



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE
CLINICHE E SPERIMENTALI

INDIRIZZO FISIOPATOLOGIA CLINICA

CICLO XXIII°

**STUDIO OSSERVAZIONALE CROSS-SECTIONAL
VOLTO A VALUTARE LO STATUS DELLA VITAMINA
K E DEL SUO POTENZIALE RUOLO NELL'AMBITO
DELLE FRATTURE VERTEBRALI E DELLE
CALCIFICAZIONI VASCOLARI NEL DIALIZZATO
(*STUDIO KAPPA*)**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Aldo Baritussio

Supervisore: Ch.mo Prof.ssa Elena Ossi

Co Supervisore: Ch.mo Prof.ssa Angela D'Angelo

Dottoranda : Dott.ssa Maria Fusaro



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE
CLINICHE E SPERIMENTALI

INDIRIZZO FISIOPATOLOGIA CLINICA

CICLO XXIII°

**STUDIO OSSERVAZIONALE CROSS-SECTIONAL
VOLTO A VALUTARE LO STATUS DELLA VITAMINA
K E DEL SUO POTENZIALE RUOLO NELL'AMBITO
DELLE FRATTURE VERTEBRALI E DELLE
CALCIFICAZIONI VASCOLARI NEL DIALIZZATO
(STUDIO KAPPA)**

*Al mio Meraviglioso Papà Dante
a cui devo Tutto nella mia vita
con Tutto il mio Amore*

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Aldo Baritussio

Supervisore: Ch.mo Prof.ssa Elena Ossi

Co Supervisore: Ch.mo Prof.ssa Angela D'Angelo

Dottoranda : Dott.ssa Maria Fusaro

INDICE

RIASSUNTO	pag. 1
ABSTRACT	pag. 4
INTRODUZIONE	pag. 7
SCOPO	pag. 19
MATERIALI E METODI	pag. 20
RISULTATI	pag. 24
DISCUSSIONE	pag. 36
CONCLUSIONI	pag. 39
BIBLIOGRAFIA	pag. 41
APPENDICE 1	pag 48
APPENDICE 2	pag 59

RIASSUNTO

Premessa

La vitamina Kappa (K), intesa K1 o Fillochinone (PK) e K2 o Menachinone (MK), è coinvolta nella produzione non solo delle proteine della coagulazione ma anche nella produzione di proteine GLA dell'osso e della matrice che regolano la mineralizzazione ossea e le Calcificazioni Vascolari (CV). Studi in letteratura suggeriscono che basse concentrazioni di Vitamina K sono associate con aumentato rischio di fratture e calcificazioni vascolari. I pazienti (pz) in emodialisi (HD) sono ad alto rischio di tali complicanze. Noi abbiamo condotto uno studio osservazionale volto a valutare la Prevalenza del Deficit di Vitamina K e la associazione tra lo Status della Vitamina K, le Fratture Vertebrali (FV) e le CV nei pz in HD.

Materiali e Metodi

Studio Osservazionale Multicentrico in 387 pz in HD, 18 centri dialisi tra il nord e centro Italia. Abbiamo misurato i livelli di: vitamina K (PK, MK4, MK5, MK6 e MK7) (in High-performance liquid chromatography, *HPLC*), Osteocalcina o Bone GLA Protein (BGP), Matrix GLA Protein (MGP) e altri biomarkers di routine. Un gruppo di soggetti sani (comparabile per età e sesso) è stato usato come controllo.

La valutazione delle FV e delle CV era centralizzata e a doppio cieco. Le FV erano valutate mediante analisi computerizzata scannerizzando la Radiografia della Colonna vertebrale in L-L (T5-L4). Era considerata FV una riduzione dell'altezza del corpo vertebrale >20%. La severità della FV era stimata in Lieve, Moderata e Severa (rispettivamente riduzione del: 20-25%, 25-40% e > 40%).

Valutammo le CV con il metodo di Witteman (Lancet,1994). La CV era misurata dalla lunghezza del deposito calcifico lungo la parete dell'Aorta Addominale (Lieve 0.1-5cm, moderato 5.1- 10cm e severa > 10cm). Valutammo anche la presenza o assenza della calcificazione delle Arterie Iliache nella medesima Radiografia.

Avevamo un gruppo di controllo di soggetti affetti da Osteoporosi Primitiva (comparabile per età e sesso).

