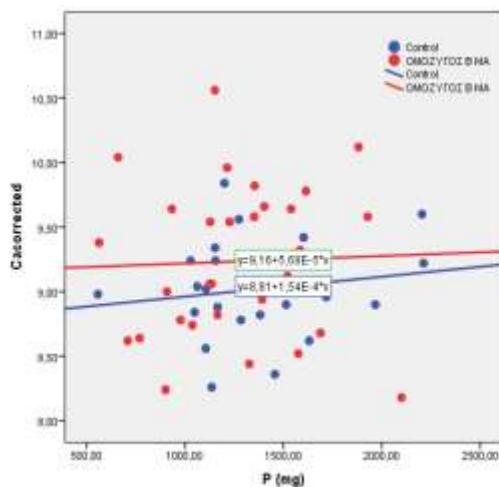
- Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση ανάμεσα στην ομάδα (NOR και THL) και την πρόσληψη Ca (p=0,851), P (p=0,790), Mg (p=0,423), Vit.D (p=0,567) σε σχέση με την παράμετρο Δ.Ca. Αυτό σημαίνει ότι η συσχέτιση του Δ.Ca με την πρόσληψη Ca, P, Mg, Vit.D δε διαφέρει ανάμεσα στα άτομα με βΜΑ και στους φυσιολογικούς μάρτυρες (Πίνακες 19-22 και Γραφήματα 4-7).

- Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση ανάμεσα στην ομάδα (NOR και THL) και την πρόσληψη Ca ( $p=0,836$ ), P ( $p=0,916$ ), Mg ( $p=0,627$ ), Vit.D ( $p=0,136$ ) σε σχέση με τα επίπεδα P στο αίμα. Συνεπώς, η συσχέτιση του P αίματος με την πρόσληψη Ca, P, Mg, Vit.D δε διαφέρει ανάμεσα στα άτομα με βΜΑ και στους φυσιολογικούς μάρτυρες.
- Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση ανάμεσα στην ομάδα (NOR και THL) και την πρόσληψη Ca ( $p=0,754$ ), P ( $p=0,790$ ), Mg ( $p=0,692$ ), Vit.D ( $p=0,580$ ) σε σχέση με τα επίπεδα Mg στο αίμα. Κατ'έκταση, η συσχέτιση του Mg αίματος με την πρόσληψη Ca, P, Mg, Vit.D δε διαφέρει ανάμεσα στα άτομα με βΜΑ και στους φυσιολογικούς μάρτυρες.
- Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση ανάμεσα στην ομάδα (NOR και THL) και την πρόσληψη Ca ( $p=0,465$ ), P ( $p=0,316$ ), Mg ( $p=0,761$ ), Vit.D ( $p=0,134$ ) σε σχέση με τα επίπεδα 25OHD. Αυτό σημαίνει ότι η συσχέτιση της 25OHD με την πρόσληψη Ca, P, Mg, Vit.D δε διαφέρει ανάμεσα στα άτομα με βΜΑ και στους φυσιολογικούς μάρτυρες.
- Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση ανάμεσα στην ομάδα (NOR και THL) και την πρόσληψη Ca ( $p=0,600$ ), P ( $p=0,925$ ), Mg ( $p=0,856$ ), Vit.D ( $p=0,849$ ) σε σχέση με τα επίπεδα PTH. Κατά συνέπεια, η συσχέτιση της PTH με την πρόσληψη Ca, P, Mg, Vit.D δε διαφέρει ανάμεσα στα άτομα με βΜΑ και στους φυσιολογικούς μάρτυρες.



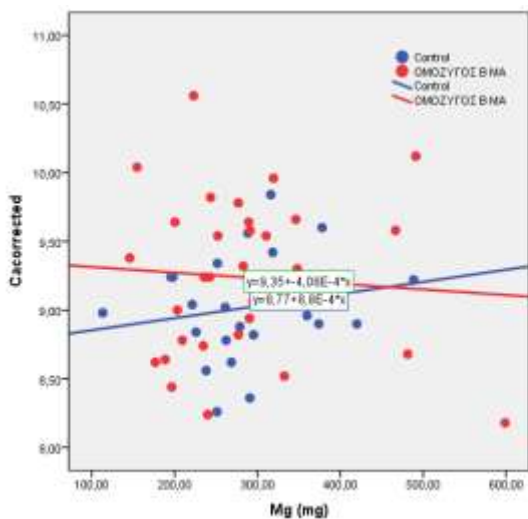
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1,008 <sup>a</sup>	3	,336	1,334	,273
Intercept	311,688	1	311,688	1237,602	,000
Group	,118	1	,118	,467	,497
Ca	,364	1	,364	1,445	,235
Group * Ca	,009	1	,009	,036	<b>0,851</b>
Error	13,348	53	,252		
Total	4787,820	57			

**Πίνακας 19 και Γράφημα 4. Επίδραση της βΜΑ στη σχέση του Δ.Ca με την πρόσληψη Ca.** Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση ( $p=0,851$ ) ανάμεσα στην ομάδα (NOR και THL) και την πρόσληψη Ca, σε σχέση με την παράμετρο Δ.Ca.



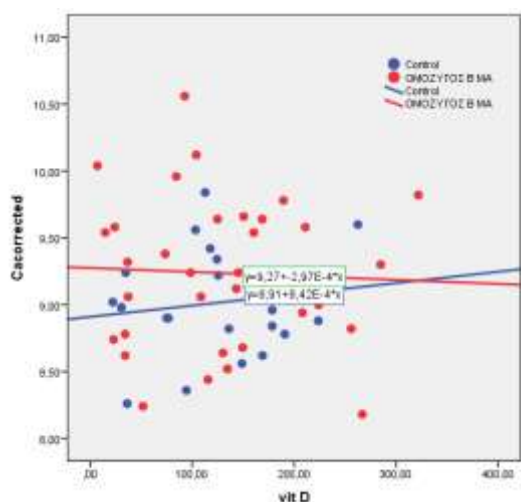
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,738 <sup>a</sup>	3	,246	,957	,420
Intercept	325,713	1	325,713	1267,644	,000
Group	,127	1	,127	,495	,485
P	,086	1	,086	,334	,565
Group * P	,018	1	,018	,071	<b>0,790</b>
Error	13,618	53	,257		
Total	4787,820	57			

**Πίνακας 20 και Γράφημα 5. Επίδραση της βΜΑ στη σχέση του Δ.Са με τη πρόσληψη P.** Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση ( $p=0,790$ ) ανάμεσα στην ομάδα (NOR και THL) και την πρόσληψη P, σε σχέση με την παράμετρο Δ.Са.



Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,810 <sup>a</sup>	3	,270	1,057	,375
Intercept	365,561	1	365,561	1430,308	,000
Group	,386	1	,386	1,512	,224
Mg	,022	1	,022	,087	,769
Group * Mg	,167	1	,167	,653	<b>0,423</b>
Error	13,546	53	,256		
Total	4787,820	57			

**Πίνακας 21 και Γράφημα 6. Επίδραση της βΜΑ στη σχέση του Δ.Са με την πρόσληψη Mg.** Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση ( $p=0,423$ ) ανάμεσα στην ομάδα (NOR και THL) και την πρόσληψη Mg, σε σχέση με την παράμετρο Δ.Са.



Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,728 <sup>a</sup>	3	,243	,944	,426
Intercept	1011,432	1	1011,432	3933,607	,000
Group	,408	1	,408	1,585	,214
vitD	,020	1	,020	,076	,784
Group * vitD	,085	1	,085	,332	<b>0,567</b>
Error	13,628	53	,257		
Total	4787,820	57			

Πίνακας 22 και Γράφημα 7. Επίδραση της βΜΑ στη σχέση του Δ.Са με την πρόσληψη VitD. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση ( $p=0,567$ ) ανάμεσα στην ομάδα (NOR και THL) και την πρόσληψη Vit.D, σε σχέση με την παράμετρο Δ.Са.

## 2.6. Συζήτηση

Όπως έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενα κεφάλαια, έμπνευση για τη διεξαγωγή της παρούσας διατριβής αποτέλεσε ο μεγάλος και συνεχώς αυξανόμενος όγκος πληροφοριών που έρχονται στο φως και αφορούν στις επιδράσεις του Fe στο μεταβολισμό των οστών και του P, μέσω μεταβολών που επιφέρει η εξωγενής, παρεντερική χορήγηση του μετάλλου στους παράγοντες iFGF23 και C-FGF23. Ως εκ τούτου, ο σχεδιασμός της παρούσας μελέτης ήταν τέτοιος που να επιτρέπει να διερευνηθούν κατά το δυνατόν διεξοδικότερα οι σχέσεις που μπορεί να υφίστανται μεταξύ (α) των παραγόντων iFGF23, C-FGF23 και Klotho και (β) της χρόνιας αιμοσιδήρωσης των ασθενών με βΜΑ, μίας σοβαρής αιματολογικής νόσου η οποία εκτός των άλλων χαρακτηρίζεται και από τη χρόνια παρουσία υψηλών επιπέδων Fe στο αίμα και στους ιστούς. Παράλληλα, έγινε προσπάθεια να διερευνηθούν οι σχέσεις που πιθανώς υπάρχουν μεταξύ των τριών προαναφερθέντων παραγόντων με λοιπές εργαστηριακές και απεικονιστικές παραμέτρους του οστικού μεταβολισμού των πασχόντων, αλλά και με το εκάστοτε θεραπευτικό σχήμα αποσιδήρωσης που αυτοί ακολουθούν. Τέλος, μελετήθηκαν οι διαφοροποιήσεις του πληθυσμού των β-θαλασσαιμικών από φυσιολογικά άτομα χωρίς την αιματολογική νόσο, τόσο σε επίπεδο βιοχημικών παραμέτρων αίματος και ούρων που άπτονται του οστικού μεταβολισμού, όσο και σε επίπεδο πρόσληψης και διαχείρισης θρεπτικών συστατικών με τη διατροφή.

Όσον αφορά κατ'αρχάς στο βασικό ερώτημα, δε διαπιστώθηκε η παρουσία στατιστικά σημαντικής διαφοράς μεταξύ των επιπέδων **iFGF23** στον ορό των θαλασσαιμικών ασθενών και των υγιών μαρτύρων, τόσο με μη-παραμετρική ανάλυση όσο και με λογαριθμικό μετασχηματισμό των δεδομένων (Πίνακας 10). Από τη στιγμή που οι περισσότερες εργασίες μελέτης των διακυμάνσεων του iFGF23 μετά τη χορήγηση Fe καταδεικνύουν αύξηση του φωσφατουρικού παράγοντα λόγω της ενδοφλέβιας έγχυσης του μετάλλου, θα μπορούσε κανείς να περιμένει έστω και ήπια αυξημένα επίπεδα iFGF23 στον ορό των ασθενών με βΜΑ, καθώς αυτοί φέρουν χρονίως υψηλά φορτία Fe στον οργανισμό τους. Μία πιθανή εξήγηση που αυτό δε φάνηκε να επιβεβαιώνεται θα μπορούσε να αποτελεί το γεγονός ότι οι β-θαλασσαιμικοί πάσχοντες λαμβάνουν καθημερινά αγωγή αποσιδήρωσης με χηλικούς παράγοντες. Αυτό σημαίνει ότι ο κυκλοφορούν Fe στο αίμα τους δεσμεύεται άμεσα από τα συγκεκριμένα φάρμακα, μία κατάσταση που σε χρόνια βάση μπορεί να μην



αφήνει την ως άνω αρχική υπόθεση να πραγματοποιηθεί. Μάλιστα, στη σημερινή εποχή οι στόχοι της θεραπείας αποσιδήρωσης είναι τέτοιοι που το επιθυμητό αποτέλεσμα της είναι η επάνοδος της Ferr σε φυσιολογικά επίπεδα, καθώς και η πλήρης αποφόρτιση των οργάνων από τον κυτταροτοξικό Fe. Ίσως λοιπόν τα πραγματικά κυκλοφορούντα επίπεδα Fe στους περισσότερους πάσχοντες από βΜΑ να είναι τέτοια που σε χρόνια βάση να μην επαρκούν για να θέσουν τους όποιους μηχανισμούς αύξησης του iFGF23 σε δυναμική λειτουργία. Μάλιστα, στον πληθυσμό THL της δικής μας μελέτης, φυσιολογικές ή σχεδόν φυσιολογικές τιμές Ferr είχαν 10 πάσχοντες, ενώ 14 μόνο παρουσίαζαν επίπεδα μεγαλύτερα των 1000 ng/ml. Βεβαίως, η μέση τιμή της Ferr των πασχόντων (μ.τ.=739 ng/ml) διέφερε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ( $p < 0,001$ ) από εκείνη των μαρτύρων (μ.τ.=39 ng/ml), αλλά υπό το πρίσμα της συνεχούς αποσιδήρωσης δεν μπορούμε να είμαστε σίγουροι για την πραγματική ποσότητα δραστικού ελεύθερου Fe που μπορεί να κυκλοφορεί στο αίμα των ασθενών και να επηρεάζει τους μηχανισμούς ρύθμισης του FGF23. Αντίθετα, στην ενδοφλέβια χορήγηση φαρμακευτικού Fe, η συγκέντρωση του μετάλλου στην κυκλοφορία αυξάνεται ραγδαία και όλος ο χορηγούμενος Fe μπορεί να ασκεί ελεύθερα τις δράσεις του σε κάθε επίπεδο, άμεσα, χωρίς να παρεμποδίζεται από άλλους παράγοντες. Επιπρόσθετα, ήδη αναφέρθηκε ότι τα φάρμακα αποσιδήρωσης έχουν ενοχοποιηθεί για πρόκληση απώλειας και άλλων μετάλλων πέραν του Fe από τον οργανισμό, ειδικά όταν χορηγούνται σε αυξημένες δόσεις ή σε ανεπαρκώς εξατομικευμένα σχήματα. Τονίζεται δε ότι η υπέρμετρη χορήγηση αυτών των φαρμάκων συμβαίνει πάρα πολύ τακτικά, καθώς τόσο οι θεράποντες ιατροί όσο και οι ίδιοι οι πάσχοντες επιθυμούν να μειώσουν τα επίπεδα Ferr κατά το δυνατόν περισσότερο. Μία τέτοια παράλληλη επίδραση με ευόδωση της απώλειας P - έστω και σε μικρό βαθμό - θα ήταν λογικά ικανή να μειώσει την έκκριση του iFGF23 στα συγκεκριμένα άτομα. Επίσης, δεν πρέπει να ξεχνάμε ότι στη βΜΑ, βιοχημικοί και ορμονικοί παράγοντες οι οποίοι προάγουν την έκκριση του iFGF23 μπορεί να βρίσκονται σε χαμηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με το φυσιολογικό πληθυσμό, λόγω παρουσίας σχετικών επιπλοκών. Χαρακτηριστικά αναφέρονται ως παράδειγμα οι πολύ συχνά απαντώμενες χαμηλότερες συγκεντρώσεις PTH, Ca, βιταμίνης D και οιστρογόνων. Μάλιστα, όπως αποτυπώνεται στον Πίνακα 9, και στο δικό μας πληθυσμό τα άτομα με βΜΑ παρουσίαζαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα PTH ( $p < 0,001$ ) και 25OHD ( $p = 0,004$ ). Τέλος, επισημαίνεται ότι η ενδοφλέβια χορήγηση Fe σε έδαφος σιδηροπενίας αποτελεί πάντοτε μία οξέως

εμφανιζόμενη συνθήκη για τον οργανισμό, η οποία έρχεται συγκριτικά σε πλήρη αντίθεση με τη μακροχρόνια σταθερή παρουσία αυξημένων φορτίων Fe σε έδαφος βΜΑ. Συνεπώς, στη δεύτερη αυτή περίπτωση, δεν μπορούμε να είμαστε σίγουροι για την κινητοποίηση ή όχι και περαιτέρω πιθανών μηχανισμών χρόνιας προσαρμογής του μεταβολισμού Ca, του P και των οστών στα διαφορετικά δεδομένα. Για παράδειγμα, ακόμη και η ίδια η διαδικασία της μετάγγισης που κατά την εφαρμογή της αυξάνει μέχρι ενός βαθμού τη συγκέντρωση Fe στην κυκλοφορία των ασθενών για ορισμένα 24ωρα,<sup>61</sup> θα μπορούσε να οδηγεί σε αύξηση του iFGF23 για ένα αντίστοιχο χρονικό διάστημα. Ίσως μάλιστα μετά την πάροδο του συγκεκριμένου διαστήματος η κατάσταση να εξισορροπείται εν μέρει και να μην καθιστάται τελικά εφικτή η εργαστηριακή αξιολόγηση αυτής της επίδρασης. Στο σημείο αυτό υπενθυμίζεται ότι στην ομάδα THL η αιμοληψία ελάμβανε χώρα τουλάχιστον μία εβδομάδα μετά την τελευταία μετάγγιση (όπως συνήθως συμβαίνει στις περισσότερες μελέτες με θαλασσαιμικούς πάσχοντες, ούτως ώστε να εκτιμώνται τα δεδομένα του οργανισμού μετά από την επέλευση μίας βασικής ισορροπίας σε επίπεδο πολλαπλών κλινικών και εργαστηριακών παραμέτρων που άπτονται της θεραπευτικής αυτής διαδικασίας.) Πρακτικά λοιπόν, τίποτε δεν μπορεί να αποκλειστεί με σιγουριά και κατά συνέπεια απαιτούνται περισσότερες μελέτες για να διερευνηθούν με μεγαλύτερη σαφήνεια οι συγκεκριμένοι προβληματισμοί.

