

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ-ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ
ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΟ ΤΜΗΜΑ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Μ.Α ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ

ΠΑΝΕΠ. ΕΤΟΣ 2008-2009

**ΜΕΛΕΤΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΣΤΙΚΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ,
ΟΣΤΕΟΚΛΑΣΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ
ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ
ΣΥΜΠΑΓΕΙΣ ΟΓΚΟΥΣ ΚΑΙ ΟΣΤΙΚΕΣ ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΙΣ**

ΜΟΥΝΤΖΙΟΥ Σ. ΙΩΑΝΝΗ
ΠΑΘΟΛΟΓΟΥ-ΟΓΚΟΛΟΓΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΟΥ ΕΘΝΙΚΟΥ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

ΑΘΗΝΑ 2009

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Χ. ΣΤΕΦΑΝΑΔΗΣ

ΑΝΤΙΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Μ.Α. ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ

Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μαυρικάκης Μύρων, Ομότιμος Καθηγητής (Επιβλέπων)

Συρίγος Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Μπάμιας Αριστοτέλης, Επίκουρος Καθηγητής

Η ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|---|----|
| ΠΡΟΛΟΓΟΣ..... | 11 |
| ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ..... | 14 |
| ΜΕΡΟΣ 1ο (ΓΕΝΙΚΟ) | |
| 1. ΣΚΕΛΕΤΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΟΣΤΙΚΟΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ | |
| 1.1 Εισαγωγή..... | 17 |
| 1.2 Ρύθμιση της σκελετικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης..... | 17 |
| 1.3 Οστεοβλάστης..... | 21 |
| 1.4 Οστεοκλάστης..... | 24 |
| 1.5 Ρυθμιστές της λειτουργίας των οστεοκυττάρων..... | 28 |
| 1.6 Οστική διαμόρφωση και αναδιαμόρφωση..... | 33 |
| | |
| 2. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΟΣΤΙΚΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ - ΔΕΙΚΤΕΣ ΟΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ (ΑΝΑΒΟΛΙΣΜΟΥ-ΚΑΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ) | |
| 2.1 Οστικός σχηματισμός..... | 40 |
| 2.2 Οστική απορρόφηση..... | 42 |
| 2.3 Δείκτες οστικού σχηματισμού..... | 43 |
| 2.4 Δείκτες οστικής απορρόφησης..... | 47 |
| 2.5 Συνδέτης (RANKL) και Υποδοχέας (RANK) του πυρηνικού παράγοντα κΒ..... | 53 |
| 2.6 Οστεοπροτεγερίνη..... | 59 |

3. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΟΣΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΩΝ ΣΕ ΚΑΚΟΗΘΕΙΣ

ΝΕΟΠΛΑΣΙΕΣ

- 3.1 Ιστορική εξέλιξη.....62
- 3.2 Παθοφυσιολογία οστικού τροπισμού σε κακοήθη νοσήματα.....63
- 3.3 Ρυθμιστές του άξονα RANKL/RANK/OPG.....68

4. ΔΙΦΩΣΦΟΝΙΚΑ ΑΛΑΤΑ ΚΑΙ Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥΣ ΣΤΟΝ ΟΣΤΙΚΟ

ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ

- 4.1 Χημική δομή και βιολογικές ιδιότητες.....72
- 4.2 Δράση των διφωσφονικών στις οστικές μεταστάσεις.....74
- 4.3 Ενδείξεις χορήγησης διφωσφονικών σε κακοήθη νοσήματα.....77

ΜΕΡΟΣ 2ο (ΕΙΔΙΚΟ)

1. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΥΠΟΘΕΣΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

- 1.1 Δεδομένα.....79
- 1.2 Υπόθεση εργασίας.....82
- 1.3 Σκοπός της μελέτης.....82

| | |
|--|-----|
| 2. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | |
| 2.1 Πληθυσμός Μελέτης..... | 83 |
| 2.2 Δείκτες Οστικού μεταβολισμού και Πειραματική Διαδικασία..... | 85 |
| 2.3 Αρχική αξιολόγηση - παρακολούθηση ασθενών..... | 86 |
| 2.4 Στατιστικός Σχεδιασμός..... | 87 |
| 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | |
| 3.1 Χαρακτηριστικά Πληθυσμού..... | 90 |
| 3.2 Αρχικές τιμές δεικτών..... | 93 |
| 3.3 Μεταβολές δεικτών μετά τη θεραπεία με διφωσφονικά..... | 103 |
| 3.4 Μεταβολές δεικτών και σκελετική νοσηρότητα..... | 103 |
| 3.5 Μεταβολές δεικτών και διάστημα ελεύθερο προόδου νόσου..... | 105 |
| 3.6 Μεταβολές δεικτών και συνολική επιβίωση..... | 106 |
| 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... | 107 |
| 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ..... | 119 |
| 6. SUMMARY..... | 121 |
| 7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 125 |

Πρόλογος

Το παρόν πόνημα είναι ο καρπός μιας πενταετούς προσπάθειας που ξεκίνησε τον Μαΐο του 2004 στο φιλόξενο περιβάλλον του Τμήματος Έρευνας του 251 Γενικού Νοσοκομείου Αεροπορίας και κάτω από την ακαδημαϊκή καθοδήγηση και αρωγή της Θεραπευτικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Ήταν η περίοδος που ως ειδικευόμενος της Παθολογικής Ογκολογίας κι έχοντας αποκτήσει μια πρώτη επαφή με την έρευνα μέσα από τον μεταπτυχιακό τίτλο σπουδών στη μεταφραστική έρευνα στην Ογκολογία που είχα αποκτήσει στο Παρίσι μου δόθηκε η ευκαιρία να ασχοληθώ με έναν τομέα ιδιαίτερα δύσκολο αλλά συνάμα και “γοητευτικό”: Αυτόν της παθοφυσιολογίας και της μοριακής βιολογίας της μεταστατικής νόσου. Μετά από αρκετά χρόνια προσπαθειών, κάποιων απογοητεύσεων αλλά κυρίως σημαντικών εμπειριών το εγχείρημα ολοκληρώθηκε, δίνοντας στον γράφοντα αλλά και –ελπίζω- στους αναγνώστες μια βαθύτερη γνώση της Μοριακής Ογκολογίας, που αποτελεί πλέον, όχι απλά ζητούμενο αλλά προαπαιτούμενο για την ολοκληρωμένη άσκηση του λειτουργήματος της Παθολογικής Ογκολογίας.

Από τη θέση αυτή θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόθερμα:

Τον Καθηγητή Κο Μελέτιο-Αθανάσιο Δημόπουλο, Παθολόγο Ογκολόγο, Διευθυντή της Θεραπευτικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω την παρούσα διατριβή, καθώς και τη συνεχή και αμέριστη στήριξη και καθοδήγηση στην προσπάθειά μου αυτή.

Τον Διευθυντή του τμήματος Έρευνας του 251 Γενικού Νοσοκομείου Αεροπορίας κι Επίκουρο Καθηγητή της Θεραπευτικής Κλινικής, Αιματολόγο Κο Τέρπο Ευάγγελο, που μου εμπιστεύθηκε την εκπόνηση της διατριβής και μου παρείχε το χώρο και την υλικοτεχνική υποδομή για το πειραματικό σκέλος της μελέτης. Κυρίως όμως τον ευχαριστώ για τη συνεχή στήριξη, συμπαράσταση, καθοδήγηση κι εμπιστοσύνη που επέδειξε προς το πρόσωπό μου.

Τα μέλη της τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής Κο Μαυρικάκη Μύρωνα, Ρευματολόγο, Ομότιμο Καθηγητή της Θεραπευτικής Κλινικής, Κο Συρίγο Κωνσταντίνο, Παθολόγο Ογκολόγο, Αναπληρωτή Καθηγητή και τον Κο Μπάμια Αριστοτέλη, Παθολόγο Ογκολόγο , Επίκουρο Καθηγητή Θεραπευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, για τη στήριξή τους στην προσπάθειά μου.

Τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής για την παρουσία τους και την κρίση της παρούσας διατριβής.

Την Εταιρεία Ογκολόγων-Παθολόγων Ελλάδος (ΕΟΠΕ) για τη χρηματοδότηση με Υποτροφία Εσωτερικού ενός σημαντικού τμήματος της αγοράς των αντιδραστηρίων που απαιτούσε το πειραματικό σκέλος της μελέτης.

Τους ίδιους τους ασθενείς και τα μέλη των οικογενειών τους για τη συμμετοχή τους στη μελέτη και τη συναίνεσή τους για τις διαδοχικές αιμοληψίες που απαιτούσε το πειραματικό πρωτόκολλο. Χωρίς τη δική τους ευγενή προθυμία και συγκατάθεση τίποτε από όλα αυτά δε θα ήταν εφικτό.

Τέλος, την οικογένειά μου και τους φίλους μου που μου παρέχουν αμέριστα τη στήριξή τους και κυρίως την αγάπη τους όλα αυτά τα χρόνια.

Αθήνα, Αύγουστος 2009

Αφιερώνεται σε όλους τους καρκινοπαθείς ασθενείς
με την ευχή να προσθέσει ένα ακόμη μικρό λιθαράκι
στο τείχος της γνώσης που θα φέρει την ελπίδα.

Σε Εσένα

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ (με τη σειρά εμφάνισης στο κείμενο)

PTH: Parathyroid Hormone

PTHrP: Parathyroid Hormone-related Peptide

IHH: Indian Hedgehog

BMP: Bone Morphogenetic Protein

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

DKK-1: Dickkopf-1

TNF- α : Tumour Necrosis Factor-alpha

OC: Osteocalcin

GH: Growth Hormone

TSH: Thyroid Stimulating Hormone

IL-1,4,6,12,13,17,18: Interleukins 1,4,6,12,13,17,18

IGF: Insulin Growth Factor

IGF-BP: Insulin Growth Factor Binding Protein

TGF- β : Transforming Growth Factor-beta

PDGF: Platelet-Derived Growth Factor

CFU-GM: Colony-Forming Unit, Granulomonocyte lineage

M-CSF: Monocyte-Colony Stimulating Factor

IFN- γ : Interferon gamma

BSU: Bone Structural Unit

OPN: Osteopontin

PYD: Pyridinoline

DPD: Deoxypyridinoline

NTX: N-telopeptide, collagen type I

CTX: C-telopeptide, collagen type I

TRACP-5b: 5b isoenzyme of Tartrate-Resistant Acid Phosphatase

PICP: C-telopeptide, procollagen type I

PINP: N-telopeptide, procollagen type I

bALP: Alkaline phosphatase, bone isoenzyme

sRANKL: Soluble Receptor Activator of Nuclear Factor kappa-B

NFκB: Nuclear Factor kappa-B

TRAF6: TNF Receptor Associated Factor 6

NFAT-1c: Nuclear Factor Activated T-lymphocytes 1c

OPG: Osteoprotegerin

PGE2: Prostaglandin E2

LHRH: Luteneizing Hormone-Related Hormone

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

EOsD: Extend Of Skeletal Disease

95% CI: 95% Confidence Intervals

IQR: InterQuartile Range

ANOVA: Analysis Of Variance

PS: Performance Status

PSc: Pain Score

HR: Hazard Ratio

SRE: Skeletal Related Events.

1. ΣΚΕΛΕΤΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΟΣΤΙΚΟΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ

1.1 Εισαγωγή

Ο ανθρώπινος σκελετός χαρακτηρίζεται από δομικές και μεταβολικές λειτουργίες. Ο στηρικτικός του ρόλος είναι πολύ σημαντικός για τη στάση και τη βάδιση, την αναπνοή και την προστασία των εσωτερικών οργάνων, ενώ παράλληλα βρίσκεται σε στενή ανατομική συσχέτιση με το αιμοποιητικό σύστημα του μυελού των οστών. Οι μεταβολικές του λειτουργίες αφορούν κυρίως το ρόλο του ως αποθήκη ασβεστίου, φωσφόρου και άνθρακα, ενώ μπορεί παράλληλα να λειτουργήσει ως ρυθμιστικό διάλυμα για την ανταλλαγή υδρογονοκατιόντων και τη ρύθμιση της οξεοβασικής ισορροπίας. Η τεράστια ανόργανη (μεταλλούχος) επιφάνεια του σκελετού μπορεί να συνδέσει τοξίνες και βαρέα μέταλλα, μειώνοντας έτσι την ικανότητά τους να προκαλέσουν κυτταρική βλάβη.

1.2 Ρύθμιση της σκελετικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης

Οι διαδικασίες της κυτταρικής διαφοροποίησης που δίνουν γένεση στο σκελετό ρυθμίζονται από γονίδια τα οποία πρώτα εγκαθιδρύουν το πρότυπο της σκελετικής δομής με τη μορφή του χόνδρου και του μεσεγχύματος και ακολούθως το αντικαθιστούν με οστόν μέσω της διαδικασίας της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών. Ο οστίτης ιστός μπορεί να σχηματιστεί απευθείας από το μεσέγχυμα (μεμβρανώδη οστά) ή από την επιφάνεια του χόνδρου που έχει ασβεστοποιηθεί (χονδρογενή οστά).

Ο αρχικός σχηματισμός του σκελετού, πρώτα ως χόνδρος και ακολούθως ως οστούν, απαιτεί τη διαδοχική ενεργοποίηση ενός μεγάλου αριθμού ρυθμιστών της οστεογένεσης. Γονίδια της υπεροικογένειας Homeobox είναι υπεύθυνα για την αρχική διαφοροποίηση όπως και για τη διατήρηση της ανάπτυξης των σκελετικών ιστών [1]. Μια σύνθετη αλληλεπίδραση ανάμεσα στο γονίδιο το σχετιζόμενο με τη παραθορμόνη (PTHrP) και το γονίδιο IHH (Indian Hedgehog) είναι ιδιαίτερα σημαντική για την ανάπτυξη και την αυτορρύθμιση της αυξητικής επιφάνειας των χόνδρων [2]. Οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (BMPs) διεγείρουν τον οστικό σχηματισμό αλλά η ομαλή διαδοχή της σκελετικής ανάπτυξης απαιτεί να υπάρχουν επίσης περίοδοι κατά τις οποίες η ανάπτυξη αναστέλλεται ή ο “ανεπιθύμητος” οστίτης ιστός απομακρύνεται. Αναστολείς των μορφογενετικών πρωτεϊνών, όπως η noggin παίζουν εδώ ένα σημαντικό ρόλο [3].

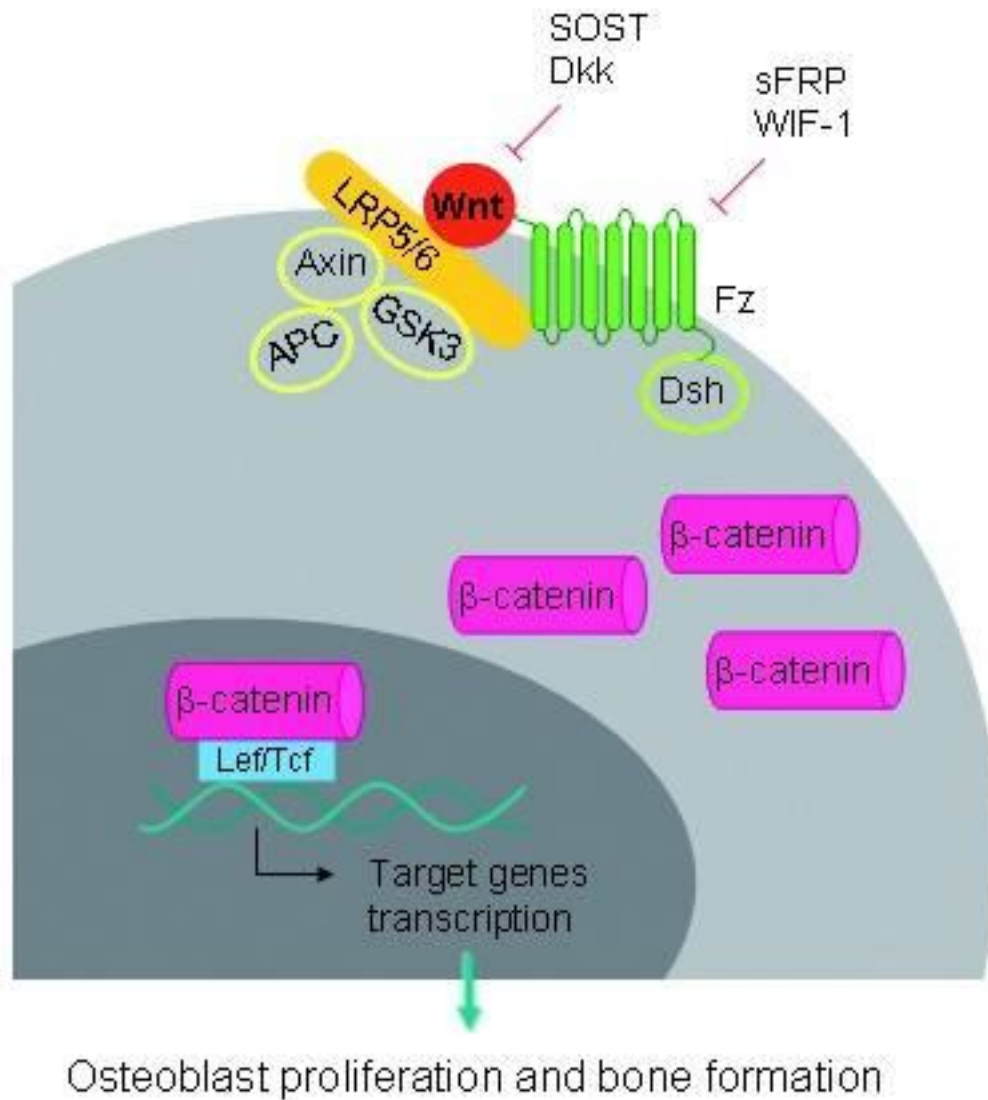
Είναι αξιοσημείωτο ότι το πρωτεϊνικό προϊόν ενός και μόνο γονιδίου βρέθηκε να είναι πολύ σημαντικό για την αρχική διαφοροποίηση των οστεοβλαστών [4]. Η αναστολή αυτού του μεταγραφικού παράγοντα του ειδικού για τους οστεοβλάστες που ονομάζεται Runx-2 ή Cbfa-1 οδηγεί στην ανάπτυξη ενός πλήρους χόνδρινου σκελετού αλλά όχι σε οστέινο σκελετό. Κατά συνέπεια, τα πειραματόζωα πεθαίνουν κατά τον τοκετό διότι λόγω του ιδιαίτερα μαλακού θωρακικού κλωβού δεν μπορούν να υποστηρίξουν την αναπνευστική λειτουργία. Η ετερόζυγος μετάλλαξη του γονιδίου οδηγεί στον άνθρωπο σε μια σπάνια γενετική ασθένεια που ονομάζεται κλειδοκρανική δυσπλασία [5]. Η σκελετική

ανάπτυξη απαιτεί επίσης το σχηματισμό αιμοφόρων αγγείων στο οστόν και η οδός μεταγωγής σήματος του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) είναι προφανώς ιδιαίτερα σημαντική για τη μετατροπή του αγγειακού χόνδρου σε υψηλής αγγείωσης οστόν [6].

Το μοριακό μονοπάτι Wnt (εικόνα 1) αποτελεί επίσης ένα πολύ σημαντικό ρυθμιστή της σκελετικής ανάπτυξης και μάζας, εργαζόμενο παράλληλα με τη διέγερση της γονιδιακής έκφρασης του Runx-2 ογκογονιδίου [7]. Επιπρόσθετα, το μονοπάτι αυτό συμπεριλαμβάνει ένα σημαντικό αριθμό ρυθμιστικών παραγόντων οι οποίοι αλληλεπιδρούν με αυξητικούς παράγοντες που σχετίζονται με τη σκελετική αύξηση, όπως η βήτα-κατενίνη και ο BMP-2 [8]. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού Wnt διαμέσου του υποδοχέα του LRP-5 (εικόνα 1) μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της οστικής μάζας όχι μόνο με την ενίσχυση του σχηματισμού νέου οστού αλλά και με την αναστολή της οστικής απορρόφησης καθώς και της λιπυνογένεσης διότι έτσι τα προγονικά στρωματικά κύτταρα του μυελού έχουν περισσότερες πιθανότητες να διαφοροποιηθούν σε οστεοβλάστες αντί για λιποκύτταρα [9].

Το ίδιο το μονοπάτι Wnt με τη σειρά του ρυθμίζεται από άλλα πρωτεϊνικά συστήματα. Για παράδειγμα, η σκληροστίνη, η οποία εκφράζεται στα οστεοκύτταρα, είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής του οστικού σχηματισμού [10]. Επιπλέον, μπορεί να συνδεθεί με τον υποδοχέα LRP-5 και να εμποδίσει την ενεργοποίηση του συμπλέγματος Wnt [11]. Αυτό με τη σειρά του μπορεί να οδηγήσει σε αναστολή του οστικού σχηματισμού που εξαρτάται από τις μορφογενετικές πρωτεΐνες BMPs [12]. Επιπλέον, η οικογένεια μορίων DKK, και

κυρίως ο DKK-1 (Dickkopf-1), αναστέλλουν το μονοπάτι Wnt με συναγωνιστική αναστολή του υποδοχέα LRP-5/6 [13]. Η μεταγωγή σήματος μέσω Wnt μπορεί επίσης να μπλοκαρισθεί από άλλες πρωτεΐνες όπως είναι οι διαλυτές “frizzle” πρωτεΐνες που συνδέονται με τους συνδέτες του Wnt (εικόνα 1) [14].



Εικόνα 1: Το μοριακό μονοπάτι Wnt και οι ρυθμιστές της οστεοβλαστογένεσης

DKK-1 : Dickkopf-1, Fz: frizzle proteins, LRP5/6: Wnt pathway protein receptor

Κάθε μεταβολή στο μονοπάτι Wnt μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στη σκελετική ομοιοστάση [15]. Για παράδειγμα, γενετικές διαταραχές στις οποίες η παραγωγή σκληροστίνης αυξάνεται σχετίζονται με ελαττωμένη οστική μάζα [16] ενώ αντισώματα έναντι της σκληροστίνης μπορούν να αυξήσουν τον οστικό σχηματισμό [17]. Οι αναβολικές επιδράσεις της παραθορμόνης και της μηχανικής φόρτισης μπορεί να οδηγήσουν σε ενίσχυση του Wnt σήματος δια μέσου απενεργοποίησης της σκληροστίνης μέσω του υποδοχέα LRP-5 [18]. Μεταλλάξεις που ενεργοποιούν τον υποδοχέα LRP-5 μπορούν να προκαλέσουν σοβαρή οστεοπόρωση [19]. Απενεργοποίηση των μελών της οικογένειας DKK μπορεί να αυξήσει την οστική μάζα [20]. Το μονοπάτι Wnt είναι επίσης ένας μείζων ρυθμιστής του μεταβολισμού των αρθρικών χόνδρων και η ενεργοποίηση του DKK-1 από τον παράγοντα νέκρωσης των όγκων-άλφα (TNF-alpha) οδηγεί σε διάβρωση των αρθρικών χόνδρων που είναι ιδιαίτερα χαρακτηριστική στη ρευματοειδή αρθρίτιδα [21].

1.3 Οστεοβλάστης (εικόνα 2):

Οι οστεοβλάστες προέρχονται από μεσεγχυματογενή κύτταρα τα οποία είναι αρχικά πολυδύναμα και τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν σε μύες, λιποκύτταρα, χόνδρο ή ινώδη συνδετικό ιστό. Φαίνεται ότι υπάρχει ένας υποπληθυσμός πρόδρομων κυττάρων τα οποία έχουν μερικώς διαφοροποιηθεί και μπορούν να εξελιχθούν σε οστεοβλάστες. Αυτά τα “δεσμευμένα προγονικά οστεοβλαστικά κύτταρα” είναι παρόντα στο περιόστεο και στο μυελικό στρώμα.

In vitro μελέτες έχουν δείξει ότι αυτά τα κύτταρα μπορούν επίσης να εξελιχθούν σε λιποκύτταρα κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες και ότι αυτός μπορεί να είναι ένας μηχανισμός ελαττωματικού οστικού σχηματισμού κατά τη γήρανση [22].

Οι προ-οστεοβλάστες σε κυτταρικές καλλιέργειες έχουν την ικανότητα παραγωγής κολλαγόνου και αλκαλικής φωσφατάσης ακολουθούμενης από τη σύνθεση οστεοκαλσίνης (OC), μιας πρωτεΐνης που περιέχει γαμμα-καρβοξυλιωμένο γλουταμικό οξύ και το οποίο παράγεται από κύτταρα της οστεοβλαστικής σειράς [23]. In vivo, οι πλήρως διαφοροποιημένοι οστεοβλάστες εκφράζουν γονίδια και για τις τρεις από αυτές τις πρωτεΐνες αλλά και για άλλα εξειδικευμένα πεπτιδία όπως η οστεοποντίνη και η οστική σιαλοπρωτεΐνη.

Οι πλήρως διαφοροποιημένοι οστεοβλάστες προσανατολίζονται κατά τέτοιο τρόπο ώστε οι κολλαγονούχες και μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες να εναποτίθενται στην οστική επιφάνεια σε μορφές κατάλληλες για επιμετάλλωση. Η επιμετάλλωση καθυστερεί αρκετές μέρες, πράγμα το οποίο επιτρέπει τη δημιουργία δεσμών μεταξύ των ινών κολλαγόνου και την ενίσχυσή τους.

Καθώς η παραγωγή κολλαγονούχων και μη πρωτεϊνών ολοκληρώνεται, μερικοί από τους οστεοβλάστες “θάβονται” μέσα στο δίκτυο και μετασχηματίζονται σε οστεοκύτταρα [24]. Οι οστεοβλάστες και τα οστεοκύτταρα συνδέονται το ένα με το άλλο με πολλές κυτταρικές διεργασίες, ενώ το δίκτυο των συνδεόμενων και αλληλεπιδρώντων κυττάρων είναι προφανώς πολύ σημαντικό για την αντίληψη των μηχανικών φορτίσεων που δέχεται το οστό. Η πλειοψηφία των οστεοβλαστών είτε παραμένει στην οστική επιφάνεια και επεκτείνεται με τη μορφή των επίπεδων και γραμμοειδών κυττάρων ή

εισέρχονται σε απόπτωση, δηλαδή σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Τα γραμμοειδή κύτταρα παραμένουν συνδεδεμένα στα οστεοκύτταρα τα οποία μπορεί να είναι απαραίτητα για τη μετάδοση του σήματος έναρξης της οστικής αναδιαμόρφωσης.

Οι οστεοβλάστες είναι λειτουργικά και μορφολογικά ετερογενείς [25]. Κατά τη διάρκεια των σύντομων φάσεων του οστικού σχηματισμού μπορεί να είναι κυλινδρικοί σε σχήμα, με άφθονο ενδοπλασματικό δίκτυο και να συνθέτουν κολλαγόνο ταχύτατα. Όταν ο ρυθμός οστικού σχηματισμού είναι βραδύτερος, γίνονται επίπεδοι και λιγότερο ενεργοί μεταβολικά. Οι οστεοβλάστες έχουν επίσης υποδοχείς για παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την οστική αναδιαμόρφωση και παράγουν πολλούς ρυθμιστές της οστικής ανάπτυξης. Οι υποδοχείς αυτοί περιλαμβάνουν αυτούς της παραθορμόνης (PTH), καλσιτριόλης, γλυκοκορτικοειδών, ορμονών του φύλου, της αυξητικής (GH) και της θυρεοτρόπου (TSH) ορμόνης. Υπάρχουν επίσης υποδοχείς για την Ιντερλευκίνη-1 (IL-1), τον παράγοντα νέκρωσης των όγκων άλφα (TNF- α), τις προσταγλανδίνες, τον παράγοντα τον ομοιάζοντα με ινσουλίνη (IGF), τον παράγοντα μετατροπής των όγκων βήτα (TGF- β), τις οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες, τους ινοβλαστικούς αυξητικούς παράγοντες και τον παράγοντα αύξησης των αιμοπεταλίων (PDGF). Ουσίες που παράγονται από τους οστεοβλάστες και πιθανά δρουν τοπικά περιλαμβάνουν προσταγλανδίνες, Ιντερλευκίνη 6 (IL-6), IGF και τις αντίστοιχες συνδετικές τους πρωτεΐνες (IGF-BPs).

Αν και ένας πολύ χαμηλός αριθμός κυττάρων της οστεοβλαστικής θεωρείται ότι υπάρχει στο περιφερικό αίμα, ο αριθμός τους μπορεί να υποεκτιμάται [26]. Στους ενήλικες, τα κύτταρα που είναι θετικά για οστεοκαλσίνη ή ειδική των οστών αλκαλική φωσφατάση ανιχνεύονται στο περιφερικό αίμα (1 με 2% των μονοπύρηνων κυττάρων), ενώ τα επίπεδα ανίχνευσης είναι έως και πενταπλάσια σε εφήβους που βρίσκονται σε φάση σκελετικής ανάπτυξης [26]. Κατά συνέπεια, ενδέχεται να υπάρχει στην κυκλοφορία μια σημαντική συνιστώσα της διαδικασίας του οστικού σχηματισμού, αν και δεν έχει αποδειχθεί ότι αυτά τα κύτταρα μπορούν να επαναποικίσουν το οστόν και να ξεκινήσουν την οστεογενετική διαδικασία.

1.4 Οστεοκλάστες (εικόνα 2)

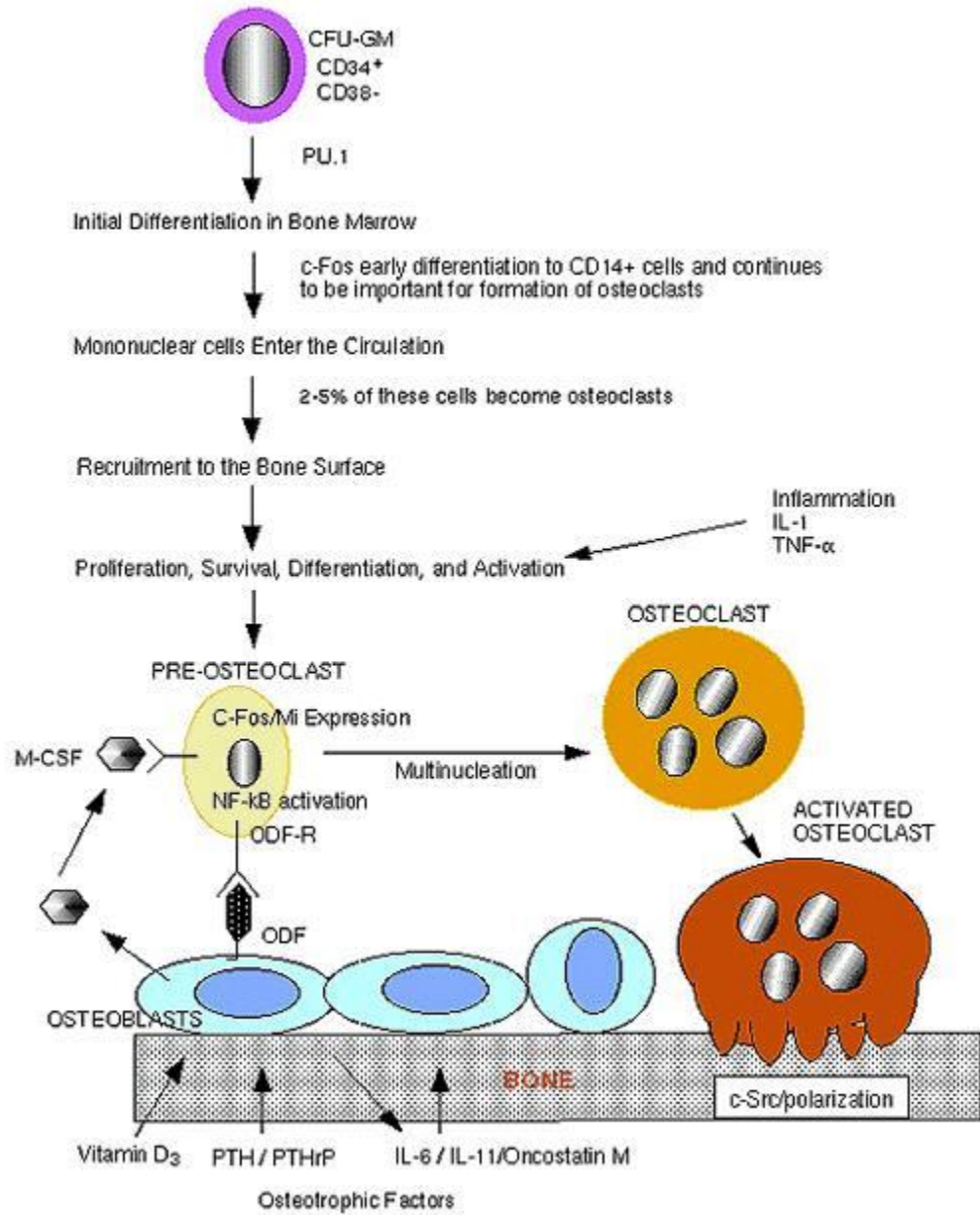
Οι οστεοκλάστες είναι μεγάλα, πολυπύρρηνα κύτταρα τα οποία απορροφούν οστόν διαλύοντας τα ανόργανα συστατικά (άλατα) και αποδομώντας το οστεοειδές. Οι ενεργοί οστεοκλάστες διαθέτουν συνήθως 2-5 πυρήνες ή και περισσότερους. Έχουν άφθονο κυτταρόπλασμα, πολλαπλά συστήματα Golgi και πολλά μιτοχόνδρια. Οι ώριμοι ενεργοί οστεοκλάστες συνδέονται σταθερά σε μια επιφανειακή ζώνη της οστικής επιφάνειας η οποία στερείται σχετικά υποκυτταρικών οργανιδίων και η οποία ονομάζεται “διαυγής” ζώνη ή ζώνη “σφραγίδας”. Οι οστεοκλάστες συχνά ανευρίσκονται σε ομάδες, είτε στην οστική επιφάνεια όπου δημιουργούν τα βοθρία του Howship είτε βαθύτερα

στις οστικές δοκίδες του φλοιού όπου δημιουργούν τα κανάλια του Havers. Ο χρόνος ζωής ενός οστεοκλάστη διαρκεί 3-4 εβδομάδες μέχρις ότου αρχίσουν να χάνουν τους πυρήνες τους μέσα από αποπτωτικούς μηχανισμούς καθώς καθίστανται ανενεργοί.