Ogni differenza era risolta dal consensus.

Risultati

I pazienti in dialisi cronica presentavano importanti deficit di Vitamina K (rispetto ai controlli sani): MK7 35.4%, PK 23.5% and MK4 14.5%.

Abbiamo inoltre trovato che il 55.3% dei pazienti dializzati avevano FV. La prevalenza delle CV aortica era dell'80.6% (Lieve 20.1%, Moderata 30.8% e Severa 29.7%) e quella delle arterie iliache era del 56.1% .

La deficienza di PK è risultata essere il più forte predittore di FV (OR 2.94, 95% IC, 1.61-6.26),.

Il deficit di MK4 era predittore di CV Aortica (OR 2.82, 95% IC, 1.14- 7.01) , mentre un Deficit di MK5 aveva azione protettiva (OR 0.38, 95%IC, 0.15-0.95).

Il deficit di MK7 era -redittore di Calcificazioni de33e arter5e Iliache (OR 1.64 95%CI 1.03-2.60).

La presenza di FV era un -redittore di CV (OR 1.76 95%CI 1.00-3.08).

Conclusioni

Questo studio, basato su una importante casistica di pazienti in dialisi del Nord e Centro Italia dimostra che un'importante frazione di tali pazienti è carente di vitamina K e che tale stato carenziale è correlato a complicanze di estremo interesse clinico, quali le FV e le CV. Su tale base si ritiene che ai pazienti con malattia renale cronica, assieme all'intake di Calcio e Vitamina D, si dovrebbe raccomandare l'assunzione di un adeguato introito di vitamina K (PK e MK) al fine di realizzare una corretta Calcificazione dell'osso ed evitando in questo modo di causare il danno della CV.

Studi aggiuntivi dovrebbero essere effettuati per investigare il Ruolo della Vitamina K nelle Fratture Ossee e nelle CV anche nella popolazione generale.

RINGRAZIAMENTI agli Investigatori dello Studio Kappa:

MT Vilei, MC Tineo, M. Rebeschini, A. Naso (Padua), C. Grimaldi, A. Mannarino (Florence), D. Ciurlino, S. Bertoli (Sesto San Giovanni, Milan), R. Puggia, A. Caberlotto, S. Mastrosimone, C. Cascone (Treviso), R. Corradini, M. Avolio, B. Giacon (Bolzano), A. Foschi, C. Barbieri, F. Milanese (Voghera), A. Pica, C. Venturelli, G. Brunori (Trento), T. Pati, A. Gemelli, A.M. Bernardi (Rovigo), F. Barbisoni, A. Elli (Lodi), P. Morachiello, M. Feriani (Mestre), F. Stoppa (Adria), G. Tarroni, E. De Paoli Vitali (Belluno), S. Lucatello, G. Meneghel (Dolo), A. Vianello, F. Antonucci (Feltre, Belluno), V. Pellanda, R. Dell'Aquila (Bassano del Grappa), A. Ferraro, M. De Luca (Castelfranco Veneto, Padua), F.M. Magonara, M. Axia (Schio), M. Spinello, M. Urso (Chioggia, Venice)

ABSTRACT

Background

Vitamin K, vitamin K1 or Phylloquinone (PK) and vitamin K2 or Menaquinone (MK), is involved not only in the production of coagulation proteins, but also in the production of bone and matrix Gla proteins regulating bone and vascular calcification. Studies suggest that low vitamin K concentrations are associated with increase in the risk of fractures and vascular calcification. Hemodialysis (HD) patients are at high risk of these complications. We carried out a cross-sectional study to establish the prevalence of vitamin K deficiency and to assess the relationship between vitamin K status, vertebral fractures (VF) and vascular calcification (VC) in HD patients.

Materials and Methods

Multicenter, cross-sectional study in 387 HD patients, 18 hospital based dialysis centers in Northern and Middle Italy. We assessed plasma levels: Vitamin K (PK, MK4, MK5, MK6 e MK7), (in High-performance liquid chromatography, *HPLC*), Osteocalcin o Bone GLA Protein (BGP), Matrix GLA Protein (MGP) and other routine biomarkers. We had a Healthy Control Group (comparable for age and sex). VF and VC assessment was centralized and double blind. We evaluated VF with a computerized analysis, of scanned L-L vertebral X-rays (D4 to L5). A reduction of > 20% of vertebral body height was considered VF. The severity of the vertebral fractures was estimated as Mild, Moderate or Severe (reduction: 20–25%, 25–40% or >40%, respectively).

