

RIASSUNTO

La patogenesi dell'osteoporosi dopo trapianto di rene è multifattoriale e la persistenza di iperparatiroidismo secondario (inteso come valori di PTH > 65 pg/ml) costituisce una delle sue caratteristiche peculiari. E' stato condotto uno studio su 125 pazienti (87 maschi e 38 femmine) trapiantati di rene da 0 a 10 anni, di età compresa tra i 25 ed i 65 anni, con creatininemia $\leq 227 \mu\text{mol/L}$. I pazienti sono stati sottoposti ad una valutazione del metabolismo calcio-fosforo, della densità minerale ossea e dei principali parametri relativi al trapianto. In un sottogruppo di 87 pazienti sono stati studiati tre polimorfismi del Calcium-sensing receptor : A986S, R990G, Q1011E. Valori elevati di paratormone (> 65 pg/ml) sono stati riscontrati nel 68 % dei soggetti. Sorprendentemente, il 40 % dei pazienti ha presentato livelli sierici di idrossicolecalciferolo (25-OH vitamina D) $\leq 30 \text{ nmol/L}$ (indicativi di carenza di vitamina D), il 56,8 % valori compresi tra 30 ed 80 nmol/L, (indicativi di insufficienza) ed il 3,2 % > 80 nmol/L (range di normalità > 80 nmol/L). La percentuale di pazienti con osteoporosi è stata pari al 25,6 % al rachide, 7,2 % al femore in toto ed al 16,8 % al collo femorale. La densità minerale ossea è risultata inferiore nei soggetti che assumevano una dose di prednisone-equivalenti superiore alla mediana (6,7 mg/die). Per quanto riguarda la prevalenza di fratture vertebrali morfometriche è emerso che il 57% dei trapiantati presentava una o più fratture. In un modello di analisi di regressione logistica, i livelli di PTH correlavano positivamente con la presenza di fratture vertebrali. In un modello di analisi di regressione lineare multipla, i livelli di 25-OH vitamina D, la dose cumulativa di prednisone-equivalenti, i mesi di dialisi pre-trapianto, l'età ed i mesi post-trapianto sono risultati fattori predittivi significativamente associati a persistenza di iperparatiroidismo secondario.

Per quanto riguarda i polimorfismi del CaSR, essi sono stati osservati rispettivamente nel 35,6 % (A986S), nel 11,5 % (R990G) e nel 1,1 % (Q1011E) dei pazienti studiati. Non sono emerse correlazioni

significative tra questi polimorfismi e i livelli di PTH sierico, la densità minerale ossea e le fratture.

In conclusione, l'osteoporosi e la persistenza di iperparatiroidismo secondario sono eventi frequenti dopo trapianto di rene. La presenza di bassi livelli di 25-OH vitamina D come fattore determinante rappresenta una novità. Il trattamento con vitamina D sembra rappresentare una valida opzione terapeutica per questi pazienti nel tentativo di ridurre l'iperparatiroidismo persistente e, di conseguenza, il rischio fratturativo.

SUMMARY

Post-transplantation osteoporosis is influenced by multiple factors. An important risk factor for bone morbidity is represented by persistent secondary hyperparathyroidism (PTH >65 pg/ml). From a large cohort of patients who had undergone kidney transplantation, we selected 125 caucasian patients (87 males and 38 females), who had undergone kidney transplantation 0 to 10 year before, aged 25-65 years, with serum creatinine < 228 µmol/L. All patients underwent an evaluation of the main biochemical parameters of bone metabolism as well as bone densitometry. In 87 patients we also studied three polymorphism of the Calcium-sensing receptor (A986S, R990G, Q1011E). PTH levels higher than 65 pg/ml were found in 68 % of the patients. Surprisingly, 40 % of the patients presented 25-OHvitaminD values ≤ 30 nmol/L (deficiency), 56,8 % values between 30 and 80 nmol/L (insufficiency) and only 3,2 % values >80 nmol/L (normal range). The proportion of patients with osteoporosis was 25,6 % at the spine, 7,2 % at total femur and 16,8 % at femoral neck. Bone density resulted lower in patients who had been treated with dose of glucocorticoid higher than 6,7 mg/day. As regard to vertebral fractures, we observed that 57 % of the patients had one or more vertebral fracture. In a logistic regression model only PTH levels were predictors of vertebral fracture. Multiple linear regression demonstrated that 25-OH vitamin D levels, cumulative glucocorticoid intake, time on dialysis, age and time since transplantation were significantly predictive of persistent hyperparathyroidism.

As regard to CaSR polymorphism, A986S, R990G, Q1011E were observed in 35,6 %, 11,5 % and 1,1 % of the patients, respectively. The study did not demonstrate a significant influence of any of the three genetic variants on PTH levels, bone mass or fractures.

We conclude that osteoporosis and persistent secondary hyperparathyroidism are common in renal transplant patients.

Low 25-OH vitamin D concentrations may exacerbate secondary hyperparathyroidism. Treatment with vitamin D could be effective for the prevention of post-transplantation bone loss.

INTRODUZIONE

IL METABOLISMO OSSEO

Lo scheletro é un organo complesso, lo sviluppo del quale dipende dall'intergioco dei tessuti osseo, cartilagineo, fibroso ed emopoietico. La particolare struttura dell' osso, compatto (o corticale) e spugnoso (o trabecolare), unisce caratteristiche di resistenza e di compattezza ideali per il movimento. Inoltre l'osso è una riserva di calcio, magnesio, fosforo, sodio ed altri ioni necessari per il mantenimento dell'omeostasi di molte funzioni dell'organismo.

Le proprietà dell'osso dipendono dalle sue componenti extracellulari; la sua struttura è costituita da due fasi: una fase solida minerale e una fase organica, in stretta associazione. La fase organica è formata da una matrice costituita per il 90-95% da collagene di tipo I e per la restante porzione da altre proteine non collageniche (albumina ed α 2-HS glicoproteine), osteocalcina, osteonectina, osteopontina ed altre ancora. La fase minerale è costituita da calcio e fosfato e può essere paragonata ad una idrossiapatite poco cristallizzata $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$.

Il corpo umano contiene in media 1000-1400 g di calcio, il 99% del quale si trova nel compartimento osseo nella forma dell' idrossiapatite, che conferisce allo scheletro le sue proprietà meccaniche e lo rende adatto a svolgere le sue funzioni di sostegno, di supporto alla locomozione, di protezione agli organi interni. L' osso costituisce anche un enorme deposito di calcio (1%) che può essere mobilizzato quando le esigenze omeostatiche lo richiedono. Circa lo 0.9% di questo si trova nel compartimento intracellulare e appena lo 0.1% si trova nel compartimento extracellulare. La concentrazione plasmatica è pari a circa 10 mg/dl, di cui il 46% è legato alle proteine circolanti, un altro 46% è in forma ionizzata e l' 8% è complessato con vari ioni (fosfato, citrato di calcio). Solo il calcio ionizzato è biologicamente attivo (Broadus A., 1990).

Oltre al calcio, nello scheletro sono contenuti anche altri ioni. Un adulto contiene circa 25 g di magnesio di cui $\frac{2}{3}$ sono presenti nello scheletro ed $\frac{1}{3}$ nei tessuti molli. Nell'osso il magnesio è localizzato sulla superficie cristallina dell' idrossiapatite. Solo una piccola frazione del magnesio dell' osso è scambiabile con quello extracellulare. Il magnesio è il catione bivalente intracellulare più importante ed è un cofattore per diverse reazioni enzimatiche.

Infine, un adulto contiene circa 600 g di fosforo, di cui l' 85% è presente nello scheletro in forma cristallina e un 15% si trova nel liquido extracellulare, sotto forma di ioni e nei tessuti molli nella forma di esteri di fosfato, coinvolti in molti processi biochimici (Broadus A., 1990).

L'osso consta anche di diverse componenti cellulari. Gli osteoblasti, di origine mesenchimale, sintetizzano e secernono la matrice organica. Dagli esperimenti di Friedenstein deriva che ci sono due popolazioni di osteoblasti: 1) quelli che si trovano nel midollo osseo e che si differenziano direttamente in cellule che formano osso e 2) quelli che si trovano in tessuti non ossei e che vengono indotti a differenziarsi in osteoblasti (Friedenstein A.J., 1976). Gli osteoblasti producono il collagene di tipo I, una fosfatasi alcalina specifica per il tessuto osseo e l' osteocalcina. Inoltre presentano recettori specifici per il paratormone e per l' $1,25 (OH)_2 D$. Man mano che l' osteoblasta svolge le sue attività sintetiche, viene circondato da tessuto osseo trasformandosi successivamente in osteocita, la cellula che resta incorporata all' interno della matrice ossea mineralizzata.

La fase di riassorbimento osseo è svolta principalmente dagli osteoclasti, cellule multinucleate che derivano dalla fusione di precursori originati da una cellula staminale emopoietica della serie dei fagociti mononucleati (monociti macrofagi) (Konsek J.et al., 1988). Gli osteoclasti appaiono spesso accolti in fossette scavate sulla superficie delle trabecole ossee, definite fossette o lacune di Howship, che si formano proprio per l'azione erosiva degli osteoclasti.

Crescita, Modellamento, Rimodellamento e Riparazione Scheletrica

Da un punto di vista morfologico, le attività degli osteoblasti e degli osteoclasti comprendono la crescita, il modellamento, il rimodellamento e la riparazione scheletrica (Teitelbaum S.L., 1990). Crescita e modellamento sono due processi associati allo sviluppo osseo e si svolgono solo nello scheletro in via di sviluppo. La riparazione, invece, avviene in qualsiasi momento della vita, in caso di fratture ossee. Il rimodellamento, infine, è quel processo scheletrico correlato all'omeostasi minerale e serve probabilmente a rimuovere ed a sostituire l'osso vecchio e non più vitale. Non si conosce il fattore responsabile del rimodellamento osseo. Il processo inizia con il riassorbimento osseo da parte degli osteoclasti sulla superficie ossea ed avviene in migliaia di siti dello scheletro umano dove si formano le "lacune di Howship". L'osso con il maggior numero di siti di rimodellamento è quello trabecolare. Alla fase del riassorbimento segue una fase di "assenza" sia degli osteoclasti che degli osteoblasti, mentre successivamente compaiono gli osteoblasti che cominciano a sintetizzare matrice fino alla produzione di nuovo osso (Hay J.E., 1995).

Nei giovani il riassorbimento e la sintesi ossea sono in equilibrio, ma con l'età la capacità degli osteoblasti di sostituire l'osso che viene riassorbito declina e si assiste ad una progressiva perdita ossea (Hay J.E., 1995).

REGOLAZIONE DEL RIMODELLAMENTO OSSEO

Fattori locali

Non sono stati ancora completamente chiariti i meccanismi di accoppiamento tra riassorbimento ad opera degli osteoclasti e neoformazione ad opera degli osteoblasti nel turnover osseo.

I fattori oggi noti in grado di stimolare la maturazione e l'attivazione degli osteoclasti, e quindi i fenomeni di riassorbimento osseo, sono numerosissimi; tra essi: le prostaglandine della serie E, i fattori di

crescita epidermica (EGF); i *transforming growth factor alfa e beta* (TGFs); il *platelet derived growth factor* (PDGF); l'interleuchina 1 (IL-1); l'interleuchina 6; l'interleuchina 11; i *tumor necrosis factor alfa e beta* (TNFs).

Molti di questi fattori, in particolare le citochine, agiscono per attività intermedia svolta da cellule della linea osteoblastica. Sono invece inibitori del riassorbimento osseo il *transforming growth factor beta* (TGF- β), il *gamma-interferon* (che inibisce il riassorbimento osseo indotto da IL-1 e TNFs, ma non quello da PTH o da $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) e l'interleuchina 4.

Tra i fattori stimolanti la formazione di osso vanno annoverati numerosi fattori di crescita: l'ormone della crescita (GH), che agisce verosimilmente tramite l'azione delle somatomedine (IGF-1); *bone morphogenetic protein* (BMP), che è contenuta nella matrice organica dell'osso; il *bone-derived growth factor* (BDGF) che stimola la sintesi del DNA e del collagene dell'osso (Girasole G et al., 1994).

Fattori sistemici

L'entrata e l'uscita degli ioni calcio (Ca) e fosforo (P) nella fase minerale dell'osso sono sotto il controllo di tre principali ormoni: gli estrogeni, il paratormone (PTH), i metaboliti della vitamina D.

Estrogeni

La riduzione della produzione di estrogeni rappresenta la modificazione endocrina fondamentale responsabile delle alterazioni del turnover e della massa ossea nel periodo postmenopausale. L'importanza degli estrogeni nel mantenere l'integrità scheletrica è determinata dalla prova che il trattamento ormonale sostitutivo è in grado di prevenire o ritardare la perdita di massa ossea in periodo postmenopausale, riducendo il rischio di frattura rispetto alle pazienti non trattate (Lindsay R et al., 1998).

Anche se il meccanismo con cui esercitano il loro effetto protettivo sullo scheletro non è completamente noto, la dimostrazione di recettori per gli estrogeni nelle cellule coinvolte nel rimodellamento

osseo ha incrementato le possibilità che tali ormoni agiscano proprio sulle citochine che rappresentano il sistema di regolazione ultimo del metabolismo scheletrico (IL-6, IL-1, TNF, GM-CSF) (Pacifci R et al., 1991).

Il probabile meccanismo d'azione della carenza estrogenica nella fisiopatologia dell'osteoporosi postmenopausale è riassumibile secondo questa sequenza logica: l'ipoestrogenismo consentirebbe agli osteoblasti di sottrarsi ai meccanismi inibitori di controllo omeostatico, cosicchè il tessuto osseo, divenuto maggiormente sensibile all'azione del paratormone, si espone ad un incremento del processo di riassorbimento; a sua volta il riassorbimento è responsabile dell'incremento della calciuria che esercita un'azione di feed back negativo sulla secrezione del paratormone. Ne consegue una diminuzione del riassorbimento del calcio da parte del tubulo renale e un decremento della 1 α -idrossilasi renale che determina a sua volta un deficit dell'assorbimento di calcio intestinale, cui contribuisce anche la ridotta sensibilità intestinale alla 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ estrogeno dipendente (Chen C et al., 1997).

Paratormone

È un ormone proteico sintetizzato a livello delle cellule principali della ghiandola paratiroidea, viene secreto come pro-ormone in risposta ad una diminuzione del calcio plasmatico; in realtà sembra che le ghiandole paratiroidi risentano soltanto della componente ionizzata della sostanza (Holick M et al., 1994). Oltre che dai livelli sierici di calcio, la formazione ed il rilascio di PTH vengono inibiti dalla 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$. L'innalzamento della fosforemia, quale si verifica in corso di insufficienza renale, determina un aumento della secrezione di PTH; il meccanismo che sottende a questo fenomeno non è ancora completamente chiarito: si ipotizza comunque un effetto indiretto a livello paratiroideo, mediato dalla diminuzione della calcemia e dell'aumento del calcitriolo sierico (Heaney RP et al., 1996).

L'azione del paratormone si esplica tramite il legame con uno specifico recettore di membrana che attiva una proteina G, con conseguente aumento dell'AMP ciclico intracellulare.

Gli organi bersaglio del PTH sono l'intestino, l'osso ed il rene.

A livello intestinale, il PTH agisce tramite la $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

A livello osseo, l'azione del PTH è complessa. Questo ormone è infatti attivo sul turnover osseo in quanto è in grado di stimolare sia gli osteoblasti che gli osteoclasti, questi ultimi sia in modo diretto che indirettamente tramite la liberazione di fattori da parte degli osteoblasti.

Sul rene, il PTH agisce sia a livello del tubulo prossimale, dove diminuisce il riassorbimento tubulare di fosfato, calcio, sodio sia a livello distale dove, al contrario, aumenta il riassorbimento di calcio e probabilmente anche di magnesio; sempre a livello tubulare, il PTH attiva la 1alfa-idrossilasi, l'enzima catalizzante la idrossilazione della 25-OH-D con formazione di $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Il PTH, infine, rallenta il catabolismo della $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ riducendo l'attività della 24-idrossilasi.

Vitamina D

La vitamina D gioca un ruolo importante nell'omeostasi del calcio e del fosfato ed è essenziale per lo sviluppo e l'integrità ossea.

Con il termine di "vitamina D" vengono indicate due sostanze liposolubili: il colecalciferolo (o vitamina D_3) e l'ergocalciferolo (o vitamina D_2). La principale provitamina trovata nei tessuti umani è il 7-deidrocolesterolo (immediato precursore del colesterolo) che è sintetizzato nella cute. L'esposizione della cute alla luce solare converte il 7-deidrocolesterolo a colecalciferolo (vitamina D_3). Tale osservazione è alla base del concetto che il rachitismo potesse essere curato con l'esposizione alla luce solare. La formazione della vitamina D_3 comporta l'apertura dell'anello B di quest'ultimo composto con formazione di un composto intermedio, previtamina D_3 , che si accumula nella cute e viene lentamente convertito a vitamina D_3 ; esso

può pertanto fungere da deposito di vitamina dopo esposizione alla luce solare.

L'ergosterolo che è presente nei lieviti e nei funghi rappresenta invece la provitamina dell'ergocalciferolo (vitamina D₂). L'ergosterolo e la vitamina D₂ differiscono dal 7-deidrocolesterolo e rispettivamente dalla D₃ per il fatto di avere un doppio legame fra i due atomi di carbonio in posizione C22 e C23 e per il fatto di possedere un gruppo metilico in C24.

Nell'organismo umano la vitamina D necessita di due idrossilazioni per esplicare la sua attività biologica: la prima nel fegato in posizione 25 (per cui dal colecalciferolo si genera il 25-OH-D₃ o calcifediolo) e la seconda nel rene, con introduzione di un secondo idrossile in posizione 12 (1 α ,25(OH)₂D₃ o calcitriolo).

Poiché le concentrazioni ematiche di vitamina D e di 25-OH-D variano in rapporto alle stagioni e all'apporto dietetico di vitamina D, i livelli plasmatici di 25-OH-D sono considerati indicativi dello stato vitaminico D dell'individuo. Infatti, fin tanto che l'approvvigionamento di vitamina D ed i livelli circolanti di 25-OH-D sono adeguati, esiste una fine regolazione metabolica che permette un'adeguata produzione di 1 α ,25(OH)₂D₃ e che vede implicati il PTH, il calcio, il fosfato e la stessa 1 α ,25(OH)₂D₃.

L'ipocalcemia comporta un aumento del calcitriolo conseguente ad una maggiore stimolazione PTH dipendente della alfa-idrossilasi renale, mentre pazienti ipoparatiroidi presentano bassi livelli di 1 α ,25(OH)₂D₃ malgrado una ipocalcemia persistente. Recenti studi, inoltre, hanno dimostrato una correlazione inversa tra calcio e livelli di 1 α ,25(OH)₂D₃ indipendente dal PTH, ed altri hanno rilevato che una dieta con poco fosforo si associa ad un aumento dei livelli sierici di 1 α ,25(OH)₂D₃ e di attività enzimatica della 1 α -idrossilasi renale. Infine, un meccanismo a feed back negativo regolato dalla vitamina D sulla propria sintesi e catabolismo, assicura livelli adeguati della vitamina stessa in circolo.

Gli effetti della vitamina D si estrinsecano a livello intestinale, osseo, renale e paratiroideo.

A livello enterico l'effetto principale dei metaboliti attivi della vitamina D è quello di aumentare l'assorbimento intestinale del calcio nella porzione prossimale del piccolo intestino. La stimolazione del trasporto di calcio da parte della $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ è un processo energia-dipendente, che richiede la presenza di sodio. Nell'enterocita l' $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ si localizza rapidamente nel nucleo stimolando la formazione di una proteina specifica che lega il calcio entro la cellula intestinale con alta affinità; la vitamina D regola anche il trasporto attivo del fosforo aumentando l'espressione di un cotrasportatore Na-P ed alterando le proprietà di membrana in modo da favorirne l'assorbimento.