Ως προς τα επίπεδα του παράγοντα **C-FGF23** στον ορό, η παρούσα μελέτη κατόρθωσε να καταδείξει την παρουσία στατιστικά σημαντικής διαφοράς μεταξύ του πληθυσμού των β-θαλασσαιμικών και εκείνου των υγιών μαρτύρων. Όπως απεικονίζεται και στον Πίνακα 10, οι τιμές του C-FGF23 φάνηκαν να είναι σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ( $p=0,04$ ) χαμηλότερες στην ομάδα των πασχόντων ( $\mu.t.=5,25$  pg/ml) από ότι στην ομάδα NOR ( $\mu.t.=9,85$  pg/ml). Ανάλογη εικόνα προέκυψε και μετά από λογαριθμικό μετασχηματισμό των δεδομένων. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της πλειοψηφίας των περισσότερο πρόσφατων μελετών, στις οποίες εξετάστηκαν ξεχωριστά οι μεταβολές του iFGF23 και του C-FGF23 μετά την εξωγενή χορήγηση Fe.<sup>229,232,236</sup> Όπως έχει υποστηριχθεί, η παρουσία χαμηλών επιπέδων Fe στον οργανισμό σε καταστάσεις σιδηροπενίας προάγει την πρωτεολυτική διάσπαση του iFGF23, αυξάνοντας μέχρι ενός βαθμού το καρβοξυτελικό θραύσμα C-FGF23 στον ορό. Αντίθετο αποτέλεσμα φαίνεται να προκαλεί η ενδοφλέβια χορήγηση Fe, ελαττώνοντας τη δράση των εμπλεκόμενων πρωτεασών και τελικά τις συγκεντρώσεις του C-FGF23. Είναι λοιπόν πολύ πιθανό

και στη βΜΑ, όπου οι ασθενείς υφίστανται χρονίως την επίδραση της αιμοσιδήρωσης σε άλλοτε άλλο βαθμό, να ευοδώνονται συνθήκες ελαττωμένης ενεργότητας των σχετικών πρωτεασών, με άμεσο αποτέλεσμα τη μειωμένη πρωτεολυτική διάσπαση του iFGF23 και τελικά την παρουσία χαμηλότερων επιπέδων C-FGF23 στον ορό σε σχέση με το φυσιολογικό πληθυσμό. Επισημαίνεται επίσης ότι από τη στιγμή που μέχρι σήμερα δεν έχει δημοσιευθεί κάποια μελέτη που να ερευνά τα επίπεδα τόσο του iFGF23 όσο και του C-FGF23 στον ορό των θαλασσαιμικών ασθενών, δεν μπορούμε να είμαστε απόλυτα σίγουροι για τους μηχανισμούς που οδηγούν στα παραπάνω αποτελέσματα.

Η διαλυτή μορφή της πρωτεΐνης  **$\alpha$ -Klotho** μελετήθηκε επίσης ξεχωριστά, καθώς όπως ήδη αναφέρθηκε αποτελεί βασικό συμπληρωματικό παράγοντα για τις δράσεις που ασκεί ο FGF23 στον οργανισμό. Στη διερεύνηση για το αν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά των συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης στον ορό των πασχόντων από βΜΑ σε σύγκριση με την ομάδα NOR, το αποτέλεσμα κατέστη αρνητικό. Όπως δηλαδή παρουσιάζεται και στον Πίνακα 10, αν και η μέση τιμή της sKlotho ήταν χαμηλότερη στην ομάδα THL σε σχέση με την ομάδα NOR (839,16 έναντι 1.410,0 pg/ml αντίστοιχα), η διαφορά αυτή απέβη στατιστικά μη-σημαντική, τόσο στη μη-παραμετρική ανάλυση των δεδομένων ( $p=0,134$ ) όσο και μετά από λογαριθμικό μετασχηματισμό αυτών ( $p=0,197$ ). Η πρώτη και μοναδική μέχρι σήμερα μελέτη παρατήρησης για τον έλεγχο των επιπέδων της πρωτεΐνης sKlotho στους ασθενείς με βΜΑ σε σύγκριση με υγιή ομάδα ελέγχου δημοσιεύθηκε το 2015 από τους Baldan A και συν.<sup>223</sup> Σε αυτήν έλαβαν μέρος 106 άτομα με μείζονα βΜΑ και 95 υγιείς μάρτυρες και διαπιστώθηκε ότι η sKlotho ήταν σημαντικά χαμηλότερη στο πλάσμα των ασθενών με βΜΑ ( $558.7\pm 160.5$  έναντι  $618.2\pm 141.1$  pg/ml,  $p=0,0021$ ) σε σχέση με τους υγιείς. Ως πιθανός μηχανισμός προτάθηκε ότι στη βΜΑ μπορεί να παρατηρείται ελάττωση της διαλυτής μορφής της Klotho στην κυκλοφορία και πιθανώς όχι της συνδεδεμένης στην κυτταρική μεμβράνη μορφής. Και επειδή η sKlotho προκύπτει μετά από ενζυμική αποκοπή μέσω των πρωτεϊνών ADAM 10 και 17 καθώς και ορισμένων εκκριτασών, πιθανολογήθηκε ότι ίσως τελικά στη βΜΑ να αναπτύσσεται κάποια σχετική ενζυμική ανεπάρκεια σε επίπεδο μεμβράνης. Στην παρούσα διατριβή δεν μπόρεσε να επιβεβαιωθεί μία αντίστοιχη στατιστικά σημαντική διαφορά, παρά τη χαμηλότερη μέση τιμή sKlotho στους πάσχοντες. Βεβαίως, οι εκάστοτε ελεγχόμενοι πληθυσμοί των β-θαλασσαιμικών που παρακολουθούνται σε διαφορετικά αιματολογικά κέντρα μπορεί να διαφοροποιούνται σημαντικά ως προς

ένα πολύ μεγάλο εύρος ξεχωριστών παραγόντων. Ενδεικτικά και μόνο αναφέρονται η ηλικία, η συχνότητα των ενδοκρινολογικών και λοιπών επιπλοκών, τα σχήματα μεταγγίσεων, οι συνδυασμοί φαρμάκων αποσιδήρωσης και η λοιπή φαρμακευτική αγωγή. Κατά συνέπεια, απαιτείται να υπάρξουν περισσότερες μελέτες που να λαμβάνουν υπόψη όλες αυτές τις παραμέτρους, προκειμένου να καθοριστεί με σαφήνεια εάν μεταβάλλονται ή όχι - και με ποιό τρόπο - οι συγκεντρώσεις της sKlotho στον ορό των ασθενών με βΜΑ σε σχέση με τον υπόλοιπο πληθυσμό.

Εκτός των ανωτέρω, λόγω των γενικότερων τεκμηριωμένων αλληλεπιδράσεων του FGF23 με το Fe, συσχετίστηκαν οι συγκεντρώσεις των iFGF23, C-FGF23 και sKlotho με τις τιμές Ferr σε όλες τις ομάδες συμμετεχόντων (Πίνακας 11). Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν, το μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η διακύμανση του κλάσματος C-FGF23, τα επίπεδα του οποίου φάνηκε να συσχετίζονται αρνητικά με εκείνα της Ferr σε στατιστικά σημαντικό βαθμό, τόσο για το σύνολο των συμμετεχόντων ( $r = -0,364$ ,  $p=0,002$ ), όσο και για την κάθε υποομάδα ξεχωριστά (THL:  $r = -0,421$ ,  $p=0,018$  και NOR:  $r = -0,304$ ,  $p=0,050$ ). Μάλιστα, οι συσχετίσεις φάνηκαν να είναι πιο έντονες στις ομάδες που εμπεριείχαν τους πάσχοντες [THL και ολικός πληθυσμός μελέτης (TOT).] Το αποτέλεσμα αυτό τεκμηριώνει ακόμη περισσότερο την προαναφερθείσα αρνητική συσχέτιση των επιπέδων Fe με το C-FGF23 και έρχεται σε συμφωνία τόσο με τις μελέτες που υποστηρίζουν ότι η σιδηροπενία οδηγεί σε αύξηση του C-FGF23 στον ορό μέσω αυξημένης πρωτεολυτικής διάσπασης του ενεργού iFGF23, όσο και με εκείνες που περιγράφουν ελάττωση των τιμών του C-FGF23 μετά από ενδοφλέβια χορήγηση Fe μέσω ελάττωσης της ενεργότητας των αντίστοιχων πρωτεασών.<sup>28,30,31,229,232,236</sup> Σε συνδυασμό και με τη στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση των συγκεντρώσεων του C-FGF23 στον ορό των θαλασσαιμικών σε σχέση με την ομάδα των υγιών μαρτύρων που αναφέρθηκε παραπάνω, φαίνεται ότι η βΜΑ παριστά μία παθολογική κατάσταση που λόγω της χρόνιας αιμοσιδήρωσης που τη συνοδεύει, καταστέλλει μέχρι ενός βαθμού - και πιθανότατα χρονίως - την πρωτεολυτική διάσπαση του iFGF23 και χαρακτηρίζεται έτσι από μετρίως μειωμένα επίπεδα C-FGF23 στον ορό. Με βάση την παρατήρηση αυτή θα περίμενε κανείς να συνυπάρχουν και έστω ήπια αυξημένα επίπεδα iFGF23 στο αίμα αυτών των ασθενών, εντούτοις κάτι τέτοιο όπως ήδη τονίστηκε δεν μπόρεσε να τεκμηριωθεί στην παρούσα εργασία, παρά το γεγονός ότι η μέση τιμή του iFGF23 ήταν λίγο υψηλότερη στην ομάδα των πασχόντων σε σύγκριση με των υγιών μαρτύρων (7,86 έναντι 5,72 pg/ml αντίστοιχα). Μάλιστα, σε αντίθεση

με τα ανωτέρω δεδομένα που προέκυψαν για το C-FGF23, στον ειδικότερο έλεγχο που διενεργήθηκε για τη σχέση που διέπει τα επίπεδα iFGF23 και Ferr, και πάλι δε βρέθηκε να υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση για κανέναν από τους δύο υπό μελέτη πληθυσμούς, αλλά και για το σύνολο των συμμετεχόντων. Ανάλογα είναι και τα αποτελέσματα που αφορούν στη διερεύνηση της σχέσης των τιμών της sKlotho με εκείνων της Ferr στον ορό, όπου επίσης δεν τεκμηριώνεται στατιστικά κάποιου είδους συσχέτιση.

Επιπρόσθετα, σε ένα επιπλέον βήμα, ελέγχθηκε και η επίδραση που θα μπορούσε να ασκεί η ίδια η νόσος της βΜΑ στη σχέση που αναπτύσσεται μεταξύ των επιπέδων iFGF23, C-FGF23 και sKlotho με εκείνα της Ferr (Γραφήματα 1-3). Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν διαπιστώνεται ότι η συσχέτιση που υφίσταται για κάθε έναν από τους τρεις πρωτεϊνικούς παράγοντες με τη Ferr, δε διαφέρει ανάμεσα στις ομάδες NOR και THL σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ( $p=0,252$  για τον iFGF23,  $p=0,106$  για το C-FGF23 και  $p=0,571$  για την sKlotho). Συνεπώς, η όποια πιθανή σχέση μπορεί να υφίσταται μεταξύ των συγκεκριμένων πεπτιδίων και της Ferr, δεν επηρεάζεται από την παρουσία ή όχι της βΜΑ.

Επειδή στη σημερινή εποχή έχει τεκμηριωθεί ότι η Ferr δεν αποτελεί το μοναδικό και τον πλέον αξιόπιστο δείκτη στη χρόνια αιμοσιδήρωση (από τη στιγμή που οι τιμές της επηρεάζονται και από άλλες παραμέτρους, όπως είναι για παράδειγμα η σύγχρονη παρουσία φλεγμονής και λοιμώδους νόσου ή η κινητοποίηση ποσοτήτων αποθηκευμένου Fe από τους ιστούς προς την κυκλοφορία σε πρόσφατη αλλαγή του σχήματος ή της δοσολογίας του σχήματος αποσιδήρωσης), αποφασίσαμε να συσχετίσουμε τα επίπεδα των iFGF23, C-FGF23 και sKlotho και με τις πρόσφατες τιμές T2\* από την MRI ήπατος/καρδιάς. Η συγκεκριμένη τεχνική αποδίδει με μεγάλη αξιοπιστία το φορτίο σιδήρου στα δύο συγκεκριμένα όργανα και τα αποτελέσματά της αποτελούν εξαιρετικούς δείκτες για τη βαρύτητα της χρόνιας αιμοσιδήρωσης. Επισημαίνεται εντούτοις ότι αν και τα δεδομένα που παρέχονται με την MRI αντικατοπτρίζουν με ακρίβεια την κατάσταση των ιστών, δεν μπορούν να προσδιορίσουν σαφώς τι συμβαίνει με το δραστικό ελεύθερο Fe που βρίσκεται στην κυκλοφορία, ο οποίος και θα μπορούσε να επηρεάζει δραστικότερα τα επίπεδα του FGF23. Για τους 30 β-θαλασσαιμικούς ασθενείς για τους οποίους υπήρχαν πρόσφατα δεδομένα προσδιορισμού του φορτίου Fe με την ως άνω τεχνική, ελέγχθηκε η πιθανή συσχέτιση της βαρύτητας της αιμοσιδήρωσης με τις συγκεντρώσεις των iFGF23, C-FGF23 και sKlotho. Όπως αποτυπώνεται και στον Πίνακα 16, με αυτήν την

προσέγγιση δε βρέθηκε να υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των συγκεκριμένων μεγεθών. Συνεπώς, τα επίπεδα των τριών πρωτεϊνικών παραγόντων δε φαίνεται να επηρεάζονται σε στατιστικά σημαντικό βαθμό από τη βαρύτητα της χρόνιας αιμοσιδήρωσης, εκφραζόμενη με τις τιμές T2\* ήπατος και καρδιάς στην ειδική τεχνική προσδιορισμού της με MRI.