We evaluated VC with Witteman's method (Lancet, 1994). VC was quantified by measuring the length of calcific deposits along the wall of the Abdominal Aorta (Mild 0.1-5 cm, Moderate 5.1-10 cm and Severe >10 cm). We also evaluated the presence or absence of calcifications of the Iliac Arteries in the same radiograph.

We had a Patient's Control Group with Primary Osteoporosis (comparable for age and sex).

Any differences were resolved by consensus.

Results

Important proportions of patients had deficiency of vitamin K2 component MK7 (35.4%), vitamin K1 (23.5%) and MK4 (14.5%). Biomarkers were: Ca 9.15 ± 0.68 mg/dl, P 4.8 ± 1.28 mg/dl, median ALP 83 U/L, median PTH 244, median 25(OH)D 28.9 ng/ml, median BGP 175 mcg/L, median ucBGP 10.95 mcg/L, median MGP 19.36 nmol/L, median PCR 1.6 mg/L.

We found that 55.3% of patients had VF. Prevalence of VC was 80.6% (Mild 20.1%, Moderate 30.8%, Severe 29.7%) in the Aorta and 56.1% in the Iliac Arteries.

Vitamin K1 deficiency was the strongest predictor of VF (OR 2.94 95%CI 1.38-6.26).

Vitamin K2 component MK4 deficiency was a predictor of Aortic Calcification (OR 2.82 95%CI 1.14-7.01), whereas MK5 deficiency actually protected against it (OR 0.38 95%CI 0.15-0.95). MK7 deficiency was a predictor of Iliac Calcification (OR 1.64 95%CI 1.03-2.60).

The presence of VF was a predictor of VC (OR 1.76 95%CI 1.00-3.08).

Conclusions

This multicenter study, based on a significant dialysis population in the North and Middle Italy shows a relevant Vitamin K deficiency related to clinical important complications such as VF and VC. We believe that in dialysis patients an adequate intake of vitamin K should be recommended together to the Calcium and Vitamin D Intake in CKD patients to promote correct Bone calcification and avoiding in this way to cause harmful VC.

Additional studies should be performed to investigate the role of vitamin K in bone fractures and in vascular calcification in the general population.

I. INTRODUZIONE

1. Vitamina K: Generalità

Nel 1926 fu scoperta da Dam una sindrome emorragica causata dalla carenza di un fattore vitaminico, chiamato K (da Koagulation) e allora ancora ignoto. Nel 1939 Doisy e Dam annunciarono l'isolamento della Vitamina da sorgenti vegetali: *Vitamina K1 o Fillochinone (PK)*. Successivamente Dam descrisse il fattore vitaminico nel pesce putrefatto e per distinguerlo da quello di origine vegetale lo chiamò *Vitamina K2 o Menachinone (MK)*. Per queste scoperte fu conferito loro nel 1943 il Premio Nobel.

I composti che posseggono una attività vitaminica K sono caratterizzati dalla presenza del gruppo 2-metil-1,4 naftochinone. In posizione 3 è presente una catena laterale, insatura e a configurazione trans, la quale differenzia la Vitamina K1 dalla K2. Il PK possiede una catena laterale di fitile: 4 residui di Isoprenoidi di cui uno insaturo; il MK ha una catena laterale formata da un numero variabile di unità isoprenoidi insature (MK_n). Il menachinone senza la catena laterale (MK-0), è chiamato Menadione o Vitamina K3 (forma sintetica, la quale può essere convertita in MK4 dal fegato) (1,2).

(Fig 1)

