



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**  
**ΤΟΜΕΑΣ ΥΓΕΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΙΔΙΟΥ**  
**ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΙΔΙΟΠΑΘΗΣ ΥΠΕΡΑΣΒΕΣΤΙΟΥΡΙΑ ΣΤΗΝ ΠΑΙΔΙΚΗ ΗΛΙΚΙΑ**  
**ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ**

**ΠΑΥΛΟΥ ΜΑΡΙΑ**  
**ΠΑΙΔΙΑΤΡΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**  
**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2017**









**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**  
**ΤΟΜΕΑΣ ΥΓΕΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΙΔΙΟΥ**  
**ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΙΔΙΟΠΑΘΗΣ ΥΠΕΡΑΣΒΕΣΤΙΟΥΡΙΑ ΣΤΗΝ ΠΑΙΔΙΚΗ ΗΛΙΚΙΑ**  
**ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ**

**ΠΑΥΛΟΥ ΜΑΡΙΑ**  
**ΠΑΙΔΙΑΤΡΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**  
**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2017**



«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2. (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».





**Ημερομηνία αίτησης της κ. Παύλου Μαρίας:** 19-5-2009

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:** 664<sup>α</sup>/23-6-2009

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Σιαμοπούλου – Μαυρίδου Αντιγόνη Καθηγήτρια Παιδιατρικής

Μέλη

Χάλλα Άννα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παιδιατρικής

Σιώμου Αικατερίνη Λέκτορας Παιδιατρικής με έμφαση στην Παιδιατρική Νεφρολογία

**Ημερομηνία ορισμού θέματος:** 10-9-2009

*«Ιδιοπαθής υπερασβεστιουρία στην παιδική ηλικία. Συσχέτιση με το μεταβολισμό των οστών».*

**ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ :** 818<sup>α</sup>/7-7-2017

1. Σιαμοπούλου–Μαυρίδου Αντιγόνη, Ομότιμη Καθηγήτρια Παιδιατρικής, του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Γιάπρος Βασίλειος, Καθηγητής Νεογνολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Σύρρου Μαρίκα, Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας-Ιατρικής Γενετικής του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Χαλιάσος Νικόλαος, Καθηγητής Παιδιατρικής του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Χάλλα Άννα, Καθηγήτρια Παιδιατρική με έμφαση στην εργαστηριακή διερεύνηση Νοσημάτων Μεταβολισμού των Οστών και άλλων Νοσημάτων Παιδικής Ηλικίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Μπαλτογιάννης Δημήτριος Αναπληρωτής Καθηγητής Ουρολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Σιώμου Αικατερίνη Επίκουρη Καθηγήτρια Παιδιατρικής με έμφαση στην Παιδιατρική Νεφρολογία του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 4-9-2017

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**Πασχόπουλος Μηνάς**

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας

**Η Γραμματέας του Τμήματος**  
  
**ΚΑΠΤΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΙΑ**  




*Στον σύζυγο μου Θανάση  
και στους γιούς μου Βασίλη και Γιάννη*



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το θέμα της διατριβής αφορά την ιδιοπαθή υπερασβεστιουρία (IYA) στην παιδική ηλικία και την επίδρασή της στον μεταβολισμό των οστών. Η υπερασβεστιουρία (YA) αφορά το 3,8-9,6% του παιδιατρικού πληθυσμού, με την IYA να αποτελεί το συχνότερο αίτιο YA με συχνότητα 2,2-6,4% και σε πρόσφατη μελέτη 17,7%. Από τέσσερις δεκαετίες σχεδόν είναι γνωστή η εμπλοκή του οστίτη ιστού στον παθοφυσιολογικό μηχανισμό της IYA, ενώ υπάρχουν αναφορές από τρεις δεκαετίες τουλάχιστον ότι ενήλικες ασθενείς με IYA και ουρολιθίαση εμφανίζουν μειωμένη οστική πυκνότητα (ΟΠ). Οι Garcia-Nieto και συν. το 1997 δημοσίευσαν επιπολασμό μειωμένης ΟΠ στο 30% παιδιών με IYA και ουρολιθίαση. Οι Skalona και συν. το 2005 κατέγραψαν οστεοπενία ή μειωμένη ΟΠ σε 9 από τα 15 παιδιά με IYA που μελέτησαν. Οι Schwaderer και συν. (2008) βρήκαν ένα σημαντικό ποσοστό παιδιών με IYA και χαμηλή ΟΠ (26%) που στην πλειονότητά τους όμως είχαν και νεφρολιθίαση. Οι Penido και συν. (2003) αναφέρουν οστεοπενία σε ποσοστό 35% σε παιδιά με IYA. Οι ανωτέρω αναφορές όπως φαίνεται αφορούν λίγες μελέτες σε παιδιά με IYA και απώλεια οστικής μάζας. Στον ελληνικό πληθυσμό δε καμία αντίστοιχη μελέτη δεν έχει πραγματοποιηθεί. Όπως λείπουν και μελέτες στα παιδιά με βιοχημικούς δείκτες μεταβολισμού των οστών και με νεώτερους δείκτες κυτταροκινών που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των οστών (OPG και sRANKL).

Στη συνήθη κλινική πράξη, για την εκτίμηση του οστικού μεταβολισμού στα παιδιά, πέραν της ΟΠ, χρησιμοποιείται η μέτρηση της ολικής παραθορμόνης (intact parathyroid hormone, iPTH), του ολικού ασβεστίου (Calcium, Ca), του φωσφόρου (Phosphorus, P), της ολικής αλκαλικής φωσφατάσης (Alkaline Phosphatase, ALP), των μεταβολιτών της βιταμίνης D (Vitamin D, VitD), καθώς και των βιοχημικών δεικτών της οστικής παραγωγής και οστικής απορρόφησης.

Στην προσπάθεια μας να μελετήσουμε την επίδραση της IYA στο μεταβολισμό των οστών στην παιδική ηλικία, εκτιμήσαμε βιοχημικούς δείκτες οστικής παραγωγής και απορρόφησης στον ορό όπως της οστεοκαλσίνης (Osteocalcin, OC), της ALP και του καρβοξύ-τελικού πεπτιδίου των διασταυρούμενων δεσμών του κολλαγόνου τύπου I (C-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen, CTX-I). Επίσης εκτιμήσαμε κυτταροκίνες που σχετίζονται με την οστεοκλαστογένεση: τον υποδοχέα ενεργοποίησης του

πυρηνικού δεσμευτικού παράγοντα kB (receptor activator of nuclear factor kB ligand, RANKL) και την οστεοπροτεγερίνη (Osteoprotegerin, OPG). Επίσης έγινε ανάλυση των πολυμορφισμών A986S, R990G και Q1011E του γονιδίου του ασβεστιοευαίσθητου υποδοχέα (Calcium sensing Receptor, CaSR) στους ασθενείς, για τη διερεύνηση συσχέτισής τους με τη νόσο, καθώς και στην ομάδα ελέγχου.

Η μελέτη εκπονήθηκε στην Παιδιατρική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων σε συνεργασία με το Εργαστήριο του Τομέα Υγείας του Παιδιού του Τμήματος Ιατρικής, Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και το εργαστήριο Γενικής Βιολογίας και Ιατρικής Γενετικής, του Τμήματος Ιατρικής, Σχολής Επιστημών Υγείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, από τον Σεπτέμβριο του 2009 έως και τον Οκτώβριο του 2016.

Με την ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα άτομα που με βοήθησαν και με καθοδήγησαν όλο αυτό το χρονικό διάστημα. Πρωτίστως, ευχαριστώ θερμά την Δασκάλα μου κα Αντιγόνη Σιαμοπούλου-Μαυρίδου ομότιμη Καθηγήτρια Παιδιατρικής, του Τμήματος Ιατρικής, Σχολής Επιστημών Υγείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την εμπιστοσύνη με την οποία με περιέβαλλε με την ανάθεση αυτής της μελέτης. Μέσα από τη δική της κλινική πορεία διδάχθηκα μεταξύ άλλων τον τρόπο προσέγγισης και παρακολούθησης των παιδιών με χρόνια και σοβαρά νοσήματα και καθοδηγήθηκα στη διαμόρφωση της έρευνας έχοντας στραμμένο το βλέμμα πρωτίστως στο παιδί και στο κλινικό όφελος.

Ιδιαίτερος ευχαριστώ την κα Άννα Χάλλα Βιοχημικό, Καθηγήτρια Παιδιατρικής με έμφαση στην εργαστηριακή διερεύνηση νοσημάτων μεταβολισμού των οστών και άλλων νοσημάτων παιδικής ηλικίας, του Τμήματος Ιατρικής, Σχολής Επιστημών Υγείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την πολύτιμη συμμετοχή της στο εργαστηριακό μέρος, στην ανάλυση ειδικών βιοχημικών εξετάσεων και δεικτών, αλλά και την ανεκτίμητη βοήθεια της στην στατιστική επεξεργασία και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την κα Αικατερίνη Σιώμου, Παιδίατρο, Επίκουρη Καθηγήτρια Παιδιατρικής με έμφαση στην Παιδιατρική Νεφρολογία του Τμήματος Ιατρικής, Σχολής Επιστημών Υγείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την πολύτιμη καθοδήγηση και τις συμβουλές της κατά την έναρξη, ολοκλήρωση και συγγραφή της μελέτης, καθώς και την ανεκτίμητη ηθική βοήθεια αλλά και την εξεύρεση πόρων για την οικονομική κάλυψη αντιδραστηρίων.

Ευχαριστώ επίσης την κα Μαρίκα Σύρρου, Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας και Ιατρικής Γενετικής, του Τμήματος Ιατρικής, Σχολής Επιστημών Υγείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την συνολική καθοδήγησή της στην γενετική προσέγγιση της ΙΥΑ στα παιδιά και στην γονιδιακή ανάλυση των δειγμάτων αίματος των παιδιών της μελέτης.

Ευχαριστώ επίσης θερμά τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής κ. Νικόλαο Χαλιάσο Καθηγητή Παιδιατρικής του Τμήματος Ιατρικής, Σχολής Επιστημών Υγείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. Βασίλειο Γιάπρο Καθηγητή Νεογνολογίας του Τμήματος Ιατρικής, Σχολής Επιστημών Υγείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και κ. Δημήτριο Μπαλτογιάννη Αναπληρωτή Καθηγητή Ουρολογίας του Τμήματος Ιατρικής, Σχολής Επιστημών Υγείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Ευχαριστώ τον κ. Βασίλειο Χολέβα ΕΔΙΠ και την κα Αφροδίτη Παπαγιάννη ΕΤΕΠ του Εργαστηρίου Τομέα Υγείας του Παιδιού που βοήθησαν σημαντικά στο εργαστηριακό μέρος της μελέτης. Ευχαριστώ εξαιρετικά την κα Ζωή Παπαδοπούλου, υποψήφια διδάκτορα του Εργαστηρίου Βιολογίας, του Τμήματος Ιατρικής, Σχολής Επιστημών Υγείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και την κα Αγγελική-Μαρία Βλάικου, μεταδιδάκτορα του Εργαστηρίου Βιολογίας, του Τμήματος Ιατρικής, Σχολής Επιστημών Υγείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την συμμετοχή τους στην γενετική μελέτη. Τέλος, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω τα παιδιά και τους γονείς που συνέβαλλαν ουσιαστικά στην πραγματοποίηση της μελέτης καθώς και τους ειδικευόμενους γιατρούς που επικούρησαν στην συλλογή των δειγμάτων.





Αποτελέσματα αυτής της μελέτης έχουν ανακοινωθεί σε πανελλήνια και διεθνή παιδιατρικά συνέδρια:

1. *Μελέτη των κυτοκινών οστεοπροτεγερίνης και sRANKL σε παιδιά με ιδιοπαθή υπερασβεστιουρία.* Μαρία Παύλου, Αικατερίνη Σιώμου, Άννα Χάλλα, Αντιγόνη Σιαμοπούλου-Μαυρίδου. 51ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο 2013. Αλεξανδρούπολη, Ελλάδα. 21-23 Ιουνίου 2013

2. *sRANKL/OPG in children with Idiopathic Hypercalciuria.* Pavlou M, Siomou E, Cholevas B, Siamopoulou A, Challa A. 6th International Conference on Children's Bone Health. Rotterdam, Netherlands. 22-25 June 2013

3. *Μελέτη των οστικών βιοχημικών δεικτών και κυτταροκινών sRANKL/OPG σε παιδιά με ιδιοπαθή υπερασβεστιουρία.* Παύλου Μ, Σιώμου Α, Χάλλα Α, Κούρου Δ, Σιαμοπούλου-Μαυρίδου Α. «Από το Παιδί στον Έφηβο-Μεταβάσεις και θέματα αιχμής». 26ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρίας Κοινωνικής Παιδιατρικής και Προαγωγής της Υγείας του παιδιού - 24η Επιστημονική Εκδήλωση Παιδιατρικής Κλινικής Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων - 3ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Αναπτυξιακής-Συμπεριφορικής Ιατρικής και Εφηβικής Υγείας. Ιωάννινα, Ελλάδα. 19-21 Σεπτεμβρίου 2014

4. *Study of bone biochemical markers and the cytokine sRANKL/OPG system in children with idiopathic hypercalciuria.* Maria Pavlou, Ekaterini Siomou, Anna Challa, Dimitroula Kourou, Antigoni Siamopoulou. 5th Congress of the European Academy of Paediatric Societies (EAPS 2014). Barcelona, Spain. 17-21 October 2014

5. *Πολυμορφισμοί του γονιδίου CaSR και πρωτοπαθής υπερασβεστιουρία στα παιδιά.* Αικατερίνη Σιώμου, Μαρία Παύλου, Ζωή Παπαδοπούλου, Αγγελική-Μαρία Βλάικου, Νικόλαος Χαλιάσος, Μαρία Σύρρου. 54ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο 2016. Ιωάννινα, Ελλάδα. 17-19 Ιουνίου 2016



# ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ .....	1
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....	7
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ (ΑΛΦΑΒΗΤΙΚΑ).....	11
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	15
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	17
Ασβέστιο (Calcium, Ca).....	19
Γενικά .....	19
Απορρόφηση του Ca από το γαστρεντερικό σύστημα .....	21
Νεφρική διαχείριση του Ca .....	22
Επίδραση της PTH και VitD στην επαναρρόφηση Ca .....	27
Φώσφορος (Phosphorus, P).....	28
Γενικά .....	28
Απορρόφηση του P από το γαστρεντερικό σύστημα.....	29
Νεφρική διαχείριση του P.....	31
Φωσφατονίνες.....	32
Οστά και P .....	33
Μέθοδοι εκτίμησης της απέκκρισης P.....	33
Βιταμίνη D (Vitamin D, Vit D).....	35
Γενικά .....	35
Μεταβολισμός και ρύθμιση παραγωγής της VitD.....	36
Δράσεις της 1,25(OH) <sub>2</sub> D .....	39
Επίπεδα της VitD στον ορό .....	39
Συνέπειες ανεπάρκειας VitD .....	40
Πρόσληψη της VitD .....	40
Παραθορμόνη (Parathormone, PTH) .....	42
Γενικά .....	42
Δράσεις της PTH .....	43
Οστά .....	46
Γενικά .....	46
Οστεοβλάστες (OB).....	47
Οστεοκλάστες (ΟΚΛ).....	50
Οστεοκύτταρα (ΟΚ) .....	52

Μεταβολισμός των οστών .....	53
Ιδιοπαθής Υπερασβεστιουρία στην παιδική ηλικία .....	59
Γενικά .....	59
Μορφές της Υπερασβεστιουρίας.....	59
Κλινική Εικόνα Ιδιοπαθούς Υπερασβεστιουρίας.....	59
Διάκριση της Ιδιοπαθούς Υπερασβεστιουρίας.....	60
Παθοφυσιολογία Οστικής Διαταραχής στην Ιδιοπαθή Υπερασβεστιουρία .....	67
Διατροφή και Ιδιοπαθής Υπερασβεστιουρία.....	68
Αντιμετώπιση Ιδιοπαθούς Υπερασβεστιουρίας στα παιδιά .....	69
Γενετική και Ιδιοπαθής Υπερασβεστιουρία.....	73
Συσχετιζόμενα Γονίδια .....	73
Το γονίδιο του ασβεστιοευαίσθητου υποδοχέα (calcium-sensing receptor, CaSR)..	75
2 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	81
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	83
3 ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	85
Υλικό.....	85
Ομάδα ασθενών .....	85
Ομάδα ελέγχου .....	87
Έλεγχος ειδικών δεικτών μεταβολισμού των οστών, κυτταροκινών και πολυμορφισμών του γονιδίου CaSR στα παιδιά με ΙΥΑ και στην ομάδα ελέγχου...88	
Μέθοδοι.....	90
Περιγραφή των χρησιμοποιούμενων βιοχημικών μεθόδων .....	90
Περιγραφή της γονιδιακής ανάλυσης και προσδιορισμός των πολυμορφισμών του γονιδίου CaSR .....	93
Στατιστική ανάλυση δεδομένων .....	93
4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	97
Εκτίμηση Σωματομετρικών Παραμέτρων και Σταδίων Ενήβωσης κατά Tanner των παιδιών της μελέτης.....	97
Σωματομετρικές Παράμετροι των Παιδιών της μελέτης.....	97
Στάδια Ενήβωσης κατά Tanner των παιδιών της μελέτης.....	98
Γενικός Εργαστηριακός Έλεγχος των παιδιών της μελέτης .....	98
Ασθενείς κατά την ένταξη στην μελέτη .....	98
Παιδιά της ομάδας ελέγχου .....	101
Ασθενείς κατά τον επανέλεγχο μετά 3 μήνες.....	101
Εκτίμηση της Διατροφής των ασθενών .....	101
Η διατροφή των ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη, στον χρόνο 0.....	101

Η διατροφή των ασθενών μετά την εφαρμογή των συστάσεων.....	102
Αποτελέσματα της επίδρασης της διατροφικής παρέμβασης σε διούρηση, ηλεκτρολύτες, απέκκριση TPR, Ca, οξαλικών και κιτρικών στα ούρα.....	102
Διούρηση .....	102
Na και K ούρων .....	103
Ca και Pi ούρων .....	103
Ολικές πρωτεΐνες στα ούρα 24ώρου (Total Protein: TPR) .....	105
Οξαλικά και κιτρικά στα ούρα 24ώρου.....	105
Αποτελέσματα της διατροφικής παρέμβασης στα επίπεδα Ca, Pi, PTH, VitD στον ορό .....	106
Ca ορού.....	106
Pi ορού.....	106
PTH ορού.....	107
25OHD ορού.....	108
1,25(OH) <sub>2</sub> D ορού.....	109
Αποτελέσματα της διατροφικής παρέμβασης στους δείκτες οστικής παραγωγής και οστικής απορρόφησης στον ορό .....	109
Δείκτες οστικής παραγωγής.....	109
Δείκτης οστικής απορρόφησης.....	109
Αποτελέσματα της διατροφικής παρέμβασης στις κυτταροκίνες OPG και sRANKL στον ορό.....	111
OPG ορού .....	111
sRANKL.....	112
sRANKL/OPG ορού .....	113
Αποτελέσματα της γονιδιακής ανάλυσης και του προσδιορισμού των πολυμορφισμών A986S, R990G και Q1011E του γονιδίου CaSR .....	113
5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	117
Επίδραση της διατροφικής παρέμβασης στα Na-K-Ca-Pi ούρων, οξαλικά και κιτρικά ούρων.....	118
Na, K, Na/K ούρων.....	118
Ca ούρων .....	118
Pi ούρων.....	119
Οξαλικά ούρων .....	119
Κιτρικά ούρων .....	120
Επίδραση της διατροφικής παρέμβασης στο Ca, Pi, PTH, VitD στον ορό .....	121
Ca και Pi ορού .....	121
PTH ορού.....	122

25OHD ορού.....	124
1,25(OH) <sub>2</sub> D.....	125
Επίδραση της διατροφικής παρέμβασης στους δείκτες οστικής παραγωγής στον ορό ....	127
ALP ορού.....	127
OC ορού.....	127
Επίδραση της διατροφικής παρέμβασης στον δείκτη οστικής απορρόφησης στον ορό...	128
β-Crosslaps ορού .....	128
Επίδραση της διατροφικής παρέμβασης στις κυτταροκίνες OPG και sRANKL στον ορό και στον λόγο sRANKL/OPG .....	130
Πολυμορφισμοί R990G, A986S και Q1011E του γονιδίου CaSR και IYA .....	131
6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	135
Επίδραση της διατροφικής παρέμβασης στο Ca ούρων και Pi, PTH, 25OHD και 1,25(OH) <sub>2</sub> D στον ορό .....	135
Επίδραση της Διατροφικής παρέμβασης στους Δείκτες Οστικής Παραγωγής.....	135
ALP και OC .....	135
Επίδραση της Διατροφικής παρέμβασης στον Δείκτη Οστικής Απορρόφησης β-Crosslaps.....	136
Επίδραση της διατροφικής παρέμβασης στις κυτταροκίνες OPG και sRANKL ορού και στον λόγο sRANKL/OPG .....	136
Πολυμορφισμοί του γονιδίου του CaSR στον πληθυσμό της μελέτης μας .....	136
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	137
ABSTRACT.....	141
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	145

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ (ΑΛΦΑΒΗΤΙΚΑ)

ALP	αλκαλική φωσφατάση (alkaline phosphatase)
Ca	ασβέστιο (Calcium)
CABP-D28K	καλβιδίνη-D28k (calbindin D28k)
CABP-D9K	καλβιδίνη-D9k (calbindin D9k)
CaSR	ασβεστιοευαίσθητος υποδοχέας (Calcium sensing Receptor)
CD	αθροιστικά σωληνάρια (collecting ducts)
Cre	κρεατινίνη (creatinine)
C-telopeptide	καρβοξύ-τελοπεπτίδιο
CTX-I	καρβοξύ-τελικό πεπτίδιο των διασταυρούμενων δεσμών του κολλαγόνου τύπου I (Carboxy-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen )
DCT	άπω εσπειραμένο σωληνάριο (distal convoluted tubule)
DPD	δεοξυπυριδινολίνη (deoxypridinoline)
FGF-23	αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών-23 (fibroblast growth factor-23)
GHS	ο γενετικά υπερασβεστιουρικός αρουραίος που σχηματίζει λίθους (genetic hypercalciuric stoneforming rat)
HC	υπερασβεστιουρία (hypercalciuria)
HYL	υδροξυλυσίνη (Hydroxylysine)
HYP	υδροξυπρολίνη (Hydroxyproline)
IH	ιδιοπαθής υπερασβεστιουρία (idiopathic hypercalciuria)
iPTH	ολική-PTH (intact PTH)
M±SD	μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (Mean ± Standard Deviation)
M±SEM	μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα (Mean ± Standard Error of Mean)
M-CSF	παράγοντας διέγερσης της αποικίας-μακροφάγων (Macrophage-Colony Stimulating Factor)
Mg	μαγνήσιο (magnesium)
Na	νάτριο
NCX	Na <sup>+</sup> -Ca <sup>2+</sup> ανταλλάκτης (Na <sup>+</sup> -Ca <sup>2+</sup> exchanger)
N-telopeptide	άμινο-τελοπεπτίδιο

NTX-I	άμινο-τελικό πεπτίδιο των διασταυρούμενων δεσμών του κολλαγόνου τύπου I (N-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen)
OC	οστεοκαλσίνη (osteocalcin)
OPG	οστεοπροτεγερίνη (osteoprotegerin)
P	φώσφορος (Phosphorus-Phosphate)
PCT	εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο (proximal convoluted tubule)
Pi	φώσφορος ανόργανος (inorganic Phosphorous)
PICP	καρβοξύ-τελικό προπεπτίδιο του προκολλαγόνου τύπου I (Procollagen type I C-terminal propeptide)
PINP	άμινο-τελικό προπεπτίδιο του προκολλαγόνου τύπου I (Procollagen type I N-terminal propeptide)
PMCA1b	πλάσματος-μεμβράνης Ca-ATPάση 1b (Plasma membrane Ca <sup>2+</sup> -ATPase 1b)
PTH	παραθορμόνη (parathormone)
PYD	πυριδινολίνη (pyridinoline)
RANK	υποδοχέας ενεργοποίησης του πυρηνικού παράγοντα kB (receptor activator of nuclear factor kB)
ROMK	δίαυλοι K της έξω μυελικής μοίρας (renal outer-medullary potassium channel)
RANKL	δεσμειτικός παράγοντας του υποδοχέα ενεργοποίησης του πυρηνικού παράγοντα kB (receptor activator of nuclear factor kB ligand)
sRANKL	διαλυτός RANKL (soluble RANKL)
TALH	παχύ ανιόν σκέλος της αγκύλης του Henle (thick ascending loop of Henle)
TPR	ολικές πρωτεΐνες (Total proteins)
TRPV	επιθηλιακός διάυλος Ca (epithelial transient receptor potential calcium channel)
UCa/Ucre	λόγος του ασβεστίου ούρων προς κρεατινίνη ούρων από δείγμα ούρων (ratio of urine Calcium to urine creatinine from urine sample)
VDR	υποδοχέας της VitD (Vitamin D Receptor)
Vit D	βιταμίνη D (Vitamin D)
β-CrossLaps	θραύσμα αποδόμησης του β-CTX-I, που περιέχει την β-ισομερισμένη



	οκταπεπτιδική ακολουθία ΕΚΑΗD-β-GGR
ΔΜΣ	δείκτης μάζας σώματος
1,25(OH) <sub>2</sub> D	25-δωδρόξυ βιταμίνη D (1,25-dihydroxy Vit D)
Επ.Σ.	επιφάνεια σώματος
ΜΟ	μηριαίο οστό
ΙΥΑ	ιδιοπαθής υπερασβεστιουρία
ΟΜΣΣ	οσφυϊκή μοίρα σπονδυλικής στήλης
ΟΠ	οστική πυκνότητα
25ΟΗD	25-υδρόξυ βιταμίνη D (25-hydroxy Vit D)
ΥΑ	υπερασβεστιουρία



# ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---



# 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το ασβέστιο (Calcium, Ca) αποτελεί βασικό στοιχείο του σκελετού. Το ισοζύγιο του Ca πρέπει να είναι θετικό κατά την διάρκεια της ανάπτυξης του ανθρώπινου οργανισμού ώστε να επιτευχθεί η βέλτιστη ανάπτυξη του σκελετού και η μέγιστη γονιδιακά προκαθορισμένη ΟΠ ως το πέρας της εφηβείας. Η υγεία των οστών τις επόμενες δεκαετίες της ζωής καθορίζεται σε σημαντικό βαθμό από την επίτευξη μέγιστης οστικής μάζας. Εμπλεκόμενοι μηχανισμοί στο ισοζύγιο του Ca αποτελούν η διατροφική πρόσληψη, η απορρόφηση και οι απώλειες από το γαστρεντερικό και τον ιδρώτα, ενώ σημαντική συνιστώσα αποτελεί η νεφρική απέκκριση Ca.

Ως ΥΑ ορίζεται η απέκκριση Ca  $>4$  mg/Kg/24ωρο για κάθε ηλικία, όταν εκτιμάται με συλλογή ούρων 24ώρου [1, 2] ή για τιμές κλάσματος Ca/Cr από δείγμα τυχαίας ούρησης μεγαλύτερες των φυσιολογικών για την ηλικία του παιδιού (Πίνακας 1) [3-6]. Ο επιπολασμός της ΥΑ στα παιδιά κυμαίνεται στο 3,8-9,6% σε πληθυσμιακές μελέτες [7-12].

**Πίνακας 1.** Φυσιολογικές τιμές απέκκρισης Ca στα ούρα [13]

Ηλικία	Δείγμα Ούρων Calcium/Cr (mg/mg)	Συλλογή Ούρων 24ώρου
0-6 μην	<0,8	
6-12 μην	<0,6	Calcium <4 mg/Kg/24h
2-18 ετών	<0,21	

Η ΥΑ διακρίνεται σε ιδιοπαθή, δευτεροπαθή και πρωτοπαθή μορφή. Ο όρος ΙΥΑ προτάθηκε από τους Albright και συν., το 1953, για να περιγράψει την ΥΑ με φυσιολογικό Ca ορού σε ασθενείς με νεφρολιθίαση από ασβεστούχους λίθους [14]. Η ΙΥΑ αποτελεί την συχνότερη μορφή, παρατηρείται σποραδικά ή οικογενώς, είναι πολυπαραγοντικό νόσημα και οφείλεται σε πολυγονιδιακές διαταραχές και στην αλληλεπίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων [15].

Η δευτεροπαθής ΥΑ προκαλείται από συγκεκριμένα αίτια όπως: αυξημένη λήψη άλατος, Ca, VitD, πρωτεΐνης, προωρότητα, υπερασβεστιαμία, υπερπαραθυροειδισμό,

υπερθυροειδισμό ή υποθυροειδισμό, υπερκορτιζολαιμία, ένδεια φωσφορικών, μεταβολική οξέωση, χορήγηση διουρητικών της αγκύλης του Henle, ακινητοποίηση, αυξημένα επίπεδα προσταγλαδίνης E2, αφυδάτωση [16-19] .

Η πρωτοπαθής ΥΑ οφείλεται σε σπάνιες μονογονιδιακές διαταραχές που προκαλούν γνωστά σύνδρομα, με μηχανισμό δράσης στους νεφρούς, τα οστά και το γαστρεντερικό. Τέτοια σύνδρομα ή διαταραχές είναι: νόσος του Dent, σύνδρομο Lowe, γλυκογονίαση τύπου 1a, νόσος του Wilson, Νεφρική σωληναριακή οξέωση τύπου I, τυροσιναιμία τύπου 1, ψευδοϋποαλδοστερονισμός τύπου II, οικογενής υπομαγνησιαίμια-υπερασβεστιουρία, σύνδρομο Bartter, σύνδρομο Gordon, σύνδρομο Liddle, σύνδρομο Fanconi, οικογενής αυτοσωμική υπασβεστιαίμια, οικογενής μεμονωμένος υποθυροειδισμός, Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) με υπερθυροειδισμό, όγκοι παραθυροειδούς με οστεοποιαίνωματα της γνάθου, βρεφική υποφωσφαταιμία, μεταφυσιακή χονδροδυσπλασία τύπου Jansen, ατελής οστεογένεση τύπου 1, σύνδρομο McCune-Albright, κληρονομική υποφωσφαταιμική ραχίτιδα και ΥΑ, συγγενής ανεπάρκεια λακτάσης, δυσασπορρόφηση σουκρόζης-ισομαλτόζης και γλυκόζης-γαλακτόζης, σύνδρομο Blue diaper, σύνδρομο Williams–Beuren, κυστική ίνωση, β-μεσογειακή αναιμία, σύνδρομο Beckwith-Wiedemann και φαινυλοκετονουρία [20].

Υπάρχουν αναφορές από τέσσερις δεκαετίες τουλάχιστον ότι ασθενείς με ΙΥΑ και ουρολιθίαση εμφανίζουν μειωμένη ΟΠ [21]. Σε ενήλικες ασθενείς με νεφρικού τύπου ΙΥΑ βρέθηκε πιο συχνά μειωμένη ΟΠ απ' ό,τι σε ασθενείς με εντερικού τύπου [22]. Μειωμένη ΟΠ βρέθηκε σε ποσοστό 26-35% των παιδιών με ΙΥΑ σε διάφορες μελέτες [23-25]. Μετά από αυτά τα ευρήματα οι ερευνητές έθεσαν το ερώτημα αν η οστεοπόρωση των ενηλίκων μπορεί να έχει τη ρίζα της στην παιδική ηλικία [26]. Η οστική διαταραχή στην ΙΥΑ μπορεί να οφείλεται σε μειωμένη οστική παραγωγή ή/και σε αυξημένη οστική απορρόφηση.

## **Ασβέστιο (*Calcium, Ca*)**

### **Γενικά**

Το Ca είναι το πέμπτο αφθονότερο στοιχείο και το αφθονότερο κατιόν στον ανθρώπινο οργανισμό, αποτελεί το 2% του βάρους σώματος ενός υγιούς ενήλικα ή περίπου 1300 gr. Κατά την γέννηση το Ca αποτελεί μόλις το 0,9% του βάρους σώματος και έως την ηλικία των 20 ετών αυξάνεται ποσοτικά περίπου 40 φορές, οπότε και ολοκληρώνεται η ανάπτυξη του σκελετού και της οδοντοφυΐας [27]. Περισσότερο από 99% βρίσκεται στα οστά και στα δόντια σαν ενώσεις φωσφορικού ασβεστίου κυρίως ως υδροξυαπατίτης  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$  και αποτελεί το 25% του ξηρού βάρους του σκελετού. Το υπόλοιπο 1% (περίπου 10 gr) βρίσκεται στους μαλακούς ιστούς και στα εξωκυττάρια υγρά [28]. Το Ca ως δομικό στοιχείο των οστών παρέχει στήριξη στον σκελετό, που αποτελεί μια δυναμική δεξαμενή αποθήκευσης του, ώστε να ρυθμίζεται η ένδο- και εξωκυττάρια συγκέντρωση του. Το μη οστικό κλάσμα Ca, αν και αφορά λιγότερο από 1% του συνολικού, αποτελεί το μεταβολικά δραστήριο κλάσμα του Ca, που είναι υπεύθυνο για μια σειρά βασικών λειτουργιών, όπως: δράση ενζύμων, λειτουργικότητα μιτοχονδρίων, πήξη του αίματος, έξω- και ενδοκυττάρια μεταφορά σημάτων, μετάδοση των νευρικών ώσεων και σύσπαση των μυών.

Το 40% του Ca του πλάσματος βρίσκεται σε μη ιονισμένη μορφή, συνδεδεμένο με πρωτεΐνες και δεν διηθείται στο νεφρικό σπείραμα. Το μη ιονισμένο Ca του πλάσματος συνδέεται με αλβουμίνη κατά 90% και το υπόλοιπο 10% με σφαιρίνες, ενώ το μη ιονισμένο Ca των κυττάρων συνδέεται κυρίως με την πρωτεΐνη καλβιδίνη αλλά και άλλες πρωτεΐνες [29, 30]. Με την μορφή ελεύθερου ιόντος βρίσκεται το 48-51% και σαν ιονικό σύμπλεγμα το 9-11%, κυρίως ως ενώσεις φωσφορικού, ανθρακικού και οξαλικού Ca. Ο οργανισμός ρυθμίζει λίγες λειτουργίες με τόση ακρίβεια, πιστότητα και αμεσότητα όπως την συγκέντρωση του ιονισμένου Ca στον ορό, που πρέπει να διατηρείται εντός ενός στενού φυσιολογικού εύρους 4,4 έως 5,4 mg/dl στους ενήλικες (1,10 έως 1,35 mMol/L) [31]. Οι φυσιολογικές τιμές των συγκεντρώσεων του ιονισμένου Ca στο αίμα, του ολικού Ca και του P στον ορό στα παιδιά στις διάφορες ηλικίες φαίνονται στον Πίνακα 2 [13].

**Πίνακας 2.** Φυσιολογικές τιμές συγκεντρώσεων του ιονισμένου ασβεστίου (Ca) στο αίμα, του ολικού (Ca) και του φωσφόρου (P) στον ορό στα παιδιά στις διάφορες ηλικίες. [13, σελ. 234]

<b>Ηλικία έτη</b>	<b>Ιονισμένο Ca (mg/dl)</b>	<b>Ολικό Ca (mg/dl)</b>	<b>Φώσφορος (P) (mg/dl)</b>
0-0,25	4,9-5,6	8,8-11,3	4,8-7,4
1-5	4,9-5,3	9,4-10,8	4,5-6,2
6-12	4,6-5,3	9,4-10,3	3,6-5,8

Το γαστρεντερικό σύστημα, ο οστίτης ιστός, οι νεφροί αλλά και ένας περίπλοκος εμπλεκόμενος ενδοκρινικός μηχανισμός, αλληλεπιδρώντας μεταξύ τους ρυθμίζουν την ομοιόσταση του Ca στον ορό. Παρά τις ημερήσιες διακυμάνσεις της πρόσληψης του Ca ο οργανισμός επιτυγχάνει κατά έναν θαυμαστό τρόπο σταθερά επίπεδα στον ορό. Η σταθερή διακύμανση της συγκέντρωσης Ca στον ορό πρωτίστως ρυθμίζεται από τους παραθυροειδείς αδένες εκκρίνοντας PTH και τους νεφρούς μετατρέποντας την 25OHVitD (25OHD) στην ενεργό μορφή της 1,25(OH)<sub>2</sub>VitD [1,25(OH)<sub>2</sub>D]. Επιπλέον, ο CaSR επιτρέπει σε κύτταρα του παραθυροειδούς αδένου, του νεφρικού σωληναρίου και δυνητικά του εντέρου και των οστών την παρακολούθηση των επιπέδων των ιόντων Ca τοπικά και τροποποίηση της λειτουργίας τους ανάλογα με τις μεταβολές [32].

Η καλσιτονίνη, εκκρίνεται από τα παραθυλακιδώδη κύτταρα (κύτταρα C) του θυροειδούς αδένου. Η υπερασβεστιασμία προκαλεί την έκκριση της καλσιτονίνης, που μειώνει τη συγκέντρωση του Ca στον ορό. Η ενέργεια αυτή επιτυγχάνεται κυρίως μέσω μείωσης της οστικής απορρόφησης, μειώνοντας τον πολλαπλασιασμό και την δραστηριότητα των οστεοκλαστών (ΟΚΛ) [33]. Ωστόσο, η δράση της καλσιτονίνης στην ρύθμιση της ΥΑ στον ανθρώπινο οργανισμό είναι πολύ περιορισμένη [34, σελ. 58]. Άλλες ορμόνες που συμβάλλουν στην ρύθμιση του Ca είναι η θυροορμόνη, οι ορμόνες του φύλου (οιστρογόνα και ανδρογόνα), η αυξητική ορμόνη, τα γλυκοκορτικοειδή και η ινσουλίνη [19].

Η βιταμίνη C, τα επίπεδα αλβουμίνης και δεσμευτικών πρωτεϊνών του Ca και της VitD, τα φωσφορικά, οι αναστολείς της επιμετάλλωσης όπως τα πυροφωσφορικά επηρεάζουν την απορρόφηση και τη συγκέντρωση του ολικού και του ιονισμένου Ca στον ορό. Το pH του αίματος επηρεάζει το βαθμό σύνδεσης της αλβουμίνης με το ιονισμένο κλάσμα του Ca, καθώς η μεταβολική και αναπνευστική αλκάλωση προάγει την σύνδεση



τους, μειώνοντας έτσι την συγκέντρωση του ενεργού ελεύθερου ιονισμένου κλάσματος Ca [35, 36].

### **Απορρόφηση του Ca από το γαστρεντερικό σύστημα**

Η πρόσληψη και απορρόφηση επιτελείται από το γαστρεντερικό και είναι μεταβαλλόμενη ανάλογα με τις εκάστοτε ανάγκες, ενώ σημαντική ποσότητα αποβάλλεται κυρίως με τα κόπρανα και λιγότερο με τα ούρα. Όταν τα επίπεδα Ca πέφτουν έστω και στιγμιαία, κινητοποιείται άμεσα η δράση του συστήματος PTH/VitD επαναφέροντας τα στα φυσιολογικά, μέσω μετακίνησης του Ca από τα οστά, αύξησης της απορρόφησης από το γαστρεντερικό και επαναρρόφησης από τους νεφρούς. Η PTH και η VitD ρυθμίζουν τη σύνθεση και τη δραστηριότητα των υπεύθυνων μεταφορέων για την μετακίνηση σε αυτές τις περιοχές. Η VitD αποτελεί απαραίτητο, ρυθμιστικό παράγοντα της απορρόφησης του Ca από το γαστρεντερικό, της εισροής και εκροής του Ca από τα οστά και της νεφρικής απέκκρισής του [37].

Οι κυριότερες πηγές Ca είναι τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Άλλα τρόφιμα όπως δημητριακά, όσπρια, ξηροί καρποί, φρούτα και λαχανικά περιέχουν επίσης ικανοποιητικές ποσότητες Ca. Οι συνιστώμενες ημερήσιες ανάγκες Ca για τα παιδιά, ανάλογα με την ηλικία φαίνονται στον Πίνακα 3 [38, 39].

**Πίνακας 3.** Συνιστώμενες ημερήσιες ανάγκες Ca για τα παιδιά, βάση ηλικίας [39].

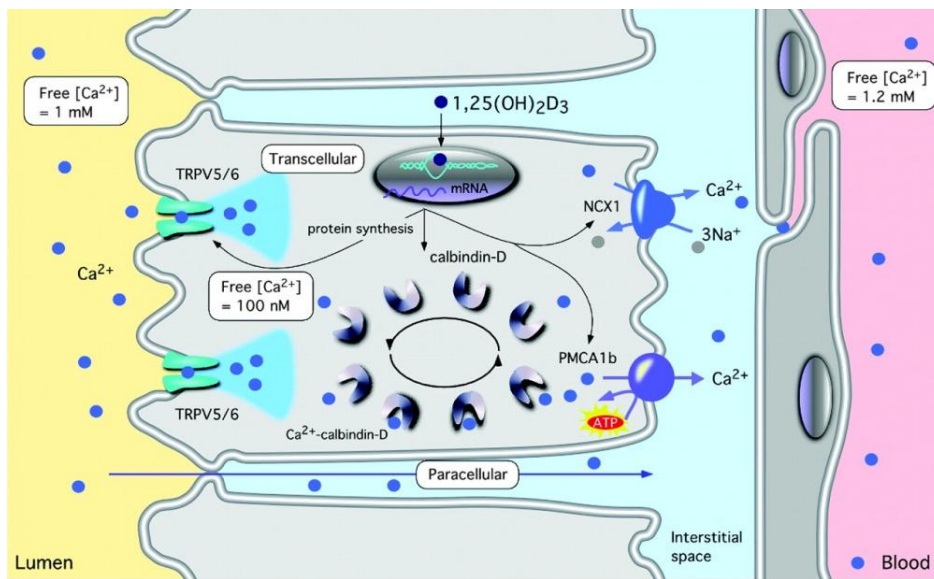
<b>Συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη ασβεστίου (Ca) για βρέφη, παιδιά και εφήβους</b>	
Βρέφη 0-12 μηνών	210 mg
Παιδιά 1-3 ετών	500 mg
Παιδιά 4-8 ετών	800 mg
Παιδιά και έφηβοι 9-18 ετών	1300 mg

Το 90% του Ca απορροφάται στο λεπτό έντερο, ενώ το υπόλοιπο 10% στο τυφλό και ανιόν κόλον [40]. Με την εντερική απορρόφηση πραγματοποιείται η εισροή του Ca στον εξωκυττάριο χώρο. Ο μηχανισμός απορρόφησης του Ca περιλαμβάνει δύο διακριτά μονοπάτια: τη διακυτταρική ενεργό διαδικασία και την παρακυτταρική παθητική διάχυση

(Εικόνα 1). Η ενδοκυττάρια μετακίνηση αφορά μεταφορά Ca διαμέσου του επιθηλιακού εντεροκυττάρου, απαιτεί ενέργεια (ενεργός μεταφορά), είναι κορέσιμη, εξαρτώμενη από τη VitD και αποτελεί το κύριο μονοπάτι απορρόφησης σε περιορισμένη διατροφική πρόσληψη Ca. Ενεργός απορρόφηση του Ca λαμβάνει χώρα στο δωδεκαδάκτυλο και στο εγγύς τμήμα της νήστιδας. Το Ca οδηγείται μέσω πρωτεϊνικών διαύλων, της ψηκτροειδούς πλευράς της κυτταρικής μεμβράνης από τον εντερικό αυλό στο κυτταρόπλασμα, κυρίως μέσω των επιθηλιακών διαύλων του Ca TRPV5 (transient receptor potential of the vanilloid type 5) και λιγότερο των TRPV6 διαύλων. Στη συνέχεια, δεσμευμένο, κυρίως με την πρωτεΐνη καλβιδίνη-D9k (calbindin D9k, CABP-D9K), την καλβιδίνη-D28k (calbindin D28k, CABP-D28K) και την καλμοδουλίνη, μετακινείται προς την πλαγιοκυτταρική μεμβράνη και τελικά εξωθείται μέσω αυτού του τμήματος της μεμβράνης προς τον εξωκυττάριο χώρο, δεσμευμένο με πρωτεΐνες πλάσματος-μεμβράνης (Εικόνα 1). Το δεύτερο μονοπάτι μεταφοράς του Ca αφορά την παθητική διάχυση, εξαρτώμενη από την κλίση συγκέντρωσης του Ca στον εντερικό αυλό και λαμβάνει χώρα σε όλο το έντερο αλλά κυρίως στην νήστιδα και στον ειλέο [19]. Διά των διακυτταρικών στενών διαστημάτων των επιθηλιακών εντεροκυττάρων διαχέονται ελεύθερα ιόντα Ca από τον εντερικό αυλό προς τον εξωκυττάριο χώρο. Η παρακυτταρική διάχυση του Ca είναι η κύρια οδός μεταφοράς σε διατροφή με υψηλή περιεκτικότητα σε Ca. Αντίθετα σε μειωμένη πρόσληψη Ca μόλις 10-20% μεταφέρεται παθητικά. Ποσοστό 20-80% της προσλαμβανόμενης ποσότητας Ca απορροφάται τελικά, ανάλογα με τις ανάγκες του οργανισμού [39, 41, 42] (Εικόνα 1).

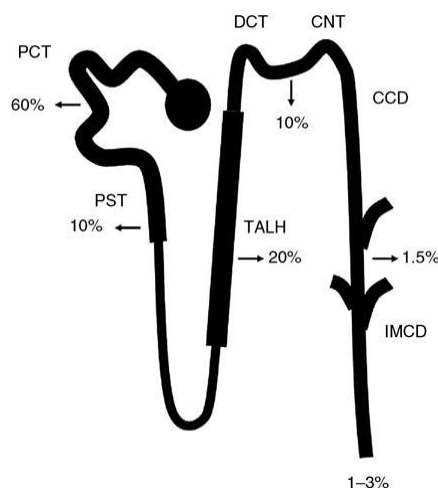
### **Νεφρική διαχείριση του Ca**

Περίπου το 60% του Ca του πλάσματος, που αφορά το ιονισμένο και την σύμπλοκη μορφή Ca, διηθείται ελεύθερα στο σπείραμα [43]. Το 98-99% του διηθούμενου φορτίου του Ca, που υπολογίζεται περίπου 8 g/24ωρο στον ενήλικα, πρέπει να επαναρροφηθεί από τα νεφρικά σωληνάκια ώστε να διατηρηθεί το ισοζύγιο του Ca στο αίμα, απεκκρίνοντας 250-300 mg στα ούρα στον ενήλικα.



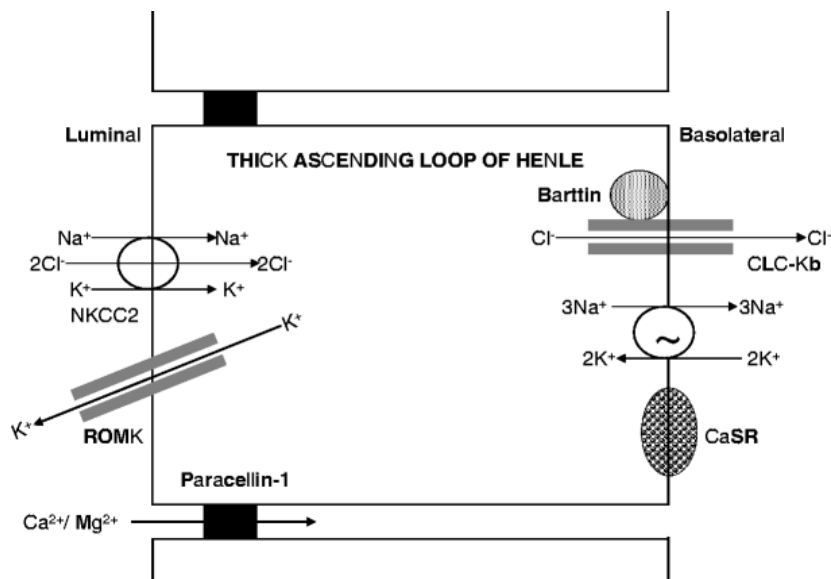
**Εικόνα 1.** Εντερική μεταφορά του ασβεστίου (Ca). Η παρακυτταρική απορρόφηση (paracellular) εξαρτάται από την συγκέντρωση Ca στον αυλό του εντέρου και οδηγείται από την ηλεκτροχημική διαβάθμιση του (μπλε βέλος). Το διακυτταρικό μονοπάτι απορρόφησης αφορά την είσοδο του Ca στα επιθηλιακά κύτταρα μέσω εξειδικευμένων διαύλων Ca (TRPV5 και TRPV6), μετά την δέσμευση του Ca στο κυτταρόπλασμα με την πρωτεΐνη καλβιδίνη D9K κυρίως και δευτερευόντως με την D28K, καλμοδουλίνη και άλλες πρωτεΐνες και τελικά την απορρόφηση του, μέσω της πλαγιοκυτταρικής μεμβράνης, συνδεδεμένου με Ca-ATPάσης (PMCA1b) και Na/Ca ανταλλάκτη (NCX1) [19].

Περίπου το 70% του διηθημένου Ca επαναρροφάται στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο (proximal convoluted tubule, PCT). Η ενεργός επαναρρόφηση του νατρίου (Na) και του νερού στο PCT, εγκαθιστά αυξημένη κλίση συγκέντρωσης Ca στον αυλό του σωληναρίου, που οδηγεί σε παθητική επαναρρόφηση του μέσω του παρακυτταρικού μονοπατιού (Εικόνα 2). Υπάρχουν ενδείξεις και για ενεργή επαναρρόφηση του Ca σε μικρό ποσοστό στο PCT, ιδιαίτερα στο πρώτο τμήμα του, όπου το διεπιθηλιακό δυναμικό με τον αυλό είναι αρνητικό [44] και στο τμήμα 3, όπου δεν εξαρτάται από το Na, αλλά εμφανίζεται έναντι ηλεκτροχημικής κλίσης [45]. Το PCT είναι επίσης σημαντικό για την μαζική επαναρρόφηση των: Na, χλωριούχων, P, αμινοξέων, γλυκόζης και μικρού μοριακού βάρους πρωτεϊνών. Δυσλειτουργία του PCT, όπως στο σύνδρομο Fanconi, στο σύνδρομο Lowe, στη νόσο Wilson, στην Τυροσιναιμία I, στην γλυκογονίαση τύπου Ia, στην κληρονομική υποφωσφαταιμική ραχίτιδα και στην νόσο Dent προκαλεί και ΥΑ [46].



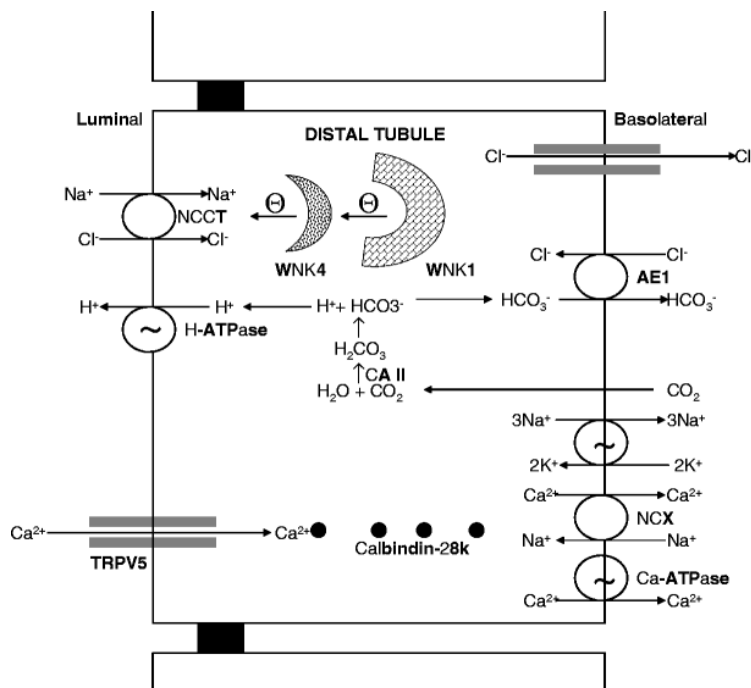
**Εικόνα 2.** Σχηματική απεικόνιση της επαναρρόφησης του Ca κατά μήκος του νεφρώνα, όπως προκύπτει από τα δεδομένα μικροπαρακέντησης. PCT (proximal convoluted tubule): εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο. PST (proximal straight tubule): εγγύς ευθύ σωληνάριο. TALH (thick ascending limb of Henle's loop): παχύ ανιόν σκέλος της αγκύλης του Henle. DCT (distal convoluted tubule): άπω εσπειραμένο σωληνάριο. CNT (connecting tubule): συνδετικό σωληνάριο. CCD (cortical collecting duct): φλοιικό συλλεκτικό σωληνάριο. IMCD (inner medullary collecting duct): έσω μυελικό συλλεκτικό σωληνάριο. Προσαρμογή από [47].

Το 20% του διηθημένου Ca επαναρροφάται παθητικά στο παχύ ανιόν σκέλος της αγκύλης του Henle (thick ascending loop of Henle, TALH), προωθούμενο από το θετικό δυναμικό του αυλού, που παράγεται δευτερογενώς από την ενεργό μεταφορά του NaCl, δια μέσου του συµμεταφορέα  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ , των διαύλων K της έξω μυελικής μοίρας (renal outer-medullary potassium channel, ROMK) και των διαύλων Cl (Εικόνα 2, Εικόνα 3) [48]. Η αναστολή της μεταφοράς του NaCl με φουροσεμίδα μειώνει την διεπιθηλιακή τάση και συνεπώς, αυξάνει την απέκκριση του Ca. Έτσι, η επαναρρόφηση του Ca στο νεφρικό σωληνάριο βρίσκεται κυρίως υπό την επίδραση της επαναρρόφησης του Na, το οποίο είναι ζωτικής σημασίας στην διαιτητική διαχείριση της ΥΑ. Σε ορισμένες μελέτες, ωστόσο, η μεταφορά Ca στο TALH βρέθηκε να είναι ενεργός [49, 50]. Δυσλειτουργία του TALH, όπως στο σύνδρομο Bartter και στην οικογενή υπομαγνησισαμία, προκαλεί ΥΑ (Εικόνα 3) [48].



**Εικόνα 3.** Σχηματική απεικόνιση της μεταφοράς του Ca στο παχύ ανιόν σκέλος της αγκύλης του Henle (thick ascending loop of Henle), που συσχετίζουν το σύνδρομο Bartter και την οικογενή υπομαγνησισαμία με υπερασβεστιουρία και νεφρασβέστωση. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> συµμεταφορέας (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter, NKCC2), νεφρικό εξω-µυελικό κανάλι K (renal outer-medullary potassium channel, ROMK), κανάλι χλωρίου Kb (chloride channel Kb, CLC-Kb), ασβεστιοευαίσθητος υποδοχέας (calcium-sensing receptor, CaSR) [48].

Η λεπτή ρύθμιση του υπόλοιπου 5-10% του διηθημένου Ca πραγματοποιείται στο άπω σωληνάριο (distal convoluted tubule, DCT), λιγότερο από 5% στο αρχικό τμήμα των φλοιικών αθροιστικών σωληναρίων και λιγότερο από 1% στα μυελικά αθροιστικά σωληνάκια, μέσω ενός ενεργού διακυτταρικού μονοπατιού [44, 51-53]. Έτσι τελικά, 1-3% του διηθημένου Ca αποβάλλεται στα ούρα (Εικόνα 2, Εικόνα 4). Η ενεργός διακυτταρική μεταφορά του Ca στο DCT, παρόλο που γίνεται παράλληλα με του Na, δεν εξαρτάται από το Na ούτε από το διεπιθηλιακό δυναμικό. Η επαναρρόφηση του Ca στα DCT μπορεί να αποσυνδεθεί από αυτή του Na με χορήγηση θειαζιδικών διουρητικών, τα οποία αυξάνουν την επαναρρόφηση του Ca και μειώνουν του Na. Η μεταφορά του Ca από τον αυλό πραγματοποιείται μέσω των TRPV5 διαύλων της ψηκτροειδούς πλευράς στο κυτταρόπλασμα, στο DCT. Οι TRPV5 συνεντοπίζονται με την VitD-εξαρτώμενη CABP-D28K, τον NCX και την PMCA1b στο DCT. Η CABP-D28K πρωτεΐνη ενεργεί ως το κύριο όχημα διακυτταρικής μετακίνησης του Ca. Οι NCX και PMCA πρωτεΐνες πλάσματος-µεμβράνης διευκολύνουν την πλαγιοκυτταρική εξώθηση του Ca, μεταφέροντας το 70% και 30% του Ca αντίστοιχα (Εικόνα 4).



**Εικόνα 4.** Σχηματική απεικόνιση της μεταφοράς του Ca στο άπω σωληνάριο που σχετίζεται με ψευδοϋποαλδοστερονισμό (PHA) τύπου II και άπω νεφρική σωληναριακή οξέωση.  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  συμμεταφορέας ( $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  cotransporter, NCCT), TRPV5 διάλυσι Ca (TRPV5 calcium channel),  $\text{Cl}^-\text{-HCO}_3^-$  ανταλλάκτης ( $\text{Cl}^-\text{-HCO}_3^-$  exchanger, AE1), κυτταροπλασματική καρβονική ανυδράση (cytoplasmic carbonic anhydrase, CA II),  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$  ανταλλάκτης ( $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$  exchanger, NCX), χωρίς λυσίνη πρωτεϊνική κινάση 1 (with-no-lysine kinase 1, WNK1), χωρίς λυσίνη πρωτεϊνική κινάση 4 (with-no-lysine kinase 4, WNK4) [48].