Ακόμη, από τη στιγμή που όπως ήδη αναφέρθηκε η αγωγή αποσιδήρωσης είναι πολύ πιθανό να επηρεάζει τα αποτελέσματα της μελέτης μέχρι ενός βαθμού, έγινε μία προσπάθεια σύγκρισης των επιπέδων των iFGF23, C-FGF23 και sKlotho με βάση το σχήμα αποσιδήρωσης, έτσι ώστε να διερευνηθεί οποιαδήποτε πιθανή φαρμακευτική επίδραση στις τιμές των συγκεκριμένων παραμέτρων. Βεβαίως, με τη συγκεκριμένη ενέργεια ελέγχθηκαν ουσιαστικά διάφορες πιθανές παρεμβάσεις των ίδιων των φαρμακευτικών ουσιών που χρησιμοποιούνταν για την αποσιδήρωση των πασχόντων, όχι όμως και η επίδραση του αποτελέσματος που αυτά επέφεραν στη μείωση της φερριτίνης και στην ελάττωση του κυκλοφορούντος φορτίου Fe. Τελικά, όπως παρουσιάστηκε στα αποτελέσματα στους Πίνακες 14(α) και 14(β), δε βρέθηκε να υφίστανται στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς τα επίπεδα των τριών πρωτεϊνικών δεικτών, τόσο μεταξύ των υποομάδων που ελάμβαναν DFX και DFO+DFP (στις οποίες ανήκε η μεγάλη πλειοψηφία των περιστατικών), όσο και ανάμεσα στα άτομα που ελάμβαναν είτε μονοθεραπεία (DFO ή DFP ή DFX) είτε συνδυαστική θεραπεία αποσιδήρωσης (DFO+DFP). Συμπερασματικά λοιπόν, το είδος του σχήματος αποσιδήρωσης που ακολουθούσαν οι πάσχοντες, δε φάνηκε να επηρεάζει με κάποιο τρόπο τα επίπεδα των FGF23, C-FGF23 και sKlotho σε στατιστικά σημαντικό βαθμό.

Τα αποτελέσματα από τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων THL και NOR των υπόλοιπων βιοχημικών και ορμονολογικών παραμέτρων αίματος και ούρων που μετρήθηκαν παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα-9. Εμφανίζουν μάλιστα ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς τεκμηριώνεται στατιστικά η παρουσία σημαντικών διαφοροποιήσεων μεταξύ των δύο ομάδων ως προς τις περισσότερες από αυτές. Πιο συγκεκριμένα:

**(α)** Στους ασθενείς με βΜΑ οι τιμές Glu νηστείας είναι υψηλότερες σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες ( $p=0,009$ ). Το φαινόμενο είναι πρακτικά αναμενόμενο, εξαιτίας της αυξημένης συχνότητας ποικίλου βαθμού διαταραγμένης παγκρεατικής λειτουργίας στα πλαίσια της χρόνιας αιμοσιδήρωσης. Υπενθυμίζεται ότι στη βΜΑ η συχνότητα εμφάνισης ΣΔ και προδιαβητικών καταστάσεων (IFG, IGT) είναι

υψηλότερη από ότι στο γενικό πληθυσμό.<sup>125,126</sup> Ακόμη και στις περιπτώσεις που τα επίπεδα γλυκαιμίας ρυθμίζονται ικανοποιητικά στο 24ωρο, συνήθως συνυπάρχει ένας βαθμός έκπτωσης της παγκρεατικής λειτουργίας, ο οποίο μάλιστα μπορεί να μεταβάλλεται προς το καλύτερο ή το χειρότερο, ανάλογα με τις αλλαγές στην κατάσταση αιμοσιδήρωσης των πασχόντων.

**(β)** Τα επίπεδα BUN παρουσιάζονται υψηλότερα στην ομάδα THL ( $p < 0,001$ ), φαινόμενο που θα μπορούσε κατ'αρχάς να εξηγηθεί από τη συχνή λήψη φαρμάκων που δυνητικά επηρεάζουν τις συγκεντρώσεις ουρίας στον ορό. Ενδεικτικά και μόνο αναφέρονται τα φάρμακα αποσιδήρωσης (κυρίως η DFX), καθώς και διουρητικά σκευάσματα, τόσο τα θειαζιδικά, χορηγούμενα επί συνυπάρχουσας υπερασβεστιουρίας, όσο και μη-θειαζιδικά διουρητικά, χρησιμοποιούμενα σε έδαφος καρδιαγγειακών επιπλοκών. Εξάλλου, δεν πρέπει να λησμονούμε ότι οι β-θαλασσαιμικοί πάσχοντες κατά κανόνα λαμβάνουν καθημερινά συνδυασμούς ποικίλων φαρμάκων. Εκείνο που προκαλεί ίσως μεγαλύτερη εντύπωση είναι τα στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα Crea στην ομάδα THL σε σύγκριση με την ομάδα NOR. Θα περίμενε κανείς ότι λόγω της αιμοσιδήρωσης, της υπερδιήθησης από τις τακτικές μεταγγίσεις, των προαναφερθέντων φαρμακευτικών παρεμβάσεων και τελικά της όχι σπάνια παρατηρούμενης ήπιας νεφρικής δυσπραγίας των πασχόντων, οι συγκεντρώσεις Crea θα ήταν τουλάχιστον παρόμοιες αν όχι υψηλότερες στην ομάδα των ασθενών, η οποία υπενθυμίζουμε ότι απαρτιζόταν από άτομα παρόμοιου βάρους και σωματοδομής με την ομάδα των μαρτύρων. Εντούτοις, το ίδιο παράδοξο φαινόμενο έχει αναφερθεί και σε άλλες μελέτες, και πιθανότατα χρήζει ειδικότερης ανάλυσης.<sup>247</sup>

**(γ)** Οι τρανσαμινάσες και η ALP παρουσιάζονται επίσης σημαντικά αυξημένες στην ομάδα THL (SGOT:  $p = 0,002$ , SGPT:  $p = 0,031$ , ALP:  $p = 0,003$ ), ευρήματα απόλυτα αναμενόμενα αν συνυπολογίσει κανείς την επίδραση που ασκούν στον ηπατικό ιστό και στα ηπατικά ένζυμα η ίδια η χρόνια αιμοσιδήρωση, η χρόνια αιμόλυση, οι φαρμακευτικές παρεμβάσεις και φυσικά το πολύ συχνό ιστορικό παλαιότερης έκθεσης σε ηπατοτρόπους ιούς, όπως είναι η ηπατίτιδα-B και η ηπατίτιδα-C. Ειδικά όσον αφορά στην ηπατίτιδα-C, σημειώνεται ότι η συχνότητά της υπολογίζεται συνήθως σε ποσοστά άνω του 30% των πασχόντων.<sup>248</sup> Ενδεικτικά της χρόνιας και σοβαρής επιβάρυνσης της λειτουργίας του ήπατος σε ασθενείς με βΜΑ είναι και τα ολοένα αυξανόμενα ποσοστά ανάπτυξης ηπατοκυτταρικού καρκινώματος σε αυτούς κατά την τελευταία 20ετία.<sup>249</sup>

(δ) Οι τιμές Ca, Δ.Ca, P και Mg στον ορό των πασχόντων δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση από τις αντίστοιχες τιμές στην ομάδα ελέγχου. Βεβαίως, εξαιτίας του διαταραγμένου οστικού μεταβολισμού και της συχνής συνύπαρξης διαταραχών στην έκκριση παραθορμόνης σε έδαφος βΜΑ, θα μπορούσε κανείς να αναμένει σημαντικά διαφοροποιημένα επίπεδα και των τεσσάρων μεγεθών στην ομάδα THL. Εντούτοις, αν και αυτή η σκέψη έχει επιβεβαιωθεί σε ορισμένες μελέτες, υπάρχουν και αρκετές ακόμη στις οποίες δε διαπιστώνονται αξιόλογες διαφοροποιήσεις από τον υγιή πληθυσμό. Οι ιδιαιτερότητες των θαλασσαιμικών που συμμετέχουν στις διάφορες μελέτες ως προς την ηλικία, τη συχνότητα των μεταγίσεων, τη φαρμακευτική θεραπεία, τα σχήματα αποσιδήρωσης και τη συχνότητα των ποικίλων επιπλοκών, πιθανότατα ευθύνονται για τα ως άνω ποικίλα αποτελέσματα.

(ε) Σημαντικά χαμηλότερες φάνηκαν να είναι οι συγκεντρώσεις iPTH ( $p < 0,001$ ) και 25OHD ( $p = 0,004$ ) στο πλάσμα των ασθενών σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Η συγκεκριμένη διαπίστωση έρχεται σε απόλυτη συμφωνία με τα αποτελέσματα πολλών άλλων μελετών που έχουν δημοσιευθεί κατά καιρούς και σχετίζεται με την παθοφυσιολογία της νόσου που ήδη έχει παρουσιαστεί στο γενικό μέρος, σύμφωνα με την οποία λόγω της μακροχρόνιας αιμοσιδήρωσης, της εφαρμοζόμενης αγωγής αποσιδήρωσης και της επηρεασμένης απορρόφησης του ΓΕΣ, παραβλάπτονται σε άλλοτε άλλο βαθμό τόσο η λειτουργία των παραθυρεοειδών αδένων, όσο και η δυνατότητα απορρόφησης θρεπτικών συστατικών από το ΓΕΣ.

(στ) Τα επίπεδα Ferr - όπως ήταν αναμενόμενο - παρουσιάστηκαν πολύ υψηλότερα στην ομάδα THL σε σχέση με την ομάδα NOR (THL: μ.τ.=739ng/ml, THL: μ.τ.=32ng/ml,  $p < 0,001$ ). Η παρατήρηση αυτή ανταποκρίνεται πλήρως στην παθοφυσιολογία της αιματολογικής νόσου και στις θεραπευτικές παρεμβάσεις που εφαρμόζονται για την αντιμετώπιση αυτής, οι οποίες και περιγράφηκαν στο πρώτο μέρος της διατριβής. Συνεπώς, ο πληθυσμός THL πληρούσε το βασικό και πλέον επιθυμητό για τη συγκεκριμένη μελέτη κριτήριο του σαφώς υψηλότερου επιπέδου αιμοσιδήρωσης, το οποίο σύμφωνα με την αρχική μας υπόθεση θα μπορούσε να επιδράσει στο σύστημα FGF23 - C-FGF23 - sKlotho. Πράγματι, οι διαφοροποιήσεις που διαπιστώθηκαν από τον πληθυσμό NOR - ιδίως όσον αφορά στις συγκεντρώσεις του C-FGF23 και συζητήθηκαν παραπάνω - μοιάζουν να σχετίζονται με το χρόνια αυξημένο φορτίο σιδήρου των ασθενών, εντούτοις η ένταση της επίδρασης δεν



μπορεί να αξιολογηθεί απόλυτα από μία και μόνο μελέτη, καθώς είναι πιθανό να επηρεάζεται από πολλαπλούς παράγοντες που σχετίζονται με τη βΜΑ.

(ζ) Η σύγκριση των αποτελεσμάτων των ούρων 24ώρου μεταξύ των δύο υπό μελέτη πληθυσμών αποδείχθηκε επίσης πολύ ενδιαφέρουσα. Κατά πρώτον, πιστοποιήθηκε ακόμη μία φορά η παρουσία αυξημένης απώλειας Ca από τα ούρα των θαλασσαιμικών πασχόντων, όπως έχει επισημανθεί εξάλλου σε πολύ μεγάλο αριθμό εργασιών μέχρι σήμερα.<sup>87,95,96,132-135</sup> Έτσι, οι τιμές των παραμέτρων UCa και UCa/UCrea παρουσιάστηκαν αναμενόμενα σημαντικά υψηλότερες στην ομάδα THL σε σύγκριση με την ομάδα NOR (UCa: μ.τ.=317 mg/24h στην ομάδα THL έναντι 211 mg/24h στην ομάδα NOR με  $p<0,001$  και UCa/UCrea: μ.τ.=0,25 στην ομάδα THL έναντι 0,22 στην ομάδα NOR με  $p=0,05$ .) Η επιπλοκή της υπερασβεστιουρίας, όπως ήδη τονίστηκε αναλυτικότερα στο γενικό μέρος, είναι πολυπαραγοντικής αιτιολογίας και δεν οφείλεται αποκλειστικά και μόνο στην αιμοσιδήρωση των νεφρών. Αυτό επιβεβαιώνεται εν μέρει και στην παρούσα εργασία, από τη συσχέτιση του λόγου UCa/UCrea με τη Ferr (Πίνακας 13), στην οποία πρακτικά δε φαίνεται να υφίσταται κάποια στατιστικά σημαντική σχέση του λόγου UCa/UCrea με τα επίπεδα της Ferr, τόσο για το σύνολο όσο και για τις επιμέρους υποομάδες των συμμετεχόντων. Πολυπαραγοντικής αρχής είναι και η συχνά διαπιστούμενη ήπια έως μέτρια πρωτεϊνουρία των πασχόντων από βΜΑ, η οποία ήταν παρούσα σε σημαντικό ποσοστό και στο δικό μας πληθυσμό (UPro: μ.τ.=0,15 gr/24h στην ομάδα THL έναντι 0,09 gr/24h στην ομάδα NOR, με  $p<0,001$ ). Η υπερφωσφατουρία που έχει αναφερθεί να παρατηρείται στη βΜΑ σε πολύ μικρότερα ποσοστά, δεν επιβεβαιώθηκε στο δικό μας πληθυσμό, όπως και στις περισσότερες σχετικές μελέτες που έχουν δημοσιευθεί μέχρι σήμερα. Το κατά πόσο θα μπορούσε η χρόνια αιμοσιδήρωση να οδηγεί σε εμφάνιση της επιπλοκής αυτής μέσω αύξησης του iFGF23 - έστω και κατά διαστήματα - δεν μπόρεσε να τεκμηριωθεί στη συγκεκριμένη διατριβή. Δε θα ήταν όμως σωστό και να αποκλειστεί, καθώς αν και τα επίπεδα του iFGF23 των β-θαλασσαιμικών (παρά την υψηλότερη μέση τιμή τους) δεν απείχαν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό από εκείνα των μαρτύρων, το C-FGF23 φάνηκε να επηρεάζεται σημαντικά από την αιματολογική νόσο στα πρότυπα των επιδράσεων που ασκεί η οξεία αύξηση του Fe στην κυκλοφορία. Ως εκ τούτου, είναι πιθανό σε άλλους πληθυσμούς ασθενών, που αντιμετωπίζουν δυσμενέστερες συνθήκες θεραπείας και πολύ εντονότερη χρόνια επιβάρυνση από το Fe, οι παραπάνω σκέψεις και συσχετισμοί να επιβεβαιώνονται. Ευτυχώς, στις ευρωπαϊκές χώρες και ειδικά στην

Ελλάδα η δυνατότητα συνεχούς ενημέρωσης του επιστημονικού προσωπικού, η ποιότητα αντιμετώπισης της βασικής νόσου και των επιπλοκών αυτής και οι εξειδικευμένες παροχές που προσφέρονται στους πάσχοντες είναι υποδειγματικές και αμβλύνουν σημαντικά τις μεγάλες εργαστηριακές αντιθέσεις μεταξύ πασχόντων και υγιούς πληθυσμού, σε σύγκριση με παλαιότερες εποχές ή με ό,τι συμβαίνει σε λιγότερο αναπτυγμένες και οικονομικά ασθενέστερες Χώρες.

(ζ) Τέλος, σημαντικά αυξημένες στην ομάδα των πασχόντων έναντι εκείνης των υγιών μαρτύρων ήταν και οι τιμές TRP ( $p=0,001$ ) και TmP/GFR ( $p=0,005$ ). Η παρατήρηση αυτή έρχεται μάλιστα σε απόλυτη συμφωνία με τα αποτελέσματα και άλλων σχετικά πρόσφατων μελετών σε πληθυσμούς θαλασσαιμικών πασχόντων χωρίς ουσιώδη νεφρολογικά προβλήματα, σε υψηλά ποσοστά των οποίων διαπιστώθηκαν αυξημένες τιμές TmP/GFR ( $>1.5\text{mmol/L}$ ) και TRP ( $>0,95$ ), αν και σαφής αιτιολογική εξήγηση του φαινομένου δεν μπόρεσε να στοιχειοθετηθεί.<sup>250,251</sup> Υπενθυμίζεται ότι η παράμετρος TmP/GFR αντιπροσωπεύει το θεωρητικά χαμηλότερο όριο του P στον ορό, κάτω από το οποίο όλα τα διηθούμενα φωσφορικά επαναρροφώνται. Εάν λοιπόν υποθέσουμε ότι στη βΜΑ υπάρχει τάση μείωσης των επιπέδων P στον ορό οφειλόμενη σε οποιαδήποτε αιτία, η αύξηση του λόγου TmP/GFR απομακρύνει τη αιτιοπαθογενετική σκέψη από την παρουσία πρωτοπαθούς νεφρικής βλάβης. Αντίθετα, η μειωμένη διατροφική πρόσληψη ή η διαταραγμένη απορρόφηση του προσλαμβανόμενου P από το ΓΕΣ ή η παρουσία υποπαραθυρεοειδισμού θα μπορούσαν να αποτελούν πιθανούς μηχανισμούς για την εξήγηση αυτής της τάσης. Με την ίδια λογική, ένα επίσης ενδιαφέρον ερώτημα που προκύπτει είναι εάν η συγκεκριμένη αύξηση του TmP/GFR θα μπορούσε να μην είναι σταθερά παρούσα, αλλά να εμφανίζεται κατά περιόδους σε κάθε πάσχοντα, καταδεικνύοντας μία εξισορροπητική τάση του οργανισμού να αυξήσει την επαναρρόφηση P (με την προϋπόθεση ότι δεν υφίσταται νεφρική βλάβη) αντιδραστικά σε μία άλλη, επίσης περιοδικά συνυπάρχουσα κατάσταση, που τείνει να τη μειώσει. Για παράδειγμα, ίσως θα μπορούσε ο παραπάνω υποθετικός μηχανισμός να έχει βάση σε έδαφος αυξημένης αποβολής φωσφόρου λόγω επίδρασης ενός φαρμάκου αποσιδήρωσης χορηγούμενου ορισμένες ημέρες το μήνα (όπως συχνά χορηγείται η DFO όταν συνδυάζεται με τη DFP) ή σε μία υποτιθέμενη συνυπάρχουσα αυξημένη επίδραση του iFGF23 στα νεφρικά σωληνάρια (για παράδειγμα κατά το διάστημα αύξησης του κυκλοφορούντος Fe αμέσως μετά από τις μεταγγίσεις αίματος, όπως συζητήθηκε παραπάνω).