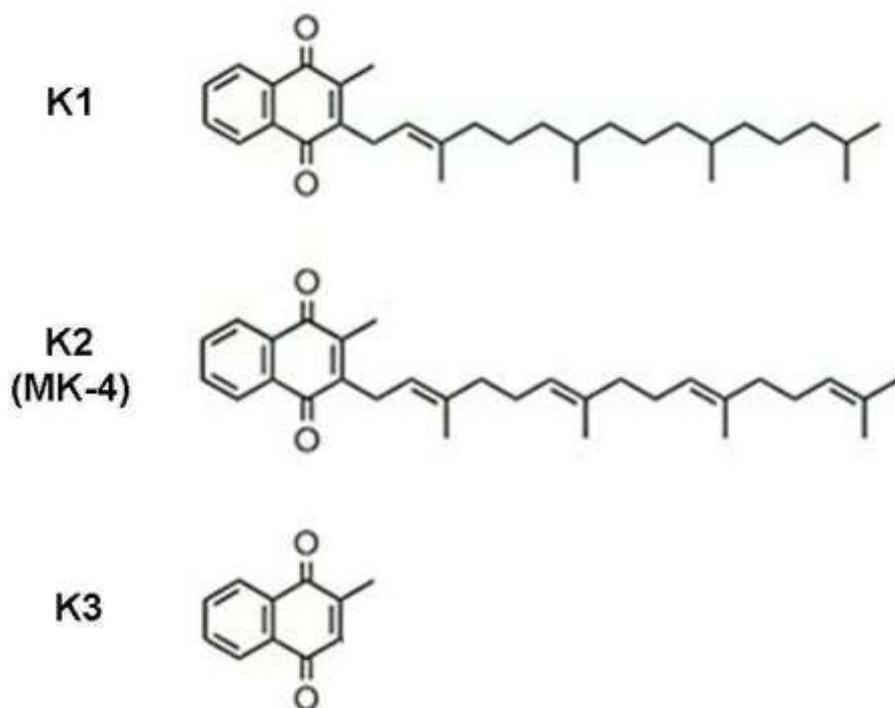


Fig. 1 Le tre forme della Vitamina K. La vitamina K1 (fillochinone o fitonadione) è prodotta dalle piante, ed è la principale risorsa con la dieta di vitamina K. Con vitamina K2 (menachinone, MK) si intende un gruppo di composti, i menachinoni. La catena laterale della vitamina K2 può avere una lunghezza variabile, con un numero altrettanto variabile di unità isoprenoidi (MK-n). In Figura è rappresentato il MK4. La vitamina K3 (menadione), una forma sintetica di vitamina K1, ha lo stesso anello di naftochinone come K1 and K2, ma è privo della catena laterale.

Le Fonti della Vitamina K si differenziano a seconda se si considera la vitamina K1 e la vitamina K2, in particolare: il PK costituisce la forma più presente nella dieta, in particolare è presente nei vegetali ricchi di foglia verde (es: spinaci, cavolo, verza, cavolini di Bruxelles) e in alcuni frutti (es. avocado e kiwi) (2,3); mentre il MK è relativamente raro nella dieta del mondo occidentale. Le sorgenti alimentari del MK sono rappresentate da cibi fermentati come per esempio: burro, formaggio cagliato; inoltre il fegato bovino, pollo (petto e fegatini), tuorlo d'uovo e il natto (tipico cibo della colazione giapponese: fagioli di soia fatti fermentare dal batterio gram positivo, *Bacillus subtilis natto*; ricco di MK7 e in minor misura di MK6). I MK più comuni contenuti nei cibi sono quelli che hanno 7, 8 e 9 unità isoprenoidi (rispettivamente isomeri MK7, MK8 e MK9). Una quota di K2 è prodotta anche dalla flora batterica intestinale, in particolar modo dall'*Escherichia Coli* (2,3). L' MK4 sembra essere sintetizzato a partire dal PK (4).

Come per le altre Vitamine Liposolubili l'assorbimento della Vitamina K dipende dalla corretta funzione pancreatica e dalla presenza dei sali biliari e di grassi. Il PK viene assorbito nell'intestino tenue attraverso un meccanismo saturabile energia dipendente; mentre il MK, viene assorbito nel colon attraverso un meccanismo di diffusione passiva. Dopo l'assorbimento la Vitamina K entra a far parte dei Chilomicroni ed è trasportata al Fegato (dopo interazione con l'Apolipoproteina E), dove viene poi trasferita alle VLDL ed alle LDL che la trasportano ai Tessuti (l'MK4 viene trasportato anche dalle HDL). Kohlmeier M et al, hanno dimostrato che le concentrazioni di vitamina K sono fortemente influenzate dai polimorfismi delle Apolipoproteine E (genotipo ApoE2>Apo3>Apo4) (5-8). La Vitamina K è sottoposta a β ossidazione ed escreta con le urine come tale o coniugata con acido glucuronico. Sebbene la Vitamina K sia una

vitamina liposolubile, il corpo ne immagazzina scarse quantità e senza un'assunzione dietetica regolare le sue riserve vengono rapidamente esaurite. L'organismo, verosimilmente proprio per compensare la limitata capacità di conservare la Vitamina k, la ricicla attraverso un processo chiamato *Ciclo della Vitamina K* (Fig 2).