Οι οστεοκλάστες σχετίζονται με τα μονοκύτταρα/μακροφάγα και προέρχονται από αποικίες κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (CFU-GM) (εικόνα 2) [27]. Ο παράγων διέγερσης M-CSF είναι απαραίτητος για την έναρξη της διαδικασίας της διαφοροποίησης των οστεοκλαστών. Οι προγονικοί οστεοκλάστες είναι παρόντες στο μυελό, το σπλήνα και σε μικρούς αριθμούς στην κυκλοφορία. Κατά τη διάρκεια της σκελετικής ανάπτυξης οι πρόδρομες μορφές των οστεοκλαστών πιθανότατα μεταναστεύουν στα οστά από εξωμυελικές αιμοποιητικές εστίες. Οι οστεοβλάστες μπορούν επίσης να αποτελέσουν πηγή M-CSF που απαιτείται για την οστεοκλαστογένεση. Ένα άλλο παράδειγμα είναι η Ιντερλευκίνη 18 (IL-18) η οποία βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία στις οστεοβλατικές κυτταρικές σειρές. Πολλές ορμόνες και τοπικοί παράγοντες μπορούν επίσης να δράσουν στους οστεοβλάστες για να ευοδώσουν ή να αναστείλλουν την οστεοκλαστογένεση (εικόνα 2). Οι ενεργοποιητές περιλαμβάνουν την καλσιτριόλη, την PTH, τον TNF α , τις προσταγλανδίνες E2, IL-1, IL-6, IL-11 και IL-17. Οι ανασταλτές περιλαμβάνουν διάφορες ιντερλευκίνες (IL-4, IL-12, IL-13, IL-18). Η ιντερφερόνη γάμμα (IF- γ) φαίνεται να ασκεί ένα απευθείας ανασταλτικό αποτέλεσμα στη λειτουργία των οστεοκλαστών [28].

Σημαντικά κυτταρικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην ωρίμανση και τη λειτουργία των οστεοκλαστών περιλαμβάνουν τους υποδοχείς ιντεγκρίνης της

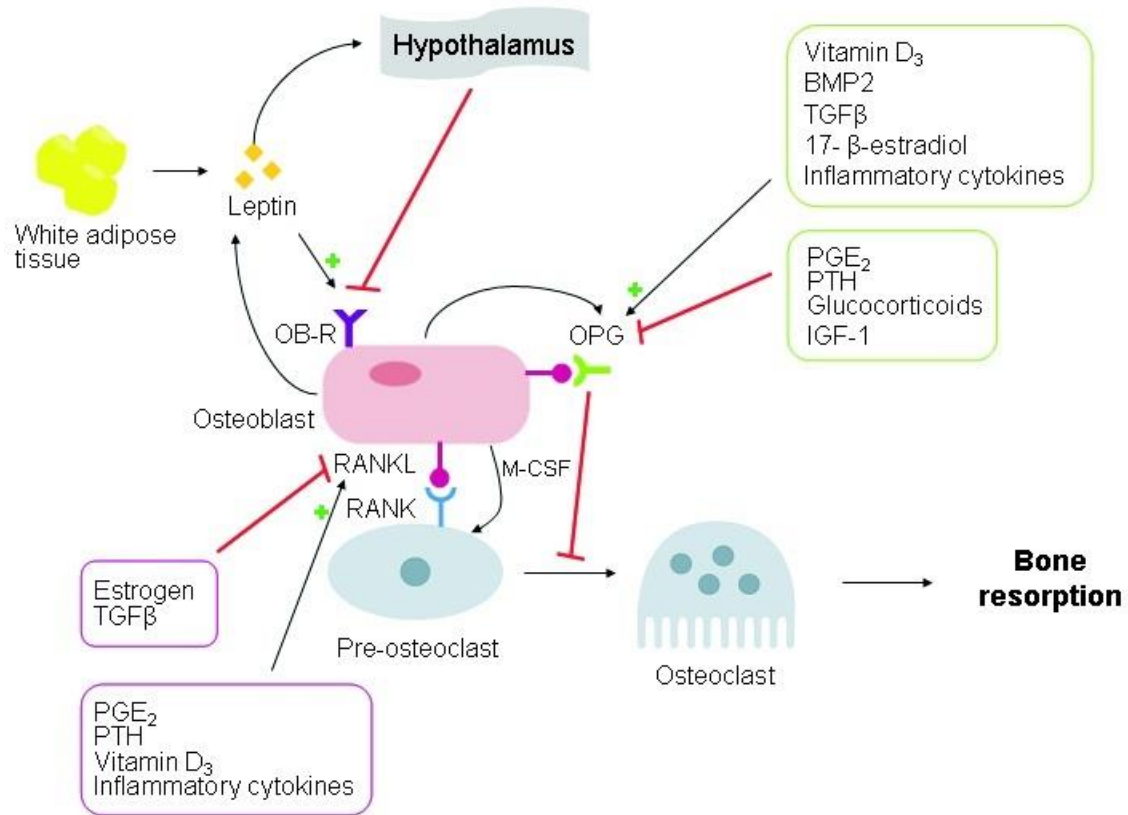
ζώνης “σφραγίδας” καθώς και των κολλαγενασών και των καθεψινών K για την αποδόμηση της θεμέλιας ουσίας του οστεοειδούς [29]. Το τελικό βήμα ενεργοποίησης πιθανότατα περιλαμβάνει τη σύνδεση ιντεγκρινών σε πρωτεΐνες της επιμεταλλωμένης οστικής επιφάνειας οι οποίες είτε είναι ήδη παρούσες είτε παράγονται από τους οστεοκλάστες [30]. Ο χρόνος δράσης τους είναι σημαντικά περιορισμένος από τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο των πυρήνων τους. Τα οιστρογόνα και ο TGF-β μπορούν να ελαττώσουν την οστική αποδόμηση με τη διέγερση της απόπτωσης των οστεοκλαστών [31].



Εικόνα 2: Διαφοροποίηση και ωρίμανση οστεοβλαστών και οστεοκλαστών.

1.5 Ρυθμιστές της λειτουργίας των οστεοκυττάρων

Ρύθμιση της λειτουργίας των οστεοκυττάρων παρατηρείται τόσο σε συστηματικό όσο και σε τοπικό επίπεδο. Οι κύριοι συστηματικοί ρυθμιστές είναι οι σχετιζόμενες με το μεταβολισμό του ασβεστίου ορμόνες Παραθορμόνη (PTH) και καλσιτριόλη, ενώ η καλσιτονίνη παίζει λιγότερο σημαντικό ρόλο (εικόνα 3).



Εικόνα 3: Ρυθμιστές της λειτουργίας των οστεοκυττάρων.

1.5.1 Παραθορμόνη

Η Παραθορμόνη (PTH) είναι ο πιο σημαντικός ρυθμιστής της ομοιόστασης του Ασβεστίου. Διατηρεί φυσιολογικές τις συγκεντρώσεις του ασβεστίου στον ορό με τη διέγερση της οστικής απορρόφησης, την αύξηση της νεφρικής σωληναριακής επαναρρόφησης ασβεστίου και την αυξημένη νεφρική παραγωγή καλσιτριόλης. Η PTH διεγείρει τον οστικό σχηματισμό όταν χορηγείται διαλειπόντως αλλά ελαττώνει τη σύνθεση του κολλαγόνου σε υψηλές συγκεντρώσεις [32]. Αντίθετα, διεγείρει την οστική επαναρρόφηση όταν χορηγείται συνεχώς κινητοποιώντας τη γονιδιακή έκφραση των οστεοκλαστών και αυξάνοντας την παραγωγή διαφόρων τοπικών παραγόντων συμπεριλαμβανομένων των IL-6, IGF-1 και των προσταγλανδινών [32].

1.5.2 Καλσιτριόλη

Η καλσιτριόλη αυξάνει την εντερική απορρόφηση ασβεστίου και φωσφόρου και με αυτόν τον τρόπο προάγει την επιμετάλλωση των οστών. Σε υψηλές συγκεντρώσεις και κάτω από συνθήκες έλλειψης ασβεστίου και φωσφόρου διεγείρει επίσης την οστική απορρόφηση και με αυτό τον τρόπο βοηθά στην διατήρηση της προμήθειας αυτών των ιόντων προς άλλους ιστούς. Η καλσιτριόλη διεγείρει την οστεοκλαστογένεση σε κυτταρικές καλλιέργειες αλλά τα ζώα που στερούνται Βιταμίνης D έχουν σχετικά ομαλή σκελετική ανάπτυξη και αναδιαμόρφωση [33].

1.5.3 Καλσιτονίνη

Η καλσιτονίνη αναστέλλει τους οστεοκλάστες και κατά συνέπεια την οστική απορρόφηση σε φαρμακολογικές δόσεις. Εντούτοις, ο φυσιολογικός της ρόλος είναι ελάχιστος στον ενήλικα σκελετό και οι επιδράσεις της προσωρινές, κυρίως λόγω της υπορρύθμισης του κυτταρικού της υποδοχέα [34]. Επομένως, ο ρόλος της στη θεραπεία της υπερασβεστιαϊμίας λόγω αυξημένης οστικής απορρόφησης είναι περιορισμένος και παροδικός.

1.5.4 Αυξητική Ορμόνη (GH) και Αυξητικός παράγων της Ινσουλίνης (IGF)

Το σύστημα GH/IGF-1 καθώς και ο IGF-2 είναι σημαντικά για τη σκελετική ανάπτυξη, ιδίως στους συζευκτικούς χόνδρους και την χονδρογενή οστεογένεση. Οι δράσεις των IGF επηρεάζονται σε σημαντικό βαθμό και από τη διαθεσιμότητα των συνδετικών τους πρωτεϊνών IGF-BPs. Η IGF-BP-3 είναι ο πιο σημαντικός καθοριστής της συγκέντρωσης του IGF στον ορό, ενώ ο IGF-BP-5 μπορεί να διευκολύνει και ο IGF-BP-4 να αναστείλει τις τοπικές δράσεις των IGF [35].

1.5.5 Γλυκοκορτικοειδή

Τα γλυκοκορτικοειδή έχουν τόσο διεγερτικές όσο και ανασταλτικές επιδράσεις στα οστεοκύτταρα. Είναι ιδιαίτερα σημαντικά για τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών κι ευαισθητοποιούν τα οστεοκύτταρα σε ρυθμιστές της οστικής αναδιαμόρφωσης, περιλαμβανομένων των IGF-1 και PTH. Η αναστολή του οστικού σχηματισμού είναι η κύρια αιτία της σχετιζόμενης με τα

γλυκοκορτικοειδή οστεοπόρωσης και μπορεί να οφείλεται σε επιταχυνόμενη απόπτωση των οστεοβλαστών και των οστεοκυττάρων [36].

1.5.6 Θυρεοειδικές Ορμόνες

Οι θυρεοειδικές ορμόνες διεγείρουν τόσο την οστική απορρόφηση όσο και τον οστικό σχηματισμό. Κατά συνέπεια, η οστική διαμόρφωση και αναδιαμόρφωση αυξάνονται στον υπερθυρεοειδισμό και οστική απώλεια μπορεί να προκύψει από τη δράση τους.

1.5.7 Ορμόνες του Φύλου

Οι ορμόνες του φύλου έχουν σημαντικές επιδράσεις στον οστίτη ιστό. Τα οιστρογόνα φαίνεται να δρουν σε κύτταρα τόσο της οστεοβλαστικής όσο και της οστεοκλαστικής σειράς [37] κι επιδρούν στη σκελετική ανάπτυξη και στα δυο φύλα. Στην όψιμη φάση της εφηβείας, τα οιστρογόνα ελαττώνουν την οστική αναδιαμόρφωση με την αναστολή της οστικής απορρόφησης και είναι απαραίτητα για τη σύγκλιση των συζευκτικών χόνδρων των επιφύσεων και στα δυο φύλα. Έτσι, άνδρες με γενετική μετάλλαξη του υποδοχέα των οιστρογόνων ή του ενζύμου αρωματάση που μετατρέπει ανδρογόνα σε οιστρογόνα καθυστερούν να εμφανίσουν σύγκλιση των επιφύσεων και αργότερα οστεοπόρωση [38]. Πολλοί τοπικοί παράγοντες επηρεάζονται επίσης από τα οιστρογόνα, συμπεριλαμβανομένων κυτταροκινών και προσταγλανδινών. Τα ανδρογόνα μπορούν επίσης να διεγείρουν τον οστικό σχηματισμό είτε άμεσα είτε διαμέσου των επιδράσεών τους στο γειτονικό μυϊκό και συνδετικό ιστό.

1.5.8 Κυτταροκίνες

Όπως περιγράφηκε ανωτέρω, οι κυτταροκίνες που παράγονται από τα οστεοκύτταρα και τα παρακείμενα αιμοποιητικά και αγγειακά κύτταρα έχουν πολλαπλές ρυθμιστικές δράσεις στο σκελετό. Η ρύθμιση μπορεί να προκύψει ως αποτέλεσμα τόσο της παραγωγής μιας ποικιλίας αγωνιστών των υποδοχέων που σχετίζονται με τον οστικό μεταβολισμό όσο και αλλαγές στους υποδοχείς των συνδετικών πρωτεϊνών αυτών των υποδοχέων.

1.5.9 Άλλοι παράγοντες

Οι ινοβλαστικοί αυξητικοί παράγοντες είναι μια άλλη οικογένεια πρωτεϊνών που σχετίζονται με το σκελετικό μεταβολισμό. Μεταλλάξεις στους υποδοχείς αυτών των παραγόντων οδηγούν σε μη φυσιολογικούς σκελετικούς φαινότυπους όπως είναι η αχονδροπλασία [39]. Ο αγγειακός αυξητικός ενδοθηλιακός παράγοντας (VEGF) παράγεται επίσης στον οστίτη ιστό και μπορεί να παίζει ρόλο στην οστική αναδιαμόρφωση (εικόνα 3).

Ένας μεγάλος αριθμός άλλων παραγόντων παίζει σημαντικό ρόλο στον οστικό μεταβολισμό: Προσταγλανδίνες, λευκοτριένια και νιτρικό οξείδιο είναι σημαντικά για τη γρήγορη απόκριση των οστεοκυττάρων στη φλεγμονή και τις μηχανικές πιέσεις. Οι προσταγλανδίνες ασκούν διπλή δράση στην οστική απορρόφηση και σχηματισμό αλλά η κυρίαρχη επίδραση *in vivo* είναι διεγερτική [40]. Το Νιτρικό οξείδιο μπορεί να αναστείλει τη λειτουργία των οστεοκλαστών [41], ενώ τα λευκοτριένια διεγείρουν την οστική απορρόφηση [42]. Ο TGF-β και η οικογένεια των μορφογενετικών πρωτεϊνών των οστών ασκούν επίσης

πολλαπλές δράσεις στην σκελετική ανάπτυξη και οστική αναδιαμόρφωση (εικόνα 3) [43]. Ο TGF- β μπορεί να ρυθμιστεί από την οιστραδιόλη [31] και μπορεί να αναστείλει την οστική απορρόφηση και να διεγείρει τον οστικό σχηματισμό. Τέλος, η οστική μορφογενετική πρωτεΐνη -2 και άλλα μέλη αυτής της οικογένειας διεγείρουν τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και τον οστικό σχηματισμό όταν ενίνονται υποδορίως ή ενδομυϊκώς.

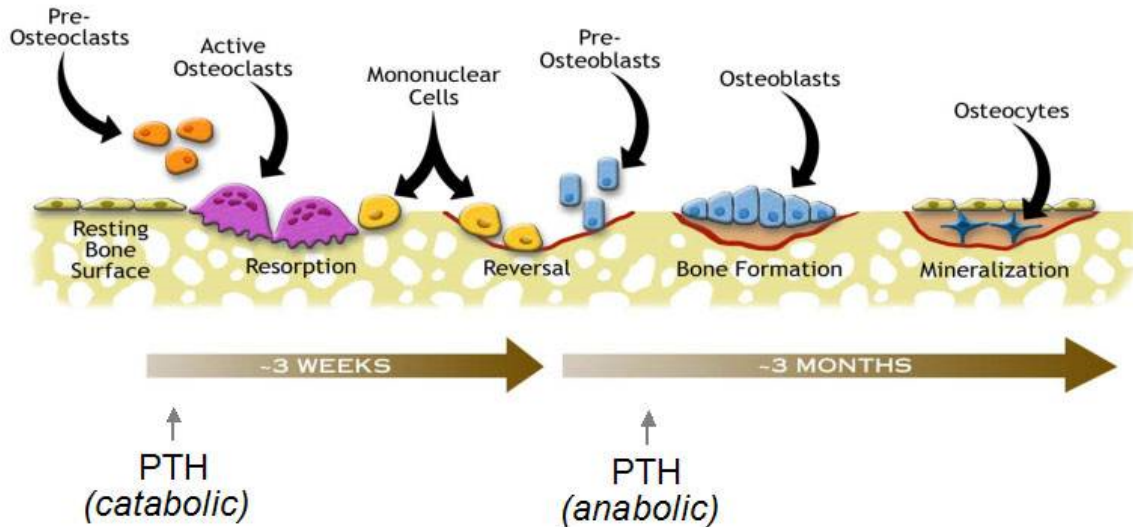
1.6 Οστική διαμόρφωση και αναδιαμόρφωση

Η ανάπτυξη του σκελετού και οι αλλαγές στο σχήμα των οστών προκαλούνται μέσω της οστικής διαμόρφωσης. Η γραμμική αύξηση κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας και της εφηβείας πραγματοποιείται με την αύξηση του χόνδρου στις συζευκτικές επιφάνειες και ακολουθείται από τον ενδοχονδριακό οστικό σχηματισμό. Το πλάτος των οστών αυξάνεται με υποπεριοστική εναπόθεση και κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας αυτό συνοδεύεται με ενδοοστική απορρόφηση. Η εσωτερική ενδοοστική επιφάνεια βρίσκεται σε επαφή με το μυελό και κατά συνέπεια η ενδοοστική απορρόφηση οδηγεί σε ταυτόχρονη διεύρυνση της μυελοφόρου δεξαμενής των οστών. Κατά τη διάρκεια της εφηβείας και την πρώιμης ενηλικίωσης η ενδοοστική εναπόθεση και η πάχυνση της σπογγώδους μοίρας των οστών οδηγούν στη μέγιστη σκελετική μάζα και κορυφαία οστική πυκνότητα. Αυτές οι διαδικασίες επηρεάζονται από τοπικά και συστηματικά παραγόμενους παράγοντες αλλά και μηχανικές δυνάμεις.

Η οστική αναδιαμόρφωση (bone remodeling), από την άλλη πλευρά, αρχίζει νωρίς κατά τη διάρκεια της σκελετικής ανάπτυξης. Αν και ο κύκλος της

οστικής αναδιαμόρφωσης έχει περιγραφεί λεπτομερώς τα κυτταρικά σήματα που πυροδοτούν τη διαδικασία δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητά. Η ενδοχονδριακή αναδιαμόρφωση στο πρωτογενές και δευτερογενές σπογγώδες οστόν μετατρέπουν τις σχετικά αδύναμες δοκίδες του ασβεστοποιούμενου χόνδρου σε ισχυρό οστόν. Ο κύκλος της οστικής αναδιαμόρφωσης αρχίζει με ενεργοποίηση των κυττάρων της οστεοβλαστικής σειράς. Η ενεργοποίηση περιλαμβάνει επίσης και τα οστεοκύτταρα, τους προ-οστεοβλάστες και τα στρωματικά κύτταρα του μυελού. Τα κύτταρα αυτά υφίστανται αλλαγές του σχήματος κι εκκρίνουν κολλαγενάσες και άλλα ένζυμα τα οποία πέπτουν πρωτεΐνες της οστικής επιφάνειας. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται παράλληλα με τη δημιουργία κι εναπόθεση νέου οστίτη ιστού από τους οστεοβλάστες. Η αναδιαμόρφωση πραγματοποιείται σε πολύ μικρές δομικές μονάδες του οστίτη ιστού (BSU: Bone Structural Units), οι οποίες ονομάζονται οστικές πολυκεντρικές μονάδες ή μονάδες αναδιαμόρφωσης [44]. Στις επιφάνειες των οστικών δοκίδων, οι BSU αποτελούνται από μικροσκοπικά ανώμαλα βοθρία που έχουν δημιουργηθεί από την οστική απορρόφηση και τα οποία ονομάζονται βοθρία του Howship. Στο φλοιώδες οστόν η δομική μονάδα ονομάζεται οστεόνιο και αποτελεί έναν κύλινδρο οστού που σχηματίζεται από οστεοβλάστες και στο κέντρο του οποίου έχει σχηματιστεί το Αβερσιανό κανάλι από τη δράση των οστεοκλαστών.

Bone Remodeling Cycle



Εικόνα 4: Ο κύκλος της οστικής αναδιαμόρφωσης κι οι διακριτές φάσεις του.

Ο κύκλος της οστικής αναδιαμόρφωσης αποτελείται από τρεις φάσεις: α) Απορρόφηση β) Αναστροφή και γ) Σχηματισμός.

A) Οστική Απορρόφηση (εικόνα 4): Η οστεοκλαστική απορρόφηση αρχίζει με τη μετανάστευση των μερικά διαφοροποιημένων μονοπύρηνων πρόδρομων μορφών των οστεοκλαστών στην οστική επιφάνεια και οι οποίοι στη συνέχεια ωριμάζουν για να σχηματίσουν τους μεγάλους, πολυπύρηνους οστεοκλάστες οι οποίοι απαιτούνται για την οστική απορρόφηση. Οι οστεοκλάστες αφαιρούν μέταλλα και δικτυωτό υπόστρωμα σε ένα περιορισμένο βάθος της οστικής

δοκίδας μέσα στο φλοιώδες οστόν. Δεν είναι ξεκάθαρο το τι σταματά αυτή τη διαδικασία, αλλά οι υψηλές συγκεντρώσεις ασβεστίου και άλλων ιχνοστοιχείων που απελευθερώνονται κατά την απορρόφηση μπορεί να εμπλέκονται στην αναστολή της επέκτασης της οστεοκλαστικής δραστηριότητας [45]. Οι ανενεργοί οστεοκλάστες μπορούν στη συνέχεια να παράγουν ουσίες που πυροδοτούν την έναρξη της οστεοβλαστικής δραστηριότητας [46].

B) Οστική Αναστροφή (εικόνα 4): Αφού η οστεοκλαστική απορρόφηση ολοκληρωθεί, αρχίζει η φάση της αναστροφής κατά την οποία μονοκύρηννα κύτταρα, πιθανώς προερχόμενα από την μονοκυτταρική/μακροφαγοκυτταρική σειρά εμφανίζονται στην οστική επιφάνεια. Αυτά τα κύτταρα προετοιμάζουν την επιφάνεια για την εναπόθεση οστεοειδούς από τους οστεοβλάστες. Μια λεπτή στοιβάδα από πλούσιο σε γλυκοπρωτείνες υλικό απλώνεται στην “απορροφημένη” επιφάνεια, διευκολύνοντας έτσι την προσκόλληση των οστεοβλαστών. Η οστεοποντίνη (OPN) μπορεί να αποτελέσει μια πρωτεΐνη “κλειδί” σε αυτές τις διαδικασίες [47]. Τα κύτταρα στο σημείο αναστροφής μπορεί επίσης να παράγουν σήματα που προωθούν την διαφοροποίηση και τη μετανάστευση των οστεοβλαστών.

B) Οστικός σχηματισμός (εικόνα 4): Η φάση του οστικού σχηματισμού ακολουθεί με διαδοχικά κύματα οστεοβλαστών να εναποθέτουν οστεοειδές έως ότου το απορροφηθέν οστόν αντικατασταθεί πλήρως και μια νέα οστική δομική μονάδα έχει σχηματιστεί. Όταν η διαδικασία ολοκληρωθεί, η οστική επιφάνεια καλύπτεται με επίπεδα γραμμοειδή κύτταρα και ακολουθεί μια παρατεταμένη

περίοδος ανάπαυσης με μικρή κυτταρική δραστηριότητα στην οστική επιφάνεια έως ότου ένας νέος κύκλος οστικής αναδιαμόρφωσης αρχίσει.

Τα στάδια του κύκλου οστικής αναδιαμόρφωσης έχουν διαφορετική διάρκεια. Η απορρόφηση συνήθως διαρκεί περίπου δυο εβδομάδες. Η φάση της αναστροφής μπορεί να κρατήσει έως 4-5 εβδομάδες, ενώ ο σχηματισμός μπορεί να διαρκέσει έως τέσσερις μήνες έως ότου η νέα δομική μονάδα σχηματιστεί πλήρως (εικόνα 4).

Στους φυσιολογικούς ενήλικες, η οστική απορρόφηση και ο οστικός σχηματισμός συνδέονται στενά, έτσι ώστε το ποσό του οστού που απορροφάται να ισοδυναμεί σε μονάδες BSU με το ποσό του νεοσχηματιζόμενου οστού. Οι δομικές οστικές μονάδες στον φλοιό του οστού που ανασχηματίζονται είναι σχετικά επιφανειακά εντοπιζόμενες σε σχέση με το βάθος των οστικών δοκίδων επί των οποίων αναπτύσσονται. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το οστό να μην καθίσταται “αδύναμο” κι εύθραστο κατά τη διαδικασία της οστικής αναδιαμόρφωσης.

Η παθολογική αναδιαμόρφωση μπορεί να οδηγήσει σε οστική απώλεια με διάφορους τρόπους. Ένας σημαντικός μηχανισμός είναι το υπέρμετρο βάθος απορρόφησης, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε πλήρη απώλεια των οστικών δοκίδων. Οι επακόλουθες διατρήσεις και ασυνέχειες μετατρέπουν τη φυσιολογική δοκιδώδη αρχιτεκτονική σε ένα πολύ πιο αδύναμο σύστημα “ραβδίων”, μερικά από τα οποία έχουν ελεύθερα, μη συνδεδεμένα άκρα. Στα σημεία ασυνέχειας δεν υπάρχει “μήτρα” για οστικό σχηματισμό, ενώ αναστολή της οστεογένεσης έχουμε

και στα ελεύθερα άκρα των οστικών δοκίδων, κυρίως επειδή αυτά δεν υφίστανται την επίδραση της μηχανικής φόρτισης.

Η παθολογική λέπτυνση του οστού μπορεί επίσης να συμβεί χωρίς διάτρηση όταν η έκταση της απορρόφησης ή ο αριθμός των απορροφούμενων οστικών μονάδων αυξάνεται. Φυσιολογικά, οι οστεοβλάστες πληρούν την κοιλότητα απορρόφησης αλλά εάν για κάποιο λόγο αυτό δεν συμβεί η οστική δομική μονάδα είναι ατελής και αυτό οδηγεί σε ελαττωμένο πάχος τοιχώματος στο φλοιό του οστού. Υπάρχει μια σταδιακή ελάττωση στο πάχος του τοιχώματος με την πάροδο της ηλικίας καθώς επίσης και στους ασθενείς που λαμβάνουν συστηματικά γλυκοκορτικοειδή. Αυτή η ελάττωση αποδίδεται στην “ελαττωματική” ανανέωση των οστεοβλαστών ή στο ελαττωμένο προσδόκιμο επιβίωσής τους.

Η ισορροπία της οστικής αναδιαμόρφωσης μπορεί επίσης να διαταραχθεί λόγω της αποτυχίας της διαδικασίας της οστικής απορρόφησης. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε υπέρμετρα πυκνά οστά (“οστεοπέτρωση” ή “οστεοσκλήρυνση”) και σε επακόλουθη ελαττωματική αιμοποίηση. Είναι γνωστό ότι ο παράγων διέγερσης των αποικιών μακροφάγων (M-CMF) απαιτείται για την έναρξη της διαφοροποίησης των οστεοκλαστών. Υπάρχουν οστεοπετρωτικοί επίμυες που δεν παράγουν M-CSF και ο αντίστοιχος γονιδιακός επίτοπος βρίσκεται στην ίδια περιοχή του χρωμοσώματος 3 όπως και του γονιδίου του M-CMF. Ο ρόλος αυτού του μηχανισμού στον άνθρωπο δεν είναι γνωστός, είναι βέβαιο όμως ότι μια σειρά από άλλες ανωμαλίες έχουν ενοχοποιηθεί για τη δημιουργία οστεοσκλήρυνσης, συμπεριλαμβανομένων και μεταλλάξεων στα γονίδια που σχετίζονται με τη μεταφορά ιόντων στους οστεοκλάστες [48].

Στον άνθρωπο, η πιο συχνή μετάλλαξη που συνδέεται αιτιοπαθογενετικά με την οστεοπέτρωση είναι ένα έλλειμα στην ειδική για τους οστεοκλάστες υποομάδα της αντλίας πρωτονίων (TCIRG1). 60% των ασθενών με σοβαρού βαθμού αυτοσωμική υπολειπόμενη οστεοπέτρωση έχουν αυτού του είδους τη μετάλλαξη [49]. Άλλες κλινικά σημαίνουσες μεταλλάξεις έχουν προσδιοριστεί στο CLCN7, ένα γονίδιο που κωδικοποιεί έναν ειδικό των οστεοβλαστών διάυλο χλωρίου, στο OSTM-1, ένα γονίδιο που μπορεί να εμπλέκεται στο Wnt μονοπάτι και στο CAII, που κωδικοποιεί την καρβονική ανυδράση II. Αυτές οι μεταλλάξεις σχετίζονται με φυσιολογικό ή αυξημένο αριθμό δυσλειτουργούντων οστεοκλαστών [50].

Εκτός από τη διαταραχή της οστικής απορρόφησης, η αυξημένη οστική πυκνότητα μπορεί να οφείλεται και σε υπερδιέγερση του οστικού σχηματισμού ή και σε συνδυασμό των δυο ανωτέρω μηχανισμών. Αυτός πιθανώς είναι και ο μηχανισμός της αυξημένης οστικής μάζας σε μια κατάσταση που χαρακτηρίζεται από αυτοσωματικό επικρατούντα τύπο οστεοπέτρωσης στον οποίο τα ελαττωμένα επίπεδα σκληροστίνης μπορεί να οδηγήσουν σε ενεργοποίηση του μονοπατιού Wnt [51].

2. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΟΣΤΙΚΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ - ΔΕΙΚΤΕΣ ΟΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ (ΑΝΑΒΟΛΙΣΜΟΥ-ΚΑΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ)

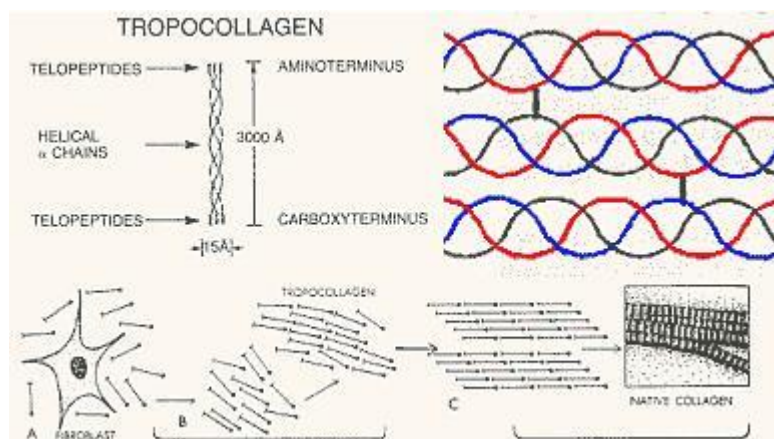
2.1 Οστικός σχηματισμός

Ο οστικός σχηματισμός αρχίζει από τους οστεοβλάστες οι οποίοι συνθέτουν τον τύπο I κολλαγόνου και άλλες πρωτεΐνες, όπως η οστεοκαλσίνη που συνδυάζονται εξωκυττάρια για να συνθέσουν οστεοειδές, το οργανικό υπόβαθρο πάνω στο οποίο συμβαίνει η επιμετάλλωση [52]. Οι οστεοβλάστες περιέχουν αλκαλική φωσφατάση συνδεδεμένη στις κυτταρικές τους μεμβράνες. Αυτή η αλκαλική φωσφατάση είναι λειτουργικά όμοια αλλά αντιγονικά διακριτή από την ηπατική και την πλακουντιακή αλκαλική φωσφατάση [53].

Η σύνθεση του κολλαγόνου τύπου I συμβαίνει με την ακόλουθη αλληλουχία: Το πρώτο βήμα είναι η σύνθεση των άλφα-1 και άλφα-2 αλυσίδων του κολλαγόνου. Μετά τη σύνθεση, πολλά υπολείμματα προλίνης και λυσίνης στις αλυσίδες κολλαγόνου υδροξυλιώνονται σε υδροξυπρολίνη και υδροξυλυσίνη αντίστοιχα. Ακολούθως, μια άλφα-2 και δυο άλφα-1 αλυσίδες συνδιαμορφώνονται για να σχηματίσουν μια ελικοειδή δομή γνωστή ως προκολλαγόνο, που ακολουθείται από αποκοπή των αμινοτελικών και καρβοξυτελικών άκρων για να σχηματίσουν το τροποκολλαγόνο (Εικόνα 5) [54]. Το τροποκολλαγόνο είναι κυρίως ελικοειδές, ενώ τα μη ελικοειδή τμήματα στα αμινοτελικά και καρβοξυτελικά άκρα είναι γνωστά ως N-τελοπεπτίδια και C-τελοπεπτίδια αντίστοιχα. Τα μόρια του τροποκολλαγόνου ευθυγραμμίζονται το ένα δίπλα στο άλλο για να σχηματίσουν ένα ινίδιο κολλαγόνου. Στη συνέχεια, οι

πλευρικές αλυσίδες των τριών υπολειμμάτων υδροξυλυσίνης από διαφορετικά μόρια τροποκολλαγόνου συμπυκνώνονται για να σχηματίσουν ένα δακτύλιο πυριδινίου, σχηματίζοντας έτσι τους “σταυρωτούς” δεσμούς πυριδινολίνης (PYD) οι οποίοι συνδέουν τρία διαφορετικά μόρια τροποκολλαγόνου. Ο σταυρωτός δεσμός δεοξυ-πυριδινολίνης (DPD) είναι μια παραλλαγή του πυριδινολινικού δακτυλίου η οποία σχηματίζεται όταν 2 πλευρικές αλυσίδες υδροξυλυσίνης συμπυκνώνονται με μια πλευρική άλυσσο λυσίνης [55].