A livello osseo, gli effetti della $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ causano un aumento del riassorbimento osseo; tale azione si esplica sinergicamente con quella del PTH. Gli osteoclasti maturi non possiedono recettori né per il PTH né per $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$; si ritiene pertanto che i due ormoni incrementino l'attività osteodistruttiva stimolando la maturazione degli osteoclasti e/o interagendo con gli osteoblasti e le cellule stromali midollari. Tale interazione darebbe luogo alla liberazione di citochine capaci di stimolare l'attività degli osteoclasti maturi. Infine, oltre a favorire un adeguato apporto di calcio e fosforo necessario per la mineralizzazione ossea, studi *in vitro* sembrerebbero dimostrare un ruolo importante della vitamina D anche per quanto concerne la regolazione dell'attività osteoblastica.

A livello paratiroideo la $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sopprime la sintesi e la secrezione di paratormone e controlla la proliferazione cellulare; un deficit di vitamina D pertanto, è associato ad iperplasia ed iperparatiroidismo secondario.

Nel rene, infine, la vitamina D aumenta il riassorbimento del calcio ed accelera il trasporto dello ione PTH dipendente a livello dei tubuli distali, dove i recettori per la vitamina D sono espressi in gran quantità.

Recentemente ha suscitato grande interesse l'ipotesi di un recettore per la vitamina D (VDR) nel determinismo dell'osteoporosi. È stato, infatti, identificato un polimorfismo del VDR nella porzione 3' del gene contenuto nel cromosoma 12 e sono stati individuati due alleli chiamati B o b sulla base rispettivamente dell'assenza o della presenza del sito di restrizione dell'endonucleasi BSM-I. Il genotipo *BB* sembra essere associato con livelli di densità minerale ossea significativamente più bassi rispetto al genotipo *bb* e si sta attualmente studiando la correlazione con l'andamento degli altri parametri densitometrici e bioumoral del metabolismo osseo (Eisman JA et al., 1995; Brown AJ et al., 1999).

FISIOPATOLOGIA DELL'OSTEOPOROSI

Osteoporosi

L'osteoporosi è una malattia scheletrica sistemica caratterizzata da una riduzione della densità dell'osso e da alterazioni microarchitetturali dello stesso, tali da rendere lo scheletro suscettibile all'insorgenza di fratture per traumi di modesta entità (Consensus development Conference, 1993).

Il rapporto tra contenuto minerale e matrice organica è conservato e perciò l'osso risulta qualitativamente normale. È interessato più precocemente il tessuto spugnoso: il numero e lo spessore delle trabecole diminuiscono, la resistenza meccanica dell'osso si riduce ed aumenta il rischio di fratture. Sono fattori di rischio per l'osteoporosi il picco di massa ossea raggiunto prima dell'inizio della perdita ossea (verso i 25-30 anni), l'età della menopausa e la durata della stessa.

Esistono sostanzialmente due forme di osteoporosi: l'osteoporosi involutiva o primitiva e l'osteoporosi secondaria. L'osteoporosi involutiva può essere distinta in tre tipi: l'osteoporosi del tipo I o postmenopausale, l'osteoporosi del tipo II o senile (uomini e donne dai 75 anni in giù) e l'osteoporosi del tipo III caratterizzata dal relativo aumento del PTH sierico.

L'osteoporosi secondaria può avere cause diverse: cause endocrine (acromegalia, sindrome di Cushing, ipogonadismo, iperparatiroidismo, ipertiroidismo), il mieloma multiplo, l'uso di farmaci (come, in particolare, i corticosteroidi), l'inattività, il fumo di sigaretta, etc.

Fattori di rischio per l'osteoporosi involutiva sono: il picco di massa ossea raggiunto in giovane età (25-30 anni), il tasso di perdita nel tempo (che aumenta con all'età, in particolare dopo la menopausa), l'età della menopausa e la durata della stessa.

L'osteoporosi riconosce un'eziologia multifattoriale dovuta all'interazione di fattori esogeni, riguardanti essenzialmente le abitudini di vita (dieta, attività fisica, fumo, farmaci, malattie intercorrenti) ed endogeni, dei quali la predisposizione genetica è ritenuta la variabile più importante assieme al profilo ormonale.

La forte influenza della componente genetica, che può rendere conto fino al 75-80% nel determinismo della malattia, è dimostrata dal fatto che i livelli della massa ossea e l'incidenza delle fratture siano maggiori in alcune razze (caucasica) rispetto ad altre (nero) (Isaia G et al., 1996), da diversi studi che indicano come i gemelli omozigoti presentino una minore variabilità della densità minerale ossea rispetto ai gemelli dizigoti e dall'esistenza di una chiara distribuzione familiare della malattia (Barche et al., 1998; Pocock et al., 1987; Tykavsky et al., 1989).

Polimorfismi genetici ed Osteoporosi

I polimorfismi sono variazioni casuali di una singola base nel genoma umano che possono essere riconosciute da diversi enzimi di restrizione: quest'ultimi in presenza della mutazione "tagliano" il DNA, generando dei frammenti che sono indicati con la lettera minuscola dell'enzima. In assenza del sito di restrizione la sequenza di DNA rimane intatta ed è rappresentata dalla lettera iniziale maiuscola dell'enzima. Le due possibilità (assenza e presenza del sito di restrizione) si definiscono "alleli" e le loro combinazioni costituiscono i genotipi dei polimorfismi dei frammenti di restrizione (RFLP).

Negli ultimi anni sono state condotte numerose ricerche basate sugli RFLP volte ad identificare le caratteristiche strutturali dei geni coinvolti nel metabolismo osseo.

Gli alleli del polimorfismo del gene del recettore della vitamina D (VDR) nella regione 3' non sono in grado da soli di predire una bassa massa ossea e quindi il rischio di osteoporosi. I polimorfismi allelici per il recettore degli estrogeni sono stati considerati possibili marcatori di osteoporosi poiché sono espressi dagli osteoblasti e dagli osteoclasti ed il deficit di estrogeni si associa ad un aumento del turnover e della perdita della massa ossea. Tuttavia mentre si è dimostrata un'associazione positiva tra genotipo e massa ossea in un'analisi condotta su 238 donne giapponesi in postmenopausa (Kabayashy et al., 1996), un'indagine condotta su un campione di 426 donne italiane in postmenopausa non ha invece rilevato una significativa relazione tra le due variabili (Gemai et al., 1998).

Il recettore della calcitonina (CTR) è stato oggetto di interesse poiché presente sulla membrana degli osteoclasti; in uno studio condotto su 307 donne in postmenopausa è stata dimostrata una correlazione significativa tra il genotipo *TT* e bassi livelli di massa ossea (Masi et al., 1998). Un altro studio su 215 donne caucasiche in postmenopausa conferma l'esistenza del polimorfismo del recettore ed attribuisce una maggiore densità di massa ossea agli eterozigoti *TC* ed agli omozigoti *TT* rispetto agli omozigoti *CC* (Taboulet et al., 1998).

Il *transforming growth factor beta* (TGF- β) è fattore di crescita nella regolazione del rimodellamento osseo; in una popolazione femminile danese sono state individuate due varianti alleliche nelle regioni codificanti del gene correlate ad un aumento del rischio di osteoporosi (Langdhal et al., 1997). Tali varianti, tuttavia, non sono molto frequenti nella popolazione caucasica, gravata invece da un'elevata prevalenza dell'osteoporosi, e ciò rende poco probabile il loro ruolo di marcatori di patologia.

Maggiore attenzione ha ricevuto il polimorfismo del sito di riconoscimento del fattore di restrizione Sp1 nel gene del collagene tipo 1alfa1 (COL1A1), poiché uno studio inglese (Grant et al., 1996),

condotto su donne in menopausa, ha dimostrato che i genotipi Ss e ss sono associati ad una ridotta massa minerale ossea della colonna lombare ed ad un aumento della prevalenza di fratture vertebrali. Uno studio olandese su 1778 donne in postmenopausa confermava il ruolo cruciale dell'allele s evidenziando però una netta riduzione della massa minerale ossea vertebrale solo nei soggetti ss ultrasessantenni, che tuttavia rappresentavano solo l'1% della popolazione indagata; in quest'ultimi, inoltre, vi era una correlazione tra polimorfismo del COLIA1 e densità minerale del collo femorale (Uitterlinden A et al. 1997).

Da questi dati si può dedurre come sia difficile individuare un marcatore di rischio per l'osteoporosi; ciò è in parte dovuto alla complessità della componente genetica della malattia ed in parte alla capacità dei geni di interagire fra loro e con fattori ambientali che possono influire sull'associazione genotipo-massa ossea.

Il recettore della vit. D (VDR)

La maggior parte degli effetti dell' $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ sui tessuti bersaglio è dovuta al legame della vitamina con un recettore intracellulare ad alta affinità che agisce come fattore di trascrizione attivato dal ligando.

Studi sul gene clonato da animali (topo, pollo) e dall'uomo hanno permesso di definire la struttura e le funzioni del VDR che risulta costituito da: a) una porzione situata a livello dell'estremità carbossi-terminale che riconosce specificatamente la molecola del calcitriolo, b) da siti collocati nelle due regioni *zinc finger* all'estremità aminotermine, responsabili della formazione di un eterodimero con il recettore dell'acido retinoico (RXR), c) una sequenza ripetuta nel dominio di legame con la vitamina D, ed infine, d) un motivo, molto simile in tutti i recettori di ormoni steroidei e tiroidei, rappresentato dalle stesse dita di zinco che interagiscono con sequenze specifiche del DNA nelle regioni promotrici della trascrizione dei geni regolati dall' $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Il VDR, legatosi alla vitamina D, si associa al RXR e subisce una modificazione allosterica che gli consente di interagire con le proteine nucleari del complesso d'inizio della trascrizione e di regolare in tal modo la RNA polimerasi II che ne è parte integrante.(Haussler MR et al., 1997).

Il ruolo del VDR come mediatore dell' $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ può essere influenzato da numerosi fattori tra i quali: la disponibilità di vitamina D, che dipende dal bilancio tra dieta, processi di sintesi e catabolici; il contenuto dei recettori nelle cellule, che è regolato dai ligandi del VDR e da altri ormoni e fattori di crescita; le modificazioni posttrascrizionali del VDR indotte dal ligando, quali le fosforilazioni di residui di serina che riducono l'attività del recettore stesso; il livello dei componenti del complesso di trascrizione nel nucleo (Brown AJ et al., 1999).

Polimorfismo VDR ed osteoporosi

Il gene del VDR è stato ampiamente oggetto di studi nel tentativo di spiegare i meccanismi coinvolti nella ereditarietà della massa ossea e di individuare i soggetti predisposti ad una maggiore perdita di tessuto. Tali conoscenze, infatti , potrebbero avere utili implicazioni in termini di profilassi dell'osteoporosi e di trattamento dei pazienti che presentano un aumentato turnover osseo e rischio di frattura (immobilizzazione, malattie croniche, menopausa, trapianto).

I principali polimorfismi individuabili nel VDR sono quattro: la maggior parte di essi è collocata in regioni del gene non codificanti (introni) e di per sé non modificano la struttura aminoacidica del recettore, ma possono interferire con la trascrizione delle regioni codificanti (esoni) o con la stabilità del mRNA. Gli enzimi di restrizione impiegati sono stati: BSM I, APO I, Taq I e FOK I; il primo sito polimorfico descritto è stato quello riconosciuto da BSM I, collocato tra l'esone VIII e la regione non codificante 3': l'enzima taglia l'allele *b* ma non l'allele *B*. nel 1992 Morrison et al. osservarono una correlazione tra il genotipo *BB* del gene per il VDR ed elevati livelli di osteocalcina in un gruppo di soggetti sani, maschi e femmine

non vincolati da legami di parentela, fatto più significativo in donne in postmenopausa (Morrison et al., 1992).

Nel 1994 lo stesso Morrison ed i suoi collaboratori indagarono la distribuzione dei due alleli del gene VDR in gemelli monozigoti (MZ) e dizigoti (DZ): i MZ risultavano avere una maggiore concordanza per la massa minerale ossea rispetto ai soggetti con alleli diversi (è utile ricordare che i MZ condividono tutti i geni mentre i DZ solo il 50%). Da questo studio emerse che il VDR poteva rendere conto fino al 75% del totale effetto genetico sullo massa ossea in individui sani, che il genotipo, che il genotipo era significativamente correlato alla BMD ed, in particolare, che l'allele *B* era associato ad una minore BMD e *b* a valori più elevati di BMD sia tra i gemelli sia nella popolazione generale. I soggetti *BB*, quindi, risultarono sfavoriti in termini di BMD e tale genotipo poteva rappresentare un fattore prognostico negativo per i cambiamenti individuali della BMD nell'arco della vita.

Questi risultati furono confermati da studi condotti in Giappone su un campione di donne sane (Yamagata et al., 1994) ed in Inghilterra (Spector et al., 1995).

Una serie di lavori successivi basati su studi di linkage in gemelli (linkage è la presenza di ereditarietà associata tra polimorfismi e fenotipo massa ossea) e di associazione in popolazioni più o meno ampie, nei quali si valutava la prevalenza degli alleli del gene in questione tra soggetti non familiari e correlazione tra frequenze genotipiche e fenotipo massa ossea, sono giunti a conclusioni opposte sulla relazione tra polimorfismo VDR e la BMD (Peacock et al., 1995). Le cause vanno ricercate nei criteri di selezione non uniformi, nella bassa numerosità delle casistiche, nella diversa distribuzione delle frequenze genotipiche nella razza caucasica ed in quella asiatica, in fattori di ordine metodologico e nella possibile influenza di altri fattori endogeni ed esogeni, come l'età, l'esercizio fisico, la menopausa, l'assunzione di calcio e la presenza di malattie ossee di tipo degenerativo. In particolare, per quanto riguarda l'età, Riggs et al. (1995) hanno osservato un'associazione più stretta tra effetto genetico e BMD nelle giovani donne rispetto a quelle più anziane; tale dato è

stato confermato da una metanalisi condotta da Cooper et al. nel 1996 con il risultato che il polimorfismo VDR 3' presenta un modesto effetto sulla massa ossea che tende a ridursi con l'avanzare degli anni. Il fatto che la massa minerale ossea sia condizionata dal rapporto tra fattori genetici ed ambientali appare sempre più chiaro dallo studio di Krall et al. (1995) che ha esaminato l'influenza dell'introduzione di calcio e degli anni trascorsi dall'inizio della menopausa sulla relazione tra alleli VDR e perdita di massa ossea; i dati indicavano un tasso di perdita più elevato nelle donne in menopausa *BB* rispetto a quelle *bb* quando la dose di calcio assunta era bassa. Anche Ferrari et al. (1998) mostrarono che l'introduzione di calcio ed il genotipo *Bb* erano significativamente correlati alla riduzione della massa ossea a livello della colonna lombare nell'anziano. Inoltre, in quanto malattia poligenica, l'osteoporosi riconosce il contributo di tanti geni, tra cui il VDR, ognuno dei quali esercita un effetto modesto singolarmente o interagendo con gli altri (Sowers et al., 1998).

Tra gli altri polimorfismi del VDR è stato descritto *T/t* riconosciuto dall'enzima Taq I nell'esone 9 che è strettamente associato a BSM I per quanto riguarda gli alleli *t* e *B*; un altro sito di restrizione è quello per l'enzima Apa I nell'introne 7 tra BSM I e Taq I, i suoi alleli sono *A/a*; infine, una mutazione a carico del primo codone d'inizio traduzione del VDR nell'esone 2 rappresenta il bersaglio dell'enzima Fok I: la presenza della sequenza mutata comporta l'inizio della traduzione in secondo codone a valle e ne risulta un recettore più corto; se la mutazione non c'è l'enzima non taglia e viene sintetizzata una proteina più lunga a partire dal primo codone. Il polimorfismo è caratterizzato dagli alleli *F/f*, dei quali *f* corrisponde al recettore più grande, mentre *F* è quello più piccolo. Il genotipo *ff* è stato associato ad una BMD della colonna lombare più bassa rispetto a *FF* in una popolazione di donne messico-americano-caucasiche in menopausa (Gross C et al.,1996).

Il Calcium-Sensing Receptor (CaSR)

La concentrazione di calcio sierico è sotto controllo genetico (Whitfield JB et al., 1984) ed è mantenuta entro uno stretto range di normalità dal PTH. La relazione tra calcio sierico e livelli di PTH è mediata dal Calcium- Sensing-Receptor (CaSR), una glicoproteina costituita da 1078 amminoacidi, che appartiene alla famiglia dei G Protein-coupled receptors. E' composto da un ampio dominio extracellulare, da un dominio transmembrana e da una coda intracellulare. Esso regola la secrezione di PTH da parte delle cellule paratiroidee ed il riassorbimento di calcio da parte delle cellule tubulari renali (Brown EM, 1999). E' attivato dall'aumento della concentrazione di ioni calcio extracellulare, che si legano al dominio extracellulare. Attraverso il suo dominio intracellulare, il CaSR stimola una G Protein, che inibisce la produzione di PTH (Brown EM, 1993) ed il riassorbimento tubulare di calcio (Riccardi D et al., 1995). Il CaSR, inoltre, influenza l'assorbimento intestinale di calcio (Chattopadhyay N et al., 1998) ed il rimodellamento osseo (Yamaguchi T et al., 2001). Il gene che codifica per il CaSR è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 3, alla posizione 3q13.3-q21. Mutazioni inattivanti il gene causano ipocalciuria ed ipercalcemia; gli eterozigoti sviluppano un'Ipercalcemia ipocalciurica familiare benigna, mentre gli omozigoti sono affetti da severo Iperparatiroidismo neonatale (Pollak MR et al., 1993). Al contrario, mutazioni che incrementano l'attività del CaSR causano ipocalcemia e ipercalcemia (Pearce SHS et al., 1996). Tre polimorfismi SNPs (Single Nucleotide Polymorphism), determinanti variazioni aminoacidiche nonconservative, codificanti il dominio intracellulare del CaSR, sono state descritte a livello dell'esone 7 (Cole DEC et al, 1998). Il polimorfismo più comune consiste nella sostituzione di una guanina con una timina al codone 986, che porta alla variante Ala986Ser. Gli altri due polimorfismi sono meno frequenti: una sostituzione adenina/guanina al codone 990 determina la variante Arg990Gly; la sostituzione citosina/guanina al codone 1011 determina la variante Gln1011Glu.

Il polimorfismo A986S è piuttosto frequente nella popolazione generale e sembra avere un ruolo determinante nel controllo della concentrazione di calcio extracellulare. Cole et al. (1998) hanno dimostrato come tale polimorfismo sia associato a più alti livelli sierici di calcio totale e ionizzato e possa predisporre donne adulte sane a patologie ossee o del metabolismo minerale, nelle quali la concentrazione di calcio extracellulare svolge un ruolo prominente. Alcuni autori hanno confermato questi effetti in pazienti caucasici (Lorentzon M et al, 2001, Vezzoli G. et al, 2002), altri non li hanno confermati (Cetani F et al., 2002, Miedlich S. et al., 2001, Bollerslev J et al., 2004). Alcuni studi su soggetti umani (Pollak MR et al, 1993) e su cellule tubulari canine hanno evidenziato un effetto inibitorio del CaSR sul trasporto cellulare di calcio, suggerendo che esso giochi un ruolo chiave nella regolazione dell'escrezione di calcio. Sulla base di queste osservazioni Vezzoli et al. (2002) hanno indagato la possibile associazione tra il CaSR e l'escrezione urinaria di calcio in pazienti calcolotici normocalciurici, in pazienti calcolotici ipercalciurici e in soggetti sani normocalciurici. Da questo studio è emerso che il polimorfismo A990G sembra produrre un'incremento della funzione del CaSR che comporta un aumento dell'escrezione urinaria di calcio e una maggiore suscettibilità all'ipercalciuria idiopatica. Scillitani et al. (2004) hanno valutato la frequenza dei tre polimorfismi e la loro associazione con il calcio sierico ionizzato in un'ampia popolazione adulta. Hanno confermato l'associazione tra l'aumento del calcio sierico ed il polimorfismo A986S e il ruolo dei polimorfismi R990G e Q1011E quali fattori predittivi significativi.