Η μεταφορά Ca στο DCT ρυθμίζεται από την PTH και την  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  [54, 55]. Οι Hoenderop και συν. έδειξαν ότι τα ποντίκια που στερούνται TRPV5 εμφάνισαν μειωμένη ενεργή επαναρρόφηση Ca, παρά τα αυξημένα επίπεδα της VitD, προκαλώντας σοβαρή ΥΑ και σημαντικές διαταραχές στη δομή των οστών [56]. Στα φλοιικά αθροιστικά σωληνάρια η μεταφορά Ca πιθανά είναι ενεργή, με την διαμεσολάβηση του  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$  ανταλλάκτη ( $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$  exchanger, NCX), της CABP-D28K και της PMCA [44]. Στο επίπεδο του DCT διαταραχές όπως η άπω σωληναριακή οξέωση και ο ψευδοϋποαλδοστερονισμός τύπου II μπορεί να προκαλέσουν ΥΑ [46] (Εικόνα 4).

## **Επίδραση της PTH και VitD στην επαναρρόφηση Ca**

Η PTH διεγείρει την επαναρρόφηση Ca στους νεφρούς και πιστεύεται ότι είναι ο κύριος ορμονικός καθοριστικός παράγοντας της απέκκρισης Ca στα ούρα. Υποδοχείς της PTH βρέθηκαν σε όλον τον νεφρώνα [57, 58]. Στο σπείραμα, μειώνοντας τον συντελεστή τριχοειδικής διήθησης Kf, μειώνει τον ρυθμό σπειραματικής διήθησης, το διηθούμενο φορτίο Ca και συνεπώς την απέκκριση του Ca [59]. Στα φλοιικά DCT κυρίως, αλλά και στο TALH η PTH αυξάνει την σωληναριακή επαναρρόφηση του Ca [54, 60]. Η PTH δρα ρυθμίζοντας τις πρωτεΐνες μεταφοράς του Ca, ανεξάρτητα από την VitD [61]. Σε παραθυρεοειδεκτομηθέντες αρουραίους, μειώθηκαν τα επίπεδα του mRNA της TRPV5, CABP-D28K και NCX, ενώ συνεχής έγχυση της PTH αποκατέστησε την έκφραση τους σε σχεδόν φυσιολογικά επίπεδα. Σε καλλιέργειες φλοιικών κυττάρων DCT κουνελιού, η PTH προκάλεσε αύξηση της εισροής Ca στην ψηκτροειδή παρυφή, προάγοντας την έκφραση του mRNA της TRPV5, CABP-D28K και NCX [62].

Η VitD δεν έχει καμία επίδραση στην επαναρρόφηση του Ca στο PCT [63]. Η 1,25(OH)<sub>2</sub>D δρα στον άπω νεφρώνα, προάγει την επαναρρόφηση Ca αυξάνοντας την έκφραση των πρωτεϊνών μεταφοράς του Ca TRPV5, CABP-D28K και NCX [64-66].

## Φώσφορος (*Phosphorus, P*)

### Γενικά

Ο P αποτελεί το 0,6% του βάρους σώματος κατά τη γέννηση και το 1,1-1,4% ή 600-700 gr στην ενήλικη ζωή. Αποτελεί το αφθονότερο ανιόν του οργανισμού, είναι κυρίως ενδοκυττάριο με 100πλάσια συγκέντρωση μέσα στα κύτταρα συγκριτικά με του πλάσματος. Περίπου 85% της ποσότητας βρίσκεται στα οστά και στα δόντια ως υδροξυαπατίτης  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ , 15% στους μαλακούς ιστούς και 0,3% στον εξωκυττάριο χώρο. Στα κύτταρα αποτελεί σημαντικό δομικό συστατικό μακρομορίων όπως: φωσφολιπιδίων, νουκλεϊνικών οξέων, φωσφοπρωτεϊνών, γλυκογόνου και ενδιάμεσων προϊόντων μεταβολισμού των υδατανθράκων, ATP, 2,3DPG και πολλών ενζύμων [67-70]. Έτσι ο P διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε μια ποικιλία βιολογικών διεργασιών, όπως: σηματοδότηση του κυττάρου, μεταβολισμό των νουκλεοτιδίων, παραγωγή της ενέργειας με την μορφή ATP, λειτουργία της κυτταρικής μεμβράνης και επιμετάλλωση των οστών. Το ισοζύγιο του P, ως σημαντικό συστατικό των οστών, πρέπει να είναι θετικό κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης ενώ παραμένει μηδενικό στην ενήλικη ζωή [71]. Η ρύθμιση της ομοιόστασης P, ως εκ τούτου, έχει μεγάλη σημασία για την ευεξία του οργανισμού. Σημαντική υποφωσφαταιμία μπορεί να οδηγήσει σε μυοπάθεια, καρδιακή δυσλειτουργία, δυσλειτουργία των ουδετερόφιλων και των αιμοπεταλίων και ευθραυστότητα της κυτταρικής μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Χρόνια ανεπάρκεια P οδηγεί σε διαταραχή των οστών, προκαλώντας ραχίτιδα και οστεομαλακία [28, 72]. Αυξημένες συγκεντρώσεις P συμβάλλουν σημαντικά στην παθογένεση του δευτεροπαθούς υπερπαραθυρεοειδισμού, που παρατηρείται σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια [73].

Ο P πλάσματος βρίσκεται σε οργανική μορφή, κυρίως ως φωσφολιπίδια σε ποσοστό 65% ή εστέρες φωσφορικών και περίπου 30% σε ανόργανη μορφή. Ποσοστό περίπου 12% του ανόργανου P (Phosphorous inorganic, Pi) πλάσματος είναι συνδεδεμένο με πρωτεΐνη ενώ το υπόλοιπο, που διηθείται στο νεφρικό σπείραμα, βρίσκεται είτε κυρίως ως ελεύθερα ιόντα  $HPO_4^{2-}$  και  $H_2PO_4^-$  (54%), είτε ως σύμπλοκο άλας με Na (28%) ή με Ca και μαγνήσιο (Mg) (6%) [74].

Στην κλινική πράξη, συνήθως μετριέται μόνο η μορφή του ανόργανου ορθοφωσφορικού Pi. Οι όροι «συγκέντρωση φωσφόρου» και «συγκέντρωση φωσφορικών» συχνά χρησιμοποιούνται ως ταυτόσημοι, αλλά ακόμη και όταν αναφερόμαστε στον όρο



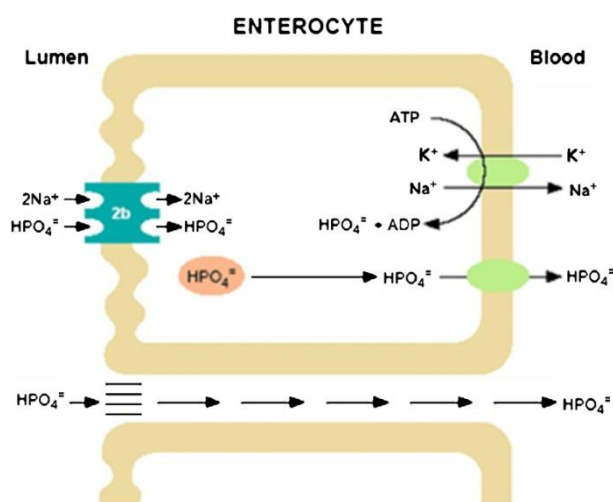
«συγκέντρωση φωσφορικών» ουσιαστικά μετράμε μόνο τον P. Ειδικά όταν αναφερόμαστε στην συγκέντρωση πλάσματος προτιμάται ο όρος «συγκέντρωση φωσφόρου». Οι φυσιολογικές τιμές του Pi στον ορό, περισσότερο από κάθε άλλο ηλεκτρολύτη, είναι ηλικιοεξαρτώμενες (Πίνακας 2). Η υψηλότερη συγκέντρωση κατά την παιδική ηλικία αποδίδεται στις αναπτυξιακές ανάγκες του οργανισμού. Υπάρχει ημερήσια διακύμανση (κυκλάδιος ρυθμός) της συγκέντρωσης του Pi στο πλάσμα, με την υψηλότερη τιμή να μετράται κατά τη διάρκεια της νύχτας και διαφοροποίηση έως και 1,2 mg/dl ή 30% της 24ωρης μέσης τιμής [75]. Η συγκέντρωση Pi πλάσματος μειώνεται μετά ενδοφλέβια έγχυση γλυκόζης/ινσουλίνης ή λήψης πλούσιου γεύματος σε υδατάνθρακες, έγχυσης ή ενδογενούς απελευθέρωσης επινεφρίνης και λόγω οξείας αναπνευστικής αλκάλωσης. Η μεταβολή αυτή οφείλεται στη μετακίνηση του Pi μέσα στα κύτταρα. Η οξεία αναπνευστική αλκάλωση μπορεί να προκαλέσει μείωση της συγκέντρωσης του Pi ως 2,0 mg/dl. Αντίστοιχα παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης Pi από μεταβολική οξέωση και ενδοφλέβια έγχυση Ca [76, 77].

Οι σημαντικές φυσιολογικές δράσεις του P καθιστούν απαραίτητη την ρύθμιση των επιπέδων πλάσματος σε στενά όρια. Η συγκέντρωση του Pi στο πλάσμα καθορίζεται από το ισοζύγιο μεταξύ της εντερικής απορρόφησης των φωσφορικών από τη διατροφή (16 mg/kg/ημέρα), της αποθήκευσης των φωσφορικών στο σκελετό (3 mg/kg/ημέρα) και της απέκκρισης τους με τα ούρα (13 mg/kg/ημέρα) στον ενήλικα [78]. Η καθαρή εντερική απορρόφηση P είναι περίπου το 60-65% της διαιτητικής πρόσληψης, στον ενήλικα με μηδενικό ισοζύγιο Pi. Για να ικανοποιηθούν οι απαιτήσεις της ραγδαίας ανάπτυξης των οστών και των μαλακών ιστών, η εντερική απορρόφηση P στα παιδιά είναι υψηλότερη από ότι στους ενήλικες, ενώ στα βρέφη μπορεί να υπερβαίνει το 90% της προσλαμβανόμενης ποσότητας [79, 80].

### **Απορρόφηση του P από το γαστρεντερικό σύστημα**

Ο P είναι ευρέως διαθέσιμος στα τρόφιμα. Γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα είναι οι κυριότερες πηγές P, υψηλές συγκεντρώσεις περιέχονται στο κρέας και στο ψάρι, ενώ τα λαχανικά είναι πλουσιότερα σε P απ' ό,τι τα φρούτα και δημητριακά. Ο P αλληλεπιδρά με διάφορα μέταλλα της τροφής, όπως Ca, Na και Mg. Για παράδειγμα, αυξημένη ποσότητα Mg οδηγεί σε μείωση της απορρόφησης P, ενώ επαρκής συγκέντρωση του Na στον εντερικό αυλό είναι απαραίτητη για τη διασφάλιση της απορρόφησης του P. Ο P της τροφής

απορροφάται στο λεπτό έντερο, κυρίως στο δωδεκαδάκτυλο και νήστιδα με την ελάχιστη απορρόφηση στον ειλεό. Η απορρόφηση του P πραγματοποιείται με δύο μηχανισμούς. Ο πρώτος αφορά την παθητική διάχυση του P ακολουθώντας το παρακυτταρικό μονοπάτι, μία μη κορέσιμη διαδικασία. Ο δεύτερος μηχανισμός αφορά την ενεργό διακυτταρική μεταφορά, μέσω του επιθηλιακού εντερικού κυττάρου προς την κυκλοφορία του αίματος, που είναι κορέσιμη, εξαρτώμενη κυρίως από την διαβάθμιση της συγκέντρωσης Na και ρυθμιζόμενη και από την  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  (Εικόνα 5). Σε υποκυτταρικό επίπεδο, η απορρόφηση του P πιστεύεται ότι πραγματοποιείται με την λειτουργία μιας οικογένειας διαλυτών ουσιών συµμεταφορέων του Na, μέλη των SLC34 πρωτεϊνών, η οποία περιλαμβάνει τρεις τύπους II συµμεταφορέων: Na-PiIIa (SLC34A1), Na-PiIIb (SLC34A2) και Na-PiIIc (SLC34A3) [81].



**Εικόνα 5.** Μεταφορά φωσφορικών στο έντερο. Οι νάτριο-εξαρτώμενοι μεταφορείς φωσφορικών τύπου NaPi-IIb είναι παρόντες στην ψηκτροειδή παρυφή του εντεροκυττάρου. Η μεταφορά αυτή προς το εσωτερικό του κυττάρου είναι ενεργός, εξαρτώμενη από την κλίση συγκέντρωσης Na<sup>+</sup>. Ο ενσωματωμένος P στα εντεροκύτταρα μεταφέρεται στην κυκλοφορία με ανεπαρκώς κατανοητό μηχανισμό. Η παθητική μεταφορά του P πραγματοποιείται μέσω των μεσοκυτταρίων διαστημάτων των εντεροκυττάρων από τον αυλό προς την κυκλοφορία (Προσαρμογή από [82]).

Ο μεταφορέας Na-PiIIb κυρίως εκφράζεται στο λεπτό έντερο, ενώ οι Na-PiIIa και Na-PiIIc εκφράζονται στην ψηκτροειδή παρυφή του επιθηλιακού κυττάρου του PCT, όπου προάγουν την επαναρρόφηση του P [83] (Εικόνα 6). Υπό συνθήκες άφθονης πρόσληψης P, η απορρόφηση γίνεται πρωτίστως με παρακυτταρική διάχυση, αντίθετα σε περιορισμένη πρόσληψη P με ενεργό μεταφορά [84, 85].

Κύριοι ρυθμιστές της εντερικής απορρόφησης P είναι η προσλαμβανόμενη ποσότητα του P, η  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  και η PTH. Ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (Epidermal growth factor, EGF) [86], τα γλυκοκορτικοειδή [87], τα οιστρογόνα [88], η μεταβολική οξέωση [89] και όπως φαίνεται πρόσφατα, οι φωσφατονίνες [90] επηρεάζουν επίσης την εντερική απορρόφηση P [91].

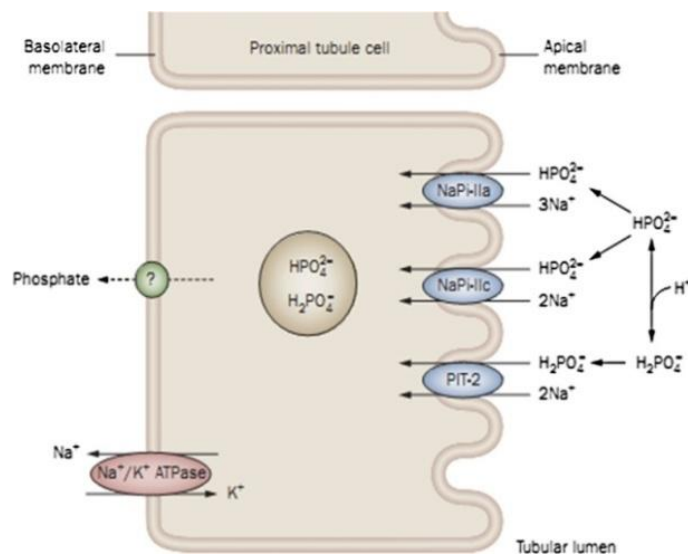
Η  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  προάγει την απορρόφηση P από το έντερο και την μετακίνηση από τα οστά στην κυκλοφορία. Έτσι μειωμένη συγκέντρωση του Pi οδηγεί σε αύξηση της σύνθεσης της ορμόνης [90]. Η δράση της PTH στο έντερο δεν επηρεάζει άμεσα την έκφραση του Na-PiIb, αλλά έμμεσα μέσω της σύνθεσης της  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ , που προάγει την έκφραση των Na-PiIb [92].

Μετά την απορρόφηση του από το έντερο, ο Pi εισερχόμενος στον εξωκυττάριο χώρο και στην κυκλοφορία, φθάνει με την δράση τουλάχιστον εν μέρει των Na-PiIII συμμεταφορέων σε διάφορους ιστούς, συμπεριλαμβανομένων των οστών και των νεφρών [93, 94].

### **Νεφρική διαχείριση του P**

Ο P του πλάσματος διηθείται στο σπείραμα και επαναρροφάται στο PCT κατά 70%, κυρίως μέσω των συμμεταφορέων Na-PiIIa, Na-PiIIc και λιγότερο των Na-PiIII [94]. Ο ρυθμός μεταφοράς του P εξαρτάται από την αφθονία των μεταφορέων που λειτουργούν στη μεμβράνη και την κλίση συγκέντρωσης  $\text{Na}^+$ , που δημιουργείται από την  $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$  στην πλαγιοκυτταρική μεμβράνη. Η μετακίνηση του Pi από το επιθηλιακό σωληναριακό κύτταρο μέσω της πλαγιοκυτταρικής μεμβράνης είναι ελάχιστα κατανοητή. Η ρύθμιση της συγκέντρωσης του Pi στον ορό επιτυγχάνεται με την μετακίνηση του από τον εξωκυττάριο στον ενδοκυττάριο χώρο και στα οστά.

Άμεσα η PTH προάγει την μετακίνηση του P από τα οστά και μειώνει την επαναρρόφηση του από το PCT, ρυθμίζοντας τον συμμεταφορέα Na-PiIIa. Έμμεσα η PTH προάγει την παραγωγή της  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  (Εικόνα 6) [92].



**Εικόνα 6.** Διακυτταρική μεταφορά φωσφορικών (P) στο εγγύς σωληνάριο. Η επαναρρόφηση P πραγματοποιείται με διακυτταρική μετακίνηση P από τον σωληναριακό αυλό προς τα περισωληναριακά τριχοειδή και αποτελεί μια μονόδρομη διαδικασία. Η μεταφορά του P στην ψηκτροειδή παρυφή είναι ενεργός, πραγματοποιείται με τους συµμεταφορείς Na-PiIIa, IIc, εξαρτάται από την συγκέντρωση του και του  $\text{Na}^+$  και την αφθονία των μεταφορέων. Η μεταφορά του P στην πλαγιοκυτταρική παρυφή συντελείται πιθανά με τους συµμεταφορείς  $\text{Na}^+$ -PiIII, με παθητική διάχυση και ανταλλαγή ανιόντων. Ωστόσο ο ακριβής µηχανισµός αυτής της µεταφοράς παραµένει άγνωστος [95].

## Φωσφατονίνες

Πρόσφατες μελέτες ανέδειξαν την ομάδα των φωσφατονινών, στις οποίες περιλαμβάνονται ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών-23 (fibroblast growth factor-23, FGF-23), ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών-7 (FGF-7), η secreted frizzled related protein-4 (sFRP-4) και η εξωκυτταρική φωσφογλυκοπρωτεΐνη (matrix extracellular phosphoglycoprotein, MEPE) [90]. Τα ανωτέρω μόρια αποτελούν μια ποικίλη ομάδα φωσφατουρικών πεπτιδίων, με ποιο σημαντικό τον FGF-23 και πιστεύεται ότι συμβάλλουν στην ρύθμιση της μετακίνησης P από τους νεφρούς, προστατεύοντας τα κύτταρα από πολύ υψηλά επίπεδα Pi. Οι FGF-23, sFRP-4, MEPE και FGF-7 έχει δειχθεί ότι αναστέλλουν τη νεφρική επαναρρόφηση P. Οι FGF-23 και sFRP-4 ρυθμίζουν επίσης την σύνθεση της  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  [73].

## Οστά και P

Επαρκή επίπεδα  $P_i$  απαιτούνται για τη δραστηριότητα των οστεοβλαστών (OB) και οστεοκυττάρων (OK) κατά την διαδικασία επιμετάλλωσης της θεμέλιας ουσίας των οστών για τον σχηματισμό του υδροξυαπατίτη. Η ενζυμική δραστηριότητα της ALP είναι απαραίτητη για την παραγωγή επαρκούς ελεύθερου ιόντος  $P_i$ . Έτσι η δραστηριότητα της ALP αυξάνεται σε υποφωσφαταιμία και μειώνεται σε παροχή επαρκούς ποσότητας P, αποτελώντας έναν καλό δείκτη ομοιόστασης του P στα οστά [96]. Πολύ υψηλά επίπεδα  $P_i$  επιδρούν αρνητικά στους OB και μπορεί να τους οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο.

## Μέθοδοι εκτίμησης της απέκκρισης P

Ο δείκτης επαναρρόφησης του P από τα νεφρικά σωληνάρια (tubular reabsorption of phosphate, TRP), δείχνει το ποσοστό του P που επαναρροφάται στο PCT [97]. Υπολογίζεται με την εξίσωση:

$$TRP = \left(1 - \frac{U_P S_{CR}}{S_P U_{CR}}\right) 100$$

$S_P$ : serum phosphate concentration (συγκέντρωση P στον ορό)

$U_P$ : urine phosphate concentration (συγκέντρωση P στα ούρα)

$S_{CR}$ : serum creatinine concentration (συγκέντρωση κρεατινίνης στον ορό)

$U_{CR}$ : urine creatinine concentration (συγκέντρωση κρεατινίνης στα ούρα)

Οι μετρήσεις P και Cre ούρων γίνονται σε δεύτερο πρωινό δείγμα ούρων νήστεως, φυσιολογικές τιμές  $TRP > 80\%$ .

Ο λόγος της μέγιστης σωληναριακής επαναρρόφησης P προς τον ρυθμό σπειραματικής διήθησης (the ratio of the maximum rate of Tubular Phosphate reabsorption to the glomerular filtration rate,  $TmP/GFR$ ), θεωρούνταν ο πιο κατάλληλος δείκτης εκτίμησης της νεφρικής διαχείρισης του P [98]. Η τιμή του δείκτη αντιστοιχεί στο θεωρητικά κατώτερο όριο P στο πλάσμα, κάτω από το οποίο αν μειωθούν τα επίπεδα P, θα μπορούσε να επαναρροφηθεί όλη η διηθούμενη ποσότητα P από το σπείραμα. Αν και η μέτρηση της PTH στον ορό, έχει περιορίσει και αντικαταστήσει κατά ένα μεγάλο μέρος την χρησιμότητα του δείκτη  $TmP/GFR$ , μπορεί ακόμα να είναι χρήσιμος για την εκτίμηση της νεφρικής επαναρρόφησης του P σε μια ποικιλία παθολογικών καταστάσεων που σχετίζονται με υποφωσφαταιμία, όπως υποφωσφαταιμική ραχίτιδα, προκαλούμενη από όγκο οστεομαλακία κτλ [98, 99]. Υπολογίζεται με την εξίσωση:

$$\frac{TmP}{GFR} = \left(1 - \frac{U_P S_{CR}}{S_P U_{CR}}\right) S_P$$

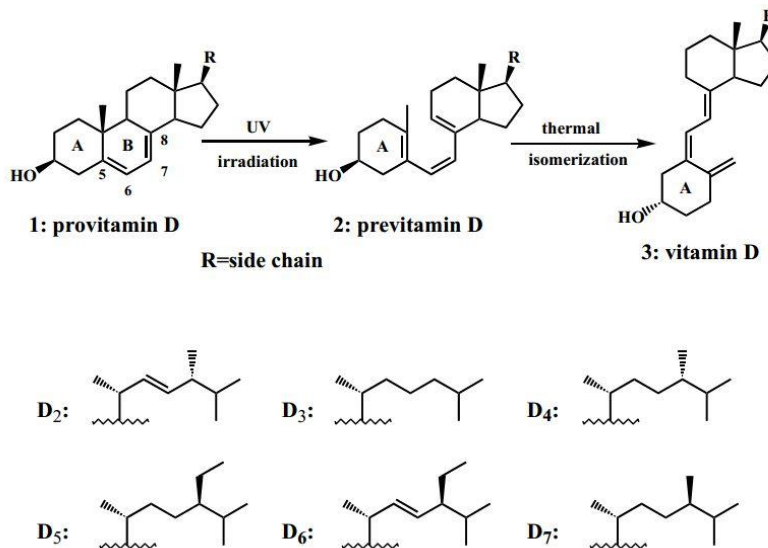
Οι μετρήσεις P και Cre ούρων γίνονται σε δεύτερο πρωινό δείγμα ούρων νήστεως. Στα παιδιά ηλικίας >2 χρόνων, η φυσιολογική τιμή του TmP/GFR είναι 4-6 mg/dL. Μετά την ηλικία των 20 χρόνων πέφτει σε 2,8-4,2 mg/dL.

Η απέκκριση του P εκτιμάται και από συλλογές ούρων 24ώρου σε (mg/Kg/24hours) και από το κλάσμα P/Cre ούρων από τυχαίο δείγμα ούρων, με φυσιολογικές τιμές βάση ηλικίας, αλλά αυτοί οι δείκτες δεν χρησιμοποιούνται συχνά [13, σελ. 500].

## Βιταμίνη D (Vitamin D, Vit D)

### Γενικά

Η οικογένεια ενώσεων γνωστών με τον όρο Vit D δεν είναι αληθείς βιταμίνες, εφόσον δεν λαμβάνονται αποκλειστικά από τη διατροφή, αλλά συντίθενται κυρίως από τον οργανισμό, γι' αυτό αποτελεί μια στεροειδή ορμόνη. Η εσφαλμένη ονομασία είναι ένα κατάλοιπο του πρώιμου έργου μιας σειράς πρωτοπόρων επιστημόνων από το 1900. Η ομάδα περιλαμβάνει μια σειρά 6 ενώσεων που κυμαίνονται από βιταμίνη D<sub>2</sub> έως D<sub>7</sub>, διακρίνονται μεταξύ τους από τις διαφορετικές πλευρικές αλυσίδες. Οι πιο σημαντικές από τις ενώσεις για τον άνθρωπο είναι η VitD<sub>3</sub> γνωστή ως χοληκαλσιφερόλη και VitD<sub>2</sub> ως εργοκαλσιφερόλη [100] (Εικόνα 7).



**Εικόνα 7.** Βιοσύνθεση της βιταμίνης D (3) από την προβιταμίνη D (1) μέσω της πρεβιταμίνης D (2) και δομή της πλευρικής αλυσίδας της βιταμίνης D<sub>2</sub> έως και της βιταμίνης D<sub>7</sub> [100].

Χημικά είναι λιποδιαλυτές αλκοόλες, που σχηματίζονται από στερόλες του δέρματος υπό την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας (ηλιακό και τεχνητό φως), εξ ου και το ψευδώνυμό της η «βιταμίνη του ήλιου». Η υπεριώδης ακτινοβολία μετατρέπει την 7-δεϋδροχοληστερόλη του δέρματος σε VitD<sub>3</sub> και τη φυτική εργοστερόλη σε VitD<sub>2</sub> αντίστοιχα. Γεωγραφικές συνθήκες που ευνοούν μεγαλύτερη παραγωγή VitD<sub>3</sub> και VitD<sub>2</sub> αποτελούν η εγγύτητα προς τον ισημερινό και το μεγαλύτερο υψόμετρο. Επίσης αυξανόμενης της μελάγχρωσης του δέρματος και της ηλικίας μειώνεται ανάλογα η παραγωγή της βιταμίνης

στο δέρμα. Πολιτιστικές συνήθειες ενδυμασίας του σώματος και του προσώπου και η χρήση αντηλιακών καλλυντικών επηρεάζουν την πρόσβαση της ακτινοβολίας UVB στο δέρμα. Η ποσότητα της φωτοσυντιθέμενης VitD<sub>2</sub> είναι μικρότερη συγκριτικά με της VitD<sub>3</sub> [101]. Ο ανθρώπινος οργανισμός προσλαμβάνει VitD<sub>3</sub> από τα ζωικά τρόφιμα (κυρίως θαλασσινά) και VitD<sub>2</sub> από φυτά (ιδιαίτερος από τα μανιτάρια του γένους *Claviceps*). Μετά τον σχηματισμό της η VitD<sub>3</sub>, διαχέεται αργά από το δέρμα στο αίμα και συνδεδεμένη με μια α<sub>2</sub>-σφαιρίνη (vitamin D-binding protein, VDBP), μεταφέρεται στο ήπαρ. Η προσλαμβανόμενη από τις τροφές VitD ως λιποδιαλυτή απορροφάται μέσα σε μικκύλια, με παθητική διάχυση από τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα σε ποσοστό 50%. Στην συνέχεια ενσωματωμένη σε χυλομικρά μεταφέρεται στο ήπαρ με την κυκλοφορία της λέμφου και του αίματος. Το μεγαλύτερο ποσοστό έως και 90% της VitD συντίθεται στον οργανισμό [35, 102].

### **Μεταβολισμός και ρύθμιση παραγωγής της VitD**

Οι VitD<sub>3</sub> και VitD<sub>2</sub> είναι ανενεργές, υπόκεινται σε πρώτο στάδιο ενεργοποίησης με υδροξυλίωση στη θέση 25-άνθρακα στο ήπαρ, σχηματίζοντας την 25OHD με την δράση κυρίως του ενζύμου 25-υδροξυλάσης. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η VitD<sub>2</sub> (εργοκαλσιφερόλη) υφίσταται παρόμοιους μεταβολικούς μετασχηματισμούς και έχει πανομοιότυπη βιολογική δραστηριότητα με την VitD<sub>3</sub>, αλλά παραμένει ασαφής η ακριβής εικόνα. Η 25OHD<sub>2</sub> έχει χαμηλότερη συγγένεια με τις δεσμευτικές πρωτεΐνες συγκριτικά με την 25OHD<sub>3</sub>. Έτσι, η 25OHD<sub>2</sub> έχει μικρότερο χρόνο ημίσειας ζωής από ό, τι η 25OHD<sub>3</sub>, ενώ η θεραπεία με VitD<sub>2</sub> δεν μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα ορού της 25OHD τόσο αποτελεσματικά όσο η VitD<sub>3</sub>. Έτσι η VitD<sub>3</sub> αποτελεί την σημαντικότερη από την οικογένεια των D βιταμινών. Γι' αυτό στο εξής θα αναφερόμαστε στον μεταβολισμό μόνο της VitD<sub>3</sub> [103].

Σε απουσία σοβαρής ηπατικής δυσλειτουργίας, ο ρυθμός 25-υδροξυλίωσης δεν περιορίζεται. Η 25OHD αποτελεί δείκτη μέτρησης επάρκειας της VitD, αντανακλώντας τα αποθέματα του οργανισμού, καθώς δεν περιορίζεται η παραγωγή της και παραμένει στην κυκλοφορία για μεγάλο διάστημα, με χρόνο ημίσειας ζωής δύο με τρεις εβδομάδες. Κύρια 25-υδροξυλάση της VitD αποτελεί η πρωτεΐνη CYP2R1 των μικροσωμάτων του ήπατος, που ανήκει στην οικογένεια του κυτοχρώματος P450 [104]. Κάποια υπολειμματική 25-υδροξυλίωση πραγματοποιείται από την μιτοχονδριακή CYP27A1 πρωτεΐνη των ηπατοκυττάρων, της οποίας η κύρια φυσιολογική λειτουργία αφορά υδροξυλίωση της



πλευρικής αλυσίδας της χοληστερόλης κατά την σύνθεση χολικού οξέος. Εξωηπατική 25-υδροξυλίωση της VitD<sub>3</sub> πραγματοποιείται στους όρχεις, καθώς εκφράζεται εκεί η CYP2R1 [105].

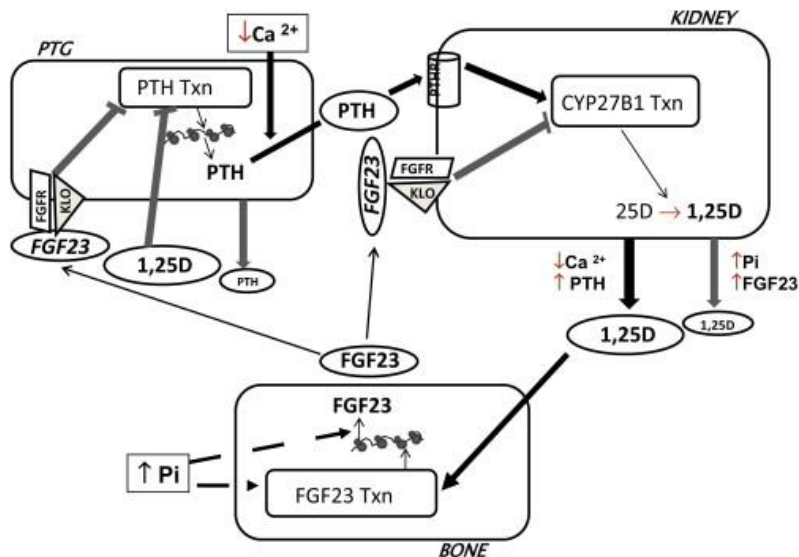
Στην συνέχεια η 25OHD<sub>3</sub>, συνδεδεμένη με τη δεσμευτική της πρωτεΐνη, μεταφέρεται μέσω της κυκλοφορίας στους νεφρούς όπου υπόκειται την επόμενη υδροξυλίωση στα νεφρικά σωληναριακά κύτταρα. Η υδροξυλίωση στο άτομο 1α-άνθρακα υπό την δράση του ενζύμου 1α-υδροξυλάση παράγει την δραστική 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (καλσιτριόλη) μορφή της VitD. Από την δεκαετία του 1970 μελέτες σε ζώα με ανεπάρκεια VitD καταδεικνύουν το PCT ως αποκλειστική θέση σύνθεσης καλσιτριόλης [106-108]. Στην συνέχεια μελέτες έκφρασης του CYP27B1 mRNA και της πρωτεΐνης εντόπισαν δραστηριότητα πέραν των PCT, στο TALH, στο DCT και στα αθροιστικά σωληνάκια (collecting ducts, CD) [109, 110].

Οι Zehnder και συν. το 1999 ανακοίνωσαν πρώτοι την έκφραση του mRNA της 1α-υδροξυλάσης και της πρωτεΐνης κατά μήκος του ανθρώπινου φυσιολογικού νεφρώνα, υπό συνθήκες επάρκειας VitD, με μελέτες υβριδοποίησης και ανοσοϊστοχημείας *in situ*. Επιβεβαίωσαν την παρουσία της 1α-υδροξυλάσης στο PCT. Ωστόσο, παρατήρησαν ισχυρότερη έκφραση στο TALH, στα DCT και CD. Ως εκ τούτου, υποθέτουν ότι η νεφρική σύνθεση της κυκλοφορούσας 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> πραγματοποιείται σε διάφορες θέσεις κατά μήκος του φυσιολογικού ανθρώπινου νεφρώνα. Η ακριβής λειτουργία της 1α-υδροξυλάσης σε κάθε θέση μένει να καθοριστεί, αλλά μπορεί να αντανακλά τόσο ενδοκρινή όσο και αυτοκρινή δραστηριότητα της VitD [64, 111, 112].

Η 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> μπορεί επίσης να συντεθεί σε ενεργοποιημένα μακροφάγα και λεμφοκύτταρα προερχόμενα από τον θύμο [113]. Έτσι σε κοκκιωματώδεις νόσους (ενεργό πνευμονική σαρκοείδωση, φυματίωση) και λέμφωμα παρατηρείται υπερασβεσταιμία και ΥΑ, λόγω αυξημένης εντερικής απορρόφησης Ca [114].

Εξωνεφρικές θέσεις έκφρασης του ενζύμου 1α-υδροξυλάση αποτελεί το γαστρεντερικό σύστημα, το δέρμα, τα αγγεία, τα μαστικά επιθηλιακά κύτταρα καθώς και οι ΟΒ και ΟΚΛ [115, 116]. Η εξωνεφρικά παραγόμενη 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> λειτουργεί αυτοκρινικά κατά όργανο-ειδικό τρόπο ανάλογα με τον ιστό, για να ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση κυττάρων, επηρεάζοντας την έκκριση ορμονών όπως της ινσουλίνης, PTH και την σύνθεση ανοσοφαιρινών ή την έκφραση αντιμικροβιακών πεπτιδίων συμβάλλοντας στη λειτουργία του ανοσοποιητικού [117].

Ο ρυθμός παραγωγής της  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  στην κυκλοφορία είναι αυστηρά ρυθμιζόμενος. Κύριοι ρυθμιστές αποτελούν το Ca με την PTH, ο Pi με τον FGF23 καθώς και οι συγκεντρώσεις της ίδιας  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (Εικόνα 8). Συγκεκριμένα η υπασβεστιαμία προκαλεί την έκκριση της PTH, που προάγει τη μεταγραφή (και πιθανώς μετα-μεταγραφική ενεργοποίηση) της CYP27B1 στους νεφρούς και τελικά την παραγωγή της  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  [118]. Η  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  είναι η κύρια ορμόνη που ανταποκρίνεται στις αλλαγές της ομοιόστασης του P, προάγοντας τη μετακίνηση του στο αίμα από το έντερο και τα οστά. Η υπερφωσφαταιμία προάγει την έκκριση του FGF23 από τα ΟΚ, που καταστέλλει την μεταγραφή της CYP27B1 στο νεφρό και έτσι την παραγωγή της  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  [119]. Η παραγωγή της  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  κυρίως διεγείρεται από την PTH και υποφωσφαταιμία, σε μια προσπάθεια να διατηρηθεί η ομοιόσταση του Ca και του Pi. Ανασταλτικός ρυθμιστικός παράγοντας της σύνθεσης  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  αποτελεί η ίδια (Εικόνα 8).



**Εικόνα 8.** Ορμόνες που ρυθμίζουν την δραστηριότητα της CYP27B1 (1α-υδροξυλάσης) στο νεφρό. Όλες οι επιδράσεις αφορούν την μεταγραφή (TXN) του CYP27B1 mRNA, αν και δεν έχουν αποκλειστεί επιπλέον μετα-μεταγραφικές επιδράσεις. Η δεξιά πλευρά του σχήματος απεικονίζει την αρνητική επίδραση της  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  επί της παραγωγής της. Στην άνω αριστερά πλευρά απεικονίζεται ο παραθυρεοειδής αδένας (PTG), όπου εκκρίνεται η παραθορμόνη (PTH) που διεγείρει την παραγωγή της CYP27B1 σε χαμηλά επίπεδα Ca στον ορό. Η σύνθεση και η έκκριση της PTH αναστέλλεται από την  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , ως ένας δεύτερος κρίκος αρνητικής επίδρασης στην σύνθεση  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Ο FGF23 παράγεται στο οστό (κάτω μέρος του σχήματος) ως απόκριση σε αυξημένα επίπεδα P, αναστέλλει τη σύνθεση της CYP27B1, ολοκληρώνοντας ένα τρίτο κρίκο αρνητικής επίδρασης που περιλαμβάνει το P. Ο FGF23 πιστεύεται ότι αναστέλλει την έκκριση PTH [120].

Άλλοι δευτερεύοντες ρυθμιστικοί παράγοντες είναι η καλσιτονίνη, αυξητική ορμόνη, ο ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας 1, επίσης υπάρχουν ενδείξεις για τα οιστρογόνα, προγεστερόνη και προλακτίνη [121, 122].

Το τελευταίο σημαντικό ένζυμο στον μεταβολισμό της VitD είναι η 24-υδροξυλάση (CYP24A1), που βρίσκεται σχεδόν σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού, αλλά εκφράζεται έντονα στους νεφρούς. Η δράση του περιορίζει την ποσότητα της  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  σε ιστούς-στόχους μετατρέποντας την ίδια σε ανενεργούς μεταβολίτες, την  $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$  και calcitroic acid καθώς και την  $25\text{OHD}_3$  σε  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Εκτός από την 24-υδροξυλίωση το ένζυμο καταλύει υδροξυλιώσεις πλευρικής αλυσίδας στο άτομο 23- και 26-άνθρακα [123].

### **Δράσεις της $1,25(\text{OH})_2\text{D}$**

Ο ενεργός μεταβολίτης  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  συνδέεται με έναν ενδοκυττάριο υποδοχέα της VitD (vitamin D receptor, VDR), που ανήκει στην κατηγορία II υποδοχέων στεροειδών ορμονών και ρυθμίζει την μεταγραφή γονιδίων. Ο VDR κατανέμεται ευρέως στα εμπύρνηνα κύτταρα, ουσιαστικά κύτταρα που στερούνται τον VDR αποτελούν την εξαίρεση. Η πιο σημαντική δράση της  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  είναι η προαγωγή της ενεργούς εντερικής απορρόφησης του Ca και σε μικρότερο βαθμό του Pi, συμβάλλοντας στην ομοιόσταση του Ca. Προάγει την εναπόθεση Ca στο νέο οστεοειδές και κατά συνέπεια την οστική επιμετάλλωση. Καταστέλλει την παραγωγή PTH από τους παραθυρεοειδείς αδένες. Στα οστά προάγει τη δημιουργία ΟΚΛ από αρχέγονα κύτταρα. Οι OB σαν απάντηση στην  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  παράγουν κυτταροκίνες και άλλους παράγοντες, που στη συνέχεια επηρεάζουν την οστεοκλαστική δραστηριότητα [124].

Η VitD εκτός από σημαντικό ρυθμιστή του ισοζυγίου του Ca, που συμβάλει στην υγεία του μυοσκελετικού συστήματος, έχει επιπλέον αξιοσημείωτες ανοσορυθμιστικές, αντιμικροβιακές και αντιπολλαπλασιαστικές δράσεις [125]. Επίσης μελετάται η επίδραση της σε πολλές χρόνιες παθήσεις του ενήλικα, όπως στον καρκίνο, τα καρδιαγγειακά επεισόδια και στο διαβήτη τύπου II [126].

### **Επίπεδα της VitD στον ορό**

Σε παγκόσμιο επίπεδο, υπάρχει ομοφωνία για τον χαρακτηρισμό της «έλλειψης» της  $25\text{OHD}$  σε επίπεδα ορού κάτω από 25 nmol/l ή 10 ng/ml, αλλά πέρα από αυτό δεν υπάρχει σήμερα κανένας πρότυπος ορισμός ή συμφωνία ως προς το «βέλτιστο» για την  $25\text{OHD}$  [SACN 127, 128]. Η έλλειψη ομοφωνίας και κοινών ορισμών μεταξύ των χωρών καθώς και

οι διαφορετικές μέθοδοι μέτρησης, έχουν οδηγήσει σε ποικίλη ορολογία και σχετιζόμενες τιμές στη βιβλιογραφία για να περιγράψει την κατάσταση της VitD, συμπεριλαμβανομένων των όρων «έλλειψη», «ανεπάρκεια», «επάρκεια» και «βέλτιστο». Αναντιστοιχία των κατώτερων φυσιολογικών επιπέδων και χρήση διαφορετικής ορολογίας καθιστά μη συγκρίσιμα τα αποτελέσματα των μελετών [129, 130]. Μερικοί επιστήμονες προτείνουν ότι τα επίπεδα πάνω από 50 nmol/l ή 20 ng/mL είναι «επαρκή», ενώ πάνω από 70-80 nmol/L ή 28-32 ng/mL είναι «βέλτιστα» [126].

### **Συνέπειες ανεπάρκειας VitD**

Είναι γνωστό ότι παρατεταμένη ανεπάρκεια VitD είναι επιζήμια για το σκελετό, προκαλώντας ραχίτιδα στα παιδιά και οστεομαλακία στους ενήλικες. Λιγότερο σοβαρή ανεπάρκεια VitD, μπορεί να οδηγήσει σε δευτεροπαθή υπερπαραθυρεοειδισμό, απώλεια οστικής μάζας, μυϊκή αδυναμία και πτώσεις και ευθραυστότητα οστών σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας [129].

Σε εφήβους τα χαμηλά επίπεδα ορού VitD σχετίζονται θετικά με αυξημένο κίνδυνο υπέρτασης, υπεργλυκαιμίας και μεταβολικού συνδρόμου, με παχυσαρκία, με χαμηλή κοινωνικοοικονομική κατάσταση και σωματική δραστηριότητα. Αυξημένος κίνδυνος λοιμώξεων του ανώτερου αναπνευστικού και όχι μόνο, τροφικές αλλεργίες και άσθμα έχουν επίσης συσχετιστεί με χαμηλά επίπεδα VitD [131-134].

Ομάδες υψηλού κινδύνου για ανεπάρκεια VitD αποτελούν πρόωρα ή αποκλειστικά θηλάζοντα βρέφη (εκτός αν λαμβάνουν συμπλήρωμα 400 IU ημερησίως), παιδιά με σκουρόχρωμο δέρμα ή χορτοφάγα ή με ασυνήθιστες δίαιτες, με διαβίωση σε υψηλότερα γεωγραφικά πλάτη, με προβλήματα δυσσαπορρόφησης ή που λαμβάνουν ορισμένα φάρμακα (αντιεπιληπτικά, χρόνια χρήση κορτικοειδών, αντί-HIV λοίμωξης, αντιμυκητιασικά). Χρόνια νεφρολογικά ή ηπατικά νοσήματα ενέχουν τον κίνδυνο ανεπάρκειας VitD [135].

### **Πρόσληψη της VitD**

Την τελευταία δεκαπενταετία μεγάλος όγκος έρευνας έχει δημοσιευθεί σχετικά με τον προσδιορισμό της αναγκαίας ημερήσιας πρόσληψης της VitD. Ωστόσο, ποια είναι η βέλτιστη πρόσληψη παραμένει ακόμα θέμα διαφωνίας. Σύμφωνα με το Ινστιτούτο Ιατρικής της Βορείου Αμερικής [136] η διαιτητική πρόσληψη αναφοράς της VitD κατά την διάρκεια χειμερινών μηνών είναι 10 μg/d ή 400 IU/d για ηλικία άνω του 1 έτους, 15 μg/d ή 600 IU/d

από 1 έως 70 ετών και άνω των 20 µg/d ή 800 IU/d για ηλικίες άνω των 70 ετών. Σύμφωνα με τις Διαιτητικές Οδηγίες για τους Αμερικανούς (Αμερικανικό Υπουργείο Υγείας και Ανθρωπίνων Υπηρεσιών και Υπουργείο Γεωργίας των ΗΠΑ, 2005) και την Αμερικανική Αντικαρκινική Εταιρεία για τη διατροφή και τη σωματική άσκηση για την πρόληψη του καρκίνου, οι ηλικιωμένοι, τα άτομα με σκούρο δέρμα και ανεπαρκή έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία πρέπει να καταναλώνουν επιπλέον VitD από D-εμπλουτισμένα τρόφιμα ή συμπληρώματα [137]. Οι ίδιες οδηγίες προτείνονται το 2014 και από έναν αριθμό ευρωπαϊκών οργανισμών (Γερμανική Εταιρεία Διατροφής, Ολλανδικό Υπουργείο Υγείας και Σκανδιναβικό Συμβούλιο Υπουργών) [138]. Για βρέφη μικρότερα του 1 έτους οι διατροφικές ανάγκες υπολογίζονται στις 600 IU/d ή 15 µg/d. Το μητρικό γάλα περιέχει περιορισμένες ποσότητες VitD, γι' αυτό στα θηλάζοντα βρέφη συνιστάται συμπλήρωμα 400 IU/d. Στο Ηνωμένο Βασίλειο για βρέφη ηλικίας έως 6 μηνών προτείνονται 320 IU/d ή 8 µg/d, για βρέφη και παιδιά ηλικίας 6-36 μηνών 280 IU/d ή 7 µg/d [126].

Μερικοί ειδικοί ισχυρίζονται ότι η βέλτιστη πρόσληψη για όλους τους ενήλικες είναι πιο κοντά στο 800-1000 IU/d ή 20-25 µg/d [139]. Η ανώτερη συνιστώμενη ποσότητα πρόσληψης της VitD είναι 2000 IU/d ή 50 µg/d στη Βόρεια Αμερική και στην Ευρώπη. Ωστόσο, ορισμένοι επιστήμονες ζητούν την αναθεώρηση της βέλτιστης πρόσληψης προς τα πάνω [140].

## **Παραθορμόνη (Parathormone, PTH)**

### **Γενικά**

Η σημασία της PTH, στην ρύθμιση των επιπέδων του Ca στον ορό, αναγνωρίστηκε στις αρχές του 20ου αιώνα, από την παρατήρηση της εμφάνισης τετανίας μετά παραθυρεοειδεκτομή [141]. Ωστόσο, η φυσιολογική λειτουργία της PTH έγινε κατανοητή με την ανακάλυψη των υποδοχέων 1 και 2 της PTH (PTH1R και PTH2R) το 1991 στον άνθρωπο [142, 143].

Η PTH είναι κύριος ρυθμιστής της ομοιόστασης του Ca, του P, των επιπέδων της 1,25(OH)<sub>2</sub>D και της δραστηριότητας των κυττάρων των οστών. Τα δύο κύρια όργανα-στόχοι της δράσης της PTH είναι τα οστά και οι νεφροί (Kronenberg et al., 1993). Στον άνθρωπο, η PTH κυρίως εκφράζεται και εκκρίνεται από τους παραθυρεοειδείς αδένες, αλλά χαμηλότερα επίπεδα μεταγραφής της μπορεί επίσης να ανιχνευθούν στον υποθάλαμο, την υπόφυση και τον θύμο [144].

Η PTH συντίθεται πρωτίστως στα κύτταρα του παραθυρεοειδούς αδένου, ως πολυπεπτιδικό οξύ 115-αμινοξέων που ονομάζεται προ-PTH, που διασπάται εντός των κυττάρων του παραθυρεοειδούς στο αμινο-τελικό τμήμα πρώτα σε προ-PTH (90 αμινοξέων) και στη συνέχεια σε PTH (84 αμινοξέων). Η τελευταία είναι η κύρια μορφή αποθήκευσης, έκκρισης και η βιολογικά δραστική μορφή της ορμόνης [145]. Η βιοσυνθετική διαδικασία εκτιμάται ότι διαρκεί λιγότερο από μία ώρα, ενώ εκκρίνεται με εξωκύτωση εντός δευτερολέπτων μετά την διέγερση από υπασβεσταιμία. Το Ca ρυθμίζει την σύνθεση, την απέκκριση και την αποδόμηση της PTH [146].

Η ρύθμιση αυτή από το Ca επιτυγχάνεται μέσω του CaSR, που εκφράζεται στην κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων των παραθυρεοειδών αδένων [147]. Η ενεργοποίηση ή αναστολή σηματοδότησης της παραγωγής PTH καθορίζεται από την κατάσταση πληρότητας των CaSR από ιόντα Ca. Εκτός από την ολική-PTH, καρβοξύ-τελικά θραύσματα (carboxyl-terminal PTH, C-PTH) και μικρές ποσότητες αμινο-τελικών θραυσμάτων της PTH (amino-terminal PTH, N-PTH), είναι παρόντα στους παραθυρεοειδείς αδένες. Κατά τη διάρκεια της υπασβεσταιμίας, η ενδοκυτταρική αποδόμηση της PTH μειώνεται και κυρίως εκκρίνεται PTH (1-84). Συγκριτικά, κατά τη διάρκεια υπερασβεσταιμίας κυρίως εκκρίνονται C-PTH, όπως PTH (7-84), που διαθέτει κάποια βιολογική δραστηριότητα [146]. Μικρότερης σημασίας διέγερση της έκκρισης της PTH πραγματοποιείται από αυξημένα επίπεδα Pi, είτε

άμεσα του Pi είτε μέσω μίας σχετικής μείωσης των επιπέδων του Ca συγκριτικά με του Pi και από χαμηλά επίπεδα  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  [148].

Υπό συνθήκες νορμοασβεστιαμίας η ολική-PTH (intact PTH, iPTH) (1-84) αποτελεί το 20% των κυκλοφορούντων μορίων της PTH. Το ποσοστό αυτό αυξάνεται σε 33% υπό υποασβεστιαμικές συνθήκες και μειώνεται σε 4% υπό την παρουσία υπερασβεστιαμίας (D' Amour P, 2006). Μετά την έκκριση της η PTH απομακρύνεται ταχέως από το πλάσμα μέσω πρόσληψης της κυρίως από το ήπαρ και τους νεφρούς, όπου η iPTH διασπάται σε C-PTH και μικρές ποσότητες N-PTH θραυσμάτων, που στη συνέχεια απεκκρίνονται κυρίως από τους νεφρούς. Ο χρόνος ημιζωής της iPTH στο πλάσμα είναι δύο έως τέσσερα λεπτά, ενώ της C-PTH είναι 5-10 φορές μεγαλύτερος. Έτσι, η κυκλοφορούσα ανοσοδραστική PTH σε φυσιολογικά άτομα αποτελείται: κατά 5-30% από iPTH, 70-95% από C-PTH και ένα μικρό ποσοστό από N-PTH [149].

## Δράσεις της PTH

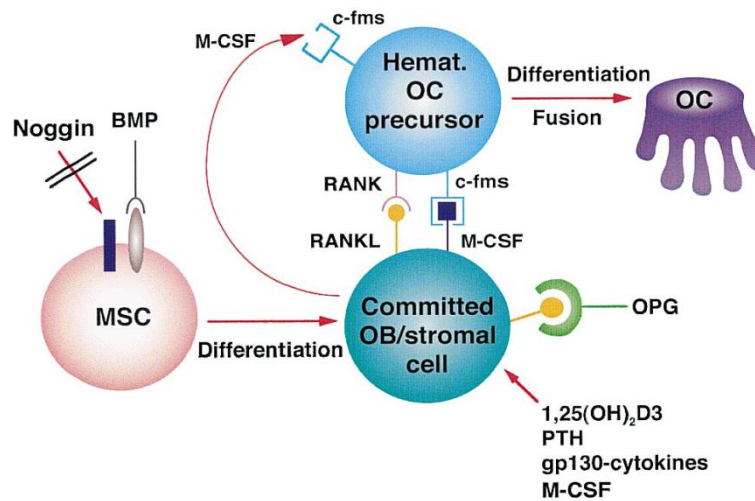
- Ρύθμιση των επιπέδων Ca, Pi και  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  στον ορό

Η ρύθμιση του ιονισμένου Ca στον ορό λεπτό προς λεπτό πραγματοποιείται αποκλειστικά από την PTH, διατηρώντας τη συγκέντρωση του μέσα σε ένα στενό εύρος τιμών, μέσω της επαναρρόφησης του Ca στα νεφρικά σωληνάρια και της αποδόμησης του από τα οστά [150]. Σε μια πιο χρόνια βάση, η PTH διεγείρει την μετατροπή της  $25\text{OHD}$  σε  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  στα νεφρικά σωληνάρια, προάγοντας έτσι την εντερική απορρόφηση του Ca. Επίσης μειώνει τα επίπεδα του Pi στον ορό, αναστέλλοντας την επαναρρόφηση του κυρίως στα PCT αλλά και στα DCT σε μικρότερο βαθμό [151]. Έτσι οι κύριες φυσιολογικές συνέπειες της αύξησης της PTH στον ορό είναι: αύξηση των επιπέδων του Ca, μείωση του Pi και αύξηση των επιπέδων  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ .

- Δράσεις στα οστά

Οι φυσιολογικές δράσεις της PTH στα οστά είναι περίπλοκες και περιλαμβάνουν τόσο αναβολικές, όσο και καταβολικές δράσεις. Η PTH είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής του οστικού ανασχηματισμού, μιας δια βίου διαδικασίας, η οποία είναι αναγκαία για τη διατήρηση της δομικής ακεραιότητας της μικροαρχιτεκτονικής του οστού. Η PTH εμφανίζει άμεση δράση στους OB και τα OK, με την ενεργοποίηση του υποδοχέα PTH1, που εκφράζεται στην επιφάνεια τους και έμμεση δράση στους OKΛ. Σε κυτταρικό επίπεδο, η PTH διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και την δραστηριότητα των OB για τον σχηματισμό των

οστών, προάγοντας την παραγωγή και εναπόθεση νέας θεμέλιας ουσίας των οστών και επιταχύνοντας τον ρυθμό επιμετάλλωσης της [152, 153]. Ταυτόχρονα, η PTH διεγείρει την οστική απορρόφηση με έμμεση δραστηριοποίηση των ΟΚΛ. Οι ΟΚΛ δεν φέρουν υποδοχείς για την PTH, αλλά ανταποκρίνονται σε παράγοντες, όπως τον δεσμευτικό παράγοντα του υποδοχέα ενεργοποίησης του πυρηνικού παράγοντα κΒ (receptor activator of nuclear factor κΒ ligand, RANKL) και την οστεοπροτεγερίνη (osteoprotegerin, OPG), που εκκρίνονται από ΟΒ μετά από διέγερση από την PTH (Εικόνα 9).



**Εικόνα 9.** Σχηματική απεικόνιση των κυτταρικών αλληλεπιδράσεων στην οστεοκλαστογένεση. Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (Mesenchymal stem cells, MSC), πρόγονοι των στρωματικών κυττάρων και οστεοβλαστών (OB). Οστική μορφογενετική πρωτεΐνη (bone morphogenetic protein, BMP). Δεσμευτικός παράγοντας του υποδοχέα ενεργοποίησης του πυρηνικού παράγοντα κΒ (receptor activator of nuclear factor κΒ ligand, RANKL), υποδοχέας ενεργοποίησης του πυρηνικού παράγοντα κΒ (receptor activator of nuclear factor κΒ, RANK), οστεοπροτεγερίνη (OPG), πρόδρομοι οστεοκλάστες (Hemat. precursor OC), ώριμοι οστεοκλάστες (OC). Ο RANKL μπορεί να ρυθμιστεί από 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, PTH και κυτταροκίνες gp130. Η διαλυτή MCSF, εκκρίνεται από στρωματικά κύτταρα ή ΟΒ, αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα c-fms, παράγοντα υποστήριξης και ενίσχυσης της οστεοκλαστογένεσης [154].

Η οστεοκλαστική δραστηριότητα ενεργοποιείται μέσω της σύνδεσης του RANKL με τον επιφανειακό υποδοχέα ενεργοποίησης του πυρηνικού παράγοντα κΒ (receptor activator of nuclear factor κΒ, RANK) των ΟΚΛ, ενεργοποιώντας έτσι την οστική απορρόφηση. Η OPG εργάζεται ως αναστολέας της οστεοκλαστογένεσης, συνδεδεμένη με τον RANKL



αποτρέπει τη συνένωση του με τον RANK, παρακωλύοντας έτσι την οστική απορρόφηση. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα της PTH στους OB και OK μπορεί να αυξήσει την αναλογία RANKL/OPG, που αποτελεί τον κύριο μηχανισμό διέγερσης της οστικής απορρόφησης από την PTH. Η PTH επηρεάζει τον οστικό ανασχηματισμό ποικιλότροπα, σε συνεχή έκθεση σε υψηλά επίπεδα προκαλεί οστική απορρόφηση και αύξηση επιπέδων Ca, ενώ σε χορήγηση χαμηλών, διαλειπουσών δόσεων οδηγεί σε καθαρή αύξηση της οστικής μάζας. Το καθαρό αποτέλεσμα της PTH στην ΟΠ εξαρτάται από τον βαθμό της ενεργοποίησης του RANK και τις συγκεντρώσεις OPG και RANKL. Περαιτέρω μελέτη απαιτείται για την διαλεύκανση των υποκείμενων μηχανισμών αυτών των αντίθετων φυσιολογικών επιδράσεων της PTH [155-157].