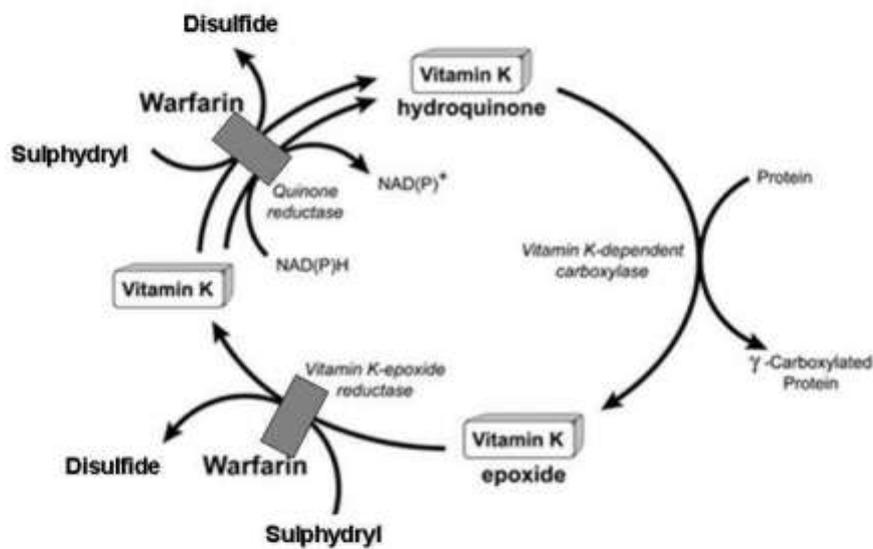


Fig.2 Ciclo della vitamina K e interferenza del warfarin con il ciclo della vitamina K

La Vitamina K è l'unica vitamina liposolubile ad agire da coenzima. La Forma coenzimatica della Vitamina K, che corrisponde alla forma attiva della Vitamina stessa, è l'Idrochinone (KH₂). Quest'ultimo è prodotto da una *Chinone Redattasi* a spese di NADPH (ossia la riduttasi dipendente da NADPH) (v Fig.2). L'enzima coinvolto è γ -Glutammi-carbossilasi (GGC). La reazione catalizzata è una reazione di

carbossilazione dei residui di Acido Glutammico (Glu) che si trasformano nell'acido γ -Carbossiglutammico (Gla). Questa reazione comporta l'ossidazione dell' KH_2 ad Epossido (KO) (Fig 2). Per restituire l' KH_2 , si avrà la riduzione dell'KO attraverso 2 reductasi: un'Epossido Redattasi (*Vitamin K Epoxide Reductase*: VKOR) che trasforma l'KO in Chinone; una *Chinone Redattasi* (*Vitamina K Quinone Reductase*, sembra diversa dalla Chinone Redattasi dipendente da NADPH) che trasforma il Chinone in KH_2 .

Il warfarin agisce come antagonista della Vitamina K inibendo 2 importanti reazioni del Ciclo della stessa a livello della Chinone Redattasi e dell'Epossido Redattasi, con conseguente carenza funzionale di Vitamina K (9) (Fig.2).

Quindi, il ciclo della Vitamina K permette in questo modo il recupero della stessa, riducendone la richiesta dietetica e di preservandola per l'importante funzione coenzimatica di carbossilazione necessaria per il funzionamento di alcune importanti proteine dell'organismo. In particolare la Vitamina K1, trasportata principalmente (ma non esclusivamente) al fegato, controlla la produzione epatica di diversi fattori della coagulazione (protrombina, Fattori VII, IX e X e le proteine C, M, S e Z). A livello extraepatico la Vitamina K2, controlla la produzione dell'Osteocalcina (o Bone Gla Protein, BGP) e della Matrix Gla Protein (MGP). In realtà il PK è distribuito in tutti i tessuti con livelli relativamente più alti nel fegato, cuore e pancreas, e livelli più bassi nel cervello, rene e polmone. L'MK4 viceversa ha livelli maggiori nel cervello e rene mentre uguali al PK nel pancreas (10).