Polimorfismo CaSR ed osteoporosi

E' ben noto come la densità minerale ossea sia fortemente influenzata da fattori genetici e come essa rappresenti il maggior determinante del rischio fratturativo. Numerosi studi sono stati condotti al fine di indagare la possibile associazione tra diversi polimorfismi genetici e BMD. In particolare Lorentzon et al. (2001) hanno studiato

l'associazione tra il polimorfismo A986S del CaSR e la BMD in adolescenti sane caucasiche. Da questo studio è emerso che le adolescenti portatrici dell'allele S hanno livelli più elevati di calcio plasmatico e più bassa BMD al rachide lombare ed alla valutazione total body. Tale polimorfismo, però, non si mantiene fattore predittivo significativamente associato alla densità minerale ossea una volta corretto per altre variabili, quali età, peso e attività fisica. Risultati simili sono stati ottenuti da Takacs et al (2002) in donne ungheresi e da Cetani et al. (2003). In quest'ultimo studio gli autori hanno indagato l'effetto dei polimorfismi A986S, R990G e Q1011E sulla densità minerale ossea e sulle fratture in donne italiane in postmenopausa. L'attenzione degli autori si è concentrata sul primo dei tre polimorfismi, essendo quello più frequente nella popolazione in esame. Dal lavoro è emerso che questo polimorfismo non è un fattore predittivo indipendente di densità minerale ossea, né di fratture da fragilità. Alla stesse conclusioni sono giunti gli autori di uno studio condotto su donne anziane australiane (Bollerslev J et al., 2004), e su donne cinese in premenopausa (Mo XY, et al., 2004).

TRAPIANTO D'ORGANO

Generalità

Il trapianto d'organo rappresenta attualmente una valida e concreta opzione terapeutica nella cura di diverse malattie acute e croniche. Introdotto all'inizio come una sorta di "ultima spiaggia", il trapianto ha guadagnato progressivamente dignità nell'ambito delle strategie terapeutiche trasformandosi sempre più da una metodica di ricerca clinico-sperimentale in un vero e proprio mezzo curativo. Tale prospettiva ha fatto rinascere le speranze di molti pazienti altrimenti condannati a morte sicura. Di conseguenza, la richiesta del trapianto d'organo sta crescendo in maniera molto significativa negli ultimi tempi, alimentata dall'aumento della sopravvivenza a lungo termine dei riceventi, dalla capacità degli agenti immunosoppressivi di prevenire il rigetto e dalla mancanza di concrete alternative terapeutiche (Epstein S., 1996).

In Italia, il trapianto costituisce una realtà di fatto che nel corso degli ultimi anni ha conosciuto una sempre maggiore diffusione, coinvolgendo un numero progressivamente crescente di centri ospedalieri; di qui è emersa la necessità di un'organizzazione il più capillare ed efficiente possibile. In questa ottica, nel 1972 è nato un programma collaborativo tra Lombardia e Veneto, che nel 1976 è stato formalizzato come Associazione di operatori del prelievo e del trapianto ed ha preso il nome di Nord Italia Transplant (NITp). Ben presto una serie di atti regionali hanno dato al NITp una struttura istituzionale. Attualmente il NITp serve un'area di 18 milioni di abitanti ed è costituito da 50 ospedali di prelievo e 35 unità di trapianto (12 di rene, 5 di rene-pancreas, 7 di fegato, 6 di cuore, 4 di polmoni e 1 di cuore-polmoni) localizzate in 15 ospedali tra Lombardia, Veneto, Friuli Venezia Giulia, Liguria, Marche e Provincia Autonoma di Trento. Negli anni successivi alla creazione del NITp si sono affermate in Italia altre tre organizzazioni in qualche misura simili al NITp: l'AIRT, un programma collaborativo tra

Piemonte, Emilia-Romagna e Toscana, il CCST e il SIT operanti nel centro-sud del Paese (Sirchia G, Mascaretti L, 1996).

Nel periodo 1985-1995 è aumentato il numero di pazienti entrati in lista d'attesa (+39% nel 1995 rispetto al 1985); a fronte del progressivo incremento della domanda, il soddisfacimento del fabbisogno annuale si aggira intorno al 50%. E' da sottolineare il fatto che nel 1994 e soprattutto nel 1995 l'incremento del numero dei donatori abbia permesso di aumentare la percentuale di soddisfacimento oltre il 60% (Sirchia G., Mascaretti L., 1996). Per diversi anni, l'Italia è stata tra le ultime nazioni nella graduatoria del reperimento d'organi, procurando circa un terzo dei donatori rispetto alla media dei paesi europei che si aggira intorno a 15 donatori per milione di abitanti per anno. Il NITp ha avuto un'attività superiore al resto dell'Italia, ma sempre insufficiente e lontana dagli altri paesi avanzati. Alla fine del 1995, tuttavia, la posizione italiana è cambiata. La media nazionale del numero dei donatori per milione di abitanti è passata da 6.2 nel 1993 a 10 nel 1995, mentre la media del NITp nel 1995 è stata di 15.6 donatori per milione di abitanti per anno, finalmente in linea con quella europea (Sirchia G., Mascaretti L., 1996). A questo incremento ha contribuito in modo significativo la notizia del bambino americano Nicholas Green, assassinato durante una vacanza nel sud dell'Italia nell'ottobre 1994, i cui genitori autorizzarono l'espianto e la donazione degli organi. Questo fatto ha sensibilizzato notevolmente l'opinione pubblica ed ha portato all'incremento della donazione degli organi, chiamato "effetto Nicholas". Inoltre, grazie alla legge n. 578 del 29/12/93 e relativo provvedimento di attuazione (D.M. n. 582 del 22/8/94), che regola l'accertamento della morte cerebrale e che ha stabilito innanzi tutto che "la morte cerebrale si identifica con la cessazione irreversibile di tutte le funzioni cerebrali", sono stati chiariti tanti dubbi ed equivoci che sussistevano intorno a questo problema. Il decreto fissa il periodo di osservazione a 6 ore per gli adulti, a 12 per i bambini da 1 a 5 anni ed a 24 per quelli di età inferiore a un anno. Infine, si cerca di dedicare una continua attenzione alle Rianimazioni, con programmi educativi

per i Medici Rianimatori e per il personale infermieristico, sempre nel tentativo di fornire più informazioni possibili (Sirchia G., Mascaretti L., 1996).

L'attività di trapianto di organi da cadavere, in Italia, ha presentato un incremento progressivo nel periodo 1991-1995 che però solo nel 1994 e soprattutto nel 1995 è diventato significativo. In questo modo, nel 1994 rispetto al 1993, si è assistito ad un incremento notevole del numero di trapianti di rene (+25.6%), di cuore (+30%) e soprattutto di fegato (+50.2%). Globalmente, nello stesso periodo l'attività di trapianto in Italia è aumentata del 31.5% (NITp, Nord Italia Transplant, Report 1994).

Per quanto riguarda la sopravvivenza dei pazienti, dei primi trapianti e dei ritrapiantati, questa è per il rene a 10 anni dal trapianto, rispettivamente, dell'86%, del 62% e del 51%. Inoltre a 3 anni, la sopravvivenza dei pazienti trapiantati con zero incompatibilità HLA-DR è del 93% contro l'80% di quelli con incompatibilità 1. Ottima anche la qualità di vita dei pazienti trapiantati: già dopo 3 mesi dal trapianto, quasi l'80% dei pazienti è in condizioni cliniche eccellenti e solo una piccola percentuale è scarsamente riabilitata (NITp, Nord Italia Transplant, Report 1994).

Per i trapiantati degli altri organi diversi dal rene, la sopravvivenza del trapianto e dei pazienti è più bassa. La sopravvivenza dei trapiantati di pancreas a 2 anni è dell'86.4%, mentre quella del trapianto stesso è del 66.3%. La sopravvivenza dei pazienti trapiantati di cuore a 3 anni è dell'84%. Per il 10% di questi pazienti la qualità di vita è ottima a 2 anni dal trapianto. La sopravvivenza dei trapiantati di polmone a 1 anno è pari al 60% (NITp, Nord Italia Transplant, Report 1994). Per quanto riguarda infine il fegato, il trapianto del quale ha avuto un inizio più travagliato, attualmente si effettuano circa 200 trapianti all'anno. La sopravvivenza a 3 anni dei pazienti trapiantati è del 63%. Dopo 3 mesi dall'intervento chirurgico oltre il 90% dei pazienti è in condizioni cliniche eccellenti (NITp, Nord Italia Transplant, Report 1994).

L'osteoporosi nel trapianto d'organo

Anche il trapianto d'organo può costituire una causa di osteoporosi. I pazienti sottoposti a trapianto sono esposti a numerosi fattori che possono compromettere il metabolismo osseo. Per esempio, tutti i pazienti con una malattia cronica che porta ad una prolungata immobilizzazione a letto sono a rischio di osteodistrofia da disuso (Katz I.A., Epstein S., 1992). Inoltre molti farmaci, somministrati ai pazienti prima del trapianto, come steroidi, metotrexate, anticoagulanti, sono associati ad osteopatia rarefacente. Differenti malattie specifiche trattate con trapianto d'organo predispongono allo sviluppo di malattie metaboliche dell'osso come, per esempio, l'insufficienza renale cronica, la cirrosi biliare primitiva, la colangite sclerosante (Maddrey W.C., 1990; Porayko M.K. et al., 1991), l'emocromatosi ed alcune malattie polmonari croniche. A questi possono associarsi altri fattori di rischio, quali la menopausa e più in generale l'ipogonadismo frequentemente associato all'insufficienza d'organo terminale, la storia familiare di osteoporosi, il fumo, l'alcool, la ridotta attività fisica, l'età, lo stato nutrizionale scadente (Epstein S. et al., 1995). Esiste, di conseguenza, la probabilità di una densità minerale ossea bassa già prima del trapianto, ciò che rende, in alcuni casi, difficile l'interpretazione degli studi post-trapianto (Katz I.A., Epstein S., 1992).

Il periodo più critico della perdita ossea dopo trapianto sembra essere quello dei primi sei mesi, con una maggiore riduzione della densità scheletrica nei primi tre. L'osso trabecolare della colonna sembra quello più a rischio e le fratture vertebrali sono le più frequenti (Lukert B.P., Raisz L.G., 1990; Eastell R. et al., 1991; Horber F.F. et al., 1994). Sebbene esistono condizioni assai particolari in cui, dopo il primo anno dal trapianto, viene osservato un aumento della densità minerale ossea, con una diminuzione delle fratture patologiche (Porayko M.K. et al., 1991), malgrado la più o meno totale ripresa di funzione da parte dell'organo trapiantato, dopo il trapianto si osservano, per solito, ulteriori e rilevanti riduzioni della massa ossea.

La causa principale di ciò sembra essere la terapia immunosoppressiva (Katz I.A., Epstein S., 1992).

I glucocorticoidi hanno una serie di effetti sull'omeostasi del calcio che insieme predispongono alla perdita ossea (Lukert B.P., Raisz L.G., 1990). Da una parte essi inibiscono l'assorbimento intestinale di calcio, attraverso un meccanismo che interferisce con le azioni della 1,25(OH)₂ D; dall'altra inducono la perdita di calcio con le urine attraverso meccanismi poco chiari, che possono comprendere azioni dirette sui tubuli renali. Questi due effetti possono condurre all'iperparatiroidismo reattivo secondario, nel tentativo di mantenere l'omeostasi del calcio mediante l'attivazione da parte del paratormone del riassorbimento del calcio a livello scheletrico e del recupero dello stesso a livello renale. Ad ogni modo, il PTH non è il principale fattore nel determinare la perdita ossea (Epstein S. et al., 1995). Infatti, i livelli del PTH non sono sempre elevati in associazione all'uso di glucocorticoidi. Inoltre, la predisposizione alla perdita di osso spugnoso sotto l'effetto dei glucocorticoidi non è stata sempre osservata negli stati iperparatiroidei. Piuttosto, il PTH ha effetti selettivi sull'osso corticale. I glucocorticoidi hanno un effetto soppressivo a feedback sulla secrezione di gonadotropine, portando ad una diminuita funzione ovarica o testicolare. L'ipogonadismo che ne risulta può avere un'importante effetto negativo sulla massa ossea. Complessivamente, gli effetti dei glucocorticoidi sul rene, sul tratto gastroenterico, sulla funzione paratiroidea e sull'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi sono fattori importanti nella perdita ossea (Epstein S. et al., 1995). Tuttavia, gli effetti che contribuiscono nella maniera più significativa alla perdita ossea sono quelli diretti sulle cellule ossee e sono di due tipi: l'inibizione della formazione ossea e l'accelerato riassorbimento osseo (Almawk W.Y. et al., 1991; Okasaki R. et al., 1994). I glucocorticoidi sopprimono la funzione osteoblastica. Tale azione sembrerebbe mediata dall'inibizione dell'effetto dell'IGF 1 su queste cellule (Okasaki R. et al., 1994) e confermata dalla ridotta formazione di osteocalcina da parte degli osteoblasti (Prummel M.F. et al., 1991). Nello stesso tempo, i corticosteroidi stimolano l'

attivazione degli osteoclasti, responsabili del riassorbimento osseo, producendo una rapida e profonda perdita di osso (Dempster D.W., 1989), a dispetto del loro effetto inibitorio sul sistema immunitario e, in particolare, sulla proliferazione delle cellule T e sull'espressione di geni per le citochine IL 1, IL 6, IFN e TNF, fortemente implicate nel riassorbimento osseo (Bateman A. et al., 1989; Almawi W.Y. et al., 1991; Mann G. et al., 1994). Di conseguenza, vie alternative, diverse dai sistemi dei macrofagi/linfociti agenti sulle cellule ossee, devono essere di prima importanza nella patogenesi dell'osteopenia indotta dai glucocorticoidi.

Il settore del trapianto d'organo ha conosciuto un notevole salto di qualità dopo la scoperta della Ciclosporina, un piccolo peptide fungino, ciclico che forma un complesso con le ciclofilline, che a loro volta legano la calcineurina (Kahan B.D., 1989). Il complesso ciclofillina-calcineurina inibisce l'espressione del gene e quindi la produzione e il rilascio della interleukina 2. Inoltre, incrementa l'espressione del Transforming Growth Factor (TGF), il quale inibisce la proliferazione delle cellule T (IL 2 stimolata) (Li B. et al., 1991). Si pensa che il sistema immunitario controlli il metabolismo minerale osseo ad un livello locale e, quindi, la ciclosporina risulterebbe dannosa per l'osso. In vitro, è stato dimostrato che la ciclosporina inibisce il riassorbimento osseo indotto da ormoni calciotropi, citochine e prostaglandine (Stewart P.J. et al., 1986) e anche un effetto diretto negativo sulla formazione degli osteoclasti (Orcel P. et al., 1991). E' stato inoltre segnalato un effetto inibitorio sulla proliferazione degli osteoblasti associato ad una ridotta attività della fosfatasi alcalina ed un'aumentata produzione di osteocalcina (Nacher M. et al., 1994; Passeri G. et al., 1996). In modelli animali, tuttavia, è stato osservato che la ciclosporina induce una osteopenia ad alto turnover, caratterizzata da alti livelli di osteocalcina e da una significativa riduzione dello spessore dell'osso trabecolare (Movsowitz C. et al., 1988; Katz I. et al., 1994). Da questi risultati è evidente che ci sono molte controversie sugli effetti della ciclosporina sull'osso. Questo potrebbe essere, almeno in parte, spiegato con il

fatto che in vitro non sono presenti i metaboliti della ciclosporina; inoltre, il modello animale (ratto) probabilmente non riesce a simulare l'azione della ciclosporina sull' osso umano (Epstein S., 1996). Infine, la perdita ossea è particolarmente severa durante i primi mesi dopo il trapianto, quando i pazienti vengono trattati con la combinazione di glucocorticoidi e ciclosporina, ma persiste anche dopo, quando la ciclosporina è spesso l' unico immunosoppressivo usato (Epstein S., 1996).

Anche altri agenti immunosoppressivi quali l'FK506 (Watson R.G.P. et al., 1990), la rapamicina e l' RS61443 hanno effetti deleteri sul metabolismo minerale osseo, alterando il sistema immunitario, così come l' azatioprina e il metotrexate (Mazanec D.J., Grisanti J.M., 1989). Sfortunatamente è difficile studiare gli effetti in vivo dei farmaci immunosoppressori, in quanto essi, di solito, si somministrano in associazione. E' stato suggerito l'uso di ciclosporina insieme agli steroidi per ottenere un effetto protettivo contro gli effetti deleteri dei due farmaci dati separatamente (Kelly P.J. et al., 1989; Movsowitz C. et al., 1990; Rivas C. et al., 1991). Ciò è dovuto ad effetti opposti di questi agenti, la ciclosporina dando un turnover osseo elevato contro il turnover basso degli steroidi (Katz I.A., Epstein S., 1992). Generalmente l'uso di ciclosporina dopo il trapianto permette una riduzione delle dosi degli steroidi, con notevoli effetti benefici sullo scheletro, mentre la combinazione di azatioprina e steroidi ha effetti più deleteri sull' osso (Ascendorf C. et al., 1990), forse perchè sono necessarie dosi più alte di steroidi per una adeguata immunosoppressione.

I fattori responsabili della perdita ossea dipendono in parte anche dalla patologia di base e dal particolare organo trapiantato (Epstein S. et al., 1995).

Nel caso del trapianto renale, l'insufficienza renale predispone all' osteodistrofia (Coburn J.W., Slalopolsky E., 1986). Ovviamente gli effetti negativi sull' osso sono tutti rimossi dopo il trapianto e l'osteodistrofia renale comincia a migliorare. Sfortunatamente, però, la necessità della terapia immunosoppressiva predispone ad ulteriore

perdita ossea, soprattutto nei primi sei mesi dal trapianto (Julian B.A. et al., 1991; Horber F.F. et al., 1994). Inoltre, la frequente incidenza di iperparatiroidismo persistente ed elevato turnover osseo costituiscono un ulteriore fattore di rischio per osteoporosi in questi soggetti (Giannini S. et al., 1996). La prevalenza delle fratture nel trapianto renale è sostanzialmente più bassa rispetto a quella del trapianto di cuore o di fegato (Meys E. et al., 1994; Sambrook P.N. et al., 1994); ciò si giustifica, almeno in parte, con l'impiego di dosaggi inferiori di farmaci immunosoppressivi nel trapianto di rene e per la possibilità di un migliore controllo della patologia ossea in corso di insufficienza renale cronica in epoca pre-trapianto. Inoltre, il follow-up della funzionalità del rene trapiantato è relativamente più semplice, ciò che consente di cogliere i segni del rigetto assai precocemente, prima, cioè, che questo diventi clinicamente evidente; è quindi possibile che vengano prese delle misure terapeutiche prima che sia avvenuto un danno esteso.

Nel caso del trapianto di cuore, la densità minerale ossea pre-trapianto è mantenuta nei normali limiti malgrado la presenza di fattori predisponenti come il danno epatico o renale, l'immobilizzazione a letto e l'uso dei diuretici. I primi sei mesi dopo il trapianto sono quelli associati alla perdita maggiore di osso (Epstein S. et al., 1995).

Per quanto concerne infine il trapianto epatico, la perdita ossea e le fratture sono molto più severe rispetto ai trapiantati di rene o di cuore. E' probabile che questi pazienti siano più predisposti allo sviluppo di osteopatie a causa dell'abnorme metabolismo minerale che caratterizza una malattia epatica avanzata.

Osteopenia e trapianto di rene

Un trapianto renale riuscito ha la più grande probabilità di correggere le sequele dell'insufficienza renale in fase terminale. Tuttavia, il ristabilire il filtrato glomerulare può non completamente ristabilire una normale funzione e struttura del sistema muscolo scheletrico (Julian et al. 1992). Spesso permangono le preesistenti anomalie del metabolismo minerale osseo. Inoltre, la coesistenza di processi

morbosi che alterano lo scheletro, possono contribuire alle complicanze ossee dopo trapianto. Inoltre, si sviluppano nuove alterazioni scheletriche che sono largamente dovute al regime immunosoppressivo richiesto per mantenere il trapianto.