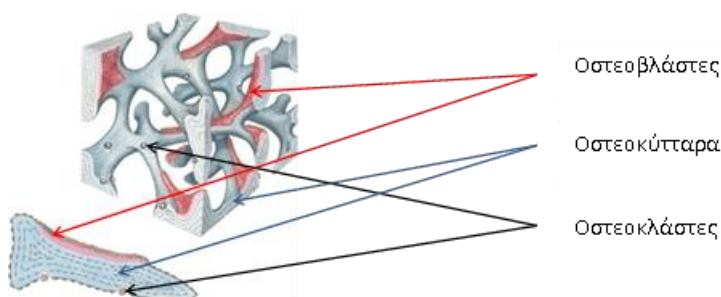
## Οστά

### Γενικά

Ο σκελετός επιτελεί δομικές και μεταβολικές λειτουργίες. Ζωτικής σημασίας είναι η παροχή δυνατότητας κινητοποίησης, αναπνοής και προστασίας των εσωτερικών οργάνων. Η σχέση μεταξύ του σκελετού και του αιμοποιητικού συστήματος είναι ιδιαίτερα στενή, καθώς μοιράζονται κύτταρα και τοπικούς ρυθμιστικούς παράγοντες. Η κύρια μεταβολική λειτουργία του αφορά την αποθήκευση Ca, P<sub>i</sub> και ανθρακικών, ως μια δυναμική αποθεματική τράπεζα μετάλλων [158].

Ο σκελετός είναι ένα ιδιαίτερα δυναμικό όργανο που υφίσταται διαρκώς αλλαγές και αναγέννηση. Αποτελείται κατά 30% του ξηρού βάρους του από οργανική ουσία και 70% από ανόργανη. Το 2% της οργανικής ουσίας αφορά εξειδικευμένα κύτταρα, ενώ το 98% την θεμέλια ουσία των οστών. Η θεμέλια ουσία αποτελείται κατά 95% από κολλαγόνο κυρίως τύπου I. Οι μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες αποτελούν το 5% των πρωτεϊνών του οστεοειδούς κυριότερη εκ των οποίων είναι η οστεοκαλσίνη (Osteocalcin, OC) ή αλλιώς πλούσια σε γ-γλουταμινικό οξύ οστική πρωτεΐνη [159].

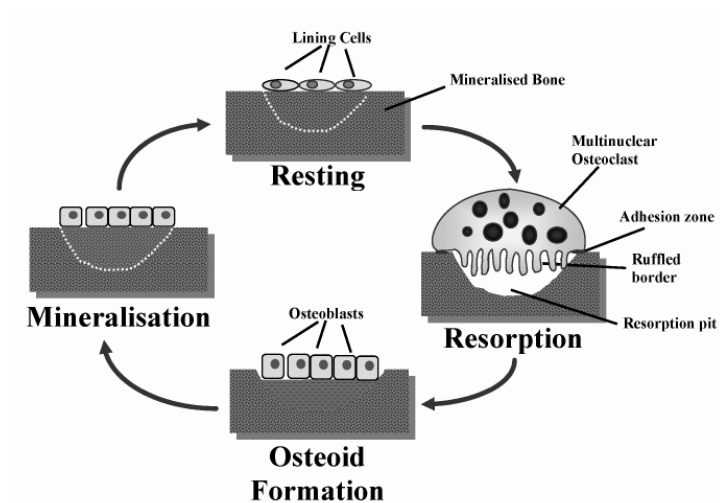
Τα κύτταρα των οστών αποτελούν οι OB (4-6%), τα OK (90-95%) και οι OKΛ (Εικόνα 10). Οι OB και OKΛ είναι εξειδικευμένα κύτταρα υπεύθυνα για την οστική παραγωγή και την οστική απορρόφηση αντίστοιχα, που είναι οι δύο βασικές δραστηριότητες ρύθμισης της οστικής μάζας. Οι δραστηριότητες αυτές συμβαίνουν διαδοχικά στην ίδια επιφάνεια, μια διαδικασία που ονομάζεται ανασχηματισμός.



**Εικόνα 10.** Σχηματική απεικόνιση της μικροαρχιτεκτονικής του οστού [34, plate 2-23, page 48].

Μικρά τμήματα οστού αποδομούνται από τους OKΛ (οστική απορρόφηση) και αντικαθίστανται από νέα θεμέλια ουσία που παράγεται από τους OB (οστική παραγωγή) (Εικόνα 11). Αυτή η συνεχής διαδικασία ανανέωσης (οστικός ανασχηματισμός) εξυπηρετεί

τις ανάγκες της ανάπτυξης, επιτρέπει την επισκευή των μηχανικών ατελειών, αντικαθιστώντας με ακρίβεια το απορροφηθέν τμήμα. Επίσης ρυθμίζει την ομοιόσταση του Ca και του P. Ο συντονισμός της δραστηριότητας των OB σε απόκριση προς την απορρόφηση των ΟΚΛ ονομάζεται «σύζευξη» (coupling) [160, 161].



**Εικόνα 11.** Ο κύκλος ανασχηματισμού των οστών. Υπό κανονικές συνθήκες, η φάση απορρόφησης (οστεοκλάστες) διαρκεί περίπου 10 ημέρες, στη συνέχεια ακολουθεί μια φάση παραγωγής (οστεοβλάστες) που μπορεί να διαρκέσει μέχρι και 3 μήνες [162].

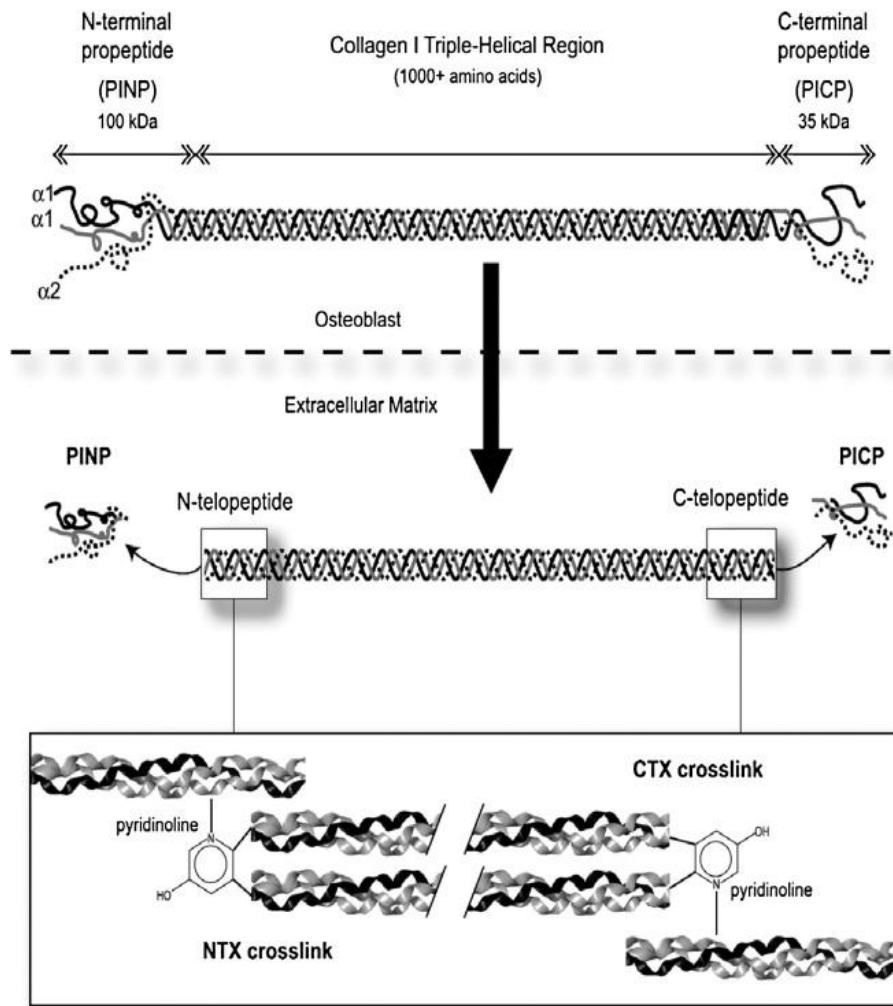
## Οστεοβλάστες (OB)

Οι OB προέρχονται από πολυδύναμα μεσεγχυματικά αρχέγονα κύτταρα του μυελού των οστών. Οι OB παράγουν πρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας των οστών, όπως κολλαγόνο τύπου I και OC, που συνεννοούμενες εξωκυττάρια σχηματίζουν το οστεοειδές, το οργανικό υπόστρωμα που στην συνέχεια επιμεταλλώνεται παράγοντας τον νέο οστίτη ιστό [163].

Η σύνθεση του κολλαγόνου τύπου I στα οστά αρχικά αφορά την διαπλοκή μιας άλφα-2 και δύο άλφα-1 πολυπεπτιδικών αλυσίδων για τον σχηματισμό μίας ελικοειδούς δομής γνωστής ως προκολλαγόνο, που αποτελεί ανενεργό πρόδρομο μορφή (Εικόνα 12). Το άμινοτελικό και καρβοξύ-τελικό προπεπτίδιο του προκολλαγόνου τύπου I, (Procollagen type I N-terminal propeptide, PINP) και (Procollagen type I C-terminal propeptide, PICP), αποτελούν τα αρχικά τμήματα της μη τριπλής έλικας σε καθεμία από τις τρεις αλυσίδες [164-166]. Αυτά τα τελικά προπεπτίδια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην συναρμολόγηση των τριών αλυσίδων σε τριπλό μονομερές κολλαγόνο [167]. Το προκολλαγόνο εκκρίνεται στον εξωκυττάριο χώρο, όπου αποσπώνται τα PINP και PICP σχηματίζοντας το τροποκολλαγόνο.

Τα αποσπώμενα PINP και P1CP αποτελούν δείκτες οστικής παραγωγής (Εικόνα 12). Πολυμερισμός και συσσωμάτωση μορίων τροποκολλαγόνου σε ινίδια και δέσμες σχηματίζουν ένα τρισδιάστατο δίκτυο, που αποτελεί την ενεργό μορφή του κολλαγόνου. Αυτό το δίκτυο κολλαγόνου συμπληρώνεται με άλλες πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και σχηματίζει το οστεοειδές, που επιμεταλλάσσεται με εναπόθεση υδροξυαπατίτη παράγοντας το οστό [168]. Κατά τον σχηματισμό ινιδίων κολλαγόνου μόρια τροποκολλαγόνου ενώνονται μεταξύ τους με διασταυρούμενους δεσμούς (cross-links) (Εικόνα 12). Ο εξαιρετικά μεγάλος αριθμός cross-links, των ομαδοποιούμενων και ελιγμένων ινιδίων τροποκολλαγόνου καθιστά ισχυρό ιστό το τρισδιάστατο δίκτυο κολλαγόνου.

Οι μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις του κολλαγόνου είναι πολύ σημαντικές, διότι απαιτείται συγκεκριμένη δομή για τη διαδικασία της σωστής εναπόθεσης μετάλλων [169]. Οι cross-links δημιουργούνται μετά την απαμίνωση της λυσίνης και υδροξυλυσίνης, που βρίσκονται σε αμινοομάδες σε πλάγιες αλυσίδες των μορίων τροποκολλαγόνου και τον σχηματισμό ομάδων αλδεΰδης με αλλυσίνη και υδροξυαλλυσίνη [170]. Συγκεκριμένα οι πλευρικές αλυσίδες τριών μορίων υδροξυλυσίνης από τρία διαφορετικά μόρια τροποκολλαγόνου συνενώνονται για να σχηματίσουν έναν δακτύλιο πυριδινολίνης (pyridinoline, PYD), που συνδέει τα τρία αυτά διαφορετικά μόρια τροποκολλαγόνου με διασταυρούμενους δεσμούς. Αντίστοιχα δακτύλιος δεοξυπυριδινολίνης (deoxypyridinoline, DPD), σχηματίζεται από την διασταυρούμενη σύνδεση δύο μορίων υδροξυλυσίνης και ενός λυσίνης πλευρικών αλυσίδων από τρία διαφορετικά μόρια τροποκολλαγόνου [162, 171] (Εικόνα 12). Κύρια πηγή των κυκλοφορούντων PYD και DPD στα βιολογικά υγρά (αίμα-ούρα) είναι τα οστά. Επειδή η DPD και PYD σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του μορίου του κολλαγόνου, θεωρούνται δείκτες αποδόμησης του κολλαγόνου τύπου I και κατ' επέκταση οστικής απορρόφησης [172]. Το τροποκολλαγόνο έχει κυρίως ελικοειδή μορφή, τα μη-ελικοειδή τμήματα στα άμινο- και καρβοξύ-τελικά άκρα του κολλαγόνου είναι γνωστά ως τμήματα άμινο-τελοπεπτιδίου (N-telopeptide) και καρβοξύ-τελοπεπτιδίου (C-telopeptide), αντίστοιχα (Εικόνα 12).



**Εικόνα 12.** Επάνω: Σχηματική απεικόνιση των τμημάτων του προκολλαγόνου τύπου I. Αμινο-τελικό προπεπτίδιο του προκολλαγόνου τύπου I (Procollagen type I N-terminal propeptide, PINP). Καρβοξυ-τελικό προπεπτίδιο του προκολλαγόνου τύπου I (Procollagen type I C-terminal propeptide, PICP). Μέση: Τροποκολλαγόνο. Καρβοξυ-τελικό τελοπεπτίδιο (C-telopeptide). Αμινο-τελικό τελοπεπτίδιο (N-telopeptide). Κάτω: Μοριακή βάση των βιοχημικών δεικτών αποδόμησης του οστικού κολλαγόνου που χρησιμοποιούνται σήμερα ως δείκτες οστικής απορρόφησης. Διασταυρούμενοι δεσμοί (crosslinks) πυριδινολίνης (pyridinoline). Αυτοί οι διασταυρούμενοι δεσμοί ενώνουν alpha-1 και alpha-2 αλυσίδες του κολλαγόνου. Αμινο-τελικό τελοπεπτίδιο των διασταυρούμενων δεσμών του κολλαγόνου (N-terminal cross-linking telopeptide of collagen, NTX). Καρβοξύ-τελικό τελοπεπτίδιο των διασταυρούμενων δεσμών του κολλαγόνου (C-terminal cross-linking telopeptide of collagen, CTX) [173].

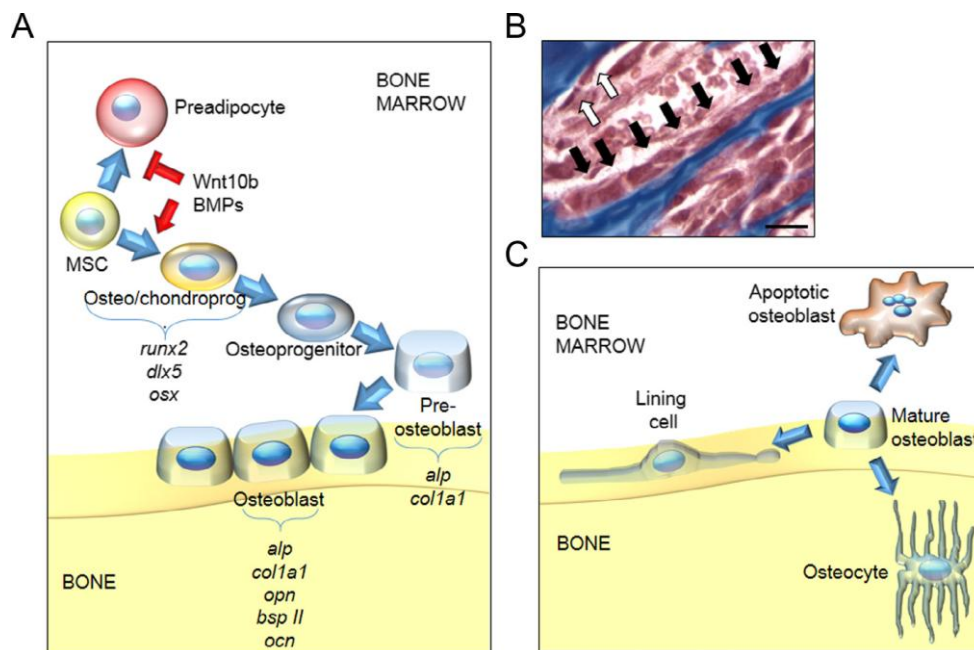
Υπάρχουν τρεις χαρακτηριστικοί τύποι cross-links στον ορό ή στα ούρα, που αποτελούν προϊόντα αποδόμησης του κολλαγόνου τύπου I των οστών (Εικόνα 12):

- Ελεύθεροι δακτύλιοι DPD και σε μικρότερο βαθμό PYD, προερχόμενοι κυρίως από τα οστά και την οδοντίνη [174].
- Άμινο-τελικό πεπτίδιο των διασταυρούμενων δεσμών (N-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen, NTX-I), στην περιοχή του N-telopeptide του κολλαγόνου που συνδέει τις άλφα-1 και άλφα-2 αλυσίδες. Το NTX-I μπορεί να μετρηθεί στα ούρα και στον ορό και αποτελεί δείκτη απορρόφησης των οστών [175].
- Καρβοξύ-τελικά πεπτίδια των διασταυρούμενων δεσμών (C-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen, CTX-I), από την περιοχή του C-telopeptide, υπάρχουν σε διάφορες μορφές. Το CTX-I είναι ένα θραύσμα της άλφα-1 πεπτιδικής αλυσίδας, με ένα ισομερισμένο δεσμό α-μορφής μεταξύ του ασπαρτικού και της γλυκίνης (α-CTX-I) ή ισομερισμό β-μορφής (b-CTX-I) με ισοασπαρτικό [168]. Το CTX-I μετριέται στον ορό και αποτελεί δείκτη απορρόφησης των οστών [175].

Ο φαινότυπος των OB αναγνωρίζεται από τις μεγάλες ποσότητες του οστικού κλάσματος της ALP, που είναι συνδεδεμένη στην κυτταρική μεμβράνη τους και της OC. Οι ώριμοι OB έχουν τρεις πιθανότητες (Εικόνα 13 - Σχήμα C): να υποστούν απόπτωση, να γίνουν OK ή να γίνουν κύτταρα που καλύπτουν την επιφάνεια του οστού (Εικόνα 13 - Σχήμα B). Αυτά, τα τελευταία κύτταρα λειτουργικά βρίσκονται σε φάση ηρεμίας. Ένας πιθανός ρόλος αυτών είναι η παρεμπόδιση της άμεσης αλληλεπίδρασης μεταξύ των OKΛ και της θεμέλιας ουσίας των οστών, όταν πρέπει να αποφευχθεί η απορρόφηση του οστού [176].

### **Οστεοκλάστες (OKΛ)**

Οι OKΛ είναι μεγάλα κύτταρα, που περιέχουν έως και 100 πυρήνες ανά κύτταρο και προέρχονται από την σειρά των μονοκυττάρων/μακροφάγων [177]. Είναι πλούσια σε λυσοσωμικά ένζυμα και σε αντλίες πρωτονίων. Οι OKΛ διαθέτουν μια εξειδικευμένη, αναδιπλούμενη κυτταρική μεμβράνη, όπου πραγματοποιείται η απορρόφηση του οστού (Εικόνα 11).



**Εικόνα 13.** Διαφοροποίηση των οστεοβλαστών (OB), μορφολογία και η εξέλιξη τους. (A) Σχηματική απεικόνιση της πολυσταδιακής διαδικασίας διαφοροποίησης των OB (MSC=μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα). (B) Η ιστολογική τομή κνήμης ποντικού, βάφεται με τριχρωματική χρώση του Masson. Τα μαύρα βέλη δείχνουν μια σειρά OB σε δοκιδώδες οστό (μπλε χρώση), τα λευκά βέλη δείχνουν οστεοκύτταρα. (C) Σχηματική απεικόνιση των δυνατοτήτων εξέλιξης ενός ώριμου οστεοβλάστη [178].

Οι ΟΚΛ ως σχετικά βραχύβια κύτταρα, πρέπει να αναπαράγονται συνεχώς στην θέση της οστικής απορρόφησης. Η παραγωγή τους ρυθμίζεται από παράγοντες διαφοροποίησης και επιβίωσης των πρόδρομων αιμοποιητικών κυττάρων, τον παράγοντα RANKL και τον παράγοντα διέγερσης της αποικίας-μακροφάγων (Macrophage-Colony Stimulating Factor, M-CSF) [179] (Εικόνα 9). Ο M-CSF διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των προγονικών ΟΚΛ, ενώ ο RANKL τη διαφοροποίησή τους [180, 181]. Ο RANKL ως απαραίτητη κυτταροκίνη για την παραγωγή των ΟΚΛ, έχει θεωρηθεί γενετικός δείκτης των ΟΚΛ. Κύτταρα που παράγουν τον RANKL και συνεπώς προάγουν την οστεοκλαστογένεση, είναι κυρίως οι OB σε διάφορα στάδια διαφοροποίησης, ΟΚ, στρωματικά κύτταρα απροσδιόριστης προέλευσης, Β και Τ λεμφοκύτταρα, αρθρικοί ινοβλάστες, υπερτροφικά χονδροκύτταρα, αλλά και οι ίδιοι οι ΟΚΛ [182-188].

Ο RANKL, κυρίως ως μόριο επιφάνειας και σε χαμηλές ποσότητες ως διαλυτή κυτταροκίνη, συνδέεται με τον RANK, που εκφράζεται στην επιφάνεια των πρόδρομων

ΟΚΛ. Έτσι ενεργοποιείται η συγχώνευση και η διαφοροποίηση των προ-ΟΚΛ σε ώριμους ΟΚΛ. Ο υποδοχέας RANK βρίσκεται επίσης στα δενδριτικά κύτταρα [189, 190]. Στα οστά, ο RANKL διεγείρει τη διαφοροποίηση, την ενεργοποίηση, τη δραστηριότητα και την επιβίωση των ΟΚΛ και την απορρόφηση του οστού [191], ενώ στο ανοσοποιητικό σύστημα ο RANKL προάγει την δραστηριότητα και την ανοσοδιεγερτική ικανότητα των δενδριτικών κυττάρων [192].

Η OPG είναι ένας διαλυτός υποδοχέας, που παράγεται κυρίως από τους OB αλλά και από μια ποικιλία ιστών. Η OPG έχει κυρίως παρακρινή δράση. Στα οστά δεσμεύει τον RANKL, παρεμποδίζοντας την αλληλεπίδραση του με τον RANK (Εικόνα 9). Έτσι η OPG αναστέλλει την οστεοκλαστογένεση και την επακόλουθη οστική απορρόφηση [193]. Ως εκ τούτου, κατάλληλη αναλογία των RANKL/OPG οδηγεί σε σωστή οστεοκλαστογένεση.

Οι ΟΚΛ προσκολλώνται στην επιφάνεια του οστού, όπου εκκρίνουν οξύ και υδρολυτικά ένζυμα που το διαλύουν, απελευθερώνοντας ανόργανα στοιχεία του οστού και προϊόντα αποδόμησης του οστεοειδούς, που κυρίως αποτελείται από κολλαγόνο τύπου I (Εικόνα 11). Το κολλαγόνο δεν πέπτεται εντελώς στα επιμέρους αμινοξέα, αλλά σε πεπτίδια. Έτσι παράγονται υπολείμματα ελεύθερων δακτυλίων PYD και DPD που κυκλοφορούν στο αίμα και εκκρίνονται στα ούρα, αλλά και θραύσματα cross-links με  $\alpha$ -1 και  $\alpha$ -2 NTX-I και CTX-I με ένα ισομερισμένο δεσμό μεταξύ του ασπαρτικού και της γλυκίνης. Τα πεπτίδια στο αίμα και στα ούρα των cross-links NTX-I και CTX-I προέρχονται σχεδόν αποκλειστικά από το κολλαγόνο-I των οστών, αντανakλούν την οστική απορρόφηση καθώς δεν επηρεάζονται από την διατροφή, αποτελώντας ειδικούς δείκτες της οστικής απορρόφησης [177, 194].

### **Οστεοκύτταρα (OK)**

Τα OK προέρχονται από τους OB, που έχουν παγιδευτεί στην επιμεταλωμένη θεμέλια ουσία του οστού κατά τη διάρκεια της οστικής παραγωγής, μέσα σε ένα μικρό βοθρίο. Τα OK σχηματίζουν μεταξύ τους ένα εκτεταμένο δίκτυο διασυνδεδεμένων καναλιών, πληρωμένων με υγρό και είναι τα μακροβιότερα των οστικών κυττάρων, με διάρκεια ζωής έως και 25 έτη [195] (Εικόνα 10, Εικόνα 13). Αυτό το δίκτυο καναλιών πιστεύεται ότι παίζει ζωτικό ρόλο στη μεταφορά κυτταρικών μεταβολιτών, στην επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων, στην ρύθμιση της ομοιόστασης των μετάλλων, στην μετάδοση παρακρινούς ή και ενδοκρινούς σήματος, καθώς και στην μεταφορά πληροφόρησης για πιθανή μηχανική



καταπόνηση. Τα ΟΚ μπορεί να παρέχουν ένα σύστημα μεταφοράς πληροφοριών από τους απορροφητικούς ΟΚΛ στην επιφάνεια των οστών στους ΟΒ [196].

Τα ΟΚ εμπλέκονται στη ρύθμιση των ΟΒ αλλά ο ρόλος τους αυτός δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Ισχυρά στοιχεία δείχνουν ότι τα ΟΚ ρυθμίζουν αρνητικά την διαφοροποίηση των ΟΒ και την οστική παραγωγή και ότι η πυκνότητα των ΟΚ συσχετίζεται αρνητικά με την οστική παραγωγή. Επίσης, μελέτες έδειξαν ότι η απόπτωση των ΟΚ ή η διαταραχή του δικτύου τους, προάγει την οστική παραγωγή [197, 198]. Σε αντίθεση, άλλες μελέτες έδειξαν ότι η *in vivo* εκτομή ΟΚ μειώνει σημαντικά την οστική παραγωγή [199].

### **Μεταβολισμός των οστών**

Ο μεταβολισμός των οστών στα παιδιά διαφέρει από εκείνο των ενηλίκων, καθώς ικανοποιεί τόσο τη σκελετική ανάπτυξη όσο και τον ανασχηματισμό. Κατά τη διάρκεια του ανασχηματισμού των οστών η παραγωγή και η απορρόφηση είναι στενά συνδεδεμένες, ενώ κατά τη διάρκεια της σκελετικής ανάπτυξης νέο οστό διαμορφώνεται σε μία θέση διαφορετική από εκείνη της απορρόφησης. Η οστική μάζα παρουσιάζει σταδιακή αύξηση από τη γέννηση μέχρι και την τρίτη δεκαετία της ζωής, οπότε ολοκληρώνεται η κατά μήκος ανάπτυξη και επιτυγχάνεται μια μέγιστη τιμή που ορίζεται ως «μέγιστη οστική μάζα». Η επίτευξη αυτής της τιμής φαίνεται να επηρεάζεται από γενετικούς, διατροφικούς, ενδοκρινικούς και μηχανικούς παράγοντες. Έτσι η συσσώρευση μικροβλαβών, ο ρυθμός του οστικού ανασχηματισμού, η αρχιτεκτονική, ο βαθμός της επιμετάλλωσης, οι ιδιότητες του κολλαγόνου και του οστεοειδούς, αλλά και χρόνιες ασθένειες και οι θεραπείες τους καθορίζουν την οστική μάζα [200]. Διαταραχές των ανωτέρω παραγόντων μπορεί να συντελέσουν σε μείωση της ΟΠ και επίδραση της σκελετικής ποιότητας και αντοχής, με προφανείς παθολογικές συνέπειες [201].

Το 2001, το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας των ΗΠΑ, National Institutes of Health (NIH), ορίζει ότι η ισχύς των οστών καθορίζεται από την ποιότητα και την πυκνότητα των μετάλλων τους. Ορίζεται επίσης ως οστεοπόρωση: η σκελετική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από επηρεασμένη ισχύ των οστών, που προδιαθέτει σε αυξημένο κίνδυνο καταγμάτων. Η πυκνότητα και η ποιότητα των οστών καθορίζονται από τον ρυθμό μεταβολισμού των οστών [202]. Εφόσον η ανάπτυξη του σκελετού κατά τη διάρκεια της παιδικής και εφηβικής ηλικίας αποτελεί καθοριστικό παράγοντα του κινδύνου οστεοπόρωσης στην ενήλικη ζωή, η

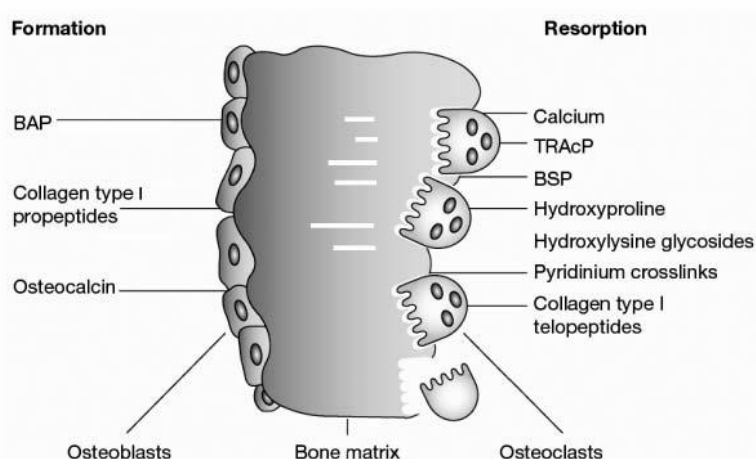
οστεοπόρωση μπορεί να θεωρηθεί ως παιδιατρική νόσος με πιθανές συνέπειες στην ενήλικη ζωή [203].

Η πρόωμη αναγνώριση παραγόντων ανάπτυξης οστεοπόρωσης είναι ιδιαίτερα σημαντική ώστε με την λήψη κατάλληλων μέτρων να εξασφαλιστεί το δυνατόν η οστική υγεία. Η διάγνωση τίθεται επεμβατικά με βιοψία οστού, με βιοχημικούς δείκτες και με αξιολόγηση της πυκνότητας των μετάλλων των οστών με πυκνομετρικές μεθόδους [204, 205]. Παραδοσιακά, η εκτίμηση της υγείας των οστών γίνεται με την πυκνομετρική μέθοδο της διπλής ενέργειας απορροφησιμετρίας ακτίνων X (dual-energy x-ray absorptiometry, DXA ή DEXA). Ωστόσο, οι μετρήσεις αυτές δεν αντανakλούν την δυναμική φύση του οστίτη ιστού [206]. Σε αντίθεση, οι βιοχημικοί δείκτες του οστικού μεταβολισμού παρέχουν μια πιο δυναμική εικόνα των αλλαγών τόσο κατά την ανάπτυξη όσο και κατά τον ανασχηματισμό των οστών και η μέτρηση τους μπορεί να είναι χρήσιμη στην αξιολόγηση των μεταβολικών ασθενειών των οστών και αναπτυξιακών διαταραχών στα παιδιά [206-208].

Οι βιοδείκτες του μεταβολισμού των οστών σε παιδιά και εφήβους παραδοσιακά αξιολογούνται σε συνάρτηση με το φύλο, την ηλικία και το στάδιο ενήβωσης [209]. Ωστόσο, η συνολική σκελετική μάζα, η ταχύτητα αύξησης ύψους και ο ρυθμός αύξησης των οστών μπορεί επίσης να είναι καθοριστικοί παράγοντες.

Ο μεταβολισμός των οστών αξιολογείται με μέτρηση βιοχημικών δεικτών οστικής παραγωγής και απορρόφησης και ανόργανων στοιχείων των οστών στον ορό και στα ούρα και καλσιotropων ορμονών [210] (Εικόνα 14):

- Ανόργανα στοιχεία: Ca, Pi
- VitD και PTH
- Ένζυμα: αλκαλική φωσφατάση
- Συστατικά της θεμέλιας ουσίας των οστών, που απελευθερώνονται στην κυκλοφορία κατά τη διάρκεια παραγωγής ή απορρόφησης της



**Εικόνα 14.** Βιοχημικοί δείκτες οστικού ανασχηματισμού [162]

### ***Ca-Pi-VitD-PTH***

Η επιμετάλλωση του οστού εξαρτάται από την επαρκή πρόσληψη Ca και Pi. Η απορρόφηση του Ca εξαρτάται από την επάρκεια της VitD. Σε ικανοποιητικά επίπεδα της VitD, η καθαρή απορρόφηση Ca είναι περίπου 30% και κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης φθάνει 60-80% της προσλαμβανόμενης ποσότητας. Σε ανεπάρκεια της VitD, μειώνεται η απορρόφηση Ca και η επαναρρόφηση Pi με αποτέλεσμα μειωμένα επίπεδα αυτών των βασικών στοιχείων για την εναπόθεση τους στα οστά [211]. Η PTH ρυθμίζει τα επίπεδα των Ca, Pi και 1,25(OH)<sub>2</sub>D στον ορό [150, 151].

### ***Βιοχημικοί δείκτες οστικής παραγωγής***

Δείκτες οστικής παραγωγής είναι είτε παραπροϊόντα σύνθεσης του κολλαγόνου τύπου I, PICP και PINP, είτε πρωτεΐνες σχετιζόμενες με την λειτουργικότητα των OB, όπως η ALP και η OC.

Η ALP έχει πέντε ισoenζυμα, το οστικό και το ηπατικό, που αποτελούν περίπου το 95% της συνολικής δραστηριότητας της ALP στον ανθρώπινο ορό. Τα άλλα τρία isoenζυμα της ALP είναι το εντερικό κλάσμα, το πλακουντιακό κατά τη διάρκεια της κύησης και το σπερματικών κυττάρων που ανευρίσκεται σε ασθενείς με σεμίνωμα. Το οστικό isoenζυμο της ALP είναι ένα εξoenζυμο που συνδέεται στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης των OB και αποτελεί κύριο ρυθμιστή της εναπόθεσης Ca και Pi, ως υδροξυαπατίτη, στο οστεοειδές [212]. Η ολική ALP ορού είναι ο πιο συχνά

χρησιμοποιούμενος δείκτης του οστικού μεταβολισμού λόγω της ευρείας διαθεσιμότητας φθηνών και απλών μεθόδων προσδιορισμού της. Εφόσον αποκλειστεί ηπατική νόσος, τα επίπεδα στον ορό της ολικής ALP παρέχουν μια καλή εικόνα της παραγωγής νέου οστού και ενεργότητας των OB [213].

Η OC είναι η πιο άφθονη μη κολλαγονούχα πρωτεΐνη της θεμέλιας ουσίας των οστών, που κυρίως εκφράζεται στους OB και δεσμεύει ιόντα Ca [214]. Ο ακριβής ρόλος της στα οστά δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός, αλλά η ικανότητά της να ρυθμίζει την επιμετάλλωση και τον μεταβολισμό τους είναι τεκμηριωμένη.

Τα επίπεδα της OC στον ορό χρησιμοποιούνται ως δείκτης οστικής παραγωγής και μάλιστα θεωρείται πιο ευαίσθητος δείκτης από τη δραστικότητα στον ορό της ALP [215]. Παρ' όλα αυτά, η ευρεία χρήση της στην κλινική πράξη περιορίζεται από την ετερογένεια των κυκλοφορούντων μορφών OC στον ορό, καθόσον καταβολίζεται ταχέως σε μικρότερα θραύσματα και κατά συνέπεια από τη δυσκολία ανάπτυξης μιας διαγνωστικής δοκιμασίας που να ανιχνεύει όλες τις διαφορετικές μορφές (ολική OC, μη καρβοξυλιωμένο μόριο και θραύσματα διαφόρων μεγεθών). Εμπορικά διατίθενται διάφορες ανοσοδοκιμασίες που βασίζονται σε αντισώματα, μετρούν την ολική και προϊόντα αποδόμησης της OC. Αυτές οι ανοσοδοκιμασίες συχνά δίνουν διαφορετικά αποτελέσματα μη συγκρίσιμα άμεσα μεταξύ τους [158].

Τα PINP και PICP παράγονται κατά την οστική παραγωγή, ως αποσπώμενα μόρια του προκαλλογόνου τύπου I κατά τη διάρκεια της μετα-μεταγραφικής εξωκυττάριας επεξεργασίας σε τροποκολλαγόνο [216] (Εικόνα 12).

Οι OB παράγουν επίσης την OPG, που εμφανίζει κυρίως παρακρινή δράση. Η OPG αναστέλλει την οστεοκλαστογένεση και την επακόλουθη οστική απορρόφηση με σύνδεση της στον RANKL, παρεμποδίζοντας την αλληλεπίδραση του με τον RANK [193]. Ως εκ τούτου, κατάλληλη αναλογία των RANKL/OPG οδηγεί σε σωστή οστεοκλαστογένεση (Εικόνα 9).

### ***Βιοχημικοί δείκτες οστικής απορρόφησης***

Οι περισσότεροι βιοχημικοί δείκτες της οστικής απορρόφησης σχετίζονται με προϊόντα διάσπασης του κολλαγόνου ή μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας.

Η υδροξυπρολίνη (Hydroxyproline, HYP) είναι ένα προϊόν υδροξυλίωσης της προλίνης κατά την αποδόμηση του κολλαγόνου τύπου I και δεν επαναχρησιμοποιείται για

σύνθεση πρωτεϊνών [217]. Μόνο το 10% της HYP απεκκρίνεται στα ούρα και μόνο ένα μέρος είναι οστικής προέλευσης. Ωστόσο η HYP βρίσκεται και σε άλλες πρωτεΐνες πέραν του κολλαγόνου τύπου I. Τα επίπεδα της HYP στα ούρα δεν θεωρούνται ισχυρός δείκτης οστικής απορρόφησης, όπως αξιολογείται από την ιστομορφομετρία των οστών ή την κινητική του Ca και η χρήση της έχει εγκαταλειφθεί [215].

Η υδροξυλυσίνη (Hydroxylysine, HYL) υπάρχει μόνο στο κολλαγόνο και σε πρωτεΐνες με αλληλουχίες που μοιάζουν με κολλαγόνο. Μετα-μεταγραφική υδροξυλίωση της λυσίνης μπορεί να ακολουθείται από γλυκοζυλίωση με γαλακτόζη, γαλακτοζυλο-υδροξυλυσίνη (Gal-HYL), ή/και με γλυκόζη, γλυκόζυλο-γαλακτόζυλο-υδροξυλυσίνη (Glu-Gal-HYL). Η νεφρική απέκκριση της Gal-HYL ή ο λόγος Gal-HYL/Glu-Gal-HYL είναι πιο ευαίσθητοι δείκτες οστικής απορρόφησης από την HYL ή HYP. Ωστόσο, το μειονέκτημα των HYL και Gal-HYL είναι η απουσία μιας ταχείας και κατάλληλης μεθόδου μέτρησης [218, 219].

Ο προσδιορισμός των DPD και PYD στα ούρα ως δείκτες αποδόμησης του κολλαγόνου τύπου I και οστικής απορρόφησης έχει αρκετά πλεονεκτήματα. Έχουν υψηλή ειδικότητα για τον οστικό μεταβολισμό, απεκκρίνονται αναλλοίωτα στα ούρα και δεν επηρεάζονται από την διατροφή [220]. Πλεονεκτεί ο προσδιορισμός των DPD και PYD σε ούρα 24ώρου, καθώς η απέκκριση τους ακολουθεί κιρκάδιο ρυθμό. Παρατηρείται υψηλότερη απέκκριση κατά την διάρκεια της νύχτας [221] (Εικόνα 12).

Θραύσματα των NTX-I και CTX-I κυκλοφορούν στο αίμα, διηθούνται στο σπείραμα και απεκκρίνονται στα ούρα μετά την αποδόμηση του κολλαγόνου τύπου I από ΟΚΛ κατά την οστική απορρόφηση. Έτσι θραύσματα NTX-I μετρούνται στον ορό και στα ούρα [222] (Εικόνα 12).

Θραύσματα CTX-I επίσης προσδιορίζονται με ELISA στα ούρα. Η μετατροπή α-ασπαρτικού οξέος στο μόριο του CTX-I, με ρακεμικοποίηση και ισομερισμό σε β-μορφή, σχηματίζει β-CTX-I. Η μετατροπή αυτή θεωρείται διαδικασία γήρανσης, καθώς η έκταση της αυξάνει με το χρόνο που έχει παρέλθει από την σύνθεση της πρωτεΐνης. Χρησιμοποιούνται μονοκλωνικά αντισώματα τα οποία μπορούν να αναγνωρίζουν ειδικά α- ή β-CTX-I. Θραύσματα α-CTX-I καταδεικνύουν την αποδόμηση του πρόσφατα σχηματισμένου κολλαγόνου ενώ β-CTX-I του ώριμου κολλαγόνου. Με βάση αυτά τα δεδομένα, προτείνεται η χρήση του λόγου α-CTX-I/β-CTX-I ως δείκτη του ρυθμού του μεταβολισμού των οστών [222]. Η δοκιμασία serum CrossLaps (s-CrossLaps) προσδιορίζει τις συγκεντρώσεις στον

ορό ή στο πλάσμα θραυσμάτων αποδόμησης του  $\beta$ -CTX-I cross-linked, που περιέχουν την  $\beta$ -ισομερισμένη οκταπεπτιδική ακολουθία EKAHD- $\beta$ -GGR. Ο  $\beta$ -CrossLaps είναι ειδικός και ευαίσθητος δείκτης ορού ή πλάσματος οστικής απορρόφησης. Η ειδικότητα αποδίδεται στην χρήση δύο μονοκλωνικών αντισωμάτων, που το καθένα αναγνωρίζει ένα διαφορετικό τμήμα της γραμμικής EKAHD- $\beta$ -GGR ακολουθίας [170, 223, 224].

### ***$\beta$ -CrossLaps/OC***

Ο λόγος  $\beta$ -CrossLaps/OC θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης οστικού μεταβολισμού, καθώς εκτιμά την οστική απορρόφηση συγκριτικά με την οστική παραγωγή. Ο δείκτης αυτός έχει προταθεί από τους συγγραφείς Arrabal-Polo MA, Agias-Santiago S και Arrabal-Martin M το 2012, για έλεγχο οστικού μεταβολισμού σε ασθενείς με υποτροπιάζουσα ουρολιθίαση από Ca [225, 226].

Το 2011, μια ομάδα ειδικών που συγκλήθηκε από το Διεθνές Ίδρυμα Οστεοπόρωσης και την Διεθνή Ομοσπονδία Κλινικής Χημείας και Εργαστηριακής Ιατρικής, πρότεινε ως δείκτες αναφοράς της οστικής παραγωγής τον PINP και απορρόφησης τον CTX-I ορού, αντίστοιχα [227].

### ***RANKL-RANK-OPG***

Ο RANKL ως απαραίτητη κυτταροκίνη για την παραγωγή των ΟΚΛ, έχει θεωρηθεί γενετικός δείκτης υποστήριξης των ΟΚΛ, διότι προάγει την διαφοροποίησή τους [180]. Η OPG αναστέλλει την οστεοκλαστογένεση και την επακόλουθη οστική απορρόφηση με σύνδεση της στον RANKL, παρεμποδίζοντας την αλληλεπίδραση του με τον RANK [193]. Ως εκ τούτου, κατάλληλη αναλογία των RANKL/OPG οδηγεί σε σωστή οστεοκλαστογένεση και οστική απορρόφηση (Εικόνα 9).

## ***Ιδιοπαθής Υπερασβεστιουρία στην παιδική ηλικία***

### **Γενικά**

Ως ΥΑ ορίζεται η απέκκριση Ca >4 mg/Kg/24ωρο σε κάθε ηλικία, όταν εκτιμάται με συλλογή ούρων 24ώρου [1, 2] ή τιμές κλάσματος Ca/Cre σε τυχαίο δείγμα ούρων μεγαλύτερες του φυσιολογικού βάσει ηλικίας (Πίνακας 1) [13, σελ. 1409]. Ο επιπολασμός της ΥΑ στα παιδιά κυμαίνεται στο 3,8-9,6% σε πληθυσμιακές μελέτες [7-12]. Ωστόσο στην περιοχή της Αράλης θάλασσας έχει καταγραφεί επιπολασμός στα παιδιά 40%, που δείχνει την επίδραση του περιβάλλοντος στην εμφάνιση της ΥΑ καθώς η αλμυρότητα του νερού είναι πολύ υψηλή [228, 229].

### **Μορφές της Υπερασβεστιουρίας**

Η ΥΑ διακρίνεται σε ιδιοπαθή, δευτεροπαθή και πρωτοπαθή μορφή. Ο όρος ΙΥΑ προτάθηκε από τους Albright και συν. το 1953 για να περιγράψει την ΥΑ με φυσιολογικό Ca ορού σε ασθενείς με νεφρολιθίαση από ασβεστούχους λίθους [14]. Η ΙΥΑ αποτελεί την συχνότερη μορφή, παρατηρείται σποραδικά ή οικογενώς, οφείλεται σε πολυγονιδιακές διαταραχές (sAC, CaSR, VDR...) και στην αλληλεπίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων [15].

Η ΙΥΑ στα παιδιά του Δυτικού κόσμου εμφανίζει επιπολασμό 2,2-6,4% [10, 25, 230, 231] και είναι η πιο συχνή αιτία ουρολιθίασης σε αυτό τον πληθυσμό. Το 2014 μια πολυκεντρική ευρωπαϊκή (Ισπανία-Γερμανία) μελέτη κατέγραψε επιπολασμό ΙΥΑ 17,7% σε επτάχρονα παιδιά. Ωστόσο, αν αυτός ο επιπολασμός αντανάκλα την τελευταία παρατηρούμενη αυξητική τάση ή υπήρξε μια μεμονωμένη αυξημένη καταγραφή μένει να επαληθευτεί [232].

### **Κλινική Εικόνα Ιδιοπαθούς Υπερασβεστιουρίας**

Η κλινική εικόνα της ΙΥΑ στα παιδιά εμφανίζει ετερόκλητα συμπτώματα, που συχνά είναι ήπια:

- Το 30% περίπου των παιδιών με ΥΑ εμφανίζει μικροσκοπική ή μακροσκοπική αιματουρία. Ο υπεύθυνος μηχανισμός δεν είναι γνωστός, αλλά αποδίδεται μάλλον σε τραυματισμό του ουροποιητικού συστήματος από τους κρυστάλλους Ca [18, 233].

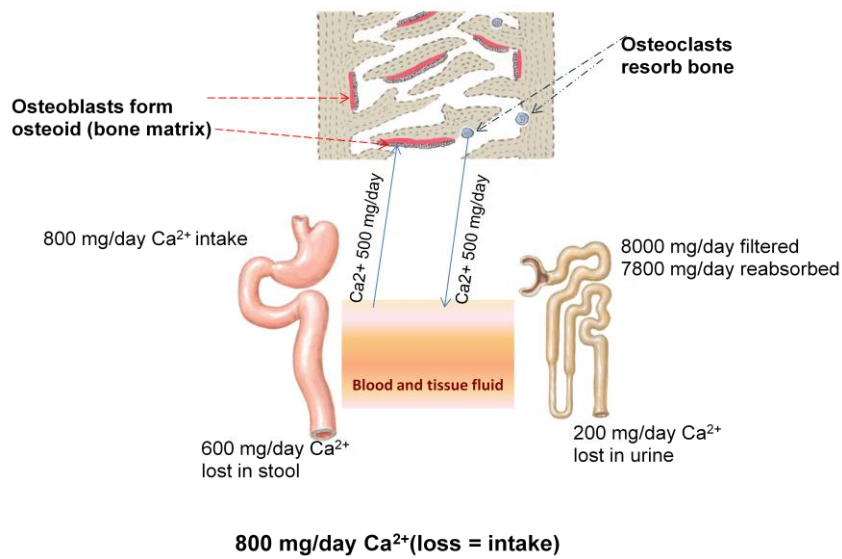
- ΥΑ παρουσιάζει το 8-30% των παιδιών με διαταραχές της ούρησης. Ακράτεια, ενούρηση, πολυουρία, δυσουρία, συχουρία, έπειξη προς ούρηση μπορεί να αποτελούν συμπτώματα ΙΥΑ [234, 235].
- Η ΙΥΑ χωρίς νεφρολιθίαση έχει συσχετιστεί με υποτροπιάζοντα οσφυϊκά και/ή κοιλιακά άλγη. Τα συμπτώματα αποδίδονται σε πιθανό τραυματισμό του ουροεπιθηλίου από μικροκρυστάλλους Ca [236, 237].
- Ποσοστό 10-40% των παιδιών με ένα ή περισσότερα επεισόδια ουρολοιμώξεων, εμφανίζουν ΙΥΑ. Η αντιμετώπιση της ΙΥΑ μειώνει σημαντικά τα επεισόδια ουρολοιμώξεων [18, 238].
- Η ΙΥΑ παρατηρείται στο 28-57% των περιπτώσεων νεφρασβέστωσης και νεφρολιθίασης, αποτελώντας την κύρια μεταβολική διαταραχή της παιδικής ουρολιθίασης [239-241]. Παιδιά με ΙΥΑ έχουν πιθανότητα 5-57% να εμφανίσουν ουρολιθίαση και συμπτώματα νεφρικού κολικού [237], που αυξάνεται με την ηλικία [242].
- Μειωμένη οστική πυκνότητα εμφανίζουν το 26-35% των παιδιών με ΙΥΑ [18, 24, 25, 243-245].

### **Διάκριση της Ιδιοπαθούς Υπερασβεστιουρίας**

Στην παθοφυσιολογία της ΥΑ εμπλέκεται η αλληλεπίδραση τριών συστημάτων: του γαστρεντερικού, των νεφρών και των οστών (Εικόνα 15). Σημαντικό ρόλο παίζουν οι ορμόνες 1,25(OH)<sub>2</sub>D και PTH, ενώ επηρεάζεται καθοριστικά από την διατροφή, περιβαλλοντικούς παράγοντες και πιθανώς άλλους άγνωστους παράγοντες [46].

Η 1,25(OH)<sub>2</sub>D και η PTH ρυθμίζουν τη σύνθεση και τη δραστηριότητα μεταφορέων του Ca, υπεύθυνων για την μετακίνηση του στο γαστρεντερικό, τους νεφρούς και τα οστά. Ο CaSR επιτρέπει στα κύτταρα του παραθυροειδούς αδένου, των νεφρικών σωληναρίων, του εντέρου και των οστών την παρακολούθηση των επιπέδων των ιόντων Ca, μεταβάλλοντας στην συνέχεια την λειτουργία τους ανάλογα. Διαταραχές της ρύθμισης του Ca σε αυτές τις θέσεις έχουν ενοχοποιηθεί για πρόκληση ΥΑ, ωστόσο οι υποκείμενοι μηχανισμοί δεν έχουν αποσαφηνισθεί πλήρως.





**Εικόνα 15.** Σχηματική παράσταση της αλληλεπίδρασης του γαστρεντερικού συστήματος, των νεφρών και των οστών στο ισοζύγιο του μεταβολισμού του Ca, μετά την ολοκλήρωση της αύξησης του οστίτη ιστού [34, plate 2-28, σελ. 53].

Οι Pak και συν. το 1975 ήταν οι πρώτοι που όρισαν τις τρεις μορφές ΙΥΑ: την εντερικού, την νεφρικού και την τύπου αποδόμησης από τα οστά [246]. Οι Bataille και συν. το 1998, βάση περαιτέρω μελετών τροποποίησαν την ταξινόμηση αυτή βασιζόμενοι στις τιμές απέκκρισης Ca, Pi και PTH στον ορό σε κατάσταση νήστεως και μετά από φόρτιση με Ca [247]. Διέκριναν έτσι τις κάτωθι μορφές ΙΥΑ και τους σχετιζόμενους μηχανισμούς που τις προκαλούν:

1. Αυξημένη εντερική απορρόφηση Ca, που οφείλεται σε αυξημένη απορρόφηση Ca από το έντερο και χαρακτηρίζεται ως Τύπου I Απορροφητική ΙΥΑ (absorptive hypercalciuria I)
2. Αυξημένη εντερική απορρόφηση Ca, που επάγεται από αυξημένη 1,25(OH)<sub>2</sub>D ή υπερευαισθησία στην 1,25(OH)<sub>2</sub>D και χαρακτηρίζεται ως Τύπου II Απορροφητική ΙΥΑ (absorptive hypercalciuria II)
3. Μειωμένη νεφρική επαναρρόφηση Pi, που προκαλεί υποφωσφαταιμία και αύξηση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D, αυξάνοντας έτσι την εντερική απορρόφηση Ca. Η μορφή αυτή χαρακτηρίζεται ως Τύπου III Απορροφητική ΙΥΑ (absorptive hypercalciuria III)
4. Μειωμένη νεφρική επαναρρόφηση Ca, που χαρακτηρίζεται ως Νεφρικού Τύπου ΙΥΑ, με δευτερεύοντα αντιρροπιστικό υπερπαραθυρεοειδισμό (renal hypercalciuria)

5. Πρωτοπαθής αυξημένη απορρόφηση Ca από τα οστά, που χαρακτηρίζεται ως Τύπου Αποδόμησης των Οστών ΙΥΑ (resorptive hypercalciuria)

Η δοκιμασία φόρτισης με Ca από το στόμα ήταν δημοφιλής στο παρελθόν, χρησιμοποιούνταν για τη διάκριση των διαφόρων μορφών της ΙΥΑ, αλλά τελευταία αμφισβητείται η χρησιμότητά τους [15, 248].

Τουλάχιστον πέντε κλινικά σημεία επιχειρηματολογίας υποστηρίζουν την άποψη ότι οι διάφοροι τύποι ΙΥΑ μπορεί να αντιπροσωπεύουν μέρη ενός συνεχούς φάσματος μιας ενιαίας νόσου και όχι διακριτές οντότητες. Συνοπτικά είναι:

1. Οι Coe και συν. [249] ανακοίνωσαν ότι, ασθενείς με απορροφητικού τύπου ΙΥΑ που τέθηκαν σε χαμηλή πρόσληψη Ca, συνέχιζαν την αυξημένη απέκκριση Ca και συμπεριφέρθηκαν σαν νεφρικού τύπου.
2. Σε παιδιά με νεφρικού τύπου ΙΥΑ που δεν καταγράφηκε διαταραχή του οστικού μεταβολισμού και της ΟΠ, η διατήρηση του ισοζυγίου του Ca εξηγείται μόνο με αυξημένη απορρόφηση Ca από το γαστρεντερικό. Συνεπώς, η νεφρική και απορροφητική μορφή ΙΥΑ μπορεί να συνυπάρχουν [250].
3. Σε μελέτες οικογενειών παιδιών με ΙΥΑ, οι Νικολαΐδου και συν. [251] και οι Harangi και Mehes [252] διαπίστωσαν ότι η νεφρική και απορροφητική μορφή ΙΥΑ μπορεί να συνυπάρχουν στην ίδια οικογένεια, ένα επιχείρημα υπέρ μιας ενιαίας μορφής ΙΥΑ. Οι Lerolle και συν. επιβεβαίωσαν την ταυτόχρονη ύπαρξη των διαφόρων μορφών ΙΥΑ στην ίδια οικογένεια [253].
4. Οι Aladjem και συν. παρατήρησαν ότι περισσότερα από 50% των παιδιών που αρχικά είχαν διαγνωστεί ως έχοντες απορροφητική ή νεφρική ΙΥΑ είχαν διαφορετικά αποτελέσματα της δοκιμασίας φόρτισης με Ca μετά από ένα διάστημα 3-7 ετών [254].
5. Διαφορετικοί φαινότυποι ΙΥΑ μπορεί να εμφανιστούν μετά τη χορήγηση καλσιτριόλης, ανάλογα με την διαιτητική πρόσληψη Ca [255]:
  - υπό φυσιολογική πρόσληψη Ca, η χορήγηση 1,25(OH)<sub>2</sub>D αυξάνει την εντερική απορρόφηση του Ca και προκαλεί Απορροφητική ΙΥΑ
  - υπό περιορισμένη πρόσληψη Ca, η χορήγηση 1,25(OH)<sub>2</sub>D προκαλεί ΙΥΑ και αυξημένο οστικό ανασχηματισμό δηλ. ΙΥΑ τύπου Αποδόμησης των Οστών

Παρότι δεν είναι πρακτική η ταξινόμηση κατά Pak και η διευρυμένη κατά Bataille, η ταξινόμηση επέτρεψε σε ερευνητές να αναπτύξουν μια δομημένη προσέγγιση για την

κατανόηση της ΙΥΑ. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 20 ετών, αυτό το σύστημα ταξινόμησης έχει αναθεωρηθεί. Σήμερα γνωρίζουμε ότι η παθοφυσιολογία της ΙΥΑ είναι πολύπλοκη και δεν είναι εντελώς κατανοητή, δεδομένου ότι η απέκκριση Ca από το ουροποιητικό είναι το τελικό αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης μεταξύ τριών οργάνων: της γαστρεντερικής οδού, των οστών και των νεφρών. Αυτή η αλληλεπίδραση τροποποιείται περαιτέρω από την  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  και PTH. Συχνά, ένα πρωτογενές ελάττωμα σε ένα όργανο προκαλεί αντισταθμιστικό μηχανισμό στα υπόλοιπα δύο, όπως δευτεροπαθώς αυξημένη απορρόφηση Ca από το έντερο σε πρωτοπαθή νεφρική απώλεια. Έτσι, η ΙΥΑ είναι μια συστηματική διαταραχή της ομοιόστασης Ca κατά την μεταφορά του από το έντερο, τούς νεφρούς και τα οστά [256-259]. Αυτά τα τρία όργανα πιθανόν να δρουν από κοινού ως ένα ενιαίο σύστημα.