Υπάρχουν τρεις τύποι σταυρωτών δεσμών πυριδινολίνης που είναι χαρακτηριστικοί του οστικού κολλαγόνου. Ο ένας τύπος είναι ο DPD (δεοξυπυριδινολίνη) η οποία βρίσκεται σε σημαντικά ποσά μόνο στο σκελετό και τη αδαμαντίνη [56]. Ο δεύτερος είναι ο σταυρωτός δεσμός πυριδινολίνης στην N-τελοπεπτιδική περιοχή (NTX) η οποία συνδέει τις άλφα-1 με τις άλφα-2 αλυσίδες ενώ αντίθετα στους υπόλοιπους ιστούς η άλφα-1 συνδέεται με άλφα-1 αλυσίδα. Ο τρίτος τύπος ειδικός του σκελετού είναι ένα τμήμα του άλφα-1 πεπτιδίου με έναν ισομερή δεσμό ανάμεσα στο ασπαρτικό οξύ και τη γλυκίνη από την καρβοξυτεπτιδική περιοχή (CTX).

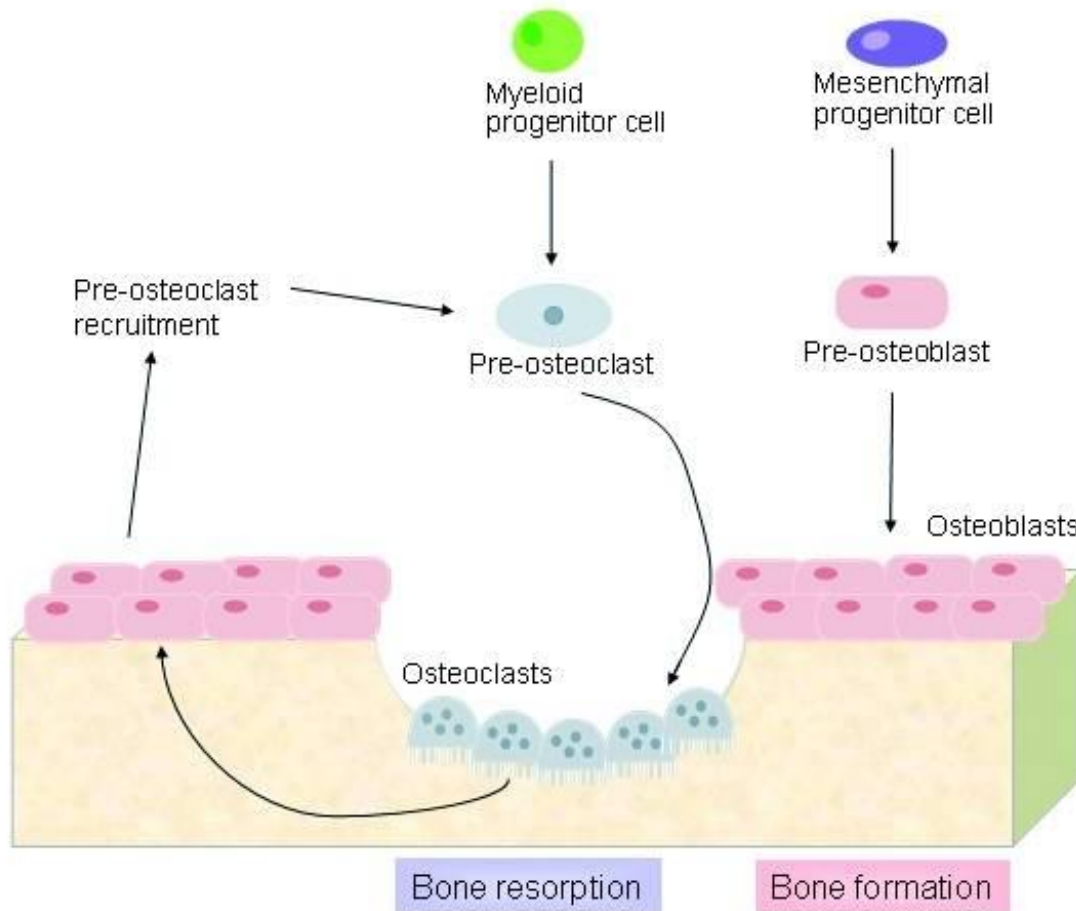


Εικόνα 5: Σύνθεση του τροποκολλαγόνου.

2.2 Οστική απορρόφηση (εικόνα 6)

Η οστική απορρόφηση αρχίζει από τους οστεοκλάστες οι οποίοι περιέχουν όξινη φωσφατάση συνδεδεμένη στις κυτταρικές τους μεμβράνες. Αν και η ενεργός μορφή της όξινης φωσφατάσης είναι παρούσα και σε άλλους ιστούς όπως ο προστάτης αδένας, οι δυο μορφές του ενζύμου μπορούν να διαχωριστούν από την ανθεκτικότητα της όξινης φωσφατάσης των οστεοκλαστών στο ταρτραϊκό οξύ (tartrate-resistant acid phosphatase, TRACP).

Οι οστεοκλάστες συνδέονται στην οστική επιφάνεια κι εκκρίνουν οξέα και υδρολυτικά ένζυμα τα οποία απορροφούν το οστόν με τη διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω (παράγραφος 1.6) και απελευθερώνουν μεταλλικά άλατα, και θραύσματα κολλαγόνου [57]. Μερικά τμήματα κολλαγόνου πέπτονται πλήρως και οδηγούν στο σχηματισμό ελεύθερων πυριδινολινικών και δεοξυπυριδινολινικών υπολειμμάτων τα οποία αποβάλλονται με τα ούρα [58]. Κάποια άλλα θραύσματα, εντούτοις, αποσυντίθενται μόνο μερικώς και οδηγούν στο σχηματισμό σταυρωτών δεσμών πυριδινολίνης που συνδέονται με τμήματα των NTX άλφα-1 και άλφα-2 αλυσίδων. Αυτοί οι συνδεδεμένοι σε πεπτίδια σταυρωτοί δεσμοί αποβάλλονται επίσης με τα ούρα [59].



Εικόνα 6: Οστική απορρόφηση και οστικός σχηματισμός.

2.3 Δείκτες οστικού σχηματισμού (Πίνακες 1 και 2)

Με βάση τους μηχανισμούς του οστικού σχηματισμού και απορρόφησης, πιθανοί υποψήφιοι δείκτες οστικής αναδιαμόρφωσης μπορούν να προσδιοριστούν: Σε σχέση με τον οστικό σχηματισμό, η συγκέντρωση του οστικού κλάσματος της αλκαλικής φωσφατάσης (bALP) αντανακλά την κυτταρική δραστηριότητα των οστεοβλαστών [60]. Η συγκέντρωση ορού της οστεοκαλσίνης επίσης αντανακλά τη σύνθεση οστεοκαλσίνης από τους οστεοβλάστες. Τέλος, η συγκέντρωση ορού των καρβοξυτελικών και αμινοτελικών πεπτιδίων του τύπου I

του προ-κολλαγόνου (PICP και PINP αντίστοιχα) αντανακλά μεταβολές στη σύνθεση νέου κολλαγόνου. Ο προσδιορισμός του PINP προπεπτιδίου φαίνεται να είναι πιο ειδικός από αυτόν του PICP για τη σύνθεση του οστικού κολλαγόνου.

2.3.1 Οστικό κλάσμα αλκαλικής φωσφατάσης (bALP)

Η αλκαλική φωσφατάση (ALP) είναι ένα πολυεμφραζόμενο στον ανθρώπινο οργανισμό ένζυμο που συνδέεται με την κυτταρική μεμβράνη. Η ολική δεξαμενή της αλκαλικής φωσφατάσης αποτελείται από διάφορα ισομερή τα οποία προέρχονται από διαφορετικούς ιστούς όπως το ήπαρ, τα οστά το έντερο, ο σπλήνας, ο νεφρός και ο πλακούντας. Σε υγιείς ενήλικες, το ηπατικό και το οστικό κλάσμα συναπαρτίζουν το 50% περίπου της συνολικής ALP του ορού, με αποτέλεσμα τα πιο συχνά αίτια αύξησης της συνολικής ALP να είναι οι μεταβολικές νόσοι των οστών και οι χολοστατικές ηπατοπάθειες. Σε απουσία ηπατοπάθειας, η ολική bALP του ορού αποτελεί μια καλή ένδειξη της οστεοβλαστικής δραστηριότητας. Εντούτοις, λόγω της αυξημένης της ειδικότητας, η οστική ισομορφή της αλκαλικής φωσφατάσης είναι προτιμητέα [61].

Πίνακας 1. Δείκτες οστικού σχηματισμού

| Δείκτης | Ιστός Προέλευσης | Αναλυτική μέθοδος | Ειδικότητα |
|----------------|-----------------------------|---|--|
| bALP | Οστά | Ηλεκτροφόρηση Ανοσοκαθήλωση IRMA, EIA | Ειδικό προϊόν οστεοβλαστών. Κάποιες μέθοδοι εμφανίζουν 20% αλληλοεπίδραση με το ηπατικό ισοένζυμο |
| OC | Οστά, αιμοπετάλια | RIA, IRMA, ELISA | Ειδικό προϊόν οστεοβλαστών Κάποιες ισομορφές προκύπτουν από οστική απορρόφηση |
| PICP | Οστά, συνδετικός ιστός | RIA, ELISA | Ειδικό προϊόν οστεοβλαστών και ινοβλαστών |
| PINP | Οστά, συνδετικός ιστός | RIA, ELISA | Ειδικό προϊόν οστεοβλαστών και ινοβλαστών. Μερικώς ενσωματωμένο στον οστίτη ιστό |

RIA: Radioimmunosorbent assay, EIA: Enzyme Immunoassay

IRMA: Immunoradiometric assay

2.3.2 Καρβοξυτελικό και αμινοτελικό άκρο του προκολλαγόνου τύπου I

Τα πεπτίδια του προκολλαγόνου τύπου I αποτελούν το 90% του οργανικού σκελετού και παράγονται από τους οστεοβλάστες. Η εξωκυττάρια διαδικασία του προκολλαγόνου πριν την άθροιση των ινιδίων περιλαμβάνει την αποκοπή των αμινοξυ- (N-) και καρβοξυ- (C-) τελικών άκρων των πεπτιδίων. Επειδή τα πεπτίδια αυτά δημιουργούνται με μια στοιχειομετρική αναλογία 1:1 με τα νεοσχηματιζόμενα μόρια κολλαγόνου, τα επίπεδά τους στον ορό ή τα ούρα θεωρούνται αντιπροσωπευτικοί δείκτες της κολλαγονικής σύνθεσης και κατά συνέπεια του οστικού σχηματισμού [62]. Τα επίπεδα ορού του καρβοξυτελικού άκρου του προκολλαγόνου τύπου I (PICP) έχει βρεθεί ότι συσχετίζονται με τα ιστομορφομετρικά χαρακτηριστικά του οστικού σχηματισμού [62], καθώς και ότι η ορμονική θεραπεία υποκατάστασης αλλά και η θεραπεία με διφωσφονικά οδηγούν σε ελάττωση των κυκλοφορούντων επιπέδων του δείκτη αυτού [63]. Πιο πρόσφατες μελέτες, εντούτοις, προτείνουν ότι το αμινοτελικό άκρο του προκολλαγόνου τύπου I (PINP) έχει μεγαλύτερη διαγνωστική αξία από το PICP [64].

2.3.3 Οστεοκαλσίνη (OC)

Η οστεοκαλσίνη είναι μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 5.8 kDa που παράγεται από τους οστεοβλάστες, τους οδοντοβλάστες και τα υπερτροφικά χονδροκύτταρα [65]. Αν και η OC είναι παρούσα σε σημαντικά ποσά στα οστά, την αδαμαντίνη και τον ασβεστοποιημένο χόνδρο, έχει επίσης πρόσφατα ανευρεθεί σε κυτταροκαλλιέργειες προστατικού καρκίνου αλλά και σε

οστεοσαρκώματα και κακοήθειες των ωοθηκών, του πνεύμονα και του ΚΝΣ [66]. Το μεγαλύτερο ποσοστό της κυκλοφορούσας OC είναι προϊόν οστεοβλαστικής δραστηριότητας κι επομένως η OC ορού μπορεί να θεωρηθεί ένας αντιπροσωπευτικός δείκτης οστικού σχηματισμού [64]. Εντούτοις, επειδή η OC δύναται να ενσωματωθεί στο νεοσχηματιζόμενο οστίτη ιστό, κάποια μικρά τμήματα μπορούν επίσης να απελευθερωθούν στον ορό κατά τη διαδικασία της οστικής απορρόφησης. Στον ορό η οστεοκαλσίνη συνήθως αποδομείται μερικώς από πρωτεολυτικά ένζυμα με αποτέλεσμα τόσο το άθικτο πεπτίδιο όσο και υποτμήματα άλλοτε άλλου μεγέθους να συνυπάρχουν στον ορό. Κατά συνέπεια, οι εργαστηριακές μέθοδοι που προσδιορίζουν τόσο το άθικτο μόριο όσο και τα κλάσματά του θεωρούνται οι πλέον κατάλληλες για τη μέτρηση της OC στον ορό [67]. Τέλος, αν και υπάρχει μια καλή συσχέτιση ανάμεσα στις ιστομορφομετρικές παραμέτρους του οστικού σχηματισμού και τα επίπεδα OC στον ορό, τα τελευταία μπορεί να επηρεαστούν σημαντικά από την ηλικία, το φύλο και τη νεφρική λειτουργία [67].

2.4 Δείκτες Οστικής απορρόφησης

Οι περισσότεροι δείκτες οστικής απορρόφησης είναι προϊόντα αποδόμησης του σκελετικού (τύπου I) κολλαγόνου. Εντούτοις, κάποια ένζυμα ειδικά των οστεοκλαστών και μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες έχει φανεί επίσης ότι αντανακλούν αυξημένη οστεοκλαστική δραστηριότητα και κατά συνέπεια αυξημένη οστική απορρόφηση (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Δείκτες οστικής απορρόφησης

| Δείκτης | Ιστός προέλευσης | Αναλυτικό δείγμα | Αναλυτική μέθοδος | Ειδικότητα |
|----------------|---|-----------------------------|------------------------------|--|
| PYD | Οστά, χόνδροι, τένοντες, αγγεία | Ούρα | ELISA | Παρόντα σε υψηλές συγκεντρώσεις σε οστά και χόνδρους, ώριμο κολλαγόνο |
| DPD | Οστά, αδαμαντίνη | Ούρα | ELISA | Όπως ανωτέρω |
| ICTP | Όλοι οι ιστοί που περιέχουν τύπου I κολλαγόνο | Ορός | RIA | Κολλαγόνο τύπου I κυρίως οστικής αρχής |
| CTX | Όλοι οι ιστοί που περιέχουν τύπου I κολλαγόνο | Ορός ή ούρα | ELISA, RIA | Κολλαγόνο τύπου I κυρίως οστικής αρχής |
| NTX | Όλοι οι ιστοί που περιέχουν τύπου I κολλαγόνο | Ούρα, ορός | ELISA, RIA | Κολλαγόνο τύπου I κυρίως οστικής αρχής |
| TRACP-5b | Οστεοκλάστες | Ορός, οστίτης ιστός | Colorimetric RIA | Οστεοκλάστες, αιμοπετάλια, ερυθροκύτταρα |

2.4.1 Υδροξυπρολίνη, υδροξυλυσίνη, πυριδινολίνη (PYD) και δεοξυπυριδινολίνη (DPD)

Η υδροξυπρολίνη σχηματίζεται ενδοκυττάρια από τη μετα-μεταφραστική υδροξυλίωση της προλίνης. Το μεγαλύτερο ποσό που απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της οστικής απορρόφησης μεταβολίζεται πρωτογενώς στο ήπαρ και ακολούθως αποβάλλεται στα ούρα. Η συγκέντρωση υδροξυπρολίνης στα ούρα συνήθως θεωρείται δείκτης οστικής απορρόφησης αν και όχι τόσο ευαίσθητος μια και σημαντικά ποσά του δείκτη παράγονται από το νεοσυντιθέμενο κολλαγόνο [68].

Η υδροξυλυσίνη σχηματίζεται κατά τη μετα-μεταφραστική φάση της κολλαγονικής σύνθεσης κι ενσωματώνεται στον οστικό σκελετό σαν συστατικό των ινιδίων του κολλαγόνου. Η υδροξυλυσίνη εμφανίζεται με δυο γλυκοζυλιωμένα ισομερή από τα οποία το ένα είναι εξειδικευμένο για τα οστά και απελευθερώνεται στην κυκλοφορία κατά την αποδόμηση του κολλαγόνου, ενώ τα επίπεδά του δεν επηρεάζονται από διαιτητικούς παράγοντες [69].

Οι διασταυρούμενοι δεσμοί του τύπου I κολλαγόνου που σχηματίζουν τους δακτυλίους της πυριδινολίνης (PYD) και δεοξυπυριδινολίνης (DPD) χρησιμοποιούνται ευρέως ως δείκτες οστικής απορρόφησης. Αν και το PYD κατανέμεται εξίσου στους ιστούς του σώματος, το DPD ανευρίσκεται μόνο στο οστικό κολλαγόνο και την αδαμαντίνη. Και τα δυο συστατικά απελευθερώνονται κατά τη διαδικασία της αποδόμησης του κολλαγόνου και η ιστομορφομετρική ανάλυση δείχνει ότι η απέκρισή τους με τα ούρα σχετίζεται με την οστική

απορρόφηση [70]. Επιπλέον, εμφανίζουν το πλεονέκτημα ότι δεν επηρεάζονται από τη σύνθεση νέου κολλαγόνου και τη διαιτητική πρόσληψη [71].

2.4.2 Ασβέστιο ούρων

Τα επίπεδα ασβεστίου ούρων εξαρτώνται σε σημαντικό βαθμό από τη νεφρική λειτουργία, τη διαιτητική πρόσληψη ασβεστίου, φωσφόρου, νατρίου και βιταμίνης D3, καθώς και από το ρυθμό οστικής απορρόφησης [72]. Κατά συνέπεια, τα επίπεδα ασβεστίου των ούρων θεωρούνται ως ένας δείκτης της συνολικής ομοιόστασης και του ισοζυγίου του ασβεστίου παρά ένας μεμονωμένος δείκτης οστικής απορρόφησης. Εντούτοις, η εκτεταμένη οστική απορρόφηση οδηγεί στην απελευθέρωση σημαντικής ποσότητας ασβεστίου από την επιμεταλλωμένη οστική επιφάνεια. Επομένως σε εκτεταμένες οστεολύσεις από νεοπλασματικές νόσους η μεσολαβούμενη από τους οστεοκλάστες απελευθέρωση ασβεστίου στην κυκλοφορία μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντική και εμμένουσα υπερασβεστιαμία και υπερασβεστιουρία μπορεί να προκύψουν, πάντα σε συνδυασμό με καταστολή της έκκρισης παραθορμόνης [72].

2.4.2 Καρβοξυτελικό (CTX) και αμινοξυτελικό (NTX) άκρο του κολλαγόνου I

Τα τελοπεπτιδία του κολλαγόνου τύπου I σχηματίζουν μικρές ελικοειδείς κυρτώσεις στα καρβοξυτελικά και αμινοξυτελικά άκρα των κολλαγονικών μορίων. Κατά τη διάρκεια της αποδόμησης του κολλαγόνου, τα καρβοξυ- και αμινοξυτελικά πεπτιδικά θραύσματα διαφόρων μεγεθών απελευθερώνονται στην κυκλοφορία [73]. Μια ειδική μέθοδος ELISA έχει αναπτυχθεί για τον

προσδιορισμό των NTX πεπτιδίων στον ορό και τα ούρα, ενώ τα CTX θραύσματα προσδιορίζονται ακριβέστερα στον ορό με διάφορες τεχνικές σύνδεσης διαφορετικών κάθε φορά επιτόπων με μεθοδολογία ELISA (ICTP, aCTX-1, aCTX-2), [74]. Η οστική νόσος του Paget, ο πρωτοπαθής υπερπαραθυρεοειδισμός, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η οστεομαλακία και η μεταστατική νόσος στο σκελετό συνδέονται με σημαντικά αυξημένα ποσοστά τελοπεπτιδίων του κολλαγόνου ενδεικτικά αυξημένης οστικής καταστροφής [64].

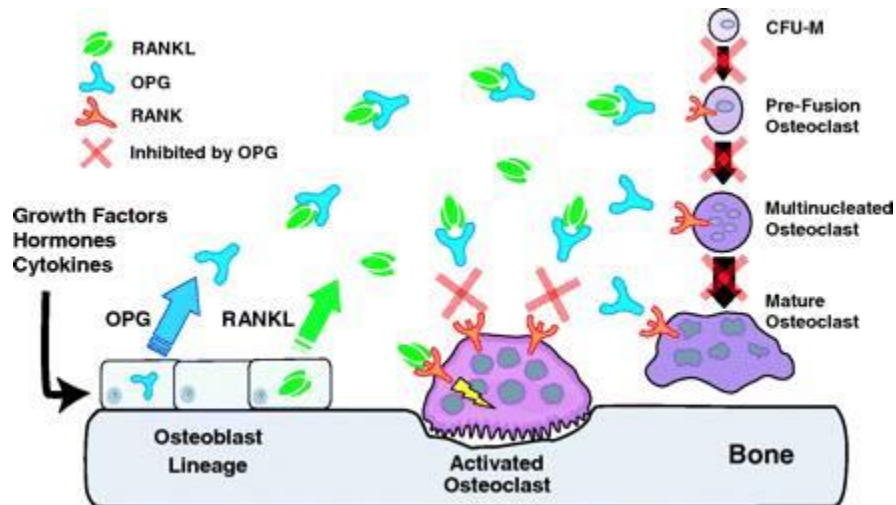
2.4.4 5β Ισοένζυμο της όξινης φωσφατάσης της ανθεκτικής στο τρυγικό οξύ

Το 5β Ισοένζυμο της όξινης φωσφατάσης της ανθεκτικής στο τρυγικό οξύ (TRACP-5b) ανήκει σε μια οικογένεια όξινων φωσφατασών που περιλαμβάνουν ισοένζυμα των οστών, του προστάτη, των αιμοπεταλίων, των ερυθροκυττάρων και του σπλήνα. Η ειδική των οστεοκλαστών ισομορφή (TRACP-5b) είναι ένα λυσοσωμιακό ένζυμο που εκκρίνεται από τους ενεργοποιημένους οστεοκλάστες και για αυτό θεωρείται ιδιαίτερα ευαίσθητος και ειδικός δείκτης οστεοκλαστικής δραστηριότητας [75]. Αυξημένα επίπεδα ενεργού TRACP-5b στον ορό έχουν ανευρεθεί στην οστική νόσο του Paget, στον πρωτοπαθή υπερπαραθυρεοειδισμό, την οστεομαλακία, και τη μεταστατική σκελετική νόσο σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού [76].

2.4.5 Οστεοποντίνη (OPN)

Η οστεοποντίνη (OPN) είναι μια φωσφορυλιωμένη γλυκοπρωτεΐνη που ανακαλύφθηκε αρχικά ως κυτταροκίνη που εμπλέκεται σε ένα ευρύ φάσμα

βιολογικών δραστηριοτήτων [77]. Η εκκρινόμενη OPN αλληλεπιδρά με μέλη της οικογένειας των ιντεγκρινών και διεγείρει μια ποικιλία ενδοκυτταρίων διαδικασιών κυτταρικής εξαλλαγής [78]. Η OPN πυροδοτεί την έκφραση του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου του τύπου της ουροκινάσης και κινητοποιεί την κυτταρική μετανάστευση και προσκόλληση, συμβάλλοντας έτσι στην κυτταρική εξαλλαγή και τη μετάσταση [79]. Επιπρόσθετα, τα επίπεδα OPN στον ορό αυξάνονται με την παρουσία ιστικής υποξίας στο εσωτερικό του όγκου, μια διαδικασία που σχετίζεται με αυξημένη αντίσταση του όγκου τόσο στη χημειοθεραπεία όσο και στην ακτινοθεραπεία [80]. Επιπλέον, τα επίπεδα της OPN έχουν συσχετισθεί με επιθετική βιολογική συμπεριφορά σε μια ποικιλία συμπαγών όγκων, συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου του νεφρού, του μαστού, του προστάτη, του στομάχου, του οισοφάγου και του καρκίνου κεφαλής –τραχήλου [81]. Ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα OPN έχουν παρατηρηθεί στον καρκίνο του πνεύμονα και ιδιαίτερα στο μη μικροκυτταρικό τύπο, όπου τα υψηλά επίπεδα mRNA ή πρωτεϊνικής έκφρασης OPN σχετίζονται με ελαττωμένη συνολική επιβίωση σε ασθενείς με πρώιμη νόσο [82].



Εικόνα 7: Το σύστημα RANKL/RANK/OPG στον οστικό μεταβολισμό

2.5 Συνδέτης (RANKL) και Υποδοχέας (RANK) του πυρηνικού παράγοντα κB

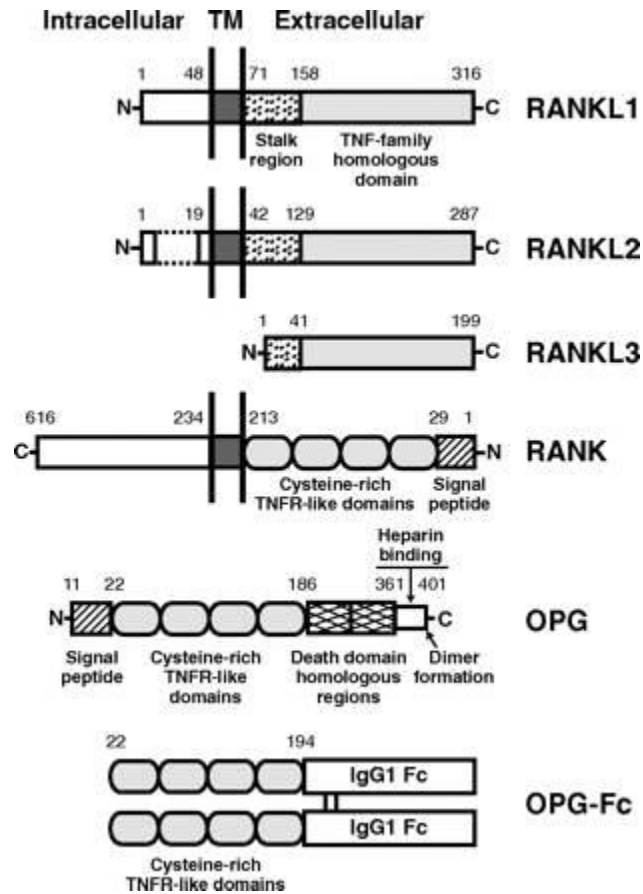
2.5.1 RANKL (Συνδέτης του υποδοχέα του πυρηνικού παράγοντα κB) (εικόνα 7)

Ο συνδέτης του υποδοχέα του πυρηνικού παράγοντα κB (Receptor Activator of Nuclear factor κB) είναι ένα νέο μέλος της υπερικογένειας του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF) [83]. Υπάρχουν τουλάχιστον τρεις μορφές RANKL δυο από τις οποίες διαθέτουν μια διαμεμβρανική περιοχή η οποία έχει ένα βιολογικά ενεργό καρβοξυτελικό άκρο στην εξωκυττάρια μοίρα [83]. Ένας από αυτούς τους τύπους, ο RANKL2 είναι ένα βραχύτερο μόριο που προκύπτει από εναλλακτική διασύνδεση (alternative splicing) του RANKL1 (εικόνα 8) [84]. Και οι δυο αυτές μορφές μπορούν να παραμείνουν στην κυτταρική επιφάνεια ή μπορούν να αποκοπούν με τη δράση πρωτεολυτικών

ενζύμων σε διαλυτές μορφές οι οποίες διαθέτουν ικανότητα διέγερσης των οστεοκλαστών μέσα στις περιοχές με TNF ομολογία (εικόνα 8), [85]. Ο RANKL παράγεται από διάφορους τύπους κυττάρων συμπεριλαμβανομένων των στρωματικών κυττάρων του μυελού, συνοβιακών κυττάρων, ινοβλαστών, ενδοθηλιακών κυττάρων, χονδροκυττάρων αλλά και κυττάρων της οστεοβλαστικής σειράς κι ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων. Τα T-λεμφοκύτταρα είναι σε θέση να παράγουν τόσο τη διαλυτή όσο και τη συνδεδεμένη στην κυτταρική μεμβράνη μορφή του RANKL [86] και είναι σήμερα γνωστό ότι και οι δύο μορφές εμπλέκονται αιτιοπαθογενετικά στις οστικές αλλοιώσεις και διαβρώσεις που χαρακτηρίζουν τη ρευματοειδή αρθρίτιδα [87]. Τα κύτταρα της οστεοβλαστικής σειράς, από την άλλη, μπορούν να εκφράσουν RANKL στην επιφάνειά τους με αποτέλεσμα να διευκολύνουν την οστεοκλαστογένεση *in vitro* δια μέσου της κυτταρικής προσκόλλησης σε με πρόδρομες μορφές οστεοκλαστών [88]. Έχει επίσης ιδιαίτερο ενδιαφέρον να επισημανθεί ότι οι διαφοροποιημένοι οστεοβλάστες σε κυτταροκαλλιέργεια εμφανίζουν ελαττωμένη έκκριση RANKL, πράγμα που σημαίνει ότι οι ώριμοι “οστεοπαραγωγοί” οστεοβλάστες δεν είναι ικανοί να κατευθύνουν και να προάγουν πλέον την οστεοκλαστική δραστηριότητα [89]. Η μεμβρανική μορφή του RANKL φαίνεται να είναι λίγο πιο ισχυρή από τη διαλυτή μορφή (soluble RANKL ή sRANKL) σε ότι αφορά τη διέγερση της οστεοκλαστογένεσης *in vitro*, όμως η διαλυτή μορφή είναι μετρήσιμη στον ορό και μπορεί να προκαλέσει ισχυρό σκελετικό καταβολισμό σε *in vivo* πειράματα σε επίμυες [90], με αποτέλεσμα να θεωρείται σήμερα ότι ο sRANKL μπορεί να αποτελέσει ένα

σημαντικό παθοφυσιολογικό δείκτη αυξημένης οστεοκλαστικής δραστηριότητας σε μοριακό και υποκυτταρικό επίπεδο [83].

Ο RANKL γόνος εντοπίζεται στο 13q14 χρωμοσωμικό επίπεδο [91]. Παράγεται ως μια πολυπεπτιδική αλυσος 317 αμινοξέων η οποία υφίσταται περιορισμένου βαθμού μετα-μεταφραστική τροποποίηση. Εκφράζεται σε σημαντικό βαθμό στους περιφερικούς λεμφαδένες και το μυελό των οστών, το θύμο αδένα, το σπλήνα, τις πλάκες του Peyer, τον εγκέφαλο, τον καρδιακό μυ, το δέρμα, τους σκελετικούς μύες, τους νεφρούς το ήπαρ, τους πνεύμονες και το μαζικό αδένα [92]. Η έκφραση του RANKL από τα κύτταρα αυτά επηρεάζεται από μια σειρά από παράγοντες όπως διάφοροι ορμονικοί ρυθμιστές, αυξητικοί παράγοντες, πεπτίδια και κυτταροκίνες. Πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα αναφέρουν ότι η β-κατενίνη, μέλος της Wnt οικογένειας μορίων, μπορεί επίσης να αποτελεί κυτταρικό ρυθμιστή της παραγωγής RANKL [93].



Εικόνα 8: Λειτουργική δομή των μορίων RANKL1,2,3, RANK και OPG.

2.5.2. RANK (Υποδοχέας του πυρηνικού παράγοντα κΒ)

Ο υποδοχέας που “διαμεσολαβεί” όλες τις γνωστές κυτταρικές επιδράσεις του RANKL ονομάζεται υποδοχέας του πυρηνικού παράγοντα κΒ ή RANK. Ο RANK είναι ένα ομοτριμερές μέλος της υπεροικογένειας TNF το οποίο αρχικά ανακαλύφθηκε από μια cDNA βιβλιοθήκη δενδριτικών κυττάρων του μυελού των οστών [83]. Ο RANK αναγνωρίστηκε ως ο υποδοχέας δια μέσου του οποίου ο RANKL μπορούσε να αυξήσει την επιβίωση καλλιεργικών δενδριτικών κυττάρων.

Στη συνέχεια, ο σημαντικός ρόλος του RANK αναγνωρίστηκε από τους Nakagawa και συνεργάτες οι οποίοι χαρακτήρισαν τον υποδοχέα αυτό ως “υποδοχέα του παράγοντα διαφοροποίησης των οστεοκλαστών” [94]. Ο ουσιαστικός ρόλος του RANK στην οστική απορρόφηση καταδείχθηκε άμεσα από την πολύ υψηλή οστική πυκνότητα επίμυων με “RANK knock-out” γόνο, οι οποίοι στερούνταν ουσιαστικά της παρουσίας οστεοκλαστών [95]. Οι RANK και RANKL “knock-out” επίμυες εμφάνιζαν ουσιαστικά τον ίδιο φαινότυπο, γεγονός που αποδεικνύει ότι ο βιολογικός ρόλος των δυο αυτών μορίων ουσιαστικά εξαντλείται στην μεταξύ τους αλληλεπίδραση [96].