Differenze in termini di bioattività tra Vitamina K1 e K2 risultano oltre che per la diversa distribuzione, anche per la diversa affinità nei confronti dell'enzima γ -

Glutammin-carbossilasi. Infatti i MK hanno una più alta affinità per quest'ultimo rispetto al PK, il che implica che per ottenere una pari attività dell'enzima per entrambe, le concentrazioni di MK debbono essere più basse (9).

Tra i vari isomeri della Vitamina K₂, la biodisponibilità dell'isomero MK 7 risulta essere di gran lunga la maggiore (ha un picco della concentrazione plasmatica a 4h e rimane in circolo per 72h) sia rispetto al PK (emivita di circa 1h) che rispetto all'MK4 (picco della concentrazione a 2h e rimane in circolo per circa 8h) (11).

L'introito giornaliero raccomandato nell'adulto è di 120µg per i maschi e di 90 µg nelle femmine (12).

2. Status della Vitamina K: *Deficit*

Le linee guide europee più recenti, riguardo allo status della Vitamina K nei pazienti dializzati, dicono che non c'è nessuna evidenza di carenza di vitamina K nella popolazione emodialitica se non in caso di antibioticoteraapia per lunghi periodi od in caso di alterazioni della coagulazione, giustificando solo in tali casi supplementazioni della stessa. Raccomandano inoltre un intake giornaliero di 90-120 µg di Vitamian K (non specificando se PK o MK) (13). Tali linee guida fanno riferimento ad un articolo del 1997, con un limitato numero di pazienti (68 emodializzati), in cui furono evidenziati bassi livelli di PK nei soggetti fratturati (14).

Nello studio Framingham, condotto sulla popolazione generale e basato su 672 partecipanti, si evidenziò un deficit di vitamina K (PK) sul 24% dei partecipanti usando un cut-off della vitamina K pari a 0.5 nmol/L (15). Questo studio, rende presumibile che nella popolazione dialitica il deficit di vitamina K possa avere una prevalenza più alta, pari circa al 30%, come riscontrato da Pilkey et al in 142 pazienti emodializzati, dove

ben il 29% dei pazineti presentava livelli di PK inferiori alla norma (cut-off 0.4nmol/L) (16).

3. Proteina Vitamina K-dipendente: *Matrix Gla Protein (MGP)*

Proteina GLA della Matrice (MGP: Matrix Gla-Protein), è una proteina composta da 84 aminoacidi, con peso molecolare 14kDa. Il gene dell'MGP è localizzato nel cromosoma 12p13 (17).

La MGP è prodotta dagli osteoclasti, dai condrociti e dalle cellule muscolari lisce della tonaca media (*Vascular Smooth Muscle Cell: VSMC*) (9). Contiene 5 residui di GLA (acido glutammico vitamina K dipendenti), che la rendono biologicamente attiva. I GLA hanno alta affinità per il Ca e l'idrossiapatite, ai quali si lega in corrispondenza dei residui 2, 37, 41, 47 e 52 (17).

Il meccanismo d'azione della MGP che porta alla inibizione delle calcificazioni vascolari non è ancora stato chiarito. Uno di questi meccanismi potrebbe essere il legame con una potente proteina osteoinduttiva e modularne l'attività, tale proteina è la BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein-2). La BMP2, fa parte della superfamiglia del TGF- β , è un potente fattore di crescita che trasforma cellule indifferenziate e sottopopolazioni di VSMC in simil cellule osteoblastiche (18). Di recente si è inoltre evidenziato che i livelli di MGP possono essere influenzati oltre che dalla reazione di carbossilazione anche da un'alterata fosforilazione. In particolare, vi sono tre residui di serina, in posizione 3, 6 e 9 della MGP, con 2 possibili stati di MGP fosforilata: una frazione extracellulare e una non fosforilata dentro alle vescicole della matrice o nei corpi apoptici implicando così che la MGP non fosforilata può predire uno stress locale delle VSMC (17).