Σε αυξημένη εντερική πρόσληψη Ca, αυξάνεται φυσιολογικά η απέκκριση του στα ούρα, όπως και σε υγιή άτομα. Ωστόσο, σε ασθενείς με ΙΥΑ, το Ca στα ούρα είναι σταθερά υψηλότερο σε οποιοδήποτε επίπεδο απορρόφησης του Ca από το έντερο. Σε μελέτες με ελεγχόμενες δίαιτες, φαίνεται ότι η απέκκριση του Ca στα ούρα είναι συχνά υψηλότερη από την εντερική απορρόφηση, πράγμα που σημαίνει ότι ποσότητα από το Ca ούρων προέρχεται από τα οστά. Ασθενείς με ΙΥΑ βρίσκονται σε κίνδυνο απώλειας Ca από τα οστά και της επιμετάλλωσης τους υπό εξαιρετικά χαμηλή διαίτα σε Ca [249].

Η υψηλότερη απέκκριση Ca στα ούρα σε ασθενείς με ΙΥΑ και λιθίαση αποδίδεται σε χαμηλότερη επαναρρόφηση Ca στο PCT και DCT συγκριτικά με υγιείς μάρτυρες [260, 261]. Άλλες μελέτες αναφέρουν διαταραχές επαναρρόφησης του Ca στο PCT και TALH [32, 262, 263].

Ασθενείς με νεφρικού τύπου ΙΥΑ μπορεί να έχουν ελαφρώς μειωμένα επίπεδα Pi στον ορό και ίσως στο 15-20% αρκετά χαμηλά. Η νεφρική απώλεια του Pi, μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα της  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  και έτσι την εντερική απορρόφηση του Ca [263, 264].

Ένας πιθανός παθοφυσιολογικός μηχανισμός της ομοιόστασης του Ca στην ΙΥΑ είναι μια τροποποιημένη απάντηση των ιστών στη VitD. Μελέτες έχουν υποστηρίξει την άποψη ότι η αυξημένη ιστική απάντηση στη VitD μπορεί να αναπαράξει όλους τους παθογενετικούς μηχανισμούς της ΙΥΑ: την αυξημένη εντερική απορρόφηση του Ca, την μειωμένη νεφρική επαναρρόφηση και την αυξημένη κινητοποίηση του Ca από τα οστά [265, 266]. Η αυξημένη ιστική απόκριση στη VitD θα μπορούσε να αποδοθεί στην ίδια την  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  ορού, στον υποδοχέα της ή σε άλλους παράγοντες. Ασθενείς με ΙΥΑ μπορεί να έχουν υψηλά επίπεδα

1,25(OH)<sub>2</sub>D. Χορήγηση 1,25(OH)<sub>2</sub>D σε υγιείς ανθρώπους μπορεί να προκαλέσει συμπτώματα παρόμοια με την κλινική εικόνα της ΙΥΑ [267].

Έχει δημιουργηθεί ένα μοντέλο αρουραίου με ΥΑ, που έχει ονομαστεί ο γενετικά υπερασβεστιουρικός αρουραίος που σχηματίζει λίθους (genetic hypercalciuric stoneforming rat, GHS). Αυτοί οι αρουραίοι, εμφανίζουν μια γενικευμένη διαταραχή της ομοιόστασης Ca, που είναι παρόμοια με εκείνη των ανθρώπων με υπερασβεστιουρικούς λίθους. Όταν τίθενται σε χαμηλή σε Ca διαίτα, απεκκρίνουν περισσότερο Ca από ότι απορροφούν, υποδεικνύοντας απώλεια μετάλλων από τα οστά [268]. Αντίθετα με πολλούς ανθρώπους με ΙΥΑ, τα επίπεδα της 1,25(OH)<sub>2</sub>D είναι φυσιολογικά σε GHS αρουραίους. Έχουν βρεθεί στα οστά, τους νεφρούς και το έντερο σημαντικά υψηλότερα επίπεδα υποδοχέων της VitD (Vitamin D Receptors, VDR), σε σύγκριση με φυσιολογικούς αρουραίους, που θα μπορούσαν να εξηγήσουν την αυξημένη ευαισθησία των ιστών στην 1,25(OH)<sub>2</sub>D [269]. Στο έντερο των GHS, όταν χορηγήθηκαν μικρές δόσεις 1,25(OH)<sub>2</sub>D, παράχθηκαν αυξημένα επίπεδα προϊόντων μεταγραφής γονιδίων που επάγονται από την VitD, όπως των πρωτεϊνών TRPV6 και καλβιδίνης, που σχετίζονται με την μεταφορά του Ca [270]. Επίσης, έχουν καταγραφεί αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης και mRNA του γονιδίου CaSR σε νεφρούς GHS αρουραίων σε σύγκριση με μάρτυρες αρουραίους, που ακολούθησαν την ίδια διαίτα [271].

Είναι ασαφές αν ο αριθμός των VDR υποδοχέων είναι αυξημένος σε κάποιους ασθενείς με ΙΥΑ. Οι Favus και συν. μελέτησαν τους VDR σε μονοκύτταρα αίματος από 10 άρρενες ασθενείς με ΙΥΑ και λιθίαση, σε σύγκριση με αντίστοιχης ηλικίας μάρτυρες. Τα επίπεδα των VDR ήταν διπλάσια στους ασθενείς με ΙΥΑ, ενώ τα επίπεδα της 1,25(OH)<sub>2</sub>D στον ορό δε διέφεραν [272]. Τα αυξημένα επίπεδα των VDR θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε αυξημένη απάντηση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D στους ιστούς, παρά τα συγκρίσιμα επίπεδα ορού της ορμόνης. Ωστόσο, κατά πόσον η έκφραση των VDR στα μονοκύτταρα αντανακλά και τα επίπεδα των ιστικών VDR δεν είναι γνωστό.

### ***Οστική νόσος στην ιδιοπαθή υπερασβεστιουρία***

Υπάρχουν αναφορές από τέσσερις δεκαετίες τουλάχιστον ότι ενήλικες ασθενείς με ΙΥΑ και ουρολιθίαση εμφανίζουν μειωμένη ΟΠ με αυξημένο οστικό ανασχηματισμό [21].

Μελέτες σε παιδιά ξεκίνησαν το 1982 με τους Stapleton και συν. [273]. Οι ερευνητές αξιολόγησαν την επιμετάλλωση των οστών σε παιδιά με νεφρικού και απορροφητικού τύπου ΙΥΑ και διαπίστωσαν κατά μήκος αύξηση του σκελετού παρόμοια και στις δύο ομάδες [273,

274]. Οι ίδιοι συγγραφείς το 1989 μελέτησαν την ΟΠ σε 76 παιδιά με ΙΥΑ και μια ομάδα ελέγχου. Δεν βρήκαν σημαντικές διαφορές στην ΟΠ μεταξύ των ασθενών και υγιών μαρτύρων ή μεταξύ των ασθενών με νεφρική και απορροφητική ΥΑ. Ομοίως, δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ ΟΠ, ΡΤΗ και ΟC [250].

Στις αρχές του '90, νεότερες μελέτες έδειξαν την ύπαρξη διαταραχών στα οστά σε παιδιά με ΙΥΑ. Οι Perrone και συν. το 1992 ανακοίνωσαν μια προοπτική μελέτη με 20 παιδιατρικούς ασθενείς με απορροφητικού τύπου ΙΥΑ, που τέθηκαν σε δίαιτα με περιορισμό του Ca και συγκρίθηκαν με ομάδα ασθενών που δεν τέθηκαν σε δίαιτα. Η ομάδα των ασθενών που ακολούθησαν δίαιτα χαμηλή σε Ca μείωσαν την ΥΑ και βελτίωσαν την ΟΠ της οσφυϊκής μοίρας της σπονδυλικής στήλης (ΟΜΣΣ). Αντίθετα οι ασθενείς της ομάδας σε δίαιτα χωρίς περιορισμό του Ca δεν εμφάνισαν μείωση της ΥΑ ούτε βελτίωση της ΟΠ [275].

Το 1997 οι García-Nieto και συν. ανακοίνωσαν μελέτη όπου αξιολογήθηκαν, σε 73 παιδιά λευκής φυλής με ΙΥΑ, η ΟΠ της ΟΜΣΣ καθώς και δείκτες οστικής παραγωγής και απορρόφησης. Οι ασθενείς είχαν αυξημένα επίπεδα της 1,25(OH)<sub>2</sub>D και της ΟC στον ορό όπως και Mg και προσταγλανδίνης E<sub>2</sub> στα ούρα. Αντίθετα, είχαν μειωμένη σωληναριακή επαναρρόφηση του Pi, απέκκριση αμμωνίου και ΟΠ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Οστεοπενία εμφάνισαν το 30% των ασθενών. Η ΟΠ σχετίστηκε αρνητικά με την ηλικία, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα παιδιά με ΙΥΑ εμφανίζουν προοδευτική οστική απώλεια άγνωστης αιτιολογίας [23].

Οι Freundlich και συν., εξετάζοντας το ενδεχόμενο ότι η μέγιστη οστική μάζα και η τελικά επιτεύξιμη οστική μάζα των ενηλίκων μπορεί να καθορίζεται γενετικά, μελέτησαν την ΟΠ της ΟΜΣΣ και του μηριαίου οστού (ΜΟ) και δείκτες οστικής απορρόφησης (DPD, ΡΥD και τελοπεπτίδια) σε 21 παιδιά με ΙΥΑ και στις προεμμηνοπαυσιακές τους μητέρες. Βρέθηκε οστεοπενία σε 38% των παιδιών και 33% των μητέρων τους. Επίσης το 57% των ζευγαριών μητέρας-γιού και το 70% των ασυμπτωματικών μητέρων, που διαγνώστηκαν στην συνέχεια με ΙΥΑ, εμφάνισαν οστεοπενία. Δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της νεφρικής απέκκρισης Ca και της ΟΠ. Οι δείκτες οστικής απορρόφησης ήταν αυξημένοι στο 57% των μητέρων με οστεοπενία [26].

Οι García-Nieto και συν. [276] το 2003, αξιολόγησαν την ΟΠ 40 κοριτσιών με ΙΥΑ και των προεμμηνοπαυσιακών μητέρων τους από τις οποίες είχαν κληρονομήσει την νόσο. Στο 42,5% των κοριτσιών βρέθηκε Z-score<-1 στην ΟΜΣΣ, ενώ στο 47,5% των μητέρων παρατηρήθηκε Z-score<-1 ΟΜΣΣ και/ή αυχένα του ΜΟ και T-score<-1 ΟΜΣΣ και/ή αυχένα

του ΜΟ στο 62,5% των μητέρων. Το Z-score στα κορίτσια μητέρων με οστεοπενία ήταν σημαντικά χαμηλότερο ή υπήρχε μια τάση για χαμηλότερη τιμή από ό, τι στα κορίτσια των μητέρων με φυσιολογική ΟΠ. Υπήρξε μια σημαντική συσχέτιση μεταξύ του Z-score των κοριτσιών και του T-score των μητέρων στην ΟΜΣΣ ( $r=0,32$ ,  $p<0,05$ ). Αυτά τα αποτελέσματα όχι μόνο συσχετίζουν την ΥΑ με την χαμηλή ΟΠ στα παιδιά, αλλά, παρόμοια με τα ευρήματα των Freundlich και συν. [26], υποστηρίζουν ότι γενετικοί παράγοντες επηρεάζουν επίσης σημαντικά την ΟΠ.

Οι Penido και συν., το 2003, σε μελέτη με 88 παιδιά με ΙΥΑ βρήκαν μειωμένη ΟΠ στο 35% αυτών και την απέδωσαν σε αυξημένο οστικό ανασχηματισμό, μετρώντας ως δείκτη οστικής απορρόφησης την απέκκριση του NTX-I στα ούρα και ως δείκτη οστικής παραγωγής την OC στον ορό [243].

Οι Skalona και συν. [24] το 2005 εξέτασαν 15 παιδιά με ΙΥΑ και βρήκαν σημαντικά χαμηλότερη την ΟΠ της ΟΜΣΣ από τις τιμές αναφοράς υγιούς ευρωπαϊκού παιδιατρικού πληθυσμού. Το 40% των ασθενών είχαν  $-1SD > Z\text{-score} > -2SD$  και 20% των ασθενών είχαν  $Z\text{-score} < -2SD$ . Επιπλέον, οι συγγραφείς βρήκαν μια σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ της ΟΠ και του Ca ούρων 24ώρου.

Το 2006 οι Penido και συν. μελέτησαν 88 παιδιά και εφήβους με ΙΥΑ, 44 με ιδιοπαθή υποκιτρουρία και 44 χωρίς. Διαπίστωσαν ότι οι ασθενείς με ιδιοπαθή υποκιτρουρία είχαν σημαντικά χαμηλότερο βάρος, ύψος, δείκτη μάζας σώματος (ΔΜΣ), οστική ηλικία και μεγαλύτερη μείωση της ΟΠ απουσία μεταβολικής οξέωσης. Οι συγγραφείς συμπέραναν ότι η συνύπαρξη ιδιοπαθούς υποκιτρουρίας με ΙΥΑ στα παιδιά επηρεάζει περαιτέρω αρνητικά την αύξηση [244].

Σε μια αναδρομική μελέτη με 110 παιδιά με ΙΥΑ ή/και λιθίαση μετρήθηκε η ΟΠ. Οι ασθενείς διακρίθηκαν σε ομάδα με χαμηλή ΟΠ και με φυσιολογική ΟΠ, καθώς και σε ομάδα ΥΑ ή/και νεφρολιθίασης. Συνολικά, το 47% είχε ΟΠ με  $Z < -1$  και το 26%  $Z < -2$ . Οι ασθενείς με χαμηλή ΟΠ είχαν υψηλότερο ΔΜΣ και μικρότερη απέκκριση Cre και αμμωνίου στα ούρα συγκριτικά με εκείνους με φυσιολογική ΟΠ. Οι ασθενείς με νεφρολιθίαση είχαν χαμηλότερη ΟΠ συγκριτικά με τους ασθενείς με ΥΑ χωρίς νεφρολιθίαση [25].

Οι Penido MG και συν. το 2012 μελέτησαν την οστική μάζα 80 παιδιών με ΙΥΑ, μετρώντας την ΟΠ της ΟΜΣΣ με DEXA και αξιολόγησαν το Z-score πριν και μετά τη θεραπεία με κιτρικά άλατα και θειαζίδες, για μέσο διάστημα 6 ετών. Η μέση απέκκριση Ca 24ώρου μειώθηκε από 5,0 mg/kg πριν την αγωγή σε 2,6mg/kg μετά. Η ΟΠ αυξήθηκε από

0,721±0,175 g/cm<sup>2</sup> σε 0,845±0,170 g/cm<sup>2</sup>, (p<0.00001). Το Z-score της ΟΠ μεταβλήθηκε επίσης σημαντικά από -0,763±0.954 σε -0,537±0.898 (p<0.0001). Οι συγγραφείς κατέδειξαν το ευεργετικό αποτέλεσμα της θεραπείας σε αυτούς τους ασθενείς [277].

Οι Artemiuk και συν. το 2015 δημοσίευσαν μελέτη με 31 παιδιά και εφήβους με ΙΥΑ, που ακολουθούσαν ελεύθερη δίαιτα με κατάλληλη ποσότητα Ca και δεν προσελάμβαναν VitD ή συμπλήρωμα κιτρικών. Μέτρησαν μειωμένη ΟΠ ΟΜΣΣ με Z-score <-1 στο 25,8% των παιδιών και επίπεδα 25OHD<sub>3</sub> στον ορό <20 ng/mL σε 71% των παιδιών. Οι συγγραφείς συσχέτισαν θετικά την μειωμένη ΟΠ με ανεπάρκεια της 25OHD<sub>3</sub> σε ασθενείς με ΙΥΑ [278].

### **Παθοφυσιολογία Οστικής Διαταραχής στην Ιδιοπαθή Υπερασβεστιουρία**

Έχουν πραγματοποιηθεί λίγες ιστομορφομετρικές μελέτες οστού με βιοψία σε ασθενείς με ΙΥΑ και μόνο σε ενήλικες. Τα αποτελέσματα από τις βιοψίες οστού είναι διαφορετικά, χωρίς να καταλήγουν σε ομοφωνία. Από τις ιστολογικές εικόνες στις περισσότερες περιπτώσεις διαπιστώνεται να είναι μειωμένη η οστική παραγωγή, ενώ η οστική απορρόφηση φυσιολογική ή οριακά αυξημένη. Ωστόσο, υπάρχουν εξαιρέσεις όπως φαίνεται σε ασθενείς με ΥΑ νηστείας και δευτεροπαθή υπερπαραθυρεοειδισμό, όπου τόσο η οστική απορρόφηση όσο και η παραγωγή είναι αυξημένες, δηλ. παρατηρείται αυξημένος οστικός ανασχηματισμός [279-286].

Τα ευρήματα από τις ιστομορφομετρικές μελέτες έρχονται σχεδόν σε αντίθεση με εκείνα, που αναφέρονται σε μελέτες με δείκτες οστικού μεταβολισμού. Οι περισσότεροι συγγραφείς παρατήρησαν τόσο αυξημένα επίπεδα των δεικτών οστικής παραγωγής όσο και απορρόφησης σε υπερασβεστιουρικούς ασθενείς [287-289].

Ωστόσο, δεν έχουν υπάρξει μελέτες βιοψίας οστών σε παιδιά με ΙΥΑ και μόνο περιορισμένες μελέτες με βιοχημικούς δείκτες οστικού μεταβολισμού [23]. Όταν αξιολογήθηκαν, οι συγκεντρώσεις των δεικτών οστικού μεταβολισμού ήταν μη συγκρίσιμες μεταξύ των μελετών [23, 26, 243].

Οι μελέτες του μεταβολισμού των οστών περιπλέκονται από το γεγονός ότι οι παιδιατρικοί ασθενείς εξακολουθούν να αυξάνονται και τα δεδομένα πρέπει, συνεπώς, να συγκρίνονται με ομάδα ελέγχου αντίστοιχης ηλικίας και φύλου. Επιπλέον, υπάρχει μία σημαντική ημερήσια διακύμανση των συγκεντρώσεων των βιοχημικών δεικτών, που απαιτεί λήψη δείγματος σε ίδιους χρόνους κατά τη διάρκεια της ημέρας.

## Διατροφή και Ιδιοπαθής Υπερασβεστιουρία

Η διατροφή επηρεάζει την απέκκριση Ca στα ούρα σε φυσιολογικά άτομα και σε πάσχοντες με ΙΥΑ. Είναι γνωστή η αυξανόμενη τάση εμφάνισης ουρολίθων, που έχει σημειωθεί στο δυτικό κόσμο τις τελευταίες δεκαετίες, που σχετίζεται μάλλον περισσότερο με τη διατροφή παρά με την κληρονομικότητα [290-294]. Αρκετά κοινά στοιχεία της δυτικού τύπου διατροφής μπορεί να αυξήσουν την απέκκριση Ca στα ούρα.

- Na

Η αυξημένη πρόσληψη Na συνοδεύεται από αυξημένη απέκκριση Ca στα ούρα. Σε υγιή άτομα το Ca ούρων αυξάνει περίπου 2,4 mg/ημέρα για κάθε αύξηση της απέκκρισης κατά 100 mEq/ημέρα Na [16]. Οι ασθενείς με ΙΥΑ έχουν υψηλότερη απέκκριση Ca σε οποιαδήποτε δεδομένη απέκκριση Na, σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες [295]. Μείωση της πρόσληψης άλατος θα μειώσει την αποβολή Ca, αλλά η υψηλή πρόσληψη Na σπάνια είναι η μοναδική αιτία της ΙΥΑ.

- Πρωτεΐνη

Αυξημένη πρόσληψη πρωτεΐνης θα αυξήσει επίσης την απέκκριση του Ca στα ούρα περίπου κατά 0,16 mg για κάθε g πρόσληψης πρωτεΐνης σε υγιείς άνδρες και γυναίκες [16]. Ο μεταβολισμός των προσλαμβανόμενων πρωτεϊνών δημιουργεί ένα φορτίο οξέος, λόγω της οξείδωσης του οργανικού θείου των αμινοξέων σε θειικό, οδηγώντας σε αυξημένη απέκκριση καθαρού οξέος και Ca. Η χορήγηση αλκάλειου μειώνει τόσο το καθαρό οξύ όσο και την απέκκριση Ca [296]. Η αύξηση της παραγωγής καθαρού οξέος αναστέλλει τη νεφρική σωληναριακή επαναρρόφιση του Ca. Μελέτες σε ποντίκια έχουν δείξει ότι η επαγωγή της οξέωσης οδηγεί σε μειωμένη έκφραση των διαύλων Ca TRPV5 στο DCT. Σε ποντίκια που αδρανοποιήθηκε το γονίδιο TRPV5 δεν παρατηρήθηκε αύξηση της απέκκρισης Ca με οξέωση [297]. Ωστόσο, το Ca ούρων είναι υψηλότερο σε ασθενείς με ΙΥΑ από ό, τι σε φυσιολογικά άτομα σε συγκρίσιμα επίπεδα απέκκρισης οξέος υποδηλώνοντας ότι η υψηλή πρόσληψη πρωτεϊνών επιδεινώνει, αλλά συνήθως δεν προκαλεί την ΙΥΑ.

- Γλυκόζη, σακχαρόζη και αιθανόλη

Ταχέως μεταβολιζόμενοι υδατάνθρακες, όπως γλυκόζη, σακχαρόζη, αλλά και αιθανόλη προκαλούν αυξημένη απέκκριση Ca στα ούρα λόγω μειωμένης επαναρρόφισης Ca και Mg [298], ενώ σε ασθενείς με ΙΥΑ φαίνεται να υπάρχει μια υπερβολική ασβεστιουρική απόκριση σε φορτίο υδατανθράκων [299]. Η απέκκριση Na στα ούρα μειώνεται σημαντικά σε αυξημένη πρόσληψη υδατανθράκων [300]. Η αύξηση της απέκκρισης Ca, που



παρατηρείται με την πρόσληψη γλυκόζης, είναι πρόσθετη σε αυτή που προκαλείται από οξέωση, δείχνοντας ένα διαφορετικό σημείο δράσης [301], που δεν αποδίδεται σε αυξημένη απορρόφηση Ca από το έντερο. Η ινσουλίνη εμπλέκεται πιθανά στη νεφρική σωληναριακή επαναρρόφηση του Ca [302]. Ασθενείς με ασβεστούχους ουρόλιθους αλλά και συγγενείς τους έχουν μια υπερβολική ασβεστιουρική απόκριση σε φορτίο γλυκόζης σε σύγκριση με υγιείς, γεγονός που υποδηλώνει μια διαταραχή λειτουργίας των νεφρικών σωληναρίων που μπορεί να είναι γενετικής προέλευσης [299, 303].

### **Αντιμετώπιση Ιδιοπαθούς Υπερασβεστιουρίας στα παιδιά**

Στόχος της αντιμετώπισης της ΥΑ αποτελεί η μείωση της απέκκρισης του Ca στα ούρα, ώστε να μειωθεί ο υπερκορεσμός αλάτων Ca και η πιθανότητα ανάπτυξης νεφρασβέστωσης και λίθου. Ωστόσο με την διόρθωση της ΥΑ αποκαθίσταται το ισοζύγιο του Ca στον οργανισμό, αποτρέπεται η απώλεια του Ca από τα οστά και επιτυγχάνεται η βέλτιστη ΟΠ.

Η θεραπευτική προσέγγιση της ΙΥΑ στα παιδιά περιλαμβάνει σαν πρώτο βήμα την εφαρμογή κατάλληλης διαίτας. Η διαίτα ακολουθείται τουλάχιστον για 3 μήνες και στην συνέχεια γίνεται επανέλεγχος των επιπέδων Ca στα ούρα. Επί αποτυχίας των διαιτητικών τροποποιήσεων, να ομαλοποιήσουν την απέκκριση Ca στα ούρα και/ή επιμονής των συμπτωμάτων που αποδίδονται στην ΥΑ, συνιστάται εξατομικευμένη φαρμακευτική αντιμετώπιση [240, 304].

### **Διαιτητική θεραπεία της ΙΥΑ στα παιδιά**

Η πρόσληψη άφθονης ποσότητας νερού και υγρών μειώνουν τον υπερκορεσμό των κρυστάλλων Ca στα ούρα, προστατεύουν από το σχηματισμό λίθων [305] και αποτρέπουν τον κίνδυνο υποτροπής σε ασθενείς με οποιοδήποτε είδος ουρόλιθου [306]. Οι Siener και συν. συνιστούν χορήγηση υγρών  $>1,5-2 \text{ L/m}^2/24\omega\rho\omicron$  (ακόμη και την νύχτα), ώστε να επιτυγχάνεται ειδικό βάρος ούρων  $<1010$  σε κάθε τύπο ουρολιθίασης [307] και διούρηση  $>1 \text{ ml/Kg/h}$ , ιδανικά  $2-3 \text{ ml/Kg/h}$ .

1. Συνιστάται πρόσληψη κατάλληλης ποσότητας Ca για την ηλικία και όχι περιορισμός Ca στα παιδιά με ΙΥΑ καθώς:

- θέτει τον αυξανόμενο οργανισμό σε κίνδυνο για αρνητικό ισοζύγιο του Ca και φτωχή επιμετάλλωση των οστών

- αυξάνει την απέκκριση οξαλικών στα ούρα, αυξάνοντας την απορρόφηση τους από το γαστρεντερικό [18]
- μπορεί να αυξήσει την απέκκριση του Ca στα ούρα επάγοντας την αύξηση των επιπέδων 1,25(OH)<sub>2</sub>D [308]

Διατροφή με 1 g/ημέρα Ca επάγει μια σημαντική αύξηση 20% της απέκκρισης Ca στα ούρα, που διαρκεί μόνο 3 ημέρες σε παιδιά με λίθους, σε σύγκριση με περιορισμό του Ca (400 mg/ημέρα). Μετά την περίοδο αυτή, η απέκκριση Ca επιστρέφει στα βασικά επίπεδα [304]. Από την άλλη πλευρά, η πρόσληψη υπερβολικών ποσοτήτων Ca (π.χ. πάνω από 2000 mg), παρά την προστατευτική επίδραση στην απορρόφηση των οξαλικών, μπορεί να προάγει την υπερασβεστιαμία, ΥΑ και το σχηματισμό λίθου [245]. Έτσι η πρόσληψη κατάλληλης ποσότητας Ca για την ηλικία αποτελεί την χρυσή τομή (Πίνακας 3).

2. Υπάρχει άμεση θετική συσχέτιση μεταξύ της απέκκρισης στα ούρα Na και Ca και αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ K και Ca. Οι Srivastava και Schwaderer συστήνουν μια δίαιτα όχι υπερβολική σε αλάτι (2,0-2,4 g Na/ημέρα), συμπληρωμένη με την ημερήσια πρόσληψη των 5-6 μερίδων φρούτων και λαχανικών (3,0-3,5 g K/ημέρα). Η συμμόρφωση με αυτές τις διατροφικές συστάσεις μπορεί να εκτιμηθεί από τα ούρα μετρώντας τον λόγο Na/K ούρων, που θα πρέπει να είναι μικρότερος από 2,5 [18].

3. Η ιδανική ημερήσια πρόσληψη Na ποικίλει ανάλογα με την ηλικία: 1,2 g για παιδιά 4-8 ετών, 1,5 g για άτομα ηλικίας 9-18 ετών. Το αντίστοιχο ανώτερο όριο είναι 1,9 g και 2,3 g [309].

4. Αυξημένη πρόσληψη πρωτεϊνών αυξάνει την καθαρή απέκκριση οξέος, η οποία με τη σειρά της αυξάνει την απέκκριση του Ca στα ούρα [310]. Δεν συνιστάται περιορισμός διαιτητικής πρόσληψης πρωτεϊνών στα παιδιά, καθώς θα επηρέαζε την αύξηση, αλλά πρόσληψη κατάλληλης ποσότητας πρωτεϊνών (1,5-2,2 gr/Kg/ημέρα) [311].

5. Αυξημένη πρόσληψη ωμέγα-3 λιπαρών οξέων και φυτικών ινών μειώνουν την απέκκριση Ca [304].

### ***Αντιασβεστιουρικά σκευάσματα – φάρμακα***

#### *Κιτρικό Κάλιο (potassium citrate)*

Η θεραπεία πρώτης γραμμής στην ΙΥΑ στα παιδιά είναι το κιτρικό κάλιο, διότι αποτελεί συμπλήρωμα και όχι φάρμακο [18, 312]. Η θεραπεία με κιτρικά άλατα μειώνει το

προσλαμβανόμενο με την διατροφή φορτίο οξέος, προάγει την επαναρρόφηση του Ca στο PCT επιτυγχάνοντας την μείωση της απέκκρισης του Ca στα ούρα και αυξάνει το pH ούρων [262]. Τα κιτρικά σχηματίζουν σύμπλοκα άλατα με το Ca στα ούρα μειώνοντας έτσι τον κορεσμό οξαλικού Ca και αναστέλλοντας την συσσώρευση αλάτων Ca, που αποτελούν τη βάση για τον σχηματισμό λίθων οξαλικού Ca [313]. Η αγωγή με κιτρικά μειώνει τις υποτροπές σε παιδιά με ΙΥΑ και ουρολιθίαση [314].

Η δόση των κιτρικών αλάτων είναι 1-2 mEq Καλίου/kg/day διαιρεμένη σε 3 δόσεις. Δόση κιτρικών >1 mEq Καλίου/kg/day μπορεί να αυξήσει πολύ το pH των ούρων [315]. Απαιτείται παρακολούθηση του pH ούρων (με pHμετρία παρά με ταινία εμβύθισης), καθώς τα πολύ αλκαλικά ούρα μπορεί να προδιαθέσουν σε σχηματισμό λίθων φωσφορικού Ca. Πέραν αυτού δεν υπάρχουν ανεπιθύμητες ενέργειες από την χρήση των κιτρικών.

Μελέτες έχουν δείξει ότι η χορήγηση αλκάλων μειώνει τις συνέπειες οστικής αποδόμησης από την περίσσεια οξέος σε υγιείς άνδρες και γυναίκες με ΙΥΑ χωρίς νεφρολιθίαση [316, 317]. Άλλες μελέτες που αφορούν διαφορετικούς πληθυσμούς ασθενών με νεφρολιθίαση έχουν επίσης δείξει βελτίωση της ΟΠ ή θετικό ισοζύγιο Ca μετά την θεραπεία με κιτρικό K [318]. Οι μηχανισμοί αναστολής της αποδόμησης του οστού με τους οποίους δρουν τα κιτρικά και βελτιώνουν την οστική μάζα περιλαμβάνουν την μείωση της ασβεστιουρίας και την παράταση της δραστηριότητας των OB [319].

#### *Αντιασβεστιουρικά Διουρητικά (Anticalciuric diuretics)*

Τα θειαζιδικά διουρητικά έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε παιδιά με ΥΑ και νεφρολιθίαση, καθώς μειώνουν την απέκκριση Ca στα ούρα. Ενδείκνυται η χλωροθειαζίδη (15-25 mg/kg/ημέρα) και η υδροχλωροθειαζίδη (0,5-2,0 mg/kg/ημέρα). Η χορήγηση σε 2 δόσεις έχει καλύτερη δράση [315]. Ο ακριβής μηχανισμός δράσης των θειαζιδικών διουρητικών στην ΥΑ δεν είναι γνωστός, ωστόσο πιστεύεται ότι η συστολή του όγκου, που προκαλείται από τις θειαζίδες, αυξάνει την επαναρρόφηση Ca παθητικά στο PCT. Ωστόσο, θεωρείται πιθανή και μια ενεργός μεταφορά Ca στο DCT [320]. Επίσης οι θειαζίδες φαίνεται να μειώνουν την απορρόφηση του Ca και του Pi από το γαστρεντερικό, με ασαφή μηχανισμό.

Τα θειαζιδικά διουρητικά πέραν της αντιασβεστιουρικής δράσης, διεγείρουν την παραγωγή των OB [321] και αναστέλλουν την διαφοροποίηση των ΟΚΛ [322]. Στις παρενέργειες της μακροχρόνιας χρήσης περιλαμβάνονται η υποκαλιαιμία, διαταραχή στην

ανοχή της γλυκόζης και μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη, δυσλιπιδαιμία και υπερουριχαιμία [25, 277, 323].

Ωστόσο, εξακολουθεί να παραμένει αμφιλεγόμενο το χρονικό διάστημα χορήγησης τους, καθώς και η κατάλληλη δοσολογία [324].

Τα θειαζιδικά διουρητικά και το κιτρικό κάλιο μπορεί να συγχορηγηθούν.

*Άλλα σκευάσματα - φάρμακα*

Ουδέτερα φωσφορικά άλατα συνιστώνται σε παιδιά με ΙΥΑ και απώλεια Ρ από τα νεφρικά σωληνάκια [18].

Τα διφωσφονικά έχουν αποδειχτεί ευεργετική θεραπεία σε ενήλικες με ΥΑ και οστεοπενία [257]. Φαίνεται ότι χορήγηση διφωσφονικών σε μικρό αριθμό παιδιών με ΥΑ και οστεοπενία μείωσε την απέκκριση Ca στα ούρα και βελτίωσε την ΟΠ, ωστόσο απαιτείται περαιτέρω μελέτη [325].

## **Γενετική και Ιδιοπαθής Υπερασβεστιουρία**

Ποσοστό 5-20% των παιδιών με ΙΥΑ χωρίς νεφρολιθίαση και 35-65% των παιδιών με ΙΥΑ και νεφρολιθίαση έχουν οικογενειακό ιστορικό νεφρολιθίασης [326-328].

Μελέτες σε οικογένειες και σε διδύμους έδειξαν ότι η ΙΥΑ έχει πολυγονιδιακό υπόστρωμα κληρονομικότητας, με μη μεντελικό τρόπο μετάδοσης και διαφορετική διεισδυτικότητα. Πέραν της κληρονομικότητας και περιβαλλοντικοί παράγοντες αλληλεπιδρούν για την δημιουργία λίθου. Ο ρόλος του περιβάλλοντος έχει καλά τεκμηριωθεί από τον Trinchieri, που έδειξε ότι η αλλαγή στις διατροφικές συνήθειες άλλαξαν και την συχνότητα και την χημική σύσταση των λίθων [328-331].

### **Συσχετιζόμενα Γονίδια**

Οι Arcidiacono και συν. σε ανασκόπηση, το 2014, συνόψισαν τα γονίδια που εκφράζονται στο νεφρό και σχετίζονται με ιδιοπαθή λιθίαση από ασβεστούχους λίθους. Σε μελέτες ασθενών-μαρτύρων συσχετίστηκαν πολυμορφισμοί 11 γονιδίων. Πέντε γονίδια ταυτοποιήθηκαν σε πολλαπλές μελέτες γονιδίων (Πίνακας 4). Οι άλλοι 6 επίτοποι ταυτοποιήθηκαν σε μελέτες συσχέτισης γονιδιώματος (genome-wide association studies, GWASs) με χαρτογράφηση ολόκληρου του γονιδιώματος (Πίνακας 5) [332].

Άλλα γονίδια, που εμπλέκονται στην εμφάνιση της ΙΥΑ, παρότι δεν έχει αποδειχτεί συσχέτιση με νεφρολιθίαση, είναι της διαλυτής αδενυλικής κυκλάσης 10 (soluble Adenylate cyclase 10) [333] και των TRPV5 και TRPV6 [334].

Τα συσχετιζόμενα με την ΙΥΑ γονίδια κωδικοποιούν κυτταρικούς και αυξητικούς παράγοντες που μπορεί να εμπλέκονται στον οστικό μεταβολισμό, κολλαγονούχα ή μη κολλαγονούχα προϊόντα της θεμέλιας ουσίας των οστών, ασβεστιοτρόπες ορμόνες και τους υποδοχείς τους ή επηρεάζουν παράγοντες κατακρήμνισης αλάτων Ca [335].

**Πίνακας 4.** Γονίδια και Πολυμορφισμοί που σχετίζονται με Ιδιοπαθή Υπερασβεστιουρία και νεφρολιθίαση, που προσδιορίστηκαν σε μελέτες αναπαραγωγής των γονιδίων [332].

<b>Γονίδιο</b>	<b>Κωδικοποιούμενη πρωτεΐνη</b>	<b>Επίτοπος</b>	<b>Συσχετιζόμενοι Πολυμορφισμοί</b>
<b>CaSR</b>	Calcium-sensing receptor	3q21.1	rs6776158 in the promoter 1 rs7652589 in 5'-UTR rs1501899 in intron 1
<b>VDR</b>	Vitamin D receptor	12q12–14	rs10735810 of start codon rs1544410 and rs7975232 in intron 8 rs731236 in exon 9
<b>SPP1</b>	Osteopontin	4q22.1	–145 and –144 in promoter –156 in promoter
<b>MGP</b>	Matrix-gla protein	12p12.3	rs4236 in the exon 4
<b>PLAU</b>	Urokinase	10q24	rs4065 in 3'-UTR

**Πίνακας 5.** Γονίδια που σχετίζονται με Ιδιοπαθή Υπερασβεστιουρία και νεφρολιθίαση, που προσδιορίστηκαν σε μελέτες συσχέτισης γονιδιώματος με χαρτογράφηση ολόκληρου του γονιδιώματος [332].

<b>Γονίδιο</b>	<b>Κωδικοποιούμενη πρωτεΐνη</b>	<b>Επίτοπος</b>	<b>Συσχετιζόμενοι Πολυμορφισμοί</b>
<b>SLC34A3</b>	Phosphate carrier NPT2c	9q33.2–34.2	rs111875450
<b>CLDN14</b>	Claudin-14	21q22.3	rs219781 rs219778 rs219780 rs219779
<b>SLC34A1</b>	Phosphate carrier NPT2a	5q35.3	rs11746443
<b>AQP1</b>	Aquaporin 1	7p14.3	rs1000597
<b>DGKH</b>	Diacyl glycerol kinase	13q14.1	rs4142110
<b>UMOD</b>	Uromodulin	16p12.3	rs4293393

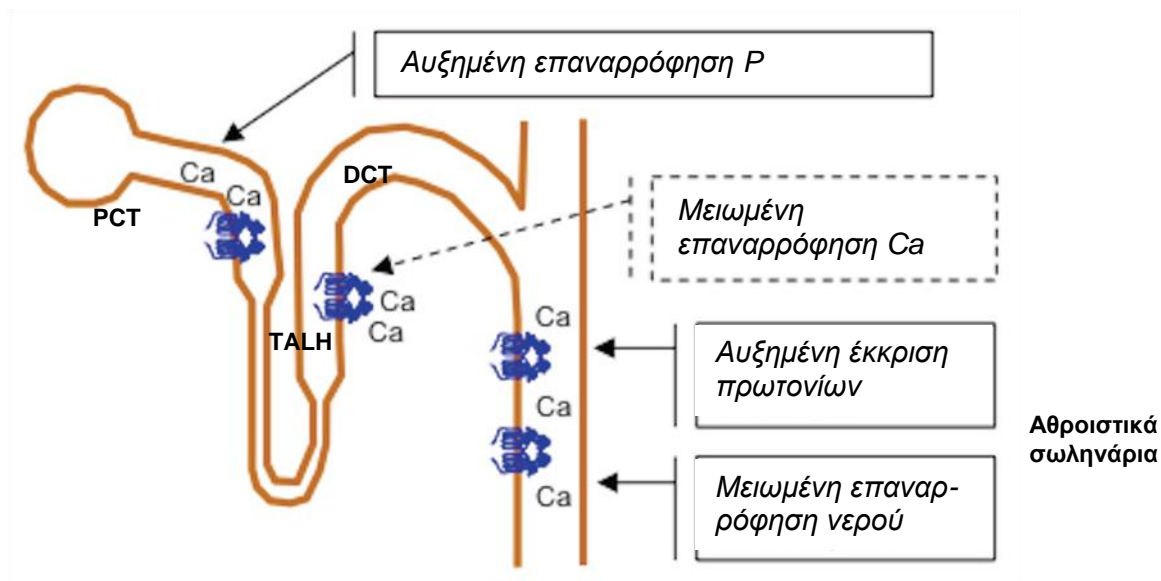
## **Το γονίδιο του ασβεστιοευαίσθητου υποδοχέα (calcium-sensing receptor, CaSR)**

Ένα από τα πλέον μελετημένα γονίδια που εμπλέκονται στην ΙΥΑ είναι το γονίδιο του CaSR. Η φυσιολογική λειτουργία του CaSR είναι η διατήρηση της ομοιόστασης του εξωκυττάριου Ca [336].

Ο CaSR εκφράζεται κυρίως στους παραθυροειδείς αδένες και στα νεφρικά σωληνάκια. Στα κύτταρα των παραθυροειδών αδένων ρυθμίζει την έκκριση της PTH, σύμφωνα με την συγκέντρωση του Ca στον ορό. Σε αύξηση της συγκέντρωσης του εξωκυττάριου Ca διεγείρεται ο CaSR, αναστέλλοντας την έκκριση της PTH και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των παραθυροειδών κυττάρων [337].

Στον νεφρό, ο CaSR εκφράζεται κυρίως στο TALH [338]. Στο TALH και στο DCT, βρίσκεται στην πλαγιοκυτταρική μεμβράνη των σωληναριακών κυττάρων, ενεργοποιείται από την συγκέντρωση του Ca στον ορό και αναστέλλει την παθητική και ενεργητική επαναρρόφηση του Ca [339] (Εικόνα 16). Για την αναστολή της παρακυτταρικής επαναρρόφησης Ca στο TALH, ο CaSR διεγείρει την έκφραση της πρωτεΐνης claudin-14 που μπλοκάρει το κανάλι Ca που δομείται από claudin-16 και claudin-19 στην παρακυτταρική σύνδεση [340, 341]. Στο TALH, ο CaSR μειώνει επίσης την δραστηριότητα των συμμεταφορέων Na-K-2Cl συμβάλλοντας στην συντήρηση της ηλεκτρικής διαβάθμισης που ενεργοποιεί την επαναρρόφηση του Ca παρακυτταρικά [342]. Ο CaSR αναστέλλει επίσης την ενεργή επαναρρόφηση του Ca στα φλοιικά εσπειραμένα σωληνάκια [339].

Στα CD και στα PCT ο CaSR εκφράζεται στην ψηκτροειδή μεμβράνη (Εικόνα 16). Στα CD διεγείρεται από την αύξηση της συγκέντρωσης του Ca στο σωληναριακό υγρό και προάγει την επαναρρόφηση του. Επίσης, φαίνεται ότι προάγει και την απέκκριση νερού και την οξינוποίηση των ούρων, μέσω της αναστολής της απόκρισης του σωληναριακού κυττάρου στην αντιδιουρητική ορμόνη και της διέγερσης της δραστηριότητας της αντλίας πρωτονίων, αντίστοιχα [343]. Στα PCT ο CaSR διεγείρεται από την αυξημένη συγκέντρωση του Ca και διευκολύνει την επαναρρόφηση P [344].



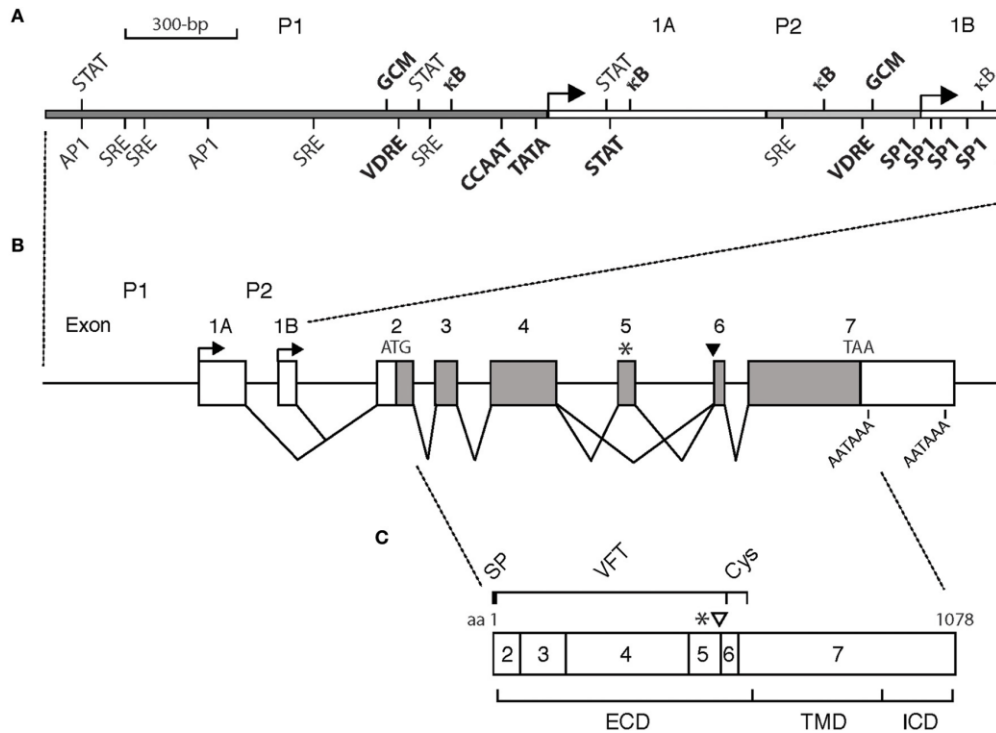
**Εικόνα 16.** Στο TALH και στο DCT, ο CaSR μειώνει την επαναρρόφηση του Ca, όταν ενεργοποιείται από αύξηση του Ca στον ορό. Στα αθροιστικά σωληνάρια και στα PCT η ενεργοποίηση του CaSR, από την αύξηση του Ca στο σωληναριακό υγρό, μπορεί να προστατεύσει από καθίζηση φωσφορικού Ca, αυξάνοντας την επαναρρόφηση του P. Με μπλε χρώμα απεικονίζεται η διαμεμβρανική πρωτεΐνη του CaSR [345].

Συνοπτικά, οι παρακρινείς δραστηριότητες του CaSR στα νεφρικά σωληνάρια, που ενεργοποιείται από αύξηση της συγκέντρωσης του Ca στο σωληναριακό υγρό, περιορίζει τον κίνδυνο κατακρήμνισης αλάτων φωσφορικού Ca και συνεπώς τον σχηματισμό λίθων φωσφορικού Ca και νεφρασβέστωσης [332]. Έτσι, μειωμένη έκφραση του CaSR στον νεφρό, διαταράσσει αυτόν τον μηχανισμό και μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο σχηματισμού λίθου φωσφορικού Ca [346].

Το ανθρώπινο γονίδιο του CaSR έχει 8 εξόνια και 2 υποκινητές, εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 3q13.3–21 και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη του CaSR, με 1078 αμινοξέα. Τα πρώτα 6 εξόνια κωδικοποιούν το μεγάλο εξωκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης και το εξόνιο 7 κωδικοποιεί το διαμεμβρανικό και το ενδοκυττάριο τμήμα (Εικόνα 17). Η πρωτεΐνη του CaSR είναι ένας συζευγμένος με G-πρωτεΐνη διαμεμβρανικός υποδοχέας. Το Ca συνδέεται στο εξωκυττάριο τμήμα, διεγείρει την αλληλεπίδραση του διαμεμβρανικού και



ενδοκυττάριου τμήματος με τις G-πρωτεΐνες. Έτσι ενεργοποιείται ένα πολύπλοκο δίκτυο ενδοκυτταρικών αγγελιοφόρων, που δραστηριοποιεί την έκφραση του γονιδίου [347].



**Εικόνα 17.** Σχηματική παράσταση (A) των υποκινητών του γονιδίου CaSR, (B) οργάνωση των εξονίων/ιντρονίων του γονιδίου CaSR και (C) η πρωτεΐνη του CaSR. (A) Υποκινητής P1 και P2, γκρι μπάρες. Εξόνιο 1A και 1B, λευκές μπάρες. Θέσεις έναρξης της μεταγραφής, βέλη. VDRE, αποκρινόμενο στοιχείο στην VitD. κB, κ-B αποκρινόμενο στοιχείο στον ενισχυτή του πυρηνικού παράγοντα των ενεργοποιημένων B κυττάρων. STAT, μετατροπέας σήματος και ενεργοποιητής της μεταγραφής. AP1, πρωτεΐνη ενεργοποιητή 1. (B) Οργάνωση εξονίων/ιντρονίων του γονιδίου CaSR. Τα εξόνια είναι σχεδιασμένα σε κλίμακα, τα ιντρόνια δεν είναι. Λευκές μπάρες: mRNA μη μεταφρασμένο. Γκρι μπάρες: πρωτεΐνη mRNA που κωδικοποιεί. ATG: κωδικόνιο έναρξης. TAA: κωδικόνιο λήξης. (C) CaSR: πρωτεΐνη 1078 αμινοξέων που κωδικοποιείται από τα εξόνια 2-7. SP, σήμα πεπτιδίου. VFT, περιοχή venus flytrap. Cys, πλούσια σε κυστεΐνη περιοχή. ECD, εξωκυττάρια περιοχή. TMD, διαμεμβρανική περιοχή. ICD, ενδοκυττάρια περιοχή [348].

Τρεις πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου, Ala986Ser (rs1801725, αλλαγή βάσης 2956 G>T, A986S), Arg990Gly (rs1042636, αλλαγή βάσης 2968 A>G, R990G) και

Gln1011Glu (rs1801726, αλλαγή βάσης 3031 C>G, Q1011E), που βρίσκονται στο εξόνιο 7, έχουν συσχετιστεί με την ΙΥΑ και την νεφρολιθίαση [349].

Οι Liu και συν., σε μια μετανάλυση, μελέτησαν την συσχέτιση των 3 πολυμορφισμών του γονιδίου CaSR με την ΙΥΑ [350] (Πίνακας 6). Από την ανάλυση προκύπτει ότι η συχνότητα των πολυμορφισμών του γονιδίου ποικίλει σημαντικά μεταξύ των πληθυσμών διαφορετικών φυλών. Τα αποτελέσματα της μετανάλυσης κατέγραψαν ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του Ca στα ούρα με τον πολυμορφισμό R990G, αλλά όχι με τον A986S και τον Q1011E στο σύνολο των ασθενών. Στην ανάλυση κατά πληθυσμιακές υποομάδες, από την συσχέτιση του πολυμορφισμού Q1011E με τα επίπεδα του Ca στα ούρα, φάνηκε μόνο ότι καυκάσιοι με τον κυρίαρχο γονότυπο είχαν σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση Ca στα ούρα από εκείνους με το πολυμορφικό αλληλίο. Αντιφατικά αποτελέσματα βρέθηκαν για τους πολυμορφισμούς A986S και R990G, όταν συσχετίστηκαν σε διάφορους πληθυσμούς για τον κίνδυνο ουρολιθίασης από Ca. Για τον πολυμορφισμό A986S, ο TT (ομόζυγος πολυμορφικός) γονότυπος συσχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο ουρολιθίασης σε ασιάτες, αλλά με μειωμένο κίνδυνο σε καυκάσιους. Σχετικά με τον πολυμορφισμό R990G, βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ GG (ομόζυγου πολυμορφικού) γονότυπου και αυξημένου κινδύνου ουρολιθίασης μόνο σε καυκάσιους. Δεν βρέθηκαν σημαντικές συσχετίσεις για τον πολυμορφισμό Q1011E [350].

**Πίνακας 6.** Σύνοψη των τυποποιημένων διαφορών μέσης τιμής (standardized mean difference SMD) και των αντίστοιχων διαστημάτων εμπιστοσύνης 95% (CI) για τις συσχετίσεις μεταξύ της συγκέντρωσης Ca στα ούρα και πολυμορφισμών του CaSR [350].

Πολυμορφισμοί	Υποομάδες	N <sup>a</sup>	Μέγεθος Δείγματος	SMD (95% CI)	p
<b>A986S</b>	Όλοι	9	1670	0,25 (-0,59–1,10)	0,56
	Καυκάσιοι	6	886	0,31 (-0,87–1,49)	0,605
	Ασιάτες	2	597	-0,02 (-0,92–0,88)	0,967
	Ασθενείς με Ουρολιθίαση	3	827	1,00 (-1,32–3,32)	0,397
	Υγιείς	4	600	-0,35 (-1,00–0,29)	0,282
	Ασθενείς με RHPT	2	243	0,31 (-0,05–0,67)	0,093
<b>R990G</b>	Όλοι	6	1049	<b>2,52 (0,12–4,92)</b>	<b>0,039</b>
	Καυκάσιοι	4	658	3,62 (-0,18–7,42)	0,062
	Ασθενείς με Ουρολιθίαση	2	333	4,00 (-3,00–10,99)	0,263
	Υγιείς	2	431	3,19 (-3,54–9,93)	0,353
<b>Q1011E</b>	Όλοι	5	964	-1,19 (-2,52–0,15)	0,081
	Καυκάσιοι	3	573	<b>-1,99 (-3,74–0,24)</b>	<b>0,026</b>
	Ασθενείς με Ουρολιθίαση	2	327	-1,14 (-4,29–2,01)	0,477
	Υγιείς	2	431	-1,63 (-4,11–0,86)	0,201

<sup>a</sup> Αριθμός μελετών. RHPT: Πρωτοπαθής Υπερπαραθυρεοειδισμός



## 2 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Τις τελευταίες δεκαετίες μικρός αριθμός μελετών έχει συσχετίσει την ΙΥΑ στα παιδιά με μειωμένη ΟΠ συγκριτικά με συνομηλικούς [23, 24, 26, 232, 276]. Ωστόσο ο ακριβής μηχανισμός διαταραχής του οστικού μεταβολισμού δεν έχει διευκρινιστεί, καθώς δεν έχουν πραγματοποιηθεί βιοψίες οστών σε παιδιά με ΙΥΑ. Όμως, από μελέτες φαίνεται ότι η κατά μήκος αύξηση των οστών είναι φυσιολογική στα περισσότερα παιδιά με ΙΥΑ, υποδεικνύοντας ως λιγότερο πιθανή την διαταραχή της οστικής παραγωγής. Έτσι, η μειωμένη οστική μάζα σ' αυτά τα παιδιά πιθανά να οφείλεται σε αυξημένη οστική απορρόφηση και/ή πιθανότερα οστικό ανασχηματισμό [23, 26, 243].

Στην παιδική ηλικία περιορισμένες μελέτες εκτίμησης των βιοχημικών δεικτών μεταβολισμού των οστών στην ΙΥΑ έχουν πραγματοποιηθεί και αυτές αφορούσαν κυρίως την OC ως δείκτη οστικής παραγωγής και ως δείκτες οστικής απορρόφησης την PYD και/ή DPD, ενώ μόλις 2 μελέτες μελέτησαν τα τελοπεπτίδια του κολλαγόνου [26, 243, 277]. Επίσης δεν έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες των κυτταροκινών OPG και sRANKL παρά το γεγονός ότι τα μόρια αυτά εμπλέκονται στον οστικό μεταβολισμό. Από την άλλη, γενετικές μελέτες σε παιδιά με ΙΥΑ στη διεθνή βιβλιογραφία είναι περιορισμένες, μάλιστα δεν αναφέρεται καμία μελέτη ανάλυσης πολυμορφισμών του γονιδίου CaSR αποκλειστικά σε παιδιά, ενώ δεν έχουν πραγματοποιηθεί αντίστοιχες μελέτες στον ελληνικό πληθυσμό.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η εκτίμηση βιοχημικών δεικτών οστικού μεταβολισμού (οστικής παραγωγής και απορρόφησης) και των κυτταροκινών OPG και sRANKL στον ορό σε παιδιά με ΙΥΑ, ως μια προσπάθεια εκτίμησης, με μη επεμβατικές και μη ακτινολογικές μεθόδους, των πρώιμων διαταραχών του οστικού μεταβολισμού και παράλληλα η γενετική προσέγγιση της ΙΥΑ με μελέτη πολυμορφισμών του γονιδίου CaSR. Είναι σημαντικό να τίθεται η υποψία για διαταραχές στον οστικό μεταβολισμό σε παιδιά με ΙΥΑ άμεσα, ώστε η έγκαιρη και κατάλληλη διαγνωστική προσέγγιση, να αποτρέψει την μακροχρόνια νοσηρότητα με την έγκαιρη έναρξη της θεραπείας.



# ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---





### 3 ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### Υλικό

Πρόκειται για μια προοπτική μελέτη δεδομένων (μελέτη παρατήρησης) σε ένα δείγμα ασθενών συγκρινόμενο με ένα δείγμα υγιών παιδιών, που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου.

#### Ομάδα ασθενών

Στη μελέτη περιλήφθηκαν 50 παιδιά με ΙΥΑ, που διαγνώστηκαν στην Παιδιατρική Κλινική και στο εξωτερικό Παιδονεφρολογικό Ιατρείο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων κατά το χρονικό διάστημα Σεπτέμβριος 2009 έως Οκτώβριος 2016 (Πίνακας 7). Η διάγνωση της ΥΑ στηρίχθηκε στην αυξημένη απέκκριση Ca στα ούρα 24ώρου ( $>4 \text{ mg/Kg/24ωρο}$ ) σε δύο συλλογές ούρων και στον αυξημένο λόγο Ca/Crε ούρων για την ηλικία σε τυχαία ούρηση, στα παιδιά με έλεγχο της κύστης (46/50) ή στον αυξημένο λόγο Ca/Crε ούρων για την ηλικία σε δύο τυχαίες ουρήσεις στα παιδιά χωρίς έλεγχο της κύστης. Στην ομάδα των παιδιών με ΥΑ, κατά την αρχική προσέγγιση πραγματοποιήθηκε εκτενής εργαστηριακός έλεγχος, για αποκλεισμό περιπτώσεων δευτεροπαθούς ή πρωτοπαθούς μορφής ΥΑ και την τεκμηρίωση της διάγνωσης της ΙΥΑ. Καταγράφηκαν οι σωματομετρικές παράμετροι του ύψους και του βάρους σώματος και εκτιμήθηκε ο ΔΜΣ και η επιφάνεια σώματος (Επ.Σ.) των ασθενών.