Το γονίδιο του RANK στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το TNFRSF11A γονιδιακό επίτοπο που εδράζεται στο χρωμόσωμα 18. Μεταλλάξεις του γονιδίου RANK που διαταράσσουν την ομαλή πεπτιδική αλληλουχία του μορίου, οδηγούν σε ελαττωματική κάθαρση του μορίου από τον ορό και σε αύξηση της μεταγωγής σήματος από τον RANKL με αποτέλεσμα τρεις διαφορετικές φαινοτυπικές εκδηλώσεις: α) Την πρώιμη οστική νόσο Paget, που είναι μια ετερογενής, αυτοσωμική επικρατούσα κληρονομική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από σκελετικές ανωμαλίες, νευροαιθητήρια βαρικοΐα κι οδοντικά προβλήματα β) την εκτατική σκελετική υπερφωσφαταιμία, μια αυτοσωμική επικρατούσα διαταραχή που εκδηλώνεται κλινικά με πρώιμη κώφωση, οδοντικά ελείμματα και αυξημένη οστική αναδιαμόρφωση που εκδηλώνεται με οστικά αλγη και παροδική υπερασβεστιαϊμία και γ) την οικογενή εκτατική οστεόλυση που είναι μια αυτοσωμική επικρατούσα διαταραχή που εκδηλώνεται στην πρώιμη παιδική ή εφηβική ηλικία και χαρακτηρίζεται κυρίως από νευροαιθητήριο βαρικοΐα κι

εκταταμένη διαπλάτυνση στα περισσότερα οστά του σκελετού [97]. Όλα τα προαναφερθέντα κλινικά σύνδρομα οφείλονται σε “ενεργοποιούς” μεταλλάξεις του RANK που αφορούν σε τμηματικό διπλασιασμό του γονιδίου μήκους 27-bp, 15-bp και 18-bp αντίστοιχα [97].

Η σύνδεση κι ενεργοποίηση του RANK περιλαμβάνει άμεση αλληλεπίδραση ανάμεσα στο εξωκυττάριο τμήμα του τριμερούς μορίου του υποδοχέα το οποίο είναι πλούσιο στο αμινοξύ κυστεΐνη και την αντίστοιχη περιοχή του ομοτριμερούς του RANKL (εικόνα 8). Αυτή η αλληλεπίδραση θεωρείται σήμερα ότι προκαλεί ολιγομερισμό του RANK κι επακόλουθη ενεργοποίηση διαφόρων ενδοκυτταρίων οδών μεταγωγής σήματος. Ειδικότερα, η σύνδεση του RANKL στον RANK οδηγεί στην ενεργοποίηση μιας ενδιάμεσης πρωτεΐνης που ονομάζεται TRAF6 (TNF receptor associated factor 6) η οποία συνδέεται σε ειδική περιοχή του ενδοκυτταρίου τμήματος του RANK (εικόνα 8). Ο TRAF6 δρα ως δεύτερος αγγελιοφόρος κι ενεργοποιεί μια σειρά από ενδοκυττάρια μονοπάτια πρωτεϊνικών κινασών καθώς επίσης και μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο πυρηνικός παράγοντας κB (NF-κB). Ο ενεργοποιημένος παράγοντας κB μετατοπίζεται στον πυρήνα και ρυθμίζει την έκφραση του c-fos, το οποίο στη συνέχεια αλληλεπιδρά με τον πυρηνικό παράγοντα των ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων (NFAT-1c) για να προκαλέσει μεταγραφική ενίσχυση γονιδίων που προάγουν την οστεοκλαστογένεση [98].

2.6 Οστεοπρωτεγερίνη (OPG)

Η οστεοπρωτεγερίνη ανακαλύφθηκε το 1997 και ήταν το πρώτο συστατικό του RANKL/RANK/OPG μονοπατιού που ήρθε στο φως της επιστημονικής έρευνας [92]. Είναι μέλος της οικογένειας υποδοχέων TNF και είναι μια εκκρινόμενη πρωτεΐνη χωρίς διαμεμβρανική περιοχή. Η οστεοπρωτεγερίνη (OPG) ανακαλύφθηκε μέσα από την ιχνηθέτηση τυχαία επιλεγμένων κλώνων μιας cDNA βιβλιοθήκης εντέρου εμβρύου επίμουσ. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του γόνου εμφάνιζε σημαντική ομολογία με τον TNF 2 και η επακόλουθη αποκωδικοποίηση του πλήρους μήκους του μορίου αποκάλυψε ένα καινούργιο μέλος της οικογένειας TNF. Στη συνέχεια βρέθηκε ότι γενετικά τροποποιημένοι επίμους με υπερέκφραση του OPG γόνου εμφάνιζαν υψηλή οστική μάζα και αυτός ο φαινότυπος παρέμενε και μετά την ενηλικίωση και γήρανση των πειραματοζώων. Η υψηλή οστική μάζα στα πειραματόζωα συνδυαζόταν με σημαντική ελάττωση στον αριθμό των οστεοκλαστών και την ενεργότητά τους. Για το λόγο αυτό η καινούργια πρωτεΐνη ονομάστηκε “οστεοπρωτεγερίνη”, λόγω της ιδιότητάς της να “προστατεύει” το οστόν. Παράλληλα με τις έρευνες αυτές, επιστήμονες στην Ιαπωνία απομόνωσαν μια πρωτεΐνη που εκκρίνεται από καλλιέργειες ανθρώπινων ινοβλαστών και η οποία αποδείχθηκε ταυτόσημη με την OPG [99]. Το μόριο αυτό είχε αρχικά ονομαστεί “παράγων αναστολής της οστεοκλαστογένεσης” λόγω της ιδιότητάς του να καταστέλλει την οστεοκλαστογένεση *in vitro* [100]. Στη συνέχεια φάνηκε ότι το ίδιο αυτό μόριο μπορούσε να καταστείλει την ενεργότητα των οστεοκλαστών [101], την επιβίωσή

τους [102], και την ικανότητά τους να προσκολλώνται στην οστική επιφάνεια [103].

Οι δομικές περιοχές της OPG και η δομική τους αναλογία με τα μόρια RANKL και RANK απεικονίζονται στο σχήμα 8. Η OPG είναι ένα "άτυπο" μέλος της οικογένειας TNF με την έννοια ότι είναι μια εκκρινόμενη πρωτεΐνη χωρίς διαμεμβρανική περιοχή και χωρίς άμεσες ιδιότητες μεταγωγής σήματος [104]. Το μόριο της OPG αποτελείται από τρεις βασικές δομικές μονάδες που περιλαμβάνουν 4 περιοχές σύνδεσης του TNF υποδοχέα πλούσιες σε κυστεΐνη, μια περιοχή σύνδεσης με ηπαρίνη και δυο ομόλογες περιοχές σύνδεσης με υποδοχείς μεταγωγής σήματος κυτταρικού θανάτου (σχήμα 8). Οι περιοχές αυτές δεν έχουν ακόμη συσχετισθεί με συγκεκριμένη λειτουργική ιδιότητα αν και πρόσφατα δεδομένα συνδέουν τις περιοχές αυτές με το σχηματισμό ομοδιμερών. Οι 4 πλούσιες σε κυστεΐνη περιοχές του μορίου της OPG που εμφανίζουν δομική ομολογία με τον TNF είναι απαραίτητες για τη σύνδεση με τον RANKL και για την αναστολή της οστεοκλαστογένεσης, όπως φάνηκε από πειράματα σε κυτταρικές καλλιέργειες [105].

Η περιοχή σύνδεσης με την ηπαρίνη ελαττώνει το χρόνο ημίσειας ζωής του μορίου στο πλάσμα μεσολαβώντας στη σύνδεση του μορίου σε κυτταρικές επιφάνειες και συμμετέχει επίσης στο σχηματισμό των ομοδιμερών, αν και μεταλλάξεις σε αυτή την περιοχή δεν ελάττωσαν την ικανότητα του μορίου να αναστέλλει την οστεοκλαστογένεση *in vitro* [106].

Οι κύριες βιολογικές πηγές οστεοπροτεγερίνης δεν έχουν ακόμη διευκρινισθεί πλήρως. Οι οστεοβλάστες ή κύτταρα της ίδιας σειράς έχουν την

ικανότητα να παράγουν οστεοπροτεγερίνη [107]. Η περιβαλλοντική εγγύτητα οστεοβλαστών και οστεοκλαστών κατά τη διάρκεια της οστικής αναδιαμόρφωσης δημιουργεί το κατάλληλο υπόστρωμα για τη ρύθμιση της λειτουργίας της οστικής απορρόφησης από μόρια παραγόμενα από τους οστεοβλάστες. Εντούτοις, η παραγωγή OPG από καλλιέργειες οστεοβλαστών φάνηκε να αυξάνει με την κυτταρική διαφοροποίηση των προ-οστεοβλαστών και αυτό σημαίνει ότι ενδεχομένως οι ώριμοι οστεοβλάστες δεν αποτελούν σημαντικούς ρυθμιστές της οστεοκλαστογένεσης [89]. Η OPG παράγεται επίσης από ενδοθηλιακά κύτταρα [108], λείες μυϊκές ίνες των αγγείων [109] και άλλα κύτταρα [110]. Οι υψηλές συγκεντρώσεις οστεοπροτεγερίνης που απομονώνονται από φυσιολογικά και παθολογικά ανθρώπινα αιμοφόρα αγγεία καταδεικνύουν ότι τα κύτταρα των αιμοφόρων αγγείων συμβάλλουν σημαντικά στην κυκλοφορούσα στο πλάσμα ποσότητα OPG [111].

Η ικανότητα της OPG να καταστέλλει την οστική απορρόφηση και να αυξάνει την οστική μάζα σχετίζεται με την ιδιότητά της να συνδέεται μέσω της περιοχής του υποδοχέα TNF που περιέχει στο μόριο της με την συμπληρωματική TNF περιοχή του συνδέτη της [112], που δεν είναι άλλος από τον RANKL.

3. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΟΣΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΩΝ ΣΕ ΚΑΚΟΗΘΕΙΣ ΝΕΟΠΛΑΣΙΕΣ

3.1 Ιστορική Εξέλιξη

Πριν από σχεδόν 120 χρόνια, ο Βρετανός Χειρουργός Stephen Paget παρατήρησε ότι ορισμένα καρκινικά κύτταρα είχαν μια τάση να μεθίστανται στα οστά και διατύπωσε την άποψη ότι το οστικό μικροπεριβάλλον παρέχει ένα γόνιμο “έδαφος” για τον αποικισμό και την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων (υπόθεση “σπόρου κι εδάφους”). Σχεδόν 100 χρόνια αργότερα, αναφέρθηκε ότι προϊόντα που απελευθερώνονται από τα απορροφούμενα οστά παρείχαν ένα χημειοτακτικό ερέθισμα για την κατευθυνόμενη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων [113]. Οι πληροφορίες αυτές οδήγησαν στην αναζήτηση πιθανών μηχανισμών του οστικού “τροπισμού” που εμφανίζουν αυτά τα κύτταρα και σύντομα ανακοινώθηκε ότι η διαδικασία οστικής απορρόφησης σε κυτταρικές καλλιέργειες οστίτη ιστού διέγειρε τον πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων τα οποία εμφάνιζαν το φαινόμενο του οστικού τροπισμού [114]. Σε συνέχεια αυτών των παρατηρήσεων, διαπιστώθηκε στη συνέχεια σε πειραματόζωα (επίμυες) ότι τα νεοπλασματικά κύτταρα που βρίσκονται σε άμεση επαφή με την οστική επιφάνεια είχαν σημαντικά μεγαλύτερους ρυθμούς αύξησης σε σύγκριση με τους πληθυσμούς που αναπτύσσονταν σε απόσταση από το οστόν [115]. Η διέγερση της οστικής απορρόφησης φάνηκε να ενισχύει ειδικά τον ρυθμό αύξησης των μεταστατικών καρκινικών κυττάρων στα οστά, αλλά όχι σε άλλους ιστούς [116]. Οι παρατηρήσεις αυτές, σε συνδυασμό με την ιδιότητα

των νεοπλασματικών κυττάρων να διεγείρουν την οστεοκλαστική απορρόφηση, παρείχαν έναν ισχυρό επιστημονικό υπόβαθρο για τη διερεύνηση της καταστολής της διαδικασίας της οστικής αναδιαμόρφωσης ως πιθανής θεραπευτικής στρατηγικής για την αντιμετώπιση οστικών μεταστάσεων από κακοήθη νοσήματα.

3.2 Παθοφυσιολογία οστικού τροπισμού σε κακοήθη νοσήματα

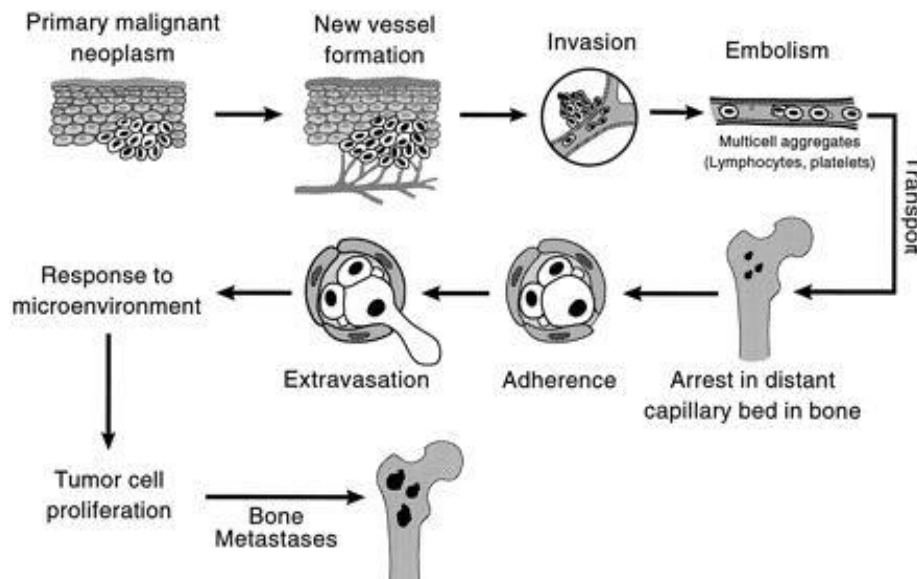
Ο καρκίνος του προστάτη, του μαστού και του πνεύμονα και σε μικρότερο βαθμό του θυρεοειδούς, του νεφρού και άλλων οργάνων εμφανίζουν ισχυρό οστικό τροπισμό. Οι οστικές μεταστάσεις στους ασθενείς αυτούς συνήθως είναι ενδεικτικές προϊούσας νόσου και μπορεί να σχετίζονται με έντονα οστικά άλγη και σκελετική νοσηρότητα [117]. Με την κλινικά εμφανή εξαίρεση του καρκίνου του προστάτη, η μεγάλη πλειοψηφία των οστικών μεταστάσεων από τα άλλα κακοήθη νοσήματα χαρακτηρίζεται από εξεσημασμένη οστική απορρόφηση. Απεικονιστικά, οι αλλοιώσεις αυτές εμφανίζονται ως λυτικές ή μεικτού τύπου εστίες οι οποίες μπορεί να προκαλέσουν πόνο, παθολογικό κάταγμα ή και νευρολογική συμπτωματολογία.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η διαφοροποίηση και η ενεργοποίηση των οστεοκλαστών ρυθμίζονται σε τοπικό επίπεδο από τη σχετική έκφραση του ενεργοποιητή του υποδοχέα του πυρηνικού παράγοντα κΒ (RANKL) και της οστεοπροτεγερίνης (OPG) : Ο RANKL δρα απευθείας στις πρόδρομες μορφές των οστεοκλαστών δια μέσου του υποδοχέα του RANK και προάγει την οστεοκλαστική διαφοροποίηση κι ενεργοποίηση, ενώ η διαδικασία αυτή μπορεί

να “μπλοκαριστεί” με συναγωνιστική αναστολή από τον αναταγωνιστή OPG. Η σχετική έκφραση των RANKL και OPG από τους οστεοβλάστες και τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών ρυθμίζεται από τη βιολογική δράση ορμονών όπως η PTH και η 1,25 (OH)₂ βιταμίνη D₃, φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και από παράγοντες σχετιζόμενους με νεοπλασίες όπως η PTHrP [118]. Η έκφραση του RANKL έχει βρεθεί να είναι αυξημένη σε περιοχές γύρω από όγκους [119] και η παραγωγή του από τα στρωματικά κύτταρα διεγείρεται όταν αυτά συγκαλλιεργούνται με νεοπλασματικά κύτταρα [118]. Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να διεγείρουν την παραγωγή RANKL είτε με απευθείας έκφραση κι έκκριση του μορίου, όπως συμβαίνει σε προστατικά καρκινικά κύτταρα [120], είτε παράγοντας PTHrP, το οποίο έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να αυξήσει την έκφραση RANKL και να μειώνει την έκφραση OPG σε στρωματικά κύτταρα. [121]. Τα προστατικά καρκινικά κύτταρα, ειδικότερα, φαίνεται ότι διευκολύνουν την οστεοσκλήρυνση με την έκφραση ενός παράγοντα αναστολής των οστεοκλαστών που ονομάζεται ενδοθηλίνη -1, οδηγώντας έτσι στην παραγωγή δικτύου οστίτου ιστού και στην επιμετάλλωσή του. Επιπρόσθετα, τα προστατικά καρκινικά κύτταρα μπορούν να διεγείρουν τον οστικό σχηματισμό δια μέσου του αμινοτελικού κλάσματος του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου, ενός αυξητικού παράγοντα που έχει ανιχνευθεί σε κυτταρικό διάλυμα καλλιέργειας της ανθρώπινης σειράς προστατικών καρκινικών κυττάρων PC-3 [120].

Η διαδικασία της δημιουργίας οστικών μεταστάσεων από κακοήθη νοσήματα είναι πολυπαραγοντική. Ο πρωτοπαθής όγκος θα πρέπει να έχει στενή ανατομική συνάφεια με το αγγειακό σύστημα (δια μέσου της προαγωγής της

αγγειογένεσης) και τα νεοπλασματικά κύτταρα πρέπει να μπορούν να διαπερνούν το τοίχωμα των αγγείων (ενδοαγγείωση). Τα βήματα αυτά πραγματοποιούνται με τη βοήθεια διαδικασιών όπως η κυτταρική κινητικότητα, χημειοταξία κι έκφραση μεταλλοπρωτεασών, ειδικά του κολλαγονικού δικτύου [83]. Αφού τα νεοπλασματικά κύτταρα περάσουν στη συστηματική κυκλοφορία, αποικίζουν κατά προτίμηση συγκεκριμένους ιστούς διαπερνώντας εκ νέου το τοίχωμα των αγγείων (εξαγγείωση), όπου πρέπει να επιβιώσουν στο περιβάλλον του “ξενιστή” ιστού, να οδηγήσουν σε δημιουργία μικρομεταστατικών εστιών και να συγκεντρώσουν επαρκή αιματική τροφοδότηση για περαιτέρω αύξηση [117]. Σε όλη αυτή τη διαδικασία η φύση του αγγειακού δικτύου έχει ιδιαίτερη σημασία μια και η κολποειδής διαμόρφωση του αγγειακού δικτύου στο μυελό των οστών πιθανά διευκολύνει τη διαφυγή των των νεοπλασματικών κυττάρων από τη συστηματική κυκλοφορία στο οστικό μικροπεριβάλλον (εικόνα 9), [119].

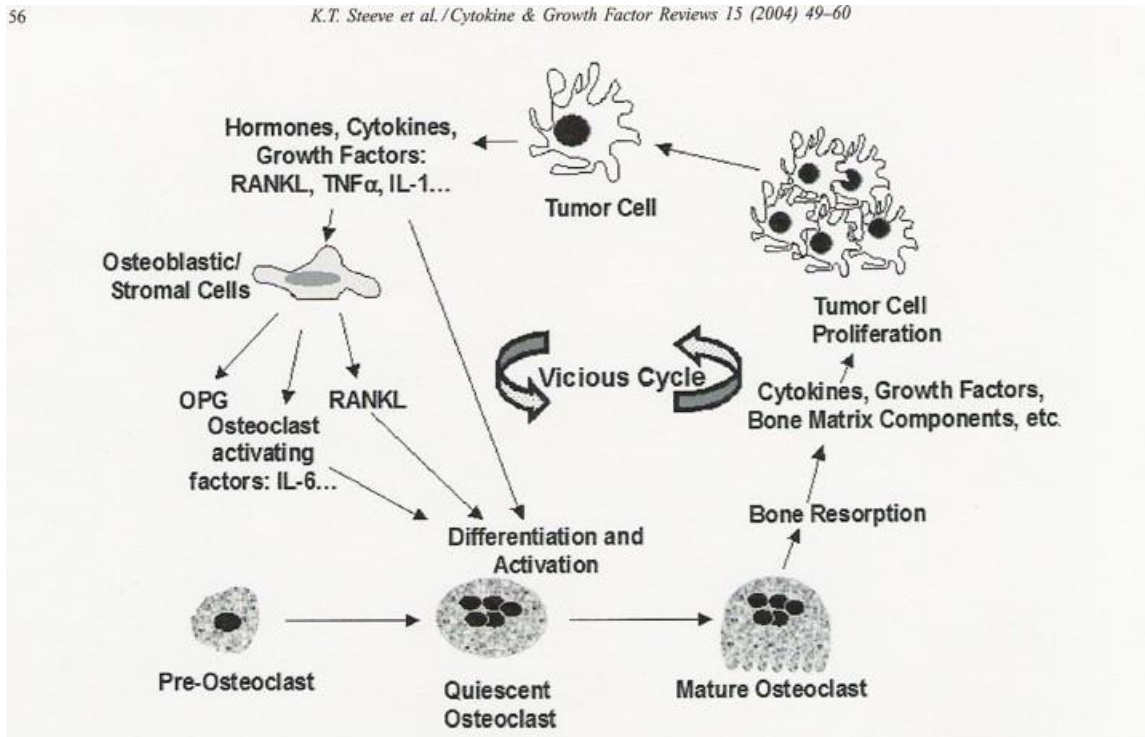


Εικόνα 9: Η παθοφυσιολογία της γένεσης οστικών μεταστάσεων σε κακοήθη νοσήματα.

Η συνεχής αύξηση του μεγέθους των μικρομεταστατικών εστιών απαιτεί συνεχείς τροποποιήσεις του μικροπεριβάλλοντος που περιβάλλει τους πληθυσμούς των νεοπλασματικών κυττάρων. Η νεο-αγγειογένεση απαιτείται για να καλυφθούν οι τροφικές απαιτήσεις του αναπτυσσόμενου όγκου, αλλά παράλληλα η αναστολή μιας σειράς φυσικών και λειτουργικών “φραγμών” καθώς και η ενίσχυση της υποστήριξης του αναπτυσσόμενου όγκου σε κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες. Είναι πολύ πιθανό ότι η διαδικασία της οστικής αναδιαμόρφωσης συνεισφέρει σε πολλές από αυτές τις δραστηριότητες κι επομένως η αναστολή της έχει θεωρητικά τη δυναμική να επηρεάσει τις οστικές μικρομεταστάσεις και την περαιτέρω αύξηση του όγκου. Είναι σήμερα γνωστό ότι οι οστεοκλάστες και οι οστεοβλάστες παράγουν ένα ευρύ όσο και χαρακτηριστικό φάσμα κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων που θα μπορούσαν να τροφοδοτήσουν την τοπική ανάπτυξη του όγκου, όπως συμβαίνει χαρακτηριστικά με την παραγωγή Ιντερλευκίνης-6 από τους οστεοκλάστες που προάγει την επιβίωση κυττάρων πολλαπλού μυελώματος [83]. Το υπόστρωμα του οστίου ιστού περιέχει πολλούς αυξητικούς παράγοντες που μπορεί να απελευθερωθούν σε ενεργό μορφή με την οστεοκλαστική δραστηριότητα, όπως ο TGFβ, ο IGF 1 και 2, ο PDGF και η οστική μορφογενετική πρωτεΐνη. Όλοι αυτοί οι παράγοντες έχει φανεί ότι μπορούν να δράσουν ως χημειοτακτικοί παράγοντες που προάγουν την νεοπλασματική αύξηση, διήθηση κι επιβίωση.

Βασισμένοι σε αυτά τα δεδομένα, οι Mundy και Guise ανέπτυξαν ένα μοντέλο “φαύλου κύκλου” που περιλαμβάνει τους οστεοκλάστες και τα νεοπλασματικά κύτταρα του μυελού των οστών (εικόνα 10): Τα νεοπλασματικά

κύτταρα δρουν τοπικά για να αυξήσουν την οστική απορρόφηση δια μέσου της έκκρισης απορροφητικών παραγόντων (και κυρίως της PTHrP) ή μορίων προσκόλλησης, όπως η οστική σιαλοπρωτεΐνη. Η PTHrP και οι κυτταρικές αλληλεπιδράσεις αυξάνουν την έκκριση RANKL, η οποία προάγει τη διαφοροποίηση, ενεργοποίηση κι επιβίωση των οστεοκλαστών. Αυτοί οι οστεοκλάστες, απορροφούν το οστόν και απελευθερώνουν ενεργό TGFβ και άλλους αυξητικούς παράγοντες (IGF 1 και 2, PDGF, BMPs) οι οποίοι μπορούν να ενισχύσουν τον πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων και να αυξήσουν την έκφραση PTHrP, συμπληρώνοντας έτσι το φαύλο κύκλο [122] (εικόνα 10).



Εικόνα 10: Ο φαύλος κύκλος των οστικών μεταστάσεων.

3.3 Ρυθμιστές του άξονα RANKL/RANK/OPG

Είναι αξιοσημείωτο ότι γονιδιακή έκφραση τόσο του RANKL όσο και της OPG παρατηρείται σε μια πληθώρα ιστών και οργάνων για τα οποία ο ακριβής βιολογικός τους ρόλος δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί. Έτσι, το mRNA της OPG για παράδειγμα, εκφράζεται σε υψηλά ποσοστά σε πνεύμονες, καρδιά, νεφρό και πλακούντα [83], χωρίς ο παθοφυσιολογικός της ρόλος σε αυτά τα όργανα να έχει διευκρινιστεί. OPG mRNA παράγεται επίσης στο ήπαρ, το στομάχο, το έντερο, το δέρμα, τα οστά και στους περισσότερους ανθρώπινους ιστούς [123], με τις εξαιρέσεις του εγκεφάλου, των σκελετικών μυών, των θυμοκυττάρων και των περιφερικών λεμφοκυττάρων του αίματος [124]. Σε επίπεδο κυτταρικών καλλιιεργειών η OPG έχει βρεθεί ότι εκφράζεται από τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών [89], τους ινοβλάστες [123], τα ενδοθηλιακά κύτταρα [108], τα λεμφοειδή κύτταρα [124], τις λείες μυϊκές ίνες και άλλους κυτταρικούς τύπους. Το mRNA του RANKL, επίσης, έχει βρεθεί ότι εκφράζεται στα οστά, το μυελό των οστών, το σπλήνα, τους γραμμωτούς μύες, τον εγκέφαλο, την καρδιά, το ήπαρ, τους πνεύμονες, το μαζικό αδένια και το δέρμα [125] και σε κυτταρικό επίπεδο από οστεοκλάστες, δενδριτικά κύτταρα, χονδροκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες, μακροφάγα και άλλα κύτταρα [126]. Ο RANKL τέλος υπερεκφράζεται όχι μόνο σε στα οστά αλλά και σε περιφερικούς λεμφαδένες, το σπλήνα, θύμο αδένια, πλάκες του Peyer και το έντερο [127]. Η πολυσχιδής αυτή βιολογική δραστηριότητα των δυο μορίων καταμαρτυρεί τις πολλαπλές αλληλεπιδράσεις σε επίπεδο κυτταρικής ρύθμισης στις οποίες συμμετέχει ο άξονας

RANKL/RANK/OPG. Ένας μεγάλος αριθμός αυξητικών παραγόντων, ορμονών, κυτταροκινών, και φαρμακευτικών παραγόντων έχει φανεί ότι επηρεάζουν την έκφραση του RANKL και της OPG (Εικόνα 3). Η αμοιβαία αλληλεπίδραση στα δυο μόρια είναι ένα πολύ συχνό φαινόμενο και σε αρκετά μοντέλα νοσημάτων ο λόγος RANKL/OPG φαίνεται να αποτελεί ένα σημαντικό ρυθμιστή της κατεύθυνσης της οστικής αναδιαμόρφωσης [128].

Ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αμοιβαίας αλληλεπίδρασης RANKL και OPG είναι η δράση της PTH (Πίνακας 4). Η PTH διεγείρει την οστική απορρόφηση σε ασθενείς με υπερπαραθυρεοειδισμό καθώς και όταν ενίεται διαλειπόντως ή με συνεχή ενδοφλέβια χορήγηση και φαίνεται ότι η δράση αυτή πραγματοποιείται μέσω μιας δόσοεξαρτώμενης αύξησης στο RANKL mRNA και αντίστοιχα μιας δόσοεξαρτώμενης μείωσης στο OPG mRNA [129]. Η διαλείπουσα θεραπεία με PTH σε ανθρώπους μπορεί επίσης να αυξήσει τα επίπεδα ορού του RANKL και να ελαττώσει τα αντίστοιχα επίπεδα OPG [130]. Άλλοι σημαντικοί πράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση του RANKL και της OPG σε κυτταρικό επίπεδο είναι η IL-1 [131], IL-7 [132], IL-17 [133], TNF- α [133], PTHrP [134] και η Βιταμίνη D [135], (Πίνακας 4). Πολλά μόρια τα οποία καταστέλλουν την οστεοκλαστογένεση ή και την οστική απορρόφηση έχει φανεί επίσης ότι ρυθμίζουν σε κυτταρικό επίπεδο τον άξονα RANKL/OPG, συμπεριλαμβανομένων των οιστρογόνων [136], της ιντερφερόνης γ [133], του TGF- β [133], της IL-4 [137] και της IL-13 [133]. Ο TNF- α , ειδικότερα, έχει φανεί ότι μπορεί να επάγει την οστεοκλαστική δραστηριότητα και διαφοροποίηση με

μηχανισμούς ανεξάρτητους αλλά και συνεργικούς με τον άξονα RANKL/OPG [138].

Μια σειρά από άλλα μόρια, χωρίς εμφανή λειτουργική αλληλεπίδραση με το οστικό μικροπεριβάλλον, έχουν αναδειχθεί τα τελευταία χρόνια ως σημαντικοί ρυθμιστές του συστήματος RANKL/OPG (Πίνακας 4). Ένας σημαντικός ρυθμιστής των οστεοβλαστών είναι η β-κατενίνη, μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη που άγει σήματα των μελών της οικογένειας wnt. Το OPG mRNA φαίνεται να είναι σημαντικά ελαττωμένο σε καλλιέργειες οστεοβλαστών που απομονώνονται από επίμυες στους οποίους έχει εξαλειφθεί ο γόνος της β-κατενίνης [139]. Αντίστροφα, αυξημένη δραστηριότητα β-κατενίνης σε καλλιέργειες οστεοβλαστών φάνηκε να ελαττώνει την έκφραση του RANKL και να αυξάνει την έκφραση της OPG [83]. Αυτές οι ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις οδήγησαν στη διαπίστωση ότι η μεταγωγή σήματος με το μονοπάτι wnt/ β-κατενίνη στους οστεοβλάστες ρυθμίζει την οστική μάζα συντονίζοντας την αλληλεπίδραση οστεοβλαστών και οστεοκλαστών με τον άξονα RANKL/OPG.

Πίνακας 4. Μοριακοί και κυτταρικοί ρυθμιστές του άξονα RANKL/RANK/OPG.

| | OPG | RANKL | RANK |
|------------------------------------|------------|--------------|-------------|
| 1,25 – διυδροξυ-βιταμίνη D | ↑↓ | ↑ | ↑ |
| Οιστρογόνα | ↑ | ↓/- | |
| Τεστοστερόνη | ↑↓ | - | |
| Γλυκοκορτικοειδή | ↓ | ↑ | |
| PTH | ↓ | ↑ | |
| PTHrP | ↓ | ↑ | |
| IL-1 | ↑↓ | ↑ | ↑ |
| IL-4 | | | ↓/- |
| IL-7 | | ↑ | |
| IL-13 | ↑ | ↓ | - |
| IL-17 | ↓ | ↑ | - |
| TNF- α | | ↑ | |
| Ιντερφερόνη γ | ↑ | ↑ | ↑ |
| Προσταγλανδίνη E2 | ↓ | ↑ | |
| TGF β | ↑ | ↑↓ | - |
| Οστική μορφογενετική πρωτεΐνη 2 | ↑ | | - |

4. ΔΙΦΩΣΦΟΝΙΚΑ ΑΛΑΤΑ ΚΑΙ Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥΣ ΣΤΟΝ ΟΣΤΙΚΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ

4.1 Χημική δομή και βιολογικές ιδιότητες

Τα διφωσφονικά άλατα είναι μικρά μόρια με δομή ατόμων φωσφόρου-άνθρακα-φωσφόρου (P-C-P) παρόμοια με την δομή φωσφόρου-οξυγόνου-φωσφόρου (P-O-P) του πυροφωσφορικού οξέος (εικόνα 11). Και οι δυο ομάδες δείχνουν υψηλό βαθμό συγγένειας με τις κρυσταλλικές επιφάνειες του φωσφορικού ασβεστίου, ενώ παράλληλα η σύνδεση αυτή αναστέλλει την περαιτέρω αποδόμηση και απορρόφηση των κρυστάλλων φωσφορικού ασβεστίου [140]. Κατά συνέπεια, τα διφωσφονικά στοχεύουν το ανόργανο οστόν μέσω της υψηλής συγγένειας αλληλεπίδρασης της P-C-P δομής με τους κρυστάλλους υδροξυαπατίτη [141]. Αφού καθηλωθούν στο οστόν, ασήμαντες ποσότητες διφωσφονικών απελευθερώνονται στην κυκλοφορία και κατά συνέπεια ο χρόνος ημίσειας ζωής των διφωσφονικών είναι δύσκολο να υπολογιστεί με ακρίβεια, αλλά υπολογίζεται μάλλον σε έτη παρά σε μήνες. Η P-C-P δομή είναι χημικά σταθερή και ανθεκτική σε χημική κι ενζυματική υδρόλυση. Γρήγορα διαπιστώθηκε ότι η χορήγηση διφωσφονικών αλάτων σε αναπτυσσόμενα νεογνά πειραματοζώων οδηγούσε σε παραμονή του ασβεστοποιούμενου χόνδρου στις συζευκτικές επιφάνειες, μια εικόνα παρόμοια με αυτή που παρατηρείται στην οστεοπέτρωση και φάνηκε ότι η παρουσία και η

ένταση αυτής της δράσης εξαρτάται από τη φύση της πλευρικής αλύσου του διφωσφονικού.