Quando la funzione renale decresce, la ritenzione di fosfato, alluminio, β_2 microglobulina e la riduzione della capacità di sintesi del metabolita attivo della vitamina D (calcitriolo) portano a un quadro di osteodistrofia che può includere osteomalacia, iperparatiroidismo, soppressione del rimodellamento osseo (cosiddetta "malattia adinamica dell'osso") e amiloidosi (Nordal K. et al. 1994). Il trapianto renale induce un aumento significativo dell'escrezione di fosforo, alluminio e β_2 microglobulina, ristabilisce la capacità di sintesi di calcitriolo e migliora la risposta dell'osso e dei tubuli renali all'ormone paratiroideo. Tuttavia, alterazioni dell'omeostasi minerale possono persistere a causa dell'incompleta risoluzione delle anomalie persistenti.

L' iperparatiroidismo uremico deriva dall'aumentata secrezione cellulare e dall'aumento della massa della ghiandola. Sebbene il trapianto renale corregga rapidamente i fattori responsabili della genesi dell'iperparatiroidismo secondario - cioè la ritenzione di fosfati, la ridotta sintesi di calcitriolo e la riduzione della concentrazione del calcio sierico la risoluzione dell'iperparatiroidismo dopo un trapianto renale riuscito è un reperto inconsistente (Sitges-Serra, 1987). Usando l'ipercalcemia come indice, fino ad un terzo dei riceventi trapianto renale, manifesta iperparatiroidismo persistente nel primo anno dopo trapianto. Questa frequenza è stata correlata con la durata della terapia dialitica prima del trapianto (Conceicao Sc et al. 1981) . L'aumento della massa ghiandolare, piuttosto che l'ipersecrezione ghiandolare, sembra essere la causa di questa alterazione (Parfitt AM, 1982). La riduzione di volume delle paratiroidi sembra avvenire lentamente nonostante l'ipercalcemia; alcune ghiandole ingrandite possono non tornare mai alle normali dimensioni.

La differenza del grado dell'iperplasia cellulare al momento del trapianto e l'entità della perdita cellulare dopo il trapianto, può

spiegare perché solo alcuni riceventi d'organo diventino ipercalcemici. L'ipercalcemia dopo trapianto può manifestarsi in una di queste tre forme: ipercalcemia subacuta subito dopo il trapianto; ipercalcemia transitoria autolimitantesi e ipercalcemia persistente (Sitges-Serra,1987). I pazienti con ipercalcemia subacuta possono arrivare ad una calcemia pari a 15 mg/dl entro tre mesi dopo il trapianto. A differenza delle altre due forme, questo grado di ipercalcemia può determinare una ridotta funzionalità del rene trapiantato o, raramente, calcifilassi (necrosi ischemica periferica dovuta a calcificazioni vascolari), che richiede un rapido intervento chirurgico alle paratiroidi (Gipstein et al.1976). Questi riceventi hanno di solito un marcato riassorbimento subperiostale prima del trapianto che probabilmente riflette una maggior severità dell'iperparatiroidismo. Sembra che negli ultimi anni la frequenza dell'ipercalcemia sia in diminuzione. L'ipercalcemia transitoria è la forma più comune di ipercalcemia dopo trapianto e generalmente si risolve entro un anno dopo l'impianto d'organo (Diethelm et al. 1982). Tuttavia, una percentuale variabile tra 4% e il 10% dei riceventi 1' ipercalcemia persiste per oltre 1 anno, ma si risolve gradatamente tra i 2 e i 5 anni dopo trapianto in metà dei casi senza interventi specifici (Parfitt AM,1982). Questa ipercalcemia persistente di media entità (10,5 a 12mg/dl, 2.63 a 3.00mmol/l) è generalmente ben tollerata e non causa disfunzioni renali, nefrolitiasi o nefrocalinosi (Deierhoi MH, 1991). Tuttavia le calcificazioni vascolari e la pancreatite possono essere più comuni in pazienti con una concentrazione di calcio sierico superiore a 12 mg/dl (3mmol/l) (Sitges-Serra A.,1 987).

L'intervento chirurgico elettivo può essere preso in considerazione quando la calcemia è oltre 12,5mg/dl (3.12mmolll) più di un anno dopo il trapianto (D'Alessandro et al.,1989), una raccomandazione applicabile solo a meno del 5% di tutti i riceventi. L'ipercalcemia deriva da un incremento dell'effetto del PTH su alcuni tessuti importanti nell'omeostasi del calcio. L'alta concentrazione di ormone circolante stimola la produzione renale di calcitriolo che aumenta l'assorbimento intestinale di calcio e aumenta il rilascio di calcio dallo

scheletro, dovuto al riassorbimento osseo da parte degli osteoclasti. Il rene trapiantato risponde all'ormone paratiroideo con un aumentato riassorbimento di calcio a dispetto dell'ipercalcemia che normalmente dovrebbe sopprimere la secrezione dell'ormone. L'ipercalcemia dopo il trapianto renale è dovuta all'iperparatiroidismo e deve essere distinta dall'ipercalcemia derivante da altre cause. Queste includono il riassorbimento di depositi di calcio in tessuti molli, l'ipofosfatemia e l'intossicazione da Vitamina D (Deierhoi ed al.1991). L'iperfosfatemia persistente nonostante una funzione renale soddisfacente suggerisce il riassorbimento di depositi extra-scheletrici di fosfato di calcio (Parfitt AM, 1982). Sebbene i depositi sottocutanei possano ampiamente disgregarsi, il calcio entro le strutture vascolari resiste alla mobilizzazione e può aggravare malattie vascolari periferiche. Un supplemento di Vitamina D a breve emivita, così come il calcitriolo o l' $1.25(\text{OH})_2 \text{D}_3$, può essere più utile ai pazienti in attesa di trapianto rispetto ad analoghi della Vitamina D a lunga emivita, così come la Vitamina D₂, il calcidiolo e il diidrotachisterolo. Questi ultimi farmaci possono causare una severa ipercalcemia quando la funzione normale del rene trapiantato rapidamente ripristina la capacità di risposta alle loro azioni. L'aumentata produzione di calcitriolo da parte dei macrofagi nei granulomi (Bell et al. 1985) o di proteine simili all'ormone paratiroideo in alcuni tipi di neoplasie maligne (Odell W.1991,Martin et al.1989), raramente possono essere causa di ipercalcemia nel primo anno successivo al trapianto. Una varietà di parametri clinici, compresa l'età e il sesso del ricevente, il tipo di malattia renale e la fonte del trapianto, non hanno correlazioni con la presenza o con il picco dell'ipercalcemia nei riceventi con una buona funzione del rene trapiantato. La misura delle concentrazioni di paratormone sierico, calcidiolo, calcitriolo e fosforo, consente di distinguere tra queste possibili cause di ipercalcemia dopo il trapianto. L'iperparatiroidismo persistente può condurre a complicanze dopo trapianto. Il grado di iperparatiroidismo può influenzare la severità della perdita ossea dopo il trapianto. L'iperparatiroidismo persistente causa osteopenia prevalentemente nell'osso corticale, mentre aumenta

la massa ossea trabecolare (osteosclerosi) (Kleerekoper M. et al. 1983). Al contrario i glucocorticoidi causano osteopenia dell'osso spugnoso (Parfitt AM, 1986). Tuttavia la quota di perdita ossea dopo trapianto attribuibile all'iperparatiroidismo indipendente dall'effetto dei glucocorticoidi non è stata interamente valutata. L'iperparatiroidismo può aumentare la perdita ossea dopo trapianto, tuttavia non è chiaro se la sua severità al tempo del trapianto sia correlata con il grado di perdita ossea. Per di più non è nota la concentrazione di PTH sierico oltre la quale l'iperparatiroidismo non si risolve dopo trapianto in modo tale da evitare complicanze gravi. Sembra prudente prendere qualsiasi provvedimento al fine di controllare totalmente l'iperparatiroidismo prima del trapianto. Questo approccio può essere compiuto attraverso la somministrazione di supplementi di calcitriolo, con controllo della concentrazione sierica del fosforo. Alternativamente la terapia chirurgica può avere un ruolo, ma il grado di iperparatiroidismo per il quale è necessaria la chirurgia non è stato esattamente determinato. La perplessità riguardo la chirurgia delle paratiroidi comprende lo sviluppo post-operatorio di ipocalcemia refrattaria e di una patologia ossea a basso turnover ("malattia adinamica dell'osso"). L'ipocalcemia nei pazienti ipoparatiroidici può essere più difficile da trattare dopo trapianto che prima. La filtrazione glomerulare ripristinata permette una significativa escrezione renale di calcio in assenza di PTH. Inoltre, antiacidi o anti-H₂ somministrati come profilassi dell'ulcera peptica possono ridurre l'assorbimento intestinale di calcio. L'aumentata capacità di assorbimento intestinale del calcio che deriva dalle normali concentrazioni di calcitriolo può non compensare l'incremento della sua escrezione urinaria. I glucocorticoidi probabilmente peggiorano l'ipocalcemia riducendo il riassorbimento intestinale di calcio. Inoltre l'uso del furosemide può precipitare una ipocalcemia sintomatica incrementando le perdite urinarie di calcio (Gabow et al., 1987); in questo caso i tiazidici possono essere preferiti nel trattamento dell'ipertensione ai diuretici dell'ansa. I pazienti paratiroidectomizzati possono sviluppare una malattia ossea adinamica dovuta alla diminuzione del turnover osseo

mediata dall'assenza dell'ormone paratiroideo. Questa patologia ossea può essere aggravata dall'accumulo di alluminio o dalle limitate capacità di sintetizzare calcitriolo, se la funzione dell'organo trapiantato non è ottimale. L'approccio chirurgico all'iperparatiroidismo in pazienti con insufficienza renale cronica terminale, sia la paratiroidectomia subtotale che totale con autotrapianto, dipende largamente dall'esperienza e dalla capacità del chirurgo. La prima tecnica ha una più alta incidenza di iperparatiroidismo persistente e ricorrente, ma d'altro canto la seconda rischia l'ipoparatiroidismo per la morte del tessuto paratiroideo reimpiantato, portando così all'ipocalcemia o alla patologia ossea adinamica (Llach F. 1990). Gli autotrapianti paratiroidi possono non funzionare in maniera apprezzabile per 3 settimane e talvolta richiedere dalle 12 alle 18 settimane per raggiungere la capacità secretoria massimale (Bell N. et al., 1985). Per scongiurare l'ipoparatiroidismo iatrogeno permanente, alcuni centri conservano sotto ghiaccio il tessuto paratiroideo per usarlo in un secondo autotrapianto, se ciò fosse necessario. A causa del rischio potenziale di una ipocalcemia severa persistente, la paratiroidectomia subtotale può offrire alcuni vantaggi nei trapianti di rene.

L'accumulo di alluminio in pazienti con insufficienza renale cronica o in fase terminale è associata ad alcune tossicità che comprendono: tossicità scheletrica (ipercalcemia, osteomalacia a basso turnover e malattia ossea adinamica), ematologica (anemia microcitica), muscolare (miopatia prossimale) e neurologica (demenza). Per quanto riguarda il metabolismo osseo, l'accumulo di alluminio è associato a diverse ed importanti alterazioni:

- 1) Diminuzione della secrezione dell' ormone paratiroideo
- 2) Diminuzione di sintesi della matrice ossea da parte degli osteoblasti
- 3) Disregolazione della mineralizzazione ossea

Le condizioni che portano ad un accumulo di alluminio sono reversibili dopo trapianto renale. In linea di principio l'esposizione al catione dovrebbe diminuire e l'escrezione urinaria aumentare (Davenport et al., 1990). Frequentemente il dolore osseo e la

debolezza prossimale associati crescono in maniera drammatica. Alcuni studi hanno dimostrato che la mineralizzazione aumenta dopo trapianto renale, e ciò avviene per una riduzione del contenuto osseo di alluminio. Il trapianto renale funzionante sembra essere migliore della terapia chelante con desferioxamina nella normalizzazione dell'istologia ossea nell'osteodistrofia da alluminio, e ciò probabilmente dipende dalla maggior clearance dell'alluminio stesso. Comunque, la rimozione completa dell' alluminio dall'osso non è necessaria perchè la guarigione possa avvenire. La biopsia ossea di alcuni trapiantati ha dimostrato un miglioramento marcato dei parametri istologici del metabolismo osseo dopo trapianto, con alluminio a livello delle linee cementanti (il punto di incontro tra riassorbimento e la formazione ossea) (Piraino et al., 1988). A tale riguardo, il trapianto di rene offre un mezzo di trattamento dell'accumulo di alluminio nell'osso senza le potenziali complicanze associate con la terapia con desferioxamina (Boelaert J et al.1991).

Una nuova forma di amiloidosi è stata recentemente riconosciuta in pazienti in trattamento dialitico di lunga durata (Zingraff J.,Duke T.,1991). I depositi tissutali contengono β_2 microglobulina, un peptide con peso molecolare di circa 12 kd, che è derivato primariamente dagli antigeni leucocitari umani di classe 1 (Linke RP et al.,1989). La prevalenza di tale disordine aumenta con la lunghezza del periodo di dialisi (Zingraff J .et al.1990). Pazienti che usano membrane biocompatibili altamente permeabili, come ad esempio, il polimetilmetacrilato o il poliacrilonitrile, possono essere a minor rischio di quelli dializzati con reni artificiali di cellulosa o cuprofan (Jahn B. et al., 1991). Comunque, l'amiloidosi da β_2 microglobulina è stata osservata anche in pazienti trattati esclusivamente con dialisi peritoneale (Jadal M. et al.1990) e in un paziente con insufficienza renale cronica non ancora sottoposto a terapia di tipo dialitico (Zingraff et al. 1990). La presentazione clinica può includere lesioni litiche ossee asintomatiche, sindrome del tunnel carpale, tenosinoviti flessorie, le artropatie del polso e delle ossa lunghe, e fratture patologiche, particolarmente del collo femorale. I liquidi articolari

sono normalmente non infiammatori e possono contenere la β_2 microglobulina. Al contrario dell'amiloidosi dovuta ad accumulo di proteina AA o AL, i depositi di β_2 microglobulina danneggiano meno frequentemente gli organi extraarticolari. Sebbene l'esperienza con tale sindrome è limitata dopo trapianto renale, i sintomi articolari migliorano rapidamente e forse ciò è dovuto agli effetti antiinfiammatori degli agenti immunosoppressori (Compistol et al 1990). Nonostante dopo il trapianto normalmente non si manifestino nuove lesioni cistiche, sfortunatamente le cisti ossee stabilizzate non diminuiscono di dimensioni (Jadoul et al. 1989). Presumibilmente nonostante l'incremento della clearance renale della β_2 microglobulina, i depositi tissutali di tale proteina non possono essere mobilizzati.

I pazienti con diabete mellito tipo 1 costituiscono una frazione di pazienti sottoposti a trapianto renale che sta aumentando sempre di più. Questa malattia altera il metabolismo osseo indipendentemente dagli effetti dell'insufficienza renale cronica. Queste modificazioni sono caratterizzate da osteopenia (massa ossea sotto il normale range per età e sesso) ed un decremento della funzione osteoblastica e sembra riflettere la diminuzione dell'attività dei fattori di crescita sul metabolismo osseo. L'osteopenia può essere severa in pazienti con neuropatia periferica e può peggiorare per un ridotto esercizio fisico o per il fumo. Confrontati con pazienti diabetici senza neuropatia, i pazienti diabetici con neuropatia periferica hanno una significativa diminuzione della massa ossea corticale a livello metatarsale. Nei modelli sperimentali i femori di animali con diabete mellito indotto dalla streptozotocina perdono osso corticale e tollerano meno lo stress rispetto agli animali di controllo (Hou J. et al. 1991). Per di più, pazienti con diabete mellito tipo 1 trattati con dialisi per un lungo periodo, hanno una più alta prevalenza di patologia ossea a basso turnover associata all'accumulo di alluminio e ipoparatiroidismo, che non i pazienti con altre cause di insufficienza renale terminale. Sfortunatamente nessuno studio ha per ora definito gli effetti del trapianto renale sulla malattia ossea dei pazienti con diabete mellito

tipo 1. La guarigione di una frattura in un paziente con diabete mellito di tipo 1 può essere prolungata, durando delle volte anche dei mesi. L'aumento di peso durante la riabilitazione può portare alla frattura ossea nell'altro piede ed alcuni medici immobilizzano il piede non coinvolto in una doccia per scaricare il peso per tutta la durata in cui il piede fratturato non deve sostenere il peso (Clohishy). La ritardata guarigione delle fratture in animali da esperimento diabetici è rallentata dalla comparsa e maturazione dei condrociti e dall'alterata sintesi della matrice extracellulare (Macey et al., 1989). Il grado di guarigione migliora dopo trattamenti con insulina in dosi insufficienti a restaurare un controllo glicemico a livelli di normalità. Questo reperto suggerisce che l'insulina agisce come fattore di crescita nella riparazione delle fratture. Comunque il quesito se la restaurazione della normale omeostasi glicemica tramite trapianto dell' intero pancreas o delle isole di Langerhans possa migliorare in realtà le complicanze ossee in pazienti diabetici dopo trapianto renale, non è stato risolto e sono pertanto necessarie ulteriori indagini.

Una completa valutazione dello stato metabolico e densitometrico dello scheletro può essere estremamente utile prima del trapianto. Oltre a stabilire il rischio di osteoporosi postoperatoria, i risultati possono a volte individuare un disturbo rimediabile, come un deficit della Vitamina D, un ipertiroidismo o un ipogonadismo. Prima del trapianto la valutazione necessita di una rassegna completa, comprese informazioni su storia familiare, stato menopausale o funzione gonadica, funzione tiroidea, esercizio fisico e introduzione con la dieta di calcio, caffeina e alcool ed inoltre sul fumo. E' importante verificare l'uso di farmaci che sono noti per influenzare in senso negativo il metabolismo del calcio, come diuretici dell'ansa, ormoni tiroidei, glucocorticoidi, altri agenti immunosoppressori e farmaci anti convulsivanti. L'esame fisico si concentra sul sistema endocrino per escludere anomalie di tiroide, surrene e sistema gonadico, così come del sistema scheletrico. La valutazione di laboratorio comprende la misurazione nel siero di calcio, fosforo, azoto, creatinina, ormone paratiroideo intatto, metaboliti della Vitamina D e tests di funzione

tiroidea. Può essere utile la documentazione dell'escrezione urinaria di calcio nei riceventi trapianti di fegato e cuore. Sono essenziali radiografie della colonna e misurazioni mineralometriche della colonna e del femore. Tests specializzati di turnover osseo, come l'osteocalcina sierica e la misurazione dell' escrezione urinaria di prodotti di degradazione del collagene, ad esempio, crosslinks della piridinolina ed N-telopeptide, possono aiutare per stabilire lo stato di rimodellamento dell'osso, ma non sono essenziali quanto le radiografie o la misurazione della densità ossea. Nel periodo del post-trapianto è molto importante monitorare i pazienti con gli stessi tests che sono stati eseguiti nel periodo pre-operatorio. In particolare le mineralometrie dovrebbero essere eseguite ogni sei mesi per i primi 18 mesi nel post-trapianto e poi annualmente.