Από τη στιγμή που δεν μπορεί να αποκλειστεί κάποιου βαθμού μακροχρόνια - έστω και ήπια ή κατά περιόδους εμφανιζόμενη - επίδραση του FGF23 στον οστικό μεταβολισμό των πασχόντων από βΜΑ, έγινε μία προσπάθεια συσχέτισης των επιπέδων iFGF23, C-FGF23 και sKlotho με τη βαρύτητα της οστικής νόσου, όπως αυτή εκτιμήθηκε με βάση τα αποτελέσματα που μας παρείχαν οι τελευταίες πυκνομετρικές αξιολογήσεις του σκελετού των ασθενών με τη μέθοδο DXA. Συνειδητά και καθαρά για πρακτικούς λόγους που διευκολύνουν τη μελέτη, η οστική νόσος των συμμετεχόντων στην ομάδα THL προσδιορίστηκε με βάση το μετρούμενο T-Score στην ΟΜΣΣ ή/και στο μη-επικρατούν ισχίο και οι πάσχοντες χαρακτηρίστηκαν ως προς την οστική τους νόσο ως φυσιολογικοί (T-Score  $\geq$  -1,0 SD), οστεοπενικοί (T-Score  $<$  -1,0 SD και  $>$  -2,5 SD) και οστεοπορωτικοί (T-Score  $\leq$  -2,5 SD).<sup>243</sup> Γεγονός είναι ότι τα αποτελέσματα των ως άνω συγκρίσεων δεν κατέδειξαν την παρουσία στατιστικά σημαντικών διαφοροποιήσεων και συσχετίσεων. Πιο συγκεκριμένα, αυτό συνέβη τόσο κατά τη σύγκριση των επιπέδων των iFGF23, C-FGF23 και sKlotho μεταξύ των οστεοπενικών και οστεοπορωτικών ατόμων [Πίνακας 15(α)], όσο και κατά τη σύγκριση των ίδιων τιμών μεταξύ των οστεοπορωτικών και όλων των υπολοίπων (φυσιολογικών και οστεοπενικών) β-θαλασσαιμικών [Πίνακας 15(β)]. Συνεπώς, με βάση τα δεδομένα της συγκεκριμένης μελέτης, δε φάνηκε τα επίπεδα στον ορό για οποιονδήποτε από τους τρεις παράγοντες iFGF23, C-FGF23 και sKlotho να επιδρούν με κάποιο τρόπο, έτσι ώστε να επηρεάζουν δυναμικά την οστική κατάσταση των πασχόντων από βΜΑ. Από την άλλη, αυτό δε σημαίνει ότι πρέπει να αποκλειστεί η πιθανότητα μιας ηπιότερης σχετικής χρόνιας επίδρασης, είτε σε όλους τους β-θαλασσαιμικούς είτε σε υποομάδες αυτών με πιο συγκεκριμένες ιδιαιτερότητες, οι οποίες έχουν να κάνουν με το σχήμα μεταγγίσεων και αποσιδήρωσης, τη βαρύτητα της αιμοσιδήρωσης και το είδος των συνυπαρχόντων αιματολογικών, ορμονολογικών και λοιπών δευτεροπαθών επιπλοκών.

Ως προς τα δεδομένα που συλλέχθηκαν για την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών από τους συμμετέχοντες στις ομάδες THL και NOR, από την αρχική συγκριτική ανάλυση φάνηκε ότι δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις πρόσληψης μεταξύ των ομάδων. Ουσιαστικά δηλαδή, οι ασθενείς και οι υγιείς μάρτυρες πέραν του ότι δε διέφεραν ως προς τα δημογραφικά τους στοιχεία, παρουσίαζαν και παρόμοιες προσλήψεις υδατανθράκων, πρωτεϊνών, λιπών, βιταμινών, μετάλλων, καφεΐνης, αλκοόλ, υγρών και ενέργειας (θερμίδων) στην

καθημερινότητά τους, όπως παρουσιάζεται με σαφήνεια και στον Πίνακα 17. Με βάση λοιπόν τις συγκεκριμένες αναλύσεις, δε φαίνεται η νόσος της βΜΑ - και ό,τι αυτή συνεπάγεται - να διαφοροποιεί σημαντικά την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών στους πάσχοντες, κατάσταση που με τη σειρά της θα μπορούσε να επιδράσει στα αποτελέσματα της μελέτης. Ακόμη, σε μία περαιτέρω ανάλυση που έλαβε χώρα για όλες τις ομάδες των συμμετεχόντων (THL, NOR και TOT) με σκοπό να διερευνηθεί κατά πόσο μπορεί να συσχετίζεται η διατροφική πρόσληψη κάθε ενός εκ των βασικών θρεπτικών συστατικών που επηρεάζουν άμεσα τον οστικό μεταβολισμό (Ca, P, Mg, Vit.D) με τα επίπεδα Δ.Ca, P, Mg, 25OHD και PTH στον ορό, παρατηρήθηκαν (α) υψηλή θετική, οριακά στατιστικά σημαντική συσχέτιση της διατροφικής πρόσληψης P με τα επίπεδα P αίματος για την ομάδα NOR ( $r=0,398$ ,  $p=0,067$ ) και (β) μέτρια αρνητική, στατιστικά σημαντική συσχέτιση της διατροφικής πρόσληψης P με τα επίπεδα 25OHD στον ορό των ατόμων από την ομάδα THL ( $r = -0,385$ ,  $p=0,022$ ). Όλες οι υπόλοιπες δυνατές συσχετίσεις απέβησαν στατιστικά μη-σημαντικές, όπως περιγράφηκε ήδη στα αποτελέσματα (Πίνακας 18).

Ως προς την πιθανά θετική συσχέτιση της διατροφικής πρόσληψης P με τη συγκέντρωση του μετάλλου στον ορό, πρόκειται για μια κατάσταση που δε μας εκπλήσσει (ειδικά στα φυσιολογικά άτομα που διατηρούν φυσιολογική λειτουργία του ΓΕΣ), καθώς όπως είδαμε στο κεφάλαιο της ομοιοστασίας του P στο γενικό μέρος, η πρόσληψή του με τη διατροφή αποτελεί βασικό μηχανισμό διατήρησης των φυσιολογικών επιπέδων του ιχνοστοιχείου στον ορό. Όσον αφορά όμως στην αρνητική συσχέτιση που φαίνεται να χαρακτηρίζει τη διατροφική πρόσληψη P με τα επίπεδα 25OHD ορού στην ομάδα των β-θαλασσαιμικών πασχόντων, η κατάσταση φαίνεται να είναι λίγο πιο περίπλοκη. Αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων P και 25OHD στον ορό έχει περιγραφεί κατά το παρελθόν, αλλά και πολύ πρόσφατα, σε μελέτες ασθενών με ήπια έως μέτρια ΧΝΝ.<sup>252-254</sup> Ένας μηχανισμός που έχει πιθανολογηθεί από τους ερευνητές, είναι η αύξηση της συγκέντρωσης του FGF23 που μπορεί να επιφέρουν τα αυξημένα επίπεδα P. Ο FGF23 εκτός των άλλων δράσεών του, είδαμε ότι μπορεί να ενισχύσει την έκφραση του ενζύμου 24-υδροξυλάση στο νεφρό [ευοδώνοντας τη μετατροπή της 25OHD στην αδρανή μορφή της 24,25(OH)<sub>2</sub>D] και ίσως να αναστείλει την 25-υδροξυλάση.<sup>19,21,37,38</sup> Και οι δύο ενζυμικές δράσεις οδηγούν σε μείωση των επιπέδων 25OHD. Μάλιστα, αρνητική συσχέτιση των επιπέδων FGF23 με εκείνων της 25OHD έχει διαπιστωθεί σε μελέτες με ποντίκια, η σχέση όμως αυτή δεν έχει μπορέσει να επιβεβαιωθεί και στους

ανθρώπους.<sup>252,255</sup> Στην παρούσα διατριβή έγινε επίσης μία ανάλογη προσπάθεια συσχέτισης των συγκεντρώσεων της 25OHD με εκείνες των παραγόντων iFGF23, C-FGF23 και sKlotho, τόσο στο σύνολο των συμμετεχόντων όσο και στις δύο υποομάδες THL και NOR, όπου και πάλι δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις (Πίνακας 12). Αν υποθέσουμε ότι στη βΜΑ διατηρείται χρονίως μια ήπια αύξηση του FGF23, ενισχυόμενη ίσως και κατά περιόδους από διάφορες εξωγενείς αιτίες όπως προαναφέρθηκε, ίσως η επιπλέον πρόσληψη Ρ διατροφικά να ενισχύει την περαιτέρω αύξηση και δράση του FGF23 και προς την κατεύθυνση που περιγράφηκε. Ακόμη μία πιθανή εξήγηση της αρνητικής συσχέτισης μεταξύ προσλαμβανόμενου Ρ και επιπέδων 25OHD στους πάσχοντες από βΜΑ που μπορεί να συνυπάρχει με την προηγούμενη υπόθεση, είναι η άμεση επίδραση του διατροφικά προσλαμβανόμενου Ρ στη συγκέντρωση της 25OHD. Σε παλαιότερες μελέτες έχει αναφερθεί ότι η πρόσληψη Ρ φαίνεται να ελέγχει την έκφραση της 24-υδροξυλάσης στο νεφρό παρεμβαίνοντας σε επίπεδο mRNA. Αύξηση της διατροφικής πρόσληψης του μετάλλου οδηγεί σε αύξηση της δράσης του ενζύμου και το αντίθετο.<sup>256</sup> Και όπως είναι αναμενόμενο, η αυξημένη ενεργοποίηση της 24-υδροξυλάσης μπορεί θεωρητικά να οδηγήσει σε ελάττωση των επιπέδων του βασικού υποστρώματός της, δηλαδή της 25OHD.

## 2.7. Συμπεράσματα

Η βΜΑ είναι μία σοβαρή αιμοσφαιρινοπάθεια που στο πλείστον των περιπτώσεων συνοδεύεται από ποικίλες δευτεροπαθείς διαταραχές και επιπλοκές, μέρος των οποίων αποτελεί και η - κατά κανόνα παρούσα - ιδιαίτερη μορφή οστικής νόσου που περιγράφηκε ανωτέρω ως ΟΝΘ. Σε επίπεδο αιτιοπαθογένειας των αλλοιώσεων από τα οστά, πολλά έχουν γίνει γνωστά κατά τις τελευταίες δεκαετίες, υπάρχουν όμως ακόμη σχετικά πεδία που δεν έχουν διερευνηθεί και ερωτήματα που δεν έχουν απαντηθεί πλήρως. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το σύστημα FGF23-Klotho, οι επιδράσεις και η συμμετοχή του οποίου στην ΟΝΘ δεν έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα στους β-θαλασσαιμικούς ασθενείς. Όπως ήδη τονίστηκε παραπάνω, ο ρόλος του FGF23 στο μεταβολισμό του θαλασσαιμικού οστού άρχισε να αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον, ιδίως από τη στιγμή που σε ένα μεγάλο αριθμό δημοσιεύσεων των τελευταίων δεκαετιών πιστοποιήθηκε η παρουσία σημαντικής διασύνδεσης των συγκεντρώσεων και της δράσης του φωσφατουρικού αυτού παράγοντα τόσο (α) με τα

επίπεδα Fe στο αίμα σε συνθήκες σιδηροπενίας, όσο και (β) με τη θεραπευτική ενδοφλέβια χορήγηση του μετάλλου. Στις περισσότερες σύγχρονες μελέτες η πρώτη συνθήκη φαίνεται να μην επηρεάζει ιδιαίτερα - και ενίοτε να μειώνει ήπια - τις τιμές του iFGF23 στον ορό και ταυτόχρονα να αυξάνει σημαντικά εκείνες του C-FGF23. Η δε ενδοφλέβια χορήγηση Fe παρουσιάζεται να επιφέρει τα αντίθετα αποτελέσματα, δηλαδή αύξηση του iFGF23, μείωση του C-FGF23 και επιπρόσθετη ελάττωση των τιμών P στο αίμα, η οποία ενίοτε μπορεί να είναι τόσο σοβαρή που να απαιτεί ιατρική παρέμβαση. Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές σχεδιάστηκε και διεξήχθη η παρούσα διατριβή, η οποία εστίασε στη διερεύνηση των μεταβολών του συστήματος FGF23-Klotho σε έδαφος ομόζυγου βΜΑ, μίας νόσου που χαρακτηρίζεται από χρονίως αυξημένη επιφόρτιση σχεδόν όλων των ιστών του οργανισμού με σίδηρο.