Τα διφωσφονικά έχουν ένα υψηλό αρνητικό ηλεκτρικό φορτίο κι επομένως δεν διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες και η δράση τους εξαρτάται από τη διαδικασία της ενδοκύττωσης [142]. Η ειδικότητα της αντι-οστεολυτικής δράσης τους προκύπτει από την αυξημένη δράση τους στα οστά και την επιλεκτική απελευθέρωση κι ενδοκύττωση από τους οστεοκλάστες κατά τη διάρκεια της οστικής απορρόφησης. Η ενεργητική ενδοκυττάρωση συμβαίνει κατά μήκος της κροσσωτής επιφάνειας του απορροφούμενου οστού, η οποία σχηματίζεται ακριβώς απέναντι από την ενεργό επιφάνεια του οστεοκλάστη [143].

Τα αζωτούχα διφωσφονικά (παμιδρονάτη, ιμπανδρονάτη, αλενδρονάτη, ρισεδρονάτη και ζολενδρονικό οξύ) δρουν ειδικά στο μονοπάτι του μεβαλονικού οξέος αναστέλλοντας το ένζυμο φαρνεσυλ-πυροφωσφορική συνθάση με αποτέλεσμα να μπλοκάρεται η φαρνεσυλίωση και η γερανυλ-γερανυλίωση των μικρών GTP-ασών, όπως είναι η Rho και η Rab. Ως αποτέλεσμα της προβληματικής πρενυλίωσης, αυτές οι μικρές GTP-άσες δεν συνδέονται με το σωστό τρόπο στην κυτταρική μεμβράνη με αποτέλεσμα εμφανή επίδραση στη λειτουργικότητα των οστεοκλαστών και προαγωγή της απόπτωσής τους [144]. Αντίθετα, τα μη αζωτούχα διφωσφονικά (κλοδρονάτη κι ετιδρονάτη) μεταβολίζονται σε μη υδρολυόμενα κυτταροτοξικά μόρια τα οποία προσομοιάζουν στο ATP. Τα διφωσφονικά επομένως είναι στοχευμένοι κυτταροτοξικοί παράγοντες με αυξημένη ειδικότητα στους οστεοκλάστες, αν και φαίνεται να προσλαμβάνονται έστω και σε πολύ μικρό βαθμό από άλλους ιστούς,

όπως τα νεφρικά σπειράματα, γεγονός που εξηγεί την νεφροτοξική τους δράση σε υψηλές συγκεντρώσεις.

4.2 Δράση των διφωσφονικών στις οστικές μεταστάσεις

Σήμερα είναι γνωστό ότι τα διφωσφονικά άλατα μπορούν να εμποδίσουν, να ελαττώσουν ή να καθυστερήσουν τις σχετιζόμενες με κακοήθεια σκελετικές επιπλοκές, συμπεριλαμβανομένων των οστικών αλγών, των παθολογικών καταγμάτων, της πίεσης του νωτιαίου μυελού, της ανάγκης για χειρουργική επέμβαση ή ακτινοβολία προκειμένου να προληφθεί ένα παθολογικό κάταγμα και της κακοήθους υπερασβεστιαϊμίας [117]. Τα διφωσφονικά σήμερα χρησιμοποιούνται για τη μείωση της σκελετικής νοσηρότητας σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους και οστικές μεταστάσεις μετά την ανακοίνωση των αποτελεσμάτων τριών μεγάλων κλινικών μελετών [145,146,147]. Ειδικότερα, η χορήγηση ζολενδρονικού οξέος στην εγκεκριμένη δόση των 4 mg προκάλεσε σχετική μείωση της πιθανότητας για σκελετικό σύμβαμα κατά 36% σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη [145], 27% σε ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα [146], και 28% σε μια μεικτή ομάδα ασθενών με καρκίνο του μαστού ή πολλαπλούν μυέλωμα [147]. Επιπρόσθετα, σε ασθενείς με οστικές μεταστάσεις από καρκίνο μαστού η χορήγηση ζολενδρονικού οξέος στην προαναφερθείσα δόση σχετίστηκε με 20% μείωση του σχετικού κινδύνου για ανάπτυξη σκελετικού συμβάματος σε σχέση με την από του στόματος χορήγηση παμιδρονάτης [148]. Μια συγκεντρωτική εικόνα των μελετών που αφορούν στο θεραπευτικό όφελος από τη χορήγηση διφωσφονικών σε ασθενείς με καρκίνο μαστού και προστάτη παρατίθεται στους πίνακες 5 και 6 αντίστοιχα.

Πίνακας 5. Μελέτες χορήγησης διφωσφονικών σε καρκίνο μαστού

| Διφωσφονικό | N | Δόση | Καταληκτικό Σημείο | RR | Αναφορά |
|-----------------------|----------|-------------|-----------------------------------|---------------------|----------------|
| IV ibadronate | 462 | 2 ή 6 mg | SRE | 0.82 (0.67-1.0) | [145] |
| p.os ibadronate | 564 | 50 mg | SRE | 0.86 (0.73-1.02) | [146] |
| p.os clodronate | 100 | 1600 mg | SRE | 0.69 (0.40-1.20) | [147] |
| p.os clodronate | 185 | 1600 mg | Νέα SRE | 0.83 (0.68-1.02) | [148] |
| p.os clodronate | 144 | 1600 mg | Νέα SRE | 0.92 (0.92-1.19) | [149] |
| IV pamidronate | 754 | 90 mg | SRE rate (events/year) | 0.77 (0.69-0.87) | [150] |
| IV zoledronic acid | 228 | 4 mg | SRE rate ratio | 0.59 (0.42-0.82) | [151] |
| IV zoledronic acid | 412 | 4 mg | Αναλογία ασθενών με ≥ 1 SRE | 0.80 (0.66-0.97) | [152] |

Πίνακας 6. Μελέτες χορήγησης διφωσφονικών σε καρκίνο προστάτη

| Διφωσφονικό | N | Δόση | Καταληκτικό σημείο | RR | Αναφορά |
|-------------|-----|-----------|------------------------|-------------|---------|
| p.os | 75 | 1.6 g/day | Ανακούφιση | 0.47 | [153] |
| Clodronate | | | άλγους | (0.15-1.47) | |
| p.os | 311 | 2080 | Συμπτωματική | 0.79 | [154] |
| Clodronate | | mg/day | βελτίωση | (0.50-1.26) | |
| IV | 204 | 1500 mg/ | Συμπτωματική | 0.75 | [155] |
| Clodronate | | 3 weeks | βελτίωση | (0.42-1.36) | |
| IV | 57 | 200 mg | Ανακούφιση | 0.73 | [156] |
| Etidronate | | b.i.d. | άλγους | (0.14-4.00) | |
| IV | 25 | 6 mg/ 4 | Κλίμακα | <0.001 | [157] |
| Ibadronate | | weeks | άλγους (pain score) | | |
| IV | 378 | 90 mg/ 3 | Αναλγητικό | 0.98 | [158] |
| Pamidronate | | weeks | αποτέλεσμα | (0.61-1.58) | |
| IV | 643 | 4 mg/ 3 | Ποσοστό | 0.71 | [159] |
| Zoledronate | | weeks | ασθενών με ≥ 1 SRE | (0.50-0.99) | |

4.3 Ενδείξεις χορήγησης διφωσφονικών σε κακοήθη νοσήματα

Με βάση τα προαναφερθέντα δεδομένα, σήμερα ενδείκνυται η χορήγηση αμινο-διφωσφονικών (παμιδρονάτη, ζολενδρονικό οξύ) σε ασθενείς με οστικές μεταστάσεις από καρκίνο του μαστού και ζολενδρονικού οξέος σε ασθενείς με καρκίνο προστάτη, πνεύμονα και άλλων συμπαγών όγκων με δευτεροπαθείς οστικές εντοπίσεις [149]. Αν και το ζολενδρονικό οξύ είναι το διφωσφονικό άλας με τη μεγαλύτερη συγγένεια δέσμευσης στους κρυστάλλους υδροξυαπατίτη κι επομένως με τη μεγαλύτερη σχετική δραστικότητα, η χορήγηση από του στόματος κλοδρονάτης ή ιμπανδρονικού οξέος είναι μια εναλλακτική επιλογή σε γυναίκες με μεταστατικό καρκίνο μαστού που δεν δύνανται ή δεν χρειάζεται να υποβάλλονται σε τακτική νοσηλεία σε νοσοκομείο. Οι πιο συχνές παρενέργειες των διφωσφονικών συνίστανται σε συμπτώματα του τύπου της γριππώδους συνδρομής, αρθραλγίες και γαστρεντερικές ενοχλήσεις όταν χορηγούνται από του στόματος. Η δόση των διφωσφονικών ενδέχεται να χρειαστεί προσαρμογή σε ασθενείς με επηρεασμένη νεφρική λειτουργία, ενώ αυξημένη επαγρύπνηση και λήψη προληπτικών μέτρων οδοντοστοματικής υγιεινής απαιτούνται για την αποφυγή της σπάνιας επιπλοκής της οστεονέκρωσης της κάτω γνάθου [150].

ΜΕΡΟΣ 2ο (ΕΙΔΙΚΟ)

1. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΥΠΟΘΕΣΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

1.1 Δεδομένα

Οι οστικές μεταστάσεις αποτελούν συχνό εύρημα σε ασθενείς με προχωρημένους συμπαγείς όγκους και μπορούν να προκαλέσουν ένα ευρύ φάσμα σημείων και συμπτωμάτων, ικανών να επηρεάσουν σημαντικά την ποιότητα ζωής ή ακόμη και την συνολική επιβίωση [117]. Τα έντονα οστικά άλγη, τα παθολογικά κατάγματα, η κακοήθης υπερασβεστιαϊμία η συμπίεση του νωτιαίου μυελού αποτελούν τις πιο σημαντικές επιπλοκές σκελετικής νοσηρότητας σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού, προστάτου ή πνεύμονα [151]. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, αμοιβαίες αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα νεοπλασματικά κύτταρα και το οστικό μικροπεριβάλλον μπορούν να οδηγήσουν σε διαταραχή της ισοροπίας ανάμεσα στη διαδικασία του οστικού σχηματισμού, που μεσολαβείται από τους οστεοβλάστες και τη διαδικασία της οστικής απορρόφησης που μεσολαβείται κατά κύριο λόγο από τους οστεοκλάστες, οδηγώντας σε ένα ευρύ φάσμα οστεοβλαστικών, οστεολυτικών ή μικτών διαταραχών [83].

Σε αυτή τη διαδικασία, το σύστημα του συνδέτη του υποδοχέα του ενεργοποιητή του πυρηνικού παράγοντα κΒ (RANKL), του υποδοχέα του (RANK) και του ενδογενούς αναστολέα του που είναι η οστεοπροτεγερίνη (OPG), κατέχει ένα καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της ωρίμανσης, διαφοροποίησης και

λειτουργίας των οστεοκλαστών [64,83,97,119,122]. Τα αποτελέσματα αυτών των αλληλεπιδράσεων είναι εμφανή μέσα από τις μεταβολές των συγκεντρώσεων δεικτών οστικού καταβολισμού ή αναβολισμού στο πλάσμα ή τα ούρα. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, “κλασσικοί” δείκτες οστικής απορρόφησης στο πλάσμα αποτελούν το καρβοξυτελικό άκρο του κολλαγόνου τύπου I (CTX), το ασβέστιο ούρων, το αμινοξυτελικό άκρο του κολλαγόνου τύπου I (NTX) αλλά και νεότεροι, όπως το 5β ισοένζυμο της όξινης φωσφατάσης της ανθεκτικής στο τρυγικό οξύ (TRACP-5b) και η οστεοποντίνη (OPN). Από την άλλη, ως παραδοσιακοί δείκτες οστικού σχηματισμού έχουν χρησιμοποιηθεί το καρβοξυτελικό άκρο του προκολλαγόνου τύπου I (CICP), το αμινοξυτελικό άκρο του κολλαγόνου τύπου I (PINP) και το οστικό κλάσμα της αλκαλικής φωσφατάσης (bALP), ενώ πιο πρόσφατα η οστεοκαλσίνη (OC) αναγνωρίστηκε ως ειδικός δείκτης οστεοβλαστικής δραστηριότητας.

Η σημασία του άξονα RANKL/RANK/OPG φάνηκε αρχικά στο πολλαπλούν μυέλωμα, μια νεοπλασία με χαρακτηριστικό και παθογνωμονικό οστικό τροπισμό, όπου ο λόγος RANKL/OPG έχει προταθεί ως ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης [152], αλλά πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα επεκτείνουν το ρυθμιστικό του ρόλο και στους συμπαγείς όγκους όπως και σε μια σειρά μη νεοπλασματικών παθήσεων με σκελετική συμμετοχή, συμπεριλαμβανομένων της οστεοπόρωσης, της νόσου Paget και της ρευματοειδούς αρθρίτιδας [83]. Τα περισσότερα βιβλιογραφικά δεδομένα σε συμπαγείς όγκους αφορούν νεοπλασίες με χαρακτηριστικό οστικό τροπισμό, όπως ο καρκίνος του προστάτη, του μαστού και του πνεύμονα. Εντούτοις, παρά την πληθώρα των πληροφοριών που

αφορούν τους βιοχημικούς δείκτες οστικής αναδιαμόρφωσης, η προβλεπτική και προγνωστική αξία αυτών των δεικτών σε σχέση με τη διάγνωση, τη θεραπευτική ανταπόκριση και την πρόγνωση των σκελετικών μεταστάσεων δεν έχει μελετηθεί επαρκώς μέχρι σήμερα. Επιπρόσθετα, σήμερα γνωρίζουμε ότι η χορήγηση ζολενδρονικού οξέος ελαττώνει σημαντικά το οστικό άλγος και την επίπτωση σκελετικών συμβαμάτων σε ασθενείς με οστικές μεταστάσεις από καρκίνο του προστάτου [145], μαστού [147] και πνεύμονα [146], αλλά λίγα είναι γνωστά για την επίδραση των διφωσφονικών στους δείκτες οστικής διαμόρφωσης και κατά πόσο η μεταβολή αυτή σχετίζεται με κλινικές παραμέτρους. Κάποιες πρόσφατες αναφορές έδειξαν ότι η συστηματική χορήγηση διφωσφονικών συνδέεται με σημαντική ελάττωση των δεικτών οστεολυτικής [153-156] και οστεοβλαστικής [153,154] δραστηριότητας, υπονοώντας μια απευθείας αντινεοπλασματική δράση των διφωσφονικών μέσω της παρεμβολής τους στις αλληλεπιδράσεις νεοπλασματικών κυττάρων και οστικού μικροπεριβάλλοντος. Ειδικότερα, κάποιοι από αυτούς τους δείκτες φάνηκε να αποτελούν ανεξάρτητους προγνωστικούς παράγοντες για την εμφάνιση σκελετικών συμβαμάτων, το διάστημα ελεύθερο προόδου νόσου ή ακόμη και τη συνολική επιβίωση, όπως η bALP του πλάσματος σε ασθενείς με μεταστατικό ορμονοάντοχο καρκίνο προστάτου [157] και το αμινοξυτελικό άκρο του κολλαγόνου τύπου I των ούρων (uNTX) σε ένα μεγάλο αριθμό ασθενών με διάφορους συμπαγείς όγκους με οστικές μεταστάσεις [158].

1.2 Υπόθεση εργασίας

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη, υποθέσαμε ότι ο άξονας RANKL/RANK/OPG διαταράσσεται σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους και οστικές μεταστάσεις και ότι η μεταβολή αυτή εκδηλώνεται με την εμφάνιση άλλοτε οστεολυτικών, άλλοτε οστεοβλαστικών και άλλοτε μικτού τύπου αλλοιώσεων ανάλογα με το ποια διαδικασία “κυριαρχεί” κάθε φορά. Εικάσαμε επίσης ότι η διαταραχή αυτή της ισορροπίας στην οστική αναδιαμόρφωση θα αντανακλάται στα επίπεδα των δεικτών οστικού αναβολισμού και καταβολισμού τα οποία μπορούν να μετρηθούν και ότι τα επίπεδα αυτά μπορεί να έχουν προγνωστική αξία. Υποθέσαμε ακόμη ότι η ανταπόκριση των τιμών των δεικτών αυτών στη θεραπεία με διφωσφονικά μπορεί να σχετίζεται με κλινικά δεδομένα, όπως η εμφάνιση σκελετικών συμβαμάτων, το διάστημα ελεύθερο προόδου νόσου και η συνολική επιβίωση.

1.3 Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής μελέτης είναι να διερευνήσει το ρόλο των βιοχημικών δεικτών της οστικής αναδιαμόρφωσης σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους και οστικές μεταστάσεις σε σχέση με τον τύπο του όγκου, τον τύπο της οστικής συμμετοχής (οστεολυτικός-οστεοβλαστικός) και το σκελετικό νεοπλασματικό φορτίο. Σε δεύτερο επίπεδο, επιχειρήσαμε να μελετήσουμε την επίδραση της θεραπείας με διφωσφονικά άλατα και ειδικότερα με ζολενδρονικό

οξύ στις τιμές των δεικτών αυτών και να ανιχνεύσουμε εάν οι παρατηρούμενες μεταβολές των δεικτών σχετίζονται με κλινικές παραμέτρους, όπως είναι η εμφάνιση σκελετικών συμβαμάτων, η πρόοδος ή υποτροπή της νόσου και η συνολική επιβίωση.

2. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πληθυσμός Μελέτης

Η μελέτη περιέλαβε ενήλικους ασθενείς με ιστολογικά ή κυτταρολογικά επιβεβαιωμένο καρκίνο του μαστού, του πνεύμονα ή του προστάτη με τουλάχιστον μια νεο-διαγνωσθείσα οστεολυτική ή οστεοβλαστική εστία επιβεβαιωμένη με απεικονιστική μέθοδο (Σπινθηρογράφημα σκελετού με ^{99}Tc). Τα κριτήρια ένταξης επίσης περιελάμβαναν: (i) Επίπεδο γενικής κατάστασης Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status μικρότερο ή ίσο του 3 (ii) ολική χολερυθρίνη <3 mg/dl; και (iii) κρεατινίνη ορού <2 mg/dl ώστε να αποφευχθούν οι επιδράσεις του δευτεροπαθούς υπερπαραθυρεοειδισμού στον οστικό μεταβολισμό. Τα κριτήρια αποκλεισμού ασθενών από τη μελέτη περιελάμβαναν: (i) χορήγηση ακτινοθεραπείας μέσα σε ένα έτος προ της ένταξης στη μελέτη ώστε να αποφευχθούν οι επιδράσεις της σχετιζόμενης με ακτινοθεραπεία οστεοπόρωσης (ii) διάγνωση οστεοπόρωσης ή χορήγηση θεραπείας υποκατάστασης με οιστρογόνα για αντιμετώπιση μεταεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης (iii) χορήγηση καλσιτονίνης, βιταμίνης D ή

συμπληρωμάτων ασβεστίου (iv) προηγηθείσα θεραπεία με διφωσφονικά και (v) γυναίκες σε κύηση ή γαλουχία.

Η ομάδα ελέγχου για τις αρχικές (baseline) μετρήσεις των δεικτών αποτελείτο από υγιείς, ομογενείς ως προς την ομάδα ασθενών σε ό,τι αφορά το φύλο και την ηλικία, εθελοντές χωρίς ιστορικό οστεοπόρωσης, κακοήθειας ή άλλης μεταβολικής διαταραχής που επηρεάζει το σκελετικό μεταβολισμό. Οι μεταεμμηνοπαυσιακές γυναίκες στην ομάδα ελέγχου αποκλείονταν από τη μελέτη εάν ελάμβαναν θεραπεία υποκατάστασης με οιστρογόνα ή ανάλογα στεροειδών για οποιοδήποτε λόγο. Όλοι οι ασθενείς έλαβαν θεραπεία με ζολενδρονικό οξύ 4 mg ενδοφλεβίως σε 100 ml διαλύματος φυσιολογικού ορού με έγχυση 30 λεπτών κατά τη διάγνωση των οστικών μεταστάσεων και άπαξ μηνιαίως στη συνέχεια, με παρακολούθηση της νεφρικής λειτουργίας και των επιπέδων ασβεστίου. Παράλληλα με τη θεραπεία με διφωσφονικό άλας, κάθε ασθενής αντιμετωπίστηκε για τη νόσο του με χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία ή συνδυασμό τους με βάση τις παρούσες συστάσεις της Ευρωπαϊκής Εταιρίας Ογκολογίας (European Society for Medical Oncology ESMO guidelines). Στις ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού ήταν επιτρεπτό να λαμβάνουν ορμονοθεραπεία με ταμοξιφαίνη ή αναστολείς αρωματάσης σε περίπτωση ορμονοευαίσθητης νόσου. Αντίστοιχα, ασθενείς με ορμονοευαίσθητο μεταστατικό καρκίνο του προστάτη όπως και ασθενείς με ορμονοανθεκτική υποτροπή μπορούσαν να συνεχίσουν τη θεραπεία ανδρογονικού αποκλεισμού με LHRH ανάλογα ή/και αντιανδρογόνα.

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με την έγκριση των επιστημονικών επιτροπών και των επιτροπών ηθικής και δεοντολογίας και των δυο κέντρων από τα οποία προέρχονταν οι ασθενείς (251 Γενικό Νοσοκομείο Αεροπορίας και Νοσοκομείο “Αλεξάνδρα”) και όλα τα στάδια της μελέτης πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές της διακήρυξης του Ελσίνκι [159].

2.2 Δείκτες Οστικού μεταβολισμού και Πειραματική Διαδικασία

Σε κάθε ασθενή αλλά και σε κάθε εθελοντή της ομάδας ελέγχου πραγματοποιήθηκε μια αρχική αιμοληψία ποσότητας 10 cc στις 10:00 πμ της ημερομηνίας ένταξης στη μελέτη που στην ομάδα των ασθενών συνέπιπτε με την ημερομηνία διάγνωσης της μεταστατικής νόσου στο σκελετό. Μετά τη φλεβοκέντηση το δείγμα φυγοκεντρούνταν άμεσα και ο ορός διαμοιραζόταν σε 4 αποθηκευτικά φιαλίδια τύπου Ebbendorf και αποθηκεύονταν στους -80°C μέχρι την ημέρα της μέτρησης. Σε κάθε ασθενή κι εθελοντή πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια της μεθόδου της ανοσοενζυμικής προσρόφησης (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)) οι παρακάτω βιοχημικοί δείκτες: sRANKL (*Biomedica Medizinprodukte, No. BI-20422H, Gesellschaft GmbH & Co KG, Wien, Austria*), OPG (*Biomedica Medizinprodukte, Gesellschaft GmbH & Co KG, Wien, Austria*), OPN (*IBL GmbH D, Hamburg, Gemany*), TRACP-5b (*BoneTRAP[®], SBA, Oulu, Finland*), CTX (*Serum CrossLaps[®], Nordic Bioscience Diagnostics A/S, Herlev, Denmark*), bALP (*Metra[®] BAP, Quidel Corporation, San Diego, CA, USA*), OC (*N/MID[®] Osteocalcin, Nordic Bioscience Diagnostics A/S, Herlev, Denmark*), και CACP (*Metra[®] CACP, Quidel Corporation, San Diego, CA,*

USA), με βάση τις τεχνικές τους προδιαγραφές και όπως έχει προηγουμένα περιγραφεί [151]. Η ίδια ακριβώς διαδικασία επαναλήφθηκε μόνο για τους ασθενείς έξι μήνες μετά την έναρξη θεραπείας με ζολενδρονικό οξύ όπως περιγράφηκε ανωτέρω.

2.3 Αρχική αξιολόγηση και παρακολούθηση ασθενών

Όλοι οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε ολοσωματικό σπινθηρογράφημα σκελετού με ^{99}Tc με το οποίο τέθηκε η διάγνωση των δευτεροπαθών οστικών εντοπίσεων. Σε περιπτώσεις αμφιλεγόμενου αποτελέσματος, διενεργήθηκε συμπληρωματικός απεικονιστικός έλεγχος με εντοπιστικές απλές ακτινογραφίες ή αξονική τομογραφία. Το σκελετικό νεοπλασματικό φορτίο σε κάθε ασθενή ποσοτικοποιήθηκε με τη βοήθεια του σταδιοποιητικού συστήματος EOD (extent of disease), [160] τροποποιημένο για το σκελετό (EOsD) ως ακολούθως: EOsD I για ασθενείς μικρό αριθμό σκελετικών εστιών (1-5), EOsD II για ασθενείς με μέτριο σκελετικό νεοπλασματικό φορτίο (6-10 βλάβες) και EOsD III είτε για ασθενείς με εκτεταμένες σκελετικές μεταστάσεις (>10 βλάβες) είτε με διάχυτη σχετιζόμενη με τον καρκίνο οστεοπενία ή οστεοπέτρωση. Το σπινθηρογράφημα επαναλαμβάνονταν ανά εξάμηνο κατά τη διάρκεια της μελέτης ή νωρίτερα επί ενδείξεων προόδου της νόσου στο σκελετό, η οποία ορίστηκε ως η εμφάνιση οποιασδήποτε νέας νεοπλασματικής εστίας στο σκελετό ή η επιδείνωση των ήδη υπάρχοντων βλαβών.

Όλοι οι ασθενείς παρακολούθηθηκαν για την εμφάνιση σκελετικών συμβαμάτων, τα οποία ορίστηκαν ως η εμφάνιση παθολογικών καταγμάτων ή η

ανάγκη για χειρουργική επέμβαση ή ακτινοβολία προκειμένου να προληφθεί ένα παθολογικό κάταγμα, η συμπίεση του νωτιαίου μυελού, η κακοήθης υπερασβεστιαμία και η κλινική επιδείνωση των οστικών αλγών σε βαθμό ώστε να απαιτείται αλλαγή του χημειοθεραπευτικού σχήματος, κάτι που παρατηρείται συχνά στον ορμονοάντοχο μεταστατικό καρκίνο του προστάτη. Η παρακολούθηση των ασθενών περιελάμβανε μηνιαία λήψη ιστορικού και κλινική εξέταση καθώς και απεικονιστικές μεθόδους (απλές ακτινογραφίες, αξονική ή μαγνητική τομογραφία) με την εμφάνιση κάθε συμπτώματος ή σημείου που θα μπορούσε να δηλώνει πρόοδο της νόσου στο σκελετό. Οι ασθενείς επίσης αξιολογήθηκαν για την εμφάνιση προόδου ή υποτροπής της νεοπλασματικής ασθένειας με μηνιαία λήψη ιστορικού και φυσικής εξέτασης, συμπεριλαμβανομένης της εκτίμησης του ECOG Performance Status και της κλίμακας άλγους της ECOG (Pain score), καθώς επίσης και με απεικονιστικές μεθόδους που περιελάμβαναν αξονικές τομογραφίες των περιοχών ενδιαφέροντος κατά τη διάγνωση των οστικών μεταστάσεων και ακολούθως ανά τρίμηνο ή νωρίτερα επί παρουσίας κλινικών ενδείξεων.

2.4 Στατιστικός Σχεδιασμός

Για κάθε βιοχημικό δείκτη καταγράφηκαν η μέση τιμή και τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95% Confidence Intervals ή 95% CI) τόσο της αρχικής αιμοληψίας (“αρχικές” τιμές) όσο και της αιμοληψίας μετά από το εξάμηνο θεραπείας με ζολενδρονικό οξύ (“πρόσφατες” τιμές). Οι αρχικές τιμές των δεικτών ελέγχθηκαν για πιθανή συσχέτιση μεταξύ τους με τη βοήθεια του

κριτηρίου χ^2 και για πιθανή συσχέτιση με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους με το test συσχέτισης του Spearman (two-tailed Spearman's correlation test). Για τον κάθε δείκτη στο σύνολο του πληθυσμού των εθελοντών και των ασθενών αλλά και για κάθε τύπο κακοήθειας ξεχωριστά (μαστός, πνεύμονας, προστάτης) κατασκευάστηκαν τα αντίστοιχα διαγράμματα κατανομής (boxplots) στα οποία απεικονίστηκαν η ενδοτεταρτημοριακή τιμή (interquartile range), οι αποκλίνουσες (outliers) και οι ακραίες (extreme) τιμές, και ελέγχθηκε για το κάθε διάγραμμα η κανονικότητα της κατανομής με τη βοήθεια των Q-Q διαγραμμάτων (Q-Q and detrended normal Q-Q plots).

Η σύγκριση των μέσων τιμών των δεικτών ανάμεσα στην κάθε ομάδα των ασθενών (μαστός, πνεύμονας, προστάτης) και την ομάδα ελέγχου (υγιείς εθελοντές) όπως επίσης και ανάμεσα στις ομάδες των ασθενών πραγματοποιήθηκε σε μονοπαραγοντικό επίπεδο με τη βοήθεια του t-test για ανεξάρτητα δείγματα ενώ η σύγκριση των τιμών των δεικτών της “αρχικής” και της “πρόσφατης” μέτρησης πραγματοποιήθηκε με το t-test για εξαρτημένα δείγματα (t-test for paired samples) σε περιπτώσεις κανονικής κατανομής του δείκτη και με το Wilcoxon test σε περιπτώσεις όπου οι τιμές του δείκτη δεν εμφάνιζαν κανονική κατανομή. Τα τεστ μονοδρομικής ανάλυσης της μεταβλητότητας (One-way analysis of variance ή ANOVA tests) μαζί με τις αντίστοιχες Post Hoc Bonferroni διορθώσεις εφαρμόστηκαν για να αξιολογηθούν οι μεταβολές στις τιμές των δεικτών πριν και μετά τη θεραπεία με ζολενδρονικό οξύ για κάθε τύπο όγκου ξεχωριστά. Σε περίπτωση που το test ομογένειας της μεταβλητότητας (test of homogeneity of variance) ήταν θετικό (Levene statistic

<0.05), τότε εφαρμοζόταν το μη παραμετρικό test για k ανεξάρτητες μεταβλητές (Kruskal-Willis test).

Στη συνέχεια κατασκευάστηκαν οι καμπύλες Kaplan-Meier για το χρόνο μέχρι την εμφάνιση σκελετικού συμβάματος (time to skeletal-related events ή SRE) όπως αυτό ορίστηκε ανωτέρω (παράγραφος 2.3), το χρόνο μέχρι την υποτροπή ή πρόοδο της νόσου (time to recurrence or disease progression) και τη συνολική επιβίωση (overall survival ή OS) και το log-rank test χρησιμοποιήθηκε για να συγκριθούν σε μονοπαραγοντικό επίπεδο τα διαστήματα ελεύθερα σκελετικού συμβάματος, ελεύθερα πρόοδου νόσου και οι συνολικές επιβιώσεις μεταξύ των υποομάδων των ασθενών. Πολυπαραγοντικά μοντέλα πολλαπλών γεγονότων (multiple event regression models) εφαρμόστηκαν για να αξιολογηθεί η προβλεπτική και η προγνωστική αξία της μεταβολής κάθε δείκτη για όλα τα σκελετικά συμβάματα, μια και αυτά μπορεί να συμβούν επαναλαμβανόμενα στον ίδιο ασθενή. Τέλος, πολυπαραγοντικά μοντέλα Cox (Cox regression models) χρησιμοποιήθηκαν για να εκτιμηθεί η συσχέτιση ανάμεσα στις μεταβολές στις τιμές των δεικτών και το χρόνο μέχρι την εμφάνιση σκελετικού συμβάματος, πρόοδου ή υποτροπής της νόσου και συνολικής επιβίωσης. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού συστήματος SPSS 13.0 (copyright 2006).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Χαρακτηριστικά Πληθυσμού

Από τον Μάρτιο του 2004 έως τον Αύγουστο του 2005, εβδομήντα (70) ασθενείς που πληρούσαν τα κριτήρια ένταξης εντάχθηκαν στη μελέτη (36 άνδρες, 34 γυναίκες, μέση ηλικία 63 έτη, εύρος 31-81 έτη). Σαράντα (40) υγιείς εθελοντές (18 άνδρες, 22 γυναίκες, μέση ηλικία: 65 έτη, εύρος: 32-78 έτη) συμμετείχαν στην ομάδα ελέγχου. Για την ομάδα των ασθενών τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά δίδονται στον πίνακα 7. Η διάμεση τιμή του χρόνου από την “αρχική” μέτρηση των δεικτών (έναρξη θεραπείας με ζολενδρονικό οξύ) μέχρι την “πρόσφατη” μέτρηση ήταν έξι μήνες (εύρος: 2-10 μήνες). Με μια ενδιάμεση παρακολούθηση 32 μηνών (εύρος 3-124 μήνες), σχεδόν το ήμισυ του πληθυσμού των ασθενών (48.6%) παρουσίασε τουλάχιστον ένα σκελετικό σύμβαμα, με πιο συχνά το παθολογικό κάταγμα και την εφαρμογή τοπικής ακτινοθεραπείας για πρόληψη παθολογικού κατάγματος.