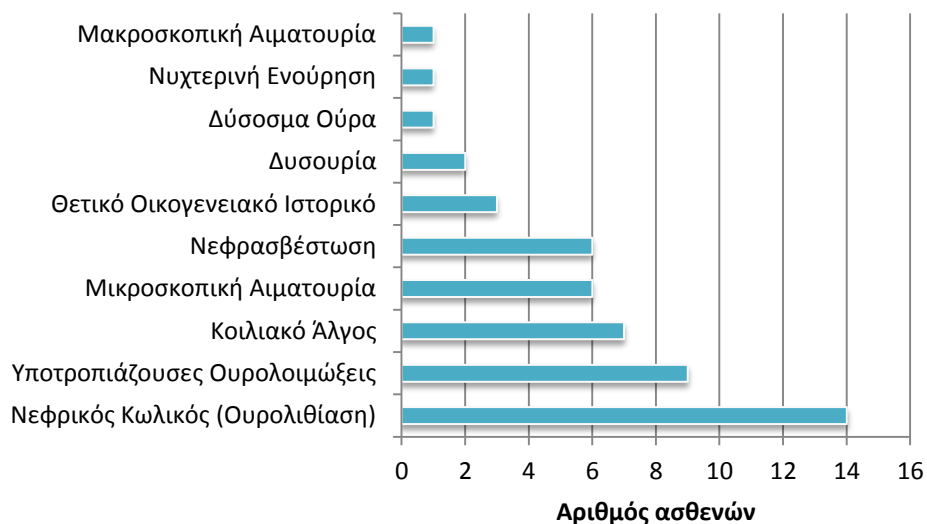
Η καταγωγή των ασθενών αφορούσε την ευρύτερη περιοχή της Ηπείρου, τα Νησιά του Ιονίου, τον νομό Αιτωλοακαρνανίας και τη Δυτική Μακεδονία. Η κλινική εικόνα των ασθενών που οδήγησε στη διάγνωση της ΙΥΑ απεικονίζεται στην Εικόνα 18. Από τα παιδιά με ΙΥΑ ένα ποσοστό 28% (14/50) είχαν νεφρικό κωλικό λόγω ουρολιθίασης.

Σε όλα τα παιδιά με ΙΥΑ ελήφθη λεπτομερές ατομικό ιστορικό και καταγράφηκαν οι διατροφικές τους συνήθειες όσον αφορά τη λήψη γαλακτοκομικών, άλατος, πρωτεϊνών, φρούτων και λαχανικών, καθώς και της ποσότητας υγρών (κυρίως νερού), κατά τον χρόνο ένταξης τους στην μελέτη. Αποκλείστηκαν παιδιά με ακραίες ή ειδικές δίαιτες (όπως κετογόνο δίαιτα) ή παιδιά με γαστρεντερολογικά προβλήματα. Κανένα από τα παιδιά με ΙΥΑ που συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη δεν εμφάνιζε φαινοτυπικά χαρακτηριστικά συνδρομικού ασθενή από την αντικειμενική εξέταση. Επίσης σημειώθηκε η σωματική δραστηριότητα των παιδιών και το στάδιο ενήβωσης κατά Tanner. Δεν συμπεριλήφθηκαν παιδιά με κινητικά

προβλήματα ή έστω σε προσωρινή κατάκλιση. Αποκλείστηκαν παιδιά που ελάμβαναν φάρμακα ή σκευάσματα, όπως κορτιζόλη ή VitD, που θα μπορούσαν να προκαλέσουν δευτεροπαθή ΥΑ.

**Πίνακας 7.** Αριθμός (N), Φύλο, Μέση τιμή και τυπική απόκλιση (M±SD) σε έτη, ηλικιακό εύρος και κατάσταση ελέγχου των σφιγκτήρων της κύστης των ασθενών και της ομάδας ελέγχου.

	<b>Ασθενείς</b>	<b>Ομάδα Ελέγχου</b>	<b>p</b>
<b>N</b>	50	60	
<b>Αγόρια</b>	24	30	
<b>Κορίτσια</b>	26	30	
<b>Ηλικία (M±SD) (έτη)</b>	7,65±4,48	7,35±4,43	NS
<b>Ηλικιακό εύρος (έτη)</b>	0,5-16,4	0,6-16,3	
<b>Έλεγχος της κύστης</b>	46	49	
<b>Χωρίς έλεγχο της κύστης</b>	4	11	



**Εικόνα 18.** Κλινική εικόνα ασθενών κατά τη διάγνωση της ΙΥΑ.

### ***Εργαστηριακός Έλεγχος των Ασθενών με ΙΥΑ κατά την ένταξη στην μελέτη***

Στην ομάδα των παιδιών με ΥΑ, κατά την αρχική προσέγγιση, για αποκλεισμό περιπτώσεων δευτεροπαθούς ή πρωτοπαθούς μορφής ΥΑ και την τεκμηρίωση της διάγνωσης της ΙΥΑ πραγματοποιήθηκε ο κάτωθι εργαστηριακός έλεγχος:

- Μετρήθηκαν οι βιοχημικοί παράμετροι στον ορό: Ca, Pi, Mg, Cl, Na, K, ALP, Glu, Ure και Cre. Επίσης προσδιορίστηκαν τα ηπατικά ένζυμα AST, ALT, γGT στον ορό
- Εκτιμήθηκε το pH και τα HCO<sub>3</sub> του φλεβικού αίματος
- Εκτιμήθηκαν τα επίπεδα στον ορό των: κορτιζόλης, iPTH, T<sub>3</sub>/FT<sub>4</sub>/TSH, 25OHD και 1,25(OH)<sub>2</sub>D
- Προσδιορίστηκαν σε δύο συλλογές ούρων 24ώρου εκτός της απέκκρισης Ca η απέκκριση των: Pi, Na, K, Ure, Cre, ολικών πρωτεϊνών (total proteins, TPR), κιτρικών και οξαλικών και στα ούρα τυχαίας ούρησης το Ca και η Cre

### **Ομάδα ελέγχου**

Την ομάδα ελέγχου αποτέλεσαν εξήντα παιδιά με φυσιολογική απέκκριση Ca στα ούρα τυχαίας ούρησης, συγκρίσιμης ηλικίας και φύλου με τους ασθενείς (Πίνακας 7). Η καταγωγή τους προερχόταν από την ίδια περιοχή με τους ασθενείς. Τα παιδιά αυτά εισήχθησαν στην Παιδιατρική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων κατά το ίδιο χρονικό διάστημα με τους ασθενείς για τακτικό έλεγχο λόγω ιστορικού απώλειας συνείδησης, κεφαλαλγίας, σπασμών και ουρολοιμώξεων. Δεν νοσούσαν κατά το χρόνο της νοσηλείας τους, δεν ελάμβαναν κανένα φάρμακο ή σκεύασμα. Κανένα παιδί δεν εμφάνιζε κινητικά προβλήματα, όλα βρισκόταν υπό ελεύθερη διαίτα και είχαν συνήθη σωματική δραστηριότητα για την ηλικία τους. Καταγράφηκαν οι σωματομετρικές παράμετροι του ύψους και του βάρους σώματος και εκτιμήθηκε ο ΔΜΣ και η Επ.Σ. των παιδιών της ομάδας ελέγχου (Πίνακας 8) και το στάδιο ενήβωσης κατά Tanner. Έγινε προσπάθεια ο εργαστηριακός έλεγχος των ασθενών και παιδιών της ομάδας ελέγχου να πραγματοποιείται στην ίδια εποχή του έτους.

### ***Εργαστηριακός Έλεγχος της ομάδας ελέγχου***

Στην ομάδα ελέγχου έγινε ο ίδιος αιματολογικός έλεγχος με των ασθενών, για αποκλεισμό νοσημάτων που θα εμπλεκόταν στον μεταβολισμό και την νεφρική απέκκριση Ca. Πραγματοποιήθηκε ο κάτωθι εργαστηριακός έλεγχος:

- Μετρήθηκαν στον ορό: Ca, Pi, Mg, Cl, Na, K, ALP, Glu, Ure, Cre, AST, ALT, γGT
- Μετρήθηκαν: το pH και τα HCO<sub>3</sub> φλεβικού αίματος
- Εκτιμήθηκαν τα επίπεδα στον ορό των: κορτιζόλης, iPTH, T<sub>3</sub>/FT<sub>4</sub>/TSH, 25OHD, 1,25(OH)<sub>2</sub>D
- Προσδιορίστηκαν στα ούρα τυχαίας ούρησης το Ca και η Cre

### ***Επανελέγχος ασθενών 3 μήνες μετά την αρχική διάγνωση***

Με τη διάγνωση, στα παιδιά με ΙΥΑ συστήθηκε αύξηση των προσλαμβανόμενων υγρών 1,5-2 φορές των ημερήσιων αναγκών, άναλος διαίτα, πρόσληψη γαλακτοκομικών στη συνιστώμενη ημερήσια ποσότητα για την ηλικία, προσπάθεια αύξησης των φρούτων και λαχανικών σε 3-5 μερίδες την ημέρα και λήψη ποσότητας πρωτεϊνών σύμφωνα με τις ημερήσιες συνιστώμενες ανάγκες [39, 311]. Τρεις μήνες μετά την εφαρμογή των διατροφικών τροποποιήσεων οι ασθενείς επανεκτιμήθηκαν. Από το σύνολο των 50 ασθενών οι 48 πραγματοποίησαν και τους 2 ελέγχους, δηλαδή στον χρόνο 0 και μετά από 3 μήνες εφαρμογής των συστάσεων. Δύο ασθενείς δεν προσήλθαν για επανέλεγχο στον αναμενόμενο χρόνο.

Κατά την επανεκτίμηση των ασθενών προσδιορίστηκαν οι ίδιοι παράμετροι που προαναφέρθηκαν κατά την εισαγωγή τους στη μελέτη.

### **Έλεγχος ειδικών δεικτών μεταβολισμού των οστών, κυτταροκινών και πολυμορφισμών του γονιδίου CaSR στα παιδιά με ΙΥΑ και στην ομάδα ελέγχου**

Τόσο στα παιδιά με ΙΥΑ και στους δυο χρόνους εκτίμησης τους, όσο και στην ομάδα ελέγχου, δείγματα ορού και πλήρους αίματος καταψύχθηκαν στους -20° C για εκτίμηση των παρακάτω:

- Δείκτη οστικής παραγωγής OC, δείκτη οστικής απορρόφησης β-Crosslaps, λόγου β-Crosslaps/OC στον ορό, κυτταροκινών OPG και sRANKL (ολικό κλάσμα) και λόγου sRANKL/OPG.
- Στα παιδιά της μελέτης έγινε ανάλυση των πολυμορφισμών A986S, R990G και Q1011E (εξόνιο 7) του γονιδίου CaSR από ολικό περιφερικό αίμα.

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους κανόνες της Επιστημονικής Επιτροπής του ΠΓΝΙ. Οι γονείς τόσο των ασθενών όσο και της ομάδας ελέγχου ενημερώθηκαν και έδωσαν τη συγκατάθεσή τους ενυπόγραφα για τη συμμετοχή των παιδιών στην μελέτη.

## **Μέθοδοι**

### **Περιγραφή των χρησιμοποιούμενων βιοχημικών μεθόδων**

Η ανάλυση των βιοχημικών δεικτών στον ορό: Ca, Pi, Mg, Cl, Na, K, AST, ALT, γGT, ALP, Glu, Ure, Cre, των ορμονών στον ορό: κορτιζόλη, iPTH, T<sub>3</sub>/FT<sub>4</sub>/TSH, καθώς και των βιοχημικών δεικτών στα ούρα: Ca, Pi, Na, K, TPR, Ure, Cre έγινε στο Βιοχημικό εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Ο προσδιορισμός του pH και των HCO<sub>3</sub> στο φλεβικό αίμα έγινε σε αναλυτή αερίων αίματος στην Μονάδα Εντατικής Νοσηλείας Νεογνών του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Ο προσδιορισμός της 25OHD και 1,25(OH)<sub>2</sub>D και των βιοχημικών δεικτών μεταβολισμού των οστών (OC, β-Crosslaps, OPG και sRANKL) στον ορό και των κιτρικών και οξαλικών στα ούρα έγινε στο Εργαστήριο του Τομέα Υγείας του Παιδιού, Τμήματος Ιατρικής, Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

### **Προσδιορισμός της Οστεοκαλσίνης (OC) ορού**

Τα επίπεδα της OC μετρήθηκαν με ανοσοενζυμική μέθοδο χρησιμοποιώντας τα αντιδραστήρια που περιέχονται μέσα στο kit της εταιρείας IDS (Systems Ltd, UK). Η μέθοδος χρησιμοποιεί δύο μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της OC ανθρώπου. Το ένα αντίσωμα αναγνωρίζει το μέσο τμήμα του μορίου (20-29 αμινοξέα) και το άλλο το αμινοτελικό (N-τελικό) άκρο του (10-16 αμινοξέα) καθώς και το N-τελικό μέσο τμήμα (1-43 αμινοξέα). Το κατώτατο όριο ανίχνευσης (ευαισθησία της μεθόδου) ήταν 0,5 ng/ml και οι συντελεστές διακύμανσης (Coefficient of Variations, CVs), στον ίδιο προσδιορισμό και μεταξύ προσδιορισμών ήταν αντίστοιχα 2,2% και 4,2% στα επίπεδα των 54 ng/ml.

### **Προσδιορισμός μεταβολιτών της βιταμίνης D: 25-υδροξυ-βιταμίνης D (25OHD) και 1,25-διυδροξυ-βιταμίνης D [1,25(OH)<sub>2</sub>D]**

Ο προσδιορισμός της 25OHD στον ορό έγινε με ανοσοενζυμική μέθοδο σύνδεσης (ELISA) χρησιμοποιώντας το kit της DRG (DRG Instruments GmbH Germany). Η μέθοδος χρησιμοποιεί μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει την 25OHD<sub>3</sub> και 25OHD<sub>2</sub> αφού πρώτα έχει πραγματοποιηθεί η αποσύνδεσή τους από την δεσμευτική πρωτεΐνη (DBP). Η ευαισθησία της μεθόδου ήταν 1,3 ng/ml και οι CVs στον ίδιο προσδιορισμό και μεταξύ προσδιορισμών ήταν 7,0% στα επίπεδα των 33 ng/ml.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  στον ορό έγινε με ανοσοενζυμική μέθοδο (EIA) και μονοκλωνικό αντίσωμα χρησιμοποιώντας το kit της DRG. Είχε προηγηθεί ο διαχωρισμός της με χρωματογραφία σε δύο στάδια με οργανικά διαλύματα (δυσόπροπυλικού αιθέρα, ισοπροπανόλης και εξανίου) σε κολώνες χρωματογραφίας Chromabond και silica και εκχύλιση με αιθανόλη. Η ευαισθησία της μεθόδου ήταν 4,8 pg/ml. Οι CVs ήταν στον ίδιο προσδιορισμό 6,7% και μεταξύ προσδιορισμών 9,0% στα επίπεδα των 40-55 pg/ml.

### ***Προσδιορισμός β-Crosslaps***

Τα β-Crosslaps στον ορό προσδιορίστηκαν με ανοσοενζυμική μέθοδο σύνδεσης (ELISA) χρησιμοποιώντας το kit της IDS. Το μονοκλωνικό αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν ποντικού. Η ευαισθησία της μεθόδου ήταν 0,02 ng/ml και οι CVs 1,8% και 2,5% στα επίπεδα των 2 ng/ml.

### ***Προσδιορισμός του sRANKL***

Ο προσδιορισμός του sRANKL (total) έγινε με ανοσοενζυμική μέθοδο (EIA) χρησιμοποιώντας ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα για την επίστρωση των μικροπλακών (στερεά φάση) και ανθρώπινο πολυκλωνικό αντίσωμα anti-sRANKL συνδεδεμένο με βιοτίνη (για τη σύνδεση σε σχηματισμό σάντουιτς). Το όριο ανίχνευσης ήταν 0,04 pmol/l και οι CVs στον ίδιο προσδιορισμό και σε διαφορετικούς προσδιορισμούς ήταν 7% και 13% στα επίπεδα των 700 και 310 pmol/l αντίστοιχα. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν περιέχονταν στο kit της BioVendor (BioVendor-Laboratorni medicina a.s., Czech Republic).

### ***Προσδιορισμός της οστεοπροτεγερίνης (OPG)***

Ο προσδιορισμός της OPG έγινε με ανοσοενζυμική μέθοδο (EIA) χρησιμοποιώντας μονοκλωνικό αντίσωμα για την επίστρωση των μικροπλακών (στερεά φάση) και ανθρώπινο πολυκλωνικό αντίσωμα anti-OPG συνδεδεμένο με βιοτίνη (για τη σύνδεση σε σχηματισμό σάντουιτς). Το όριο ανίχνευσης ήταν 0,03 pmol/l και οι CVs στον ίδιο προσδιορισμό και σε διαφορετικούς προσδιορισμούς ήταν 3,8% και 9,0% στα επίπεδα των 5-6 pmol/l αντίστοιχα. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν περιέχονταν στο kit της BioVendor (BioVendor-Laboratorni medicina a.s., Czech Republic).

### **Προσδιορισμός ηλεκτρολυτών, ALP, τρανσαμινασών, ορμονών, νεφρικών δεικτών**

Οι προσδιορισμοί στον ορό των παραμέτρων ALP, Ca, P, Mg, K, Na, Cl, Cre, Ουρία, PTH, κορτιζόλης, των τρανσαμινασών AST/ALT/γGT, των θυρεοειδικών ορμονών T<sub>3</sub>/FT<sub>4</sub>/TSH πραγματοποιήθηκαν στον βιοχημικό αναλυτή Olympus AU600 Clinical Chemistry analyzer (Olympus Diagnostica, Hamburg, Germany) στο πλαίσιο των εξετάσεων ρουτίνας.

### **Προσδιορισμός Οξαλικών αλάτων στα ούρα**

Τα οξαλικά άλατα των ούρων μετρήθηκαν με φωτομετρική ενζυματική μέθοδο, χρησιμοποιώντας το kit της Sigma Diagnostics (St. Louis, ΗΠΑ). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ενζυματική κατάλυση των οξαλικών από την οξαλική οξειδάση σε CO<sub>2</sub> και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και στη συνέχεια τη μέτρηση του παραγόμενου H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> κατά την οξείδωσή του σε H<sub>2</sub>O. Αυτό γίνεται από την υπεροξειδάση παρουσία 3-μεθυλ-2-βενζοθιαζολινόνης (MBTH) και 3-διμεθυλαμινο-βενζοϊκού οξέος (DMAB) αποδίδοντας μία χρωστική ουσία η απορρόφηση της οποίας μετράται στο φάσμα των 590 nm. Η ένταση του χρώματος που δημιουργήθηκε ήταν ευθέως ανάλογη με την ποσότητα των οξαλικών.

### **Προσδιορισμός κιτρικών αλάτων στα ούρα**

Τα κιτρικά άλατα των ούρων μετρήθηκαν με φωτομετρική ενζυματική μέθοδο χρησιμοποιώντας το kit της Boehringer Mannheim/R-Biopharm (Darmstadt, Γερμανία). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ενζυματική κατάλυση των κιτρικών από την κιτρική λυάση σε οξαλοξικό οξύ και οξικό. Στη συνέχεια το οξαλοξικό και το πυροσταφυλικό οξύ που προέρχονται από αποκαρβοξυλίωση ανάγονται σε μηλικό και γαλακτικό οξύ παρουσία των αντίστοιχων αφυδρογονασών ενζύμων (L-MDH και L-LDH) και την παράλληλη οξείδωση του NADH σε NAD<sup>+</sup>. Η ποσότητα του NADH που οξειδώνεται υπολογίζεται βάση της απορρόφησης στο φάσμα των 340nm και είναι στοιχειομετρικά ανάλογη της ποσότητας των κιτρικών.

### **Προσδιορισμός PH/HCO<sub>3</sub>**

Ο προσδιορισμός του pH και των HCO<sub>3</sub> των δειγμάτων αίματος έγινε σε αναλυτή αερίων αίματος τύπου RAPIDPoint 500 Systems, της εταιρείας Siemens-healthcare-



diagnostics Germany. Συγκεκριμένα ο προσδιορισμός του pH και pCO<sub>2</sub> έγινε με την μέθοδο της ποτενσιομετρίας με χρήση εκλεκτικών ηλεκτροδίων ιόντων (potentiometry using ion selective electrode, ISE). Ο προσδιορισμός των HCO<sub>3</sub> έγινε με υπολογισμό από την συσκευή, αφού είχε μετρήσει τις παραμέτρους pCO<sub>2</sub> και pH, με βάση την εξίσωση Henderson-Hasselbalch, από τον τύπο  $HCO_3 = 0,03 * pCO_2 * 10^{(pH-6,1)}$ .

### **Περιγραφή της γονιδιακής ανάλυσης και προσδιορισμός των πολυμορφισμών του γονιδίου CaSR**

Από περιφερικό αίμα 38 παιδιών με IYA και 72 υγιών μαρτύρων συγκρίσιμης ηλικίας απομονώθηκε γενωμικό DNA (Qiagen DNA mini kit Cat. No. 51304). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR σε όλα τα δείγματα για να ενισχυθεί το τμήμα του DNA στο οποίο βρίσκεται το γονίδιο CaSR. Η αντίδραση είχε συνολικό όγκο 50 ul, 10 ul Buffer 5X, 3 ul MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 5 ul dNTPs 2 mM, 1 ul από κάθε εκκινητή 10 uM και 1 U Taq Polymerase. Η αλληλουχία των εκκινητών ήταν η εξής:

F:5'-CAGAAGGTCATCTTTGGCAGCGGCA-3'

R:5'-TGCAGACCTGTTTCCTGGACGGTC-3' [258].

Το πρόγραμμα της αντίδρασης ήταν το εξής: αρχική αποδιάταξη DNA 95°C/5min, 35 κύκλοι από 94°C/30sec (αποδιάταξη DNA), 62°C/30sec (πρόσδεση εκκινητών), 72°C/1min (επιμήκυνση εκκινητών) και τελική επιμήκυνση και επιδιόρθωση στους 72°C/10min, 4°C διατήρηση.

Στο προϊόν της αντίδρασης PCR έγινε αλληλούχιση του γονιδίου (sequencing) προκειμένου να αναλυθούν οι πολυμορφισμοί A986S, R990G και Q1011E [351]. Η αλληλούχιση του γονιδίου έγινε σε "3730xl DNA Analyzer" της εταιρείας Applied Biosystems.

### **Στατιστική ανάλυση δεδομένων**

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων της μελέτης έγινε κυρίως με το στατιστικό πακέτο Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 15.0 σε λειτουργικό Windows, ενώ επικουρικά χρησιμοποιήθηκε το Microsoft Excel για τη δημιουργία κάποιων γραφικών παραστάσεων.

Για τις παραμέτρους της μελέτης έγιναν συγκρίσεις μεταξύ της ομάδας των ασθενών, στους χρόνους ένταξης στην μελέτη και στους 3 μήνες μετά από την διαιτητική παρέμβαση

και της ομάδας ελέγχου για ανάδειξη μεταβολών ή διαφορών, ενώ αναζητήθηκαν και οι συσχετίσεις τους.

Για τις συγκρίσεις χρησιμοποιήθηκαν παραμετρικές δοκιμασίες, όπου βέβαια η κατανομή των τιμών των παραμέτρων είχε τη μορφή κανονικής καμπύλης κατανομής. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία t-test για τον εντοπισμό **στατιστικά σημαντικών διαφορών** σε κάποια παράμετρο συγκρίνοντας κάθε ομάδα ασθενών με την ομάδα ελέγχου. Επίσης για να διερευνηθούν οι πιθανές **στατιστικά σημαντικές μεταβολές** που επέφερε στις παραμέτρους η θεραπεία στους ασθενείς, έγινε σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων των ασθενών σε αντιστοιχία ανά ζεύγη χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία paired t-test [352]. Για λίγες παραμέτρους που δεν είχαν κανονική κατανομή τιμών χρησιμοποιήθηκαν οι αντίστοιχες μη παραμετρικές δοκιμασίες Mann-Witney U-test και Kruskal-Wallis [352]. Ο έλεγχος γραμμικών συσχετίσεων έγινε χρησιμοποιώντας το Pearson's product-moment correlation coefficient (r). Η κατανομή γονοτύπων για κάθε πολυμορφισμό του γονιδίου του CaSR μεταξύ ασθενών και μαρτύρων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της δοκιμασίας  $\chi^2$ .

Στις στατιστικές δοκιμασίες ιδιαίτερη θέση έχουν οι τιμές  $\alpha$  (σφάλμα τύπου I) και  $\beta$  (σφάλμα τύπου II) που αντίστοιχα επηρεάζουν το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας και την στατιστική ισχύ της δοκιμασίας.

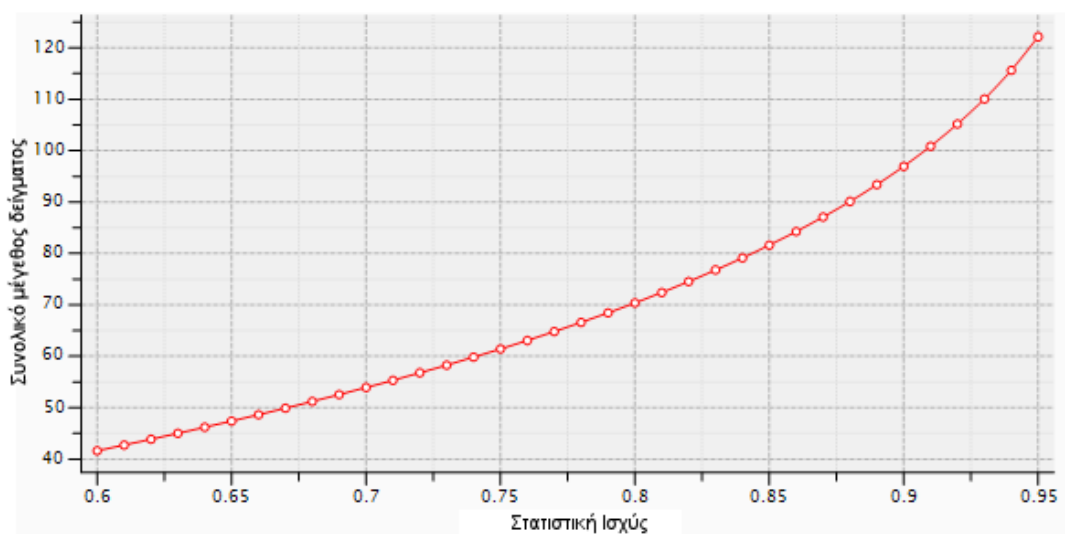
### **Στατιστική σημαντικότητα**

Επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε η τιμή  $\alpha=0,05$ . Μετά από κάθε στατιστική δοκιμασία σύγκρισης μιας παραμέτρου προκύπτει μια εκτίμηση διαφοράς καθώς και μια εκτίμηση της σημαντικότητας του αποτελέσματος εκφρασμένη με την τιμή μιας παραμέτρου p. Για τιμές  $p < \alpha$ , δηλαδή  $p < 0,05$ , η διαφορά θεωρείται στατιστικά σημαντική με πιθανότητα λάθους ίση με p, δηλαδή μικρότερη του 5%. Τιμή του p μεγαλύτερη του 0,05 αλλά μικρότερη του 0,10 ( $0,05 < p < 0,10$ ) αν και δεν είναι στατιστικά σημαντική, υποδηλώνει μία τάση σημαντικότητας. Για τιμές στατιστικά μη σημαντικές χρησιμοποιήθηκε ο συμβολισμός  $p=NS$ . Να σημειωθεί ότι για παραμέτρους που τεκμηριωμένα είναι γνωστό εκ των προτέρων το πρόσημο της διαφοράς (θετική ή αρνητική) τότε χρησιμοποιήθηκε μονόπλευρη (one-tail) δοκιμασία, όπου οι τιμές του p μειώνονται στο μισό.

## Στατιστική ισχύς

Η στατιστική ισχύς σχετίζεται με το σφάλμα  $\beta$  μέσω της σχέσης  $(1-\beta)$  και εκφράζει το ποσοστό πιθανότητας που έχει μια στατιστική δοκιμασία να αναδείξει μια διαφορά που πράγματι υπάρχει. Η στατιστική ισχύς εξαρτάται από το επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha$ , από το μέγεθος της διαφοράς που αναμένουμε να αναδειχθεί καθώς και από το μέγεθος του δείγματος [352]. Ο σχεδιασμός της έρευνας βασίστηκε σε ανάλυση στατιστικής ισχύος (power analysis) για κάποιες βασικές παραμέτρους της μελέτης, όπως η  $\beta$ -Crosslaps, ώστε να καθορισθεί το απαιτούμενο μέγεθος του δείγματος.

Σαν παράδειγμα, στην Εικόνα 19 φαίνεται η εξάρτηση της στατιστικής ισχύος από το μέγεθος δείγματος προσαρμοσμένη σε πιλοτικά δεδομένα της παραμέτρου  $\beta$ -Crosslaps. Έτσι καταλήξαμε σε ένα στόχο συνολικού μεγέθους δείγματος 100, δηλαδή  $N=50$  ανά ομάδα (ασθενών και μαρτύρων), που αντιστοιχεί σε ένα ικανοποιητικό επίπεδο στατιστικής ισχύος 90% για εντοπισμό διαφορών στις βασικές παραμέτρους της έρευνας.



**Εικόνα 19.** Διάγραμμα συσχέτισης του μεγέθους του δείγματος σαν συνάρτηση της στατιστικής ισχύος, προσαρμοσμένη στα δεδομένα της παραμέτρου  $\beta$ -Crosslaps.



## 4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### *Εκτίμηση Σωματομετρικών Παραμέτρων και Σταδίων Ενήβωσης κατά Tanner των παιδιών της μελέτης*

#### Σωματομετρικές Παράμετροι των Παιδιών της μελέτης

Υπολογίστηκαν οι μέσες τιμές των σωματομετρικών παραμέτρων των παιδιών με ΙΥΑ κατά την ένταξη στην μελέτη και 3 μήνες μετά, καθώς και της ομάδας ελέγχου. Δεν σημειώθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ως προς το ύψος, βάρος και Επ.Σ. μεταξύ ασθενών και ομάδας ελέγχου. Καταγράφηκε σημαντικά χαμηλότερη μέση τιμή ( $M \pm SD$ ) του ΔΜΣ των ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη και 3 μήνες μετά, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ( $p=0,048$  και  $p=0,024$  αντίστοιχα) (Πίνακας 8).

**Πίνακας 8.** Οι μέσες τιμές ( $M \pm SD$ ) των σωματομετρικών παραμέτρων ύψους, βάρους, δείκτη μάζας σώματος (ΔΜΣ) και Επιφάνειας Σώματος (Επ.Σ.) των ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη, μετά 3 μήνες και της ομάδας ελέγχου.

	Ασθενείς στον χρόνο 0 $M \pm SD$	Ασθενείς μετά 3 μήνες $M \pm SD$	Ομάδα ελέγχου $M \pm SD$	$p_1$	$p_2$
<b>Βάρος (Kg)</b>	28,0±14,0	27,7±13,7	31,6±19,7	NS	NS
<b>Ύψος (cm)</b>	123,8±26,5	123,7±25,7	122,5±29,0	NS	NS
<b>ΔΜΣ (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	17,0 ± 2,2	16,9±2,2	18,75±4,25	0,048	0,024
<b>Επ.Σ. (m<sup>2</sup>)</b>	0,962±0,349	0,957±0,343	1,011±0,428	NS	NS

$p_1$ : μεταξύ ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη και της ομάδας ελέγχου

$p_2$ : μεταξύ ασθενών 3 μήνες μετά και της ομάδας ελέγχου

NS: non significant

## Στάδια Ενήβωσης κατά Tanner των παιδιών της μελέτης

Δε βρέθηκε σημαντική διαφορά ως προς το στάδιο ενήβωσης κατά Tanner μεταξύ ασθενών και της ομάδας ελέγχου. Σημειώνεται ότι η πλειοψηφία των ασθενών αλλά και των παιδιών της ομάδας ελέγχου (περίπου 70%), δεν εμφάνιζαν έναρξη της ήβης (Πίνακας 9).

**Πίνακας 9.** Αριθμός παιδιών ανά στάδιο ενήβωσης κατά Tanner και ανά φύλο στους ασθενείς και στην ομάδα ελέγχου. Άρρεν (♂), Θήλυ (♀).

Στάδιο Ενήβωσης		I	II	III	IV	V
<b>Ασθενείς (N=50)</b>	♂	18	5	1	0	0
	♀	18	2	1	2	3
<b>Μάρτυρες (N=60)</b>	♂	21	5	1	1	2
	♀	20	2	4	4	0

## Γενικός Εργαστηριακός Έλεγχος των παιδιών της μελέτης

### Ασθενείς κατά την ένταξη στην μελέτη

Στην ομάδα των παιδιών με ΥΑ, κατά την αρχική προσέγγιση, για αποκλεισμό περιπτώσεων δευτεροπαθούς ή πρωτοπαθούς μορφής ΥΑ και την τεκμηρίωση της διάγνωσης της ΙΥΑ πραγματοποιήθηκε εκτενής εργαστηριακός έλεγχος των: Ca, Pi, Mg, Cl, Na, K, ALP, Glu, Ure, Cre, AST, ALT και γGT στον ορό, pH και HCO<sub>3</sub> φλεβικού αίματος. Αποκλείστηκαν έτσι καταστάσεις, όπως: υπερασβεσταιμία, υποασβεσταιμία, υποφωσφαταιμία, υπομαγνησταιμία, υπερχλωραιμία, υποφωσφατασαιμία. Όλοι οι ασθενείς είχαν φυσιολογική νεφρική και ηπατική λειτουργία και φυσιολογική Glu αίματος. Από την ανάλυση των φλεβικών αερίων αίματος αποκλείστηκε η πιθανότητα νεφροσωληνιακής και μεταβολικής οξέωσης ή συνδρόμου Bartter. Οι τιμές των παραπάνω παραμέτρων βρέθηκαν φυσιολογικές για την ηλικία (Πίνακας 10, Πίνακας 11). Επίσης τα επίπεδα στον ορό των: κορτιζόλης, iPTH, T<sub>3</sub>/FT<sub>4</sub>/TSH, 25OHD και 1,25(OH)<sub>2</sub>D βρέθηκαν φυσιολογικά για την ηλικία, αποκλείοντας περιπτώσεις υπερκορτιζολαιμίας, υπερπαραθυροειδισμού και διαταραχών του θυρεοειδούς αδένος καθώς και υπερβιταμίνωσης D (Πίνακας 12).

**Πίνακας 10.** Οι μέσες τιμές (M±SD) των παραμέτρων: Ca, Pi, Mg, Cl, Na, K, ALP, Glu, Ure, Cre, Glu στους ασθενείς κατά την ένταξη στην μελέτη και μετά 3 μήνες και στην ομάδα ελέγχου.

<b>Παράμετροι</b>	<b>Ασθενείς κατά την ένταξη στην μελέτη (M±SD)</b>	<b>Ασθενείς μετά 3 μήνες (M±SD)</b>	<b>Ομάδα Ελέγχου (M±SD)</b>	<b>p<sub>1</sub></b>	<b>p<sub>2</sub></b>	<b>p<sub>3</sub></b>
<b>Glu (mg/dl)</b>	87,1±11,3	86,3±10,1	89,6±13,7	NS	NS	NS
<b>Ure (mg/dl)</b>	29,4±7,3	28,9±7,2	28,3±7,7	NS	NS	NS
<b>Cre (mg/dl)</b>	0,62±0,14	0,62±0,13	0,63±0,15	NS	NS	NS
<b>Ca (mg/dl)</b>	10,3±0,4	10,3±0,4	10,3±0,4	NS	NS	NS
<b>Pi (mg/dl)</b>	4,77±0,62	4,83±0,57	4,97±0,72	NS	0,049	0,065
<b>ALP (IU/L)</b>	212,9±111,6	207,923±75,0	192,3±68,6	NS	NS	NS
<b>K (mEq/L)</b>	4,3±0,3	4,4±0,3	4,3±0,5	NS	NS	NS
<b>Na (mEq/L)</b>	138,4±1,6	138,3±1,4	133,3±1,5	NS	NS	NS
<b>Cl (mEq/L)</b>	104,6±1,8	104,8±1,5	104,6±2,1	NS	NS	NS
<b>Mg (mEq/L)</b>	1,7±0,2	1,6±0,1	1,7±0,2	NS	NS	NS
<b>AST (IU/L)</b>	31,2±11,7	31,3±11,2	31,1±10,7	NS	NS	NS
<b>ALT (IU/L)</b>	18,3±10,8	17,0±6,5	19,7±10,2	NS	NS	NS
<b>γGT (IU/L)</b>	12,5±3,1	12,6±2,5	13,3±3,4	NS	NS	NS

**p<sub>1</sub>:** μεταξύ ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη και ασθενών μετά 3 μήνες

**p<sub>2</sub>:** μεταξύ ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη και της ομάδας ελέγχου

**p<sub>3</sub>:** μεταξύ ασθενών μετά 3 μήνες και της ομάδας ελέγχου

**NS:** non significant

**Πίνακας 11.** Οι μέσες τιμές (M±SD) των pH και HCO<sub>3</sub> στο φλεβικό αίμα των ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη και μετά 3 μήνες και των παιδιών της ομάδας ελέγχου.

Παράμετροι	Ασθενείς κατά την ένταξη στην μελέτη (M±SD)	Ασθενείς μετά 3 μήνες (M±SD)	Ομάδα ελέγχου (M±SD)	p <sub>1</sub>	p <sub>2</sub>	p <sub>3</sub>
pH	7,35±0,44	7,35±0,03	7,35±0,04	NS	NS	NS
HCO <sub>3</sub> (mmol/L)	22,08±2,2	22,6±2,4	22,3±2,7	NS	NS	NS

p<sub>1</sub>: μεταξύ ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη και ασθενών μετά 3 μήνες

p<sub>2</sub>: μεταξύ ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη και της ομάδας ελέγχου

p<sub>3</sub>: μεταξύ ασθενών μετά 3 μήνες και της ομάδας ελέγχου

NS: non significant

**Πίνακας 12.** Οι μέσες τιμές (M±SD) των παραμέτρων: κορτιζόλη (cortisol), iPTH, T3/FT4/TSH, 25OHD, 1,25(OH)<sub>2</sub>D στον ορό των ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη και μετά 3 μήνες και της ομάδας ελέγχου.

Παράμετροι	Ασθενείς κατά την ένταξη στην μελέτη (M±SD)	Ασθενείς μετά 3 μήνες (M±SD)	Ομάδα ελέγχου (M±SD)	p <sub>1</sub>	p <sub>2</sub>	p <sub>3</sub>
PTH (pg/ml)	22,4±12,4	27,08±16,6	27,2±15,5	0,053	0,042	NS
Cortisol (mg/ml)	11,0±5,5	9,6±3,6	11,7±6,4	NS	NS	NS
T <sub>3</sub> (ng/ml)	1,44±0,23	1,48±0,23	1,74±0,89	NS	NS	NS
FT <sub>4</sub> (ng/dl)	0,95±0,23	0,97±0,22	1,02±0,24	NS	NS	NS
TSH (μIU/ml)	2,04±0,95	2,20±1,08	2,66±1,28	NS	NS	NS
25OHD (ng/mL)	30,6±15,2	34,2±23,4	33,1±18,3	NS	NS	NS
1,25(OH) <sub>2</sub> D (pg/mL)	32,6±8,7	35,7±11,2	29,2±13,6	NS	NS	0,035

p<sub>1</sub>: μεταξύ των ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη και των ασθενών μετά 3 μήνες

p<sub>2</sub>: μεταξύ των ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη και της ομάδας ελέγχου

p<sub>3</sub>: μεταξύ των ασθενών μετά 3 μήνες και της ομάδας ελέγχου

NS: non significant



## **Παιδιά της ομάδας ελέγχου**

Στην ομάδα ελέγχου έγινε ο ίδιος αιματολογικός έλεγχος με των ασθενών, για αποκλεισμό νοσημάτων, που θα εμπλεκόταν στον μεταβολισμό και τη νεφρική απέκκριση Ca. Ο έλεγχος των βιοχημικών παραμέτρων στον ορό Ca, Pi, Mg, Cl, Na, K, ALP, Glu, Ure, Cre, AST, ALT, γGT, κορτιζόλη, iPTH, T<sub>3</sub>/FT<sub>4</sub>/TSH, 25OHD, 1,25(OH)<sub>2</sub>D, καθώς και του pH και των HCO<sub>3</sub> στο φλεβικό αίμα ήταν φυσιολογικός για την ηλικία των παιδιών (Πίνακας 10, Πίνακας 11, Πίνακας 12). Τα παιδιά της ομάδας ελέγχου είχαν φυσιολογική ηπατική, νεφρική λειτουργία και αποκλείστηκαν άλλες διαταραχές που θα εμπλεκόταν στο ισοζύγιο του Ca και τον μεταβολισμό των οστών.

## **Ασθενείς κατά τον επανέλεγχο μετά 3 μήνες**

Κατά την επανεκτίμηση των ασθενών, μετά την εφαρμογή των διαιτητικών οδηγιών για 3 μήνες, επαναλήφθηκε εργαστηριακός έλεγχος των βιοχημικών δεικτών στον ορό: Ca, Pi, Mg, Cl, Na, K, AST, ALT, γGT, ALP, Glu, Ure, Cre, κορτιζόλη, iPTH, T<sub>3</sub>/FT<sub>4</sub>/TSH, 25OHD, 1,25(OH)<sub>2</sub>D και εκτιμήθηκε το pH και τα HCO<sub>3</sub> στο φλεβικό αίμα. Οι μετρήσεις ήταν φυσιολογικές. Επιβεβαιώθηκε ξανά η διάγνωση της ΙΥΑ, επανεκτιμήθηκε η νεφρική/ηπατική και ενδοκρινολογική εύρυθμη λειτουργία (Πίνακας 10, Πίνακας 11, Πίνακας 12).

## **Εκτίμηση της Διατροφής των ασθενών**

### **Η διατροφή των ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη, στον χρόνο 0**

Από το ιστορικό των παιδιών με ΙΥΑ, βάση των αναφορών από τους γονείς κατά την ένταξη στην μελέτη, καταγράφηκε ως προς τη διαίτα τους ότι:

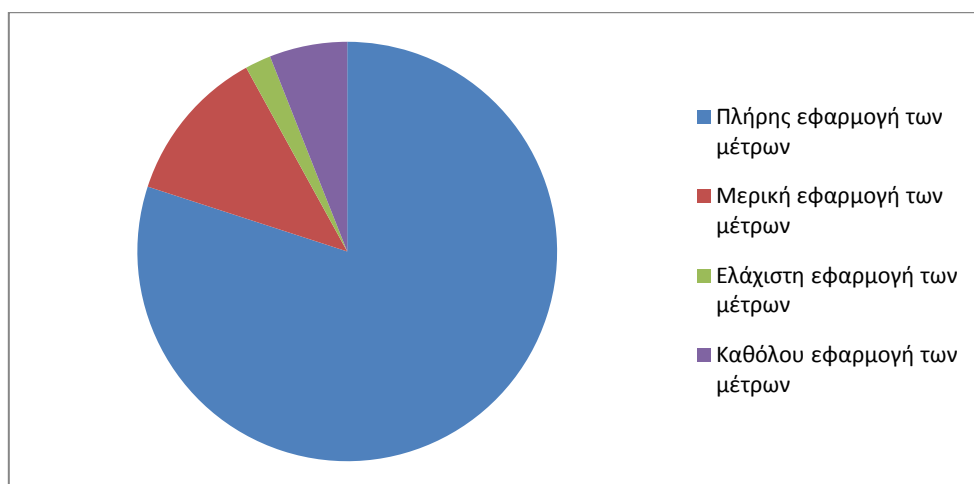
- 42/50 παιδιά ακολουθούσαν συνήθη ελεύθερη διαίτα για την ηλικία
- 6/50 παιδιά προσελάμβαναν πολλά υγρά
- 1/50 παιδί προσελάμβανε μεγάλες ποσότητες Ca
- 1/50 παιδί προσελάμβανε πολύ λίγα υγρά

## Η διατροφή των ασθενών μετά την εφαρμογή των συστάσεων

Τρεις μήνες μετά τις διατροφικές συστάσεις, οι γονείς των 48/50 ασθενών, που επανεκτιμήθηκαν, ανέφεραν ότι:

- 38/48 παιδιά αύξησαν την πρόσληψη των υγρών (χωρίς να προσδιορίζεται πόσο), προσελάμβαναν τις ενδεικνυόμενες ποσότητες Ca και όχι υπερβολικές ποσότητες πρωτεϊνών, μείωσαν την ποσότητα άλατος και αύξησαν την ποσότητα των προσλαμβανόμενων φρούτων και λαχανικών
- 6/48 παιδιά αύξησαν τα προσλαμβανόμενα υγρά μόνο
- 3/48 παιδιά συνέχισαν την ελεύθερη διατροφή τους ως είχε, χωρίς καμιά αλλαγή
- 1/48 παιδιά μείωσαν τις υψηλές ποσότητες Ca

Όπως προκύπτει από την αναφορά των γονέων οι διατροφικές οδηγίες εφαρμόστηκαν περίπου στο 80% των παιδιών, στο 12% αυτών εφαρμόστηκαν μερικώς, στο 2% ελάχιστα, ενώ 6% των ασθενών δεν έκαναν καμιά τροποποίηση (Εικόνα 20).



Εικόνα 20. Διάγραμμα εφαρμογής των διατροφικών συστάσεων από τους ασθενείς.

## **Αποτελέσματα της επίδρασης της διατροφικής παρέμβασης σε διούρηση, ηλεκτρολύτες, απέκκριση TPR, Ca, οξαλικών και κιτρικών στα ούρα**

### **Διούρηση**

Από την στατιστική ανάλυση των δεδομένων των ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη και 3 μήνες μετά τη διαιτητική παρέμβαση, η μέση τιμή ( $M \pm SD$ ) του όγκου των ούρων, που προκύπτει από τις συλλογές ούρων 24ώρου, δεν παρουσίασε ουσιαστικά

στατιστικά σημαντική αύξηση ( $1161,72 \pm 607,73$  ml και  $1213 \pm 608,24$  ml, αντίστοιχα). Αυτό καταγράφεται εμφανώς στην μέση τιμή της διούρησης που παραμένει ίδια  $1,85$  ml/Kg/h και στους δύο χρόνους της μελέτης (Πίνακας 13). Συνεπώς δεν φαίνεται να αυξήθηκε η πρόσληψη των υγρών, παρά τις αναφορές των γονέων.

### **Na και K ούρων**

Από τις συλλογές ούρων 24ώρου η μέση τιμή ( $M \pm SD$ ) του Na ούρων των ασθενών μειώθηκε μετά τις διατροφικές οδηγίες από  $88,12 \pm 49,15$  mEq σε  $82,89 \pm 44,26$  mEq, χωρίς όμως στατιστικά σημαντική διαφορά (Πίνακας 13).

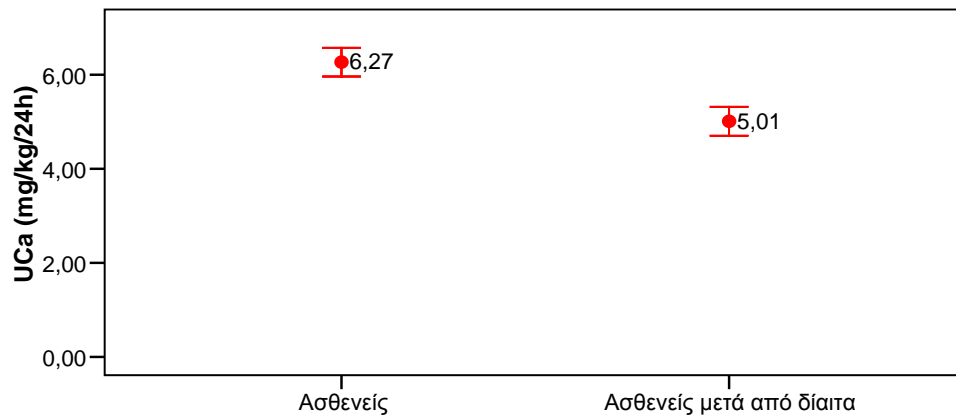
Η μέση τιμή ( $M \pm SD$ ) του K ούρων 24ώρου των ασθενών δεν μεταβλήθηκε σημαντικά πριν και μετά την εφαρμογή των διατροφικών τροποποιήσεων  $37,57 \pm 15,41$  mEq και  $38,88 \pm 15,49$  mEq, αντίστοιχα (Πίνακας 13).

Ο λόγος Na/K ούρων θεωρείται διατροφικός δείκτης συμμόρφωσης με τις συστάσεις αντιμετώπισης της ΙΥΑ, που συσχετίζει την προσλαμβανόμενη ποσότητα άλατος συγκριτικά με την ποσότητα φρούτων/λαχανικών. Τιμή μικρότερη των 2,5 θεωρείται ικανοποιητική [18]. Η μέση τιμή ( $M \pm SD$ ) της σχέσης Na/K βρέθηκε  $2,56 \pm 1,44$  κατά την ένταξη στην μελέτη και  $2,19 \pm 0,83$  μετά την τροποποίηση της διατροφής, χωρίς όμως στατιστικά σημαντική διαφορά (Πίνακας 13).

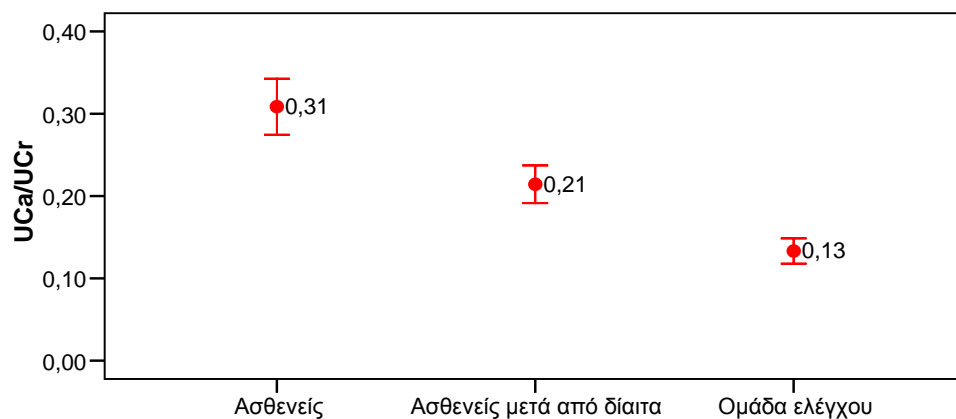
### **Ca και Pi ούρων**

**Ca ούρων:** Οι μέσες τιμές ( $M \pm SD$ ) του Ca στις συλλογές ούρων 24ώρου των ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη ήταν  $6,49 \pm 2,03$  mg/Kg/24ωρο με διάμεση τιμή  $5,7$  mg/Kg/24ωρο και εύρος  $3,70-10,90$  mg/Kg/24ωρο (την τιμή  $3,70$  mg/Kg/24ωρο είχε ασθενής με εικόνα ουρολιθίασης από ασβεστούχο λίθο και νεφρικού κωλικού). Οι ασθενείς μετά την τρίμηνη διατροφική παρέμβαση είχαν στατιστικά σημαντική μείωση ( $p=0,001$ ) των επιπέδων Ca στα ούρα 24ώρου  $5,06 \pm 1,92$  mg/Kg/24ωρο, με διάμεση τιμή  $5,03$  mg/Kg/24ωρο και εύρος  $1,6-9,5$  mg/Kg/24ωρο (Πίνακας 13) (Εικόνα 21). Από τα κλάσματα Ca προς Cre ούρων (UCa/UCre) στα δείγματα τυχαίων ουρήσεων προκύπτει για τους ασθενείς κατά την ένταξη στην μελέτη μέση τιμή ( $M \pm SD$ )  $0,31 \pm 0,22$ , διάμεση  $0,24$  και εύρος τιμών  $0,03-0,80$  και 3 μήνες μετά την παρέμβαση αντίστοιχα  $0,21 \pm 0,15$ ,  $0,18$  και  $0,05-0,76$ . Στα παιδιά της ομάδας ελέγχου η μέση τιμή ήταν  $0,13 \pm 0,12$ , η διάμεση  $0,11$  και το εύρος  $0,01-0,69$  (Εικόνα 22). Οι διαφορές των τιμών του κλάσματος UCa/UCre ήταν

στατιστικώς σημαντικά υψηλότερες μεταξύ ασθενών πριν τη διατροφική παρέμβαση και της ομάδας ελέγχου ( $p < 0,0001$ ), μεταξύ ασθενών πριν και μετά τη διατροφική παρέμβαση ( $p < 0,0001$ ) και μεταξύ ασθενών μετά τη διατροφική παρέμβαση και της ομάδας ελέγχου ( $p = 0,0015$ ).



**Εικόνα 21.** Διάγραμμα μέσων τιμών ( $M \pm SEM$ ) του Ca ούρων 24ώρου, UCa (mg/Kg/24h), της ομάδας των ασθενών πριν και μετά την διατροφική παρέμβαση ( $p = 0,001$ ).



**Εικόνα 22.** Διάγραμμα των μέσων τιμών ( $M \pm SEM$ ) του λόγου Ca/Crε ούρων δείγματος τυχαίας ούρησης (UCa/UCr) της ομάδας των ασθενών πριν και μετά την εφαρμογή των διαιτητικών τροποποιήσεων και της ομάδας ελέγχου.

$p < 0,0001$  μεταξύ των ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη και των ασθενών 3 μήνες μετά

$p < 0,0001$  μεταξύ των ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη και της ομάδας ελέγχου

$p = 0,0015$  μεταξύ των ασθενών 3 μήνες μετά και της ομάδας ελέγχου

**Pi ούρων:** Δεν διαφοροποιήθηκαν οι μέσες τιμές των επιπέδων του Pi ούρων 24ώρου στην ομάδα των ασθενών στους δύο χρόνους της μελέτης και ήταν φυσιολογικές για την ηλικία (τιμές αναφοράς 20-25 mg/kg/24h) [13, σελ. 500] (Πίνακας 13).

**Πίνακας 13.** Μέσες τιμές (M±SD) όγκου ούρων, διούρησης, Ca, Na, K, Na/K, Pi, TPR, οξαλικών, κιτρικών από τις συλλογές ούρων 24ώρου των ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη και 3 μήνες μετά.

Παράμετροι ούρων 24ώρου	Ασθενείς κατά την ένταξη (M±SD)	Ασθενείς μετά 3 μήνες (M±SD)	p
<b>Όγκος (ml)</b>	1161,72±607,73	1213±608,24	NS
<b>Διούρηση (ml/min/h)</b>	1,85±0,78	1,85±0,82	NS
<b>Ca (mg/Kg/d)</b>	6,37±1,99	5,05±1,93	0,001
<b>Na (mEq)</b>	85,06±41,48	81,63±41,17	NS
<b>K (mEq)</b>	35,59±12,80	38,46±13,90	NS
<b>Na/K</b>	2,56±1,44	2,19±0,83	NS
<b>Pi (mg/kg/24h)</b>	21,88±9,02	20,51±7,61	NS
<b>TPR (mg/m<sup>2</sup>/h)</b>	2,20±0,79	2,06±0,79	NS
<b>Οξαλικά (mg/1,73m<sup>2</sup>)</b>	22,74±10,76	27,48±13,12	0,063
<b>Κιτρικά/Cre (mg/g)</b>	108,72±107,07	94,06±85,77	NS

p: μεταξύ των ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη και των ασθενών μετά 3 μήνες

NS: non significant

### Ολικές πρωτεΐνες στα ούρα 24ώρου (Total Protein: TPR)

Δεν καταγράφηκε διαφοροποίηση της μέσης τιμής (M±SD) της απέκκρισης TPR στα ούρα 24ώρου, στους ασθενείς κατά την ένταξη στην μελέτη και μετά 3 μήνες διαιτητικής παρέμβασης (Πίνακας 13).

### Οξαλικά και κιτρικά στα ούρα 24ώρου

**Οξαλικά:** Η μέση τιμή (M±SD) των οξαλικών αλάτων στα ούρα 24ώρου στους ασθενείς πριν και μετά την παρέμβαση εμφάνισε τάση αύξησης, ωστόσο στατιστικά μη σημαντική (22,74±10,76 και 27,48±13,12 mg/1,73m<sup>2</sup>/24ωρο, αντίστοιχα, p=0,063) (Πίνακας

13). Ένας ασθενής της ομάδας πριν την παρέμβαση και 3 της ομάδας μετά βρέθηκαν να έχουν τιμές οξαλικών ούρων υψηλότερες των φυσιολογικών (τιμές αναφοράς <45 mg/1,73m<sup>2</sup>/24ωρο).

**Κιτρικά:** Η μέση τιμή (M±SD) απέκκρισης των κιτρικών στα ούρα 24ώρου, εκτιμώμενη με τον λόγο κιτρικών προς την Cre ούρων της ίδιας συλλογής, στους ασθενείς κατά τους δύο χρόνους εκτίμησης δεν μεταβλήθηκε (Πίνακας 13). Ωστόσο οι μέσες τιμές ήταν σαφώς χαμηλότερες σε σχέση με τις τιμές αναφοράς (>300 mg/g Cre) [13, σελ.367].

### ***Αποτελέσματα της διατροφικής παρέμβασης στα επίπεδα Ca, Pi, PTH, VitD στον ορό***

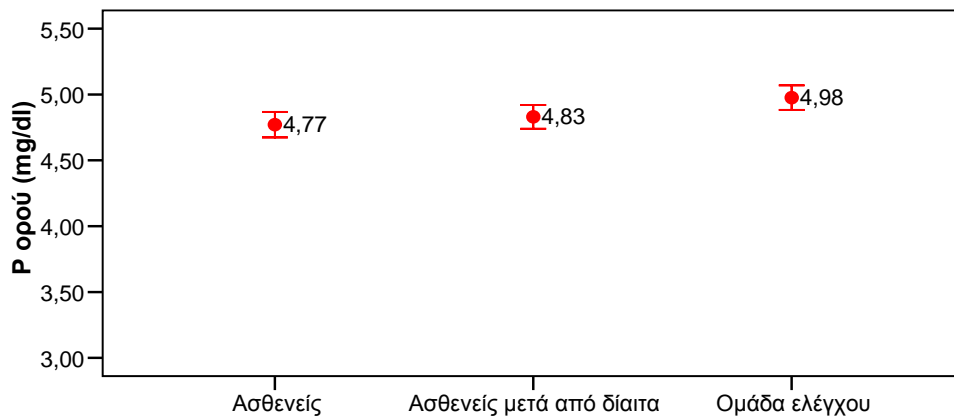
#### **Ca ορού**

Οι μέσες τιμές του Ca στον ορό τόσο στους ασθενείς πριν και μετά την διατροφική παρέμβαση, δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση και ήταν συγκρίσιμες με αυτές της ομάδας ελέγχου, όπως φαίνεται στον Πίνακα 10.