Studi trasversali del tutto recenti hanno confermato che i pazienti sottoposti a trapianto di rene presentano una ridotta densità ossea, fatto prevalente a livello trabecolare. Questa perdita ossea sarebbe proporzionale all'età del trapianto, alla dose cumulativa di steroidi e ai livelli di PTH, indipendentemente dalla funzione renale. Recenti studi longitudinali su trapianto di rene e massa ossea, pur nella diversificazione dei risultati ottenuti, hanno portato alla conclusione che la densità ossea si riduce molto nei primi 6 mesi, dall' 1 all' 1,5 % per mese, tanto che a 12 mesi è diminuita dell' 8-10 % . Sono i pazienti che hanno più elevati livelli di PTH nel pre trapianto a mantenere il PTH elevato dopo il trapianto renale. All'istomorfometria questo interessamento osseo, riguarda il 94 % dei pazienti; la maggior parte presenta aspetti compatibili con iperparatiroidismo, con osteomalacia più o meno rilevante, il 43 % dimostra lesioni osteomalaciche-osteopeniche e solo il 6 % ha un osso normale. Corticosteroidi, ciclosporina e azatioprina concorrono in modo rilevante a questa osteopatia, inducendo nell'osso atteggiamenti metabolici sia ad elevato che a basso turnover, i cui effetti negativi tendono a sommarsi piuttosto che ad annullarsi tra loro.

Trapianto di rene e rischio di frattura

La patologia ossea dopo trapianto di rene è ascrivibile a questi fattori principali: l'osteodistrofia preesistente, la persistenza di iperparatiroidismo, la terapia immunosoppressiva e le alterazioni della funzione renale conseguenti al trapianto. Anche l'ipogaonadismo secondario ad uremia o a terapia steroidea ha effetti negativi sulla massa ossea e sul metabolismo minerale. Nei primi mesi dopo il trapianto i pazienti subiscono un'accelerata perdita di massa ossea ed hanno un alto rischio di frattura a causa delle alte dosi di steroidi e ciclosporina che provocano un disaccoppiamento del turnover osseo con prevalenza dei fenomeni di riassorbimento (Cohen et al, 2004). La rapida riduzione della densità minerale ossea avviene nei primi sei mesi e pare sia seguita da una perdita continua dell'1% annuo fino ad otto anni dal trapianto di rene (Pichette et al., 1996). Nonostante il recupero della funzionalità renale, alterazioni clinicamente rilevanti del metabolismo scheletrico tendono a permanere dopo il trapianto. Circa il 50% dei pazienti trapiantati mantiene livelli elevati di paratormone, anche in presenza di una normale funzione renale. L'eccesso di paratormone è responsabile di un'osteopenia ad elevato turnover che può causare fratture da fragilità soprattutto a carico del distretto corticale (femore, radio prossimale)(Giannini S. et al, 2001); anche le ossa dei piedi possono essere sede di frattura secondo quanto descritto da Goldman et al, 1999. La prevalenza di fratture da fragilità dopo il trapianto è compresa tra l'11 ed il 43% e riconosce diversi fattori di rischio: l'età avanzata, il basso BMI, la menopausa, la presenza di pregresse fratture, il diabete mellito, una dialisi protratta (Ball AM et al, 2002) la dose cumulativa e di mantenimento degli steroidi, una pregressa paratiroidectomia. Meno frequenti risultano le fratture dello scheletro assiale (3-29%), nel qual caso la ridotta densità minerale ossea (BMD) sembra avere un valore predittivo (Nam J.H. et al, 2000). Infine, parallelamente alla persistenza di una perdita ossea nel lungo termine dopo il trapianto, anche l'incidenza di fratture tende a crescere in modo progressivo a distanza dal trapianto (Vautour et al, 2004).

POLIMORFISMO VDR ED IPERPARATIROIDISMO

Il complesso vitamina D-VDR costituisce il principale meccanismo di regolazione della secrezione del PTH e della proliferazione cellulare delle paratiroidi (Demei et al., 1992). Poiché l'iperparatiroidismo è caratterizzato dall'aumento del rilascio di ormone e della massa cellulare, un'alterazione del VDR potrebbe essere correlata alla patogenesi della malattia. Sulla base delle associazioni individuate da Morrison et al. (1994) tra polimorfismo VDR, BMD e rischio di osteoporosi, si è cercato di stabilire se le stesse varianti alleliche potessero predisporre all'iperparatiroidismo primario, a quello secondario ad uremia ed a quello persistente dopo trapianto.

Polimorfismo VDR nell'iperparatiroidismo primario

Carling et al. (1995) hanno dimostrato che l'incidenza del genotipo *bb* è maggiore in una popolazione di donne svedesi in postmenopausa affette da iperparatiroidismo primario non familiare rispetto ai controlli (60% vs 33%). Da tale studio, inoltre, l'allele *b* risulta strettamente associato ad *aT*, costituendo l'aplotipo *baT* che come riportato da Morrison et al. condiziona una ridotta espressione del gene VDR od una minore stabilità del suo mRNA. Pertanto, un'alterazione della funzione del recettore a livello delle ghiandole paratiroidi di pazienti con genotipo *bb* può spiegare la resistenza agli effetti della vitamina D, ovvero alla sua capacità di inibire la secrezione ormonale e la proliferazione cellulare, aumentando il rischio di adenomi causa di iperparatiroidismo primario (Carling T et al., 1996).

Diversamente altri studi non hanno riscontrato un legame tra varianti alleliche VDR e quantità del suo mRNA (Mocharla H et al., 1997; Veerbek W et al., 1997), né risulta biologicamente definita la relazione tra polimorfismo del VDR ed iperparatiroidismo primario.

Polimorfismo VDR nell'iperparatiroidismo secondario ad insufficienza renale cronica

Il deterioramento della funzione renale comporta lo sviluppo di un iperparatiroidismo secondario alla ritenzione di fosfati, alla riduzione della sintesi della vitamina D e della concentrazione di calcio nel sangue. Tecniche immunoistochimiche, inoltre, hanno evidenziato una minore densità di VDR nelle paratiroidi con presenza di iperplasia nodulare secondaria ad uremia che potrebbe rendere queste ghiandole meno suscettibili all'azione della vitamina D (Fukuda N et al., 1993). L'espressione clinica dell'iperparatiroidismo secondario è variabile, comprendendo forme con elevati livelli ormonali che hanno un maggior rischio di sviluppare l'osteite fibrosocistica ed altri con modesto innalzamento del PTH che a lungo andare esitano nella malattia dinamica dell'osso.

In tale contesto è probabile che il polimorfismo del VDR possa influire sul funzionamento delle cellule paratiroidi ed in parte giustificare i vari gradi di iperparatiroidismo secondario nei pazienti uremici, in particolare Tsukamoto Y et al. (1996) hanno riscontrato in un'ampia popolazione di soggetti in dialisi che il genotipo *bb* era associato a maggiori livelli di PTH rispetto a *BB*. Queste affermazioni hanno trovato conferma nello studio di Fernandez E et al. (1997). Questi prese in considerazione due gruppi di pazienti con iperparatiroidismo secondario, dopo averli selezionati da un ampio campione di soggetti in dialisi sulla base di parametri che potevano condizionare il PTH (livelli del calcio sierico, durata della dialisi, alluminio sierico). Il genotipo *BB* era più frequente nei soggetti con ridotto grado di iperparatiroidismo rispetto a quelli con elevati livelli di PTH, mentre *bb* era maggiormente espresso nei pazienti con grado severo di iperparatiroidismo. Ciò era in accordo con quanto dimostrato da Carling et al. (1995) nell'iperparatiroidismo primario. I soggetti *BB* erano predisposti ad avere un iperparatiroidismo relativo (low iperPTH), mentre quelli *bb*, se da un lato erano protetti contro la malattia dinamica dell'osso, dall'altro presentavano concentrazioni molto elevate di PTH (high iperPTH).

Molti altri studi non hanno confermato una relazione tra polimorfismo e gravità dell'iperparatiroidismo (Schmidt S et al., 1997) e questo può essere dovuto alla diversità dei criteri di selezione, alla scarsa corposità delle casistiche ed alla influenza di fattori ambientali.

Polimorfismo VDR nel trapianto di rene: relazione con la massa ossea e con l'iperparatiroidismo persistente

Il trapianto di rene migliora l'assetto metabolico dei pazienti con insufficienza renale terminale, ristabilendo la velocità di filtrazione glomerulare, aumentando la sintesi di vitamina D e la calcemia, già nei primi mesi dopo l'intervento (Saha HH et al., 1994); tuttavia non elimina il rischio di perdita ossea che è elevato nel primo anno dopo il trapianto (Julian BA et al., 1991) e poi si riduce con valori di BMD al di sotto della norma (GrotzWH et al., 1995).

Diversi sono i fattori coinvolti nella patogenesi della riduzione della massa ossea dopo trapianto, i più importanti dei quali sono la terapia immunosoppressiva (ciclosporina ed glucocorticoidi) (Julian B et al., 1991; Julian B et al., 1992), il danno osseo conseguente all'osteodistrofia renale (Alsina J et al., 1989) e l'iperparatiroidismo persistente. I livelli basali di PTH tendono a ridursi lentamente dopo il trapianto ed in molti pazienti non si osserva un completo ritorno alla normalità; dopo l'intervento, l'iperparatiroidismo si riduce nei pazienti nei quali tale condizione era lieve o moderata prima del trapianto, con riduzione della massa funzionale della ghiandola. L'iperparatiroidismo può persistere a lungo dopo l'intervento nei pazienti con livelli elevati di PTH prima del trapianto, anche quando la funzione renale si è quasi completamente ristabilita (Parfit AM et al., 1991; Cueto AM et al., 1999).

Torres et al. (1996) in uno studio su 34 pazienti trapiantati non diabetici, hanno osservato che nei primi tre mesi dopo il trapianto la riduzione della BMD a livello vertebrale era associata alla gravità dell'iperparatiroidismo secondario a danno renale cronico e che nei mesi successivi alleli diversi del VDR condizionavano il turnover osseo ed il recupero della massa ossea; in particolare, i pazienti con

genotipo *bb* presentavano una modesta perdita ossea dopo un anno dal trapianto rispetto a *BB* e *Bb* e risultavano più protetti dal rischio di fratture. Questo dato concordava con quanto dimostrato da Morrison nelle donne osteoporotiche.

Altri studi genetici (Messa P et al., 1998) hanno evidenziato la correlazione tra polimorfismo del VDR e l'iperparatiroidismo persistente dopo trapianto di rene nella quale il genotipo *BB* è associato con minori livelli di PTH rispetto agli altri genotipi, sia prima che dopo il trapianto. Un nostro studio su 67 trapiantati di rene, infine, attribuiva al genotipo *bb* la densità minerale ossea più bassa, i livelli di paratormone più elevati ed un maggior rischio di frattura (Giannini S et al, 2002).

POLIMORFISMO CASR ED IPERPARATIROIDISMO

Le cellule paratiroidi, attraverso il CaSR, localizzato sulla membrana plasmatica, risentono delle variazioni di concentrazione del calcio ionizzato, modificando la secrezione di PTH in modo inversamente proporzionale ai livelli di calcio. Pregressi lavori hanno documentato come lo sviluppo clinico di iperparatiroidismo primitivo sia associato a fattori genetici, in particolare a polimorfismi del VDR (Carling et al, 1995). Sulla base di tali osservazioni alcuni autori hanno indagato il possibile ruolo dei polimorfismi del CaSR nel determinismo dell'iperparatiroidismo. Yano et al (2000) hanno dimostrato come il polimorfismo R990G del CaSR sia associato ai livelli sierici di PTH in pazienti emodializzati con iperparatiroidismo secondario. Yamauchi et al (2001) hanno studiato lo stesso polimorfismo nell'ambito dell'iperparatiroidismo primitivo, dimostrando come esso condizioni la severità clinica della malattia. Scillitani et al. (2007) hanno condotto uno studio da cui è emersa una stretta associazione tra l'aplotipo SRQ del CaSR e lo sviluppo della patologia. La variante A986S, che è la più frequente nella popolazione italiana affetta da iperparatiroidismo primitivo, non sembra avere un ruolo nel

determinismo della malattia (Cetani F, 2002). Sembra, tuttavia, rappresentare un fattore di rischio per lo sviluppo di neoplasia delle paratiroidi nel sesso maschile. E' quanto è emerso da uno studio di Miedlich et al (2001), che ha inoltre evidenziato come la presenza del genotipo Q1011E possa influenzare il decorso clinico della malattia. Per quanto concerne l'iperparatiroidismo secondario ad uremia, recenti studi clinici e sperimentali hanno suggerito un importante ruolo del CaSR e del VDR nella regolazione del rilascio di PTH da parte delle ghiandole paratiroidi e nella proliferazione delle cellule paratiroidi. L'espressione di tali recettori è ridotta nei pazienti uremici con severo iperparatiroidismo secondario. Il trapianto di rene corregge le anomalie del metabolismo minerale che, durante l'uremia, causano iperparatiroidismo secondario e osteodistrofia renale. Nonostante ciò la diminuita espressione del CaSR e del VDR mRNA persiste suggerendo un loro possibile ruolo nel determinismo dell'iperparatiroidismo secondario persistente dopo trapianto di rene.

SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questa tesi è l'analisi dei parametri clinici, metabolici e genetici che influenzano l'iperparatiroidismo persistente in pazienti trapiantati di rene per insufficienza renale cronica in fase terminale. L'intento è riuscire ad identificare precocemente i fattori di rischio di iperparatiroidismo ed individuare i soggetti con una predisposizione genetica alla patologia, in modo da proporre efficaci misure di prevenzione degli effetti dei livelli elevati di paratormone così da ridurre l'incidenza di fratture osteoporotiche.

MATERIALI E METODI

Pazienti

Abbiamo studiato una popolazione di 125 pazienti trapiantati di rene 87 maschi (69,6%) e 38 femmine (30,4%) di età media 51 ± 11 anni (età media maschi 50 ± 11 anni, femmine: 52 ± 11 anni) che sono stati sottoposti a trapianto per insufficienza renale in fase terminale con valori medi di creatininemia post trapianto di 146 ± 31 $\mu\text{mol/L}$. Le patologie che avevano portato al trapianto erano: la glomerulonefrite cronica (45,6 %), la nefropatia policistica (17,6%), cause sconosciute (12%), la nefropatia da reflusso (9,6%), la nefropatia ipertensiva (8,8%), la nefropatia da tossici (3,2%), ostruttiva (1,6%) e la nefrolitiasi (1,6%). Prima del trapianto i pazienti erano stati sottoposti ad emodialisi per una media di 33 ± 51 mesi ed a dialisi peritoneale per una media di 8 ± 22 mesi. Tutti i pazienti, al momento dello studio, erano in trattamento secondo vari protocolli immunosoppressivi: il 35% con CsA MM Cs (ciclosporina, micofenolato mofetile, corticosteroidi), il 21% con Fk MM Cs, il 7,2% con CsA Cs, un 6,4% con CsA Aza Cs (ciclosporina, azatioprina, corticosteroidi), un 6,4% con CsA Rad Cs, un 4,8% con Fk Cs, un 4,8% con Fk MM, un 3% con CsA MM, un 2,4% con Rapamicina MM Cs, un 1,6% con Rapamicina Cs, un 1,6% con CsA ERL Cs, uno 0,8% con CsA Rapa Cs, Uno 0,8% con Rad Fk MM Cs, uno 0,8% con CsA FTY Cs, uno 0,8% con CsA Aza, uno 0,8% con CsA Erl, uno 0,8% con FTY ed uno 0,8% con Fk. La dose cumulativa di ciclosporina media era 171 ± 225 grammi, quella di corticosteroidi 8 ± 7 grammi. I pazienti sottoposti a paratiroidectomia prima del trapianto erano il 3,2%. Abbiamo, inoltre, suddiviso i pazienti in base al tempo trascorso dal trapianto: il 22% era compreso tra 0 e 12 mesi, il 28% tra 13 e 36 mesi, il 22 % tra 37 e 60 mesi, il 28% tra 60 e 120 mesi dal trapianto. Il 7% dei pazienti presentava fratture da trauma minimo, il 5% un'osteonecrosi della testa del femore e l'8% aveva sviluppato un diabete post-trapianto.

Nella seconda parte del nostro lavoro abbiamo selezionato, dalla popolazione in esame, 87 pazienti (60 maschi e 27 femmine), di età media 52 ± 10 anni, e ne abbiamo studiato i polimorfismi del CaSR.

Esami di laboratorio

Tutti i soggetti sono stati sottoposti, dopo digiuno notturno, ad un prelievo ematico per la determinazione di calcio, fosforo, creatinina clearance della creatinina, paratormone intatto, 25 idrossicolecalciferolo e fosfatasi alcalina ossea.

Il calcio sierico è stato valutato per mezzo di un analizzatore automatico multiparametrico (Modular D, Roche Diagnostics) mediante metodo colorimetrico con determinazione a punto finale e con bianco campione (la sensibilità analitica di tale metodo corrisponde a 0,05 mmol/L) (calcemia range di normalità: 2,10-2,55 mmol/l). Il fosforo è stato determinato utilizzando un analizzatore multiparametrico automatizzato (Modular D, Roche Diagnostics) con metodo a punto finale con bianco campione (la sensibilità analitica del fosforo nel siero è uguale a 0,1 mmol/L) (fosforemia range di normalità: 0,87-1,45 mmol/l). La creatinina è stata analizzata con metodo Jaffè con compensazione bianco cinetica (Roche Diagnostic GmbH, D-68298 Mannheim, Germania; la sensibilità del metodo corrisponde a 0,1 mg/dl) (creatininemia range di normalità: 62-115 μ mol/l). Il paratormone intatto è stato determinato con metodo immunoenzimatico a sandwich (LIAISON® N-tact™ PTH Assay) che utilizza due tipi di anticorpi; il primo legato alla fase solida riconosce la regione 39-84 del PTH, mentre il secondo, coniugato ad un derivato dell'isoluminolo, riconosce la porzione 1-34 del PTH (la sensibilità analitica di tale analizzatore è pari a 1 è pg/ml) (PTH range di normalità 10-55 pg/ml). La 25-OH vitamina D è stata dosata con strumento automatico (LIAISON) con metodo immunoenzimatico e con sistema di rilevazione in chemiluminescenza (25-OH vitamina D < 30 nmol/L: carenza; 25-OH vitamina D da 30 a 80 nmol/L: insufficienza; 25-OH vitamina D > 80 nmol/L: normalità).

La fosfatasi alcalina ossea, marcatore di neoapposizione ossea, è stata calcolata con metodo immunoenzimatico (MetraTM BAP EIA) che utilizza un anticorpo monoclonale antiBAP per catturare BAP nel campione (il limite di sensibilità del metodo, ovvero la concentrazione minima che può essere distinta dallo zero, è di 0,7 U/L) (ALP ossea range di normalità: 15-41,3 U/L). La concentrazione di deossipiridinolini urinari è stata valutata con metodo immunoenzimatico (2000 Pyrilinks- D) su analizzatore automatico IMMULITE® con sistema di rilevazione in chemiluminescenza ed è stata corretta per la creatinina urinaria (la sensibilità del metodo è di 6nM (range di normalità: nella femmina 3-7,4 nmol/mmol creat, nel maschio 2,3-5,4 nmol/mmol creat).

Determinazione dei genotipi del CaSR

Il DNA genomico di 87 soggetti nefrotrapiantati è stato estratto da sangue periferico, utilizzando la digestione standard con proteinase K-SDS ed estrazione con fenolo-cloroformio. I campioni di DNA sono stati mantenuti a -20°C fino all'utilizzo.

Un frammento dell'esone 7 del gene del Calcium Sensing Receptor contenente i 3 polimorfismi (A986S, R990G e Q1011E) è stato amplificato tramite PCR con i seguenti primers: Forward 5'-TCCCGCAACACCATCGAGGA-3' e Reverse 5'-TCTTCCTCAGAGGAAAGGAG. I tre polimorfismi sono stati determinati attraverso un sequenziamento diretto.

Densitometria ossea

Tutti i soggetti sono stati sottoposti ad esame densitometrico del rachide lombare (L2-L4) e del femore prossimale, mediante densitometria a raggi X Hologic QDR-4500 A. I risultati relativi a tali determinazioni sono stati espressi come gr/cm² e come T-score (numero delle deviazioni standard di cui il valore del soggetto in esame si discosta dalla media dei giovani adulti normali) e Z-score (numero delle deviazioni standard di cui il valore del soggetto esaminato si discosta dalla densità media di una popolazione di

soggetti della stessa età e sesso). Seguendo le indicazioni della World Health Organization (WHO), l'osteoporosi è definita da valori di T score <-2.5 DS.