Από τη σχετική σύγκριση που διενεργήθηκε μεταξύ β-θαλασσαιμικών ασθενών και υγιών μαρτύρων διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική ελάττωση της μέσης τιμής των επιπέδων C-FGF23 στην ομάδα THL, εικόνα που έρχεται σε απόλυτη συμφωνία με τις σχετικές παρατηρήσεις σε συνθήκες παρεντερικής χορήγησης Fe. Επιπρόσθετα, οι τιμές του C-FGF23 συσχετίστηκαν αρνητικά σε στατιστικά σημαντικό βαθμό με εκείνες της Ferr, τόσο στο σύνολο των συμμετεχόντων, όσο και σε κάθε υποομάδα ξεχωριστά. Με βάση λοιπόν τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται να τεκμηριώνεται ότι στη βΜΑ αναπτύσσονται συνθήκες μείωσης των συγκεντρώσεων του C-FGF23, με πιθανότερο μηχανισμό τη μειωμένη πρωτεολυτική διάσπαση του ακέραιου μορίου του FGF23, λόγω των συνθηκών χρόνιας υπερφόρτισης του οργανισμού με Fe. Όσον αφορά στον παράγοντα iFGF23, παρατηρήθηκε μέτρια αυξημένη μέση τιμή των συγκεντρώσεων του μορίου στο ορό στην ομάδα THL σε σύγκριση με την ομάδα NOR, η διαφορά όμως αυτή δεν μπόρεσε να καταστεί στατιστικά σημαντική. Εάν αυτό συνέβαινε, το πρότυπο μεταβολών των παραγόντων iFGF23 και C-FGF23 στη βΜΑ θα ήταν απόλυτα συμβατό με εκείνο της παρεντερικής χορήγησης Fe και θα μπορούσαμε με βεβαιότητα να υποστηρίξουμε ότι ένας από τους παθογενετικούς μηχανισμούς της ΟΝΘ είναι και η χρόνια αυξημένη φωσφατουρική επίδραση του FGF23 στον οργανισμό. Από την άλλη, η απουσία στατιστικά σημαντικής διαφοροποίησης των επιπέδων iFGF23 μεταξύ των ομάδων THL και NOR στην παρούσα μελέτη δεν μπορεί να αποκλείσει αβασάνιστα την υπόθεση αυτή, καθώς ποικίλες καταστάσεις που άπτονται της παθοφυσιολογίας και των θεραπευτικών ιδιαιτεροτήτων της βΜΑ αλλά και των πολυάριθμων επιπλοκών αυτής, μπορεί να παρεμβαίνουν επηρεάζοντας

μέχρι ενός βαθμού τις εργαστηριακές τιμές του iFGF23, και μάλιστα κατά περιόδους. Όπως ήδη αναφέρθηκε, παράγοντες όπως είναι η συχνότητα και η χρονική στιγμή των μεταγγίσεων, οι επιδράσεις του εκάστοτε μακροχρόνιου σχήματος αποσιδήρωσης, οι βιοχημικές και ορμονικές διαταραχές που παρατηρούνται συχνότερα σε έδαφος βΜΑ και προδιαθέτουν σε ελάττωση παραγόντων στην κυκλοφορία που φυσιολογικά προάγουν την έκκριση FGF23, αλλά και η ανάπτυξη πιθανών προσαρμοστικών μηχανισμών στη χρόνια επίδραση της υπερφόρτωσης σιδήρου αποτελούν παραμέτρους που δυνητικά θα μπορούσαν να επηρεάσουν το αποτέλεσμα των μετρήσεων του iFGF23. Τα φαινόμενα αυτά δεν έχουν μέχρι σήμερα μελετηθεί στα άτομα με βΜΑ και ως εκ τούτου πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω, ώστε να καταλήξουμε σε πιο ξεκάθαρα και σαφή συμπεράσματα. Για παράδειγμα, ο έλεγχος των επιπέδων του iFGF23 στα πρώτα 24ωρα μετά από τη μετάγγιση θα αποτελούσε μία εύλογη προσπάθεια πιο στοχευμένου ελέγχου. Ως προς τη σύγκριση των επιπέδων της sKlotho μεταξύ των δύο πληθυσμών της μελέτης, η μέση τιμή του μορίου στον ορό ήταν χαμηλότερη στην ομάδα των πασχόντων, δε διαπιστώθηκε όμως να υφίσταται στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση από εκείνη των υγιών μαρτύρων. Στη μοναδική μέχρι σήμερα σχετική μελέτη παρατήρησης των επιπέδων της sKlotho στους ασθενείς με βΜΑ σε σύγκριση με υγιή ομάδα ελέγχου που έχει δημοσιευθεί από τους Baldan A και συν. το 2015, διαπιστώθηκε ότι η sKlotho ήταν σημαντικά χαμηλότερη στο πλάσμα των ασθενών με βΜΑ. Βεβαίως, στη συγκεκριμένη εργασία συμμετείχε σχεδόν τριπλάσιος αριθμός θαλασσαιμικών πασχόντων από ότι στη δική μας και ίσως αυτός να ήταν ένας καταλυτικός παράγοντας στην τελική δυνατότητα ανάδειξης μίας στατιστικά σημαντικής διαφοράς. Εάν τελικά η διαφορά αυτή όντως υφίσταται ο μηχανισμός παραμένει ασαφής, αν και έχει προταθεί από τους προηγούμενους ερευνητές πιθανή αρνητική επίδραση της βΜΑ στη δράση ή στην έκκριση των ενζύμων που αποκόπτουν το μόριο της sKlotho από την κυτταρική μεμβράνη.

Από τη συγκριτική μελέτη των υπολοίπων εργαστηριακών παραμέτρων μεταξύ των ομάδων THL και NOR, τα στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα της PTH και ο αυξημένος λόγος TmP/GFR που διαπιστώθηκαν στην ομάδα των πασχόντων, όπως και η απουσία συγκριτικά αυξημένων τιμών P στα ούρα 24ώρου στην ομάδα THL, επισημάνθηκαν και συζητήθηκαν διεξοδικά στο προηγούμενο κεφάλαιο. Ομοίως και η αρνητική συσχέτιση μεταξύ της διατροφικής πρόσληψης P και των επιπέδων της 25OHD στον πληθυσμό των β-θαλασσαιμικών που φάνηκε να υπάρχει

με τη βοήθεια της επεξεργασίας των διατροφικών δεδομένων. Όλες αυτές οι παρατηρήσεις παρείχαν χρήσιμες πληροφορίες που μπορούν να κατευθύνουν την ιατρική σκέψη σε ενδιαφέρουσες παθοφυσιολογικές υποθέσεις, δεν ήταν όμως ικανές να υποστηρίξουν ή να απορρίψουν με βεβαιότητα τις μεταβολές του FGF23 ή τις επιδράσεις αυτού που υφίστανται στα άτομα με βΜΑ, καθώς το συγκεκριμένο πεδίο παραμένει μέχρι σήμερα πρακτικά αδιερεύνητο. Ο σχεδιασμός νέων εξειδικευμένων μελετών, με μεγαλύτερο αριθμό συμμετεχόντων, σχεδιασμένων από διαφορετικά κέντρα παγκοσμίως, που χρησιμοποιούν διαφορετικά θεραπευτικά πρωτόκολλα και ο προσδιορισμός των παραγόντων iFGF23, C-FGF23 και sKlotho σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα από τη μετάγγιση, θα αποτελούσε το ιδανικό αρχικό σενάριο για να εξαχθούν πολύ περισσότερα συμπεράσματα που να εμπλουτίζουν περαιτέρω τις γνώσεις μας στο συγκεκριμένο αντικείμενο. Τονίζεται βεβαίως ότι ο αριθμός συμμετεχόντων αποτελεί την αχίλλειο πτέρνα της πλειοψηφίας των μελετών που αφορούν στη βΜΑ, καθώς αποτελεί μία όχι τόσο συχνή παθολογική οντότητα, με τους πάσχοντες να βρίσκονται διασκορπισμένοι σε πολλά κέντρα παρακολούθησης. Εφόσον τελικά πιστοποιηθεί και επισήμως η συμμετοχή του παράγοντα FGF23 στην παθογένεια της οστικής νόσου της βΜΑ, είναι επόμενο να αναπτυχθούν ακόμη πιο στοχευμένοι θεραπευτικοί χειρισμοί, που σε συνδυασμό με τα σύγχρονα χρησιμοποιούμενα - αλλά και άμεσα αναπτυσσόμενα - φαρμακευτικά μέσα, να εμπλουτίσουν σημαντικά τη θεραπευτική φαρέτρα των κλινικών ιατρών που ασχολούνται ενεργά και δυναμικά με τη φροντίδα των θαλασσαιμικών ασθενών.



### III. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Penido MG, Alon US. Phosphate homeostasis and its role in bone health. *Pediatr Nephrol* 2012;27(11):2039-48.
2. Λυρίτης ΓΠ, *Μεταβολικά Νοσήματα των Οστών*. 5<sup>η</sup> Έκδοση. Αθήνα (GR): Hylonome Editions; 2013.
3. Λυρίτης ΓΠ, *Μεταβολικά Νοσήματα των οστών*. 4<sup>η</sup> Έκδοση. Αθήνα (GR): Hylonome Editions; 2007.
4. Bergwitz C, Jüppner H. Regulation of phosphate homeostasis by PTH, vitamin D, and FGF23. *Annu Rev Med* 2010;61:91-104.
5. Baron R. Anatomy and ultrastructure of bone - Histogenesis, growth and remodeling. *Endotext* 13 May 2008.
6. Crespo-Peña M, Torrijos-Eslava A, Gijón-Baños J. Benign familial hyperphosphatasemia: a report of two families and review of the literature. *Clin Exp Rheumatol* 1997;15(4):425-31
7. Rosen CJ, Lian JB, Compston JE. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 7th Edition. Washington D.C: American Society for Bone and Mineral Research; 2008.
8. Iliopoulos Ch, Zouloumis L, Lazaridou M. Physiology of bone turnover and its application in contemporary maxillofacial surgery. A review. *Hippokratia* 2010;14(4):244-8
9. Khosla S. Minireview: The OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 2001;142(12):5050-5.
10. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and Remodeling. *Arch Biochem Biophys* 2008;15;473(2):139-46.
11. Boyce BF, Xing L. Review: Biology of RANK, RANKL and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther* 2007;9(Suppl 1):S1.
12. Crockett JC, Mellis DJ, Scott DI, Helfrich MH. New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: focus on the RANK/RANKL axis. *Osteoporos Int* 2011;22(1):1-20.

13. Cundy T, Hegde M, Naot D, Chong B, King A. et al. A mutation in the gene TNFRSF11B encoding osteoprotegerin causes an idiopathic hyperphosphatasia phenotype. *Hum Mol Genet* 2002;11(18): 2119-27.
14. Ney JT, Fehm T, Juhasz-Boess I, Solomayer EF. RANK, RANKL and OPG Expression in Breast Cancer - Influence on Osseous Metastasis. *Geburtsh Frauenheilk* 2012;72(5):385-91.
15. Hanada R, Hanada T, Penninger JM. Physiology and pathophysiology of the RANKL/RANK system. *Biol. Chem* 2010;391(12):1365-70.
16. Toumba M, Skordis N. Osteoporosis Syndrome in Thalassaemia Major: An Overview. *J Osteoporosis* 2010;2010:53673(7 pages.)
17. Morabito N, Gaudio A, Lasco A, Atteritano M, Pizzoleo MA et al. Osteoprotegerin and RANKL in the pathogenesis of thalassemia-induced osteoporosis: new pieces of the puzzle. *J Bone Miner Res* 2004;19(5):722–7.
18. Τσαγγάλης Γ, Λαγγουράνης Α. Φωσφατονίνες και Νεφρός. *Ελληνική Νεφρολογία* 2008;20:250-8.
19. Hu MC, Shiizaki K, Kuro-o M, Moe OW. Fibroblast growth factor 23 and Klotho: physiology and pathophysiology of an endocrine network of mineral metabolism. *Annu Rev Physiol* 2013;75: 503–33.
20. Martin A, David V, Quarles LD. Regulation and function of the FGF23/klotho endocrine pathways *Physiol Rev* 2012;92(1):131–55.
21. Ramon I, Kleynen P, Body JJ, Karmali R. Fibroblast growth factor 23 and its role in phosphate homeostasis *Europ J Endocrinol* 2010;162:1–10.
22. Bhattacharyya N, Chong WH, Gafni RI, Collins MT. Fibroblast growth factor 23: state of the field and future directions. *Trends Endocrinol Metab* 2012;23(12):610–8.
23. Saito T, Fukumoto S. Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) and disorders of phosphate metabolism. *Int J Pediatr Endocrinol* 2009;(1):496514 (7 pages).
24. Tsuji K, Maeda T, Kawane T, Matsunuma A, Horiuchi N. Leptin stimulates fibroblast growth factor 23 expression in bone and suppresses renal 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> synthesis in leptin-deficient mice. *J Bone Miner Res.* 2010 Aug;25(8):1711-23.

25. David V, Dai B, Martin A, Huang J, Han X et al. Calcium regulates FGF-23 expression in bone. *Endocrinology* 2013;154(12):4469-82.
26. Durham BH, Joseph F, Bailey LM, Fraser WD. The association of circulating ferritin with serum concentrations of fibroblast growth factor-23 measured by three commercial assays. *Ann Clin Biochem* 2007;44(Pt 5):463-6.
27. Schouten BJ, Doogue MP, Soule SG, Hunt PJ. Iron polymaltose-induced FGF23 elevation complicated by hypophosphataemic osteomalacia. *Ann Clin Biochem* 2009;46(Pt 2):167-9.
28. Schouten BJ, Hunt PJ, Livesey JH, Frampton CM, Soule SG. FGF23 elevation and hypophosphatemia after intravenous iron polymaltose: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94(7):2332-7.
29. Shimizu Y, Tada Y, Yamauchi M, Okamoto T, Suzuki H. et al. Hypophosphatemia induced by intravenous administration of saccharated ferric oxide: another form of FGF23-related hypophosphatemia. *Bone* 2009;45(4):814-6.
30. Farrow EG, Yu X, Summers LJ, Davis SI, Fleet JC et al. Iron deficiency drives an autosomal dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) phenotype in fibroblast growth factor-23 (Fgf23) knock-in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108(46):E1146-55.
31. Imel EA, Peacock M, Gray AK, Padgett LR, Hui SL, Econs MJ. Iron modifies plasma FGF23 differently in autosomal dominant hypophosphatemic rickets and healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(11):3541-9.
32. Silver J, Naveh-Many T. FGF-23 and secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2013;9(11):641-9.
33. Ησίοδος. Θεογονία. 217-219 / 901-906 (αρχαία ελληνικά.)
34. Kim JH, Hwang KH, Park KS, Kong ID, Cha SK. Biological role of anti-aging protein klotho. *J Lifestyle Med* 2015;5(1):1-6.
35. Hu MC, Shi M, Zhang J, Pastor J, Nakatani T. et al. Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule. *FASEB J* 2010;24:3438-350.
36. Hu MC, Kuro-o M, Moe OW. Klotho and chronic kidney disease. *Contrib Nephrol* 2013;180:47-63.
37. Shimada T, Mizutani S, Muto T, Yoneya T, Hino R. et al. Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. *PNAS* 2001;98(11):6500-5.

38. Andrukhova O, Slavic S, Smorodchenko A, Zeitz U, Shalhoub V. et al. FGF23 regulates renal sodium handling and blood pressure. *EMBO Mol Med* 2014;6(6):744-59.
39. Udell JA, Morrow DA, Jarolim P, Sloan S, Hoffman EB. Et al. Fibroblast growth factor-23, cardiovascular prognosis, and benefit of angiotensin-converting enzyme inhibition in stable ischemic heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2014;63(22):2421-8.
40. Ohata Y, Yamazaki M, Kawai M, Tsugawa N, Tachikawa K. et al. Elevated fibroblast growth factor 23 exerts its effects on placenta and regulates vitamin D metabolism in pregnancy of Hyp mice. *J Bone Miner Res* 2014;29(7):1627-38.
41. Kocelak P, Olszanecka-Glinianowicz M, Chudek J. Fibroblast Growth Factor 23 - Structure, Function and Role in Kidney Diseases. *Adv Clin Exp Med* 2012;21(3):391–401.
42. Xiao Y, Peng C, Huang W, Zhang J, Xia M. et al. Circulating fibroblast growth factor 23 is associated with angiographic severity and extent of coronary artery disease. *PLoS One* 2013;28(8):e72545.
43. Shalhoub V, Ward SC, Sun B, Stevens J, Renshaw L. et al. Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) and Alpha-Klotho Stimulate Osteoblastic MC3T3.E1 Cell Proliferation and Inhibit Mineralization. *Calcif Tissue Int* 2011;89(2):140–50.
44. Lu Y, Feng JQ. FGF23 in skeletal modeling and remodeling. *Curr Osteoporos Rep* 2011;9(2):103-8.
45. Zhang R, Lu Y, Ye L, Yuan B, Yu S. et al. Unique roles of phosphorus in endochondral bone formation and osteocyte maturation. *J Bone Miner Res* 2011;26(5):1047-56.
46. Sitara D, Kim S, Razzaque MS, Bergwitz C, Taguchi T. et al. Genetic evidence of serum phosphate-independent functions of FGF-23 on bone. *PLoS Genet* 2008 8;4(8):e1000154.
47. Wang H, Yoshiko Y, Yamamoto R, Minamizaki T, Kozai K. et al. Overexpression of Fibroblast Growth Factor 23 Suppresses Osteoblast Differentiation and Matrix Mineralization In Vitro. *J Bone Miner Res* 2008;23(6):939–48.
48. Hayashibara T, Hiraga T, Sugita A, Wang L, Hata K. et al. Regulation of osteoclast differentiation and function by phosphate: potential role of osteoclasts in the skeletal abnormalities in hypophosphatemic conditions. *J Bone Miner Res* 2007;22(11):1743-51.
49. Kuro-o M. Klotho and the Aging Process. *Korean J Int Med* 2011;26(2):113-122.