Quando i livelli di Vitamina K risultano adeguatamente sufficienti nell'organismo si ha che tutta la MGP sintetizzata nelle VSMC, a livello della tonaca media, è attivata (carbossilata) ad inibire la calcificazione (non essendoci MGP decarbossilata, ucMGP, non si avrà il legame con l'idrossipatite della matrice e quindi assenza di nodo calcifico), adeguata clearance delle vescicole della matrice (vm) e dei corpi apoptotici (ca), mediante fagocitosi, ed immissione in circolo di MGP carbossilata (cMGP) (17). Nel caso in cui vi sia invece una deficienza di Vitamina K (per esempio dovuta ad un basso intake, all'uso di warfarin, a malattie: Insufficienza Renale, Diabete, Infiammazione), si avrà una ridotta clearance (fagocitosi) delle vm e dei ca, con incremento della MGP inattiva (ucMGP) che si legherà al calcio dell'idrossipatite della matrice stessa dando luogo alla calcificazione dei vasi (17, 19).

Una mutazione a carico del gene che codifica la MGP comporta la Sindrome di Keutel (20), trasmessa come carattere autosomico recessivo che si caratterizza clinicamente per la presenza di stenosi delle arterie polmonari, calcificazione diffusa delle cartilagini, dell'aorta, delle coronarie e delle arterie cerebrali, brachitelefalangismo e dismorfismi facciali (21).

Topi Knock-out per MGP $-/-$, presentano nei primi due mesi di vita fratture patologiche da osteoporosi grave e severe calcificazioni vascolari della media e muoiono per rottura dell'aorta (22,23).

Il problema delle Calcificazioni Vascolari (CV) nei pazienti con Insufficienza Renale Cronica (IRC) è di grande rilievo, poiché la prevalenza delle CV delle grosse arterie varia dal 30 al 70% (24), per arrivare nell'emodializzato addirittura a valori del 60-80% (25, 26).

La ucMGP sta assumendo sempre più il ruolo di verosimile biomarker delle CV. Cranenburg et al hanno misurato i livelli di ucMGP in soggetti sani e in diverse categorie di pazienti, tra cui gli emodializzati. I livelli di ucMGP erano nei pazienti inferiori rispetto ai soggetti sani; questo verosimilmente perché la ucMGP come già descritto, in caso di Deficit di Vitamina K, si localizza nelle sedi di lesione vascolare legandosi con il Ca dell'idrossipatite della matrice e rimanendo quindi incamerata nel nodulo calcifico (27,17). Questi dati sono stati recentemente confermati da un report preliminare di Schurgers LJ et al, in cui in pazienti con diversi stadi di IRC, i livelli di dp-ucMGP aumentavano con l'aumentare della estensione della calcificazioni aortiche (28).

4. Proteina Vitamina K-dipendente: *Osteocalcina o Bone Gla Protein (BGP)*

Osteocalcina o Proteina GLA dell'osso (BGP: Bone GLA-Protein), è una piccola proteina, prodotta dagli osteoblasti e odontoblasti (9, 29), sotto il controllo della vitamina D che ne regola anche l'espressione genica (30). E' composta da 49 aminoacidi, con peso molecolare di 58kDa e contenente 3 residui di GLA (Vitamina K dipendente), in posizione 17,21 e 24 che la rendono biologicamente attiva (carbossilata). In particolare, la carbossilazione dell'acido glutammico in posizione 17 verosimilmente risulta essere essenziale per la conformazione spaziale e strutturale della molecola, consentendone l'interazione con i cristalli di idrossipatite (31,32). Il gene Esp, che codifica la proteina Osteotesticular Protein Tyrosine Phosphatase (OST-PTP), è implicato nel processo di carbossilazione (33).

I livelli di BGP, sebbene siano aumentati nell'IRC causa ridotta clearance, riflettono il grado di formazione ossea infatti fisiologicamente i livelli di tale proteina Vitamina K-

dipendente aumentano fino a raggiungere un picco a 12 anni nelle Femmine e 15 anni nei Maschi, dopo di che diminuiscono fino all'età menopausale per aumentare causa verosimile aumentato turnover osseo (34,35). Topi geneticamente modificati per BGP, ossia che non esprimono tale proteina (Knock-out, BGP -/-), sviluppano iperostosi a conferma del suo ruolo nel promuovere la normale mineralizzazione dell'osso stessa (36). La vitamina K, oltre portare alla carbossilazione della BGP, sembra diminuire il riassorbimento osseo attraverso stimolazione della produzione di Osteoprotegerina (OPG) e inibizione dell'espressione del RANK Ligand (RANKL) (53).