Πίνακας 7. Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού των ασθενών της μελέτης.

| | | N | % |
|---|-------------------|-------------|----------|
| Σύνολο | | 70 | |
| Ηλικία | Μέση (έτη) | 63.07 | |
| | Εύρος (έτη) | 31.24-81.08 | |
| Φύλο | Άνδρες | 36 | 51.4 |
| | Γυναίκες | 34 | 48.6 |
| Πρωτοπαθής εστία | Μαστός | 30 | 42.9 |
| | Πνεύμονας | 18 | 25.7 |
| | Προστάτης | 22 | 31.4 |
| Βαθμός διαφοροποίησης | I | 2 | 2.9 |
| | II | 37 | 52.9 |
| | III | 31 | 44.3 |
| ECOG Performance Status | 0 | 15 | 21.4 |
| | 1 | 38 | 54.3 |
| | 2 | 16 | 22.9 |
| | 3 | 1 | 1.4 |
| ECOG Pain score | 0 | 7 | 10 |
| | 1 | 27 | 38.6 |
| | 2 | 21 | 30 |
| | 3 | 12 | 17.1 |
| | 4 | 3 | 4.3 |
| Αναλγητική θεραπεία | Ναι | 52 | 74.3 |
| | Όχι | 18 | 25.7 |
| Εντόπιση σκελετικής νόσου | Αυχενική μοίρα ΣΣ | 8 | 11.4 |
| | Θωρακική μοίρα ΣΣ | 33 | 47.1 |
| | Οσφυϊκή μοίρα ΣΣ | 22 | 31.4 |
| | Θωρακικός κλωβός | 32 | 45.7 |
| | Λεκάνη | 27 | 38.6 |
| | Άκρα | 20 | 28.6 |
| | Κρανίο | 11 | 15.7 |
| Τύπος σκελετικής συμμετοχής | Οστεολυτικός | 35 | 50 |
| | Οστεοβλαστικός | 21 | 30 |
| | Μεικτός | 14 | 20 |
| Προηγηθείσα εξωτερική Ακτινοθεραπεία | Ναι | 31 | 44.3 |
| | Όχι | 39 | 55.7 |
| Υποτροπή νόσου | Ναι | 48 | 68.6 |
| | Όχι | 22 | 31.4 |
| Εστία υποτροπής | Ήπαρ | 16 | 22.9 |
| | Πνεύμονες* | 25 | 35.7 |
| | Λεμφαδένες** | 15 | 21.4 |

| | | | |
|------------------------------------|--|----|------|
| | Κ.Ν.Σ. | 6 | 8.6 |
| | Επινεφρίδια | 2 | 2.9 |
| | Νεφροί | 1 | 1.4 |
| | Τοπικοπεριοχική*** | 5 | 7.1 |
| Σκελετικά συμβάματα | Ναι | 34 | 48.6 |
| | Όχι | 36 | 51.4 |
| Τύπος σκελετικού συμβάματος | Τοπική ακτινοθεραπεία | 24 | 34.3 |
| | Κάταγμα | 14 | 20 |
| | Συμπίεση νωτιαίου μυελού | 5 | 7.1 |
| | Χειρουργική αποκατάσταση | 7 | 10 |
| | Αλλαγή αντινεοπλασματικής θεραπείας ⁺ | 1 | 1.4 |
| | Κακοήθης υπερασβεστιαμία | 1 | 1.4 |

* : πλην των ασθενών με πρωτοπαθή εστία στον πνεύμονα

** : απομακρυσμένοι (οι επιχώριοι θεωρούνται τοπικοπεριοχική υποτροπή)

*** : αφορά υποτροπή της πρωτοπαθούς εστίας ή των επιχώριων λεμφαδένων

+ : αφορά ασθενείς με καρκίνο του προστάτη που εμφανίζουν σημαντική κλινική επιδείνωση των οστικών αλγών η οποία απαιτεί αλλαγή της αντινεοπλασματικής αγωγής

3.2 Αρχικές τιμές δεικτών

3.2.1 Σύγκριση ομάδας ασθενών-ομάδας ελέγχου

Η σύγκριση των μέσων τιμών των βιοχημικών δεικτών της αρχικής μέτρησης ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και ίσου αριθμού ασθενών με ομολογία ως προς το φύλο και την ηλικία απεικονίζονται στον πίνακα 8. Η ομάδα των ασθενών είχε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα δεικτών οστεοκλαστικής δραστηριότητας και ειδικότερα των sRANKL ($p=0.004$), TRACP-5b ($p=0.022$) και OPN ($p<0.0001$) αλλά όχι του CTX ($p=0.49$) σε σύγκριση με τους υγιείς εθελοντές. Οι δείκτες οστεοβλαστικής δραστηριότητας ήταν επίσης σημαντικά αυξημένοι, συμπεριλαμβανομένων των OPG ($p<0.0001$) και bALP ($p<0.0001$) αλλά όχι του CICP ($p=0.26$), ενώ τα επίπεδα OC ήταν σημαντικά χαμηλότερα στην ομάδα των ασθενών ($p=0.0001$) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (εικόνα 11).

Πίνακας 8. Σύγκριση των μέσων τιμών των βιοχημικών δεικτών της αρχικής μέτρησης ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και ίσου αριθμού ασθενών με ομολογία ως προς το φύλο και την ηλικία.

| | ΑΣΘΕΝΕΙΣ | | ΕΘΕΛΟΝΤΕΣ | | P-VALUE |
|--|-----------------|---------------|------------------|---------------|-------------------|
| | ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ | 95% C. I. | ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ | 95% C. I. | |
| sRANKL (pmol/L) | 1.99 | 1.07 - 2.91 | 0.93 | 0 - 1.87 | 0.004 |
| OPG (pmol/L) | 9.19 | 7.20 - 11.17 | 5.9 | 4.23 - 7.57 | <0.0001 |
| sRANKL/OPG (x10⁻²) | 24.6 | 11.74 - 37.46 | 13 | 3.43 - 22.57 | 0.015 |
| TRACP-5b (U/L) | 2.4 | 1.91 - 2.89 | 1.94 | 1.61- 2.27 | 0.022 |
| CTX (ng/mL) | 0.6 | 0.49 - 0.93 | 0.61 | 0.57-0.86 | 0.49 |
| OPN (ng/mL) | 141.42 | 72.55-210.29 | 32.67 | 13.74 - 51.6 | <0.0001 |
| bALP (IU/L) | 53.45 | 31.92 - 74.98 | 25.8 | 19.73 - 31.87 | <0.0001 |
| OC (ng/mL) | 11.9 | 5.82 - 17.98 | 19.78 | 16.02 - 23.54 | 0.0001 |
| CICP (ng/mL) | 20.95 | 0 -120.9 | 23.78 | 0 - 124.04 | 0.26 |

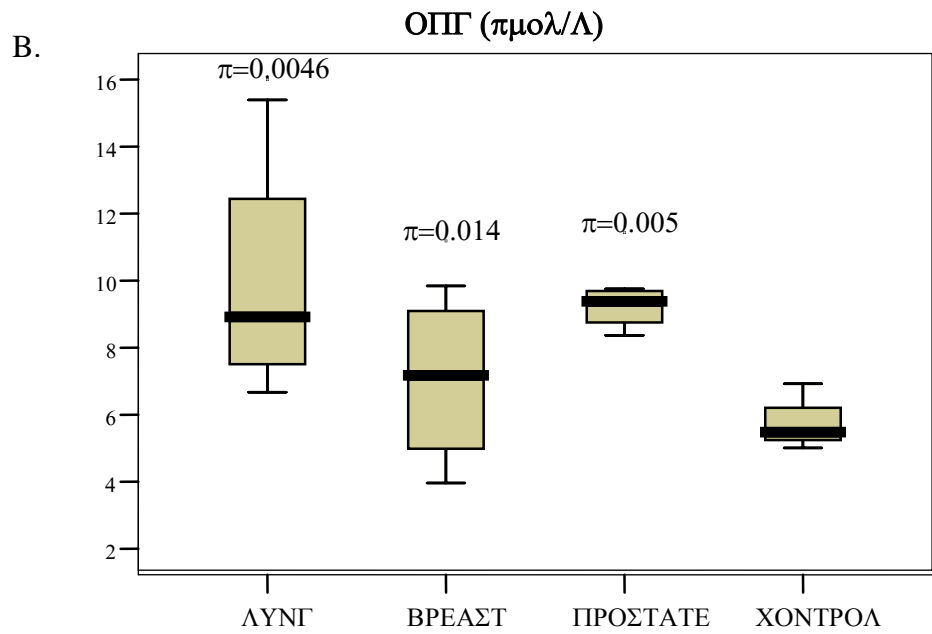
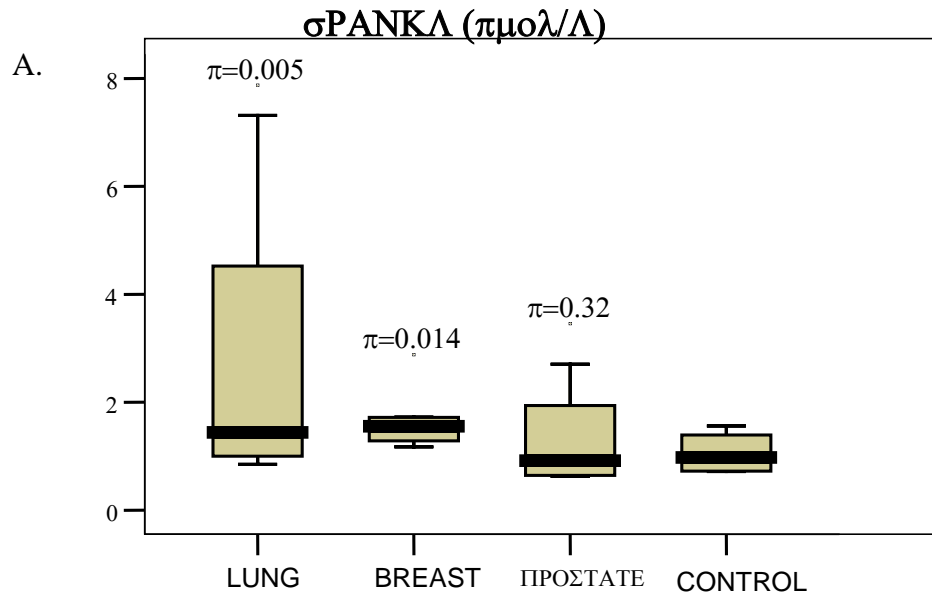
sRANKL: soluble receptor activator of nuclear factor-kB ligand,
 OPG: osteoprotegerin, OPN: osteopontin,
 TRACP-5b: 5b isoenzyme of tartrate resistant acid phosphatase,
 CTX: C-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen,
 bALP: bone alkaline phosphatase, OC: osteocalcin and CICP: C-terminal propeptide of procollagen type I.

3.2.2 Σύγκριση με βάση τον τύπο κακοήθειας (εικόνα 11)

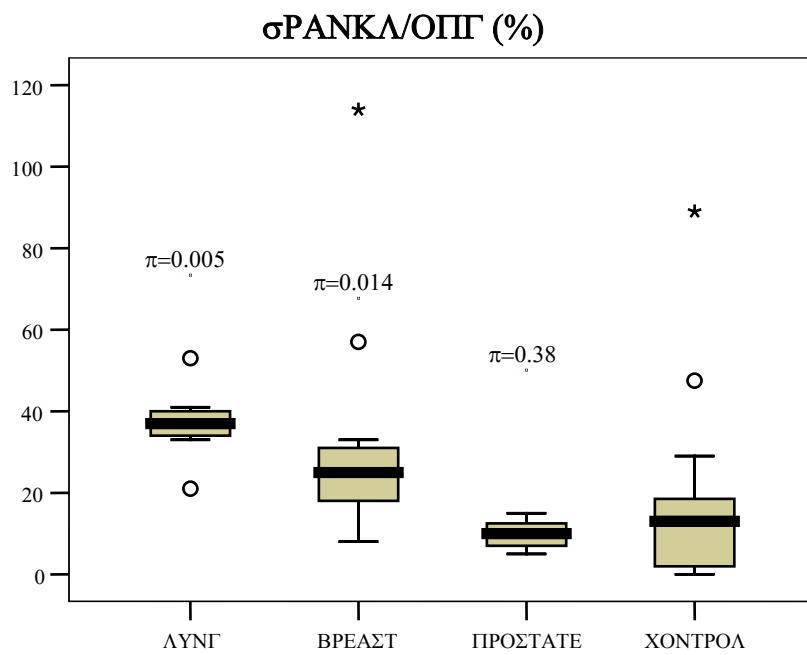
Τα αρχικά επίπεδα του RANKL ήταν σημαντικά υψηλότερα στους ασθενείς με καρκίνο του μαστού ή πνεύμονα σε σύγκριση με τους ασθενείς με προστατικό καρκίνο, ενώ αντίθετα τα επίπεδα OPG ήταν σημαντικά αυξημένα και στις τρεις κατηγορίες ασθενών, με αποτέλεσμα ένα σημαντικά ελαττωμένο λόγο RANKL/OPG για τους ασθενείς με προστατικό καρκίνο σε σύγκριση με τον καρκίνο του μαστού (πίνακας 9 και εικόνα 11). Οι ασθενείς με καρκίνο του προστάτου εμφάνιζαν επίσης σημαντικά υψηλότερα επίπεδα bALP και σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα OPN σε σχέση με τις άλλες δυο ομάδες ασθενών.

3.2.3 Συσχέτιση με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους

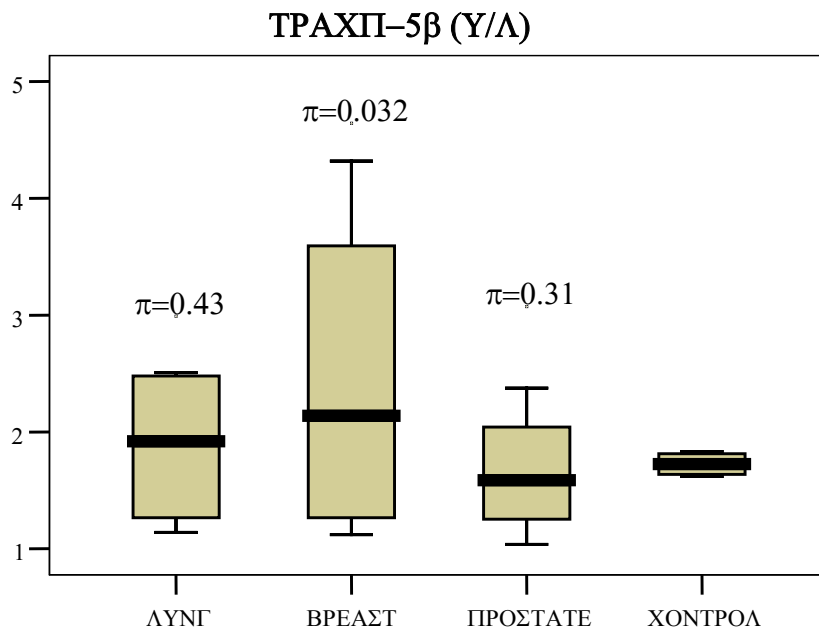
Οι αρχικές τιμές των δεικτών στην ομάδα των ασθενών δεν συσχετιζόνταν μεταξύ τους, με την εξαίρεση μιας τάσης, αν και όχι στατιστικά σημαντικής, για συσχέτιση ανάμεσα σε RANKL και TRACP-5b ($p=0.190$), RANKL και OPN ($p=0.166$) και bALP και OPG ($p=0.196$). Το test συσχέτισης του Spearman's έδειξε ότι οι αρχικές τιμές bALP συσχετιζόνταν με το pain score στη διάγνωση ($p=0.098$). Η ηλικία ως συνεχής μεταβλητή συσχετιζόταν με τις αρχικές τιμές bALP, RANKL και του λόγου RANKL/OPG ($p=0.097$, 0.008 και 0.017 αντίστοιχα), με αύξηση των τιμών των δεικτών αυτών με την πρόοδο της ηλικίας. Τα επίπεδα OPG στο σύνολο του πληθυσμού συσχετιζόνταν ικανοποιητικά με το σκελετικό νεοπλασματικό φορτίο EOsD (εικόνα 12). Δεν παρατηρήθηκε καμιά άλλη συσχέτιση μεταξύ των αρχικών τιμών των δεικτών και κάποιας άλλης κλινικοπαθολογικής παραμέτρου.



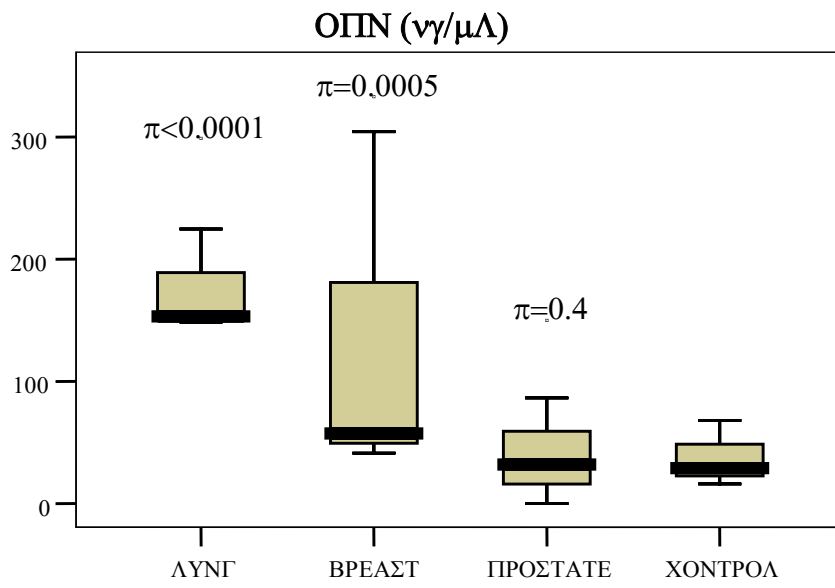
C.



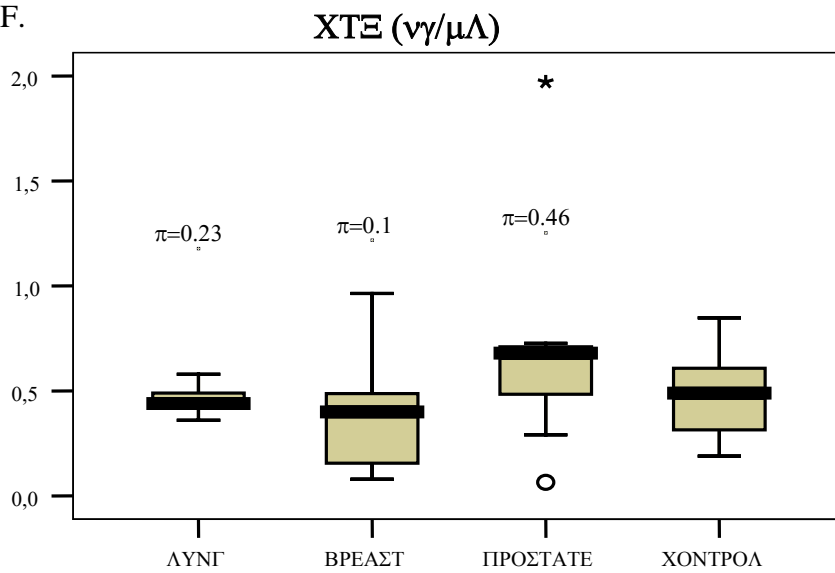
D.

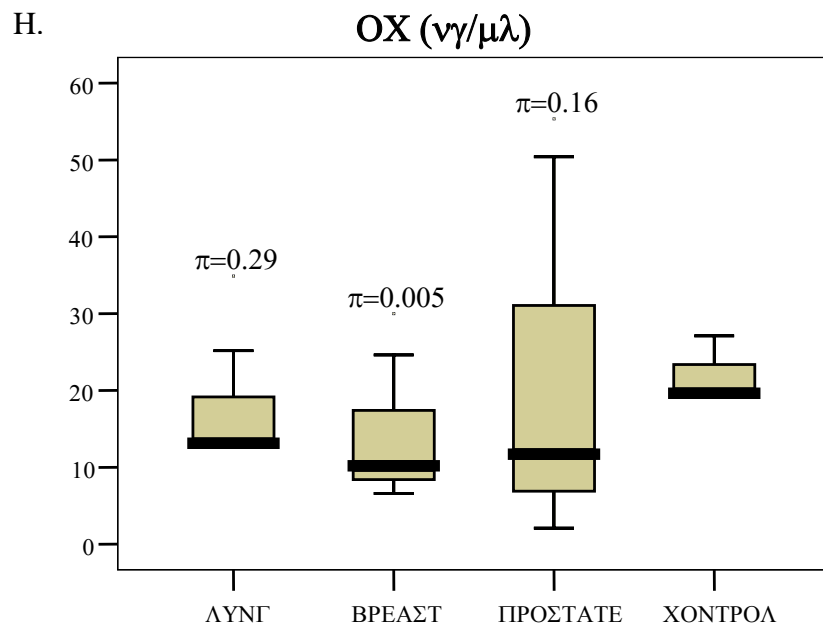
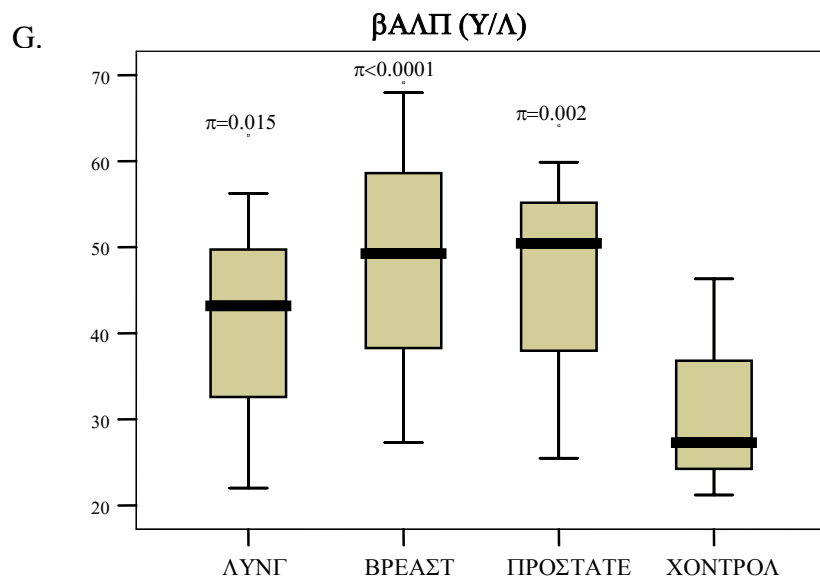


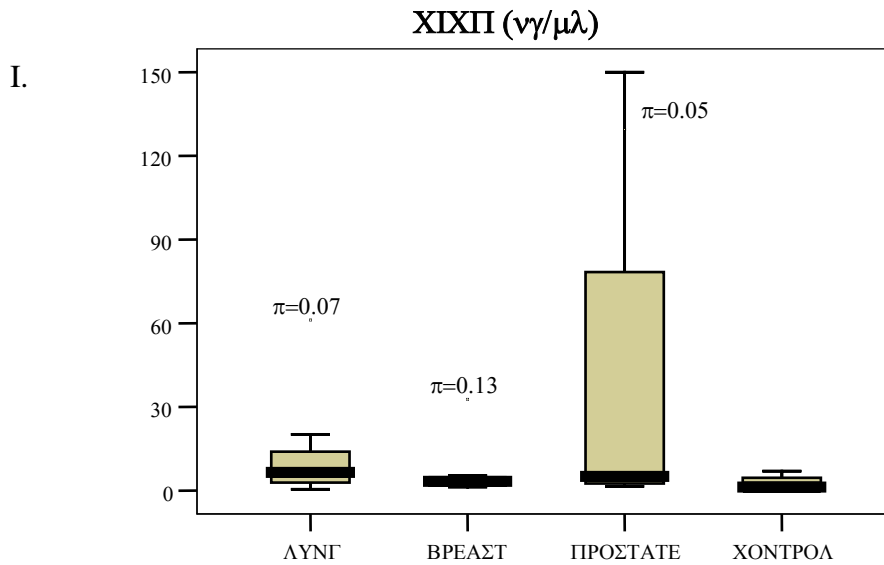
E.



F.







Εικόνα 11 (A-I): Συγκριτική κατανομή των επιπέδων των δεικτών οστικής αναδιαμόρφωσης για κάθε μια από τις κατηγορίες ασθενών (πνεύμονας, μαστός, προστάτης) και την ομάδα ελέγχου. Ο βαθμός στατιστικής συσχέτισης για κάθε μια από τις ομάδες απεικονίζεται με την αντίστοιχη τιμή p. Ο κάθε κύλινδρος απεικονίζει τη διάμεση τιμή, την ενδοτεταρτημοριακή κατανομή, τις αποκκλίνουσες και τις ακραίες τιμές για κάθε ομάδα.

sRANKL: soluble receptor activator of nuclear factor-kB ligand,

OPG: osteoprotegerin, OPN: osteopontin,

TRACP-5b: 5b isoenzyme of tartrate resistant acid phosphatase,

CTX: C-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen,

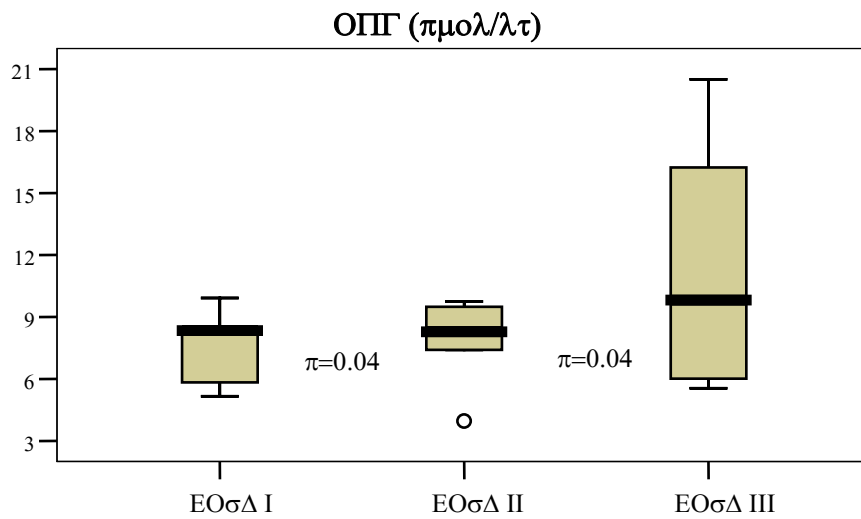
bALP: bone alkaline phosphatase,

OC: osteocalcin

CICP: C-terminal propeptide of procollagen type I

Πίνακας 9. Αρχικές και πρόσφατες τιμές των βιοχημικών δεικτών οστικού μεταβολισμού των ασθενών της μελέτης.

| | | Βασική μέτρηση Μέση τιμή (95% CI) | Δεύτερη μέτρηση Μέση τιμή (95% CI) | p* |
|---|--------------|--|---|--------------|
| RANKL (pmol/lt) | Total | 0.94 (0.63-1.25) | 0.73 (0.50-0.96) | 0.319 |
| | Breast | 1.04 (0.60-1.48) | 0.80 (0.55-1.05) | 0.480 |
| | Lung | 1.13 (0.21-2.04) | 0.62 (0.26-0.97) | 0.384 |
| | Prostate | 0.68 (0.18-1.17) | 0.72 (0.12-1.33) | 0.874 |
| OPG (pmol/lt) | Total | 8.97 (7.93-10.02) | 8.91 (7.92-9.90) | 0.988 |
| | Breast | 9.24 (7.37-11.11) | 8.89 (7.26-10.52) | 0.428 |
| | Lung | 8.50 (6.52-10.49) | 8.22 (6.56-9.88) | 0.507 |
| | Prostate | 8.91 (7.30-10.51) | 9.40 (7.46-11.35) | 0.342 |
| RANKL/OPG Ratio X 100 (%) | Total | 11.08 (6.26-15.9) | 7.96 (5.39-10.54) | 0.195 |
| | Breast | 14.17 (5.82-22.51) | 8.96 (6.26-11.65) | 0.214 |
| | Lung | 9.60 (1.87-21.06) | 5.58 (2.29-8.87) | 0.377 |
| | Prostate | 7.46 (1.05-13.87) | 8.06 (0.99-15.12) | 0.748 |
| TRACP-5b (U/lt) | Total | 3.02 (2.35-3.70) | 2.94 (2.31-3.57) | 0.714 |
| | Breast | 2.73 (2.09-3.37) | 2.63 (1.79-3.47) | 0.665 |
| | Lung | 2.22 (1.90-2.54) | 2.41 (1.65-3.16) | 0.778 |
| | Prostate | 4.03 (2.07-5.99) | 3.74 (2.19-5.30) | 0.644 |
| CTX (ng/ml) | Total | 0.66 (0.49-0.83) | 0.47 (0.32-0.61) | 0.003 |
| | Breast | 0.52 (0.30-0.75) | 0.42 (0.24-0.60) | 0.285 |
| | Lung | 0.69 (0.46-0.91) | 0.40 (0.29-0.52) | 0.012 |
| | Prostate | 0.86 (0.40-1.32) | 0.60 (0.17-1.02) | 0.019 |
| bALP (U/lt) | Total | 58.71 (49.30-68.12) | 58.33 (46.88-69.78) | 0.446 |
| | Breast | 51.95 (41.48-62.62) | 57.86 (43.38-72.35) | 0.364 |
| | Lung | 52.31 (43.59-61.03) | 54.53 (29.89-79.17) | 0.469 |
| | Prostate | 75.84 (46.76-104.93) | 62.60 (34.68-90.53) | 0.138 |
| Osteopontin (ng/ml) | Total | 59.16 (36.55-81.77) | 44.27 (21.62-66.91) | 0.687 |
| | Breast | 72.82 (36.42-109.22) | 64.90 (23.85-105.96) | 0.574 |
| | Lung | 63.45 (15.15-111.75) | 39.77 (9.4-88.94) | 0.308 |
| | Prostate | 33.18 (5.26-71.61) | 15.72 (2.47-33.91) | 0.408 |
| | | | | |



Εικόνα 12. Συγκριτική κατανομή των επιπέδων οστεοπροτεγερίνης (OPG) για το σύνολο του πληθυσμού των ασθενών με βάση το σκελετικό νεοπλασματικό φορτίο. Ο βαθμός στατιστικής συσχέτισης για κάθε μια από τις ομάδες απεικονίζεται με την αντίστοιχη τιμή p . Ο κάθε κύλινδρος απεικονίζει τη διάμεση τιμή, την ενδοτεταρτημοριακή κατανομή, τις αποκκλίνουσες και τις ακραίες τιμές για κάθε ομάδα.

3.3 Μεταβολές δεικτών μετά τη θεραπεία με ζολενδρονικό οξύ (Εικόνα 13)

Μεταξύ των δεικτών της οστικής απορρόφησης, τα επίπεδα του CTX βρέθηκαν να είναι σημαντικά ελαττωμένα στο σύνολο του πληθυσμού κατά τη δεύτερη (“πρόσφατη”) μέτρηση σε σχέση με την αρχική ($p=0.003$). Μια πτωτική τάση, αν και όχι στατιστικά σημαντική, καταγράφηκε επίσης και για το λόγο RANKL/OPG ($p=0.195$), με την εξαίρεση των ασθενών με προστατικό καρκίνο (Πίνακας 9). Δεν διαπιστώθηκε επίσης κάποια συσχέτιση ανάμεσα στις μεταβολές των τιμών των δεικτών και την καταγραφείσα μεταβολή στο ECOG Performance Status (PS) ή το Pain Score (PSc) από την αρχική στη δεύτερη μέτρηση, με την εξαίρεση μιας τάσης, αν και όχι στατιστικά σημαντικής, για συσχέτιση μεταξύ της βελτίωσης του Pain Score και της μείωσης των επιπέδων bALP ($p=0.105$). Το Wilcoxon test για μη παραμετρικά συνδεδεμένα δείγματα έδειξε ότι το PSc βελτιώθηκε σημαντικά από την αρχική στην πρόσφατη μέτρηση ($p<0.0001$) σε αντίθεση με το PS ($p=0.269$).

3.4 Μεταβολές δεικτών και σκελετική νοσηρότητα

Χρησιμοποιώντας ως κριτήριο το αν τα επίπεδα των δεικτών στο πλάσμα αυξήθηκαν ή μειώθηκαν μετά τη θεραπεία με ζολενδρονικό οξύ, μελετήσαμε τη συσχέτιση ανάμεσα στη μεταβολή του δείκτη ως κατηγορική μεταβλητή (αύξηση ή μείωση) και την επίπτωση των σκελετικών συμβαμάτων (Skeletal-Related Events ή SRE). Σε πολυπαραγοντικό επίπεδο εφαρμόστηκαν μοντέλα πολλαπλών γεγονότων (multiple event regression models) για να αξιολογηθεί η

συσχέτιση ανάμεσα σε κλινικοπαθολογικές παραμέτρους ή μεταβολές των τιμών των δεικτών (αύξηση vs μείωση) και την εμφάνιση σκελετικών συμβαμάτων (ωαι vs όχι). Διαπιστώθηκε ότι το προχωρημένο PS κατά τη διάγνωση (PS 2 ή 3 vs 0 ή 1) εμφάνιζε τάση συσχέτισης με την εμφάνιση SRE (HR=2.28, 95%CI:0.71-7.29, $p=0.167$), αλλά καμιά άλλη από τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους, συμπεριλαμβανομένων του τύπου του όγκου (μαστός ή πνεύμονας vs προστάτης), η ηλικία ως συνεχής μεταβλητή, το φύλο και ο τύπος της σκελετικής βλάβης (οστεολυτικός ή μικτός vs οστεοβλαστικός) δεν εμφάνιζε συσχέτιση με την επίπτωση σκελετικών συμβαμάτων. Σε ό,τι αφορά τους βιοχημικούς δείκτες οστικού μεταβολισμού, η ελάττωση στα επίπεδα του TRACP-5b μετά τη θεραπεία με ζολενδρονικό οξύ για έξι μήνες συσχετίστηκε με ελαττωμένη εμφάνιση σκελετικών συμβαμάτων (HR=0.396, 95%CI:0.14-1.10, $p=0.076$) και η προβλεπτική αξία του δείκτη βελτιωνόταν ελαφρά όταν το PS κατά τη διάγνωση προστέθηκε στο πολυπαραγοντικό μοντέλο ($p=0.051$). Για όλους τους άλλους βιοχημικούς δείκτες, η αύξηση στα επίπεδα πλάσματος μετά τη θεραπεία με ζολενδρονικό οξύ δεν συχετίστηκε με αυξημένη επίπτωση σκελετικών συμβαμάτων (Πίνακας 10).