50. Urena Torres P, Friedlander G, de Vernejoul MC, Silve C, Prie D. Bone mass does not correlate with the serum fibroblast growth factor 23 in hemodialysis patients» *Kidney Int* 2008;73(1):102–7 .
51. Marsell R, Mirza MA, Mallmin H, Karlsson M, Mellstrom D. et al. Relation between FGF23, body weight and bone mineral density in elderly men. *Osteoporos Int* 2009;20(7):1167–73.
52. Manghat P, Fraser WD, Wierzbicki AS, Fogelman I, Goldsmith DJ, Hampson G. Fibroblast growth factor-23 is associated with C-reactive protein, serum phosphate and bone mineral density in chronic kidney disease. *Osteoporos Int* 2010;21(11):1853–61.
53. Desjardins L, Liabeuf S, Renard C, Lenglet A, Lemke HD. et al. FGF23 is independently associated with vascular calcification but not bone mineral density in patients at various CKD stages. *Osteoporos Int* 2012;23(7):2017–25.
54. Kanda E, Yoshida M, Sasaki S. Applicability of fibroblast growth factor 23 for evaluation of risk of vertebral fracture and chronic kidney disease-mineral bone disease in elderly chronic kidney disease patients» *BMC Nephrol* 2012;13:122.
55. Mirza MA, Karlsson MK, Mellstrom D, Orwoll E, Ohisson C. et al. Serum fibroblast growth factor-23 (FGF-23) and fracture risk in elderly men *J Bone Miner Res* 2011;26(4):857–64.
56. Lane NE, Parimi N, Corr M, Yao W, Cauley JA et al. Association of serum fibroblast growth factor 23 (FGF23) and incident fractures in older men: the osteoporotic fractures in men (MrOS) study. *J Bone Miner Res* 2013;28(11):2325–32.
57. Isakova T, Cai X, Lee J, Katz R, Cauley JA. et al. Associations of FGF23 With Change in Bone Mineral Density and Fracture Risk in Older Individuals. *J Bone Miner Res* 2016;31(4):742-8.
58. Jovanovich A, Buzkova P, Chonchol M, Robbins J, Fink HA. et al. Fibroblast growth factor 23, bone mineral density, and risk of hip fracture among older adults: the cardiovascular health study. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98(8):3323–31.
59. Reyes-Garcia R, Garcia-Martin A, Garcia-Fontana B, Morales-Santana S, Rozas-Moreno P, Munoz-Torres M. FGF23 in type 2 diabetic patients: relationship with bone metabolism and vascular disease. *Diabetes Care* 2014;37(5):89–90.
60. Olivieri NF. The  $\beta$ -Thalassemias. *N Engl J Med* 1999;341:99-109.

61. Cappellini MD, Cohen A, Porter J, Taher A, Viprakasit V. Guidelines for the management of transfusion dependent thalassaemia (TDT). 3rd Edition. Nicosia (CY): Thalassaemia International Federation; 2014.
62. Galanello R, Origa R. Beta-thalassaemia Orphanet J Rare Dis. 2010;5:11.
63. Φερτάκης Α. Παθολογική Φυσιολογία Ιατρικού Τμήματος Πανεπιστημίου Αθηνών. Αθήνα (GR): Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ.Πασχαλίδης; 1998.
64. De Sanctis V. Multicentre study on prevalence of endocrine complications in thalassaemia major. Italian Working Group on Endocrine Complications in Non-endocrine Diseases. Clin Endocrinol (Oxf). 1995;42(6):581-6.
65. Kwiatkowski JL. Management of transfusional iron overload - differential properties and efficacy of iron chelating agents. J Blood Med 2011;2:135-49. [SEP]
66. Cappellini MD, Pattoneri P. Oral iron chelators. Ann Rev Med 2009;60:25-38.
67. Mobarra N, Shanaki M, Ehteram H, Nasiri H, Sahmani M. et al. A review on iron chelators in treatment of iron overload syndromes” Int J Hematol Oncol Stem Cell Res 2016;10(4):239-47.
68. Toumba M, Skordis N. Osteoporosis syndrome in thalassaemia major: an Overview. J Osteoporos 2010;2010:537673.
69. Terpos E, Voskaridou E. Treatment options for thalassaemia patients with osteoporosis. Ann N Y Acad Sci 2010;1202:237-43.
70. Baldini M, Forti S, Marcon A, Olivieri FM, Orsatti A, Tampieri B et al. Endocrine and bone disease in appropriately treated adult patients with beta- thalassaemia major. Ann Hematol 2010;89(12):1207-13.
71. Dresner Pollack R, Rachmilewitz E, Blumenfeld A, Idelson M, Goldfarb AW. Bone mineral metabolism in adults with beta-thalassaemia major and intermedia. Br J Hematol 2000;111(3):902-7.
72. Vogiatzi MG, Macklin EA, Fung EB, Cheung AM, Vichinsky E, Olivieri N, et al. Bone disease in thalassaemia: a frequent [SEP]and still unresolved problem. J Bone Miner Res 2009;24(3):543-57.
73. Vogiatzi MG, Macklin EA, Fung EB, Vichinsky E, Olivieri N, Kwiatkowski J, et al. Prevalence of fractures among the Thalassaemia syndromes in North America. Bone 2006;38(4):571-5.
74. Sutipornpalangkul W, Janechetsadatham Y, Siritanaratkul N, Harnroongroj T. Prevalence of fractures among Thais with thalassaemia syndromes. Singapore Med J 2010;51(10):817- 21.

75. Fung EB, Harmatz PR, Milet M, Coates TD, Thompson AA, Ranalli M, et al. Fracture prevalence and relationship to endocrinopathy in iron overloaded patients with sickle cell disease and thalassemia. *Bone* 2008;43(1):162–8. [L SEP]
76. Origa R, Fiumana E, Gamberini MR, Armari S, Mottes M, Sangalli A, et al. Osteoporosis in  $\beta$ -Thalassemia: Clinical and genetic aspects. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1054(1):451–6.
77. Christoforidis A, Hatzipantelis E, Tsatra I, Kazantzidou E, Katzos G, Athanassiou-Metaxa M. Bone mineral density in children and young adults with  $\beta$ -thalassemia major conventionally treated. *Pediatr Blood Cancer* 2006;47(1):113–4.
78. Kyriakou A, Savva SC, Savvides I, Pangalou E, Ioannou YS, Christou S, et al. Gender differences in the prevalence and severity of bone disease in thalassaemia. *Pediatr Endocrinol Rev* 2008;6(suppl 1):116–22.
79. Ladis V, Raptou P, Rigatou E, Chouliaras G, Korres D, Kattamis C. Study of bone density by pQCT analysis in healthy adults and patients with B-Thalassemia major and intermedia. *Pediatr Endocrinol Rev* 2008;6(suppl 1):127-31.
80. Wong P, Fuller PJ, Gillespie MT, Milat F. Bone Disease in Thalassemia: A Molecular and Clinical Overview. *Endocr Rev* 2016;37(4):320-46.
81. Voskaridou E, Terpos E. New insights into the pathophysiology and management of osteoporosis in patients with  $\beta$  thalassaemia. *Br J Haematol* 2004;127(2):127–39.
82. Wonke B, Jensen C, Hanslip JJ, Prescott E, Lalloz M, Layton M, et al. Genetic and acquired predisposing factors and treatment of osteoporosis in thalassaemia major. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1998;11(Suppl 3):795–801.
83. Skordis N, Efstathiou E, Kyriakou A, Toumba M. Hormonal dysregulation and bones in thalassaemia - an overview. *Pediatr Endocrinol Rev* 2008;6(Suppl 1):107-15.
84. Vichinsky EP. The morbidity of bone disease in Thalassemia. *Ann N Y Acad Sci* 1998;30(850):344-8.
85. Borgna-Pignatti C, Cappellini MD, De Stefano P, Del Vecchio GC, Forni GL, Gamberini MR, et al. Survival and complications in thalassemia. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1054:40-7.

86. Mahachoklertwattana P, Pootrakul P, Chuansumrit A, Choubtum L, Sriphrapadang A, Sirisriro R, et al. Association between bone mineral density and erythropoiesis in Thai children and adolescents with thalassemia syndromes. *J Bone Miner Metab* 2006;24(2):146–52.
87. Wong P, Fuller PJ, Gillespie MT, Kartsogiannis V, Strauss BJ, Bowden D, et al. Thalassemia bone disease: the association between nephrolithiasis, bone mineral density and fractures. *Osteoporos Int* 2013;24(7):1965–71.
88. Mahachoklertwattana P, Sirikulchayanonta V, Chuansumrit A, Karnsombat R, Choubtum L, Sriphrapadang A, et al. Bone histomorphometry in children and adolescents with  $\beta$ -thalassemia disease: iron-associated focal osteomalacia.” *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(8):3966–72.
89. Zarjou A, Jeney V, Arosio P, Poli M, Zavaczki E, Balla G, et al. Ferritin ferroxidase activity: a potent inhibitor of osteogenesis. *J Bone Miner Res* 2010;25(1):164 –72.
90. Yamasaki K, Hagiwara H. Excess iron inhibits osteoblast metabolism. *Toxicol Lett* 2009;191(2-3):211–5.
91. Yang Q, Jian J, Abramson SB, Huang X. Inhibitory effects of iron on bone morphogenetic protein 2-induced osteoblastogenesis. *J Bone Miner Res* 2011;26(6):1188 –96.
92. Jia P, Xu YJ, Zhang ZL, Li K, Zhang W, Yang H. Ferric ion could facilitate osteoclast differentiation and bone resorption through the production of reactive oxygen species. *J Orthop Res* 2012;30(11):1843–52.
93. De Virgiliis S, Congia M, Frau F, Argioli F, Diana G, Cucca F, et al. Deferoxamine-induced growth retardation in patients with thalassemia major. *J Pediatr* 1988;113(4):661–9.
94. Naderi M, Sadeghi-Bojd S, Valeshabad AK, Jahantigh A, Alizadeh S, Dorgalaleh A, et al. A prospective study of tubular dysfunction in pediatric patients with beta thalassemia major receiving deferasirox. *Pediatr Hematol Oncol* 2013;30(8):748–54.
95. Quinn CT, Johnson VL, Kim HY, Trachtenberg F, Vogiatzi MG, Kwiatkowski JL, et al. Renal dysfunction in patients with thalassaemia. *Br J Haematol* 2011;153(1):111–7.



96. Wong P, Polkinghorne K, Kerr PG, Doery JC, Gillespie MT, Larmour I, et al. Deferasirox at therapeutic doses is associated with dose-dependent hypercalciuria. *Bone* 2016;85:55–8.
97. Chan YL, Pang LM, Chik KW, Cheng JC, Li CK. Patterns of bone diseases in transfusion-dependent homozygous thalassaemia major: predominance of osteoporosis and desferrioxamine-induced bone dysplasia. *Pediatr Radiol* 2002;32(7):492–7.
98. Olivieri NF, Koren G, Harris J, Khattak S, Freedman MH, Templeton DM, et al. Growth failure and bony changes induced by deferoxamine. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1992;14(1):48–56.
99. Morabito N, Gaudio A, Lasco A, Atteritano M, Pizzuolo MA, Cincotta M, et al. et al. Osteoprotegerin and RANKL in the pathogenesis of thalassaemia-induced osteoporosis: new pieces of the puzzle. *J Bone Miner Res* 2004;19(5):722–7.
100. Voskaridou E, Christoulas D, Xirakia C, Varvagiannis K, Boutsikas G, Bilalis A, et al. Serum Dickkopf-1 is increased and correlates with reduced bone mineral density in patients with thalassaemia-induced osteoporosis. Reduction post-zoledronic acid administration. *Haematologica* 2009;94(5):725–8.
101. Morabito N, Russo GT, Gaudio A, Lasco A, Catalano A, Morini E, et al. The “lively” cytokines network in beta-Thalassaemia Major-related osteoporosis. *Bone* 2007;40(6):1588–94.
102. Borgna-Pignatti C, Rugolotto S, De Stefano P, Zhao H, Cappellini MD, Del Vecchio GC, et al. Survival and complications in patients with thalassaemia major treated with transfusion and deferoxamine. *Haematologica* 2004;89(10):1187–93.
103. Anapliotou ML, Kastanias IT, Psara P, Evangelou EA, Liparaki M, Dimitriou P. The contribution of hypogonadism to the development of osteoporosis in thalassaemia major: new therapeutic approaches. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1995;42(3):279–287.
104. Gamberini MR, De Sanctis V, Gilli G. Hypogonadism, diabetes mellitus, hypothyroidism, hypoparathyroidism: incidence and prevalence related to iron overload and chelation therapy in patients with thalassaemia major followed from 1980 to 2007 in the Ferrara centre. *Pediatr Endocrinol Rev* 2008;6(suppl 1):158–69.

105. Shamsheersaz AA, Bekheirnia MR, Kamgar M, Pourzahedgilani N, Bouzari N, Habibzadeh M, et al. Metabolic and endocrinologic complications in beta-thalassemia major: a multicenter study in Tehran. *BMC Endocr Disord* 2003;3(1):4.
106. Toumba M, Sergis A, Kanaris C, Skordis N. Endocrine complications in patients with thalassaemia major. *Pediatr Endocrinol Rev* 2007;5(2):642–8. [SEP]
107. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ 3rd. Sex Steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev* 2002;23(3):279–302.
108. Compston JE. Sex Steroids and Bone. *Physiol Rev* 2001;81(1):419–47.
109. Ribot C, Trémollières F, Pouillès JM. Aromatase and regulation of bone remodelling. *Joint Bone Spine* 2006;73(1):37–42.
110. Frenkel B, Hong A, Baniwal SK, Coetzee GA, Ohlsson C. et al. Regulation of adult bone turnover by sex steroids. *J Cell Physiol* 2010;224(2):305–10.
111. Khosla S. Estrogen and bone: Insights from estrogen-resistant, aromatase deficient, and normal men. *Bone* 2008;43(3):414–7.
112. Kung AW. Androgen and bone mass in men. *Asian J Androl* 2003;5(2):148–54.
113. Callewaert F, Boonen S, Vanderschueren D. Sex steroids and the male skeleton: a tale of two hormones. *Trends Endocrinol Metab* 2010;21(2):89–95.
114. Balasch J. Sex steroids and bone: current perspectives. *Hum Reprod Update* 2003;9(3):207–22.
115. Lala R, Chiabotto P, Di Stefano M, Isaia GC, Garofalo F, Piga A. Bone density and metabolism in thalassaemia. *J Pediatr Endocrinol Metabol* 1998;11(Suppl 3):785–90.
116. Pérez-López FR, Chedraui P, Cuadros-López JL. Bone mass gain during puberty and adolescence: Deconstructing gender characteristics. *Curr Med Chem* 2010;17(5):453–66.
117. Mohan S, Richman C, Guo R, Amaar Y, Donahue LR. et al. Insulin-Like Growth Factor regulates peak bone mineral density in mice by both Growth Hormone-dependent and -independent mechanisms. *Endocrinology* 2003;144(3):929–36.
118. Bonjour JP, Chevalley T, Ferrari S, Rizzoli R. The importance and relevance of peak bone mass in the prevalence of osteoporosis. *Salud Publica Mex.* 2009;51(Suppl 1):S5–17.

119. Perrini S, Laviola L, Carreira MC, Cignarelli A, Natalicchio A, Giorgino F. The GH/IGF1 axis and signaling pathways in the muscle and bone mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and osteoporosis. *J Endocrinol* 2010;205(3):201–10.
120. Russell-Aulet M, Shapiro B, Jaffe CA, Gross MD, Barkan AL. Peak Bone Mass in young healthy men is correlated with the Magnitude of endogenous Growth Hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(10):3463-8.
121. Soliman AT, El Banna N, Ansari BM. GH response to provocation and circulating IGF-I and IGF-binding protein-3 concentrations, the IGF-I generation test and clinical response to GH therapy in children with beta-thalassaemia. *Eur J Endocrinol* 1998;138(4):394-400.
122. Karamifar H, Karimi M, Amirhakimi G, Sharbatialaei M, De Sanctis V. Reduced insulin growth factor I concentrations in iron-overloaded beta thalassaemic patients with normal growth hormone secretion and liver function. *Pediatr Endocrinol Rev* 2004;2 (Suppl 2):256-8.
123. De Sanctis V. Growth and puberty and its management in thalassaemia. *Horm Res* 2002;58(suppl 1):72–9.
124. Poggi M, Pascucci C, Monti S, Pugliese P, Lauri C, Amodeo G, et al. Prevalence of growth hormone deficiency in adult polytransfused-thalassemia patients and correlation with transfusional and chelation parameters. *J Endocrinol Invest* 2010;33(8):534–8.
125. Italian Working Group on Endocrine Complications in Non-Endocrine Diseases. Multicentre study on prevalence of endocrine complications in thalassaemia major. *Clin Endocrinol* 1995;42(6):581-6.
126. Monge L, Pinach S, Caramellino L, Bertero MT, Dall’omo A, Carta Q. The possible role of autoimmunity in the pathogenesis diabetes in B-thalassaemia major. *Diabetes Metab* 2001;27(2 Pt 1):149-54.
127. Hamidieh AA, Moradbeag B, Pasha F, Jalili M, Hadjibabaie M, Keshavarznia M. High Prevalence of Hypoparathyroidism in patients with beta-Thalassaemia Major. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res* 2009;3(3):17–20.
128. Angelopoulos NG, Goula A, Rombopoulos G, Kaltzidou V, Katounda E, et al. Hypoparathyroidism in transfusion-dependent patients with beta-thalassaemia. *J Bone Miner Metab* 2006;24(2):138-45.