#### **Pi ορού**

Οι μέσες τιμές (M±SD) του Pi στον ορό τόσο στην ομάδα των ασθενών πριν και μετά την διατροφική παρέμβαση και στην ομάδα ελέγχου ήταν (4,77±0,62, 4,83±0,57 και 4,98±0,72 mg/dl, αντίστοιχα) (Πίνακας 10) (Εικόνα 23).

Η μέση τιμή του Pi στον ορό παρουσίασε αυξητική τάση μετά την παρέμβαση σε σύγκριση με την αρχική και προς την κατεύθυνση της μέσης τιμής της ομάδας ελέγχου. Η μέση τιμή του Pi στον ορό των ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη συγκριτικά με της ομάδας ελέγχου (p=0,049). Η μέση τιμή του Pi στον ορό των ασθενών κατά την δεύτερη εκτίμηση συγκριτικά με της ομάδας ελέγχου, εμφάνισε μια σημαντική θετική τάση (p=0,065) (Εικόνα 23).



**Εικόνα 23.** Διάγραμμα των μέσων τιμών ( $M \pm SEM$ ) του  $P_i$  στον ορό της ομάδας των ασθενών πριν και μετά την διατροφική παρέμβαση και της ομάδας ελέγχου.

$p=NS$  μεταξύ των ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη και των ασθενών μετά 3 μήνες

$p=0,049$  μεταξύ των ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη και της ομάδας ελέγχου

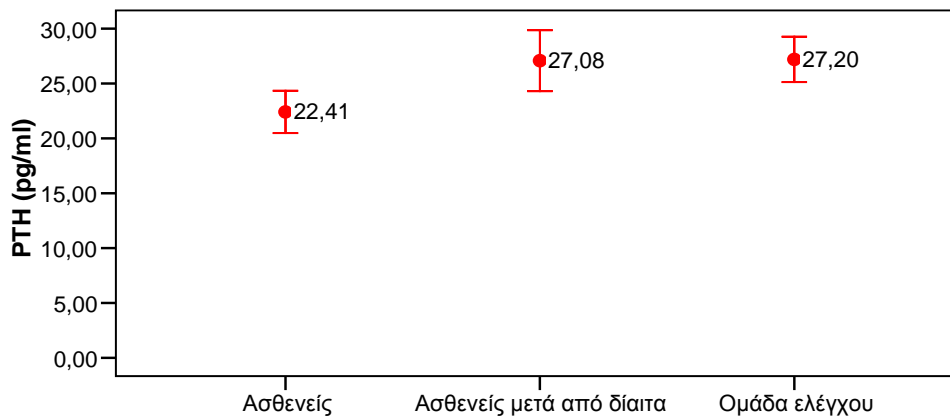
$p=0,065$  μεταξύ των ασθενών μετά 3 μήνες και της ομάδας ελέγχου

NS: non significant

## PTH ορού

Η μέση τιμή ( $M \pm SD$ ) της PTH στον ορό των ασθενών πριν τη διαιτητική παρέμβαση καταγράφηκε χαμηλότερη στατιστικά σημαντικά συγκριτικά με των ασθενών μετά τη διαιτητική παρέμβαση ( $22,4 \pm 12,4$  και  $27,1 \pm 15,5$  pg/ml αντίστοιχα,  $p=0,042$ ) και με τάση οριακά χαμηλότερη μεταξύ των ασθενών πριν και της ομάδας ελέγχου ( $27,2 \pm 16,7$  pg/ml,  $p=0,053$ ) (Πίνακας 12) (Εικόνα 24).

Χαμηλότερες τιμές των φυσιολογικών ορίων της PTH στον ορό είχαν 9/49 (18%) ασθενείς κατά την ένταξη στην μελέτη, 2/48 (4%) ασθενείς στον επανέλεγχο στους 3 μήνες και 3/60 (5%) παιδιά της ομάδας ελέγχου. Κανένα παιδί της μελέτης δεν εμφάνισε υψηλότερη των φυσιολογικών ορίων τιμή της PTH στον ορό.



**Εικόνα 24.** Διάγραμμα των μέσων τιμών ( $M \pm SEM$ ) της PTH στον ορό των ασθενών πριν και μετά την διατροφική παρέμβαση και της ομάδας ελέγχου.

$p=0,042$  μεταξύ των ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη και των ασθενών μετά 3 μήνες

$p=0,053$  μεταξύ των ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη και της ομάδας ελέγχου

$p=NS$  μεταξύ των ασθενών μετά 3 μήνες και της ομάδας ελέγχου

NS: non significant

## 25OHD ορού

Οι μέσες τιμές ( $M \pm SD$ ) στον ορό των ασθενών πριν και μετά την παρέμβαση δεν διαφοροποιήθηκαν σημαντικά και δεν διέφεραν από της ομάδας ελέγχου (Πίνακας 12). Ανεπάρκεια των επιπέδων της 25OHD (10 ng/mL έως <20 ng/mL) και έλλειψη αυτής (<10 ng/mL) καταγράφηκε στο 15-22% και στο 2% αντίστοιχα των ασθενών της μελέτης, αλλά και στην ομάδα ελέγχου τα ποσοστά ήταν 20% και 3% αντίστοιχα (Πίνακας 14).

**Πίνακας 14.** Κατάσταση έλλειψης, ανεπάρκειας επιπέδων της 25OHD των παιδιών της μελέτης.

	Ανεπάρκεια 25OHD 10 ng/mL έως <20 ng/mL		Έλλειψη 25OHD <10 ng/mL	
	No	%	No	%
<b>Ασθενείς κατά την ένταξη στην μελέτη</b>	11/50	22	1/50	2
<b>Ασθενείς μετά 3 μήνες</b>	7/48	15	1/48	2
<b>Ομάδα ελέγχου</b>	12/60	20	2/60	3



Οι ασθενείς και στους δύο χρόνους εκτίμησης, αλλά και η ομάδα ελέγχου διακρίθηκαν με βάση το όριο της βέλτιστης τιμής της 25OHD 30 ng/mL στον ορό. Τιμές υψηλότερες των 30 ng/mL είχε ποσοστό 56%, 54% και 53% αντίστοιχα των ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη και μετά την διατροφική παρέμβαση και της ομάδας ελέγχου. Τα επίπεδα Ca ούρων δεν διαφοροποιήθηκαν στους ασθενείς με μεγαλύτερες ή μικρότερες τιμές των 30 ng/mL της 25OHD μεταξύ τους και στους δύο χρόνους ελέγχου. Δεν βρέθηκε συσχέτιση των επιπέδων της 25OHD στον ορό και του Ca ούρων στους ασθενείς και στους δύο χρόνους ελέγχου.

### **1,25(OH)<sub>2</sub>D ορού**

Η μέση τιμή (M±SD) της 1,25(OH)<sub>2</sub>D στον ορό των ασθενών κατά την ένταξη δε διαφοροποιήθηκε από των ασθενών μετά την παρέμβαση και από της ομάδας ελέγχου. Ωστόσο, η μέση τιμή των ασθενών μετά την παρέμβαση καταγράφηκε στατιστικά σημαντικά υψηλότερη από της ομάδας ελέγχου, χωρίς όμως να φθάνουν παθολογικά επίπεδα (35,7±11,2 pg/mL και 29,2±13,6 pg/mL αντίστοιχα, p=0,035) (Πίνακας 12).

## ***Αποτελέσματα της διατροφικής παρέμβασης στους δείκτες οστικής παραγωγής και οστικής απορρόφησης στον ορό***

### **Δείκτες οστικής παραγωγής**

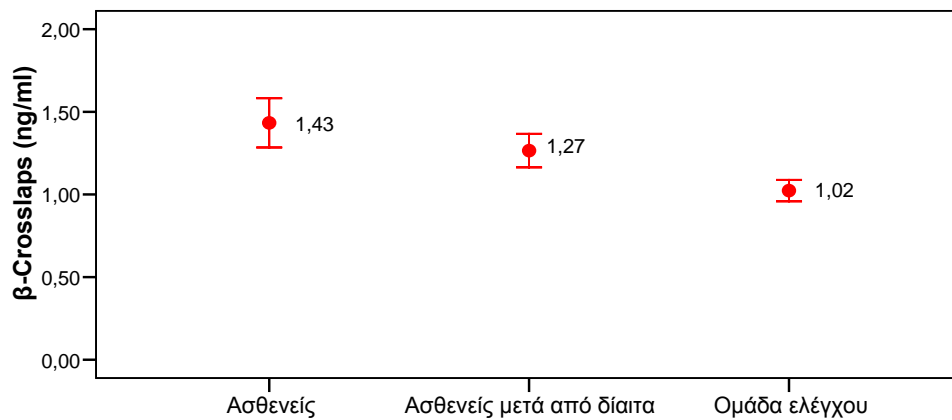
**ALP ορού:** Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά της μέσης τιμής (M±SD) της ALP στον ορό ούτε μεταξύ των ασθενών πριν και μετά την παρέμβαση, ούτε μεταξύ ασθενών και μαρτύρων (Πίνακας 10).

**OC ορού:** Η μέση τιμή (M±SD) της OC στον ορό δεν διέφερε μεταξύ των ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη και της ομάδας ελέγχου. Και γι' αυτό το λόγο δεν επανεκτιμήθηκε στους ασθενείς 3 μήνες μετά την παρέμβαση (Πίνακας 15).

### **Δείκτης οστικής απορρόφησης**

**β-Crosslaps ορού:** Η μέση τιμή (M±SD) των β-Crosslaps στον ορό καταγράφηκε στατιστικά σημαντικά αυξημένη στην ομάδα των ασθενών πριν και μετά τους 3 μήνες συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (p=0,016 και p=0,039, αντίστοιχα). Παρατηρήθηκε μείωση

της μέσης τιμής των ασθενών πριν και μετά 3 μήνες, μη στατιστικά σημαντική (Εικόνα 25) (Πίνακας 15).



**Εικόνα 25.** Διάγραμμα των μέσων τιμών ( $M \pm SEM$ ) των  $\beta$ -Crosslaps στον ορό των ασθενών πριν και μετά την διατροφική παρέμβαση και της ομάδας ελέγχου.

$p=NS$  μεταξύ των ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη και των ασθενών μετά 3 μήνες

$p=0,016$  μεταξύ των ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη και της ομάδας ελέγχου

$p=0,039$  μεταξύ των ασθενών μετά 3 μήνες και της ομάδας ελέγχου

NS: non significant

**$\beta$ -Crosslaps/OC:** Εκτιμήθηκε ο λόγος του δείκτη οστικής απορρόφησης  $\beta$ -Crosslaps προς τον δείκτη οστικής παραγωγής OC στους ασθενείς πριν την παρέμβαση και στην ομάδα ελέγχου και βρέθηκε η μέση τιμή του ( $M \pm SD$ ) στατιστικά σημαντικά αυξημένη στους ασθενείς ( $p=0,0285$ ) (Πίνακας 15).

**Πίνακας 15.** Μέση τιμή (M±SD) βιοχημικών δεικτών οστικού μεταβολισμού OC, β-Crosslaps, β-Crosslaps/OC και κυτταροκινών sRANKL, OPG και sRANKL/OPG των παιδιών της μελέτης.

Βιοχημικοί δείκτες	Ασθενείς στον χρόνο 0 (M±SD)	Ασθενείς μετά 3 μήνες (M±SD)	Ομάδα ελέγχου (M±SD)	p <sub>1</sub>	p <sub>2</sub>	p <sub>3</sub>
OC (ng/ml)	64,20±44,10	-	63,72±34,57	-	NS	-
β-Crosslaps (ng/ml)	1,432±0,789	1,265±0,575	1,023±0,485	NS	0,016	0,039
β-Crosslaps/OC	0,028±0,013	-	0,022±0,009	-	0,0285	-
OPG (pmol/L)	3,01±1,23	2,97±0,95	2,56±1,22	NS	NS	NS
sRANKL (pmol/L)	373,26±212,15	382,10±32,13	381,15±200,69	NS	NS	NS
sRANKL/OPG	145,28±108,97	141,96±99,93	207,95±269,12	NS	0,077	NS

p<sub>1</sub>: μεταξύ των ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη και των ασθενών μετά 3 μήνες

p<sub>2</sub>: μεταξύ των ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη και της ομάδας ελέγχου

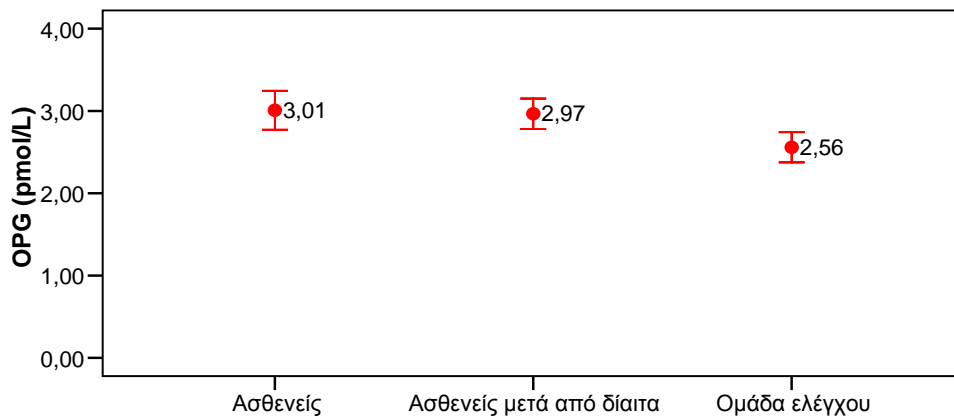
p<sub>3</sub>: μεταξύ των ασθενών μετά 3 μήνες και της ομάδας ελέγχου

NS: non significant

### **Αποτελέσματα της διατροφικής παρέμβασης στις κυτταροκίνες OPG και sRANKL στον ορό**

#### **OPG ορού**

Η μέση τιμή (M±SD) της OPG στον ορό των ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη και 3 μήνες μετά την παρέμβαση δεν διαφοροποιήθηκαν και δεν διέφεραν από τη μέση τιμή της ομάδας ελέγχου (Εικόνα 26) (Πίνακας 15).



**Εικόνα 26.** Διάγραμμα της μέσης τιμής (M±SEM) της OPG (pmol/L) στον ορό των ασθενών πριν και μετά την διατροφική παρέμβαση και της ομάδας ελέγχου.

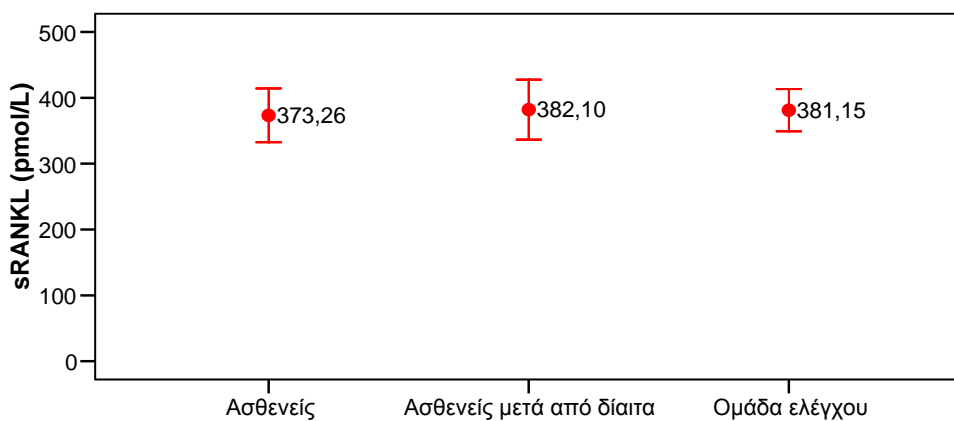
**p=NS** μεταξύ των ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη και των ασθενών μετά 3 μήνες

**p=NS** μεταξύ των ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη και της ομάδας ελέγχου

**p=NS** μεταξύ των ασθενών μετά 3 μήνες και της ομάδας ελέγχου **NS:** non significant

### sRANKL

Η μέση τιμή (M±SD) του sRANKL στον ορό των ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη και 3 μήνες μετά την παρέμβαση δε διαφοροποιήθηκαν και δεν διέφεραν από τη μέση τιμή της ομάδας ελέγχου (Εικόνα 27) (Πίνακας 15).



**Εικόνα 27.** Διάγραμμα της μέσης τιμής (M±SEM) του sRANKL (pmol/L) των ασθενών πριν και μετά την διατροφική παρέμβαση και της ομάδας ελέγχου.

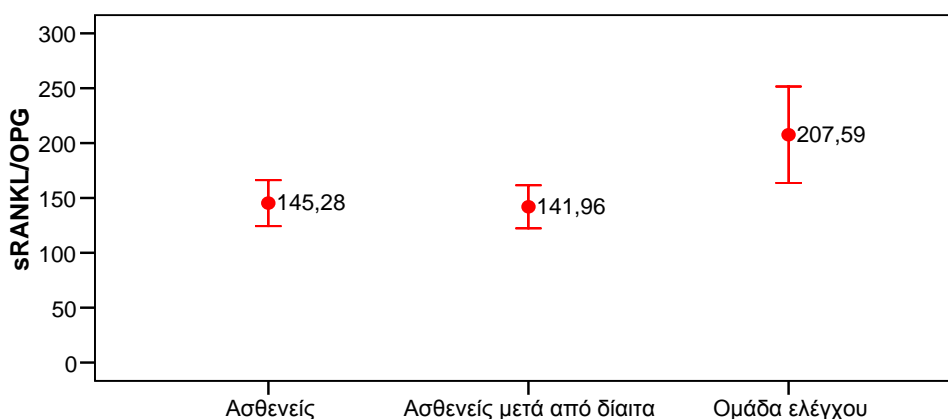
**p=NS** μεταξύ των ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη και των ασθενών μετά 3 μήνες

**p=NS** μεταξύ των ασθενών κατά την ένταξη και της ομάδας ελέγχου

**p=NS** μεταξύ των ασθενών μετά 3 μήνες και της ομάδας ελέγχου **NS:** non significant

### sRANKL/OPG ορού

Παρατηρήθηκε μία τάση για υψηλότερη μέση τιμή ( $M \pm SD$ ) του λόγου sRANKL/OPG στην ομάδα ελέγχου συγκριτικά με τούς ασθενείς κατά την ένταξη ( $p=0,077$ ) στην μελέτη και 3 μήνες μετά την παρέμβαση, χωρίς όμως να φτάνει στατιστική σημαντικότητα. Ούτε καταγράφηκε διαφοροποίηση της μέσης τιμής του sRANKL/OPG μεταξύ των ασθενών πριν και μετά την παρέμβαση (Εικόνα 28) (Πίνακας 15).



**Εικόνα 28.** Διάγραμμα της μέσης τιμής ( $M \pm SEM$ ) της σχέσης sRANKL/OPG των ασθενών πριν και μετά την διατροφική παρέμβαση και της ομάδας ελέγχου.

$p=NS$  μεταξύ των ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη και των ασθενών μετά 3 μήνες

$p=0,077$  μεταξύ των ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη και της ομάδας ελέγχου

$p=NS$  μεταξύ των ασθενών μετά 3 μήνες και της ομάδας ελέγχου

NS: non significant

### **Αποτελέσματα της γονιδιακής ανάλυσης και του προσδιορισμού των πολυμορφισμών A986S, R990G και Q1011E του γονιδίου CaSR**

Η συχνότητα των αλληλίων (ή αλληλόμορφων) των πολυμορφισμών A986S, R990G και Q1011E του γονιδίου CaSR των ασθενών και της ομάδας ελέγχου φαίνεται στον Πίνακα 16. Στην μελέτη μας καταγράφηκε σημαντική διαφοροποίηση του πολυμορφικού και του κυρίαρχου αλληλίου του πολυμορφισμού A986S ( $p=0,045$ ) μεταξύ των ασθενών και της ομάδας ελέγχου, ενώ δεν διαφοροποιήθηκε η συχνότητα των αλληλίων των πολυμορφισμών R990G και Q1011E.

**Πίνακας 16.** Συχνότητα των αλληλίων των τριών πολυμορφισμών A986S, R990G και Q1011E του γονιδίου του CaSR στους ασθενείς και στην ομάδα ελέγχου.

	<b>Ασθενείς (N=38)</b>	<b>Ομάδα ελέγχου (N=72)</b>	
<b>A986S G: wildtype</b>			
<b>G</b>	56 (74%)	123 (85%)	<b>p=0,045</b>
<b>T</b>	20 (26%)	21 (15%)	
<b>R990G A: wildtype</b>			
<b>A</b>	72 (95%)	139 (97%)	<b>p=NS</b>
<b>G</b>	4 (5%)	5 (3%)	
<b>Q1011E C: wildtype</b>			
<b>C</b>	74 (97%)	139 (97%)	<b>p=NS</b>
<b>G</b>	2 (3%)	5 (3%)	

Στην μελέτη μας βρέθηκε αυξημένη συχνότητα του ετερόζυγου (GT) και του ομόζυγου πολυμορφικού (TT) γονότυπου συγκριτικά με του ομόζυγου κυρίαρχου (GG) γονότυπου του πολυμορφισμού A986S του γονιδίου του CaSR στους ασθενείς. Δε διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές ως προς τη συχνότητα των γονότυπων των δύο άλλων πολυμορφισμών R990G και Q1011E (Πίνακας 17).

**Πίνακας 17.** Συχνότητα των ομόζυγων κυρίαρχων γονότυπων και των ετερόζυγων και ομόζυγων πολυμορφικών γονότυπων των τριών πολυμορφισμών A986S, R990G και Q1011E του γονιδίου του CaSR στους ασθενείς και στην ομάδα ελέγχου.

	<b>Ασθενείς (N=38)</b>	<b>Ομάδα ελέγχου (N=72)</b>	
<b>A986S G: wildtype</b>			
<b>GG</b>	20 (52,6%)	52 (72,2%)	<b>p=0,05</b>
<b>GT+TT</b>	18 (47,4%)	20 (27,8%)	
<b>R990G A: wildtype</b>			
<b>AA</b>	34 (89,5%)	68 (94,4%)	<b>p=NS</b>
<b>GA+GG</b>	4 (10,5%)	4 (5,6%)	
<b>Q1011E C: wildtype</b>			
<b>CC</b>	36 (94,7%)	67 (93%)	<b>p=NS</b>
<b>CG+GG</b>	2 (5,3%)	5 (7%)	





## 5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη εκτιμήθηκαν βιοχημικοί δείκτες οστικού μεταβολισμού (παραγωγής και απορρόφησης) καθώς και κυτταροκίνες σχετιζόμενες με την οστεοκλαστογένεση σε 50 παιδιά με ΙΥΑ κατά τον χρόνο της διάγνωσης και 3 μήνες μετά την σύσταση διαιτητικών οδηγιών. Ταυτόχρονα έγινε γονιδιακός έλεγχος για πολυμορφισμούς του γονιδίου CaSR, που εμπλέκεται στην παθογένεια της ΙΥΑ, στα παιδιά της μελέτης. Εξήντα υγιή παιδιά αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου και ελέγχθηκαν για τους ίδιους δείκτες οστικού μεταβολισμού και τους ίδιους γονιδιακούς πολυμορφισμούς με τους ασθενείς.

Ο πληθυσμός της μελέτης αφορούσε παιδιά που καταγόταν από την ίδια περιοχή. Η ομάδα των ασθενών και του ελέγχου είχαν την ίδια μέση, διάμεση τιμή και εύρος ηλικίας, καθώς και την ίδια αναλογία αγοριών/κοριτσιών. Τα στάδια ενήβωσης των ασθενών και των μαρτύρων αντιστοιχούσαν περίπου στα ίδια ποσοστά και αυτό είναι σημαντικό καθώς είναι γνωστό ότι οι ορμόνες του φύλου επηρεάζουν τον οστικό μεταβολισμό [209] [353]. Όλα τα παιδιά είχαν φυσιολογική νεφρική λειτουργία και δεν εμφάνιζαν πρωτεϊνουρία. Η ομάδα των ασθενών και των μαρτύρων στην μελέτη μας αποτελούν συγκρίσιμες ομάδες.

Από την ανάλυση των ανθρωπομετρικών στοιχείων διαφοροποιήθηκε μόνο ο ΔΜΣ, που ήταν υψηλότερος στα παιδιά της ομάδας ελέγχου, αλλά όχι υψηλός. Το ύψος των ασθενών δεν διαφοροποιήθηκε από των υγιών μαρτύρων, που σημαίνει ότι η ΙΥΑ δεν επηρέασε την κατά μήκος αύξηση των ασθενών.

Με την ολοκλήρωση της προοπτικής μελέτης από τις αναφορές των γονέων, σχετικά με την εφαρμογή των διατροφικών οδηγιών, καταγράφηκε ότι η μεγάλη πλειοψηφία των ασθενών (80%) εφάρμοσε σχεδόν πλήρως τις οδηγίες και ότι μια μικρή μειοψηφία τις ακολούθησε μερικώς ή καθόλου.

## ***Επίδραση της διατροφικής παρέμβασης στα Na-K-Ca-Pi ούρων, οξαλικά και κιτρικά ούρων***

### **Na, K, Na/K ούρων**

Μετά την εφαρμογή των διατροφικών οδηγιών από τους ασθενείς, η μέση τιμή του Na είχε μείωση και η μέση τιμή του K αύξηση στις συλλογές ούρων 24ώρου, που όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Ωστόσο, η μέση τιμή του λόγου Na/K ούρων 24ώρου στους ασθενείς κατά την ένταξη στην μελέτη, από λίγο υψηλότερη του 2,5 κατά τον επανέλεγχο των ασθενών βρέθηκε πολύ χαμηλότερη (2,19). Το 2,5 θεωρείται η ανώτερη επιθυμητή τιμή του λόγου Na/K ούρων για τη διατροφική αντιμετώπιση της ΙΥΑ [18] και η παρατηρηθείσα σχετική μείωσή του συνηγορεί υπέρ της μερικής τουλάχιστον συμμόρφωσης των ασθενών με τις οδηγίες.

### **Ca ούρων**

Στο ίδιο διάστημα, η μέση τιμή απέκκρισης Ca στα ούρα 24ώρου των ασθενών μειώθηκε στατιστικά σημαντικά, χωρίς όμως να φτάνει τα φυσιολογικά επίπεδα. Επίσης καταγράφηκε στατιστικά σημαντική μείωση της μέσης τιμής του κλάσματος UCa/Ucre στα ούρα των ασθενών μετά τους 3 μήνες και η μέση τιμή του στους ασθενείς πριν αλλά και μετά τη διατροφική παρέμβαση διέφερε στατιστικά σημαντικά από των μαρτύρων. Η μη επίτευξη φυσιολογικών τιμών απέκκρισης Ca στα ούρα 24ώρου μπορεί να οφείλεται στην μερική συμμόρφωση των ασθενών με τις οδηγίες ή σε αναγκαιότητα για μεγαλύτερο διάστημα παρακολούθησης ή ακόμη και για περαιτέρω θεραπευτική αντιμετώπιση.

Η ΥΑ έχει ενοχοποιηθεί για μείωση της ΟΠ ακόμη και σε παιδιά. Οι Skalona και συν. σε μία μελέτη τους το 2005 σε 15 παιδιά με ΙΥΑ, βρήκαν σημαντικά υψηλότερη μέση τιμή της N-ακετυλ-β-D-γλυκοζαμινιδάσης (N-acetyl-β-D-glucosaminidase, NAG), ενός δείκτη δυσλειτουργίας του νεφρικού σωληναρίου και οστεοπενία ή σημαντικά χαμηλότερη ΟΠ της ΟΜΣΣ σε 9 από αυτά συγκριτικά με τις τιμές αναφοράς αντίστοιχου υγιούς ευρωπαϊκού παιδιατρικού πληθυσμού. Επιπλέον, υπήρχε μια αντίστροφη στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της ΟΠ και του Ca ούρων 24ώρου [24].

Σε ενήλικες επίσης με ΙΥΑ και λιθίαση οι Asplin και συν. σε μια προοπτική μελέτη ασθενών και συγγενών τους, διάρκειας 3 χρόνων, βρήκαν θετική συσχέτιση απώλειας ΟΠ με την πάροδο του χρόνου και την αυξημένη απέκκριση Ca ούρων 24ώρου [354]. Τα παραπάνω

ευρήματα οδηγούν στην υπόθεση ότι η βαρύτητα και η διάρκεια της ΥΑ επιδρούν αρνητικά στην υγεία των οστών, οπότε η αντιμετώπιση αυτών των ασθενών είναι επιβεβλημένη ανεξάρτητα αν εμφανίζουν ουρολιθίαση ή όχι.

### **Pi ούρων**

Η απέκκριση φωσφορικών στα ούρα των ασθενών ήταν στα φυσιολογικά όρια και δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στην απέκκρισή τους μετά τη δίαιτα παρά τα οριακά χαμηλότερα επίπεδα Pi στον ορό που είχαν κατά την ένταξή τους στη μελέτη.

Υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν απώλεια φωσφορικών στα ούρα, κυρίως όμως σε ασθενείς με νεφρολιθίαση και μάλιστα χωρίς υψηλά επίπεδα PTH [260, 264].

Στη δική μας μελέτη οι ασθενείς με νεφρολιθίαση αποτελούσαν ένα πολύ μικρό ποσοστό ώστε να μην επηρεάζουν τα αποτελέσματα. Η απώλεια Pi στα ούρα ενέχεται στην παθοφυσιολογία της ΙΥΑ και αποτελεί ένδειξη διαταραχής της νεφρικής επαναρρόφησης του P [263].

### **Οξαλικά ούρων**

Η μέση τιμή των οξαλικών αλάτων στα ούρα 24ώρου των ασθενών μετά την παρέμβαση εμφάνισε μία τάση αύξησης. Αλλά οι τιμές σε ατομικό επίπεδο ήταν στα φυσιολογικά όρια με εξαίρεση ενός ασθενή πριν και τριών μετά την παρέμβαση που ήταν υψηλότερες των φυσιολογικών (μεταξύ αυτών δεν συμπεριλαμβάνονταν ο ένας ασθενής από πριν). Έχει αναφερθεί ότι αύξηση απέκκρισης των οξαλικών μπορεί να προκληθεί από την αύξηση των προσλαμβανόμενων φρούτων και λαχανικών, η οποία αυξάνει την εντερική απορρόφηση των οξαλικών αλάτων και στη συνέχεια την απέκκρισή τους στα ούρα [355]. Επίσης η πρόσληψη Ca, βάση των συνιστώμενων ημερήσιων αναγκών για την ηλικία στα παιδιά με ΙΥΑ, συχνά μειώνει τη συγκέντρωση Ca στο έντερο (στα παιδιά που λάμβαναν περισσότερες των αναγκαίων ποσοτήτων Ca). Το αποτέλεσμα είναι να μειώνει την πιθανότητα αντίδρασής του με τα οξαλικά και τη μετατροπή τους σε αδιάλυτα άλατα οξαλικού ασβεστίου, που δεν απορροφούνται από το έντερο. Έτσι τα αυξημένα ελεύθερα ευδιάλυτα οξαλικά άλατα απορροφούνται ευκολότερα από το γαστρεντερικό, αυξάνοντας τη συγκέντρωσή τους στον ορό και τη νεφρική τους απέκκριση [356].

Γι' αυτό το λόγο απαιτείται προσοχή κατά τη διαιτητική αντιμετώπιση της ΙΥΑ, καθώς μπορεί να προκληθεί δευτεροπαθής υπεροξαλουρία, που είναι άλλος ένας παράγοντας

λιθογένεσης [355]. Επανεκτίμηση των αποτελεσμάτων της διατροφικής παρέμβασης επιβάλλεται να γίνεται τακτικά με μέτρηση οξαλικών ούρων και αναλόγως τροποποίηση ώστε να αποφευχθεί αυτή η παρενέργεια, το οποίο έγινε και στους παραπάνω δικούς μας ασθενείς.

### **Κιτρικά ούρων**

Δεν καταγράφηκε μεταβολή των μέσων τιμών απέκκρισης των κιτρικών αλάτων στα ούρα 24ώρου, στην ομάδα των ασθενών κατά την επανεκτίμηση. Οι ασθενείς μας παρά την αύξηση πρόσληψης φρούτων και λαχανικών για διάστημα 3 μηνών δεν βελτίωσαν την υποκιτρουρία τους.

Επίσης, η οξεοβασική κατάστασή τους και στους 2 χρόνους εκτίμησης δεν διαφοροποιήθηκε, καθώς οι μέσες τιμές του pH και των  $\text{HCO}_3$  στο φλεβικό αίμα παρέμειναν αδιαφοροποίητες και όμοιες με της ομάδας ελέγχου.

Η οξεοβασική ισορροπία ρυθμίζεται κατά έναν σημαντικό βαθμό από την επαναρρόφηση των κιτρικών αλάτων στο PCT. Σε συστηματική οξέωση, αυξάνεται η επαναρρόφηση των κιτρικών, ώστε να χρησιμοποιηθούν στον κύκλο του Krebs [357]. Καταστάσεις που συνδέονται με χαμηλότερο ενδοκυττάριο pH και pH ούρων, όπως η μεταβολική οξέωση και η υποκαλιαιμία, προκαλούν μειωμένη απέκκριση κιτρικών στα ούρα. Αντίθετα, η αλκάλωση μειώνει την επαναρρόφηση κιτρικών, με αποτέλεσμα την αυξημένη απέκκριση κιτρικών στα ούρα [358]. Η οξεοβασική ισορροπία, υπό φυσιολογικές συνθήκες, επηρεάζεται από την καθαρή παραγωγή ενδογενούς οξέος που σχετίζεται με τη διαιτητική πρόσληψη οξέος και αλκάλεος και τον ατελή μεταβολισμό των οργανικών οξέων. Η κύρια διαιτητική πηγή αλκάλεος είναι τα άλατα K που υπάρχουν στα φρούτα και τα λαχανικά, ενώ οι μη γαλακτοκομικών προϊόντων ζωικές πρωτεΐνες, όπως αυτές που υπάρχουν στο κρέας, τα πουλερικά, τα ψάρια και τα αυγά, που περιέχουν αμινοξέα με ομάδες θείου, αντιπροσωπεύουν την κύρια πρόσληψη διαιτητικών οξέων [304].

Η υποκιτρουρία είναι κοινή μεταβολική διαταραχή στην ουρολιθίαση, με επιπολασμό που κυμαίνεται στο 20-60% και μπορεί να είναι η μόνη ή να συνυπάρχει με άλλη λιθογόνο μεταβολική διαταραχή. Στα παιδιά πολύ πιθανόν να οφείλεται σε αυξημένη πρόσληψη άλατος και ζάχαρης και σε μικρότερη από τη συνιστώμενη ημερήσια δόση κατανάλωση φρούτων και λαχανικών [359]. Στις δυτικές χώρες, έχει αποδειχθεί ότι τα παιδιά έχουν μια εξαιρετικά χαμηλή μέση πρόσληψη λαχανικών και παρά το ότι η κατανάλωση φρούτων

παρουσιάζει ελαφρά αύξηση κατά τα τελευταία χρόνια, ακόμη παραμένει χαμηλότερη από τη συνιστώμενη [360].

Γι' αυτό το λόγο συνιστάται από τις περισσότερες διεθνείς οδηγίες, η θεραπευτική χορήγηση αλκαλικών κιτρικών (όπως κιτρικό Na, κιτρικό K-Mg και κυρίως κιτρικό K) σε ουρολιθίαση με υποκιτρουρία και για πρόληψη υποτροπής λιθίασης [361]. Στους ασθενείς μας, οι οποίοι δεν εμφάνισαν μείωση της ΥΑ αν και είχαν εφαρμόσει τις διατροφικές οδηγίες, στην συνέχεια χορηγήθηκαν άλατα κιτρικών.

Το 2006 οι Penido και συν. που μελέτησαν 88 παιδιά και εφήβους με ΙΥΑ, 44 με ιδιοπαθή υποκιτρουρία και 44 χωρίς, διαπίστωσαν ότι τα παιδιά με υποκιτρουρία είχαν σημαντικά χαμηλότερο ύψος, ΔΜΣ, οστική ηλικία και μεγαλύτερη μείωση της ΟΠ, ενώ δεν είχαν μεταβολική οξέωση. Οι συγγραφείς συμπέραναν ότι η παρουσία υποκιτρουρίας σε παιδιά με ΙΥΑ επηρεάζει αρνητικά την αύξηση [244]. Εντόπισαν επίσης μια σημαντική μείωση του αρτηριακού pH και  $\text{HCO}_3$  στην ομάδα με υποκιτρουρία, αν και τα φλεβικά αέρια αίματος ήταν φυσιολογικά σε όλους τους ασθενείς, όπως και στη δική μας ομάδα.

Στην ομάδα των ασθενών μας δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση των κιτρικών ούρων με το ΔΜΣ, ούτε με το ύψος και στους δύο χρόνους εκτίμησης.

## ***Επίδραση της διατροφικής παρέμβασης στο Ca, Pi, PTH, VitD στον ορό***

### **Ca και Pi ορού**

Δεν καταγράφηκε διαφοροποίηση της μέσης τιμής των επιπέδων Ca στον ορό στην ομάδα των ασθενών πριν και μετά την παρέμβαση και στην ομάδα ελέγχου. Εξ ορισμού, το Ca στον ορό στην ΙΥΑ είναι φυσιολογικό, όπως καθορίστηκε το 1953 από τους Albright και συν. [14], παρά την επιμένουσα ΥΑ υπό κανονική ή περιορισμένη πρόσληψη Ca [48, 362]. Στο ισοζύγιο του Ca στην ΙΥΑ συμβάλλει η αυξημένη εντερική απορρόφηση του Ca, η αυξημένη νεφρική απέκκριση του Ca και η μετακίνηση Ca από τα οστά [283].

Η μέση τιμή του Pi στον ορό των ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ( $p=0,049$ ) και δεν έφτασε στα επίπεδα της ομάδας ελέγχου. Ωστόσο κανένα παιδί δεν είχε υποφωσφαταιμία.

Είναι γνωστό από πολλές δεκαετίες ότι πολλοί ασθενείς με ΙΥΑ εμφανίζουν χαμηλότερα επίπεδα Pi στον ορό έως και πολύ χαμηλά στο 15-20% αυτών [263, 363, 364].

Οι Prie και συν. μελέτησαν ασθενείς με ΙΥΑ και λίθους Ca και βρήκαν σημαντικά αυξημένη απέκκριση P σε σύγκριση με υγιών ατόμων και φυσιολογικά επίπεδα PTH. Η απώλεια P στα ούρα, που μειώνει τα επίπεδα Pi στον ορό, δεν φαίνεται να οφείλεται σε αυξημένα επίπεδα της PTH [260, 264]. Ωστόσο, η μείωση των επιπέδων Pi στον ορό μπορεί να αυξάνει τα επίπεδα της 1,25(OH)<sub>2</sub>D και κατά συνέπεια την απορρόφηση του Ca από το έντερο αλλά και τη μετακίνησή του από τα οστά, με επακόλουθο την επιδείνωση της ΥΑ και της ΟΠ [261].

Στην παρούσα μελέτη παρά τα ελαφρώς χαμηλότερα επίπεδα Pi στον ορό η απέκκρισή τους από τα ούρα ήταν μέσα στα φυσιολογικά όρια. Άλλωστε το ποσοστό των παιδιών με λίθους ήταν μικρό. Σε άλλη μελέτη τους οι Penido και συν. σε παιδιά με ΙΥΑ και μάρτυρες, όπου το 35% των ασθενών είχαν οστεοπενία ΟΜΣΣ, δεν κατέγραψαν διαφορά στην τιμή του Pi στον ορό [243].

Η διατήρηση επαρκών επιπέδων Pi είναι ζωτικής σημασίας για τη δραστηριότητα των OB και OK. Ο Pi και το Ca είναι τα δύο κύρια ιοντικά συστατικά που απαιτούνται για το σχηματισμό υδροξυαπατίτη κατά τη διάρκεια της επιμετάλλωσης της εξωκυττάριας ουσίας στο οστό [365].

Απαιτείται η δράση της ALP για την παραγωγή επαρκούς Pi. Σε καταστάσεις υποφωσφαταιμίας, η δραστηριότητα της ALP αυξάνεται, προκειμένου να εφοδιαστούν τα κύτταρα των οστών με περισσότερο Pi [96].

Στη μελέτη μας αν και οι ασθενείς είχαν χαμηλότερα επίπεδα Pi στον ορό κυρίως κατά την ένταξη, συγκριτικά με τους μάρτυρες, δεν εμφάνισαν υποφωσφαταιμία ούτε αύξηση της ALP. Όλα τα παιδιά είχαν τιμές Pi ορού >4 mg/dl, εκτός από δύο που οι τιμές τους ήταν 3,6 και 3,8 mg/dl.

## **PTH ορού**

Στη μελέτη μας καταγράφηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της μέσης τιμής των επιπέδων της PTH στον ορό των ασθενών κατά τον επανέλεγχο ( $p=0,042$ ) που έφτασε τη μέση τιμή των μαρτύρων, ενώ συγκριτικά ήταν οριακά χαμηλότερη κατά την ένταξη στην μελέτη ( $p=0,053$ ).

Το ποσοστό των ασθενών, που είχαν χαμηλότερες των φυσιολογικών τιμές της PTH στον ορό, από 18% στο χρόνο 0 μειώθηκε σε 4% στον επανέλεγχο, προσεγγίζοντας το 5% των παιδιών της ομάδας ελέγχου και κανένα παιδί της μελέτης δεν εμφάνισε υψηλότερη των

φυσιολογικών τιμή. Φαίνεται σαφώς ότι η τροποποίηση της διατροφής στους ασθενείς βελτίωσε τα επίπεδα της PTH.

Στη βιβλιογραφία έχει καταγραφεί και αυξημένη τιμή της PTH στον ορό σε ενήλικες ασθενείς με ΙΥΑ, σε ποσοστό όμως που δεν υπερβαίνει το 2-3% [366].

Οι περισσότεροι ασθενείς με ΙΥΑ έχουν φυσιολογικά [263] ή φυσιολογικά/οριακά χαμηλότερα επίπεδα PTH στον ορό [367, 368]. Σύμφωνα με τους Hess και Jaeger (1993) η πρωτοπαθής εντερική υπεραπορρόφηση του Ca στην ΙΥΑ οδηγεί σε μείωση της έκκρισης της PTH [369]. Σε μελέτη τους με ενήλικες άνδρες με ιδιοπαθείς ασβεστούχους λίθους και ίδια επίπεδα Ca στον ορό, καταγράφηκε χαμηλότερο επίπεδο PTH στον ορό σε εκείνους που ήταν υπερασβεστιουρικοί σε σύγκριση με τους μη υπερασβεστιουρικούς ασθενείς [370]. Παρόμοια ευρήματα ανέφεραν και οι Kim και συν., πολλά χρόνια αργότερα [371].

Οι Giannini και συν. επίσης δεν θεωρούν ότι η PTH διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της απώλειας του Ca από τα οστά στην ΙΥΑ, καθώς τα επίπεδα της PTH στον ορό στην ΙΥΑ είναι γενικά φυσιολογικά ή προς τα κατώτερα όρια, εκτός από μία μικρή μειοψηφία ασθενών που εμφανίζουν υψηλά επίπεδα [372]. Αυτή η θεωρία υποστηρίζεται και από ευρήματα σε παιδιά με ΙΥΑ, όπου ενώ εμφάνιζαν μειωμένη ΟΠ σε ποσοστό 35-38%, τα επίπεδα της  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  και PTH ήταν φυσιολογικά ή λίγο χαμηλότερα από των μαρτύρων [26, 243].

Στους ασθενείς με ΙΥΑ τα επίπεδα του Ca στα ούρα είναι σταθερά υψηλότερα σε οποιοδήποτε επίπεδο απορρόφησης του Ca από το έντερο σε αντίθεση με τα υγιή άτομα. Σε μελέτες με ελεγχόμενες δίαιτες, βρέθηκε η απέκκριση του Ca στα ούρα συχνά να είναι υψηλότερη από την εντερική απορρόφηση, που σημαίνει ότι ένα σημαντικό μέρος του Ca ούρων προέρχεται από τα οστά [249]. Ασθενείς με ΙΥΑ που τέθηκαν σε χαμηλή σε Ca και ελεύθερη κατά τα άλλα δίαιτα δεν εμφάνισαν διαφοροποίηση των επιπέδων Ca στον ορό και αντί αύξησης της PTH παρουσίασαν χαμηλότερα επίπεδα [373]. Συνολικά, φαίνεται ότι η διαταραγμένη νεφρική διαχείριση του Ca στην ΙΥΑ δεν προστατεύει αλλά επιτρέπει την οστική απώλεια Ca. Έτσι, ακόμη και σε χαμηλή σε Ca δίαιτα, εξισορροπούνται οι νεφρικές απώλειες, διατηρώντας φυσιολογικό το Ca παρά την κατασταλαμμένη PTH [367].

Αντίθετα η κατασταλαμμένη PTH, συμβάλλει στην αύξηση της απέκκρισης του Ca από τα νεφρικά σωληνάρια σύμφωνα με τους Worcester and Coe (2008). Σε ασθενείς με ΙΥΑ και ουρολιθίαση και υγιή άτομα κατά τη διάρκεια τριών γευμάτων την ημέρα, υπό δίαιτες που περιείχαν ισοδύναμες ποσότητες καθημερινά Ca (1160 mg), Pi (1240 mg), Na (2141 mg) και

K (2427 mg), βρήκαν ότι το διηθημένο φορτίο του Ca δεν διέφερε μεταξύ των υγιών ατόμων και εκείνων με ΙΥΑ, ούτε σε νηστεία, ούτε μεταγευματικά. Ωστόσο, η απέκκριση Ca στα ούρα ήταν σημαντικά υψηλότερη μετά τα γεύματα σε άτομα με ΙΥΑ και η κλασματική επαναρρόφηση ήταν χαμηλότερη τόσο κατά τη διάρκεια της νηστείας όσο και της μεταποροφητικής περιόδου. Ως εκ τούτου, η αυξημένη ποσότητα Ca που απορροφήθηκε με τα γεύματα στους ασθενείς με ΙΥΑ αποβλήθηκε στα ούρα κυρίως μέσω μειωμένης σωληναριακής επαναρρόφησης, ενώ οι τιμές των επιπέδων της PTH δεν διέφεραν μεταξύ υγιών και ατόμων με ΙΥΑ, είτε νηστείας είτε μεταγευματικά. Αν και οι τιμές των επιπέδων της PTH μειώθηκαν με τα γεύματα και στις δύο ομάδες, δε διαφοροποιήθηκαν και σε κάθε δεδομένο επίπεδο της PTH η επαναρρόφηση του Ca ήταν σημαντικά χαμηλότερη στα άτομα με ΙΥΑ. Ούτε η απέκκριση Na στα ούρα διέφερε μεταξύ των δύο ομάδων, όπως αναμενόταν σε αυτή την ελεγχόμενη διαίτα [374].

Τα ευρήματα της μελέτης μας σχετικά με τα χαμηλότερα επίπεδα της PTH στον ορό των ασθενών με ΙΥΑ κατά την ένταξη στη μελέτη συμφωνούν με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας. Μετά δε τη διαιτητική παρέμβαση, καταγράφεται αύξηση της μέσης τιμής της PTH στον ορό των ασθενών και μάλιστα σε συγκρίσιμα επίπεδα με των μαρτύρων, που συσχετίζεται με τη μείωση της ΥΑ των ασθενών.

## **25OHD ορού**

Δεν διαφοροποιήθηκαν στατιστικά σημαντικά οι μέσες τιμές των επιπέδων της 25OHD μεταξύ των ομάδων των παιδιών αλλά ένα 15-22% των παιδιών της μελέτης είχε ανεπάρκεια (25OHD <20 ng/mL) και ένα 2-3% είχε έλλειψη (25OHD <10 ng/mL).

Ανεπάρκεια της 25OHD έχει βρεθεί σε μελέτες παιδιών με ΙΥΑ. Οι Artemiuk και συν. συσχέτισαν θετικά την ανεπάρκεια της 25OHD με μειωμένη ΟΠ της ΟΜΣΣ [278].

Επίσης, έχει απασχολήσει αρκετούς ερευνητές στο παρελθόν κατά πόσο υψηλά επίπεδα της 25OHD με φυσιολογικά επίπεδα της 1,25(OH)<sub>2</sub>D στον ορό, θα προκαλούσαν υπεραπορρόφηση Ca και ΥΑ. Αν και γενικά θεωρείται ότι η 25OHD δεν συνδέεται με τους VDRs, καθώς εμφανίζει 2400 φορές χαμηλότερη χημική συγγένεια από την 1,25(OH)<sub>2</sub>D και μόλις 1000 φορές υψηλότερη συγκέντρωση [247], οι Heaney και συν. έδειξαν ότι ένα ποσοστό 18% της ενεργούς εντερικής μεταφοράς του Ca σε υγιή άτομα μπορεί να αποδοθεί στην 25OHD [375]. Επίσης σε μία άλλη μελέτη ανέφεραν μια αδύναμη θετική συσχέτιση μεταξύ της απέκκρισης του Ca και των επιπέδων της 25OHD στον ορό [376].



Στην παρούσα μελέτη έγινε και διαχωρισμός των παιδιών βάση της αναφερόμενης βέλτιστης τιμής της 25OHD των 30 ng/ml. Τα ποσοστά των παιδιών με ΙΥΑ που είχαν υψηλότερα επίπεδα αυτής της τιμής δεν διαφοροποιήθηκαν ούτε μεταξύ τους και στους δύο χρόνους εκτίμησης, ούτε με την ομάδα ελέγχου. Ούτε υπήρχε διαφοροποίηση στα επίπεδα του Ca ούρων 24ώρου μεταξύ των ασθενών με υψηλότερη ή χαμηλότερη των 30 ng/ml τιμή της 25OHD και στους δύο χρόνους μέτρησης. Στους ασθενείς της μελέτης μας δεν καταγράφηκε συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της 25OHD στον ορό και του Ca ούρων 24ώρου και στους δύο χρόνους εκτίμησης.

### **1,25(OH)<sub>2</sub>D**

Οι μέσες τιμές της 1,25(OH)<sub>2</sub>D στον ορό των ασθενών πριν και μετά τη διατροφική παρέμβαση ήταν φυσιολογικές. Όμως η μέση τιμή των επιπέδων της 1,25(OH)<sub>2</sub>D στους ασθενείς μετά την παρέμβαση βρέθηκε σημαντικά υψηλότερη συγκριτικά με τη μέση τιμή της ομάδας ελέγχου.

Η 1,25(OH)<sub>2</sub>D είναι πιο σημαντική σε σύγκριση με την 25OHD, γιατί αποτελεί τον ενεργό μεταβολίτη της για τη διαμεσολάβηση των βιολογικών δράσεων της VitD επί του Ca και του οστικού μεταβολισμού [377].

Τα επίπεδα της 1,25(OH)<sub>2</sub>D στον ορό είναι εξαιρετικά ευαίσθητα στις μεταβολές της ποσότητας του προσλαμβανόμενου Ca στα υγιή αλλά και στα υπερασβεστιουργικά άτομα. Ο μεταβολισμός της 1,25(OH)<sub>2</sub>D μπορεί να είναι επηρεασμένος σε ασθενείς με απορροφητική ΙΥΑ [378]. Ασθενείς με ΙΥΑ συχνά έχουν αυξημένα επίπεδα της 1,25(OH)<sub>2</sub>D ή αυξημένη ευαισθησία στην ορμόνη με φυσιολογικά επίπεδα αυτής. Υψηλά επίπεδα της 1,25(OH)<sub>2</sub>D παρατηρούνται σε άτομα με αυξημένη εντερική απορρόφηση Ca ή αυξημένη απέκκριση P στα ούρα [379]. Η υπερβολική φωσφατουρία και μείωση των επιπέδων Pi στον ορό, μπορεί να ευθύνεται για αυξημένη παραγωγή 1,25(OH)<sub>2</sub>D και δευτερευόντως για εντερική υπεραπορρόφηση Ca [264]. Χορήγηση 1,25(OH)<sub>2</sub>D σε υγιή άτομα μπορεί να αναπαράξει ένα μεγάλο μέρος της εικόνας της ΙΥΑ [265].

Η σημαντικότητα της 1,25(OH)<sub>2</sub>D στην ΙΥΑ αποδείχθηκε και σε μια μελέτη υπερασβεστιουργικών ατόμων που έλαβαν αγωγή με κετοκοναζόλη, έναν αναστολέα του CYP450, που μειώνει τα επίπεδα της 1,25(OH)<sub>2</sub>D κατά 30-40%. Τα 2/3 των ασθενών μείωσαν σημαντικά την εντερική απορρόφηση αλλά και τη νεφρική απέκκριση του Ca, ενώ είχαν παραμείνει υπό την ίδια δίαιτα, γεγονός που αποδόθηκε εν μέρει στη δράση της

1,25(OH)<sub>2</sub>D. Στο υπόλοιπο 1/3 των ασθενών επηρεάστηκε ελάχιστα ή καθόλου η εντερική απορρόφηση και η νεφρική απέκκριση Ca, παρά τη μείωση των επιπέδων της 1,25(OH)<sub>2</sub>D και επιπλέον τα 3/4 των ασθενών, που ανταποκρίθηκαν στην κετοκοναζόλη, δεν είχαν αρχικά αυξημένα επίπεδα 1,25(OH)<sub>2</sub>D. Άρα οι διαταραχές σε αυτούς τους ασθενείς φαίνεται να είναι ανεξάρτητες από τα επίπεδα της 1,25(OH)<sub>2</sub>D, αλλά πιθανότατα να οφείλονται σε αυξημένη ευαισθησία των ιστών στην 1,25(OH)<sub>2</sub>D [267].

Σε GHS αρουραίους, παρατηρείται αυξημένη έκφραση του VDR στο έντερο, που οδηγεί σε αυξημένη εντερική απορρόφηση του Ca, ακόμη και χωρίς αυξημένες τιμές 1,25(OH)<sub>2</sub>D [268]. Είναι ακόμη ασαφές αν ο αριθμός των VDR είναι αυξημένος σε κάποιους ασθενείς με ΙΥΑ, παρ' ότι οι Favus και συν. βρήκαν διπλάσια επίπεδα των VDR σε μονοκύτταρα αίματος ασθενών με ΙΥΑ, με φυσιολογικά επίπεδα της 1,25(OH)<sub>2</sub>D [272].

Η 1,25(OH)<sub>2</sub>D ρυθμίζει θετικά την έκφραση πρωτεϊνών μεταφοράς του Ca στο έντερο, όπως TRPV6 και καλβιδίνης και επομένως και την απορρόφηση του Ca. Ωστόσο σε ασθενείς με ΙΥΑ, η εντερική απορρόφηση του Ca φαίνεται να αυξάνεται δυσανάλογα με τα επίπεδα της 1,25(OH)<sub>2</sub>D και έχει παρατηρηθεί υπερέκφραση γονιδίων στο έντερο, που προάγουν την αυξημένη παραγωγή TRPV6 και καλβιδίνης, σε απόκριση μικρών δόσεων 1,25(OH)<sub>2</sub>D [19].

Ο CaSR είναι γονίδιο που αποκρίνεται στην 1,25(OH)<sub>2</sub>D. Αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης και mRNA του γονιδίου CaSR έχουν επίσης βρεθεί στους νεφρούς των GHS αρουραίων σε σύγκριση με υγιείς, που τρέφονταν με την ίδια δίαιτα [271].

Η αυξημένη 1,25(OH)<sub>2</sub>D σε ασθενείς με ΙΥΑ θεωρήθηκε αρχικά ότι επάγει την οστική απορρόφηση [265]. Όμως αυξημένα επίπεδα 1,25(OH)<sub>2</sub>D περιγράφονται πιο συχνά σε ασθενείς με απορροφητική ΙΥΑ, που εμφανίζουν γενικά φυσιολογική ή ελαφρά μειωμένη ΟΠ. Φαίνεται ότι τα αυξημένα επίπεδα της 1,25(OH)<sub>2</sub>D μάλλον έχουν προστατευτική, παρά επιζήμια επίδραση στην οστική μάζα σε ασθενείς με ΙΥΑ και ουρολιθίαση [247, 366].

Στην μελέτη μας τα επίπεδα της 1,25(OH)<sub>2</sub>D στον ορό των ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη δεν διαφοροποιήθηκαν από των μαρτύρων. Παρόμοια και σε μελέτη παιδιών με ΙΥΑ και μειωμένη ΟΠ στο 38% αυτών, δεν καταγράφηκε διαφοροποίηση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D μεταξύ των ασθενών και των μαρτύρων [26]. Όμως στους ασθενείς της μελέτης μας μετά την παρέμβαση καταγράφηκε μία μικρή αύξηση συγκριτικά με των μαρτύρων, αλλά μέσα στα φυσιολογικά πλαίσια. Πιθανά η αύξηση αντανακλά έναν αντιρροπιστικό μηχανισμό για τη διατήρηση των επιπέδων Ca στον ορό και την προαγωγή της επιμετάλλωσης των οστών.

## ***Επίδραση της διατροφικής παρέμβασης στους δείκτες οστικής παραγωγής στον ορό***

### **ALP ορού**

Οι μέσες τιμές των επιπέδων της ALP στον ορό δε διαφοροποιήθηκαν στην ομάδα των ασθενών πριν και μετά την εφαρμογή των διατροφικών οδηγιών αλλά ούτε και συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Ωστόσο, στη βιβλιογραφία υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα.

Οι Polito και συν. σε μία αναδρομική μελέτη παιδιών με ΙΥΑ, χωρίς νεφρασβέστωση διάρκειας 4-13 ετών, κατέγραψαν την αύξησή τους και εκτίμησαν την ΟΠ καθώς και βιοχημικούς δείκτες οστικού μεταβολισμού. Βρήκαν ότι το ύψος των παιδιών, οι τιμές της ALP και PTH ήταν φυσιολογικές και μειωμένη η ΟΠ της ΟΜΣΣ στο 11,5% των παιδιών, κυρίως σε αυτά που είχαν και υπερουρικοζουρία [380].