Πίνακας 10. Συσχέτιση των μεταβολών των δεικτών με την επιπτώση σκελετικών συμβαμάτων, υποτροπής ή προόδου νόσου και θανάτου.

| | | Hazard Ratio | 95% CI | p |
|--|-----------|---------------------|---------------|--------------|
| SRE | RANKL | 0.50 | 0.18-1.37 | 0.178 |
| | OPG | 1.85 | 0.66-5.20 | 0.242 |
| | RANKL/OPG | 0.51 | 0.18-1.42 | 0.194 |
| | TRACP-5b | 0.40 | 0.14-1.10 | 0.076 |
| | CTX | 1.65 | 0.53-5.09 | 0.384 |
| | bALP | 0.88 | 0.31-2.49 | 0.812 |
| | OPN | 1.30 | 0.47-3.59 | 0.612 |
| Υποτροπή/ Πρόοδος νόσου | RANKL | 0.77 | 0.26-2.25 | 0.629 |
| | OPG | 1.68 | 0.56-5.06 | 0.356 |
| | RANKL/OPG | 0.95 | 0.32-2.84 | 0.923 |
| | TRACP-5b | 0.69 | 0.23-2.06 | 0.511 |
| | CTX | 1.21 | 0.36-4.10 | 0.760 |
| | bALP | 1.18 | 0.38-3.69 | 0.776 |
| | OPN | 1.10 | 0.36-3.32 | 0.866 |
| Θάνατος | RANKL | 1.50 | 0.55-4.09 | 0.427 |
| | OPG | 1.61 | 0.57-4.50 | 0.367 |
| | RANKL/OPG | 0.75 | 0.26-2.11 | 0.586 |
| | TRACP-5b | 0.44 | 0.16-1.23 | 0.119 |
| | CTX | 1.23 | 0.40-3.81 | 0.720 |
| | bALP | 1.79 | 0.41-3.36 | 0.758 |
| | OPN | 1.69 | 0.60-4.78 | 0.317 |

3.5 Μεταβολές δεικτών και διάστημα ελεύθερο προόδου νόσου

Μετά από ένα διάμεσο διάστημα παρακολούθησης 32 μηνών, 48 ασθενείς (68.6%) εκδήλωσαν υποτροπή της νόσου ύστερα από ένα διάμεσο διάστημα έξι μηνών (εύρος: 1 έως 107 μήνες) από τη διάγνωση της σκελετικής συμμετοχής. Οι πιο συχνές θέσεις υποτροπής περιελάμβαναν το ήπαρ, τους πνεύμονες και τους απομακρυσμένους λεμφαδένες (Πίνακας 7). Όπως ήταν

αναμενόμενο, οι ασθενείς με προστατικό καρκίνο είχαν μια σχεδόν 75% χαμηλότερη πιθανότητα υποτροπής ή προόδου της νόσου σε σχέση με τους ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα ή μαστού (HR=0.26, 95%CI: 0.09-0.78, $p=0.017$). Στην πολυπαραγοντική ανάλυση, κανείς από τους δείκτες οστικής αναδιαμόρφωσης δε συσχετίσθηκε με υποτροπή ή πρόοδο της νόσου (Πίνακας 10).

3.6 Μεταβολές δεικτών και συνολική επιβίωση

Μέχρι την ημερομηνία ανάλυσης των δεδομένων (3/8/2008), 40 θάνατοι από οποιαδήποτε αιτία είχαν καταγραφεί. Ο τύπος του όγκου (πνεύμονας ή μαστός vs προστάτης) ήταν ο μόνος ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για τη συνολική επιβίωση στο σύνολο του πληθυσμού (HR=0.14, 95%CI: 0.05-0.43, $p<0.001$ για τους ασθενείς με προστατικό καρκίνο) και η συνολική απόδοση του πολυπαραγοντικού μοντέλου βελτιώθηκε περαιτέρω όταν το PS κατά τη διάγνωση προστέθηκε στο πολυπαραγοντικό μοντέλο ($p=0.0007$). Και στην περίπτωση αυτή, η αύξηση των τιμών των δεικτών μετά από έξι μήνες θεραπείας με ζολενδρονικό οξύ δε συσχετίσθηκε με αυξημένο κίνδυνο θανάτου και κανείς από τους δείκτες δεν ήταν ικανός να βελτιώσει την απόδοση του προαναφερθέντος πολυπαραγοντικού μοντέλου (πίνακας 10).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αν και το σπινθηρογράφημα οστών με ραδιονουκλίδιο έχει παραδοσιακά χρησιμοποιηθεί για τη διάγνωση οστικών μεταστάσεων σε ασθενείς με νεοπλασματικές ασθένειες, οι επανειλημμένοι έλεγχοι είναι εργώδεις και κοπιώδεις τόσο για τον ασθενή όσο και για το ιατρικό και παραϊατρικό προσωπικό και το σκελετικό νεοπλασματικό φορτίο είναι δύσκολο να προσδιοριστεί με αυτό τον τρόπο. Κατά συνέπεια, μια εξέταση αίματος ή ούρων που θα μπορούσε να ανιχνεύσει έγκαιρα τη διαταραχή στη διαδικασία της οστικής αναδιαμόρφωσης και να προβλέψει τη σκελετική νοσηρότητα σε ασθενείς με οστικές μεταστάσεις που λαμβάνουν θεραπεία με διφωσφονικά άλατα θα ήταν κλινικά ιδιαίτερα χρήσιμη.

Η πρόσφατη ανακάλυψη του άξονα RANKL/OPG ως ενός σημαντικού ρυθμιστή της κατεύθυνσης της οστικής αναδιαμόρφωσης προς την πλευρά της οστεοκλαστικής ή οστεοβλαστικής δραστηριότητας έχει αυξήσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας στη μελέτη των σύνθετων αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στα νεοπλασματικά κύτταρα και το οστικό μικροπεριβάλλον [64,97,119]. Ο πυρηνικός παράγοντας κΒ, που είναι ο τελικός στόχος του μονοπατιού RANKL/RANK, παίζει ένα ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης προ-φλεγμονωδών παραγόντων, με αποτέλεσμα την επαγωγή της σύνθεσης κυτταροκινών, μορίων προσκόλλησης, χημειοκινών και αυξητικών παραγόντων [83,122]. Έτσι, το σύστημα RANKL/OPG κατέχει ένα ρόλο-κλειδί σε μια ποικιλία νοσημάτων του ερειστικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένων της

οστεοπόρωσης, της φλεγμονώδους και της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, της νόσου Paget και ιδιαίτερα του πολλαπλού μυελώματος, όπου ο λόγος RANKL/OPG έχει προταθεί ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγων [152].

Στους συμπαγείς όγκους με σκελετικές μεταστάσεις ο σημαντικός ρόλος του συστήματος RANKL/OPG είναι επίσης καλά τεκμηριωμένος [161]. Στην παρούσα μελέτη και στο σύνολο των ασθενών με καρκίνο μαστού, πνεύμονα ή προστάτη, φαίνεται ότι η διαταραχή στην ισορροπία της οστικής αναδιαμόρφωσης προκαλείται από αντίστοιχη διαταραχή της ισορροπίας του συστήματος sRANKL/OPG είτε προς την κατεύθυνση της οστικής αποδόμησης είτε του οστικού σχηματισμού, οδηγώντας σε αντίστοιχες αλλαγές στα επίπεδα των βιοχημικών δεικτών του οστικού μεταβολισμού (Πίνακας 8). Τα επίπεδα OPG, ειδικότερα, μπορούσαν να προβλέψουν με ασφάλεια την έκταση του σκελετικού νεοπλασματικού φορτίου (Εικόνα 12), [151]. Τα αποτελέσματα δείχνουν επίσης ότι οι ασθενείς με καρκίνο του μαστού ή του πνεύμονα χαρακτηρίζονται από διαταραχή του άξονα RANKL/OPG με υπεροχή του RANKL με αποτέλεσμα μια αυξημένη οστεοκλαστική δραστηριότητα. Η επακόλουθη αύξηση των επιπέδων TRACP-5b και OPN αντανakλούν την υπέρμετρη οστική απορρόφηση σε αυτές τις κατηγορίες ασθενών, ενώ η αύξηση στα επίπεδα bALP και OPG πιθανώς αντιπροσωπεύει ένα επιγενές αντιροποιστικό αποτέλεσμα αντιδραστικού οστικού σχηματισμού, το οποίο, όμως, δεν μπορεί να εξισορροπήσει την αυξημένη οστική καταστροφή (Πίνακας 8).

Τα επίπεδα OPN βρέθηκαν ιδιαίτερα αυξημένα στους ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, επιβεβαιώνοντας την αιτιοπαθογενετική συσχέτιση αυτής της

κυτταροκίνης με ένα ευρύ φάσμα πνευμονοπαθειών, όπως το πνευμονικό κοκκίωμα, πνευμονική ίνωση και καρκίνο του πνεύμονα [162]. Η OPN φαίνεται να παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην πνευμονική καρκινογένεση πυροδοτώντας την έκφραση ενεργοποιητών του πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης και αυξάνοντας την κυτταρική μετανάστευση κι έκφραση μορίων προσκόλλησης, συμβάλλοντας έτσι στην νεοπλασματική εκτροπή και τη μετάσταση [163]. Επειδή η OPN αυξάνεται με την ιστική υποξία που προκαλεί ο αναπτυσσόμενος όγκος, είναι πολύ πιθανό ότι τα υψηλά επίπεδα OPN σχετίζονται με την αντοχή του όγκου στη χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία. Οι Fedarko και συνεργάτες έδειξαν ότι τα αυξημένα επίπεδα OPN μπορούσαν να διαγνώσουν με ακρίβεια περιπτώσεις καρκίνων του πνεύμονα, μαστού, προστάτη και παχέος εντέρου ακόμη κι επί απουσίας οστικών μεταστάσεων [164]. Η τελευταία παρατήρηση είναι ιδιαίτερα σημαντική μια και υπονοεί ένα ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο της OPN στην βιολογία της καρκινογένεσης ακόμη και αν η νόσος δεν εμπλέκει άμεσα το σκελετό. Οι Schneider και συνεργάτες ανακοίνωσαν πρόσφατα ότι η mRNA έκφραση OPN είναι ένας ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας σε πλήρως εξαιρεθέντα μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα [165]. Στην παρούσα μελέτη, αν και τα επίπεδα OPN μειώθηκαν μετά από τη χορήγηση διφωσφονικών σε όλες τις ομάδες των ασθενών, η μείωση δεν έφτασε σε επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας σε καμιά κατηγορία ασθενών και αυτό οφείλεται κατά κύριο λόγο στην υψηλή βιολογική μεταβλητότητα του δείκτη, η οποία οδηγεί σε ευρέα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης. Ο περιορισμένος αριθμός ασθενών με καρκίνο του

πνεύμονα που εντάχθηκαν στη μελέτη (N=18) δεν επέτρεψε την εκτίμηση της προγνωστικής αξίας της OPN σε αυτή την υποομάδα ασθενών ειδικότερα.

Οι ασθενείς με προστατικό καρκίνο μεταστατικό στο σκελετό φαίνεται να ακολουθούν ένα αρκετά διαφορετικό “μοντέλο” διαταραχής της οστικής αναδιαμόρφωσης με κυριαρχία της διαδικασίας του οστικού σχηματισμού. Τα προστατικά καρκινικά κύτταρα φαίνεται να πυροδοτούν εξεσημασμένη αύξηση των επιπέδων της OPG χωρίς αντίστοιχη αύξηση των επιπέδων RANKL, οδηγώντας έτσι σε μια μέτρια μείωση του λόγου sRANKL/OPG, η οποία αντανακλάται σε επίπεδο οστικών μεταβολιτών με αύξηση των επιπέδων των δεικτών οστικού σχηματισμού, όπως της bALP και του CICP (Πίνακας 8). Θεωρείται σήμερα πιθανό ότι το οστικό μικροπεριβάλλον μπορεί στις περιπτώσεις αυτές να απελευθερώσει μεγάλες ποσότητες OPG προκειμένου να αντιρροπήσει τα υψηλά επίπεδα RANKL που παράγονται από τα νεοπλασματικά κύτταρα. Η OPG δρα σε αυτές τις περιπτώσεις σαν ένας “εξουδετερωτικός” παράγοντας του RANKL και ως τέτοιος θα πρέπει να θεωρείται “προστατευτικός” παράγων των οστών [166]. Πρόσφατα, θετικά αποτελέσματα από μελέτες φάσης I που χρησιμοποιούν ανθρῶπειο ανασυνδυασμένη OPG σε ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα ή οστικές μεταστάσεις από καρκίνο του μαστού ανακοινώθηκαν και το μέλλον θα δείξει κατά πόσον η OPG διαθέτει θεραπευτική δυναμική σε αυτόν τον τομέα [167].

Σε ό,τι αφορά την επίδραση της θεραπείας με ζολενδρονικό όξύ, τα αποτελέσματα της μελέτης δείχνουν ότι, με την εξαίρεση των ασθενών με

καρκίνο του προστάτη, η διαταραχή του άξονα RANKL/OPG τείνει να αποκατασταθεί μετά από διάμεσο διάστημα έξι μηνών, αν και η μείωση στα επίπεδα RANKL και OPG δεν αγγίζει τα επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας (Πίνακας 9). Τα αποτελέσματα αυτά θα πρέπει να ερμηνευθούν με προσοχή διότι οι εργαστηριακές μετρήσεις του RANKL πραγματοποιούνται με μεθόδους που περιορίζονται από τη σχετικά ασταθή μορφή του ισομερούς που βρίσκεται στο πλάσμα (sRANKL). Επιπρόσθετοι φυσιολογικοί παράγοντες όπως οι κιρκάδιοι νυχθημερινοί ρυθμοί, ο καταμήνιος κύκλος, η ηλικία και το φύλο πρέπει επίσης να συνεκτιμηθούν για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Η OPG από την άλλη παράγεται σε διάφορους ιστούς συμπεριλαμβανομένων των οστών, του δέρματος, του στομάχου, του εντέρου, του πνεύμονα, της καρδιάς και του πλακούντα και κατά συνέπεια οι συγκεντρώσεις της OPG στο πλάσμα μπορεί να μην είναι αντιπροσωπευτικές των επιπέδων της στο οστικό μικροπεριβάλλον [97].

Σε επίπεδο δεικτών οστεοκλαστικής δραστηριότητας, η ελάττωση της διαδικασίας της οστικής αποδόμησης μετά από τη θεραπεία με ζολενδρονικό οξύ φάνηκε από τη σημαντική ελάττωση στα επίπεδα CTX στο σύνολο του πληθυσμού. Έχει αναφερθεί ότι περίπου 80 με 90% των ασθενών με συμπαγείς όγκους μεταστατικούς στο σκελετό έχουν αυξημένη απέκκριση N- και C- τελικών πεπτιδίων κολλαγόνου στα ούρα [168]. Τα επίπεδα NTX του ορού έχουν βρεθεί επίσης αυξημένα σε ασθενείς με εκτεταμένο σκελετικό νεοπλασματικό φορτίο [158]. Υπάρχει, εντούτοις, σημαντικού βαθμού αλληλεπικάλυψη στις τιμές των περισσότερων από αυτούς τους δείκτες ανάμεσα σε καρκινοπαθείς με ή χωρίς

οστικές μεταστάσεις και κάποιοι ασθενείς χωρίς κλινικά εμφανή σκελετική νόσο εμφανίζουν επίσης αυξημένες τιμές των δεικτών αυτών [169]. Επειδή στη μελέτη μας δεν υπήρχαν διαθέσιμα δείγματα ούρων πριν και κατά τη διάρκεια της θεραπείας με ζολενδρονικό οξύ, επιλέξαμε να μετρήσουμε τα επίπεδα CTX του ορού αντί για το NTX γιατί τα πρώτα έχουν αναφερθεί να αποτελούν πιο αντιπροσωπευτικούς δείκτες οστικής απορρόφησης στο πλάσμα σε σχέση με τα δεύτερα.

Το TRACP-5b είναι ένα ένζυμο που εκφράζεται σε υψηλά ποσά από τους ενεργούς οστεοκλάστες, τα μακροφάγα της φλεγμονής και τα δενδριτικά κύτταρα και κατά συνέπεια αντιπροσωπεύει έναν ιδιαίτερα ειδικό δείκτη αυξημένης οστεοκλαστικής δραστηριότητας [170]. Υψηλά επίπεδα του ίδιου ισοενζύμου έχουν επίσης αναφερθεί σε ασθενείς με οστικές μεταστάσεις από καρκίνο του μαστού [171] και σε μια ποικιλία συμπαγών όγκων αλλά δεν ήταν αυξημένα σε ασθενείς με τους ίδιους όγκους χωρίς οστικές μεταστάσεις. Στην παρούσα ανάλυση τα επίπεδα TRACP-5b παρέμεναν σχετικά σταθερά κατά τη διάρκεια της θεραπείας με ζολενδρονικό οξύ και η βιολογική τους μεταβλητότητα ήταν αξιοσημείωτα σταθερή (Πίνακας 9).

Η αύξηση των επιπέδων της bALP σε ασθενείς με προστατικό καρκίνο κατά τη διάγνωση των οστικών μεταστάσεων είναι σήμερα καλά τεκμηριωμένη και αντανακλά το κυρίαρχο οστεοβλαστικό στοιχείο της διαδικασίας της οστικής αναδιαμόρφωσης σε αυτήν την κατηγορία ασθενών [172]. Είναι επίσης χρήσιμος δείκτης στη διάγνωση σκελετικής συμμετοχής σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα [173] αλλά και στον καρκίνο του μαστού όπου έχει βρεθεί ότι τα

επίπεδα bALP στον ορό τείνουν να ελαττωθούν μετά από θεραπεία με ζολενδρονικό οξύ σε ασθενείς με πρώιμο ορμονοευαίσθητο καρκίνο του μαστού που λαμβάνουν λετροζόλη [154]. Στην παρούσα μελέτη επιβεβαιώσαμε ότι οι ασθενείς με προστατικό καρκίνο και οστικές μεταστάσεις χαρακτηρίζονται από σημαντικά υψηλότερες τιμές bALP σε σχέση με τους ασθενείς με καρκίνο του μαστού ή πνεύμονα, αν και η διαφορά αυτή τείνει προς ύφεση μετά από θεραπεία με ζολενδρονικό οξύ (Πίνακας 9).

Ένας συνεχώς αυξανόμενος αριθμός μελετών τα τελευταία χρόνια δείχνει ότι οι βιοχημικοί δείκτες οστικού μεταβολισμού αναδύονται ως πιθανοί προβλεπτικοί παράγοντες της σκελετικής νοσηρότητας και άλλων κλινικών παραμέτρων: Πρόσφατα, μια μεγάλη αναδρομική μελέτη έδειξε ότι οι ασθενείς με οστικές μεταστάσεις από μια ποικιλία συμπαγών όγκων και υψηλά επίπεδα NTX στα ούρα φαίνεται να έχουν υψηλότερο κίνδυνο σκελετικών επιπλοκών και θανάτου σε σχέση με τους ασθενείς με χαμηλά επίπεδα του δείκτη [158]. Τα υψηλά επίπεδα bALP στο ορό σχετίζονται ισχυρά με υψηλότερη επίπτωση σκελετικών συμβαμάτων, υποτροπής ή προόδου νόσου και θανάτου σε άνδρες με ορμονοάντοχο καρκίνο του προστάτη και σκελετικές μεταστάσεις [157,174]. Τα χαμηλά επίπεδα OPN στο πλάσμα σχετίζονται με καλύτερα κλινικά αποτελέσματα σε ασθενείς με προχωρημένο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα που λαμβάνουν χημειοθεραπεία με βάση πλατινούχα σκευάσματα [81]. Το TRACP 5b έχει επίσης προταθεί ως προβλεπτικός παράγοντας για τη συνολική επιβίωση σε ασθενείς με προστατικό καρκίνο με οστικές μεταστάσεις σε μια μελέτη [175] αλλά τα αποτελέσματα αυτά σεν επιβεβαιώθηκαν από

επακόλουθες μελέτες. Στην παρούσα μελέτη, επιλέξαμε να μελετήσουμε τη συσχέτιση ανάμεσα στη μεταβολή (αύξηση ή ελάττωση) του κάθε δείκτη μετά από θεραπεία με ζολενδρονικό οξύ και στις κλινικές παραμέτρους. Με την εξαίρεση μιας οριακής συσχέτισης ανάμεσα στην ελάττωση των επιπέδων του TRACP-5b και στην ελάττωση της επίπτωσης σκελετικών συμβαμάτων, η παρούσα ανάλυση δεν ανίχνευσε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις μεταβολές των επιπέδων των βιοχημικών δεικτών και των κλινικών παραμέτρων, συμπεριλαμβανομένης της σκελετικής νοσηρότητας, υποτροπής ή προόδου της νόσου και θανάτου. Ο τύπος του όγκου (πνεύμονας ή μαστός) και η κακή γενική κατάσταση ικανότητας ($PS \geq 2$) κατά τη διάγνωση των οστικών μεταστάσεων παρέμειναν οι ισχυρότεροι, ανεξάρτητοι, αρνητικοί προγνωστικοί παράγοντες στο σύνολο του πληθυσμού και κανείς από τους βιοχημικούς δείκτες οστικής αναδιαμόρφωσης δεν μπόρεσε να βελτιώσει την συνολική προβλεπτική ικανότητα του μοντέλου στην πολυπαραγοντική ανάλυση. Πιθανά αίτια για αυτό το αρνητικό αποτέλεσμα περιλαμβάνουν το χαμηλό αριθμό των ασθενών σε κάθε κατηγορία νεοπλασίας που δεν επέτρεψε την εκτίμηση της προγνωστικής αξίας του κάθε δείκτη χωριστά για κάθε τύπο όγκου και ο χαμηλός αριθμός των καταγεγραμμένων συμβαμάτων σε ό,τι αφορά το διάστημα ελεύθερο υποτροπής και τη συνολική επιβίωση στην ομάδα των ασθενών με προστατικό καρκίνο, οφειλόμενου προφανώς στην καλοήγη φυσική και βιολογική πορεία της νόσου.

Για την πληρέστερη ερμηνεία των αποτελεσμάτων αυτών θα πρέπει κανείς να λάβει υπόψη του διάφορες ενστάσεις που έχουν διατυπωθεί κατά καιρούς σχετικά με την αξιοπιστία των μετρήσεων των δεικτών οστικής αναδιαμόρφωσης:

Αρχικά, θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι απόλυτες μεταβολές στις τιμές των δεικτών μπορεί να λειτουργήσουν αποπροσανατολιστικά εάν στην ερμηνεία τους δεν ληφθεί υπόψιν η βιολογική μεταβλητότητα που παρατηρείται πάντα σε επαναλαμβανόμενες εργαστηριακές μετρήσεις. Ο CTX αποτελεί ένα τυπικό παράδειγμα δείκτη που ακολουθεί ένα κιρκάδιο ρυθμό ως αποτέλεσμα του νυχθημερινού ρυθμού έκκρισης κορτιζόλης τόσο σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού όσο και σε υγιείς εθελοντές [176]. Οι Fohr και συνεργάτες πρότειναν ότι μια μεταβολή της τάξης του 30% σε ένα δείκτη οστικού σχηματισμού θα πρέπει να θεωρηθεί στατιστικά σημαντική, ενώ για τους περισσότερους δείκτες οστικής καταστροφής η ελάχιστη βιολογικά σημαντική αλλαγή θεωρείται το 60% λόγω της υψηλότερης βιοποικιλότητας που εμφανίζει η μέτρησή τους [64]. Όπως είναι κατανοητό, μια τέτοια προσέγγιση θα απέκλειε την μεγάλη πλειοψηφία των μεταβολών των τιμών των δεικτών ως “στατιστικά μη σημαντικές”. Στην παρούσα ανάλυση επιλέξαμε να διαχωρίσουμε απλά τις μεταβολές των τιμών σε “αύξηση” και “μείωση” μετά από έξι μήνες θεραπείας με ζολενδρονικό οξύ με σκοπό να κατανεύσουμε ισότιμα τους ασθενείς σε συγκρίσιμες ομάδες και να μεγιστοποιήσουμε τον αριθμό των μετρήσεων ώστε να αποκτήσει η μελέτη τη μέγιστη στατιστική ισχύ. Επιπλέον, θεωρούμε ότι αυτή η ταξινόμηση είναι πιο πρακτική και κατά συνέπεια πιο εφαρμόσιμη στην καθημερινή κλινική πράξη.

Η επίδραση τυχόν προηγηθείσας ή ταυτόχρονης χημειοθεραπείας ή και ορμονικής θεραπείας (οιστρογόνα, αντι-οιστρογόνα, αντι-ανδρογόνα, αναστολείς αρωματάσης και LHRH ανάλογα) είναι επίσης ένα σημαντικό θέμα λόγω των προφανών επιδράσεων της χημειοθεραπείας και της ορμονικής παρέμβασης

στην οστική μεταβολική διαδικασία [151]. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι ο στεροειδικός αναστολέας αρωματάσης εξεμεστάνη αυξάνει τα επίπεδα των δεικτών τόσο της οστικής απορρόφησης όσο και του οστικού σχηματισμού αλλά και την επίπτωση σκελετικών συμβαμάτων σε μεταεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με πρώιμο καρκίνο μαστού σε σύγκριση με την ταμοξιφένη [177]. Τα επίπεδα των δεικτών οστικού μεταβολισμού αναμένεται να μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια της νόσου σε απόκριση της εφαρμοζόμενης αντineοπλασματικής αγωγής και αυτή η επίδραση μπορεί να “συγκαλύψει” το θεραπευτικό όφελος από την παράλληλη χορήγηση διφωσφονικών. Για να ελαχιστοποιηθεί αυτή η επίδραση, στην ανάλυση συμπεριελήφθησαν ασθενείς οι οποίοι έλαβαν τα ίδια ή παρόμοια θεραπευτικά σχήματα για κάθε τύπο όγκου και ακολουθήθηκε η ίδια θεραπευτική στρατηγική σε ό,τι αφορά τον ανδρογονικό αποκλεισμό στους ασθενείς με καρκίνο προστάτου. Εντούτοις, το αποτέλεσμα της ορμονικής παρέμβασης στον οστικό μεταβολισμό σε ένα σημαντικό αριθμό ασθενών με καρκίνο του μαστού ή προστάτη δεν μπορεί να αγνοηθεί.

Το ζολενδρονικό οξύ είναι ένας ισχυρός αναστολέας των οστεοκλαστών ο οποίος έχει επιδείξει κλινικό όφελος στη μεταστατική οστική νόσο όχι μόνο στον καρκίνο του προστάτη και του μαστού αλλά και σε μια πλειάδα συμπαγών όγκων, συμπεριλαμβανομένων των καρκίνων πνεύμονα και νεφρού [178]. Σε προκλινικά μοντέλα, το ζολενδρονικό οξύ έχει φανεί ότι μπορεί να διεγείρει την παραγωγή mRNA OPG από φυσιολογικούς ανθρώπινους οστεοβλάστες και μπορεί έτσι να συμβάλλει στην αναστολή της οστεοκλαστικής οστικής απορρόφησης. Η τιμή του δείκτη NTX στα ούρα έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να

παρέχει σημαντικές προγνωστικές πληροφορίες σε ασθενείς με οστικές μεταστάσεις που λαμβάνουν διφωσφονικά άλατα [179]. Μια σειρά από πρόσφατες μελέτες τείνουν να επεκτείνουν το θεραπευτικό όφελος από τη χορήγηση διφωσφονικών σε ευρύτερες κατηγορίες ασθενών. Ειδικότερα, φάνηκε ότι η προληπτική χορήγηση ζολενδρονικού οξέος σε δόση 4mg ανά τρίμηνο συνδέεται με ελάττωση της απώλειας οστικής μάζας σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες που λαμβάνουν επικουρική χημειοθεραπεία για πρώιμο καρκίνο του μαστού [155]. Επιπρόσθετα η εξαμηνιαία προληπτική χορήγησή του βρέθηκε να ελαττώνει την απώλεια οστικής μάζας που οφείλεται στην επικουρική ορμονοθεραπεία με λετροζόλη σε μεταεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με ορμονοευαίσθητο πρώιμο καρκίνο του μαστού [154]. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η παρατήρηση ότι ασθενείς με μεταστατικό στο σκελετό καρκίνο μαστού που είχαν εμφανίσει πρόοδο στην οστική νόσο μετά από αρχική θεραπεία με κλοδρονάτη ή παμιδρονάτη μπορούν να αντλήσουν θεραπευτικό όφελος από την αλλαγή του διφωσφονικού στο πιο ισχυρό ζολενδρονικό οξύ και η αλλαγή αυτή συνοδεύεται από ελάττωση του NTX των ούρων [156]. Η συσχέτιση των δεικτών του οστικού μεταβολισμού με τη χορήγηση διφωσφονικών έγινε πιο φανερή όταν διαπιστώθηκε ότι το NTX των ούρων καθώς και το PINP του πλάσματος είναι αυξημένα σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με καρκίνο του μαστού που λαμβάνουν συστηματική χημειοθεραπεία αλλά οι τιμές αυτές μειώνονται μετά από χορήγηση ρισεδρονάτης [153]. Τέλος, πρόσφατα ανακοινώθηκαν τα αποτελέσματα μιας μεγάλης μελέτης σε πληθυσμό 1.824 ασθενών με συμπαγείς όγκους και οστικές μεταστάσεις που ελάμβαναν ζολενδρονικό οξύ ή άλλα

διφωσφονικά και που έδειξε ότι η τιμή του NTX των ούρων, αλλά όχι η bALP του πλάσματος, αποτελεί ισχυρό ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη τόσο για την εμφάνιση σκελετικών επιπλοκών όσο και για πρόοδο της νόσου και το θάνατο από τη νόσο [158], χωρίς όμως να μελετηθεί η επίδραση της θεραπείας με διφωσφονικά στις τιμές των δεικτών και η συσχέτιση της επίδρασης αυτής με κλινικές παραμέτρους.

Η πρόσφατη ανάπτυξη του πλήρως ανθρωποποιημένου μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της διαλυτής μορφής του RANKL (denosumab) προσφέρει μια πολλά υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση σε ασθενείς με μεταστατική σκελετικό νόσο μετά τη χορήγηση ενδοφλεβίων διφωσφονικών [180,181] και η χορήγησή του έχει συνδυαστεί με ελάττωση στα επίπεδα δεικτών οστικού καταβολισμού, όπως του CTX στον ορό [182].

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η σκελετική νοσηρότητα αποτελεί ένα σημαντικό θέμα στους ασθενείς με συμπαγείς όγκους και οστικές μεταστάσεις και πολλές πτυχές της αιτιοπαθογένειας και της παθοφυσιολογίας της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στα νεοπλασματικά κύτταρα και το οστικό μικροπεριβάλλον δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως. Φαίνεται ότι οι ασθενείς με συμπαγείς νεοπλασίες μεταστατικές στο σκελετό χαρακτηρίζονται από μια σοβαρή διαταραχή στην ισορροπία της διαδικασίας της οστικής αναδιαμόρφωσης όπως αυτή ρυθμίζεται από τον άξονα RANKL/OPG και αντανάκλαται στις μεταβολές των επιπέδων αντιπροσωπευτικών δεικτών οστικού σχηματισμού ή αποδόμησης. Ο καρκίνος του μαστού και του πνεύμονα φαίνεται να χαρακτηρίζονται από κυριαρχία της οστεοκλαστικής δραστηριότητας μέσα από υπέρμετρη λειτουργία του άξονα RANKL/OPG που οδηγεί σε επιτάχυνση της διαδικασίας της οστικής αναδιαμόρφωσης με προεξάρχοντα τον οστικό καταβολισμό, ενώ αντίθετα ο προστατικός καρκίνος φαίνεται να πυροδοτεί τη μεμονωμένη αύξηση των επιπέδων OPG χωρίς την αντίστοιχη αύξηση του RANKL, οδηγώντας έτσι σε αυξημένη οστεοβλαστική δραστηριότητα.

Η θεραπεία με ζολενδρονικό οξύ τείνει να εξομαλύνει τη διαταραχή αυτής της ισορροπίας μέσω της αναστολής της οστεοκλαστογένεσης και τη διέγερση της παραγωγής mRNA OPG, με τελικό αποτέλεσμα την αποκατάσταση της ισορροπίας του άξονα RANKL/OPG. Εντούτοις, οι κλινικές εφαρμογές των μεθόδων μέτρησης των δεικτών οστικής αναδιαμόρφωσης στο πλάσμα είναι

προς το παρόν περιορισμένες λόγω μεθοδολογικών δυσκολιών ή επιδράσεων μιας πληθώρας φυσιολογικών παραγόντων και για την ώρα κανείς τους δεν είναι σε θέση να προβλέψει αξιόπιστα τη σκελετική νοσηρότητα ή άλλες κλινικές παραμέτρους (πρόοδο νόσου, επιβίωση), ανεξάρτητα από ήδη γνωστούς και καλά τεκμηριωμένους κλινικούς προγνωστικούς παράγοντες. Οι μελλοντικές βελτιώσεις στην βιοτεχνολογία, σε συνδυασμό με την πληρέστερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν τη διαδικασία της οστικής αναδιαμόρφωσης σε φυσιολογικές συνθήκες αλλά και στη μεταστατική οστική νόσο, αναμένεται να βελτιώσουν την αξιοπιστία, αναπαραγωγιμότητα και προγνωστική ικανότητα των μετρήσεων των βιοχημικών δεικτών του οστικού μεταβολισμού.

7. SUMMARY

Background: Receptor Activator of Nuclear factor KappaB Ligand (RANKL) and its endogenous inhibitor osteoprotegerin (OPG) are important determinants of bone remodeling in patients with solid tumors metastatic to the skeleton. We aimed: a) to assess the levels of the RANKL/OPG system and of a panel of biochemical markers in patients with solid tumors metastatic to the bone in relation to the type of malignancy and the neoplastic burden to the skeleton b) to evaluate the effect of treatment with the biphosphonate zoledronic acid on markers of bone remodeling and c) to detect possible correlations of marker response with skeletal morbidity and clinical outcomes.