Radiografia del rachide dorsolombare

102 pazienti trapiantati sono stati sottoposti a valutazione qualitativa e quantitativa con metodica morfometrica delle radiografie della colonna dorsolombare per valutare la presenza di fratture vertebrali. Le altezze anteriori, medie e posteriori di ogni vertebra tra la quarta vertebra toracica e la quinta lombare sono state misurate con un morfometro digitale. Una riduzione in altezza di 4 mm o più era definita come frattura. Le fratture sono state definite lievi, moderate e gravi in base alla classificazione semiquantitativa di Genant (lieve, grado 1 con riduzione dell'altezza vertebrale del 20-25%; moderata, grado 2 con riduzione dell'altezza vertebrale dal 25 al 40%, grave, grado 3 con riduzione dell'altezza vertebrale oltre il 40%).

Statistica

I risultati sono stati espressi come $M \pm DS$ (media e deviazione standard). L'analisi della regressione multipla e logistica sono state adoperate per valutare la presenza di correlazioni tra variabili. Un valore di $P < 0.05$ è stato considerato come significativo.

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando SPSS per Windows versione 12.0 (SPSS Inc., Chicago, USA)

RISULTATI

I principali dati metabolici relativi alla funzione renale, al metabolismo osseo ed alla dose cumulativa di steroidi sono esposti nella tabella 1. Considerando la popolazione nel suo complesso, si può notare la presenza di livelli medi elevati di paratormone (PTH) prima (304 pg/ml) e successivamente al trapianto (113 pg/ml) compatibili con un iperparatiroidismo secondario persistente, nonostante la ripresa della funzionalità renale. Valutando lo stato vitaminico D di questi pazienti risulta che la concentrazione media di 25-idrossicolecalciferolo (25-OH vitamina D) è di 40 nmol/l ed esprime un livello insufficiente di vitamina D. In particolare, nella tabella 2 osserviamo che il 68% dei pazienti trapiantati di rene presenta livelli di $PTH \geq 65$ pg/ml (valore soglia per definire la presenza di un iperparatiroidismo) ed il 40% ha una concentrazione di 25-idrossicolecalciferolo ≤ 30 nmol/L (valore che definisce uno stato carenziale vitaminico D); dai nostri dati risulta, inoltre, che il 56,8% presenta valori di 25-OH vitamina D compresi tra 30 e 80 nmol/L e solo il 3,2% presenta livelli normali di 25-OH vitamina D > 80 nmol/L.

Nella popolazione di trapiantati è stata condotta una correlazione multipla tra variabili, in cui la variabile dipendente era il paratormone e le variabili indipendenti: l'età, il sesso, il BMI, la creatinina, i livelli di 25-OH vitamina D, di ALP ossea e di PTH pretrapianto, i mesi di emodialisi precedenti il trapianto ed i mesi trascorsi dal trapianto, la dose cumulativa di glucocorticoidi. I livelli di paratormone erano predetti negativamente dai livelli di 25-OH vitamina D e positivamente dall'età, dalla dose cumulativa di glucocorticoidi e dai mesi di emodialisi precedenti il trapianto; anche i mesi successivi al trapianto erano fattori predittivi significativamente associati ai livelli di PTH (tabella 3). In un modello di regressione logistica che considerava quale variabile dipendente il paratormone dicotomizzato per valori $<$ ed $>$ a 65 pg/ml (al di sopra del quale si parla di iperparatiroidismo) e come variabili indipendenti quelle

precedentemente elencate, l'età, la dose cumulativa di steroidi ed i livelli di 25-OH vitamina D risultavano significativamente correlati con il paratormone (tabella 4). In particolare, considerando come cut-off per l'iperparatiroidismo secondario nell'insufficienza renale valori di PTH > 80 pg/ml, risultavano positivamente correlati l'età ed i livelli di PTH pretrapianto e negativamente la concentrazione del 25-OH vitamina D (tabella 5).

Considerando la prevalenza di pazienti osteoporotici, dai nostri dati emerge che la percentuale di trapiantati di rene con osteoporosi al rachide era il 25,6% (il 29% dei maschi aveva un'osteoporosi del rachide contro un 18% delle femmine), al collo femorale 16,8% e al femore 7,2% in toto. La densità ossea risultava inferiore nei soggetti che assumevano una dose di prednisone-equivalenti superiore alla mediana (6,7 mg/die).

Abbiamo, inoltre, valutato la prevalenza di fratture vertebrali morfometriche. Il 57% dei trapiantati presentava una o più fratture, di cui il 70% erano lievi ed il 30% di grado moderato; in particolare, il 29% della popolazione femminile risultava fratturata al rachide, mentre quella maschile lo era nel 69 % dei casi (tabella 6). Nella popolazione è stato applicato un modello di regressione logistica tra variabili, in cui le fratture vertebrali erano la variabile dipendente, mentre l'età, il sesso, il BMI, la creatinina, il paratormone, la 25-OH vitamina D, l'ALP ossea, i mesi successivi al trapianto, una paratiroidectomia pretrapianto, la comparsa di diabete mellito post trapianto, il T score del rachide, del femore in toto e del collo femorale, le fratture pregresse e la terapia con acido alendronico erano le variabili indipendenti. I livelli di PTH predicevano positivamente la presenza di fratture vertebrali, le fratture pregresse non raggiungevano la significatività statistica e il sesso femminile sembrava un fattore protettivo anche se nell'interpretazione di questo dato è utile segnalare che la rappresentatività del campione femminile era scarsa (tabella 7). Per quanto riguarda la distribuzione dei polimorfismi del gene del *CaSR*, il polimorfismo A986S è stato osservato nel 35,6 % della popolazione in esame, il polimorfismo R990G nell'11,5 % e il

Q1011E nell' 1,1 %. Non sono state osservate correlazioni significative tra i polimorfismi studiati, i livelli di PTH sierico (tabella 8), la densità minerale ossea e il rischio fratturativo.

DISCUSSIONE

Il trapianto di rene al giorno d'oggi è il trattamento più efficace dell'insufficienza renale cronica in fase uremica e risulta in costante aumento negli ultimi anni grazie al miglioramento delle condizioni cliniche e della speranza di vita del soggetto trapiantato. La ripresa della funzionalità renale, tuttavia, non impedisce la comparsa di complicanze nel medio e lungo termine, quali la riduzione della massa ossea ed il conseguente rischio di fratture patologiche (Julian et al 1992; Grotz et al 1995). I fattori responsabili del danno osseo sono l'osteodistrofia renale preesistente al trapianto, la funzionalità dell'organo trapiantato, la persistenza dell'iperparatiroidismo e la terapia immunosoppressiva (corticosteroidi, ciclosporina, azatioprina, rapamicina, FK 506). In particolare, Pichette et al (1996) hanno dimostrato che dosaggi elevati di corticosteroidi assunti per lunghi periodi sono associati ad un aumento della frequenza di fratture osteoporotiche.

In questo studio abbiamo riscontrato una marcata riduzione della densità minerale ossea compatibile, secondo i criteri OMS, con un'osteoporosi del rachide nel 25,6% dei pazienti trapiantati, del collo femorale nel 16,8% dei casi e del femore in toto nel 7,2% dei pazienti. Abbiamo potuto osservare, come la densità minerale ossea risultava inferiore nei soggetti che assumevano una dose di prednisone-equivalenti superiore a 6,7 mg/die; è noto, infatti, l'effetto osteolesivo di basse dosi giornaliere di prednisone (anche inferiori a 10 mg/die) in pazienti affetti da artrite reumatoide, secondo quanto affermato da Laan R et al (1993). Dal punto di vista patogenetico, gli steroidi riducono la massa ossea trabecolare inibendo la differenziazione e l'attività degli osteoblasti con meccanismo dose-dipendente, stimolandone l'apoptosi (Manolagas SC et al, 1999) e secondo quanto emerso da recenti studi aumentano anche i parametri di riassorbimento espressi come numero di osteoclasti ed estensione della superficie di riassorbimento (Dalle Carbonare et al, 2001) e l'osteoclastogenesi riducendo i livelli di osteoprotegerina (Canalis et al, 2002). Il

trattamento con steroidi riduce, inoltre, l'assorbimento intestinale di calcio, ne aumenta l'escrezione urinaria ed un bilancio calcico negativo può stimolare la secrezione di paratormone; in particolare nel nostro studio è emersa una correlazione positiva tra dose cumulativa di glucocorticoidi e livelli di paratormone dopo il trapianto. Dosi elevate di glucocorticoidi, inoltre, possono sopprimere l'asse ipotalamo-ipofisario, determinando un ipogonadismo spesso già presente come complicanza dell'insufficienza terminale d'organo con prevalenza dei fenomeni di riassorbimento(Adi C, Philip Sambrook et al, 2004). Questi fattori possono spiegare la perdita di massa ossea; ad essi può aggiungersi la miopatia da steroidi che compromettendo la mobilità del paziente ne aumenta il rischio di caduta e di frattura.

Tra i fattori maggiormente coinvolti nella riduzione della massa ossea successiva al trapianto segnaliamo l'iperparatiroidismo persistente dopo trapianto di rene, un evento frequente che interessa fino al 50% dei pazienti anche in presenza di una normale funzione renale (Giannini S et al, 2001). Dall'analisi dei nostri dati emerge che, nonostante la ripresa della funzionalità renale corregga i parametri biochimici correlati all'iperparatiroidismo secondario (la ritenzione di fosfato e l'ipocalcemia), i valori medi dell'ormone (113 pg/ml) rimangono elevati per lungo tempo dopo il trapianto e nel 68% dei pazienti trapiantati si configura un iperparatiroidismo persistente (Grotz et al,1995; D'Angelo et al 2000). Le cause di questo fenomeno sembrano essere correlate alla persistenza dell'iperplasia paratiroidea, ai livelli di paratormone ed alla durata dell'emodialisi precedenti il trapianto (Torres A et al 1998, Messa et al 1998, Pavan S et al 2005), al basso tasso di apoptosi delle cellule paratiroidee che hanno una lunga emivita (circa trent'anni), ad un'alterazione del set point per il calcio della ghiandola paratiroidea (Parfitt et al, 1997), all'influenza genetica dei polimorfismi del recettore della vitamina D (Giannini et al, 2002), al grado di insufficienza renale ed, oggetto del nostro lavoro, allo stato vitaminico D. Abbiamo notato che i livelli medi di 25 idrossicolecalciferolo (25-OH vitamina D) dopo il trapianto erano ridotti (25-OH vitamina D = 40 nmol/l) e che il 40% dei pazienti

trapiantati presentava una franca carenza vitaminica D (25-OH vitamina D < 30 nmol/l) ed un 57% aveva comunque un'insufficienza di tale parametro (25-OH vitamina D tra 30 ed 80 nmol/l). In particolare, dall'analisi dei nostri dati, è emerso che i livelli di vitamina D correlavano negativamente con il paratormone considerato come variabile continua e dicotomizzata per valori > ad 80 nmol/l, considerato cut off per l'iperparatiroidismo secondario in pazienti con insufficienza renale. Questa correlazione inversa tra 25-OH vitamina D e paratormone è interessante anche perché è stata documentata da pochi altri studi, dei quali uno è stato condotto da autori tedeschi (Reinhardt W et al, 1998) in una popolazione di trapiantati rene seguita per due anni dopo il trapianto, che presentava livelli di paratormone elevati nel 25% dei casi ad un anno dal trapianto e funzionalità renale nella norma e l'altro da autori spagnoli (GomezA et al, 2003). Anche in uno studio recente di Lomonte et al (2005) i livelli di vitamina D rappresentano un importante fattore di rischio per l'iperparatiroidismo indipendentemente dalla concentrazione del calcitriolo con l'86% dei pazienti trapiantati di rene con livelli di vitamina D insufficienti.. Tra le cause possibili dell'ipovitaminosi D è possibile siano coinvolte la dieta e la ridotta esposizione al sole che i pazienti trapiantati in terapia con immunosoppressori come la ciclosporina sono costretti ad osservare. È' stato proposto dalla Kidney Dialysis Outcomes Quality Initiative (K-DOQI) che i livelli di 25-OH vitamina D devono essere monitorati nei pazienti con insufficienza renale cronica di grado tre e quattro con aumento del paratormone e che livelli di 25-OH vitamina D <30 ng/ml devono essere corretti con supplementazioni di vitamina D (National Kidney FoundationI 2003) come il colecalciferolo, non con analoghi attivati come il calcitriolo (Coburn JW et al, 2003) che aumentano il catabolismo della 25-OH vitamina D. Tale raccomandazioni possono essere estese anche ai pazienti trapiantati di rene affinché i livelli di 25-OH vitamina D possano essere controllati e le eventuali carenze trattate; a tal proposito stiamo conducendo uno studio che analizza quanto i livelli di paratormone si riducano correggendo

l'ipovitaminosi D con supplementi di vitamina D e se questo si traduca in un minor rischio di frattura.

Dai nostri dati emerge un'elevata prevalenza di fratture vertebrali tra i pazienti trapiantati di rene pari al 57%, più del doppio di quanto riportato da Cohen et al (2004) che osservarono una frequenza compresa tra 3 e 29% e da Mazzaferro S et al (2005) che segnarono un 32%. Questo dato è interessante se si pensa che nel trapianto di rene si riteneva che le fratture interessassero principalmente lo scheletro corticale delle ossa lunghe (femore, avambraccio) e dei piedi (Goldman R et 1999) come effetto dell'iperparatiroidismo secondario e che si attribuiva ai trapianti di fegato, cuore e polmone una maggior prevalenza di fratture vertebrali probabilmente a causa dell'esposizione ad elevate dosi di corticosteroidi (Maalouf M et al 2004). Nel nostro studio, inoltre, la prevalenza delle fratture vertebrali è maggiore nel sesso maschile (69%) rispetto a quello femminile (29%); l'interpretazione di questo risultato, è tuttavia da considerare con cautela vista la scarsa rappresentatività del campione femminile.

Dai nostri dati emerge che i livelli di paratormone correlano positivamente con la presenza di fratture vertebrali, mentre altri fattori descritti da Goldman et al (1999) come il T-score lombare, la ridotta BMD lombare, la dose cumulativa e di mantenimento di corticosteroidi, la presenza di diabete mellito, una dialisi prolungata (Vautour LM et al 2004), una pregressa paratiroidectomia, il BMI l'età e le pregresse fratture, che nel nostro studio non raggiungono il limite della significatività, non risultavano essere coinvolti. È importante e necessario, pertanto, abbassare i livelli di PTH nei trapiantati con un iperparatiroidismo persistente per ridurre il rischio di una frattura vertebrale e la morbidità di questi pazienti.

I nostri dati, infine, sembrano escludere un ruolo dei polimorfismi del calcium-sensing receptor nella eziopatogenesi dell'iperparatiroidismo persistente dopo trapianto di rene. Successive analisi si rendono necessarie per trarre ulteriori conclusioni.

CONCLUSIONI

L'osteoporosi e l'iperparatiroidismo secondario persistente si confermano molto frequenti dopo il trapianto di rene; anche l'ipovitaminosi D è estremamente comune e costituisce un ulteriore fattore di rischio per la persistenza di alti valori di PTH.

Nei pazienti trapiantati di rene, inoltre, la prevalenza di fratture vertebrali risulta inaspettatamente elevata rispetto a quanto descritto in letteratura e livelli elevati di paratormone ne costituiscono un fattore di rischio significativo. Infine, riteniamo che questi pazienti necessitino di un monitoraggio dei livelli di vitamina D e che sia indicata una terapia con supplementi di vitamina D per correggere l'iperparatiroidismo secondario persistente e ridurre il rischio fratturativo.

TABELLE: *Tabella 1*

	Media	DS
s-Ca (mmoL/l)	2.4	0.2
s-Pi (mmoL/l)	0.9	0.2
PTH-preTX (pg/ml)	304	316
PTH postTx (pg/ml)	113	83
25-OH-D (nmol/l)	40	22
b-ALP (U/l)	21	12
Cl Cr (ml/min)	53	15
Dose cumulativa GC (gr)	8	7

Tabella 2

Pz con PTH ≥ 65 pg/ml 68 %	Pz con 25-OH-D ≤ 30 nmol/l 40 %
---	--

Tabella 3

Analisi di regressione multipla
Variabile dipendente: PTH sierico

	Coefficiente beta	P
25-OH-D	-0.31	0.000
Dose cumulativa GC	0.44	0.000
Mesi di HD preTx	0.25	0.002
Mesi postTX	-0.26	0.014
Età	0.22	0.006

Tabella 4

Analisi di regressione logistica
Variabile dipendente: PTH < o > di 65
pg/ml

	Odds Ratio	C.I. 95%	P
Età	1.05	1.01-1.10	0.037
Dose cum. GC	1.14	1.02-1.27	0.021
25-OH-D	0.96	0.93-0.99	0.005

Tabella 5

Analisi di regressione logistica
Variabile dipendente: PTH < o > di 80
pg/ml

	Odds Ratio	C.I. 95%	P
Età	1.05	1.01-1.10	0.022
PTH-preTx	1.01	1.00-1.02	0.019
25-OH D	0.97	0.94-0.99	0.012

Tabella 6

Risultati: fratture vertebrali

PAZIENTI %	FEMMINE %	MASCHI %
57%	29%	69%

Tabella 7

Analisi di regressione logistica
Variabile dipendente: fratture vertebrali

	Odds Ratio	C.I. 95%	P
PTH	1.01	1.00-1.02	0.011
Sesso (F vs M)	0.12	0.04-0.35	0.000
Fx. pregresse (si vs no)	5.34	0.95-30.07	0.058

Regressione logistica che ha incluso anche le seguenti variabili predittive: età; peso; creatinina; Vit.D; ALP ossea; mesi tx; DM post trapianto; T score rachide, femore, collo femorale; paratiroidectomia pretx.

Tabella 8

	WT m $\pm$ DS (n°)	ETERO m $\pm$ DS (n°)	OMO m $\pm$ DS (n°)
A986S	117 $\pm$ 94 (56)	134 $\pm$ 84 (29)	85 $\pm$ 16 (2)
R990G	124 $\pm$ 91 (77)	107 $\pm$ 88 (10)	- (0)
Q1011E	123 $\pm$ 90 (86)	42 (1)	- (0)

BIBLIOGRAFIA

Adams D.H., Neyberger J.M.: Patterns of graft rejection following liver transplantation, *J. Hepatol.*, 1990, 10: 113- 119.

Adams D.H., Pansford S., Gunson B. et al.: Neurological complications following liver transplantation, *Lancet*, 1987, 1: 949-951.

Aguilar J.I., Radick J., Kodali V., Levis S., Altman R., Sadowsky J.A., Reddy K.R., Jeffers L.J., Parker T., Schill E.R.: Bone disease and plasma vitamin K levels in PBC patients, (abs), *Gastroenterology*, 1993, 104: A 868.

Alem Am, Sherrad DJ et al: Increased risk oh hip fracture among patients with end- renal disease, *Kidney Int*, 2000, 58:396-399.

Almawi W.Y., Lipman M.I., Stevens A.C., Zanker B., Hado E.T., Strom T.B.: Abrogation of glucocorticoid mediated inhibition of T cell proliferation by the synergistic action of IL 1 and IL 6 and INF γ , *J. Immunol.*, 1991, 146: 3526-3527.

Almond M., J.Kwan, K.Ewans, J.Cunningham: Loss of Bone Mineral Density in the First 12 Months following Renal Transplantation, *Nephron*, 1994, 66: 52-57.

Argao E.A., Balistreri W.F., Hollis B.W., Ryckman F.C. Effects of orthotopic liver transplantation on bone mineral content and serum vitamin D metabolites in infants and children with chronic cholestasis, *Hepatology*, 1994, 20: 598-603.

Arnold J.C., Hauser D., Ziegler R., Kommerell B., Otto G., Theilmann L., Wuster C.: Bone disease after liver transplantation, *Transplant. Proc.*, 1992, 24: 2709-2710.