Στη μελέτη των Penido και συν. παιδιών με ΙΥΑ κατά το χρόνο της διάγνωσης, βρέθηκε οστεοπενία ΟΜΣΣ στο 35% και αυξημένη τιμή της ALP συγκριτικά με τους μάρτυρες [243].

Σε ενήλικες οι μετρήσεις της ALP των ασθενών με απορροφητικού τύπου ΙΥΑ ήταν συγκρίσιμες με της ομάδας ελέγχου [288]. Επίσης οι Kuczera και συν. σε μελέτη με ενήλικες με ΙΥΑ, βρήκαν ότι είτε είχαν ενεργό, ή μη-ενεργό λιθίαση είχαν την ίδια δραστηριότητα του ενζύμου της ολικής ALP με τους υγιείς μάρτυρες [381].

Στην μελέτη μας η μη διαφοροποίηση της ALP συμβαδίζει και με τη φυσιολογική αύξηση αυτών των παιδιών.

### **OC ορού**

Η μέση τιμή της OC στον ορό στους ασθενείς κατά την ένταξη στην μελέτη δε διέφερε από αυτή της ομάδας ελέγχου.

Άλλοι ερευνητές όπως οι Penido και συν. κατέγραψαν μόλις οριακά αυξημένη OC στον ορό παιδιών με ΙΥΑ, που το 35% εμφάνιζε οστεοπενία ( $p=0,09$ ) [243] και οι Garcia-Nieto και συν. ανέφεραν υψηλά επίπεδα OC στον ορό σε παιδιά λευκής φυλής με ΙΥΑ, που το 30% αυτών εμφάνιζε οστεοπενία. Η αύξηση της OC μπορεί να αποδοθεί σε αύξηση είτε της οστικής παραγωγής είτε του οστικού ανασχηματισμού. Αυτά τα παιδιά είχαν επίσης υψηλότερη  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  στον ορό και Prostaglandin E2 στα ούρα, που είναι γνωστοί διεγέρτες οστικής απορρόφησης. Η ΟΠ συσχετίστηκε αρνητικά με την ηλικία, γεγονός που ερμηνεύτηκε ότι τα παιδιά με ΥΑ έχουν προοδευτική οστική απώλεια [23].

Οι Arrabal-Polo και συν. μελετώντας ενήλικες με ΙΥΑ, βρήκαν ότι η ΟC ήταν αυξημένη στην ομάδα των ασθενών με υποτροπιάζουσα λιθίαση, συγκριτικά με δύο άλλες ομάδες που δεν είχαν ή είχαν ένα επεισόδιο λιθίασης. Όταν εκτιμήθηκε το κλάσμα  $\beta$ -crosslaps/OC, που δείχνει τη σχέση της οστικής απορρόφησης και παραγωγής βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας των ασθενών χωρίς λιθίαση και της ομάδας με υποτροπιάζουσα λιθίαση ( $p=0,01$ ). Οι συγγραφείς συμπέραναν ότι ο οστικός μεταβολισμός επηρεάζεται περισσότερο στους ασθενείς με ΙΥΑ και υποτροπιάζουσα λιθίαση, που είχαν και χαμηλότερη ΟΠ όταν ελέγχθηκαν με DEXA, συγκριτικά με τους ασθενείς χωρίς λιθίαση [382].

Οι Kuczera και συν. σε μελέτη με ενήλικες με ΙΥΑ και ενεργό λιθίαση ή μη-ενεργό λιθίαση, βρήκαν σημαντικά αυξημένη την ΟC σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες. Όμως υπήρχε διαφορά και μεταξύ των ομάδων των ασθενών με ή χωρίς ενεργό νεφρολιθίαση, όντας υψηλότερη στην πρώτη ομάδα. Φαίνεται ότι η επίδραση της ΙΥΑ στα οστά διαβαθμίζεται ανάλογα με την βαρύτητα της ασβεστιουρίας αλλά και της εμπλεκόμενης λιθίασης. Στη μελέτη καταγράφεται αύξηση του οστικού ανασχηματισμού ανάλογη της βαρύτητας της κλινικής εικόνας [381].

Από την βιβλιογραφία δεν υπάρχει ομοφωνία σχετικά με τα αποτελέσματα των ασθενών με ΙΥΑ και των επιπέδων της ΟC στον ορό. Φαίνεται ότι η οστική παραγωγή εξαρτάται από τη βαρύτητα της κλινικής νόσου. Στην μελέτη μας οι ασθενείς δεν διαφοροποιήθηκαν ως προς τα επίπεδα της ΟC με τους υγιείς μάρτυρες και αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με τα επίπεδα της ALP καθώς και το ύψος των παιδιών της μελέτης που επίσης δεν διαφοροποιήθηκαν. Τα αποτελέσματα αυτά συνηγορούν υπέρ μιας ανεπηρέαστης διαδικασίας οστικής παραγωγής.

## ***Επίδραση της διατροφικής παρέμβασης στον δείκτη οστικής απορρόφησης στον ορό***

### ***$\beta$ -Crosslaps ορού***

Οι μέσες τιμές των επιπέδων των  $\beta$ -Crosslaps στον ορό καταγράφηκαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερες στην ομάδα των ασθενών πριν αλλά και μετά τους 3 μήνες συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ( $p=0,016$  και  $p=0,039$ , αντίστοιχα). Μεταξύ των ασθενών πριν και μετά την παρέμβαση υπήρξε μείωση των μέσων τιμών, που όμως δεν έφτασε σε

στατιστική σημαντικότητα. Πιθανόν ο χρόνος των 3 μηνών δεν είναι αρκετός για σημαντική μείωση της οστεοκλαστικής δραστηριότητας ώστε να είναι ανιχνεύσιμη.

Αυτά τα ευρήματα είναι συμβατά με μελέτη σε παιδιά με ΙΥΑ, όπου βρέθηκε στο 35% αυτών χαμηλότερη ΟΠ (ΟΜΣΣ, ΜΟ και ολόκληρου του σώματος) στατιστικά σημαντική, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Στην ίδια μελέτη ποσοστό 72% των ασθενών εμφάνιζε πολύ υψηλό κλάσμα Ca/Cr ούρων νηστείας που αποδίδεται σε αύξηση της οστικής δραστηριότητας. Επίσης, μετρήσεις βιοχημικών δεικτών οστικού μεταβολισμού έδειξαν αυξημένη απέκκριση του N-telopeptide στα ούρα, καθώς και αυξημένη OC στον ορό, που οδήγησε τους ερευνητές στο συμπέρασμα ότι η ΥΑ είναι μια διαταραχή, που συνοδεύεται από αυξημένο οστικό ανασχηματισμό, με υπεροχή όμως της οστικής απορρόφησης σε σχέση με την οστική παραγωγή. Επί πλέον δεν βρήκαν συσχέτιση της λιθίασης ή της ιδιοπαθούς υπερουρικοζουρίας με την ΟΠ στους ασθενείς [243].

Οι Arrabal-Polo και συν. σε μια μετανάλυση (2013) 40 τεκμηριωμένων άρθρων, αναφέρουν ότι η μείωση της ΟΠ σε ασθενείς με ουρολίθους από Ca παρατηρείται κυρίως σε εκείνους που εμφανίζουν υποτροπιάζουσα λιθίαση. Γι' αυτό συστήνουν να εκτιμώνται οι ασθενείς με ουρολιθίαση εκτός από τον μεταβολικό έλεγχο για προσδιορισμό ηλεκτρολυτών ορού και ούρων 24ώρου και για δείκτες οστικού μεταβολισμού όπως ALP, OC και β-CrossLaps. Η εύρεση αυξημένων τιμών των δεικτών σε αυτούς τους ασθενείς συμβάλλει αποτελεσματικά στην έγκαιρη διάγνωση της οστεοπενίας/οστεοπόρωσης, που θα πρέπει να ελεγχθεί περαιτέρω με μέτρηση της ΟΠ. Οι συγγραφείς τονίζουν ότι η εκτίμηση του οστικού μεταβολισμού είναι κυρίως χρήσιμη στους ασθενείς με σοβαρή λιθίαση από ασβεστούχους λίθους [383]. Κατ' επέκταση θεωρούμε ότι η σύσταση αυτή θα ήταν καίρια και χρήσιμη στους ανήλικους και ενήλικες ασθενείς με ΙΥΑ, καθώς το μεγαλύτερο ποσοστό της ΥΑ αποτελεί η ΙΥΑ.

Ο δείκτης β-CrossLaps χρησιμεύσει πέραν της αρχικής εκτίμησης της οστικής απορρόφησης σε ασθενείς με λιθίαση από Ca και ως παράμετρος παρακολούθησης και αποτελεσματικότητας της θεραπευτικής παρέμβασης της νόσου. Επιπλέον, ο λόγος β-CrossLaps/OC, καταγράφεται υψηλότερος σε ασθενείς με υποτροπιάζουσα λιθίαση από Ca, αντικατοπτρίζοντας μεγαλύτερου βαθμού οστική απορρόφηση συγκριτικά με οστική παραγωγή, στην οποία και αποδίδεται η μείωση της ΟΠ [225, 226].

Παρόμοια και στη δική μας μελέτη, όπου εκτιμήθηκε ο λόγος του δείκτη οστικής απορρόφησης β-Crosslaps προς τον δείκτη οστικής παραγωγής OC στους ασθενείς πριν την

παρέμβαση και στην ομάδα ελέγχου βρέθηκε αυξημένος στους ασθενείς ( $p=0,0285$ ). Το αποτέλεσμα αυτό υποστηρίζει την παραπάνω θεωρία και φαίνεται ότι και οι ασθενείς της μελέτης μας είχαν αυξημένη οστική απορρόφηση συγκριτικά με την παραγωγή κατά το χρόνο της ένταξης παρ' ότι δεν εμφάνιζαν σε μεγάλο ποσοστό λιθίαση.

Επίσης η μείωση της μέσης τιμής των  $\beta$ -Crosslaps των ασθενών μας μετά τη διατροφική παρέμβαση συγκριτικά με πριν υποδηλώνει μία θετική επίδραση στην οστική απορρόφηση, αλλά φαίνεται να χρειάζεται μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για να αποτυπωθούν οι αλλαγές σε στατιστικά σημαντικές διαφορές. Η οστική παραγωγή με βάση τους οστικούς δείκτες OC και ALP παρουσιάζεται φυσιολογική σε αυτούς τους ασθενείς. Από τη βιβλιογραφία φαίνεται ότι ο βαθμός της ΥΑ αλλά κυρίως η παρουσία της λιθίασης επηρεάζει τη βαρύτητα της οστικής διαταραχής. Σε ηπιότερη διαταραχή μπορεί να αυξηθούν μόνο οι δείκτες οστικής απορρόφησης ενώ σε σοβαρότερη και οι δείκτες οστικής παραγωγής, πάντα όμως με υπεροχή των δεικτών απορρόφησης. Στη μελέτη μας μόνο το 28% των ασθενών είχαν λιθίαση και μάλιστα όχι σοβαρή. Τα ευρήματά μας λοιπόν συμφωνούν με τη βιβλιογραφία και δείχνουν μία σχετικά ήπια οστική διαταραχή.

### ***Επίδραση της διατροφικής παρέμβασης στις κυτταροκίνες OPG και sRANKL στον ορό και στον λόγο sRANKL/OPG***

Δεν διαφοροποιήθηκαν οι μέσες τιμές της OPG στον ορό στην ομάδα των ασθενών μετά την παρέμβαση και δε διέφεραν από της ομάδας ελέγχου.

Παρόμοια και στις μέσες τιμές του sRANKL στον ορό δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές μετά την παρέμβαση στους ασθενείς και ήταν συγκρίσιμες με της ομάδας ελέγχου.

Όμως καταγράφηκε μία τάση για χαμηλότερη μέση τιμή του λόγου sRANKL/OPG στην ομάδα των ασθενών κατά την ένταξη στη μελέτη συγκριτικά με των μαρτύρων ( $p=0,077$ ). Αυτή η σχέση παίζει σημαντικό ρόλο στον οστικό μεταβολισμό.

Μετά τη διαθεσιμότητα εμπορικών δοκιμασιών μέτρησης της OPG και του sRANKL στον ορό, υπήρξε ιδιαίτερο ενδιαφέρον από ερευνητές, που ασχολούνται με τα οστά, για την εκτίμηση τους σε διάφορες πληθυσμιακές ομάδες και νοσήματα, παρά τα κάποια προβλήματα με τις αναλύσεις που συνεχώς όμως βελτιώνονται.

Δεν έχουν δημοσιευθεί μελέτες εκτίμησης των κυτταροκινών αυτών στον ορό σε παιδιά ή ενήλικες ασθενείς με ΙΥΑ. Ωστόσο, οι Gomes και συν. δημοσίευσαν μελέτη με

βιοψία οστού σε ασθενείς με ΙΥΑ, όπου πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική μελέτη έκφρασης των RANKL και OPG σε απασβεστωμένα δείγματα οστών που λήφθηκαν από βιοψίες λαγονίων οστών ενηλίκων ασθενών με ΙΥΑ. Η ιστομορφομετρία εκεί έδειξε μικρότερο όγκο και αυξημένη απορρόφηση οστού καθώς και παρατεταμένο χρόνο επιμετάλλωσης. Η έκφραση του RANKL και της OPG στα δείγματα των οστών ήταν σημαντικά υψηλότερη στους ασθενείς με ΙΥΑ έναντι των μαρτύρων. Η υψηλότερη έκφραση του RANKL στον ιστό των οστών δείχνει ότι η αυξημένη οστική απορρόφηση στους ασθενείς με ΙΥΑ μεσολαβείται από τον RANKL και η αυξημένη έκφραση της OPG μπορεί να οφείλεται σε δευτερογενή αύξηση σε μια προσπάθεια να αντισταθμίσει τις ενέργειες του RANKL [384].

Σε διάφορα ζωικά μοντέλα έχει αποδειχθεί ότι μια σχετική ανεπάρκεια της OPG προκαλεί οστική απώλεια [385-387], ενώ η χορήγησή της [388] παρεμποδίζει αποτελεσματικά την οστική απορρόφηση.

Στην παρούσα μελέτη η σχετική αύξηση των Crosslaps που παρατηρήθηκε στους ασθενείς πιθανόν να οδήγησε σε αντιροπιστική τάση για μικρή αύξηση της OPG σε σύγκριση με του RANKL για την προστασία του οστίτη ιστού.

Συμπερασματικά στα παιδιά της μελέτης μας οι διαταραχές στον οστικό μεταβολισμό φαίνεται να είναι περιορισμένες πιθανόν λόγω της μικρής ηλικίας των ασθενών και της έγκαιρης διάγνωσης και αντιμετώπισης της ασβεστιουρίας καθώς και του μικρού ποσοστού με ουρολιθίαση.

### ***Πολυμορφισμοί R990G, A986S και Q1011E του γονιδίου CaSR και ΙΥΑ***

Στην μελέτη μας βρέθηκε αυξημένη συχνότητα του πολυμορφικού T αλληλίου του πολυμορφισμού A986S του γονιδίου του CaSR στους ασθενείς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επίσης καταγράφηκε αυξημένη συχνότητα του ετερόζυγου (GT) και ομόζυγου (TT) πολυμορφικού γονότυπου του πολυμορφισμού A986S, συγκριτικά με του ομόζυγου κυρίαρχου γονότυπου στους ασθενείς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η συχνότητα των αλληλίων και των γονότυπων των πολυμορφισμών R990G και Q1011E δε διέφερε σημαντικά μεταξύ ασθενών και ομάδας ελέγχου. Ο πολυμορφισμός A986S του γονιδίου του CaSR βρέθηκε να σχετίζεται με την εμφάνιση ΥΑ στον πληθυσμό της μελέτης μας.

Πολυμορφισμοί του CaSR έχουν συσχετιστεί με ιδιοπαθή λιθίαση Ca περίπου από εικοσαετίας [389]. Συγκεκριμένα, το πολυμορφικό αλλήλιο T του πολυμορφισμού A986S εκτός από ιδιοπαθή νεφρολιθίαση από Ca έχει συσχετιστεί και με υψηλές συγκεντρώσεις Ca στον ορό [390, 391]. Το πολυμορφικό αλλήλιο G του πολυμορφισμού R990G έχει συσχετιστεί με ιδιοπαθή νεφρολιθίαση, με IYA και λίθους από Ca, με πρωτοπαθή υπερπαραθυροειδισμό και οστεοπόρωση σε γυναίκες [390, 392, 393].

Τα αποτελέσματα μιας *in vitro* μελέτης έδειξαν, ότι ο πολυμορφισμός R990G μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της δραστηριότητας του CaSR [394]. Έτσι, το πολυμορφικό αλλήλιο G αυξάνει την ευαισθησία του CaSR και οδηγεί σε μεγαλύτερη αναστολή της επαναρρόφησης Ca στο TALH και σε υψηλότερα επίπεδα απέκκρισης Ca [395]. Οι Guha και συν., σε μελέτη 200 ασθενών με ουρολιθίαση από Ca από την Ινδία βρήκαν ότι αυτοί που φέρουν το πολυμορφικό αλλήλιο T του πολυμορφισμού A986S και το G του πολυμορφισμού R990G έχουν υψηλότερα επίπεδα Ca στα ούρα και πιθανότητα νεφρολιθίασης. Ομόζυγα άτομα για το πολυμορφικό αλλήλιο T (TT γονότυπος) του πολυμορφισμού A986S έχουν 3 φορές υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης χρόνιας λιθιασικής νεφρικής νόσου συγκριτικά με ετερόζυγα. Ενώ, ομόζυγα άτομα για το πολυμορφικό αλλήλιο G (GG γονότυπος) του πολυμορφισμού R990G εμφανίζουν 20 φορές υψηλότερη πιθανότητα ανάπτυξης λίθου συγκριτικά με τον κυρίαρχο τύπο. Επίσης έδειξαν ότι, τα άτομα που φέρουν δύο διαφορετικά πολυμορφικά αλλήλια των πολυμορφισμών A986S και R990G έχουν αυξημένο κίνδυνο για χρόνια λιθιασική νεφρική νόσο σε σύγκριση με τα άτομα που φέρουν μόνο ένα πολυμορφικό αλλήλιο. Στην ανωτέρω μελέτη δεν βρήκαν καμιά συσχέτιση με τον Q1011E πολυμορφισμό και την YA [396].

Οι Shakhssalim και συν., σε ένα δείγμα 223 Καναδών ασθενών με ουρολιθίαση από Ca κατέγραψαν μία σημαντικά υψηλότερη συχνότητα των πολυμορφικών αλλήλιων T, G, και G των πολυμορφισμών A986S, R990G και Q1011E αντίστοιχα [392]. Μια άλλη ιταλική μελέτη παρουσιάζει παρόμοια αποτελέσματα [397]. Ωστόσο, σε άλλη μελέτη επίσης από τον Καναδά σε ασθενείς με νεφρολιθίαση από Ca, βρέθηκε σημαντική αύξηση μόνο του πολυμορφισμού R990G και μάλιστα παρατηρήθηκε αύξηση του κινδύνου λιθογένεσης 8 φορές στην ομόζυγη μορφή του πολυμορφικού αλλήλιου (GG), σε σχέση με του κυρίαρχου τύπου ( $p < 0,001$ ) [398]. Οι Vezzoli και συν., το 2012, θεωρούν την παρουσία του πολυμορφικού αλλήλιου G του R990G πολυμορφισμού δείκτη κινδύνου για ανάπτυξη νεφρολιθίασης από Ca σε ασθενείς με YA [351].



Όπως φαίνεται η συχνότητα των πολυμορφισμών A986S και R990G διαφοροποιείται σε διαφορετικούς πληθυσμούς [399] [398]. Έτσι, οι Bollerslev και συν. σε ένα πληθυσμό 1252 αυστραλών γυναικών δεν βρήκαν συσχέτιση του πολυμορφισμού A986S με την ομοιόσταση Ca ή την ΟΠ [400], ενώ οι Harding και συν. σε 101 διζυγωτικούς καυκάσιους διδύμους δεν βρήκαν καμιά συσχέτιση των τριών πολυμορφισμών του γονιδίου του CaSR με την ομοιόσταση του Ca, λιθίαση ή ΟΠ [401].

Συνοπτικά, όπως καταγράφουν οι Liu και συν. σε πρόσφατη μετανάλυση, το 2015, βρέθηκαν αντιφατικά αποτελέσματα για τους πολυμορφισμούς A986S και R990G, όταν συσχετίστηκαν σε διάφορους πληθυσμούς για τον κίνδυνο ουρολιθίασης από Ca. Για τον πολυμορφισμό A986S, ο TT (ομόζυγος πολυμορφικός) γονότυπος συσχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο ουρολιθίασης σε ασιάτες, αλλά με μειωμένο κίνδυνο σε καυκάσιους. Σχετικά με τον πολυμορφισμό R990G, βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ GG (ομόζυγου πολυμορφικού) γονότυπου και αυξημένου κινδύνου ουρολιθίασης μόνο σε καυκάσιους. Δεν βρέθηκαν σημαντικές συσχετίσεις για τον πολυμορφισμό Q1011E [350].

Στην μελέτη μας από την γονιδιακή ανάλυση των τριών πολυμορφισμών του γονιδίου του CaSR συσχετίστηκε μόνο ο πολυμορφισμός A986S με την ΙΥΑ, που βάση της βιβλιογραφίας έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο ουρολιθίασης από λίθους Ca σε ασθενείς ασιατικής καταγωγής και μειωμένο κίνδυνο σε καυκάσιους με ΙΥΑ [350]. Ωστόσο, είναι απαραίτητη μελέτη με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών για την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων.



## 6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα προοπτική μελέτη εκτιμήθηκαν δείκτες οστικής παραγωγής και οστικής απορρόφησης καθώς και κυτταροκίνες που σχετίζονται με την οστεοκλαστογένεση σε παιδιά με ΙΥΑ μετά από τρίμηνη εφαρμογή διατροφικών οδηγιών συντηρητικής αντιμετώπισης της ΥΑ. Επίσης έγινε γονιδιακός έλεγχος για πολυμορφισμούς του γονιδίου του CaSR.

### ***Επίδραση της διατροφικής παρέμβασης στο Ca ούρων και Pi, PTH, 25OHD και 1,25(OH)<sub>2</sub>D στον ορό***

Η ΥΑ μειώθηκε χωρίς να φτάνει τα φυσιολογικά επίπεδα, που αποδίδεται κατά ένα ποσοστό στη μερική εφαρμογή των οδηγιών ή/και στο μικρό χρονικό διάστημα παρακολούθησης, αλλά και με πιθανή την αναγκαιότητα λήψης αντιασβεστιουρικών σκευασμάτων.

Η μείωση της ΥΑ, μετά την διαιτητική παρέμβαση, στους ασθενείς αύξησε ελαφρώς τα επίπεδα του Pi και της PTH στον ορό των ασθενών μη διαφοροποιούμενα πλέον από των μαρτύρων. Τα επίπεδα της 25OHD δεν επηρεάστηκαν από την διατροφή, ενώ αυξήθηκαν εντός φυσιολογικών ορίων αυτά της 1,25(OH)<sub>2</sub>D στον ορό.

### ***Επίδραση της Διατροφικής παρέμβασης στους Δείκτες Οστικής Παραγωγής***

#### **ALP και OC**

Στην μελέτη μας ο δείκτης οστικής παραγωγής ALP στους ασθενείς ήταν φυσιολογικός και δεν επηρεάστηκε από την διατροφική παρέμβαση, όπως και τα επίπεδα της OC στους ασθενείς συγκριτικά με τους υγιείς μάρτυρες. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν και με το μη διαφοροποιούμενο ύψος των ασθενών παιδιών από των συνομήλικων υγιών μαρτύρων. Τα αποτελέσματα αυτά συνηγορούν υπέρ μιας ανεπηρέαστης διαδικασίας οστικής παραγωγής κατά την ένταξη αλλά και μετά την παρέμβαση στα παιδιά της μελέτης μας με ΙΥΑ.

### ***Επίδραση της Διατροφικής παρέμβασης στον Δείκτη Οστικής Απορρόφησης $\beta$ -Crosslaps***

Οι ασθενείς είχαν αυξημένη οστική απορρόφηση κατά την ένταξη στην μελέτη, που καταγράφηκε από τα αυξημένα επίπεδα των  $\beta$ -Crosslaps στον ορό και τον αυξημένο λόγο  $\beta$ -Crosslaps/OC συγκριτικά με τους μάρτυρες. Επίσης καταγράφηκε θετική επίδραση της μερικής εφαρμογής των διατροφικών οδηγιών, καθώς τα επίπεδα των  $\beta$ -Crosslaps στον ορό μειώθηκαν οριακά σημαντικά. Φαίνεται λοιπόν ότι ο δείκτης αυτός θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση του οστικού μεταβολισμού στα παιδιά με ΙΥΑ.

### ***Επίδραση της διατροφικής παρέμβασης στις κυτταροκίνες OPG και sRANKL ορού και στον λόγο sRANKL/OPG***

Στην μελέτη μας δεν επηρεάστηκαν τα επίπεδα των OPG και sRANKL στον ορό στους ασθενείς και δεν διαφοροποιήθηκαν από των μαρτύρων. Οι ασθενείς της μελέτης μας παρ' ότι είχαν αυξημένη οστική απορρόφηση που βελτιώθηκε μετά την θεραπευτική παρέμβαση, δεν αντικατοπτρίστηκε στα επίπεδα των sRANKL και OPG στον ορό, που βρέθηκαν αδιαφοροποίητα. Όμως ο λόγος sRANKL/OPG στους ασθενείς κατά την ένταξη στην μελέτη ήταν ελαφρά χαμηλότερος, πιθανά σαν απάντηση αντιρρόπησης του υψηλότερου ρυθμού οστεοκλαστογένεσης, λόγω της υπερασβεστιουρίας.

### ***Πολυμορφισμοί του γονιδίου του CaSR στον πληθυσμό της μελέτης μας***

Ο πολυμορφισμός A986S του γονιδίου του CaSR βρέθηκε να σχετίζεται με την εμφάνιση ΥΑ στον πληθυσμό της μελέτης, υποστηρίζοντας την γενετική προδιάθεση του νοσήματος. Οι πολυμορφισμοί R990G και Q1011E δε συσχετίστηκαν σημαντικά στον πληθυσμό της μελέτης μας. Η παρούσα μελέτη, είναι η πρώτη μελέτη γονιδιακής προσέγγισης στον Ελληνικό πληθυσμό και περαιτέρω έρευνα σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών είναι απαραίτητες για τη διεξαγωγή πιο ασφαλών συμπερασμάτων.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ιδιοπαθής υπερασβεστιουρία (IYA) στα παιδιά του Δυτικού κόσμου εμφανίζει επιπολασμό από 2,2% έως 17,7% σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη. Η IYA εκδηλώνεται με αιματουρία, νεφρικό κωλικό ή κοιλιακό άλγος, ουρολοίμωξη και διαταραχές της ούρησης. Ποσοστό 5-57% των παιδιών εμφανίζει νεφρασβέστωση ή νεφρολιθίαση, ενώ τα ποσοστά με οστεοπενία ή μειωμένη οστική πυκνότητα (ΟΠ) που αναφέρονται ποικίλουν μεταξύ 26% και 35%. Ο ακριβής μηχανισμός διαταραχής του οστικού μεταβολισμού δεν έχει διευκρινιστεί, καθώς δεν έχουν πραγματοποιηθεί βιοψίες οστών σε παιδιά με IYA. Από μελέτες φαίνεται ότι η κατά μήκος αύξηση των οστών είναι φυσιολογική στα περισσότερα παιδιά με IYA, υποδεικνύοντας ως λιγότερο πιθανή την διαταραχή της οστικής παραγωγής. Έτσι, η μειωμένη οστική μάζα σ' αυτά τα παιδιά πιθανά να οφείλεται σε αυξημένη οστική απορρόφηση και/ή οστικό ανασχηματισμό. Στην παιδική ηλικία έχουν πραγματοποιηθεί περιορισμένες μελέτες εκτίμησης των βιοχημικών δεικτών μεταβολισμού των οστών στην IYA και αυτές αφορούσαν κυρίως την οστεοκαλσίνη (osteocalcin, OC) ως δείκτη οστικής παραγωγής και ως δείκτες οστικής απορρόφησης την πυριδινολίνη (pyridinoline, PYD) και/ή δεοξυπυριδινολίνη (deoxypyridinoline, DPD), ενώ 2 μελέτες εκτίμησαν τα τελοπεπτίδια του κολλαγόνου τύπου I. Επίσης, δεν έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες συσχέτισης των κυτταροκινών οστεοπροτεγερίνη (osteoprotegerin, OPG) και διαλυτό δεσμευτικό παράγοντα του υποδοχέα ενεργοποίησης του πυρηνικού παράγοντα kB (soluble receptor activator of nuclear factor kB ligand, sRANKL) με την IYA, παρά το γεγονός ότι τα μόρια αυτά εμπλέκονται στην οστεοκλαστογένεση. Τέλος, περιορισμένες είναι οι γενετικές μελέτες σε παιδιά με IYA στη διεθνή βιβλιογραφία, ενώ δεν έχουν πραγματοποιηθεί αντίστοιχες μελέτες στον ελληνικό πληθυσμό.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση των βιοχημικών δεικτών οστικού μεταβολισμού (οστικής παραγωγής και απορρόφησης) και των κυτταροκινών OPG και sRANKL στον ορό σε παιδιά με IYA, ως μια προσπάθεια εκτίμησης, με μη επεμβατικές μεθόδους του οστικού μεταβολισμού. Επίσης έγινε γενετική προσέγγιση της IYA με μελέτη πολυμορφισμών του γονιδίου του ασβεστιοευαίσθητου υποδοχέα (Calcium sensing Receptor, CaSR).

Στην παρούσα προοπτική μελέτη, διάρκειας 7 ετών (Σεπτέμβριος 2009 έως Οκτώβριος 2016), περιελήφθησαν 50 παιδιά με ΙΥΑ (ομάδα ασθενών) και 60 υγιή παιδιά (ομάδα ελέγχου). Στην μελέτη μας, ποσοστό 28% των ασθενών είχαν και λιθίαση. Οι ασθενείς εκτιμήθηκαν κατά τον χρόνο της διάγνωσης και 3 μήνες μετά την εφαρμογή των διαιτητικών οδηγιών αντιμετώπισης της ΙΥΑ.

Οι ασθενείς και η ομάδα ελέγχου είχαν αντίστοιχη ηλικία (η μέση τιμή και το ηλικιακό εύρος ήταν  $7,65 \pm 4,48$  έτη και  $0,5-16,4$  έτη των ασθενών και  $7,35 \pm 4,43$  έτη και  $0,6-16,3$  έτη των μαρτύρων, αντίστοιχα). Το ύψος, βάρος και το στάδιο ενήβωσης κατά Tanner ανά φύλο των ασθενών δε διέφερε από της ομάδας ελέγχου.

Οι ασθενείς, κατά την αρχική προσέγγιση, εκτιμήθηκαν με εκτενή εργαστηριακό έλεγχο, με σκοπό τον αποκλεισμό περιπτώσεων δευτεροπαθούς ή πρωτοπαθούς μορφής υπερασβεστιουρίας (ΥΑ) και περιελήφθησαν μόνο αυτοί με τεκμηριωμένη διάγνωση ΙΥΑ. Επαναλήφθηκε ο εργαστηριακός έλεγχος κατά την επανεκτίμηση των ασθενών, μετά την τρίμηνη παρέμβαση. Ο ίδιος εργαστηριακός έλεγχος έγινε και στην ομάδα ελέγχου.

Τόσο στα παιδιά με ΙΥΑ και στους δυο χρόνους εκτίμησης, όσο και στην ομάδα ελέγχου, προσδιορίσαμε τα επίπεδα στον ορό του δείκτη οστικής απορρόφησης των θραυσμάτων αποδόμησης του καρβοξύ-τελικού τελοπεπτιδίου των διασταυρούμενων δεσμών του κολλαγόνου τύπου I (serum Carboxy-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen,  $\beta$ -Crosslaps), των δεικτών οστικής παραγωγής αλκαλική φωσφατάση (alkaline phosphatase, ALP) και OC και των κυτταροκινών OPG και sRANKL στον ορό. Υπολογίστηκε ο λόγος των sRANKL/OPG και  $\beta$ -Crosslaps/OC. Ο σκοπός του προσδιορισμού αυτών των δεικτών και των κυτταροκινών ήταν η εκτίμηση πιθανών αρνητικών επιδράσεων της ΙΥΑ στον οστικό μεταβολισμό και η εκτίμηση κατά πόσο η παρέμβαση θα μπορούσε να τις αντιστρέψει. Παράλληλα εκτιμήθηκαν και οι μεταβολίτες της βιταμίνης D [25OHD,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ] και τα επίπεδα Ca και Pi στον ορό που επίσης εμπλέκονται στη διεργασία του οστικού μεταβολισμού.

Οι ασθενείς της μελέτης μας είχαν σχετικά ήπια προς μέτρια ΥΑ, καθώς η μέση τιμή του Ca στα ούρα κατά την ένταξη στην μελέτη ήταν  $6,49 \pm 2,03$  mg/Kg/day. Οι ασθενείς εφάρμοσαν σε μεγάλο βαθμό τις διατροφικές οδηγίες, όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα του επανελέγχου. Αν και τα επίπεδα του Ca στα ούρα κατά μέσο όρο μειώθηκαν σημαντικά, δεν έφτασαν όλοι οι ασθενείς τις φυσιολογικές τιμές. Παράλληλα η μέση τιμή του λόγου του Ca ούρων προς κρεατινίνη ούρων από δείγμα ούρων (ratio of urine Calcium to urine

creatinine from urine sample, UCa/Ucre) των ασθενών είχε στατιστικά σημαντική μείωση και πλησίασε χωρίς πάλι να φτάσει τις φυσιολογικές τιμές.

Μετά την διαιτητική παρέμβαση και την μείωση της ΥΑ στους ασθενείς αυξήθηκαν ελαφρώς τα επίπεδα του Pi, της 1,25-διυδροξυ βιταμίνης D [1,25(OH)<sub>2</sub>D] και της PTH στον ορό των ασθενών, φτάνοντας αυτά των μαρτύρων, ενώ τα επίπεδα της 25-υδροξυ βιταμίνης D (25OHD) δεν επηρεάστηκαν από την παρέμβαση.

Τα επίπεδα των δεικτών οστικής παραγωγής ALP και OC των ασθενών ήταν συγκρίσιμα με της ομάδας ελέγχου, που συμφωνούν με το φυσιολογικό και αναμενόμενο ύψος των ασθενών και αποτελεί ένδειξη μη σημαντικής επίδρασης της οστικής παραγωγής. Τα επίπεδα των β-Crosslaps στον ορό των ασθενών, στους δύο χρόνους εκτίμησης, ήταν υψηλότερα από των μαρτύρων (p=0,013 και p=0,044, αντίστοιχα), αν και υπήρξε τάση μείωσης της μέσης τιμής κατά τη διάρκεια της τρίμηνης παρέμβασης. Πιθανόν δεν ήταν αρκετό το χρονικό διάστημα για να φτάσουν οι δείκτες τα φυσιολογικά επίπεδα. Ο λόγος β-Crosslaps/OC των ασθενών κατά την ένταξη στην μελέτη ήταν αυξημένος συγκριτικά με των μαρτύρων (p=0,0285), εύρημα που δείχνει υψηλότερο ρυθμό οστικής απορρόφησης συγκριτικά με οστικής παραγωγής. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με άλλες αναφορές, που αφορούν στην ήπια υπερασβεστιουρική νόσο και η παρέμβαση φαίνεται να έχει ευεργετικές επιδράσεις στον οστικό μεταβολισμό.

Τα επίπεδα των OPG και sRANKL στον ορό των ασθενών, στους δύο χρόνους εκτίμησης δε διέφεραν και ήταν συγκρίσιμα με των μαρτύρων. Ωστόσο, ο λόγος sRANKL/OPG στους ασθενείς κατά την ένταξη στην μελέτη ήταν ελαφρά χαμηλότερος, πιθανά σαν απάντηση αντιρρόπησης του υψηλότερου ρυθμού οστεοκλαστογένεσης, λόγω της ΥΑ.

Επίσης έγινε γενετική ανάλυση των πολυμορφισμών A986S, R990G και Q1011E (εξόνιο 7) του γονιδίου του CaSR στους ασθενείς και μάρτυρες. Αυτή η ανάλυση έδειξε ότι ο πολυμορφισμός A986S του γονιδίου του CaSR φαίνεται να σχετίζεται με την ΙΥΑ, ενώ οι πολυμορφισμοί R990G και Q1011E δεν έδειξαν να συσχετίζονται στον πληθυσμό της μελέτης.

Συμπερασματικά οι ασθενείς της μελέτης μας φαίνεται να έχουν φυσιολογική οστική παραγωγή, αλλά αυξημένη οστική απορρόφηση. Μετά την παρέμβαση, η τάση μείωσης των β-Crosslaps στον ορό αντανακλά τάση βελτίωσης, αλλά πιθανά χρειάζεται περισσότερο χρόνο για να γίνει πιο εμφανής. Βρέθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού A986S του γονιδίου

του CaSR με την ΙΥΑ στους ασθενείς της μελέτης μας. Θεωρούμε ότι θα ήταν χρήσιμη η εκτίμηση των παιδιών με ΙΥΑ, κυρίως αυτών με λιθίαση, με μέτρηση βιοχημικών δεικτών οστικής παραγωγής και απορρόφησης στον ορό, ως μια μη επεμβατική μέθοδο για πρόωμη ανίχνευση οστικών μεταβολικών διαταραχών. Στη συνέχεια, η παρακολούθηση με τους ίδιους δείκτες θα δώσει πληροφορίες τόσο για τις επιδράσεις της παρέμβασης όσο και για την συμμόρφωση των ασθενών και θα βοηθήσει να αποφευχθούν συνέπειες στην ενήλικη ζωή, καθώς η μέγιστη οστική πυκνότητα αποκτάται μέχρι το τέλος της εφηβείας.



# ABSTRACT

## IDIOPATHIC HYPERCALCIURIA IN CHILDHOOD CORRELATION WITH BONE METABOLISM

The incidence of idiopathic hypercalciuria (IH) among children of the western world is reported to range between 2.2% and 17.7% according to a recent study. The clinical manifestations of pediatric IH include haematuria, renal colic or abdominal pain, urinary tract infection and voiding symptoms. A 5-57% of these children are presented with nephrocalcinosis or nephrolithiasis, and 26-35% is reported to have osteopenia or reduced bone density. The exact mechanism of the bone changes in this disorder have not yet been clarified, as bone biopsies are rather unethical to be performed in children with IH. So far studies show normal longitudinal bone growth in most of the children with IH, suggesting that bone formation is less likely to have been disturbed. Thus, the reduced bone mass in these children is probably due to increased bone resorption and/or bone remodeling. A limited number of studies has been conducted in children evaluating biochemical markers of bone metabolism in IH, and those mainly concerned osteocalcin (OC) as a marker of bone formation and pyridinoline (PYD) and/or deoxypyridinoline (DPD) as bone resorption markers, while only two studies estimated the telopeptides of type I collagen. Also, correlation studies of the osteoprotegerin (OPG) and soluble receptor activator of nuclear factor kB ligand (sRANKL) cytokines with IH have not been conducted despite the fact that these molecules are involved in osteoclastogenesis. Finally, genetic studies for children with IH are limited in the literature, while there are no such studies for the Greek population.

The aim of the present study was to evaluate some serum biochemical markers of bone turnover (bone formation and resorption), and the serum cytokines OPG and sRANKL in children with IH, as an effort to assess bone metabolism by non-invasive methods. Also, a genetic approach to the IH was made, by Calcium sensing Receptor (CaSR) gene polymorphisms study.

In the 7-year prospective study (September 2009 to October 2016), 50 children with IH (patient group) and 60 healthy children (control group) participated. In our study 28% of

the patients had also lithiasis. The patients were assessed at the time of diagnosis and after a 3-month period of intervention with dietary recommendations, for the treatment of IH.

The patient and the control group were matched for age (mean age and range were respectively  $7.65\pm 4.48$  y and 0.5-16.4 y for patients,  $7.35\pm 4.43$  y and 0.6-16.3 y for controls). Patient's height, weight, and tanner stage per sex did not differ from those of controls.

Patients before entering the study were assessed with extensive laboratory tests in order to exclude cases of secondary or primary form of hypercalciuria (HC), and include only those with established the diagnosis of IH. The same tests were repeated on reevaluation of the patients after a 3-month period of intervention. The same laboratory tests were performed in the control group.

In the children with IH at both times of assessment and the control group we estimated the levels of the bone absorption index of degraded fragments of Carboxy-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen ( $\beta$ -Crosslaps), the bone formation indices of alkaline phosphatase (ALP) and OC, and the cytokines OPG and sRANKL in serum. The ratios of sRANKL/OPG and  $\beta$ -Crosslaps/OC were also estimated. The purpose of determining these markers and cytokines was to evaluate any possible negative effects on bone metabolism of the IH itself and to assess whether the intervention can reverse them. At the same time, we measured also the metabolites of vitamin D [25OHD,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ] and the serum levels of Ca and Pi, who also involved in the bone metabolism process.

The patients of our study had relatively mild to moderate HC, as the mean urinary calcium on study enrollment was  $6.49\pm 2.03$  mg/kg/day. Patients followed to a great extent the dietary recommendations, as evidenced by the results of the reevaluation. Although, the levels of Ca in 24hours urine decreased significantly on average during the study period, not all patients reached normal values. At the same time, the mean value of the patients' ratio of urine Calcium to urine creatinine from urine random samples (UCa/Ucre) had a statistically significant reduction and had approached again without reaching the normal range.

After the dietary modification and the decrease of HC, the levels of serum Pi, of 1,25-dihydroxy vitamin D [ $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ] and PTH of the patients increased slightly and reached those of the controls, while the levels of 25-hydroxy Vit D (25OHD) were not affected by intervention.

The levels of the bone formation markers of ALP and OC in patients were comparable to those of controls, which complies with the normal and expected height of patients and is an

indication for non significant effect of bone formation. Patients' serum  $\beta$ -Crosslaps levels at both times of assessment were higher than controls ( $p=0.013$  and  $p=0.044$ , respectively), although there was a trend for decreasing of the mean value during the 3-month period under the intervention. Probably the time was not enough for them to reach normal levels. The  $\beta$ -Crosslaps/OC ratio of the patients on their entry to the study was increased compared to controls ( $p=0.0285$ ), finding that indicates higher rate of bone resorption compared to bone formation. These findings are in agreement with other reports concerning the mild hypercalciuric disease, and the intervention seems to have beneficial effects on bone metabolism.

The patient's serum levels of OPG and sRANKL at the two assessment times did not differ, and were comparable to controls. However, the ratio sRANKL/OPG in the patient group at their entry to the study was found to be slightly lower than controls possibly in response to counteract the higher rate of osteoclastogenesis due to the HC.

Also, a genetic analysis of the A986S, R990G and Q1011E polymorphisms (exon 7) of the CaSR gene was performed in patients and controls. This analysis had showed that the A986S polymorphism of the CaSR gene seems to be associated with IH, whereas the R990G and Q1011E polymorphisms were not significantly correlated in the study population.

In conclusion, the patients in our study seem to have normal bone formation but higher bone resorption. After the intervention, the trend for decrease in the serum  $\beta$ -Crosslaps reflects the trend for improvement, but possibly needs longer time to become more evident. An association of A986S polymorphism of the CaSR gene was found in the patients of our study. We consider that it would be helpful to assess children with IH especially those with urolithiasis by measuring biochemical markers of bone formation and resorption in serum, as a non-invasive method for early detection of bone metabolic disturbances. Then the follow up with the same markers would give information about the effects of the intervention as well as of the compliance and help to avoid consequences in the adult life, as the maximum bone density is acquired until the end of puberty.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ghazali S, Barratt TM. Urinary excretion of calcium and magnesium in children. *Arch Dis Child* 1974; **49**: 97-101.
2. Alconcher LF, Castro C, Quintana D et al. Urinary calcium excretion in healthy school children. *Pediatr Nephrol* 1997; **11**: 186-8.
3. Nordin BE. Assessment of calcium excretion from the urinary calcium/creatinine ratio. *Lancet* 1959; **2**: 368-71.
4. Sargent JD, Stukel TA, Kresel J, Klein RZ. Normal values for random urinary calcium to creatinine ratios in infancy. *J Pediatr* 1993; **123**: 393-7.
5. Matos V, van Melle G, Boulat O et al. Urinary phosphate/creatinine, calcium/creatinine, and magnesium/creatinine ratios in a healthy pediatric population. *J Pediatr* 1997; **131**: 252-7.
6. Vachvanichsanong P, Lebel L, Moore ES. Urinary calcium excretion in healthy Thai children. *Pediatr Nephrol* 2000; **14**: 847-50.
7. Kruse K, Kracht U, Kruse U. Reference values for urinary calcium excretion and screening for hypercalciuria in children and adolescents. *Eur J Pediatr* 1984; **143**: 25-31.
8. Manz F, Kehrt R, Lausen B, Merkel A. Urinary calcium excretion in healthy children and adolescents. *Pediatr Nephrol* 1999; **13**: 894-9.
9. Sonmez F, Akcanal B, Altincik A, Yenisey C. Urinary calcium excretion in healthy Turkish children. *Int Urol Nephrol* 2007; **39**: 917-22.
10. Moore ES, Coe FL, McMann BJ, Favus MJ. Idiopathic hypercalciuria in children: prevalence and metabolic characteristics. *J Pediatr* 1978; **92**: 906-10.
11. De Santo NG, Di Iorio B, Capasso G et al. Population based data on urinary excretion of calcium, magnesium, oxalate, phosphate and uric acid in children from Cimitile (southern Italy). *Pediatr Nephrol* 1992; **6**: 149-57.
12. Welch TR, Abrams SA, Shoemaker L et al. Precise determination of the absorptive component of urinary calcium excretion using stable isotopes. *Pediatr Nephrol* 1995; **9**: 295-7.
13. Avner ED, Harmon WE, Niaudet P, Yoshikawa N, eds. *Pediatric Nephrology*. 6th ed. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag 2009.
14. Albright F, Henneman P, Benedict PH, Forbes AP. Idiopathic hypercalciuria: a preliminary report. *Proc R Soc Med* 1953; **46**: 1077-81.
15. Vezzoli G, Soldati L, Gambaro G. Hypercalciuria revisited: one or many conditions? *Pediatr Nephrol* 2008; **23**: 503-6.
16. Lemann J, Jr. Pathogenesis of Idiopathic Hypercalciuria and Nephrolithiasis. In: Coe FL, Favus MJ, eds. *Disorders of bone and mineral metabolism*. New York: Raven Press 1992:685-706.
17. Felsenfeld A, Rodriguez M, Levine B. New insights in regulation of calcium homeostasis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2013; **22**: 371-6.
18. Srivastava T, Schwaderer A. Diagnosis and management of hypercalciuria in children. *Curr Opin Pediatr* 2009; **21**: 214-9.
19. Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ. Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev* 2005; **85**: 373-422.

20. Moe OW, Bonny O. Genetic hypercalciuria. *J Am Soc Nephrol* 2005; **16**: 729-45.
21. Lawoyin S, Sismilich S, Browne R, Pak CY. Bone mineral content in patients with calcium urolithiasis. *Metabolism* 1979; **28**: 1250-4.
22. Borghi L, Meschi T, Guerra A et al. Vertebral mineral content in diet-dependent and diet-independent hypercalciuria. *J Urol* 1991; **146**: 1334-8.
23. Garcia-Nieto V, Ferrandez C, Monge M et al. Bone mineral density in pediatric patients with idiopathic hypercalciuria. *Pediatr Nephrol* 1997; **11**: 578-83.
24. Skalova S, Palicka V, Kutilek S. Bone mineral density and urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity in paediatric patients with idiopathic hypercalciuria. *Nephrology (Carlton)* 2005; **10**: 99-102.
25. Schwaderer AL, Cronin R, Mahan JD, Bates CM. Low bone density in children with hypercalciuria and/or nephrolithiasis. *Pediatr Nephrol* 2008; **23**: 2209-14.
26. Freundlich M, Alonzo E, Bellorin-Font E, Weisinger JR. Reduced bone mass in children with idiopathic hypercalciuria and in their asymptomatic mothers. *Nephrol Dial Transplant* 2002; **17**: 1396-401.
27. Widdowson EM, Dickerson JWT. The chemical composition of the body. In: C.L. C, F. B, eds. *Mineral Metabolism An Advanced Treatise Volume 2, Part A The Elements*. New York: Academic Press 1964:1-247.
28. Nordin BEC. Nutritional considerations. In: Nordin BEC, ed. *Calcium, phosphate and magnesium metabolism*. Edinburgh, UK: Churchill Livingstone 1976:1-35.
29. Moore EW. Ionized calcium in normal serum, ultrafiltrates, and whole blood determined by ion-exchange electrodes. *J Clin Invest* 1970; **49**: 318-34.
30. Robertson WG, Marshall RW. Calcium measurements in serum and plasma--total and ionized. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci* 1979; **11**: 271-304.
31. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; **4**: 517-29.
32. Worcester EM, Coe FL. New insights into the pathogenesis of idiopathic hypercalciuria. *Semin Nephrol* 2008; **28**: 120-32.
33. Huebner AK, Keller J, Catala-Lehnen P et al. The role of calcitonin and alpha-calcitonin gene-related peptide in bone formation. *Arch Biochem Biophys* 2008; **473**: 210-7.
34. Netter FH. The Netter collection of medical illustrations. Volume 6, Musculoskeletal system. Part III, Biology and systemic diseases. 2nd ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, 2013.
35. Basu TK, Donaldson D. Intestinal absorption in health and disease: micronutrients. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003; **17**: 957-79.
36. Kliegman RM, Behrman RE, Jenson HB, Stanton BF. *Nelson Textbook of Pediatrics*: Elsevier - Health Sciences Division 2007.
37. Garg MK, Mahalle N. Calcium homeostasis, and clinical or subclinical vitamin D deficiency--can a hypothesis of "intestinal calcistat" explain it all? *Med Hypotheses* 2013; **81**: 253-8.
38. National Center for Health Statistics. National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003-2006 [Available from: <https://wwwn.cdc.gov/Nchs/Nhanes/>]
39. Abrams SA, Griffin IJ, Hawthorne KM et al. Relationships among vitamin D levels, parathyroid hormone, and calcium absorption in young adolescents. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; **90**: 5576-81.

40. Bronner F, Pansu D. Nutritional aspects of calcium absorption. *J Nutr* 1999; **129**: 9-12.
41. McCormick CC. Passive diffusion does not play a major role in the absorption of dietary calcium in normal adults. *J Nutr* 2002; **132**: 3428-30.
42. Bouillon R, Van Cromphaut S, Carmeliet G. Intestinal calcium absorption: Molecular vitamin D mediated mechanisms. *J Cell Biochem* 2003; **88**: 332-9.
43. Harris CA, Baer PG, Chirito E, Dirks JH. Composition of mammalian glomerular filtrate. *Am J Physiol* 1974; **227**: 972-6.
44. Mount DB, Yu ASL. Transport of Inorganic Solutes: Sodium, Chloride, Potassium, Magnesium, Calcium and Phosphate. In: Brenner BM, ed. *Brenner & Rector's the kidney*. 8th ed. Philadelphia: Saunders 2007:156-200.
45. Rouse D, Ng RC, Suki WN. Calcium transport in the pars recta and thin descending limb of Henle of the rabbit, perfused in vitro. *J Clin Invest* 1980; **65**: 37-42.
46. Srivastava T, Alon US. Pathophysiology of hypercalciuria in children. *Pediatr Nephrol* 2007; **22**: 1659-73.
47. Friedman PA, Gesek FA. Calcium transport in renal epithelial cells. *Am J Physiol* 1993; **264**: F181-98.
48. Frick KK, Bushinsky DA. Molecular mechanisms of primary hypercalciuria. *J Am Soc Nephrol* 2003; **14**: 1082-95.
49. Rocha AS, Magaldi JB, Kokko JP. Calcium and phosphate transport in isolated segments of rabbit Henle's loop. *J Clin Invest* 1977; **59**: 975-83.
50. Suki WN, Rouse D, Ng RC, Kokko JP. Calcium transport in the thick ascending limb of Henle. Heterogeneity of function in the medullary and cortical segments. *J Clin Invest* 1980; **66**: 1004-9.
51. Loffing J, Loffing-Cueni D, Valderrabano V et al. Distribution of transcellular calcium and sodium transport pathways along mouse distal nephron. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; **281**: F1021-7.
52. Reilly RF, Ellison DH. Mammalian distal tubule: physiology, pathophysiology, and molecular anatomy. *Physiol Rev* 2000; **80**: 277-313.
53. Suki WN. Calcium transport in the nephron. *Am J Physiol* 1979; **237**: F1-6.
54. Shimizu T, Yoshitomi K, Nakamura M, Imai M. Effects of PTH, calcitonin, and cAMP on calcium transport in rabbit distal nephron segments. *Am J Physiol* 1990; **259**: F408-14.
55. Bindels RJ, Hartog A, Timmermans J, Van Os CH. Active Ca<sup>2+</sup> transport in primary cultures of rabbit kidney CCD: stimulation by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and PTH. *Am J Physiol* 1991; **261**: F799-807.
56. Hoenderop JG, van Leeuwen JP, van der Eerden BC et al. Renal Ca<sup>2+</sup> wasting, hyperabsorption, and reduced bone thickness in mice lacking TRPV5. *J Clin Invest* 2003; **112**: 1906-14.
57. Riccardi D, Lee WS, Lee K et al. Localization of the extracellular Ca(2+)-sensing receptor and PTH/PTHrP receptor in rat kidney. *Am J Physiol* 1996; **271**: F951-6.
58. Yang T, Hassan S, Huang YG et al. Expression of PTHrP, PTH/PTHrP receptor, and Ca(2+)-sensing receptor mRNAs along the rat nephron. *Am J Physiol* 1997; **272**: F751-8.
59. Ichikawa I, Humes HD, Dousa TP, Brenner BM. Influence of parathyroid hormone on glomerular ultrafiltration in the rat. *Am J Physiol* 1978; **234**: F393-401.

60. Gesek FA, Friedman PA. On the mechanism of parathyroid hormone stimulation of calcium uptake by mouse distal convoluted tubule cells. *J Clin Invest* 1992; **90**: 749-58.
61. Lambers TT, Bindels RJ, Hoenderop JG. Coordinated control of renal Ca<sup>2+</sup> handling. *Kidney Int* 2006; **69**: 650-4.
62. van Abel M, Hoenderop JG, van der Kemp AW et al. Coordinated control of renal Ca(2+) transport proteins by parathyroid hormone. *Kidney Int* 2005; **68**: 1708-21.
63. Friedman PA, Gesek FA. Cellular calcium transport in renal epithelia: measurement, mechanisms, and regulation. *Physiol Rev* 1995; **75**: 429-71.
64. Bouhtiauy I, Lajeunesse D, Brunette MG. Effect of vitamin D depletion on calcium transport by the luminal and basolateral membranes of the proximal and distal nephrons. *Endocrinology* 1993; **132**: 115-20.
65. Hoenderop JG, Muller D, Van Der Kemp AW et al. Calcitriol controls the epithelial calcium channel in kidney. *J Am Soc Nephrol* 2001; **12**: 1342-9.
66. Hoenderop JG, Dardenne O, Van Abel M et al. Modulation of renal Ca<sup>2+</sup> transport protein genes by dietary Ca<sup>2+</sup> and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-1alpha-hydroxylase knockout mice. *FASEB J* 2002; **16**: 1398-406.
67. Cohen P. The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem* 1989; **58**: 453-508.
68. Hubbard SR, Till JH. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem* 2000; **69**: 373-98.
69. Hunter T, Cooper JA. Protein-tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* 1985; **54**: 897-930.
70. Krebs EG, Beavo JA. Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. *Annu Rev Biochem* 1979; **48**: 923-59.
71. Neuman W. Bone material and calcification mechanisms. In: Urist MR, ed. *Fundamental and clinical bone physiology*. Philadelphia: J.B. Lippincott Co. 1980:83-107.
72. Knochel JP. The pathophysiology and clinical characteristics of severe hypophosphatemia. *Arch Intern Med* 1977; **137**: 203-20.
73. Sommer S, Berndt T, Craig T, Kumar R. The phosphatonins and the regulation of phosphate transport and vitamin D metabolism. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; **103**: 497-503.
74. Greenbaum LA. Electrolyte and acid-base disorders: Phosphorus In: Kliegman RM, Behrman RE, Jenson HB, Stanton BF, eds. *Nelson Textbook of Pediatrics*. 18th ed. Philadelphia: Elsevier - Health Sciences Division 2007:225.
75. Markowitz M, Rotkin L, Rosen JF. Circadian rhythms of blood minerals in humans. *Science* 1981; **213**: 672-4.
76. Mostellar ME, Tuttle EP, Jr. Effects of Alkalosis on Plasma Concentration and Urinary Excretion of Inorganic Phosphate in Man. *J Clin Invest* 1964; **43**: 138-49.
77. Suki WN, Lederer ED, Rouse D. Renal transport of calcium, magnesium, and phosphate. In: Brenner BM, ed. *The kidney*. 8th ed. Philadelphia: W.B. Saunders 2000:520-74.
78. Berndt T, Kumar R. Novel mechanisms in the regulation of phosphorus homeostasis. *Physiology (Bethesda)* 2009; **24**: 17-25.