Patients and Methods: Levels of soluble RANKL (sRANKL), OPG and RANKL/OPG ratio were assessed in 70 patients with breast (N=30), lung (N=18) and prostate (N=22) cancer with newly-diagnosed metastasis to the bone and in 40 healthy age and sex-matched volunteers. Biochemical markers of bone resorption, including C-telopeptide of type-I collagen (CTX), tartrate-resistant acid phosphatase-5b (TRACP-5b) and osteopontin (OPN) and of bone formation, including bone-alkaline phosphatase (bALP), osteocalcin (OC), and C-terminal propeptide of collagen type-I (CICP) were also assessed at the onset of skeletal metastases and six months after initiation of treatment with zoledronic acid (4 mg monthly). Logistic regression models were applied to assess the correlation between bone marker level changes and Skeletal Related Events (SRE, primary endpoint), recurrence and death.

Results: Patients had elevated serum levels of RANKL, OPG, OPN, TRACP-5b, and bALP, and reduced OC levels compared to controls. OPG correlated with the extent of metastatic bone burden. Patients with breast and lung cancer shared increased levels of RANKL, OPG, and OPN whereas prostate cancer patients had elevated values of OPG and bALP only. After a median follow-up of 32 months, 34 patients (48.6%) presented with at least one SRE and 48 patients (68.6%) relapsed. RANKL/OPG ratio tended to decline after treatment with zoledronic acid with the exception of patients with prostate cancer. CTX levels were significantly reduced in the whole study population at the second compared to the initial measurement ($p=0.003$). Decrease in TRACP-5b levels tended to correlate with reduced incidence of SRE (HR=0.39, 95%CI: 0.14-1.10, $p=0.076$) and the model fit was improved when Performance Status (PS) at diagnosis was added in logistic regression analysis ($p=0.051$). Tumor type (lung or breast vs prostate) and PS (PS \geq 2 vs $<$ 2) were the only significant predictors for recurrence and death and none of the bone markers was able to improve predictive value when added to the model.

Conclusions: Patients with solid tumors metastatic to the bone have severe disruption of the RANKL/OPG axis. Breast and lung cancer seem to exert their osteolytic action through upregulation of the RANKL/OPG system whereas prostate cancer seems to provoke profound elevation of OPG levels only, thus leading to increased osteoblastic activity. Imbalance in the RANKL/OPG axis tends to normalize after treatment with zoledronic acid, as reflected by decrease

in serum bone resorption markers. Marker level responses are not predictive for SRE, disease progression or survival.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Wellik DM, Capecchi MR. Hox10 and Hox11 genes are required to globally pattern the mammalian skeleton. *Science* 2003;301:363-367.
2. Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 2003;423:332-336.
3. Zhao GQ. Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse. *Genesis* 2003;35:43-56.
4. Otto F, Thornell AP, Crompton T et al. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 1997;89:765-771.
5. Mundlos S, Otto F, Mundlos C et al. Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 1997;89:773-779.
6. Zelzer E, McLean W, Ng YS et al. Skeletal defects in VEGF(120/120) mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. *Development* 2002;129:1893-1904.
7. Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyanyan H et al. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J.Biol.Chem.* 2005;280:33132-33140.
8. Mbalaviele G, Sheikh S, Stains JP et al. Beta-catenin and BMP-2 synergize to promote osteoblast differentiation and new bone formation. *J.Cell Biochem.* 2005;94:403-418.
9. Krishnan V, Bryant HU, Macdougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J.Clin.Invest* 2006;116:1202-1209.

10. Poole KE, van Bezooijen RL, Loveridge N et al. Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *FASEB J.* 2005;19:1842-1844.
11. Li X, Zhang Y, Kang H et al. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J.Biol.Chem.* 2005;280:19883-19887.
12. van Bezooijen RL, Svensson JP, Eefting D et al. Wnt but not BMP signaling is involved in the inhibitory action of sclerostin on BMP-stimulated bone formation. *J.Bone Miner.Res.* 2007;22:19-28.
13. Diarra D, Stolina M, Polzer K et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat.Med.* 2007;13:156-163.
14. Bodine PV, Seestaller-Wehr L, Kharode YP, Bex FJ, Komm BS. Bone anabolic effects of parathyroid hormone are blunted by deletion of the Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1. *J.Cell Physiol* 2007;210:352-357.
15. Ott SM. Sclerostin and Wnt signaling--the pathway to bone strength. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 2005;90:6741-6743.
16. Gardner JC, van Bezooijen RL, Mervis B et al. Bone mineral density in sclerosteosis; affected individuals and gene carriers. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 2005;90:6392-6395.
17. Shoback D. Update in osteoporosis and metabolic bone disorders. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 2007;92:747-753.
18. Sawakami K, Robling AG, Ai M et al. The Wnt co-receptor LRP5 is essential for skeletal mechanotransduction but not for the anabolic bone response to parathyroid hormone treatment. *J.Biol.Chem.* 2006;281:23698-23711.

19. Boyden LM, Mao J, Belsky J et al. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N.Engl.J.Med.* 2002;346:1513-1521.
20. Kurokawa A, Nagata M, Kitamura N et al. Diagnostic value of integrin alpha3, beta4, and beta5 gene expression levels for the clinical outcome of tongue squamous cell carcinoma. *Cancer* 2008;112:1272-1281.
21. Seeman E. The structural and biomechanical basis of the gain and loss of bone strength in women and men. *Endocrinol.Metab Clin.North Am.* 2003;32:25-38.
22. Allan EH, Ho PW, Umezawa A et al. Differentiation potential of a mouse bone marrow stromal cell line. *J.Cell Biochem.* 2003;90:158-169.
23. Malaval L, Modrowski D, Gupta AK, Aubin JE. Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures. *J.Cell Physiol* 1994;158:555-572.
24. Aarden EM, Burger EH, Nijweide PJ. Function of osteocytes in bone. *J.Cell Biochem.* 1994;55:287-299.
25. Liu F, Malaval L, Aubin JE. The mature osteoblast phenotype is characterized by extensive plasticity. *Exp.Cell Res.* 1997;232:97-105.
26. Eghbali-Fatourehchi GZ, Lamsam J, Fraser D et al. Circulating osteoblast-lineage cells in humans. *N.Engl.J.Med.* 2005;352:1959-1966.
27. Massey HM, Flanagan AM. Human osteoclasts derive from CD14-positive monocytes. *Br.J.Haematol.* 1999;106:167-170.
28. Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S et al. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature* 2000;408:600-605.

29. Grigoriadis AE, Wang ZQ, Cecchini MG et al. c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science* 1994;266:443-448.
30. Rodan SB, Rodan GA. Integrin function in osteoclasts. *J.Endocrinol.* 1997;154 Suppl:S47-S56.
31. Hughes DE, Dai A, Tiffée JC et al. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat.Med.* 1996;2:1132-1136.
32. Dobnig H, Turner RT. The effects of programmed administration of human parathyroid hormone fragment (1-34) on bone histomorphometry and serum chemistry in rats. *Endocrinology* 1997;138:4607-4612.
33. Weinstein RS, Underwood JL, Hutson MS, DeLuca HF. Bone histomorphometry in vitamin D-deficient rats infused with calcium and phosphorus. *Am.J.Physiol* 1984;246:E499-E505.
34. Reginster JY, Deroisy R, Lecart MP et al. A double-blind, placebo-controlled, dose-finding trial of intermittent nasal salmon calcitonin for prevention of postmenopausal lumbar spine bone loss. *Am.J.Med.* 1995;98:452-458.
35. Herrington J, Carter-Su C. Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. *Trends Endocrinol.Metab* 2001;12:252-257.
36. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J.Bone Miner.Res.* 1998;13:793-802.
37. Taxel P, Kaneko H, Lee SK et al. Estradiol rapidly inhibits osteoclastogenesis and RANKL expression in bone marrow cultures in postmenopausal women: a pilot study. *Osteoporos.Int.* 2008;19:193-199.

38. Carani C, Qin K, Simoni M et al. Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. *N.Engl.J.Med.* 1997;337:91-95.
39. Chen L, Li C, Qiao W, Xu X, Deng C. A Ser(365)-->Cys mutation of fibroblast growth factor receptor 3 in mouse downregulates Ihh/PTHrP signals and causes severe achondroplasia. *Hum.Mol.Genet.* 2001;10:457-465.
40. Kawaguchi H, Pilbeam CC, Harrison JR, Raisz LG. The role of prostaglandins in the regulation of bone metabolism. *Clin.Orthop.Relat Res.* 199536-46.
41. Evans DM, Ralston SH. Nitric oxide and bone. *J.Bone Miner.Res.* 1996;11:300-305.
42. Garcia C, Boyce BF, Gilles J et al. Leukotriene B4 stimulates osteoclastic bone resorption both in vitro and in vivo. *J.Bone Miner.Res.* 1996;11:1619-1627.
43. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J.Bone Joint Surg.Am.* 2002;84-A:1032-1044.
44. Parfitt AM. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J.Cell Biochem.* 1994;55:273-286.
45. Nielsen RH, Karsdal MA, Sorensen MG, Dziegiel MH, Henriksen K. Dissolution of the inorganic phase of bone leading to release of calcium regulates osteoclast survival. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2007;360:834-839.
46. Henriksen K, Sorensen MG, Nielsen RH et al. Degradation of the organic phase of bone by osteoclasts: a secondary role for lysosomal acidification. *J.Bone Miner.Res.* 2006;21:58-66.

47. Nanci A, Zalzal S, Gotoh Y, McKee MD. Ultrastructural characterization and immunolocalization of osteopontin in rat calvarial osteoblast primary cultures. *Microsc.Res.Tech.* 1996;33:214-231.
48. Tolar J, Teitelbaum SL, Orchard PJ. Osteopetrosis. *N.Engl.J.Med.* 2004;351:2839-2849.
49. Feigin ME, Malbon CC. OSTM1 regulates beta-catenin/Lef1 interaction and is required for Wnt/beta-catenin signaling. *Cell Signal.* 2008;20:949-957.
50. Henriksen K, Gram J, Hoegh-Andersen P et al. Osteoclasts from patients with autosomal dominant osteopetrosis type I caused by a T253I mutation in low-density lipoprotein receptor-related protein 5 are normal in vitro, but have decreased resorption capacity in vivo. *Am.J.Pathol.* 2005;167:1341-1348.
51. Calvo MS, Eyre DR, Gundberg CM. Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocr.Rev.* 1996;17:333-368.
52. Gomez B, Jr., Ardakani S, Ju J et al. Monoclonal antibody assay for measuring bone-specific alkaline phosphatase activity in serum. *Clin.Chem.* 1995;41:1560-1566.
53. Horgan DJ, King NL, Kurth LB, Kuypers R. Collagen crosslinks and their relationship to the thermal properties of calf tendons. *Arch.Biochem.Biophys.* 1990;281:21-26.
54. Robins SP. Biochemistry and functional significance of collagen cross-linking. *Biochem.Soc.Trans.* 2007;35:849-852.
55. Eyre DR, Dickson IR, Van NK. Collagen cross-linking in human bone and articular cartilage. Age-related changes in the content of mature hydroxypyridinium residues. *Biochem.J.* 1988;252:495-500.

56. Taylor AK, Lueken SA, Libanati C, Baylink DJ. Biochemical markers of bone turnover for the clinical assessment of bone metabolism. *Rheum.Dis.Clin.North Am.* 1994;20:589-607.
57. Hanson DA, Weis MA, Bollen AM et al. A specific immunoassay for monitoring human bone resorption: quantitation of type I collagen cross-linked N-telopeptides in urine. *J.Bone Miner.Res.* 1992;7:1251-1258.
58. Garnero P, Gineyts E, Arbault P, Christiansen C, Delmas PD. Different effects of bisphosphonate and estrogen therapy on free and peptide-bound bone cross-links excretion. *J.Bone Miner.Res.* 1995;10:641-649.
59. Garnero P, Delmas PD. Assessment of the serum levels of bone alkaline phosphatase with a new immunoradiometric assay in patients with metabolic bone disease. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1993;77:1046-1053.
60. Magnusson P, Larsson L, Magnusson M, Davie MW, Sharp CA. Isoforms of bone alkaline phosphatase: characterization and origin in human trabecular and cortical bone. *J.Bone Miner.Res.* 1999;14:1926-1933.
61. Parfitt AM, Simon LS, Villanueva AR, Krane SM. Procollagen type I carboxy-terminal extension peptide in serum as a marker of collagen biosynthesis in bone. Correlation with Iliac bone formation rates and comparison with total alkaline phosphatase. *J.Bone Miner.Res.* 1987;2:427-436.
62. Cross NA, Hillman LS, Allen SH, Krause GF, Vieira NE. Calcium homeostasis and bone metabolism during pregnancy, lactation, and postweaning: a longitudinal study. *Am.J.Clin.Nutr.* 1995;61:514-523.
63. Fohr B, Dunstan CR, Seibel MJ. Clinical review 165: Markers of bone remodeling in metastatic bone disease. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 2003;88:5059-5075.

64. Lian JB, Gundberg CM. Osteocalcin. Biochemical considerations and clinical applications. *Clin.Orthop.Relat Res.* 1988;267-291.
65. Koeneman KS, Kao C, Ko SC et al. Osteocalcin-directed gene therapy for prostate-cancer bone metastasis. *World J.Urol.* 2000;18:102-110.
66. Epstein S. Serum and urinary markers of bone remodeling: assessment of bone turnover. *Endocr.Rev.* 1988;9:437-449.
67. Prockop DJ, Kivirikko KI. Heritable diseases of collagen. *N.Engl.J.Med.* 1984;311:376-386.
68. Al-Dehaimi AW, Blumsohn A, Eastell R. Serum galactosyl hydroxylysine as a biochemical marker of bone resorption. *Clin.Chem.* 1999;45:676-681.
69. Robins SP, Woitge H, Hesley R et al. Direct, enzyme-linked immunoassay for urinary deoxypyridinoline as a specific marker for measuring bone resorption. *J.Bone Miner.Res.* 1994;9:1643-1649.
70. Scheidt-Nave C, Bismar H, Leidig-Bruckner G et al. Serum interleukin 6 is a major predictor of bone loss in women specific to the first decade past menopause. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 2001;86:2032-2042.
71. Coleman RE. The clinical use of bone resorption markers in patients with malignant bone disease. *Cancer* 2002;94:2521-2533.
72. Knott L, Bailey AJ. Collagen cross-links in mineralizing tissues: a review of their chemistry, function, and clinical relevance. *Bone* 1998;22:181-187.
73. Clemens JD, Herrick MV, Singer FR, Eyre DR. Evidence that serum NTx (collagen-type I N-telopeptides) can act as an immunochemical marker of bone resorption. *Clin.Chem.* 1997;43:2058-2063.

74. Kraenzlin ME, Lau KH, Liang L et al. Development of an immunoassay for human serum osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1990;71:442-451.
75. Scarnecchia L, Minisola S, Pacitti MT et al. Clinical usefulness of serum tartrate-resistant acid phosphatase activity determination to evaluate bone turnover. *Scand.J.Clin.Lab Invest* 1991;51:517-524.
76. Chakraborty G, Jain S, Behera R et al. The multifaceted roles of osteopontin in cell signaling, tumor progression and angiogenesis. *Curr.Mol.Med.* 2006;6:819-830.
77. Katagiri YU, Sleeman J, Fujii H et al. CD44 variants but not CD44s cooperate with beta1-containing integrins to permit cells to bind to osteopontin independently of arginine-glycine-aspartic acid, thereby stimulating cell motility and chemotaxis. *Cancer Res.* 1999;59:219-226.
78. Tuck AB, Arsenault DM, O'Malley FP et al. Osteopontin induces increased invasiveness and plasminogen activator expression of human mammary epithelial cells. *Oncogene* 1999;18:4237-4246.
79. Le QT, Sutphin PD, Raychaudhuri S et al. Identification of osteopontin as a prognostic plasma marker for head and neck squamous cell carcinomas. *Clin.Cancer Res.* 2003;9:59-67.
80. Mack PC, Redman MW, Chansky K et al. Lower osteopontin plasma levels are associated with superior outcomes in advanced non-small-cell lung cancer patients receiving platinum-based chemotherapy: SWOG Study S0003. *J.Clin.Oncol.* 2008;26:4771-4776.
81. Schneider S, Yochim J, Brabender J et al. Osteopontin but not osteonectin messenger RNA expression is a prognostic marker in curatively resected non-small cell lung cancer. *Clin.Cancer Res.* 2004;10:1588-1596.

82. Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr.Rev.* 2008;29:155-192.
83. Ikeda T, Kasai M, Utsuyama M, Hirokawa K. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology* 2001;142:1419-1426.
84. Hikita A, Yana I, Wakeyama H et al. Negative regulation of osteoclastogenesis by ectodomain shedding of receptor activator of NF-kappaB ligand. *J.Biol.Chem.* 2006;281:36846-36855.
85. Kong YY, Feige U, Sarosi I et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 1999;402:304-309.
86. Ominsky MS, Stolina M, Li X et al. One year of transgenic overexpression of osteoprotegerin in rats suppressed bone resorption and increased vertebral bone volume, density, and strength. *J.Bone Miner.Res.* 2009;24:1234-1246.
87. Udagawa N, Takahashi N, Yasuda H et al. Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology* 2000;141:3478-3484.
88. Gori F, Hofbauer LC, Dunstan CR et al. The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally regulated. *Endocrinology* 2000;141:4768-4776.
89. Nakamichi Y, Udagawa N, Kobayashi Y et al. Osteoprotegerin reduces the serum level of receptor activator of NF-kappaB ligand derived from osteoblasts. *J.Immunol.* 2007;178:192-200.

90. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997;390:175-179.
91. Lacey DL, Timms E, Tan HL et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93:165-176.
92. Glass DA, Bialek P, Ahn JD et al. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev.Cell* 2005;8:751-764.
93. Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K et al. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1998;253:395-400.
94. Li J, Sarosi I, Yan XQ et al. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2000;97:1566-1571.
95. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999;397:315-323.
96. Vega D, Maalouf NM, Sakhaee K. CLINICAL Review #: the role of receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK)/RANK ligand/osteoprotegerin: clinical implications. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 2007;92:4514-4521.
97. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423:337-342.
98. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N et al. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by

- which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 1998;139:1329-1337.
99. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N et al. A novel molecular mechanism modulating osteoclast differentiation and function. *Bone* 1999;25:109-113.
 100. Ono K, Akatsu T, Murakami T et al. Mouse mammary carcinoma cell line (BALB/c-MC) stimulates osteoclast formation from mouse bone marrow cells through cell-to-cell contact. *Bone* 1998;23:27-32.
 101. Farrell CL, Bready JV, Kaufman SA, Qian YX, Burgess TL. The uptake and distribution of phosphorothioate oligonucleotides into vascular smooth muscle cells in vitro and in rabbit arteries. *Antisense Res.Dev.* 1995;5:175-183.
 102. Humphrey EL, Williams JH, Davie MW, Marshall MJ. Effects of dissociated glucocorticoids on OPG and RANKL in osteoblastic cells. *Bone* 2006;38:652-661.
 103. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89:309-319.
 104. Yamaguchi K, Kinoshita M, Goto M et al. Characterization of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor. *J.Biol.Chem.* 1998;273:5117-5123.
 105. Schneeweis LA, Willard D, Milla ME. Functional dissection of osteoprotegerin and its interaction with receptor activator of NF-kappaB ligand. *J.Biol.Chem.* 2005;280:41155-41164.
 106. Hofbauer LC, Shui C, Riggs BL et al. Effects of immunosuppressants on receptor activator of NF-kappaB ligand and osteoprotegerin production by human osteoblastic and coronary artery smooth muscle cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2001;280:334-339.

107. Collin-Osdoby P, Rothe L, Anderson F et al. Receptor activator of NF-kappa B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. *J.Biol.Chem.* 2001;276:20659-20672.
108. Olesen P, Ledet T, Rasmussen LM. Arterial osteoprotegerin: increased amounts in diabetes and modifiable synthesis from vascular smooth muscle cells by insulin and TNF-alpha. *Diabetologia* 2005;48:561-568.
109. Haynes DR, Barg E, Crotti TN et al. Osteoprotegerin expression in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis, spondyloarthropathies and osteoarthritis and normal controls. *Rheumatology* 2003;42:123-134.
110. Shalhoub V, Faust J, Boyle WJ et al. Osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand effects on osteoclast formation from human peripheral blood mononuclear cell precursors. *J.Cell Biochem.* 1999;72:251-261.
111. Schneeweis LA, Koppaka V, Lund-Katz S, Phillips MC, Axelsen PH. Structural analysis of lipoprotein E particles. *Biochemistry* 2005;44:12525-12534.
112. Orr FW, Varani J, Gondek MD, Ward PA, Mundy GR. Partial characterization of a bone-derived chemotactic factor for tumor cells. *Am.J.Pathol.* 1980;99:43-52.
113. Manishen WJ, Sivananthan K, Orr FW. Resorbing bone stimulates tumor cell growth. A role for the host microenvironment in bone metastasis. *Am.J.Pathol.* 1986;123:39-45.
114. Kostenuik PJ, Singh G, Suyama KL, Orr FW. Stimulation of bone resorption results in a selective increase in the growth rate of spontaneously metastatic Walker 256 cancer cells in bone. *Clin.Exp.Metastasis* 1992;10:411-418.

115. Kostenuik PJ, Singh G, Suyama KL, Orr FW. A quantitative model for spontaneous bone metastasis: evidence for a mitogenic effect of bone on Walker 256 cancer cells. *Clin.Exp.Metastasis* 1992;10:403-410.
116. Mundy GR. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat.Rev.Cancer* 2002;2:584-593.
117. Min H, Morony S, Sarosi I et al. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *J.Exp.Med.* 2000;192:463-474.
118. Dougall WC, Chaisson M. The RANK/RANKL/OPG triad in cancer-induced bone diseases. *Cancer Metastasis Rev.* 2006;25:541-549.
119. Holen I, Croucher PI, Hamdy FC, Eaton CL. Osteoprotegerin (OPG) is a survival factor for human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2002;62:1619-1623.
120. Li J, Sarosi I, Cattley RC et al. Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia. *Bone* 2006;39:754-766.
121. Kwan TS, Padrines M, Theoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15:49-60.
122. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1998;95:3597-3602.
123. Yun TJ, Chaudhary PM, Shu GL et al. OPG/FDCR-1, a TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40. *J.Immunol.* 1998;161:6113-6121.

124. Fata JE, Kong YY, Li J et al. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell* 2000;103:41-50.
125. Shortman K, Maraskovsky E. Developmental options. *Science* 1998;282:424-425.
126. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999;96:3540-3545.
127. Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK et al. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15:457-475.
128. Ma YL, Cain RL, Halladay DL et al. Catabolic effects of continuous human PTH (1--38) in vivo is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation. *Endocrinology* 2001;142:4047-4054.
129. Buxton EC, Yao W, Lane NE. Changes in serum receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand, osteoprotegerin, and interleukin-6 levels in patients with glucocorticoid-induced osteoporosis treated with human parathyroid hormone (1-34). *J.Clin.Endocrinol.Metab* 2004;89:3332-3336.
130. Wei S, Kitaura H, Zhou P, Ross FP, Teitelbaum SL. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J.Clin.Invest* 2005;115:282-290.
131. Toraldo G, Roggia C, Qian WP, Pacifici R, Weitzmann MN. IL-7 induces bone loss in vivo by induction of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and tumor necrosis factor alpha from T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2003;100:125-130.

132. Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S et al. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2000;275:768-775.
133. Thomas RJ, Guise TA, Yin JJ et al. Breast cancer cells interact with osteoblasts to support osteoclast formation. *Endocrinology* 1999;140:4451-4458.
134. Kondo T, Kitazawa R, Maeda S, Kitazawa S. 1 alpha,25 dihydroxyvitamin D3 rapidly regulates the mouse osteoprotegerin gene through dual pathways. *J.Bone Miner.Res.* 2004;19:1411-1419.
135. Shevde NK, Bendixen AC, Dienger KM, Pike JW. Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2000;97:7829-7834.
136. Lubberts E, Joosten LA, Chabaud M et al. IL-4 gene therapy for collagen arthritis suppresses synovial IL-17 and osteoprotegerin ligand and prevents bone erosion. *J.Clin.Invest* 2000;105:1697-1710.
137. Azuma Y, Kaji K, Katogi R, Takeshita S, Kudo A. Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *J.Biol.Chem.* 2000;275:4858-4864.
138. Yang X, Matsuda K, Bialek P et al. ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome. *Cell* 2004;117:387-398.
139. Fleisch H, Russell RG, Francis MD. Diphosphonates inhibit hydroxyapatite dissolution in vitro and bone resorption in tissue culture and in vivo. *Science* 1969;165:1262-1264.

140. Rogers MJ, Gordon S, Benford HL et al. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer* 2000;88:2961-2978.
141. Thompson K, Rogers MJ, Coxon FP, Crockett JC. Cytosolic entry of bisphosphonate drugs requires acidification of vesicles after fluid-phase endocytosis. *Mol.Pharmacol.* 2006;69:1624-1632.
142. Sato M, Grasser W, Endo N et al. Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *J.Clin.Invest* 1991;88:2095-2105.
143. Rogers MJ. New insights into the molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Curr.Pharm.Des* 2003;9:2643-2658.
144. Saad F, Gleason DM, Murray R et al. Long-term efficacy of zoledronic acid for the prevention of skeletal complications in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* 2004;96:879-882.
145. Rosen LS, Gordon D, Tchekmedyian NS et al. Long-term efficacy and safety of zoledronic acid in the treatment of skeletal metastases in patients with nonsmall cell lung carcinoma and other solid tumors: a randomized, Phase III, double-blind, placebo-controlled trial. *Cancer* 2004;100:2613-2621.
146. Rosen LS, Gordon D, Kaminski M et al. Long-term efficacy and safety of zoledronic acid compared with pamidronate disodium in the treatment of skeletal complications in patients with advanced multiple myeloma or breast carcinoma: a randomized, double-blind, multicenter, comparative trial. *Cancer* 2003;98:1735-1744.
147. Rosen LS, Gordon DH, Dugan W, Jr. et al. Zoledronic acid is superior to pamidronate for the treatment of bone metastases in breast carcinoma patients with at least one osteolytic lesion. *Cancer* 2004;100:36-43.

148. Rosen LS, Gordon D, Tchekmedyian S et al. Zoledronic acid versus placebo in the treatment of skeletal metastases in patients with lung cancer and other solid tumors: a phase III, double-blind, randomized trial--the Zoledronic Acid Lung Cancer and Other Solid Tumors Study Group. *J.Clin.Oncol.* 2003;21:3150-3157.
149. Aapro M, Abrahamsson PA, Body JJ et al. Guidance on the use of bisphosphonates in solid tumours: recommendations of an international expert panel. *Ann.Oncol.* 2008;19:420-432.
150. Bamias A, Kastritis E, Bamia C et al. Osteonecrosis of the jaw in cancer after treatment with bisphosphonates: incidence and risk factors. *J.Clin.Oncol.* 2005;23:8580-8587.
151. Mountzios G, Dimopoulos MA, Bamias A et al. Abnormal bone remodeling process is due to an imbalance in the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) axis in patients with solid tumors metastatic to the skeleton. *Acta Oncol.* 2007;46:221-229.
152. Terpos E, Sezer O, Croucher P, Dimopoulos MA. Myeloma bone disease and proteasome inhibition therapies. *Blood* 2007;110:1098-1104.
153. Greenspan SL, Bhattacharya RK, Sereika SM, Brufsky A, Vogel VG. Prevention of bone loss in survivors of breast cancer: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 2007;92:131-136.
154. Brufsky A, Harker WG, Beck JT et al. Zoledronic acid inhibits adjuvant letrozole-induced bone loss in postmenopausal women with early breast cancer. *J.Clin.Oncol.* 2007;25:829-836.
155. Hershman DL, McMahon DJ, Crew KD et al. Zoledronic acid prevents bone loss in premenopausal women undergoing adjuvant chemotherapy for early-stage breast cancer. *J.Clin.Oncol.* 2008;26:4739-4745.

156. Clemons MJ, Dranitsaris G, Ooi WS et al. Phase II trial evaluating the palliative benefit of second-line zoledronic acid in breast cancer patients with either a skeletal-related event or progressive bone metastases despite first-line bisphosphonate therapy. *J.Clin.Oncol.* 2006;24:4895-4900.
157. Smith MR, Cook RJ, Coleman R et al. Predictors of skeletal complications in men with hormone-refractory metastatic prostate cancer. *Urology* 2007;70:315-319.
158. Coleman RE, Major P, Lipton A et al. Predictive value of bone resorption and formation markers in cancer patients with bone metastases receiving the bisphosphonate zoledronic acid. *J.Clin.Oncol.* 2005;23:4925-4935.
159. Puri KS, Suresh KR, Gogtay NJ, Thatte UM. Declaration of Helsinki, 2008: implications for stakeholders in research. *J.Postgrad.Med.* 2009;55:131-134.
160. Koizumi M, Takahashi S, Ogata E. Comparison of serum bone resorption markers in the diagnosis of skeletal metastasis. *Anticancer Res.* 2003;23:4095-4099.
161. Grimaud E, Soubigou L, Couillaud S et al. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis. *Am.J.Pathol.* 2003;163:2021-2031.
162. Das R, Philip S, Mahabeleshwar GH, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin: it's role in regulation of cell motility and nuclear factor kappa B-mediated urokinase type plasminogen activator expression. *IUBMB.Life* 2005;57:441-447.
163. Fedarko NS, Jain A, Karadag A, Van Eman MR, Fisher LW. Elevated serum bone sialoprotein and osteopontin in colon, breast, prostate, and lung cancer. *Clin.Cancer Res.* 2001;7:4060-4066.

164. Brabender J, Usadel H, Metzger R et al. Quantitative O(6)-methylguanine DNA methyltransferase methylation analysis in curatively resected non-small cell lung cancer: associations with clinical outcome. *Clin.Cancer Res.* 2003;9:223-227.
165. Jung K, Lein M, von HK et al. Osteoprotegerin in serum as a novel marker of bone metastatic spread in prostate cancer. *Clin.Chem.* 2001;47:2061-2063.
166. Body JJ, Greipp P, Coleman RE et al. A phase I study of AMGN-0007, a recombinant osteoprotegerin construct, in patients with multiple myeloma or breast carcinoma related bone metastases. *Cancer* 2003;97:887-892.
167. Nakayama K, Fukumoto S, Takeda S et al. Differences in bone and vitamin D metabolism between primary hyperparathyroidism and malignancy-associated hypercalcemia. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1996;81:607-611.
168. Pecherstorfer M, Zimmer-Roth I, Schilling T et al. The diagnostic value of urinary pyridinium cross-links of collagen, serum total alkaline phosphatase, and urinary calcium excretion in neoplastic bone disease. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1995;80:97-103.
169. Halleen JM, Tiitinen SL, Ylipahkala H, Fagerlund KM, Vaananen HK. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as a marker of bone resorption. *Clin.Lab* 2006;52:499-509.
170. Korpela J, Tiitinen SL, Hiekkanen H et al. Serum TRACP 5b and ICTP as markers of bone metastases in breast cancer. *Anticancer Res.* 2006;26:3127-3132.
171. Lorente JA, Morote J, Raventos C, Encabo G, Valenzuela H. Clinical efficacy of bone alkaline phosphatase and prostate specific antigen in the

- diagnosis of bone metastasis in prostate cancer. *J.Urol.* 1996;155:1348-1351.
172. Alatas F, Alatas O, Metintas M et al. Usefulness of bone markers for detection of bone metastases in lung cancer patients. *Clin.Biochem.* 2002;35:293-296.
 173. Coleman R, Brown J, Terpos E et al. Bone markers and their prognostic value in metastatic bone disease: clinical evidence and future directions. *Cancer Treat.Rev.* 2008;34:629-639.
 174. Salminen EK, Kallioinen MJ, la-Houhala MA et al. Survival markers related to bone metastases in prostate cancer. *Anticancer Res.* 2006;26:4879-4884.
 175. Dovio A, Generali D, Tampellini M et al. Variations along the 24-hour cycle of circulating osteoprotegerin and soluble RANKL: a rhythmometric analysis. *Osteoporos.Int.* 2008;19:113-117.
 176. Coleman RE, Banks LM, Girgis SI et al. Skeletal effects of exemestane on bone-mineral density, bone biomarkers, and fracture incidence in postmenopausal women with early breast cancer participating in the Intergroup Exemestane Study (IES): a randomised controlled study. *Lancet Oncol.* 2007;8:119-127.
 177. Rosen LS, Gordon D, Kaminski M et al. Zoledronic acid versus pamidronate in the treatment of skeletal metastases in patients with breast cancer or osteolytic lesions of multiple myeloma: a phase III, double-blind, comparative trial. *Cancer J.* 2001;7:377-387.
 178. Eastell R, Adams JE, Coleman RE et al. Effect of anastrozole on bone mineral density: 5-year results from the anastrozole, tamoxifen, alone or in combination trial 18233230. *J.Clin.Oncol.* 2008;26:1051-1057.

179. Lipton A, Steger GG, Figueroa J et al. Randomized active-controlled phase II study of denosumab efficacy and safety in patients with breast cancer-related bone metastases. *J.Clin.Oncol.* 2007;25:4431-4437.
180. Fizazi K, Lipton A, Mariette X et al. Randomized phase II trial of denosumab in patients with bone metastases from prostate cancer, breast cancer, or other neoplasms after intravenous bisphosphonates. *J.Clin.Oncol.* 2009;27:1564-1571.
181. Ellis GK, Bone HG, Chlebowski R et al. Randomized trial of denosumab in patients receiving adjuvant aromatase inhibitors for nonmetastatic breast cancer. *J.Clin.Oncol.* 2008;26:4875-4882.
182. Zelzer E, Olsen BR. The genetic basis for skeletal diseases. *Nature* 2003;423:343-348.