Aschendorf C., Offner G., Wincler L., Schirg E., Hoyer P.F., Brodehl J.: Adult height achieved in children after kidney transplantation, *Am. J. Dis. Child.*, 1990, 144: 1138-1141.

Atzumi K, Kushida K, Shimizu et al: Risk factor for vertebral fractures in renal osteodystrophy, *Ann J.Kidney Dis*, 1999,33: 287-297.

Ball AM, Gillen DL, Sherrard D et al: Risk of hip fracture among dialysis and renal transplant recipient, *JAMA*, 2002, 288: 3014-3018.

Bateman A., Singh A., Kral T., Solomon S.: The immune hypothalamic pituitary adrenal axis, *Endocrinol. Rev.*, 1989, 10: 92- 112.

Bengoa J.M., Sitrin M.D., Meredith S., Kelly S.E., Shah N., Baker A.L., Rosenberg I.H.: Intestinal calcium absorption and vitamin D status in chronic cholestatic liver disease, *Hepatology*, 1984, 4: 261-265.

Bird G., Friend P., Donaldson J. et al.: Hyperacute rejection in liver transplantation; A case report, *Transplant. Proc.*, 1989, 21: 3742-3744.

Boelaert J, Fenves AZ, Coburns JW: Defoxamine therapy and mucormyosis in dialysis patients: Report of an international registry. *Am J Kidney Dis* 18: 600-667, 1991

Bollerslev J., Wilson S.G. 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: 12-17.

Brinner V., J.Landmann, F.Brunner, G.Thiel: Cyclosporin A-Induced Transient Rise in Plasma Alkaline phosphatase in Kidney Transplant Patients, *Transplantation*, 1993, No 6, 99-107.

Brinner V., G.Thiel, M.C.Monier-Faugere, B.Bognar, J.Landmann, V.Kamber, H.Malluche: Prevention Of Cancellous Bone Loss But Persistence Of Renal Bone Disease Despite Normal 1,25 Vitamin D Levels Two Years After Kidney Transplantation, *Transplantation*, 1995

Broadus A.E.: Physiologic functions of calcium, magnesium and phosphorus, in *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, first edition published by the American Society for Bone and Mineral Research Society Office, Favus M.J. (ed), Kelseyville, California, 1990, 7: 29-30.

Brown E.M.: Physiology and pathophysiology of the extracellular calcium-sensing-receptor, *Am J Med*, 1999, 106: 238-253.

Brown E.M., Gamba G., Riccardi D et al.: Cloning and characterization of an extracellular Ca-sensing receptor from bovine parathyroid, *Nature*, 1993, 366: 575-580.

Buckley L, E.Leib, K.Cartularo, P.Vaceck, S.Cooper: Effects Of Low Dose Corticosteroids On The Bone Mineral Density Of patients With Rheumatoid Arthritis, *J Bone Mineral Res* , 1994, Vol.10 N° 3.

Campistol J, Munoz-Gomez J, Sole M, et al :Results of renal transplantation for dialysis arthropathy, *Nephrol Dial Transpl* 1990, 4 :492.

Canalis E., Effect of Insulin Growth Factor 1 on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria, *J. Clin. Invest.*, 1980, 66: 709-719.

Canalis E., Lorenzo J., Burgess W.H., Maciag T.: Effects of endothelial cell growth factor on bone remodelling in vitro, *J. Clin. Invest.*, 1987, 79: 52-58.

Canalis E., McCarthy T., Centrella M.: A bone-derived growth factor isolated from rat calvariae is beta 2 microglobulin, *Endocrinology*, 1987, 121: 1198-1200.

Canalis E et al.: Isolation and characterization of insulin-like growth-factor 1 (somatomedin C) from cultures of fetal rat calvariae, *Endocr*, 1988, 122: 22-27.

Canalis E., Delany AM.: Mechanisms of glucocorticoid action in bone, *Ann NY Acad Sci*, 2002, 966: 73-81.

Canalis E.: Regulation of bone remodelling, in *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, first edition published by the American Society for Bone and Mineral Research Society Office, Favus M.J. (ed), Kelseyville, California, 1990, 6- 23-25.

Canalis E: Effect of platelet-derived growth factor on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria, *Metabolism*, 1981, 30: 950-975.

Centrella M.et al.: Transforming growth factor beta is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone, *J. Biol. Chem.*, 1987, 262: 2869-2874.

Cetani F., Borsari S. et al.: Calcium-sensing receptor gene polymorphism in primary hyperparathyroidism, *J Endocrinol Invest*, 2002, 25:614-619.

Cetani F., Pardi E. et al.: Calcium-sensing receptor gene polymorphism is not associated with bone mineral density in

italian postmenopausal women, Eur J Endocrinol, 2003, 148: 603-607.

Chao S., K.Tsai, P.Chieng, P.Lee, C.Lee, S.Lee: Bone Mineral Density Profili in Uremic and Renal Transplant Patients, Transplantation Proceedings, 1994, Vol 26, N° 4: 2009-2011.

Chattopadyay N., Cheng I. et al., Identification and localization of extracellular Ca-sensing receptor in rat intestine, Am J Physiol Gastroint Liver Physiol, 1998, 274: G122-G130.

Clohisy D, Thompson R,: Fractures associated with neuropatic arthropathy in adults who have juvenile onset diabetes . J Bone Surg (Am), 1988, 70-A: 1192-1200,

Cobum J.W., Slalopolsky E.: Vitamin D parathyroid hormone and renal osteodystrophy in The Kidney, Brenner B., Rector F. (eds), Philadelphia, W.B.Saunders, 1986, 1657-1729.

Cockburn I.T., Krupp P.: The risk of neoplasms in patients treated with cyclosporine A, J. Autoimmun., 1989, 2: 723-731.

Cohen A, Sambrook P. Shane E: Management of bone loss after organ transplantation, J Bone Mineral Res, 2004, 19: 1919-1932.

Cole D.E.C., Peltekova V.D et al.: A986S polymorphism of the calcium-sensing receptor and circulating calcium concentrations, Lancet, 1998, 353: 112-115.

Colonna J.O., Winston D.J., Brill J.E. et al.: Infectious complications in liver transplantation, Arch. Surg., 1988, 123: 360-364.

Compston J.E.: Metabolic bone disease, in Complications of chronic liver disease, Rector W.G. (ed), St. Louis, Mosby, 1992, 295-316.

Conceicao S., Willkinson R., Feest T., et al. Hypercalcemia following renal transplantation: Causes and consequences. Clin Nephrol 16 :235-244, 1987

Consensus development conference: Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis, Am. J. Med., 1993, 94: 646-650.

Cosimi A.B., Cho S.I., Delmonico A.C. et al.: A randomised clinical trial comparing OKT3 and steroids for treatment of hepatic allograft rejection, Transplantation, 1987, 43: 91-95.

Cuervas-Mons V., Millan I., Gavalier J.S. et al.: Prognostic value of preoperatively obtained clinical and laboratory data in predicting survival following orthotopic liver transplantation, Hepatology, 1986, 6: 922-927.

Cvetkovic M., G.Mann, D.Romeo, X.Liang, Y.Ma, W.Jee, Sol Epstein: The Deleterious Effects of Long - Term Cyclosporine A, Cyclosporine G, And FK506 On Bone Mineral Metabolism In Vivo, Transplantation Vol.1231-1237, No.8.

Dahlback-Sjoberg H., Bjorkhem I., Princen H.M.G.: Selective inhibition of mitochondrial 27-hydroxylation of bile acid intermediates and 25 hydroxylation of vitamin D3 by cyclosporin A, *Biochem. J.*, 1993, 293: 203-206.

D'Alessandro A., Metzler J., Pirsch J.: Tertiary hyperparathyroidism after renal transplantation: Operative indications, *Surgery*, 1989, 106: 1049-1056.

Dalle Carbonare L, Arlot ME., Chavassieux PM et al: Comparison of trabecular microarchitecture and remodeling in glucocorticoid induced osteoporosis and postmenopausal osteoporosis, *J Bone Mineral Res*, 2001, 16:97-103.

D'Angelo A, Calò L., Giannini S., Carraro G., Bonfante L., Favaro, Antonello A: Parathyroid hormone and bone metabolism in Kidney transplanted patient, *Clinical Nephrology*, 2000, 53: 19-22.

Davenport A., Davison M., Newton K., et al. Urinary aluminium excretion following renal transplantation and the effect of pulse steroid therapy, *Ann Clin Biochem*, 1990, 27 :25-32.

Davis E.- Neto, V.Jorgetti, M.Soeiro, R.Periera, A.Borelli, L.Ianhez, E.Sabbaga, B.Wwajchemberg, S.Arap: Reversal of Aluminium - Related Bone Disease after Renal Transplantation, *American Journal of Nephrology*, 1993 ;13 :12 17.

Deierhoi M., Diethelm A.: Management of hyperparathyroidism following renal transplantation, *Transplant Management*, 1991, 2 :3-10.

Dempster D.W.: Perspectives: Bone histomorphometry in glucocorticoid-induced osteoporosis, *J. Bone Miner. Res.*, 1989, 4; 137-141.

Diamond T.H.: Metabolic bone disease in Primary biliary cirrhosis, *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 1990, 5: 66-81.

Diethelm A., Edwards R., Whelchel J.: The natural history and surgical treatment of hypercalcemia before and after renal transplantation, *Surg Gynecol Obstet*, 1982, 154 :481-490.

Drueke T. , Lacour B., Touam M., et al.: Effect of aluminium on hematopoiesis , *Kidney Int*, 29: 45-48, 1986

Dummer J.S., Harder A., Poorsattar A. et al: Early infections in kidney, heart and liver transplant recipients on cyclosporine transplantation, *Transplantation*, 1983, 36: 259-267.

Eastell R., Dickson R.E., Hodgson S.F., Wiesner R.H., Porayko M.K., Wahne H.W., Cedel S.L., Riggs B.L., Krom R.A.F.: Rates of vertebral bone loss before and after liver transplantation in women with primary biliary cirrhosis, *Hepatology*, 1991, 14: 296-300.

Epstein S., Shane E., Bilezikian J.P.: Organ transplantation and osteoporosis, *Curr. Opin. Rheumatol.*, 1995, 7: 255-261.

Epstein S.: Post-transplantation bone disease: the role of immunosuppressive agents and the skeleton, *J. Bone Miner. Res.*, 1996, 11: 1-7.

Fisher L.W., Gehron Robey P., Tuross N., Otsuka A., Tepen D.A., Esch F.S., Shimasaki S., Termine J.D.: The Mr 24000 phosphoprotein from developing bone is the NH₂-terminal propeptide of the α 1 chain of type I collagen, *J. Biol. Chem.*, 1987, 262: 13457-13463.

Friday K.E., Howard G.A.: Ethanol inhibits human bone cell proliferation and function in vitro, *Metabolism*, 1991, 40: 562-565.

Friedenstein A.J.: Precursor cells of mechanocytes, *Int. Rev. Cytol.*, 1976, 47: 327-359.

Genant H.K., Steiger P., Block J.E. et al.: Quantitative computed tomography: Update 1987, *Calcif. Tissue Res.*, 1987, 41: 179-186.

Giannini S., D'angelo A., Carraro G. et al, Persistently increased bone turnover and low bone density in long term survivors to kidney transplantation. *Clin. Nephrol.*, 2001, 56: 353-63.

Giannini S., D'angelo A., Nobile M., Carraro G., Pavan S., Crepaldi G. et al: The effect of vitamin D receptor polymorphism on secondary hyperparathyroidism and bone density after renal transplantation, *J Bone Mineral Res*, 2002, 17 (10): 1768-73.

Giannini S, Sella S, Dalle Carbonare: Osteoporosi nel paziente sottoposto a trapianto d'organo, *Riv.It.Ost.Gin*, 5: 302-309

Giannini S., Carraro G., Bonato P., Di Landro D., Plebani M., Bernardi D., Rigotti P., Antonello A., Crepaldi G., Sartori L., D'Angelo A.: Metabolic bone disease in kidney transplantation, (abs), *Osteoporosis Int.*, 1996, 6, suppl. 1: PTu 843, 293.

Goldman RR, Dunn JE, Dunlop DD., Sturtt FP., Abecassia MM, et al, Increased risk of fracture in patients receiving solid organ transplants, *J of Bone Mineral Res*, 1999, 14 (3): 456-63.

Gomez AG, Navez DM, Rodriguez GM., andez M, Cannata A JB: Review of the concept of vitamin D "sufficiency and Insufficiency", *Nefrologia*, 2003, 23 (suppl. 2): 573-7.

Gorensek M.J., Carey W.D., Vogt D. et al.: A multivariate analysis of risk factors for Cytomegalovirus infection in liver transplant recipients, *Gastroenterology*, 1990, 98: 1326-1332.

Gotz W., A.Mundinger, B.Gugel, V.Exner, A. Reichelt, P.Schollmeier:: Missing Impact of Cyclosporine on Osteoporosis in Renal Transplant Recipients, *Transplantation Proceedings*, 1994, Vol 26, No.5, :2652-2653.

Gowen M.: Cytokines regulate bone cell function, Rheumatology, 1991, 1: 43-50.

Grey A.B., Stapleton J.P., Evans M.C., Tatuell M.A., Arnes R.W., Reld I.R.: The effect of the antiestrogen tamoxifen on bone mineral density in normal late postmenopausal women, Am. J. Med., 1995, 99: 636- 641.

Grotz W., F.Alexander Munding, B.Gugel, V.Exner , G.Kirste, P.Schollmeier,: Bone Fracture And Osteodensitometry With Dual Energy X-Ray Absorptiometry in Kidney Transplant Recipients, Transplantation, 1995, Vol.59, 982-986, No.7

Haagsma E.B., Thijn C.J.P., Post J.G. et al.: Bone disease after liver transplantation, J. Hepatol., 1988, 6: 94-100.

Hanto D.W., Simmons R.L., Nayarian J.S.: Epstein-Barr virus lymphoproliferative diseases in renal allograft recipients, Heart transplant., 1984, 3: 121-131.

Hauschka P.V., Mavrakos A.E., Iafrati M.D., Doleman S.E., Klagsbrun M.: Growth factors in bone matlix, J. Biol. Chem., 1986, 261: 12665 12674.

Hawkins F.G., Leon M., Lopez M.B., Valero M.A., Larrodera L., Garcia L., Loinaz C., Moreno Gonzales L.: Bone loss and turnover in patients with liver transplantation, Hepatogastroenterology, 1994, 41: 158-161.

Hay J.E., Lindor K.D., Wiesner R.H. et al.: The metabolic bone disease of primary sclerosing cholangitis, *Hepatology*, 1991, 14: 257-261.

Hay J.E.: Bone disease in cholestatic liver disease, *Gastroenterology*, 1995, 108: 276-283.

Hay J.E.: Bone disease in liver transplant recipients, *Gastroenterol. Clin. N.*, 1993, 22: 337-349.

Hedlung L., Gallagher J.C.: The effect of age and menopause on bone mineral density of the proximal femur, *J. Bone Miner. Res.*, 1989, 4: 639-42.

Herlong H.F., Becker R.R., Maddrey W.C.: Bone disease in primary biliary cirrhosis: histologic features and response to 25-hydroxyvitamin D, *Gastroenterology*, 1982, 83: 103-108.

Hock J.M., Centrella M., Canalis E.: Insulin-like growth factor 1 (IGF 1) has independent effects on bone matrix formation and cell replication, *Endocrinology*, 1988, 122: 254-260.

Horber F.F., Casez J.P., Steiger U., Czerniack A., Montandon A., Jaeger P.H.: Changes in bone mass early after kidney transplantation, *J. Bone Miner. Res.*, 1994, 9: 1-9.

House R.M., Dubovsky S.L., Penn I.: Psychiatric aspects of hepatic transplantation, *Transplantation*, 1983, 36: 146-150.

Jadoul M, Noel H, Van Ypserle: B 2-microglobuline amyloidosis in a patient treated exclusively by continuous ambulatory peritoneal dialysis, Am J Kidney Dis, 1990,15 :86-88,

Jadoul M, Malgouyres J, Prignon Y, et al :Effect of renal transplantation on the radiological signs of dialysis amyloid osteoarthropathy, Clin Nephrol, 1989,32 :194 197

Jahn B, Betz M, Deppisch R ,et al :Stimulation of B 2 microglobuline synthesis in lymphocytes after exposure to Cuprophane dialyzer membranes,. Kidney Int, 1991, 40 :285 290.

Janes C., Dickson E.R., Bonde S., Riggs B. L.: Bilirubin inhibits proliferation in cultured normal human osteoblast-like cells: a possible mechanism for bone loss in primary biliary cirrhosis, (abs), Gastroenterology, 1992, 102: A 827.

Janes C., Dickson E.R., Bonde S., McDonagh A., Riggs B.: Hyperbilirubinemia inhibits osteoblast proliferation: role of bilirubin in the development of cholestatic osteoporosis, (abs), Gastroenterology, 1993, 104: A 922.

Jilka R.L., Hangoc G., Girasole G., Passeri G., Williams D., Abrams J., Boyce R., Broxmeyer H., Manolagas S.C.: Increased osteoblast development after estrogen loss: mediation by interleukin 6, Science, 1992, 251: 88-91.

Julian B., L.Quarles, K.Niemann: Musculoskeletal Complications After Renal Transplantation: Pathogenesis and Treatment, American Journal of Kidney Diseases, 1992, Vol.19, No.2

Julian B.A., Laskow D.A., Dubovsky J., Dubovsky E.V., Curtis J.J., Quarles L.D.: Rapid loss of vertebral bone density after renal transplantation, N. Engl. J Med., 1991, 325: 544-550.

Kahan B.D.: Cyclosporine, N. Engl. J. Med., 1989, 321: 1725-1738.

Kalef-Ezra J., A.Karantanas, I.Hatzikonstantinou, G.Sferopoulos, D.Glaros, K.Siamopoulos: Bone Mineral Status after Renal Transplantation Assessment by Noninvasive Techniques, Investigative Radiology, 1994, Vol.29, No.2, 127-133.

Kanis J.A. and the WHO Study Group: Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report, Osteoporosis Int., 1994, 4: 368-381.

Kaplan M.M., Goldberg M.J., Matloff D.S., Neer R.M., Goodman D.B.P.: Effect of 25-hydroxyvitamin D3 on vitamin D metabolites in primary biliary cirrhosis, Gastroenterology, 1981; 81: 681-685.

Katz I.A., Epstein S.: Perspectives: Posttransplantation bone disease, J. Bone Miner. Res., 1992, 7: 123-126.

Katz I.A., Li M., Joffe I., Stein B., Jacobs T., Liang X., Ke H., Jee W., Epstein S.: Influence of age on cyclosporin A induced alteration in bone mineral metabolism in the rat in vivo, *J. Bone Miner. Res.*, 1994, 9: 59-67.

Kelly P.J., Sambrook P.N., Eisman J.A.: Potential protection by cyclosporin against glucocorticoid effects on bone, (letter), *Lancet*, 1989, 2: 1388.

Konsek J., Clohisy D., Teitelbaum S., Blair H.: Isolated osteoclasts express functional macrophage membrane receptors, for mannose or fucose, (abs), *J. Bone Miner. Res.*, 1988, 3: S 98.

Krane S.M.: Calcium, phosphate and magnesium in *International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics*, Rasmussen H. (ed), Pergamon Press, London, 1976, 1: 19-59.

Kusne S., Dummer S., Singh N. et al.: Infections after liver transplantation. An analysis of 101 consecutive cases, *Medicine*, 1988, 67: 132-143.

Laan R, Van Riel, Vande Putte et al: Low dose prednisone induces rapid reversible axial bone loss in patients with rheumatoid arthritis, *Ann Intern Med*, 1993, 119, 963-968.

Lake J.R., Wright T.L.: Liver transplantation for patients with hepatitis B: what have we learned from our results, *Hepatology*, 1991, 13: 796.