79. Rowe J, Rowe D, Horak E et al. Hypophosphatemia and hypercalciuria in small premature infants fed human milk: evidence for inadequate dietary phosphorus. *J Pediatr* 1984; **104**: 112-7.
80. Giles MM, Fenton MH, Shaw B et al. Sequential calcium and phosphorus balance studies in preterm infants. *J Pediatr* 1987; **110**: 591-8.
81. Murer H, Forster I, Biber J. The sodium phosphate cotransporter family SLC34. *Pflugers Arch* 2004; **447**: 763-7.
82. Carpenter TO. Primary Disorders of Phosphate Metabolism. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K et al., eds. *Endotext*. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc. 2000.
83. Forster IC, Virkki L, Bossi E et al. Electrogenic kinetics of a mammalian intestinal type IIb Na(+)/P(i) cotransporter. *J Membr Biol* 2006; **212**: 177-90.
84. Lee DBN, Kurokawa K. Physiology of phosphorus metabolism. In: Maxwell MH, Kleeman CR, Narins RG, eds. *Clinical Disorders of Fluid and Electrolyte Metabolism*. New York: McGraw-Hill 1987:245-95.
85. Favus MJ. Intestinal absorption of calcium, magnesium, and phosphorus. In: Coe FL, Favus MJ, eds. *Disorders of Bone and Mineral Metabolism*. New York: Raven 1992:57-81.
86. Xu H, Collins JF, Bai L et al. Regulation of the human sodium-phosphate cotransporter NaP(i)-IIb gene promoter by epidermal growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; **280**: C628-36.
87. Arima K, Hines ER, Kiela PR et al. Glucocorticoid regulation and glycosylation of mouse intestinal type IIb Na-P(i) cotransporter during ontogeny. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; **283**: G426-34.
88. Xu H, Uno JK, Inouye M et al. Regulation of intestinal NaPi-IIb cotransporter gene expression by estrogen. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; **285**: G1317-24.
89. Stauber A, Radanovic T, Stange G et al. Regulation of intestinal phosphate transport. II. Metabolic acidosis stimulates Na(+)-dependent phosphate absorption and expression of the Na(+)-P(i) cotransporter NaPi-IIb in small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; **288**: G501-6.
90. Berndt TJ, Schiavi S, Kumar R. "Phosphatonins" and the regulation of phosphorus homeostasis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; **289**: F1170-82.
91. Farrow EG, White KE. Recent advances in renal phosphate handling. *Nat Rev Nephrol* 2010; **6**: 207-17.
92. Marks J, Debnam ES, Unwin RJ. Phosphate homeostasis and the renal-gastrointestinal axis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; **299**: F285-96.
93. Werner A, Kinne RK. Evolution of the Na-P(i) cotransport systems. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; **280**: R301-12.
94. Forster IC, Hernando N, Biber J, Murer H. Proximal tubular handling of phosphate: A molecular perspective. *Kidney Int* 2006; **70**: 1548-59.
95. Alizadeh Naderi AS, Reilly RF. Hereditary disorders of renal phosphate wasting. *Nat Rev Nephrol* 2010; **6**: 657-65.
96. Tiosano D, Hochberg Z. Hypophosphatemia: the common denominator of all rickets. *J Bone Miner Metab* 2009; **27**: 392-401.
97. Bijvoet OL. Relation of plasma phosphate concentration to renal tubular reabsorption of phosphate. *Clin Sci* 1969; **37**: 23-36.

98. Manghat P, Sodi R, Swaminathan R. Phosphate homeostasis and disorders. *Ann Clin Biochem* 2014; **51**: 631-56.
99. Payne RB. Renal tubular reabsorption of phosphate (TmP/GFR): indications and interpretation. *Ann Clin Biochem* 1998; **35 ( Pt 2)**: 201-6.
100. Kubodera N. A new look at the most successful prodrugs for active vitamin D (D hormone): alfacalcidol and doxercalciferol. *Molecules* 2009; **14**: 3869-80.
101. Reichel H, Koeffler HP, Norman AW. The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *N Engl J Med* 1989; **320**: 980-91.
102. Holick MF. Vitamin D: a D-Lightful health perspective. *Nutr Rev* 2008; **66**: S182-94.
103. Agus ZS. Metabolism of vitamin D. In: Drezner MK, Mulder JE, eds. *UpToDate*. Waltham, MA: UpToDate 2013.
104. Cheng JB, Motola DL, Mangelsdorf DJ, Russell DW. De-orphanization of cytochrome P450 2R1: a microsomal vitamin D 25-hydroxylase. *J Biol Chem* 2003; **278**: 38084-93.
105. Foresta C, Strapazzon G, De Toni L et al. Bone mineral density and testicular failure: evidence for a role of vitamin D 25-hydroxylase in human testis. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; **96**: E646-52.
106. Midgett RJ, Spielvogel AM, Coburn JW, Norman AW. Studies on calciferol metabolism. VII. The renal production of the biologically active form of vitamin D, 1,25-dihydroxycholecalciferol; species, tissue and subcellular distribution. *J Clin Endocrinol Metab* 1973; **36**: 1153-61.
107. Brunette MG, Chan M, Ferriere C, Roberts KD. Site of 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> synthesis in the kidney. *Nature* 1978; **276**: 287-9.
108. Kawashima H, Torikai S, Kurokawa K. Calcitonin selectively stimulates 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-1 alpha-hydroxylase in proximal straight tubule of rat kidney. *Nature* 1981; **291**: 327-9.
109. Kumar R, Schaefer J, Grande JP, Roche PC. Immunolocalization of calcitriol receptor, 24-hydroxylase cytochrome P-450, and calbindin D28k in human kidney. *Am J Physiol* 1994; **266**: F477-85.
110. Kawashima H, Kurokawa K. Metabolism and sites of action of vitamin D in the kidney. *Kidney Int* 1986; **29**: 98-107.
111. Zehnder D, Bland R, Walker EA et al. Expression of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-1alpha-hydroxylase in the human kidney. *J Am Soc Nephrol* 1999; **10**: 2465-73.
112. Anderson PH, May BK, Morris HA. Vitamin D metabolism: new concepts and clinical implications. *Clin Biochem Rev* 2003; **24**: 13-26.
113. Cadranet J, Garabedian M, Milleron B et al. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub> production by T lymphocytes and alveolar macrophages recovered by lavage from normocalcemic patients with tuberculosis. *J Clin Invest* 1990; **85**: 1588-93.
114. Dusso A, Finch J, Delmez J et al. Extrarenal production of calcitriol. *Kidney Int Suppl* 1990; **29**: S36-40.
115. van Driel M, Koedam M, Buurman CJ et al. Evidence that both 1alpha,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 24-hydroxylated D<sub>3</sub> enhance human osteoblast differentiation and mineralization. *J Cell Biochem* 2006; **99**: 922-35.
116. Hewison M, Burke F, Evans KN et al. Extra-renal 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-1alpha-hydroxylase in human health and disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; **103**: 316-21.

117. Bikle D. Nonclassic actions of vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; **94**: 26-34.
118. Henry HL. The 25-Hydroxyvitamin D 1 $\alpha$ -hydroxylase. In: Feldman D, Pike JW, Glorieux FH, eds. *Vitamin D*. 2nd ed. San Diego: Elsevier Academic Press 2005:69–83.
119. Kuro-o M. Overview of the FGF23-Klotho axis. *Pediatr Nephrol* 2010; **25**: 583-90.
120. Henry HL. Regulation of vitamin D metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011; **25**: 531-41.
121. Robinson CJ, Spanos E, James MF et al. Role of prolactin in vitamin D metabolism and calcium absorption during lactation in the rat. *J Endocrinol* 1982; **94**: 443-53.
122. Pike JW, Spanos E, Colston KW et al. Influence of estrogen on renal vitamin D hydroxylases and serum 1 $\alpha$ ,25-(OH) $_2$ D $_3$  in chicks. *Am J Physiol* 1978; **235**: E338-43.
123. Anderson PH, O'Loughlin PD, May BK, Morris HA. Quantification of mRNA for the vitamin D metabolizing enzymes CYP27B1 and CYP24 and vitamin D receptor in kidney using real-time reverse transcriptase- polymerase chain reaction. *J Mol Endocrinol* 2003; **31**: 123-32.
124. Lavin N, ed. *Manual of Endocrinology and Metabolism*. 4th ed. Tarzana, California: Lippincott Williams & Wilkins 2009.
125. Neer RM. The evolutionary significance of vitamin D, skin pigment, and ultraviolet light. *Am J Phys Anthropol* 1975; **43**: 409-16.
126. Kim SY. The pleiomorphic actions of vitamin D and its importance for children. *Ann Pediatr Endocrinol Metab* 2013; **18**: 45-54.
127. Scientific Advisory Committee on Nutrition [SACN]. Update on vitamin D: Position Statement by the Scientific Advisory Committee on Nutrition. London: The Stationary Office 2007.
128. Cancer Research UK. Vitamin D: Expert Review: National Institute for Health and Care Excellence [NICE]; 2010.
129. Thacher TD, Clarke BL. Vitamin D insufficiency. *Mayo Clin Proc* 2011; **86**: 50-60.
130. Hilger J, Friedel A, Herr R et al. A systematic review of vitamin D status in populations worldwide. *Br J Nutr* 2014; **111**: 23-45.
131. Reis JP, von Muhlen D, Miller ER, 3rd et al. Vitamin D status and cardiometabolic risk factors in the United States adolescent population. *Pediatrics* 2009; **124**: e371-9.
132. Ginde AA, Mansbach JM, Camargo CA, Jr. Association between serum 25-hydroxyvitamin D level and upper respiratory tract infection in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch Intern Med* 2009; **169**: 384-90.
133. Fox AT, Du Toit G, Lang A, Lack G. Food allergy as a risk factor for nutritional rickets. *Pediatr Allergy Immunol* 2004; **15**: 566-9.
134. Allen KJ, Koplin JJ, Ponsonby AL et al. Vitamin D insufficiency is associated with challenge-proven food allergy in infants. *J Allergy Clin Immunol* 2013; **131**: 1109-16, 16 e1-6.

135. Lehmann B, Rudolph T, Pietzsch J, Meurer M. Conversion of vitamin D3 to 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in human skin equivalents. *Exp Dermatol* 2000; **9**: 97-103.
136. Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Washington, D.C.: The National Academies Press 2011.
137. Kushi LH, Byers T, Doyle C et al. American Cancer Society Guidelines on Nutrition and Physical Activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA Cancer J Clin* 2006; **56**: 254-81; quiz 313-4.
138. NORDEN. Vitamin D. In: NORDEN, ed. *Nordic Nutrition Recommendations 2012 - Integrating nutrition and physical activity*. 5th ed: Nordic Council of Ministers 2014:349-84.
139. Vieth R, Bischoff-Ferrari H, Boucher BJ et al. The urgent need to recommend an intake of vitamin D that is effective. *Am J Clin Nutr* 2007; **85**: 649-50.
140. Hathcock JN, Shao A, Vieth R, Heaney R. Risk assessment for vitamin D. *Am J Clin Nutr* 2007; **85**: 6-18.
141. Boothby WM. The parathyroid glands: a review of the literature. *Endocrinology* 1921; **5**: 403-40.
142. Juppner H, Abou-Samra AB, Freeman M et al. A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science* 1991; **254**: 1024-6.
143. Usdin TB, Gruber C, Bonner TI. Identification and functional expression of a receptor selectively recognizing parathyroid hormone, the PTH2 receptor. *J Biol Chem* 1995; **270**: 15455-8.
144. Fraser RA, Kronenberg HM, Pang PK, Harvey S. Parathyroid hormone messenger ribonucleic acid in the rat hypothalamus. *Endocrinology* 1990; **127**: 2517-22.
145. Habener JF, Kemper BW, Rich A, Potts JT, Jr. Biosynthesis of parathyroid hormone. *Recent Prog Horm Res* 1976; **33**: 249-308.
146. D'Amour P, Rakel A, Brossard JH et al. Acute regulation of circulating parathyroid hormone (PTH) molecular forms by calcium: utility of PTH fragments/PTH(1-84) ratios derived from three generations of PTH assays. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; **91**: 283-9.
147. Egbuna OI, Brown EM. Hypercalcaemic and hypocalcaemic conditions due to calcium-sensing receptor mutations. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2008; **22**: 129-48.
148. Bringhurst FR, Demay MB, Kronenberg HM. Hormones and disorders of mineral metabolism. In: Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, eds. *Williams Textbook of Endocrinology*. 11th ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier 2008:1203-68.
149. El-Hajj GF, Brown EM. Parathyroid hormone secretion and action. In: Rosen CJ, Mulder JM, eds. *UpToDate*. Waltham, MA: UpToDate 2014.
150. Hanley DA, Watson PH, Hodsman AB, Dempster DW. Pharmacological mechanisms of therapeutics: parathyroid hormone. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Martin TJ, eds. *Principles of Bone Biology*: Elsevier 2008.
151. Civitelli R, Ziambaras K. Calcium and phosphate homeostasis: concerted interplay of new regulators. *J Endocrinol Invest* 2011; **34**: 3-7.

152. Kroll MH. Parathyroid hormone temporal effects on bone formation and resorption. *Bull Math Biol* 2000; **62**: 163-88.
153. Bohinc BN, Gesty-Palmer D. Arrestins in bone. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2013; **118**: 335-58.
154. Horowitz MC, Xi Y, Wilson K, Kacena MA. Control of osteoclastogenesis and bone resorption by members of the TNF family of receptors and ligands. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001; **12**: 9-18.
155. Jilka RL. Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH. *Bone* 2007; **40**: 1434-46.
156. Kousteni S, Bilezikian JP. Cellular actions of parathyroid hormone. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Martin TJ, eds. *Principles of bone biology*. 3rd ed. San Diego, CA: Academic Press, Elsevier 2008:639-56.
157. Silva BC, Bilezikian JP. Parathyroid hormone: anabolic and catabolic actions on the skeleton. *Curr Opin Pharmacol* 2015; **22**: 41-50.
158. Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Osteocalcin: skeletal and extra-skeletal effects. *J Cell Physiol* 2013; **228**: 1149-53.
159. Gorski JP. Biomineralization of bone: a fresh view of the roles of non-collagenous proteins. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2011; **16**: 2598-621.
160. Frost HM. Dynamics of bone remodeling. In: Frost HM, ed. *Bone Biodynamics*. Boston, MA: Little, Brown & Co. 1964:315-33.
161. Howard GA, Bottemiller BL, Turner RT et al. Parathyroid hormone stimulates bone formation and resorption in organ culture: evidence for a coupling mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; **78**: 3204-8.
162. Seibel MJ. Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev* 2005; **26**: 97-122.
163. Aubin JE, Triffitt JT. Mesenchymal stem cells and osteoblast differentiation. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. *Principles of bone biology*. 2nd ed. San Diego, CA: Academic Press 2002:59-81.
164. Rosen HN, Dresner-Pollak R, Moses AC et al. Specificity of urinary excretion of cross-linked N-telopeptides of type I collagen as a marker of bone turnover. *Calcif Tissue Int* 1994; **54**: 26-9.
165. Fink E, Cormier C, Steinmetz P et al. Differences in the capacity of several biochemical bone markers to assess high bone turnover in early menopause and response to alendronate therapy. *Osteoporos Int* 2000; **11**: 295-303.
166. Eastell R, Mallinak N, Weiss S et al. Biological variability of serum and urinary N-telopeptides of type I collagen in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2000; **15**: 594-8.
167. Risteli J, Elomaa I, Niemi S et al. Radioimmunoassay for the pyridinoline cross-linked carboxy-terminal telopeptide of type I collagen: a new serum marker of bone collagen degradation. *Clin Chem* 1993; **39**: 635-40.
168. Eyre DR, Dickson IR, Van Ness K. Collagen cross-linking in human bone and articular cartilage. Age-related changes in the content of mature hydroxyproline residues. *Biochem J* 1988; **252**: 495-500.
169. Christgau S, Rosenquist C, Alexandersen P et al. Clinical evaluation of the Serum CrossLaps One Step ELISA, a new assay measuring the serum concentration of bone-derived degradation products of type I collagen C-telopeptides. *Clin Chem* 1998; **44**: 2290-300.

170. Rosenquist C, Fledelius C, Christgau S et al. Serum CrossLaps One Step ELISA. First application of monoclonal antibodies for measurement in serum of bone-related degradation products from C-terminal telopeptides of type I collagen. *Clin Chem* 1998; **44**: 2281-9.
171. Eriksen HA, Sharp CA, Robins SP et al. Differently cross-linked and uncross-linked carboxy-terminal telopeptides of type I collagen in human mineralised bone. *Bone* 2004; **34**: 720-7.
172. Seibel MJ, Woitge HW. Basic principles and clinical applications of biochemical markers of bone metabolism: biochemical and technical aspects. *J Clin Densitom* 1999; **2**: 299-321.
173. Herrmann M, Seibel MJ. The amino- and carboxyterminal cross-linked telopeptides of collagen type I, NTX-I and CTX-I: a comparative review. *Clin Chim Acta* 2008; **393**: 57-75.
174. Robins SP. Collagen crosslinks in metabolic bone disease. *Acta Orthop Scand Suppl* 1995; **266**: 171-5.
175. Seibel MJ. Molecular markers of bone turnover: biochemical, technical and analytical aspects. *Osteoporos Int* 2000; **11 Suppl 6**: S18-29.
176. Del Fattore A, Teti A. The tight relationship between osteoclasts and the immune system. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2012; **11**: 181-7.
177. Scheven BA, Visser JW, Nijweide PJ. In vitro osteoclast generation from different bone marrow fractions, including a highly enriched haematopoietic stem cell population. *Nature* 1986; **321**: 79-81.
178. Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Arch Biochem Biophys* 2014; **561**: 3-12.
179. Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T et al. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 1990; **345**: 442-4.
180. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; **423**: 337-42.
181. Felix R, Cecchini MG, Hofstetter W et al. Impairment of macrophage colony-stimulating factor production and lack of resident bone marrow macrophages in the osteopetrotic op/op mouse. *J Bone Miner Res* 1990; **5**: 781-9.
182. O'Brien CA. Control of RANKL gene expression. *Bone* 2010; **46**: 911-9.
183. Takayanagi H, Iizuka H, Juji T et al. Involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; **43**: 259-69.
184. 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**: 4768-76.
185. Zhao S, Zhang YK, Harris S et al. MLO-Y4 osteocyte-like cells support osteoclast formation and activation. *J Bone Miner Res* 2002; **17**: 2068-79.
186. Usui M, Xing L, Drissi H et al. Murine and chicken chondrocytes regulate osteoclastogenesis by producing RANKL in response to BMP2. *J Bone Miner Res* 2008; **23**: 314-25.
187. Kartsogiannis V, Zhou H, Horwood NJ et al. Localization of RANKL (receptor activator of NF kappa B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskeletal tissues. *Bone* 1999; **25**: 525-34.

188. Nakashima T, Hayashi M, Takayanagi H. New insights into osteoclastogenic signaling mechanisms. *Trends Endocrinol Metab* 2012; **23**: 582-90.
189. 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**: 3540-5.
190. Fuller K, Wong B, Fox S et al. TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med* 1998; **188**: 997-1001.
191. Lacey DL, Timms E, Tan HL et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; **93**: 165-76.
192. Kong YY, Boyle WJ, Penninger JM. Osteoprotegerin ligand: a regulator of immune responses and bone physiology. *Immunol Today* 2000; **21**: 495-502.
193. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; **89**: 309-19.
194. 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.
195. Buenzli PR, Sims NA. Quantifying the osteocyte network in the human skeleton. *Bone* 2015; **75**: 144-50.
196. Schaffler MB, Cheung WY, Majeska R, Kennedy O. Osteocytes: master orchestrators of bone. *Calcif Tissue Int* 2014; **94**: 5-24.
197. Bivi N, Nelson MT, Faillace ME et al. Deletion of Cx43 from osteocytes results in defective bone material properties but does not decrease extrinsic strength in cortical bone. *Calcif Tissue Int* 2012; **91**: 215-24.
198. Moriishi T, Fukuyama R, Ito M et al. Osteocyte network; a negative regulatory system for bone mass augmented by the induction of Rankl in osteoblasts and Sost in osteocytes at unloading. *PLoS One* 2012; **7**: e40143.
199. Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N et al. Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell Metab* 2007; **5**: 464-75.
200. Ma NS, Gordon CM. Pediatric osteoporosis: where are we now? *J Pediatr* 2012; **161**: 983-90.
201. Bachrach LK. Assessing bone health in children: who to test and what does it mean? *Pediatr Endocrinol Rev* 2005; **2 Suppl 3**: 332-6.
202. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention D, Therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA* 2001; **285**: 785-95.
203. Stagi S, Cavalli L, Iurato C et al. Bone health in children and adolescents: the available imaging techniques. *Clin Cases Miner Bone Metab* 2013; **10**: 166-71.
204. D'Elia G, Caracchini G, Cavalli L, Innocenti P. Bone fragility and imaging techniques. *Clin Cases Miner Bone Metab* 2009; **6**: 234-46.
205. Zemel BS. Quantitative computed tomography and computed tomography in children. *Curr Osteoporos Rep* 2011; **9**: 284-90.
206. Jurimae J. Interpretation and application of bone turnover markers in children and adolescents. *Curr Opin Pediatr* 2010; **22**: 494-500.
207. Orwoll ES, Miller PD, Adachi JD et al. Efficacy and safety of a once-yearly i.v. Infusion of zoledronic acid 5 mg versus a once-weekly 70-mg oral alendronate in the treatment of male osteoporosis: a randomized, multicenter, double-blind, active-controlled study. *J Bone Miner Res* 2010; **25**: 2239-50.

208. Hubina E, Lakatos P, Kovacs L et al. Effects of 24 months of growth hormone (GH) treatment on serum carboxylated and undercarboxylated osteocalcin levels in GH-deficient adults. *Calcif Tissue Int* 2004; **74**: 55-9.
209. Rauchenzauner M, Schmid A, Heinz-Erian P et al. Sex- and age-specific reference curves for serum markers of bone turnover in healthy children from 2 months to 18 years. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; **92**: 443-9.
210. Civitelli R. Biochemical markers of bone turnover. In: Avioli LV, ed. *The Osteoporotic syndrome : detection, prevention, and treatment*. 4th ed. New York: Academic press 2000:67-89.
211. McAssey KL, Grey V. Disorders of calcium and phosphate metabolism in infants and children. In: Dietzen DJ, Bennett MJ, Wong ECC, eds. *Biochemical and molecular basis of pediatric disease*. 4th ed: AACCC Press 2010:195.
212. Penido MG, Alon US. Phosphate homeostasis and its role in bone health. *Pediatr Nephrol* 2012; **27**: 2039-48.
213. van Straalen JP, Sanders E, Prummel MF, Sanders GT. Bone-alkaline phosphatase as indicator of bone formation. *Clin Chim Acta* 1991; **201**: 27-33.
214. Wolf G. Function of the bone protein osteocalcin: definitive evidence. *Nutr Rev* 1996; **54**: 332-3.
215. Delmas PD, Christiansen C, Mann KG, Price PA. Bone Gla protein (osteocalcin) assay standardization report. *J Bone Miner Res* 1990; **5**: 5-11.
216. Hannon R, Blumsohn A, Naylor K, Eastell R. Response of biochemical markers of bone turnover to hormone replacement therapy: impact of biological variability. *J Bone Miner Res* 1998; **13**: 1124-33.
217. Lowry M, Hall DE, Brosnan JT. Hydroxyproline metabolism by the rat kidney: distribution of renal enzymes of hydroxyproline catabolism and renal conversion of hydroxyproline to glycine and serine. *Metabolism* 1985; **34**: 955-61.
218. Al-Dehaimi AW, Blumsohn A, Eastell R. Serum galactosyl hydroxylysine as a biochemical marker of bone resorption. *Clin Chem* 1999; **45**: 676-81.
219. Langrock T, Garcia-Villar N, Hoffmann R. Analysis of hydroxyproline isomers and hydroxylysine by reversed-phase HPLC and mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; **847**: 282-8.
220. Abe Y, Ishikawa H, Fukao A. Higher efficacy of urinary bone resorption marker measurements in assessing response to treatment for osteoporosis in postmenopausal women. *Tohoku J Exp Med* 2008; **214**: 51-9.
221. Fassbender WJ, Godde M, Brandenburg VM et al. Urinary bone resorption markers (deoxypyridinoline and C-terminal telopeptide of type I collagen) in healthy persons, postmenopausal osteoporosis and patients with type I diabetes. *Adv Med Sci* 2009; **54**: 1-6.
222. Civitelli R, Armamento-Villareal R, Napoli N. Bone turnover markers: understanding their value in clinical trials and clinical practice. *Osteoporos Int* 2009; **20**: 843-51.
223. Crofton PM, Evans N, Taylor MR, Holland CV. Serum CrossLaps: pediatric reference intervals from birth to 19 years of age. *Clin Chem* 2002; **48**: 671-3.
224. Okabe R, Nakatsuka K, Inaba M et al. Clinical evaluation of the Elecsys beta-CrossLaps serum assay, a new assay for degradation products of type I collagen C-telopeptides. *Clin Chem* 2001; **47**: 1410-4.



225. Arrabal-Polo MA, Arias-Santiago S, Arrabal-Martin M. What is the value of bone remodeling markers in patients with calcium stones? *Urol Res* 2012; **40**: 803.
226. Arrabal-Polo MA, Arrabal-Martin M, de Haro-Munoz T et al. Biochemical determinants of severe lithogenic activity in patients with idiopathic calcium nephrolithiasis. *Urology* 2012; **79**: 48-54.
227. Vasikaran S, Cooper C, Eastell R et al. International Osteoporosis Foundation and International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine position on bone marker standards in osteoporosis. *Clin Chem Lab Med* 2011; **49**: 1271-4.
228. Kaneko K, Chiba M, Hashizume M et al. Extremely high prevalence of hypercalciuria in children living in the Aral Sea region. *Acta Paediatr* 2002; **91**: 1116-20.
229. Crighton EJ, Barwin L, Small I, Upshur R. What have we learned? A review of the literature on children's health and the environment in the Aral Sea area. *Int J Public Health* 2011; **56**: 125-38.
230. Gillespie RS, Stapleton FB. Nephrolithiasis in children. *Pediatr Rev* 2004; **25**: 131-9.
231. Bercem G, Cevit O, Toksoy HB et al. Asymptomatic hypercalciuria: prevalence and metabolic characteristics. *Indian J Pediatr* 2001; **68**: 315-8.
232. Escribano J, Rubio-Torrents C, Ferre N et al. Reduced bone mass in 7-year-old children with asymptomatic idiopathic hypercalciuria. *Ann Nutr Metab* 2014; **64**: 304-13.
233. Penido MG, Diniz JS, Moreira ML et al. Idiopathic hypercalciuria: presentation of 471 cases. *J Pediatr (Rio J)* 2001; **77**: 101-4.
234. Korzeniecka-Kozerska A, Porowski T, Wasilewska A, Stefanowicz M. Urinary calcium excretion in children with monosymptomatic enuresis. *Ir J Med Sci* 2015; **184**: 899-905.
235. Yousefichaijan P, Rafiei M, Aziminejad A, Pakniyat A. The prevalence of hypercalciuria in girl kids with over active bladder. *J Renal Inj Prev* 2015; **4**: 117-9.
236. Vachvanichsanong P, Malagon M, Moore ES. Recurrent abdominal and flank pain in children with idiopathic hypercalciuria. *Acta Paediatr* 2001; **90**: 643-8.
237. Polito C, La Manna A, Cioce F et al. Clinical presentation and natural course of idiopathic hypercalciuria in children. *Pediatr Nephrol* 2000; **15**: 211-4.
238. Stojanovic VD, Milosevic BO, Djapic MB, Bubalo JD. Idiopathic hypercalciuria associated with urinary tract infection in children. *Pediatr Nephrol* 2007; **22**: 1291-5.
239. Lande MB, Varade W, Erkan E et al. Role of urinary supersaturation in the evaluation of children with urolithiasis. *Pediatr Nephrol* 2005; **20**: 491-4.
240. Alon US, Zimmerman H, Alon M. Evaluation and treatment of pediatric idiopathic urolithiasis-revisited. *Pediatr Nephrol* 2004; **19**: 516-20.
241. Spivacow FR, Negri AL, del Valle EE et al. Metabolic risk factors in children with kidney stone disease. *Pediatr Nephrol* 2008; **23**: 1129-33.
242. Garcia CD, Miller LA, Stapleton FB. Natural history of hematuria associated with hypercalciuria in children. *Am J Dis Child* 1991; **145**: 1204-7.
243. Penido MG, Lima EM, Marino VS et al. Bone alterations in children with idiopathic hypercalciuria at the time of diagnosis. *Pediatr Nephrol* 2003; **18**: 133-9.

244. Penido MG, Lima EM, Souto MF et al. Hypocitraturia: a risk factor for reduced bone mineral density in idiopathic hypercalciuria? *Pediatr Nephrol* 2006; **21**: 74-8.
245. Escribano J, Balaguer A, Roque i Figuls M et al. Dietary interventions for preventing complications in idiopathic hypercalciuria. *Cochrane Database Syst Rev* 2014: CD006022.
246. Pak CY, Kaplan R, Bone H et al. A simple test for the diagnosis of absorptive, resorptive and renal hypercalciurias. *N Engl J Med* 1975; **292**: 497-500.
247. Bataille P, Fardellone P, Ghazali A et al. Pathophysiology and treatment of idiopathic hypercalciuria. *Curr Opin Rheumatol* 1998; **10**: 373-88.
248. Lein JW, Keane PM. Limitations of the oral calcium loading test in the management of the recurrent calcareous renal stone former. *Am J Kidney Dis* 1983; **3**: 76-9.
249. Coe FL, Favus MJ, Crockett T et al. Effects of low-calcium diet on urine calcium excretion, parathyroid function and serum 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> levels in patients with idiopathic hypercalciuria and in normal subjects. *Am J Med* 1982; **72**: 25-32.
250. Stapleton FB, Jones DP, Miller LA. Evaluation of bone metabolism in children with hypercalciuria. *Semin Nephrol* 1989; **9**: 75-8.
251. Nicolaidou P, Themeli S, Karpathios T et al. Family pattern of idiopathic hypercalciuria and its subtypes. *J Urol* 1996; **155**: 1042-4.
252. Harangi F, Mehes K. Family investigations in idiopathic hypercalciuria. *Eur J Pediatr* 1993; **152**: 64-8.
253. Lerolle N, Coulet F, Lantz B et al. No evidence for point mutations of the calcium-sensing receptor in familial idiopathic hypercalciuria. *Nephrol Dial Transplant* 2001; **16**: 2317-22.
254. Aladjem M, Barr J, Lahat E, Bistritzer T. Renal and absorptive hypercalciuria: a metabolic disturbance with varying and interchanging modes of expression. *Pediatrics* 1996; **97**: 216-9.
255. Maierhofer WJ, Lemann J, Jr., Gray RW, Cheung HS. Dietary calcium and serum 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamin D concentrations as determinants of calcium balance in healthy men. *Kidney Int* 1984; **26**: 752-9.
256. Kerstetter JE, O'Brien KO, Insogna KL. Dietary protein, calcium metabolism, and skeletal homeostasis revisited. *Am J Clin Nutr* 2003; **78**: 584S-92S.
257. Bushinsky DA. Genetic hypercalciuric stone-forming rats. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1999; **8**: 479-88.
258. Vezzoli G, Tanini A, Ferrucci L et al. Influence of calcium-sensing receptor gene on urinary calcium excretion in stone-forming patients. *J Am Soc Nephrol* 2002; **13**: 2517-23.
259. Heilberg IP, Weisinger JR. Bone disease in idiopathic hypercalciuria. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006; **15**: 394-402.
260. Worcester EM, Gillen DL, Evan AP et al. Evidence that postprandial reduction of renal calcium reabsorption mediates hypercalciuria of patients with calcium nephrolithiasis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; **292**: F66-75.
261. Worcester EM, Coe FL. Evidence for altered renal tubule function in idiopathic calcium stone formers. *Urol Res* 2010; **38**: 263-9.
262. Coe FL, Evan A, Worcester E. Pathophysiology-based treatment of idiopathic calcium kidney stones. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011; **6**: 2083-92.

263. Levy FL, Adams-Huet B, Pak CY. Ambulatory evaluation of nephrolithiasis: an update of a 1980 protocol. *Am J Med* 1995; **98**: 50-9.
264. Prie D, Ravery V, Boccon-Gibod L, Friedlander G. Frequency of renal phosphate leak among patients with calcium nephrolithiasis. *Kidney Int* 2001; **60**: 272-6.
265. Maierhofer WJ, Gray RW, Cheung HS, Lemann J, Jr. Bone resorption stimulated by elevated serum 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamin D concentrations in healthy men. *Kidney Int* 1983; **24**: 555-60.
266. Adams ND, Gray RW, Lemann J, Jr., Cheung HS. Effects of calcitriol administration on calcium metabolism healthy men. *Kidney Int* 1982; **21**: 90-7.
267. Breslau NA, Preminger GM, Adams BV et al. Use of ketoconazole to probe the pathogenetic importance of 1,25-dihydroxyvitamin D in absorptive hypercalciuria. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; **75**: 1446-52.
268. Bushinsky DA, Frick KK, Nehrke K. Genetic hypercalciuric stone-forming rats. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006; **15**: 403-18.
269. Li XQ, Tembe V, Horwitz GM et al. Increased intestinal vitamin D receptor in genetic hypercalciuric rats. A cause of intestinal calcium hyperabsorption. *J Clin Invest* 1993; **91**: 661-7.
270. Yao J, Kathpalia P, Bushinsky DA, Favus MJ. Hyperresponsiveness of vitamin D receptor gene expression to 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. A new characteristic of genetic hypercalciuric stone-forming rats. *J Clin Invest* 1998; **101**: 2223-32.
271. Yao JJ, Bai S, Karnauskas AJ et al. Regulation of renal calcium receptor gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in genetic hypercalciuric stone-forming rats. *J Am Soc Nephrol* 2005; **16**: 1300-8.
272. Favus MJ, Karnauskas AJ, Parks JH, Coe FL. Peripheral blood monocyte vitamin D receptor levels are elevated in patients with idiopathic hypercalciuria. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; **89**: 4937-43.
273. Stapleton FB, Noe HN, Roy S, 3rd, Jerkins G. Hypercalciuria in children with urolithiasis. *Am J Dis Child* 1982; **136**: 675-8.
274. Stapleton FB, McKay CP, Noe HN. Urolithiasis in children: the role of hypercalciuria. *Pediatr Ann* 1987; **16**: 980-1,4-92.
275. Perrone HC, Lewin S, Langman CB et al. Bone effects of the treatment of children with absorptive hypercalciuria. *Pediatr Nephrol* 1992; **6**: C115.
276. Garcia-Nieto V, Navarro JF, Monge M, Garcia-Rodriguez VE. Bone mineral density in girls and their mothers with idiopathic hypercalciuria. *Nephron Clin Pract* 2003; **94**: c89-93.
277. Penido MG, de Sousa Tavares M, Campos Linhares M et al. Longitudinal study of bone mineral density in children with idiopathic hypercalciuria. *Pediatr Nephrol* 2012; **27**: 123-30.
278. Artemiuk I, Panczyk-Tomaszewska M, Adamczuk D et al. Bone Mineral Density in Children with Idiopathic Hypercalciuria. *Dev Period Med* 2015; **19**: 356-61.
279. Malluche HH, Tschoepe W, Ritz E et al. Abnormal bone histology in idiopathic hypercalciuria. *J Clin Endocrinol Metab* 1980; **50**: 654-8.
280. Heller HJ, Zerwekh JE, Gottschalk FA, Pak CY. Reduced bone formation and relatively increased bone resorption in absorptive hypercalciuria. *Kidney Int* 2007; **71**: 808-15.

281. Steiniche T, Mosekilde L, Christensen MS, Melsen F. A histomorphometric determination of iliac bone remodeling in patients with recurrent renal stone formation and idiopathic hypercalciuria. *APMIS* 1989; **97**: 309-16.
282. Bordier P, Ryckewart A, Gueris J, Rasmussen H. On the pathogenesis of so-called idiopathic hypercalciuria. *Am J Med* 1977; **63**: 398-409.
283. Zerwekh JE. Bone disease and idiopathic hypercalciuria. *Semin Nephrol* 2008; **28**: 133-42.
284. Da Silva AMM, Dos Reis LM, Pereira RC. Bone histomorphometric and bone mineral content in idiopathic hypercalciuria patients. *XIIth International Congress of Nephrology*. June 13-19, Jerusalem, Israel 1993.
285. de Vernejoul MC, Hioco D, Villiaumey J et al. Etude histomorphometrique osseuse au cours de l'hypercalciurie idiopathique. *Rev Rhum Mal Osteoartic* 1981; **48**: 389-95.
286. Fournier A, Ghazali A, Bataille P et al. Bone involvement in idiopathic calcium-stone formers. In: Coe FL, Worcester E, Lingeman JE, Evan A, eds. *Kidney Stones: Medical and Surgical Management*. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven 1996:921-38.
287. Bataille P, Achard JM, Fournier A et al. Diet, vitamin D and vertebral mineral density in hypercalciuric calcium stone formers. *Kidney Int* 1991; **39**: 1193-205.
288. Tasca A, Cacciola A, Ferrarese P et al. Bone alterations in patients with idiopathic hypercalciuria and calcium nephrolithiasis. *Urology* 2002; **59**: 865-9; discussion 9.
289. Sella S, Cattelan C, Realdi G, Giannini S. Bone disease in primary hypercalciuria. *Clin Cases Miner Bone Metab* 2008; **5**: 118-26.
290. Routh JC, Graham DA, Nelson CP. Epidemiological trends in pediatric urolithiasis at United States freestanding pediatric hospitals. *J Urol* 2010; **184**: 1100-4.
291. Hesse A. Reliable data from diverse regions of the world exist to show that there has been a steady increase in the prevalence of urolithiasis. *World J Urol* 2005; **23**: 302-3.
292. Sas DJ. An update on the changing epidemiology and metabolic risk factors in pediatric kidney stone disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011; **6**: 2062-8.
293. Kieran K, Giel DW, Morris BJ et al. Pediatric urolithiasis--does body mass index influence stone presentation and treatment? *J Urol* 2010; **184**: 1810-5.
294. Clayton DB, Pope JC. The increasing pediatric stone disease problem. *Ther Adv Urol* 2011; **3**: 3-12.
295. Lemann J, Jr., Worcester EM, Gray RW. Hypercalciuria and stones. *Am J Kidney Dis* 1991; **17**: 386-91.
296. Lemann J, Jr. Idiopathic hypercalciuria. In: Coe FL, Favus MJ, eds. *Disorders of bone and mineral metabolism*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2002:673-97.
297. Nijenhuis T, Renkema KY, Hoenderop JG, Bindels RJ. Acid-base status determines the renal expression of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> transport proteins. *J Am Soc Nephrol* 2006; **17**: 617-26.
298. Lemann J, Jr., Lennon EJ, Piering WR et al. Evidence that glucose ingestion inhibits net renal tubular reabsorption of calcium and magnesium in man. *J Lab Clin Med* 1970; **75**: 578-85.

299. Lemann J, Jr., Piering WF, Lennon EJ. Possible role of carbohydrate-induced calciuria in calcium oxalate kidney-stone formation. *N Engl J Med* 1969; **280**: 232-7.
300. Lennon EJ, Lemann J, Jr., Piering WF, Larson LS. The effect of glucose on urinary cation excretion during chronic extracellular volume expansion in normal man. *J Clin Invest* 1974; **53**: 1424-33.
301. Lennon EJ, Piering WF. A comparison of the effects of glucose ingestion and NH<sub>4</sub>Cl acidosis on urinary calcium and magnesium excretion in man. *J Clin Invest* 1970; **49**: 1458-65.
302. DeFronzo RA, Goldberg M, Agus ZS. The effects of glucose and insulin on renal electrolyte transport. *J Clin Invest* 1976; **58**: 83-90.
303. Schwille PO, Rumenapf G, Kohler R. Blood levels of glucometabolic hormones and urinary saturation with stone forming phases after an oral test meal in male patients with recurrent idiopathic calcium urolithiasis and in healthy controls. *J Am Coll Nutr* 1989; **8**: 557-66.
304. Prezioso D, Strazzullo P, Lotti T et al. Dietary treatment of urinary risk factors for renal stone formation. A review of CLU Working Group. *Arch Ital Urol Androl* 2015; **87**: 105-20.
305. Curhan GC, Willett WC, Speizer FE, Stampfer MJ. Beverage use and risk for kidney stones in women. *Ann Intern Med* 1998; **128**: 534-40.
306. Qiang W, Ke Z. Water for preventing urinary calculi. *Cochrane Database Syst Rev* 2004: CD004292.
307. Siener R, Hesse A. Fluid intake and epidemiology of urolithiasis. *Eur J Clin Nutr* 2003; **57 Suppl 2**: S47-51.
308. Noori N, Honarkar E, Goldfarb DS et al. Urinary lithogenic risk profile in recurrent stone formers with hyperoxaluria: a randomized controlled trial comparing DASH (Dietary Approaches to Stop Hypertension)-style and low-oxalate diets. *Am J Kidney Dis* 2014; **63**: 456-63.
309. Food and Nutrition Board. Nutrient Recommendations: Dietary Reference Intakes (DRI). 2015 [Available from: [https://ods.od.nih.gov/Health\\_Information/Dietary\\_Reference\\_Intakes.aspx](https://ods.od.nih.gov/Health_Information/Dietary_Reference_Intakes.aspx)]
310. Lemann J, Jr. Relationship between urinary calcium and net acid excretion as determined by dietary protein and potassium: a review. *Nephron* 1999; **81 Suppl 1**: 18-25.
311. Pencharz PB, Elango R, Wolfe RR. Recent developments in understanding protein needs - How much and what kind should we eat? *Appl Physiol Nutr Metab* 2016; **41**: 577-80.
312. Penido MG, de Sousa Tavares M. Pediatric primary urolithiasis: Symptoms, medical management and prevention strategies. *World Journal of Nephrology* 2015; **4**: 444-54.
313. Phillips R, Hanchanale VS, Myatt A et al. Citrate salts for preventing and treating calcium containing kidney stones in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2015: CD010057.
314. Sarica K, Erturhan S, Yurtseven C, Yagci F. Effect of potassium citrate therapy on stone recurrence and regrowth after extracorporeal shockwave lithotripsy in children. *J Endourol* 2006; **20**: 875-9.

315. Escribano J, Balaguer A, Pagone F et al. Pharmacological interventions for preventing complications in idiopathic hypercalciuria. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; CD004754.
316. Sellmeyer DE, Schloetter M, Sebastian A. Potassium citrate prevents increased urine calcium excretion and bone resorption induced by a high sodium chloride diet. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; **87**: 2008-12.
317. Dawson-Hughes B, Harris SS, Palermo NJ et al. Treatment with potassium bicarbonate lowers calcium excretion and bone resorption in older men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; **94**: 96-102.
318. Hofbauer J, Hobarth K, Szabo N, Marberger M. Alkali citrate prophylaxis in idiopathic recurrent calcium oxalate urolithiasis--a prospective randomized study. *Br J Urol* 1994; **73**: 362-5.
319. Prezioso D, Strazzullo P, Lotti T et al. ERRATUM: Dietary treatment of urinary risk factors for renal stone formation. A review of CLU Working Group. *Arch Ital Urol Androl* 2016; **88**: 76.
320. Costanzo LS, Windhager EE. Calcium and sodium transport by the distal convoluted tubule of the rat. *Am J Physiol* 1978; **235**: F492-506.
321. Sakhaee K, Maalouf NM, Kumar R et al. Nephrolithiasis-associated bone disease: pathogenesis and treatment options. *Kidney Int* 2011; **79**: 393-403.
322. Hall TJ, Schaubelin M. Hydrochlorothiazide inhibits osteoclastic bone resorption in vitro. *Calcif Tissue Int* 1994; **55**: 266-8.
323. Reusz GS, Dobos M, Vasarhelyi B et al. Sodium transport and bone mineral density in hypercalciuria with thiazide treatment. *Pediatr Nephrol* 1998; **12**: 30-4.
324. Choi JN, Lee JS, Shin JI. Low-dose thiazide diuretics in children with idiopathic renal hypercalciuria. *Acta Paediatr* 2011; **100**: e71-4.
325. Freundlich M, Alon US. Bisphosphonates in children with hypercalciuria and reduced bone mineral density. *Pediatr Nephrol* 2008; **23**: 2215-20.
326. Polito C, La Manna A, Nappi B et al. Idiopathic hypercalciuria and hyperuricosuria: family prevalence of nephrolithiasis. *Pediatr Nephrol* 2000; **14**: 1102-4.
327. Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Stampfer MJ. Family history and risk of kidney stones. *J Am Soc Nephrol* 1997; **8**: 1568-73.
328. Stechman MJ, Loh NY, Thakker RV. Genetic causes of hypercalciuric nephrolithiasis. *Pediatr Nephrol* 2009; **24**: 2321-32.
329. Goldfarb DS, Fischer ME, Keich Y, Goldberg J. A twin study of genetic and dietary influences on nephrolithiasis: a report from the Vietnam Era Twin (VET) Registry. *Kidney Int* 2005; **67**: 1053-61.
330. Trinchieri A. Epidemiology of urolithiasis. *Arch Ital Urol Androl* 1996; **68**: 203-49.
331. Resnick M, Pridgen DB, Goodman HO. Genetic predisposition to formation of calcium oxalate renal calculi. *N Engl J Med* 1968; **278**: 1313-8.
332. Arcidiacono T, Mingione A, Macrina L et al. Idiopathic calcium nephrolithiasis: a review of pathogenic mechanisms in the light of genetic studies. *Am J Nephrol* 2014; **40**: 499-506.
333. Reed BY, Gitomer WL, Heller HJ et al. Identification and characterization of a gene with base substitutions associated with the absorptive hypercalciuria

- phenotype and low spinal bone density. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; **87**: 1476-85.
334. Sayer JA. Progress in Understanding the Genetics of Calcium-Containing Nephrolithiasis. *J Am Soc Nephrol* 2017; **28**: 748-59.
335. Vezzoli G, Terranegra A, Arcidiacono T, Soldati L. Genetics and calcium nephrolithiasis. *Kidney Int* 2011; **80**: 587-93.
336. Riccardi D, Brown EM. Physiology and pathophysiology of the calcium-sensing receptor in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; **298**: F485-99.
337. Brown EM, MacLeod RJ. Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol Rev* 2001; **81**: 239-97.
338. Hofer AM, Brown EM. Extracellular calcium sensing and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; **4**: 530-8.
339. Blankenship KA, Williams JJ, Lawrence MS et al. The calcium-sensing receptor regulates calcium absorption in MDCK cells by inhibition of PMCA. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; **280**: F815-22.
340. Toka HR, Al-Romaih K, Koshy JM et al. Deficiency of the calcium-sensing receptor in the kidney causes parathyroid hormone-independent hypocalciuria. *J Am Soc Nephrol* 2012; **23**: 1879-90.
341. Gong Y, Renigunta V, Himmerkus N et al. Claudin-14 regulates renal Ca(+)(+) transport in response to CaSR signalling via a novel microRNA pathway. *EMBO J* 2012; **31**: 1999-2012.
342. Dimke H, Desai P, Borovac J et al. Activation of the Ca(2+)-sensing receptor increases renal claudin-14 expression and urinary Ca(2+) excretion. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013; **304**: F761-9.
343. Casare F, Milan D, Fernandez R. Stimulation of calcium-sensing receptor increases biochemical H(+)-ATPase activity in mouse cortex and outer medullary regions. *Can J Physiol Pharmacol* 2014; **92**: 181-8.
344. Ba J, Brown D, Friedman PA. Calcium-sensing receptor regulation of PTH-inhibitable proximal tubule phosphate transport. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; **285**: F1233-43.
345. Vezzoli G, Terranegra A, Rainone F et al. Calcium-sensing receptor and calcium kidney stones. *J Transl Med* 2011; **9**: 201.
346. Vezzoli G, Terranegra A, Aloia A et al. Decreased transcriptional activity of calcium-sensing receptor gene promoter 1 is associated with calcium nephrolithiasis. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; **98**: 3839-47.
347. Chen RA, Goodman WG. Role of the calcium-sensing receptor in parathyroid gland physiology. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; **286**: F1005-11.
348. Hendy GN, Canaff L. Calcium-Sensing Receptor Gene: Regulation of Expression. *Front Physiol* 2016; **7**: 394.
349. Scillitani A, Guarnieri V, De Geronimo S et al. Blood ionized calcium is associated with clustered polymorphisms in the carboxyl-terminal tail of the calcium-sensing receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; **89**: 5634-8.
350. Liu K, Wang X, Ye J et al. The G allele of CaSR R990G polymorphism increases susceptibility to urolithiasis and hypercalciuria: evidences from a comprehensive meta-analysis. *Biomed Res Int* 2015; **2015**: 958207.

351. Vezzoli G, Terranegra A, Soldati L. Calcium-sensing receptor gene polymorphisms in patients with calcium nephrolithiasis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2012; **21**: 355-61.
352. Armitage P, Berry G, Matthews JNS. Statistical methods in medical research. 4th ed. Oxford ; Malden, MA: Blackwell Science 2002.
353. Fischer DC, Mischek A, Wolf S et al. Paediatric reference values for the C-terminal fragment of fibroblast-growth factor-23, sclerostin, bone-specific alkaline phosphatase and isoform 5b of tartrate-resistant acid phosphatase. *Ann Clin Biochem* 2012; **49**: 546-53.
354. Asplin JR, Donahue S, Kinder J, Coe FL. Urine calcium excretion predicts bone loss in idiopathic hypercalciuria. *Kidney Int* 2006; **70**: 1463-7.
355. Copelovitch L. Urolithiasis in children: medical approach. *Pediatr Clin North Am* 2012; **59**: 881-96.
356. Penniston KL, Nakada SY. Effect of dietary changes on urinary oxalate excretion and calcium oxalate supersaturation in patients with hyperoxaluric stone formation. *Urology* 2009; **73**: 484-9.
357. Romero V, Akpinar H, Assimos DG. Kidney stones: a global picture of prevalence, incidence, and associated risk factors. *Rev Urol* 2010; **12**: e86-96.
358. Sakhaee K, Maalouf NM, Sinnott B. Clinical review. Kidney stones 2012: pathogenesis, diagnosis, and management. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; **97**: 1847-60.
359. Ross SS, Masko EM, Abern MR et al. The effect of dietary sodium and fructose intake on urine and serum parameters of stone formation in a pediatric mouse model: a pilot study. *J Urol* 2013; **190**: 1484-9.
360. Lynch C, Kristjansdottir AG, Te Velde SJ et al. Fruit and vegetable consumption in a sample of 11-year-old children in ten European countries--the PRO GREENS cross-sectional survey. *Public Health Nutr* 2014; **17**: 2436-44.
361. Worcester EM, Coe FL. Clinical practice. Calcium kidney stones. *N Engl J Med* 2010; **363**: 954-63.
362. Ryan LE, Ing SW. Idiopathic hypercalciuria and bone health. *Curr Osteoporos Rep* 2012; **10**: 286-95.
363. Maggio AJ, Jr., Coburn JW, Brosman SA, Das S. The role of vitamin D in idiopathic hypercalciuria. *J Urol* 1979; **122**: 147-51.
364. Pak CY. Physiological basis for absorptive and renal hypercalciurias. *Am J Physiol* 1979; **237**: F415-23.
365. Magne D, Bluteau G, Faucheux C et al. Phosphate is a specific signal for ATDC5 chondrocyte maturation and apoptosis-associated mineralization: possible implication of apoptosis in the regulation of endochondral ossification. *J Bone Miner Res* 2003; **18**: 1430-42.
366. Tasca A, Dalle Carbonare L, Nigro F, Giannini S. Bone disease in patients with primary hypercalciuria and calcium nephrolithiasis. *Urology* 2009; **74**: 22-7.
367. Moreira Guimaraes Penido MG, de Sousa Tavares M. Bone disease in pediatric idiopathic hypercalciuria. *World J Nephrol* 2012; **1**: 54-62.
368. Barros EJ, dos Santos DR, Boim MA et al. [Calciuria, calcium overload and urinary cyclic AMP in the evaluation of patients with calcic lithiasis]. *AMB Rev Assoc Med Bras* 1986; **32**: 96-100.



369. Hess B, Jaeger P. The tale of parathyroid function in idiopathic hypercalciuria. *Scanning Microsc* 1993; **7**: 403-8.
370. Hess B, Casez JP, Takkinen R et al. Relative hypoparathyroidism and calcitriol up-regulation in hypercalciuric calcium renal stone formers--impact of nutrition. *Am J Nephrol* 1993; **13**: 18-26.
371. Kim WT, Kim YJ, Yun SJ et al. Role of 1,25-dihydroxy vitamin D3 and parathyroid hormone in urinary calcium excretion in calcium stone formers. *Yonsei Med J* 2014; **55**: 1326-32.
372. Giannini S, Nobile M, Sella S, Dalle Carbonare L. Bone disease in primary hypercalciuria. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2005; **42**: 229-48.
373. Liberman UA, Sperling O, Atsmon A et al. Metabolic and calcium kinetic studies in idiopathic hypercalciuria. *J Clin Invest* 1968; **47**: 2580-90.
374. Worcester EM, Coe FL, Evan AP et al. Evidence for increased postprandial distal nephron calcium delivery in hypercalciuric stone-forming patients. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; **295**: F1286-94.
375. Heaney RP, Barger-Lux MJ, Dowell MS et al. Calcium absorptive effects of vitamin D and its major metabolites. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82**: 4111-6.
376. Berlin T, Emtestam L, Bjorkhem I. Studies on the relationship between vitamin D3 status and urinary excretion of calcium in healthy subjects: effects of increased levels of 25-hydroxyvitamin D3. *Scand J Clin Lab Invest* 1986; **46**: 723-9.
377. Holick MF, Schnoes HK, DeLuca HF et al. Isolation and identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol. A metabolite of vitamin D active in intestine. *Biochemistry* 1971; **10**: 2799-804.
378. Vezzoli G, Soldati L, Proverbio MC et al. Polymorphism of vitamin D receptor gene start codon in patients with calcium kidney stones. *J Nephrol* 2002; **15**: 158-64.
379. Weisinger JR. New insights into the pathogenesis of idiopathic hypercalciuria: the role of bone. *Kidney Int* 1996; **49**: 1507-18.
380. Polito C, Iolascon G, Nappi B et al. Growth and bone mineral density in long-lasting idiopathic hypercalciuria. *Pediatr Nephrol* 2003; **18**: 545-7.
381. Kuczera M, Wiecek A, Kokot F. Markers of bone turnover in patients with nephrolithiasis. *Int Urol Nephrol* 1997; **29**: 523-8.
382. Arrabal-Polo MA, Arrabal-Martin M, de Haro-Munoz T et al. Mineral density and bone remodelling markers in patients with calcium lithiasis. *BJU Int* 2011; **108**: 1903-8; discussion 8.
383. Arrabal-Polo MA, Sierra Giron-Prieto M, Orgaz-Molina J et al. Calcium renal lithiasis and bone mineral density. Importance of bone metabolism in urinary lithiasis. *Actas Urol Esp* 2013; **37**: 362-7.
384. Gomes SA, dos Reis LM, Noronha IL et al. RANKL is a mediator of bone resorption in idiopathic hypercalciuria. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; **3**: 1446-52.
385. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR et al. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 2000; **15**: 2-12.
386. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR et al. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998; **12**: 1260-8.

387. Mizuno A, Amizuka N, Irie K et al. Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **247**: 610-5.
388. Bekker PJ, Holloway D, Nakanishi A et al. The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2001; **16**: 348-60.
389. Petrucci M, Scott P, Ouimet D et al. Evaluation of the calcium-sensing receptor gene in idiopathic hypercalciuria and calcium nephrolithiasis. *Kidney Int* 2000; **58**: 38-42.
390. O'Seaghdha CM, Yang Q, Glazer NL et al. Common variants in the calcium-sensing receptor gene are associated with total serum calcium levels. *Hum Mol Genet* 2010; **19**: 4296-303.
391. Kapur K, Johnson T, Beckmann ND et al. Genome-wide meta-analysis for serum calcium identifies significantly associated SNPs near the calcium-sensing receptor (CASR) gene. *PLoS Genet* 2010; **6**: e1001035.
392. Shakhssalim N, Kazemi B, Basiri A et al. Association between calcium-sensing receptor gene polymorphisms and recurrent calcium kidney stone disease: a comprehensive gene analysis. *Scand J Urol Nephrol* 2010; **44**: 406-12.
393. Corbetta S, Eller-Vainicher C, Filopanti M et al. R990G polymorphism of the calcium-sensing receptor and renal calcium excretion in patients with primary hyperparathyroidism. *Eur J Endocrinol* 2006; **155**: 687-92.
394. Vezzoli G, Terranegra A, Arcidiacono T et al. R990G polymorphism of calcium-sensing receptor does produce a gain-of-function and predispose to primary hypercalciuria. *Kidney Int* 2007; **71**: 1155-62.
395. Gambaro G, Soldati L, Vezzoli G. Genetics and Molecular Biology of Renal Stones. In: Rao PN, Preminger GM, Kavanagh JP, eds. *Urinary Tract Stone Disease*: Springer 2011:9-15.
396. Guha M, Bankura B, Ghosh S et al. Polymorphisms in CaSR and CLDN14 Genes Associated with Increased Risk of Kidney Stone Disease in Patients from the Eastern Part of India. *PLoS One* 2015; **10**: e0130790.
397. Vezzoli G, Terranegra A, Arcidiacono T et al. Calcium kidney stones are associated with a haplotype of the calcium-sensing receptor gene regulatory region. *Nephrol Dial Transplant* 2010; **25**: 2245-52.
398. Hamilton DC, Grover VK, Smith CA, Cole DE. Heterogeneous disease modeling for Hardy-Weinberg disequilibrium in case-control studies: application to renal stones and calcium-sensing receptor polymorphisms. *Ann Hum Genet* 2009; **73**: 176-83.
399. Yun FH, Wong BY, Chase M et al. Genetic variation at the calcium-sensing receptor (CASR) locus: implications for clinical molecular diagnostics. *Clin Biochem* 2007; **40**: 551-61.
400. Bollerslev J, Wilson SG, Dick IM et al. Calcium-sensing receptor gene polymorphism A986S does not predict serum calcium level, bone mineral density, calcaneal ultrasound indices, or fracture rate in a large cohort of elderly women. *Calcif Tissue Int* 2004; **74**: 12-7.
401. Harding B, Curley AJ, Hannan FM et al. Functional characterization of calcium sensing receptor polymorphisms and absence of association with indices of calcium homeostasis and bone mineral density. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; **65**: 598-605.