129. Vogiatzi MG, Macklin EA, Trachtenberg FL, Fung EB, Cheung AM, Vichinsky E, et al. Differences in the prevalence of growth, endocrine and vitamin D abnormalities among the various thalassaemia syndromes in North America. *Br J Haematol* 2009;146(5):546-56. [11]
130. Napoli N, Carmina E, Bucchieri S, Sferrazza C, Rini GB, Di Fede G. Low serum levels of 25-hydroxy vitamin D in adults affected by thalassemia major or intermedia. *Bone* 2006;38(6):888-92.
131. Soliman A, De Sanctis V, Yassin M,. Vitamin D Status in Thalassemia Major: an Update. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2013;5(1):e2013057.
132. Mohkam M, Shamsian BS, Gharib A, Nariman S, Arzanian MT. Early markers of renal dysfunction in patients with beta-thalassemia major. *Pediatr Nephrol* 2008;23(6):971-6.
133. Koliakos G, Papachristou F, Koussi A, Perifanis V, Tsatra I, Souliou E, et al. Urine biochemical markers of early renal dysfunction are associated with iron overload in beta-thalassaemia. *Clin Lab Hematol* 2003;25(2):105-9.
134. Smolkin V, Halevy R, Levin C, Mines M, Sakran W, Iliia K, et al. Renal function in children with beta-thalassemia major and thalassemia intermedia. *Pediatr Nephrol* 2008;23(10):1847-51.
135. Sadeghi-Bojd S, Hashemi M, Karimi M. Renal tubular function in patients with beta-thalassaemia major in Zahedan, southeast Iran. *Singapore Med J* 2008;49(5):410-2.
136. Milat F, Wong P, Fuller PJ, Johnstone L, Kerr PG, Doery JC, et al. A case of hypophosphatemic osteomalacia secondary to deferasirox therapy. *J Bone Miner Res* 2012;27(1):219-22.
137. Moulas A, Challa A, Chaliasos N, Lapatsanis PD. Vitamin D metabolites (25-hydroxyvitamin D, 24,25-dihydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D) and osteocalcin in  $\beta$ -thalassaemia. *Acta Paediatr* 1997;86(6):594-9.
138. Stefanopoulos D, Papaioannou NA, Papavassiliou AG, Mastorakos G, Vryonidou A. et al. A contemporary therapeutic approach to bone disease in beta-thalassemia - a review. *Journal of Frailty, Sarcopenia & Falls* 2018;3(1):13-25.
139. Palmer P.E.S, Reeder M.M. *The Imaging of Tropical Diseases: With Epidemiological, Pathological and Clinical Correlation*. 2<sup>nd</sup> rev. ed. Edition, 2001, British Institute of Radiology, Publisher: Springer.

140. Tyler PA, Madani G, Ghaudhuri R, Wilson LF, Dick EA. The radiological appearances of Thalassaemia. *Clin Radiol* 2006;61(1):40-52.
141. International Osteoporosis Foundation (IOF) Europe Guidelines 2013.
142. International Society for Clinical Densitometry (ISCD) Official Positions 2015.
143. Fung EB, Vichinsky EP, Kwiatkowski JL, Huang J, Bachrach LK, Sawyer AJ, Zemel BS. Characterization of low bone mass in young patients with thalassaemia by DXA, pQCT and markers of bone turnover. *Bone* 2011;48(6):1305–12.
144. Ladis V, Gandaifis N, Papadopoulos EC, Gavras GM, Papassotiriou I. et al. Bone density study at the distal radius, using pQCT analysis in Greek thalassaemic patients. *Pediatr Endocrinol Rev* 2004;2(Suppl 2):307–9.
145. Shamshirsaz AA, Bekheirnia MR, Kamgar M, Pakbaz Z, Tabatabaie SM. et al. Bone mineral density in Iranian adolescents and young adults with thalassaemia major. *Pediatr Hematol Oncol* 2007;24(7):469–79.
146. Fung EB, Xu Y, Trachtenberg F, Odame I, Kwiatkowski JL. et al. Inadequate dietary intake in patients with thalassaemia. *J Acad Nutr Diet*. 2012;112(7):980-90.
147. Valizadeh N, Farrokhi F, Alinejad V, Said Mardani S, Valizadeh N. et al. Bone density in transfusion dependent thalassaemia patients in Urmia, Iran. *Iran J Ped Hematol Oncol* 2014;4(2):68-71.
148. Shivani S, Douglas PK. Smoking, Alcohol and Bone. In: Hollich MF, Nieves JW. *Nutrition and Bone Health*, Edition: 2nd. New York: Springer; 2015. P. 489-504.
149. Rosen CJ, Compston JE, Lian JB. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*, Edition: 7th. Washington, D.C: ASBMR; 2008.
150. Angelucci E, Barosi G, Camaschella C, Cappellini MD, Cazzola M, Galanello R, et al. Italian Society of Hematology guidelines for the management of iron overload in thalassaemia major and related disorders. *Haematologica* 2008;93(5):741-52.
151. Yardumian A, Telfer P, Shah F, Ryan K, Darlison MW, Miller E, Constantinou G. *Standards for the Clinical Care of Children and Adults with Thalassaemia in the UK*, Edition: 3rd. London: United Kingdom Thalassaemia Society; 2016.
152. Perrotta S, Cappellini MD, Bertoldo F, Servedio V, Iolascon G, D'Agruma L, et al. Osteoporosis in beta-thalassaemia major patients: analysis of the genetic background. *Br J Haematol* 2000;111(2):461-6.

153. Farmaki K, Angelopoulos N, Anagnostopoulos G, Goula A, Pappa C. Thyroid Function in Thalassaemic Patients Treated with Combined Chelation Therapy. *Blood* 2006;108:1592.
154. Farmaki K, Tzoumari I, Pappa C, Chouliaras G, Berdoukas V. Normalisation of total body iron load with very intensive combined chelation reverses cardiac and endocrine complications of thalassaemia major. *Br J Haematol* 2010;148(3):466-75.
155. Casale M, Citarella S, Filosa A, De Michele E, Palmieri F, Ragozzino A, et al. Endocrine function and bone disease during long-term chelation therapy with deferasirox in patients with  $\beta$ -thalassaemia major. *Am J Hematol* 2014;89(12):1102-6.
156. Cauley JA, Seeley DG, Ensrud K, Ettinger B, Black D, Cummings SR. Estrogen replacement therapy and fractures in older women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Ann Intern Med* 1995;122(1):9-16. <sup>[[SEP]]</sup>
157. Chatterjee R, Katz M, Bajoria R. Use of hormone replacement therapy for correction of high turnover bone disease in hypogonadal  $\beta$ -Thalassaemia major patients presenting with osteoporosis: comparison with idiopathic premature ovarian failure. *Hemoglobin* 2011;35(5-6):653-68. <sup>[[SEP]]</sup>
158. L'hermite M, Simoncini T, Fuller S, Genazzani AR. Could transdermal estradiol + progesterone be a safer postmenopausal HRT? A review. *Maturitas* 2008;60(3-4):185-201.
159. Cappellini MD, Poggiali E, Taher AT, Musallam KM. Hypercoagulability in  $\beta$ -thalassaemia: a status quo. *Expert Rev Hematol* 2012;5(5):505-11.
160. Curhan GC, Willett WC, Speizer FE, Spiegelman D, Stampfer MJ. Comparison of dietary calcium with supplemental calcium and other nutrients as factors affecting the risk for kidney stones in women. *Ann Intern Med* 1997;126(7):497-504.
161. Han H, Segal AM, Seifter JL, Dwyer JT. Nutritional Management of Kidney Stones (Nephrolithiasis). *Clin Nutr Res* 2015;4(3):137-52.
162. Moreira Guimaraes Penido MG, de Sousa Tavares M, Campos Linhares M, Silva Barbosa AC, Cunha M. Longitudinal study of bone mineral density in children with idiopathic hypercalciuria. *Prdiatr Nephrol* 2012;27(1):123-30.
163. Kruse C, Eiken P, Vestergaard P. Continuous and long-term treatment is more important than dosage for the protective effect of thiazide use on bone metabolism and fracture risk. *J Intern Med* 2016;279(1):110-22.

- 164.Schwadere AI, Srivastava T, Schueller L, Cronin R, Mahan JD, Hains D. Dietary modifications alone do not improve bone mineral density in children with idiopathic hypercalciuria. *Clin Nephrol* 2011;76(5):341-7.
- 165.Arrabal-Polo MA, Arias-Santiago S, de Haro-Munoz T, Lopez-Ruiz A, Orgaz-Molina J, Gonzalez-Torres S, et al. Effects of aminobisphosphonates and thiazides in patients with osteopenia/osteoporosis, hypercalciuria, and recurring renal calcium lithiasis. *Urology* 2013;81(4):731–7.
- 166.Brandi ML. Indications on the use of vitamin D and vitamin D metabolites in clinical phenotypes *Clin Cases Miner Bone Metab* 2010;7(3):243–50.
- 167.Bolland MJ, Grey A, Avenell A, Gamble GD, Reid IR. Calcium supplements with or without vitamin D and risk of cardiovascular events: reanalysis of the Women's Health Initiative limited access dataset and meta-analysis *BMJ* 2011;19;342:d2040.
- 168.Lewis JR, Calver J, Zhu K, Flicker L, Prince RL. Calcium supplementation and the risks of atherosclerotic vascular disease in older women: results of a 5-year RCT and a 4.5-year follow-up. *J Bone Miner Res* 2011;26(1):35–41.
- 169.Paik JM, Curhan GC, Sun Q, Rexrode KM, Manson JE, Rimm EB, et al. Calcium supplement intake and risk of cardiovascular disease in women. *Osteoporos Int* 2014;25(8):2047-56.
- 170.Ozturk Z, Genc GE, Gumuslu S. Minerals in thalassaemia major patients: An overview. *J Trace Elem Med Biol* 2017;41:1-9.
- 171.Fung EB, Kwiatkowski JL, Huang JN, Gildengorin G, King JC, Vichinsky EP. Zinc supplementation improves bone density in patients with thalassemia: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2013;98(4):960–71.
- 172.Morabito N, Lasco A, Gaudio A, Crisafulli A, Di Pietro C, Meo A. et al. Bisphosphonates in the treatment of thalassemia-induced osteoporosis. *Osteoporos Int* 2002;13(8):644-9.
- 173.Viereck V, Emons G, Lauck V, Frosch KH, Blaschke S, Grundker C, et al. Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;291(3):680–6.
- 174.Pennisi P, Pizzarelli G, Spina M, Riccobene S, Fiore CE. Quantitative ultrasound of bone and clodronate effects in thalassemia-induced osteoporosis. *J Bone Miner Metab* 2003;21(6):402–8.

175. Voskaridou E, Terpos E, Spina G, Palermos J, Rahemtulla A, Loutradi A, et al. Pamidronate is an effective treatment for osteoporosis in patients with beta-thalassaemia. *Br J Haematol* 2003;123(4):730–7.
176. Pan B, Farrugia AN, To LB, Findlay DM, Green J, Lynch K, et al. The nitrogencontaining bisphosphonate, zoledronic acid, influences RANKL expression in human osteoblast-like cells by activating TNF-alpha converting enzyme (TACE). *J Bone Miner Res* 2004;19(1):147–54.
177. Perifanis V, Vyzantiadis T, Vakalopoulou S, Tziomalos K, Garypidou V, Athanassiou-Metaxa M, et al. Treatment of beta-thalassaemia-associated osteoporosis with zoledronic acid.” *Br J Haematol* 2004;125(1):91–2.
178. Voskaridou E, Anagnostopoulos A, Konstantopoulos K, Stoupa E, Spyropoulou E, Kiamouris C, et al. Zoledronic acid for the treatment of osteoporosis in patients with beta-thalassemia: results from a single-center, randomized, placebo-controlled trial.” *Haematologica* 2006;91(9):1193-202.
179. Gilfillan CP, Strauss BJ, Rodda CP, Bowden DK, Kean AM, Obaid M, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of intravenous zoledronic acid in the treatment of thalassemia-associated osteopenia. *Calcif Tissue Int* 2006;79(3):138–44.
180. Otrrock ZK, Azar ST, Shamseddeen WA, Habr D, Inati A, Koussa S, et al. Intravenous zoledronic acid treatment in thalassemia-induced osteoporosis: results of a phase II clinical trial. *Ann Hematol* 2006;85(9):605–9.
181. Perifanis V, Vyzantiadis T, Tziomalos K, Vakalopoulou S, Garipidou V, Athanassiou-Metaxa M, et al. Effect of zoledronic acid on markers of bone turnover and mineral density in osteoporotic patients with beta-thalassaemia. *Ann Hematol* 2007;86(1):23–30.
182. Skordis N, Ioannou YS, Kyriakou A, Savva SC, Efstathiou E, Savvides I, et al. Effect of bisphosphonate treatment on bone mineral density in patients with thalassaemia major. *Pediatr Endocrinol Rev* 2008;6(Suppl 1):144–8.
183. Patırođlu T, Torun YA, Kula M, Karakükçü M. Treatment of thalassemia-induced osteoporosis with intermittent pamidronate infusions: two-year follow up. *Turk J Haematol* 2008;25(2):79–82.
184. Leung TF, Chu Y, Lee V, Cheng FW, Leung WK, Shing MM, et al. Long-term effects of pamidronate in thalassemic patients with severe bone mineral density deficits. *Hemoglobin* 2009;33(5):361–9.



185. Chatterjee R, Shah FT, Davis BA, Byers M, Sooranna D, Bajoria R, et al. Prospective study of histomorphometry, biochemical bone markers and bone densitometric response to pamidronate in  $\beta$ -thalassaemia presenting with osteopenia-osteoporosis syndrome. *Br J Haematol* 2012;159(4):462–71.
186. Shirani F, Iashkari M, Ahmadi AS, Arabi M, Asefi N. Evaluation of alendronate efficacy on bone mineral density in thalassemic patients. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res* 2012;6(4):20–4.
187. Forni GL, Perrotta S, Giusti A, Quarta G, Pitrolo L, Cappellini MD, et al. Neridronate improves bone mineral density and reduces back pain in  $\beta$ -thalassaemia patients with osteoporosis: results from a phase 2, randomized, parallel-arm, open-label study. *Br J Haematol* 2012;158(2):274–82.
188. Dede AD, Trovas G, Chronopoulos E, Triantafyllopoulos IK, Dontas I, Papaioannou N, et al. Thalassaemia-associated osteoporosis: a systematic review on treatment and brief overview of the disease. *Osteoporos Int* 2016;27(12):3409-25.
189. Giusti A, Barone A, Balocco M, Pinto V, Pilotto A, Forni GL. Atypical fractures of the femur and bisphosphonate therapy in patients with thalassaemia-associated osteoporosis: report of three cases. Poster presented at: 10th Cooley's Anemia Symposium; October 18-22, 2015; Chicago, IL.
190. Lampropoulou-Adamidou K, Tournis S, Triantafyllopoulos IK. Atypical femoral fracture in a beta-thalassaemia major patient with previous bisphosphonate use: case report and a review of the literature. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2016;16(1):75–8.
191. Chatterjee R, Bajoria R, Shah FT, Porter JB, Fedele S. High index of suspicion for early diagnosis of alendronate-induced stage zero osteonecrosis of jaw in thalassaemia major. *Br J Haematol*. 2014 Jul;166(2):292-4.
192. Stathopoulos IP, Liakou CG, Katsalira A, Trovas G, Lyritis GG, Papaioannou NA, et al. The use of bisphosphonates in women prior to or during pregnancy and lactation. *Hormones (Athens)* 2011;10(4):280-91.
193. Levy S, Fayez I, Taguchi N, Han JY, Aiello J, Matsui D, et al. Pregnancy outcome following in utero exposure to bisphosphonates. *Bone* 2009 Mar;44(3):428-30.
194. Carmina E, Di Fede G, Napoli N, Renda G, Vitale G, Lo Pinto C, et al. Hypogonadism and hormone replacement therapy on bone mass of adult women with thalassaemia major. *Calcif Tissue Int* 2004;74(1):68-71.