Lomonte C, Antonelli M; Cazzato F,Basile et al: Are low levels of 25-OH vitamin D a major risk factor for hyperparathyroidism independent of calcitriol in renal transplant patients, J of Nephrology, 2005, 18: 96-101.

Landman J.O., Hamdy N.A., Pauwels E.K., Papapoulos S.E.: Skeletal metabolism in patients with osteoporosis after discontinuation of long term treatment with oral pamidronate, J. Clin. Endocrinol. Metab., 1995, 80: 3465-3468.

Leblanc A.D., Schneider V.S., Harlan J.E. et al.: Bone mineral loss and recovery after 17 weeks of bed rest, J. Bone Miner. Res., 1990, 5: 843-850.

Li B., Sehajpal P.K., Khanna A. et al.: Differential regulation of transforming growth factor beta and interleukin 2 genes in human T cells; demonstration by usage of a novel competitor DNA construct in the quantitative polymerase chain reaction, J. Exp. Med., 1991, 174: 1259-1262.

Linke R, Hampl H, Lobeck H, et al.: Lysine-specific cleavage of B₂-microglobuline in amyloid deposits associated with hemodialysis, . Kidney Int, 1989, 36 :675-681.

Llach F.: Parathyroidectomy in chronic renal failure: Indications, surgical approach and the use of calcitriol,.Kidney Int, ,1990, 38: 62-68.

Lopez M.B., Gonzales Pinto I., Hawkins F.G., Valero M.A., Leon M., Loinaz C., Garcia I., Gomez R.: Effect of liver transplantation and immunosuppressive treatment on bone mineral density, *Transplant. Proc.*, 1992, 24: 3044-3046.

Lorentzon M., Lorentzon R. et al.: Calcium sensing receptor gene polymorphism, circulating calcium concentration and bone mineral density in healthy adolescent girls, *Eur J Endocrinol*, 2001, 144: 257-261.

Lukert B.P., Raisz L.G.: Glucocorticoid induced osteoporosis: pathogenesis and management, *Ann. Intern. Med.*, 1990, 112: 352-364.

Maalouf MN., Shane e., Osteoporosis following solid organ transplantation, *J of Clin Endocrin & Met.* 2004.

Macey L, Kana S, Jingushy S, Terek R, Borretos D, Borlander ME: Defects of early fracture-healing in experimental diabetes: *J Bone J Surg (am)*, 1989, 71-A :722 733.

Maddrey W.C.: Bone disease in patients with primary biliary cirrhosis, *Prog. Liver Dis.*, 1990, 9: 537-554.

Mann G., Jacobs T., Buchinsly F., Armstrong E.C., Li M., Ke H., Ma Y., Jee W., Epstein S.: Interferon- γ causes loss of bone volume in vivo and fails to ameliorate cyclosporine A induced osteopenia, *Endocrinology*, 1994, 135: 1077-1083.

Martin T., Suva L. .Parathyroid-hormone related protein in hypercalcemia of malignancy. Clin Endocrinol (Oxf) 31 :631-647.1989

Massai P., G.Garay, M.Ulla,: Bone Mineral Content in Cyclosporine - Treated Renal Transplant Patients, Transplantation Proceedings, 1994, Vol 26, No 5,: 2646-2648.

Matloff D.S., Kaplan M.M., Neer R.M. et al., Osteoporosis in primary biliary cirrhosis. Effects of 25-hydroxyvitamin D3 treatment, Gastroenterology, 1982, 83: 97-102.

Mazanec D.J., Grisanti J.M.: Drug-induced osteoporosis, Cleve Clin. J. Med., 1989, 56: 297-303.

Mazzaferro S, Diacinti D, Proietti E, Pisani D et al, Morphometric X-ray absorptiometry in the assessment of vertebral fractures in renal transplant patients, Nephrol Dial Transplant, 2005.

McCaughan G.W., Feller R.B., Osteoporosis in chronic liver disease: pathogenesis, risk factors and management, Dig. Dis., 1994, 12: 223-231.

McDonald J.A., Dunstan C.R., Dilworth P., Sherbon K., Ross Sheil A.G., Evans R.A., McCaughan G.W.: Bone loss after liver transplantation, Hepatology, 1991, 14: 613-619.

Melton L.J., Eddy D.M., Johnston C.C.Jr.: Screening for osteoporosis, *Ann. Intern. Med.*, 1990, 112: 516-528.

Meys E., Fontanges E., Fourcade N., Thomasson A., Pouyet M., Delmas P.: Bone loss after orthotopic liver transplantation, *Am. J. Med.*, 1994, 97: 445-50.

Miedlich S., Lamesch P. et al.: Frequency of the calcium-sensing receptor variant A986S in patients with primary hyperparathyroidism, *Eur J Endocrinol*, 2002, 145: 421-427.

Mitchison H.C., Neuberger J.M.: Medical complications of liver transplantation, *Dig. Dis.*, 1993, 11: 78-101.

Mitlak L., Alpert, C., Delmonico, R., Neer: Parathyroid Function in Normocalcemic Renal Transplant Recipients: Evaluation By Calcium Infusion, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol.72.

Mo X.Y., Zhang Y.Y. et al.: A986S polymorphism of calcium-sensing receptor is not related to bone mineral density or bone size in premenopausal chinese women, *Di Yi jun Da Xue Xue Bao*, 2004, 24: 1097-1101, 1122.

Movsowitz C., Epstein S., Fallon M., Ismail F., Thomas S.: Cyclosporine A in vivo produces severe osteopenia in the rat: effect of dose and duration of administration, *Endocrinology*, 1988, 123: 2571-2577.

Movsowitz C., Schlosberg M., Epstein S., Ismail F., Fallon M., Thomas S.: Combined treatment with cyclosporin A and cortisone acetate minimizes the adverse bone effects of either agent alone, J. Orthop. Res., 1990, 8: 635-641.

Munoz SJ., Deems R.O., Moritz M.J. et al.: Hyperlipidaemia and obesity after orthotopic liver transplantation, Transplant. Proc., 1991, 23: 1480-1483.

Nacher M., Aubia J., Serrano S. et al., Effect of cyclosporine A on normal human osteoblasts in vitro, Bone and Mineral, 1994, 26: 231-243.

Nan JH, Moon JI, Chung SS et al: Prevalence and risk factors for vertebral fractures in renal transplants, Trans. Proceed, 2000, 1877.

Nalesnik M.A., Makowka L., Starzl T.E.: The diagnosis and treatment of post transplant lymphoproliferative disorders, Curr. Prob. Surg., 1988, 25: 371-472.

National Kidney Foundation (K-DOQI): Clinical practice guidelines for bone metabolism and disease, *Ann N Y Acad Sci*, 2003, 1007 (suppl 3): S7-201.

Nisbeth U., E.Lind, S. Junghall, U.Backmann, B. Fellstroem
Fracture Frequency After Kidney Transplantation

In NITp, Nord Italia Transplant, Report 1994.

Noel H, Zingraff J, Bardin T, et al :Tissue distribution of dialysis amyloidosis, Clin Nephrol, 1987, 27 :17S-178.

Nordal K., E.Dahl, J.Halse, L.Aksnes, Y.Thomassen, A.Flatmark
Aluminium Metabolism and Bone Histology after Kidney Transplantation A One - Year Follow - Up Study, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 1994, Vol.74, No.11.

Okazaki R., Riggs B.I., Conover C.A.: Glucocorticoid regulations of insulin-like growth factor binding protein expression in normal human osteoblast-like cells, Endocrinology, 1994, 134: 126-132.

Orcel P., Bielakoff J., Modrowski D. et al.: Cyclosporin A induces in vivo inhibition of resorption and stimulation of formation in rat bone, J. Bone Miner. Res., 1989, 4: 387-391.

Orcel P., Denne M.A., De Vemejoul M.C.: Cyclosporin A in vitro decreases bone resorption, osteoclast formation and fusion of cells of the monocyte-macrophage lineage, Endocrinology, 1991, 128: 1638 1646.

Passeri G., Bellido T., Girasole G., Tkaczyk A., Manolagas S.C., Jilka R.L.: Trasforming growth factor beta (TGF β) and interleukin 1 (IL 1) induce the interleukin 11 (IL 11) mRNA in both bone-marrow-derived stromal cells and osteoblasts from humans, (abs), J. Bone Miner. Res., 1993, 8, suppl. 1: S 163.

Passeri G., Girasole G., Jilka R.L., Manolagas S.C.: Increased IL 6 production by murine bone marrow and bone cells following estrogen withdrawal, *Endocrinology*, 1993, 133: 822-828.

Passeri G., Girasole G., Manolagas S.C., Jilka R.L.: Endogenous production of tumor necrosis factor by primary cultures of murine calvarial cells; influence on IL 6 production and osteoclast development, *Bone Miner.*, 1994, 24: 109-126.

Passeri G., Dalle Carbonare L., Giannini S., Musacchio E., Crepaldi G., Sartori L.: Effects of Cyclosporin A on osteoblasts and progenitors from murine bone marrow *Osteoporosis Int.*, 1996.

Paya C.V., Hermans P.E., Washington J.A. et al.: Incidence, distribution and outcome of episodes of infection in 100 orthotopic liver transplantations, *Mayo Clin. Proc.*, 1989, 64: 555-564.

Parfitt A : Are bone problems of dialysis patients always resolved by renal trasplantation ? Zackson CPC series: Cases in metabolic Bone Disease .NY, Education in Practise. 1986

Pavan S., Giannini S, Sella S., Zordan S et al: Iperparatiroidismo secondario persistente dopo trapianto di rene e ruolo causale dell'ipovitaminosi D, Abstract SIOMMMS, 2005.

Pearce S.H.S., Williamson C. et al.: A familial syndrome of hypocalcemia with hypercalciuria due to mutation in the

calcium-sensing receptor, New Engl J Med, 1996, 335: 1115-1122.

Penn I.: Cancers complication organ transplantation, N. Engl. J. Med., 1990, 323: 1767-1769.

Pichler R., N.Franceschini, B.Young, C.Hugo, T.Andoh, E.Bwrdmann, C.Alpers, W.Bennett, W.Couser, R.Johnson: Pathogenesis of Cyclosporine Nephropathy: Roles of Angiotensin 11 and Osteopontin Bone Mineral Density After Kidney Transplantation

Pietschmann P., A.Vychytil, W.Woloszczuk, J.Kovarik Nephron 1991; 59: 533-536. Bone Metabolism in Patients with Functioning Kidney Grafts: Increased Serum Levels of Osteocalcin and Parathyroid Hormone Despite Normalisation of Kidney Function

Piraino B., Carpenter B., Puschett J: Resolution of hypercalcemia and aluminium bone disease after renal transplantation, Am J Med, 1988, 85: 728-730.

Pollak M.R., Brown E.M. et al.: Mutation in the human calcium-sensing receptor gene cause familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism, Cell,1993: 1237-1239.

Porayko M.K., Wiesner R.H., Hay J.E., Krom R.A.F., Dickson E.R., Beaver J., Schwerman L.: Bone disease in liver transplant

recipients: Incidence, timing and risk factors, *Transplant. Proc.*, 1991, 23: 1462-1465.

Prince R.L., Dick I., Devine A., Price R.I., Guttendge D.H., Ke~D., Criddle A., Garcia-Webb P., St. John A.: The effects of menopause and age on calcitropic hormones: a cross-sectional study of 655 healthy women aged 35 to 90, *J. Bone Miner. Res.*, 1995, 10: 835-842.

Prummel M.F., Wiersinga W.M., Lips P., Sanders G.T.P., Sauewein H.P.: The course of biochemical parameters of bone turnover during treatment with corticosteroids, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1991, 72: 382-386.

Rabinovitz M., Shapiro J., Lian J., Block G.D., Merckel I.S., Van Thiel D.H.: Vitamin D and osteocalcin levels in liver transplant recipients: Is osteocalcin a reliable marker of bone turnover in such cases?, *J. Hepatol.*, 1992, 16: 50-55.

Reinhardt W, Bartelworth H., Wagner K., Heeman UV et al, Sequential changes of biochemical bone parameter after kidney transplantation, *Nephrol Dial Transplant*, 1998, 13: 436-442.

Riccardi D., Park J.I., Lee W.S. et al., Cloning and functional expression of a rat kidney extracellular calcium/polyvalent cation-sensing receptor, *Proc Natl Acad Sci*, 1995, 92: 131-135.

Rivas C., Silverberg S.J., Kim T., Shane E.: Osteopenia in cardiac transplant recipients, (abs), J. Bone Miner. Res., 1991, 6, suppl 1: T 93.

Saito J., J.Davis, Ds Wasnich, P.Ross,: Users of Low Dose Glucocorticoids Have Increased Bone Loss Rates: A Longitudinal Study, Calcified Tissue International, 1995,57:115-119.

Sartori L., Boschiero L., Bonato P., Pizzardini M., Giannini S.: Bone loss in kidney-transplanted patients, (abs), J. Bone Miner. Res., 1995, 10, suppl. 1: S 473, 105.

Scillitani A., Garnieri V et al. : Blood ionized calcium is associated with clustered polymorphism in the carboxyl-terminal tail of the calcium sensing receptor, J Clin endocrinol Metab, 2004, 89: 5634-5638.

Scillitani A., Garnieri V et al. : Primary Hyperparathyroidism and the presence of kidney stones are associated with different haplotypes of the calcium sensing receptor, J Clin endocrinol Metab, 2007, 92: 277-283.

Searnann E., P.Miach, M.Cooper, J.McKay, J.Dawborn,: The Effect of Renal transplantation on Bone Mass, Transplantation Proceedings, 1989, Vol 21, No 1, 2159-2169.

Sherlock S., Dooley J.: Liver transplantation, in Diseases of the liver and biliary system, Blackwell Scientific Publications Limited, Oxford, ed., versione italiana, 1994, 35: 513-528.

Sirchia G., Mascaretti L.: Il trapianto di organi in Italia: organizzazione, attività, prospettive, Notizie Brevi dal Policlinico di Milano, 1996, 1: I VIII.

Sitges-Serra A. Caralps-Riera A: Hyperparathyroidism associated with renal disease. Pathogenesis, natural history, and surgical treatment,. Surg Clin North Am, 67 :359-378

Slootweg M.C.: Growth hormone and bone, Horm. Metab. Res., 1993, 25: 335-343.

Smith A., Faugre M., Abreo K. Etal.: Aluminium associated bone disease in mild and advanced renal failure: Evidence for high prevalence and morbidity and studies on etiology and diagnosis,. Am J Nephrol, 1986, 6 :275-283,

Stein B., B.Halloran, T. Reinhardt, G.Engstrom, C.Bales, M.Drezner, K.Currie, M.Takizawa, J.Adams, S.Epstein: Cyclosporine A Increased Synthesis of 1,25 Dihydroxyvitamin D3 in the Rat and Mouse, Endocrinology, 1991, Vol 128, No3.

Stewart B.J., Green O.C., Stern P.H.: Cyclosporine A inhibits calcemic hormone-induced bone resorption in vitro, J. Bone Miner. Res., 1986, 1: 285-291.

Takacs I., Speer G. et al.: Lack of association between calcium-sensing receptor gene A986S polymorphism and bone mineral density in Hungarian postmenopausal women, *Bone*, 2002, 30: 849-852.

Tashjian A.H., Voelker E.F., Lazaro M., Singer F.R., Roberts A.B., Derynck R, Winkler M.E., Levine L.: α and β human transforming growth factors stimulate prostaglandin production and bone resorption in cultured mouse calvaria, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1985, 82: 4535

Teitelbaum S.L.: Skeletal growth and development, in *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, American Society for Bone and Mineral Research Society Office, Favus M.J. (ed), Kelseyville, California, 1990, 2: 7-11.

Termine J.D.: Non-collagen proteins in bone, in *Cell and Molecular biology of Vertebrate Hard Tissues*, Ciba, Foundation Symposium 136, Evered D., Harnett S. (eds), John Wiley and Sons, Chichester, 1988, 178-190.

Todo S., Fung J.J., Tzakis A. et al.: One hundred ten consecutive primary orthotopic liver transplants under FK506 in adults, *Transplant. Proc.*, 1991, 23: 1397-1402.

Torres A, Rodriguez A., Garcia S, Machado M, De Bonis E,, Losada M, lorenzo V, Parathyroid function in long term renal

transplant patients: importance of pre-transplant PTH concentration, *Nephrol Dial Transplant*, 13 (suppl 3):94-97.

Van Hoek B., Wiesner R.H., Ludwig J., Paya C.: Recurrence of ductopenic rejection in liver allografts after retransplantation for vanishing bile duct syndrome, *Transplant. Proc.* 1991, 23: 1442-1443.

Van Staaen J., E.Sanders, M.Prummel, G.Sanders: Bone Alkaline phosphatase as Indicator of Bone Formation, *Clinica Chimica Acta*, 1991, 201 27-34.

Van Thiel D.H., Dindzans V.J., Gavalier J.S. and Tarter R.E.: The postoperative problems and management of the liver transplant recipient, in *Progress in liver diseases*, vol. 9, Popper H., Schaffner F. (eds.), Philadelphia, 1990, 37: 657-685.

Valero M., Loinatz C., L.Larrodera, M.Leon, E.Morreno, F.Hawkins: Calcitonin and Bisphosphonates Treatment in Bone Loss After Liver Transplantation, *Calcified Tissue International* 1995, 57:1 5-19

Vautour LM, MeltonLJ 3rd, Clarke BL et al, Long term fracture risk following renal transplantation: a population- based study. *Osteoporosis Int*, 2004, 15: 160-167.

Vezzoli G., Tanini A. et al.: Influence of calcium sensing receptor gene on urinary calcium excretion in stone-former patients, *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13: 2517-2523.

Watson R.G.P., Coulton L., Kanis J.A., Lombard M., Williams R., Neuberger J., Elias E.: Circulating osteocalcin in primary biliary cirrhosis following liver transplantation and during treatment with cyclosporin, *J. Hepatol*, 1990, 11: 354-358.

Whitfield J.B., Martin N.G.: The effects of inheritance on constituents of plasma: a twin study on some biochemical variables, *Ann Clin Biochem*, 1984, 21: 176-183.

Withold W., S.Degenhard, M.Heins, B.Garbensee, H.Reinauer
Monitoring of Bone Resorption after Renal Transplantation by
Measuring the Urinary Excretion of Pyridium Cross – Links, *Eur J Chem Clin Biochem*, 1995, 33 :15-21.

Wolpaw T., C.Deal, S. Fleming Brooks, M. Bartucci, J.Schulak, D.Hricik: Factors Influencing Vertebral Bone Density After Renal Transplantation, *Transplantation*, 1994, Vol.58, 1186-1189, No.11

Yamaguchi T., Chattopadhyay N. et al.: Expression of extracellular calcium sensing receptor in human osteoblastic MG-63 cell line, *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001, 280: C382-393.

Yamauchi M., et al.: Association of polymorphic alleles of the calcium sensing receptor gene with the clinical severity of primary hyperparathyroidism, *Clinic Endocrinol*, 2001, 55: 373-379.

Yano S., Sugimoto T. et al.: Association of polymorphic alleles of the calcium sensing receptor gene with parathyroid hormone secretion in hemodialysis patients, *Nephron*, 85: 317-323.

Zingraff J, Druke T.: Can the nephrologist prevent dialysis related amyloidosis ? ,*Am J Kidney Dis*, 1991,18 :1 – 11.

Zingraff J, Noel H, Bardin T. et al : β 2-microglobuline amyloidosis: A sternoclavicular joint biopsy study in hemodialysis patients, *Clin Nephrol*, 1990, 33 :94-97.

Zingraff J, Noel H, Bardin T, et al: β 2-microglobuline amyloidosis as a complication of chronic renal failure: A biopsy proven case, *N Engl J Med*, 1990, 323 :1070-1071

Zitelli B.J., Gartner J.C., Malatack J.J. et al.: Pediatric liver transplantation: Patient evaluation and selection infectious complications and life style after transplantation, *Transplant. Proc.*, 1987, 19: 3309-3316.