195. Lasco A, Morabito N, Gaudio A, Buemi M, Wasniewska M, Frisina N. Effects of hormonal replacement therapy on bone metabolism in young adults with beta-thalassemia major. *Osteoporos Int* 2001;12(7):570-5.
196. Yassin MA, Soliman AT, De Sanctis V, Abdelrahman MO, Aziz Bedair EM, AbdelGawad M. Effects of the anti-receptor activator of nuclear factor kappa B ligand denosumab on beta thalassemia major-induced osteoporosis. *Indian J Endocrinol Metab* 2014;18(4):546–51.
197. CHMP Assessment report for Denosumab (Prolia). Doc.Ref.: EMA/21672/2010. Available from: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Public\\_assessment\\_report/human/001120/WC500093529.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/001120/WC500093529.pdf)
198. Ghaffari J, Abediankenari S, Nasehi M. Thalassemia and Immune System Dysfunction - Review Article. *Int J Curr Res* 2011;3(12):105-8.
199. Farmakis D, Giakoumis A, Polymeropoulos E, Aessopos A. Pathogenetic aspects of immune deficiency associated with beta-thalassemia. *Med Sci Monit* 2003;9(1):RA19-22.
200. Tournis S, Dede AD, Savvidis C, Triantafyllopoulos IK, Kattamis A, Papaioannou N. Effects of teriparatide retreatment in a patient with  $\beta$ -thalassemia major. *Transfusion* 2015;55(12):2905–10.
201. Clima LN, Albu A, Lambrescu I, Barbu CG, Fica S. The response to teriparatide of a patient with  $\beta$ -thalassemia and multiple endocrine complications. *Endocrine Abstracts* 2015;37:EP243.
202. Trotta A, Corrado A, Cantatore FP. Anabolic therapy of induced osteoporosis in beta-thalassaemia major: case report and <sup>[L]</sup><sub>[SEP]</sub>literature review. *Reumatismo* 2010;62(2):119–26.
203. Morabito N, Catalano A, Gaudio A, Morini E, Bruno LM, Basile G, et al. Effects of strontium ranelate on bone mass and bone turnover in women with thalassemia major-related osteoporosis. *J Bone Miner Metab* 2016;34(5):540-6.
204. Reginster JY. Cardiac concerns associated with strontium ranelate. *Expert Opin Drug Saf* 2014;13:1209-13.
205. McClung MR, Grauer A, Boonen S, Bolognese MA, Brown JP, Diez-Perez A, et al. Romosozumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med* 2014;370:412–20.

206. Voskaridou E, Christoulas D, Plata E, Bratengeier C, Anastasilakis AD, Komninaka V, et al. High circulating sclerostin is present in patients with thalassemia-associated osteoporosis and correlates with bone mineral density. *Horm Metab Res* 2012;44(12):909-13.
207. Saag KG, Petersen J, Brandi ML, Karaplis AC, Lorentzon M, Thomas T, et al. Romosozumab or Alendronate for Fracture Prevention in Women with Osteoporosis. *N Engl J Med* 2017;377(15):1417-27.
208. Lotinun S, Pearsall RS, Home WC, Baron R. Activin receptor signaling: a potential therapeutic target for osteoporosis. *Curr Mol Pharmacol* 2012;5(2):195-204.
209. Chantry AD, Heath D, Mulivor AW, Pearsall S, Baud'huin M, Coulton L, et al. Inhibiting activin-A signaling stimulates bone formation and prevents cancer-induced bone destruction in vivo. *J Bone Miner Res* 2010;25(12):2633-46.
210. Langdon JM, Barkataki S, Berger AE, Cheadle C, Xue QL, Sung V, et al. RAP-011, an activin receptor ligand trap, increases hemoglobin concentration in hepcidin transgenic mice. *Am J Hematol* 2015;90(1):8-14.
211. Fields SZ, Parshad S, Anne M, Raftopoulos H, Alexander MJ, Sherman ML, et al. Activin receptor antagonists for cancer-related anemia and bone disease. *Expert Opin Investig Drugs* 2013;22(1):87-101.
212. Dussiot M, Maciel TT, Fricot A, Chartier C, Negre O, Velga J, et al. An activin receptor IIA ligand trap corrects ineffective erythropoiesis in  $\beta$ -thalassemia. *Nat Med* 2014;20(4):398-407.
213. Cappellini MD, Porter J, Origa R, Forni GL, Laadem A, Galacteros F, et al. A Phase 2a, Open-Label, Dose-Finding Study To Determine The Safety and Tolerability Of Sotatercept (ACE-011) In Adults With Beta ( $\beta$ )-Thalassemia: Interim Results. *Blood* 2013;122:3448;
214. Piga AG, Perrotta S, Melpignano A, Borgna-Pignatti, Gamberini MR, Voskaridou E, et al. Luspatercept decreases transfusion burden and liver iron concentration in regularly transfused adults with beta-thalassemia. Oral Presentation at: 21<sup>st</sup> Congress of European Hematology Association (EHA); June 9-12, 2016; Copenhagen, Denmark.
215. Piga AG, Tartaglione I, Gamberini R, Voskaridou E, Melpignano A, Ricchie P, et al. Luspatercept Increases Hemoglobin, Decreases Transfusion Burden and Improves Iron Overload in Adults with Beta-Thalassemia. *Blood* 2016;128:851;

216. Piga AG, Tartaglione I, Gamberini R, Voskaridou E, Melpignano A, Ricchie P, et al. Luspatercept increases hemoglobin and decreases transfusion burden in adults with  $\beta$ -thalassemia. Oral Presentation at: 22<sup>nd</sup> Congress of European Hematology Association (EHA); June 22-25, 2017; Madrid, Spain.
217. Mirhosseini NZ, Shahar S, Ghayour-Mobarhan M, Banihashem A, Kamaruddin NA et al. Bone-related complications of transfusion-dependent beta thalassemia among children and adolescents. *J Bone Miner Metab.* 2013;31(4):468-76.
218. Sadia S, Syed MI, Syed IA. Biochemical Markers of Bone Turnover in Patients with  $\beta$ -Thalassemia Major: A Single Center Study from Southern Pakistan. *Adv Hematol.* 2016;2016:5437609.
219. Milat F, Wong P, Fuller PJ, Johnstone L, Kerr PG et al. A case of hypophosphatemic osteomalacia secondary to deferasirox therapy. *J Bone Miner Res.* 2012;27(1):219-22.
220. Eren E., Yilmaz N. Biochemical markers of bone turnover and bone mineral density in patients with  $\beta$ -thalassaemia major. *International Journal of Clinical Practice.* 2005;59(1):46–51.
221. Saboor M, Qudsia F, Qamar K, Moinuddin M. Levels of Calcium, Corrected Calcium, Alkaline Phosphatase and Inorganic Phosphorus in Patients' Serum with  $\beta$ -Thalassemia Major on Subcutaneous Deferoxamine. *J Hematol Thromb Dis.* 2014;2(2):1000130.
222. Al-Elq AH and Al-Saeed HH. Endocrinopathies in patients with thalassemias. *Saudi Med J.* 2004 Oct;25(10):1347-51.
223. Baldan A, Giusti A, Bosi C, Malaventura C, Musso M, Forni GL et al. Klotho, a new marker for osteoporosis and muscle strength in  $\beta$ -thalassemia major. *Blood Cells Mol Dis.* 2015 Dec;55(4):396-401.
224. Okada M, Imamura K, Fuchigami T, Omae T, Lida M. et al. 2 Cases of non specific multiple ulcers of the small intestine associated with osteomalacia caused by long-term intravenous administration of saccharated ferric oxide. *Nippon Naika Gakkai Zasshi (Japanese)* 1982;71:1566–72.
225. Okada M, Imamura K, Iida M, Fuchigami T, Omae T. Hypophosphatemia induced by intravenous administration of saccharated iron oxide. *Klin Wochenschr.* 1983;61:99–102.

- 226.Sato K, Nohtomi K, Demura H, Takeuchi A, Kobayashi T et al. Saccharated ferric oxide (SFO)-induced osteomalacia: in vitro inhibition by SFO of bone formation and 1,25-dihydroxy-vitamin D production in renal tubules. *Bone* 1997;21:57–64.
- 227.Sato K & Shiraki M. Saccharated ferric oxide-induced osteomalacia in Japan: iron-induced osteopathy due to nephropathy. *Endocr J.* 1998;45:431–9.
- 228.Takeda Y, Komaba H, Goto S, Fujii H, Umezu M. et al. Effect of Intravenous Saccharated Ferric Oxide on Serum FGF23 and Mineral Metabolism in Hemodialysis Patients. *Am J Nephrol* 2011;33:421-6.
- 229.Prats M, Font R, Garcia C, Cabré C, Jarrod M, Veá AM. Effect of ferric carboxymaltose on serum phosphate and C-terminal FGF23 levels in non-dialysis chronic kidney disease patients: post-hoc analysis of a prospective study. *BMC Nephrol.* 2013;14:167.
- 230.Schaefer B, Würtinger P, Finkenstedt A, et al. Choice of high-dose intravenous iron preparation determines hypophosphatemia risk. *PLoS ONE* 2016;11:e0167146
- 231.Hryszko T, Rydzewska-Rosolowska A, Brzoski S, Koc-Zorawska E, Mysliwiec M: Low molecular weight iron dextran increases fibroblast growth factor-23 concentration together with parathyroid hormone decrease in hemodialyzed patients. *Ther Apher Dial* 2012, 16:146–51.
- 232.Wolf M, Koch TA, Bregman DB. Effects of iron deficiency anemia and its treatment on fibroblast growth factor 23 and phosphate homeostasis in women. *J Bone Miner Res* 2013;28:1793-803.
- 233.Hardy S. and Vandemergel X. Intravenous iron administration and hypophosphatemia in clinical practice. *Int J Rheumatol.* 2015;2015:1-6.
- 234.Anand G and Schmid C. Severe hypophosphataemia after intravenous iron administration. *BMJ Case Rep.* 2017;2017. pii:bcr2016219160.
- 235.Dahlerup JF, Jacobsen BA, van der Woode J, Bark LA, Thomsen LL, Lindgren S. High-dose fast infusion of parenteral iron isomaltoside is efficacious in inflammatory bowel disease patients with iron-deficiency anaemia without profound changes in phosphate or fibroblast growth factor 23. *Scand J Gastroenterol.* 2016;51(11):1332-8.
- 236.Muras-Szwedziak K and Nowicki M. Associations Between Intravenous Iron, Inflammation and FGF23 in Non-Dialysis Patients with Chronic Kidney Disease Stages 3-5. *Kidney Blood Pres Res.* 2018;43(1):143-51.

237. Roberts MA, Huang L, Lee D, MacGinley R, Troster SM et al. Effects of intravenous iron on fibroblast growth factor 23 (FGF23) in haemodialysis patients: a randomized controlled trial. *BMC Nephrol.* 2016;17(1):177.
238. Braithwaite V, Prentice AM, Doherty C, Prentice A. FGF23 is correlated with iron status but not with inflammation and decreases after iron supplementation: a supplementation study. *Int J Pediatr Endocrinol.* 2012;2012(1):27.
239. David V, Martin A, Isakova T, Spandling C, Qi L, Ramirez V, Zumbrennen-Bullogh KB, Sun CC, Lin HY, Babitt IL, Wolf M: Inflammation and functional iron deficiency regulate fibroblast growth factor 23 production. *Kidney Int* 2016;89:135-146
240. Ferro E, Visalli G, Curro M, La Rosa MA, Piraino B et al. HIF1 $\alpha$  and Glut1 receptor in transfused and untransfused thalassemic patients. *Br J Haematol.* 2016;174(5):824-6.
241. Payne RB. Renal tubular reabsorption of phosphate (TmP/GFR): indications and interpretation. *Ann Clin Biochem* 1998;35: 201-6.
242. Walton RJ and Bijvoet OL. Nomogram for derivation of renal threshold phosphate concentration." *Lancet* 1975;2:309–10.
243. World Health Organisation. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. *World Health Organ Tech Rep Ser* 843:1-129.
244. Wood JC, Enriquez C, Ghugre N, Otto-Duessel M, Aguilar M et al. MRI R2 and R2\* mapping accurately estimates hepatic iron concentration in transfusion-dependent thalassemia and sickle cell disease patients. *Blood* 2005;106(4):1460-5.
245. Angelucci E, Muretto P, Nicolucci A, Baronciani D, Erer B. et al. Effects of iron overload and hepatitis C virus positivity in determining progression of liver fibrosis in thalassemia following bone marrow transplantation. *Blood* 2002;100(1):17-21.
246. Olivieri NF and Brittenham GM. Iron-chelating therapy and the treatment of thalassemia. *Blood* 1997;89:739-61.
247. Karim MF, Ismail M, Hasan AM, Shekhar HU. Hematological and biochemical status of Beta-thalassemia major patients in Bangladesh: A comparative analysis. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res* 2016;10(1):7-12.
248. Zachou K, Arvaniti P, Gatselis NK, Azariadis K, Papadimou G. et al. Patients with Haemoglobinopathies and Chronic Hepatitis C: A Real Difficult to Treat Population in 2016? *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2017;9(1):e2017003.

249. Moukhadder HM, Halawi R, Cappellini MD, Taher AT. Hepatocellular carcinoma as an emerging morbidity in the thalassemia syndromes: A comprehensive review. *Cancer* 2017;123(5):751-8.
250. Waad-Allah S Mula-Abed, Huda S Al-Hashmi, Muhanna N Al-Muslani. Indicators of renal glomerular and tubular functions in patients with beta-thalassemia major. *Sultan Qaboos Univ Med J*. 2011;11(1):69-76.
251. Aldudak B, Karabay Bayazit A, Noyan A, Ozel A, Anarat A. et al. Renal function in pediatric patients with beta-thalassemia major. *Pediatr Nephrol* 2000;15(1-2):109-12.
252. Fayed A, El Nokeety MM, Heikal AA, Marzouk K, Hammad H. et al. Serum 25-hydroxyvitamin D level is negatively associated with serum phosphorus level among stage 3a-5 chronic kidney disease patients. *Nefrologia* 2018 May 26. pii: S0211-6995(18)30066-3. doi: 10.1016/j.nefro.2018.02.011. [Epub ahead of print]
253. Ishimura E, Nishizawa Y, Inaba M, Matsumoto N, Emoto M, et al. Serum levels of 1,25-dihydroxyvitamin D, 24,25-dihydroxyvitamin D, and 25-hydroxyvitamin D in nondialyzed patients with chronic renal failure. *Kidney Int*. 1999;55(3):1019-27.
254. Barreto Silvia MI, Cavalieri VV, Lemos CC, Klein MR, Bregman R. Body adiposity predictors of vitamin D status in nondialyzed patients with chronic kidney disease: a cross-sectional analysis in a tropical climate city. *Nutrition* 2017;33:240-7.
255. Dai B, David V, Ashayeb HM, Showkat A, Gyamlani G. et al. Assessment of 24,25(OH)<sub>2</sub>D levels does not support FGF23-mediated catabolism of vitamin D metabolites. *Kidney Int*. 2012;82:1061-70.
256. Wu S, Finch J, Zhong M, Slatopolsky E, Grieff M, Brown AJ. Expression of the renal 25-hydroxyvitamin D-24-hydroxylase gene: regulation by dietary phosphate. *Am J Physiol*. 1996;271(1 Pt 2):203-8.