Per quanto appena descritto, è deducibile che un deficit di Vitamina K in termini di impatto clinico porti, oltre ad un incremento delle CV per il diminuire dell' cMGP e aumento della quota di ucMGP , anche a un incremento della patologia fratturativa per il diminuire della cBGP attiva e aumento della quota ucBGP. La BGP in realtà, a livello di studi sperimentali, sembra avere delle implicazioni anche con l'evento vascolare (33).

La patologia Fratturativa nella popolazione con malattia renale cronica, è stata poco studiata dalla comunità scientifica nefrologica (38). Il primo vero studio sull'evento fratturativo consistente in termini di numerosità, riguardante pazienti in dialisi, seppur retrospettivo, è di Alem et al, e riguarda l'incidenza della frattura dell'anca, che risulta significativamente maggiore nella popolazione dialitica rispetto alla popolazione generale (39). Relativamente invece alle fratture vertebrali (FV) nei pazienti in dialisi, i dati in letteratura sono scarsi e inconsistenti. La prevalenza delle FV in dialisi, a differenza della frattura dell'anca, sembra essere sovrapponibile a quella della popolazione generale, situandosi tra il 20,9%-26,5% e tale dato è compatibile al fatto che l'osso della vertebra è di tipo prevalentemente trabecolare e mentre

nell'iperparatiroidismo secondario alla IRC la sede tipicamente colpita è l'osso corticale (40-43). Questo è verosimilmente dovuto ad una sottodiagnosi delle FV, sia nella popolazione generale e ancor più in quella dialitica. La FV, intesa come una deformazione del corpo vertebrale conseguente ad una riduzione delle sue altezze (altezza anteriore, media e posteriore: rispettivamente Deformità o FV a cuneo, biconcava e a crollo) (38, 44), può essere identificata in modo Semiquantitativo o Quantitativo. Nella prima metodica, l'identificazione della FV prevede la valutazione dei radiogrammi da parte di un radiologo esperto che con la sola valutazione visiva sappia identificare il tipo e il grado (lieve, riduzione del 20-25%; moderata, riduzione del 25-40%; severa, riduzione maggiore al 40%) di FV. Il metodo Semiquantitativo più utilizzato a livello internazionale è quello di Genant (45). Il metodo morfometrico Quantitativo invece, consiste nella misurazione delle singole altezze dei corpi vertebrali (da T5 a L4) attraverso lastra tradizionale: Morfometria Vertebrale Radiologica (46). La misurazione delle altezze di ciascun corpo vertebrale (da T5 a L4), può essere manuale o computerizzata (software *MorphoXpress* in passato, quello di ultima generazione *Spine Analyzer*) (47). La maggior parte degli studi di prevalenza prima citati fanno riferimento al metodo Semiquantitativo di Genant, e questo può giustificare la percentuale relativamente bassa rilevata in entrambe le popolazioni. Di recente, Arboleya L et al., in 289 donne in postmenopausa con Osteopenia ha rilevato una prevalenza di FV (prevalentemente Dorsali e a Cuneo) del 50% dopo valutazione morfometrica Quantitativa usando il *MorphoXpress*; prima di tale valutazione quantitativa la diagnosi di FV era stata del 7% (48).

Le FV sono dunque sotto diagnosticate e questo è un problema non solo per la stima corretta delle reali prevalenze delle stesse ma soprattutto per la prevenzione dell'evento

fratturativo in quanto tale, poiché, pur essendo asintomatiche il rischio di insorgenza a distanza di un anno è quintuplicato (49). Altro dato rilevante relativo alle FV è il fatto che si presentano in associazione alle CV, come dimostrato da Rodriguez-Garcia et al, in più studi nella popolazione dialitica; in particolare, nel più recente studio che coinvolgeva 193 pz in emodialisi (HD), seguiti per 2 anni, a seconda del calibro delle arterie calcificate considerate, si aveva un Rischio Relativo (OR) per FV di 3.8 nelle arterie calcificate a largo calibro (predominante nella tonaca media la componente elastica: aorta e iliache) e di 6.5 nelle arterie calcificate a medio calibro (predominante nella tonaca media la componente muscolare liscia: femorale, uterina/spermatICA e radiale). Nel medesimo studio, dopo i 2 anni di follow-up, le donne, ma non gli uomini, avevano una associazione positiva tra CV severe e mortalità dopo aggiustamento per età e durata dialisi (RR 3.2, p=0.036). Inoltre, sempre soltanto nella popolazione femminile, vi era una più alta mortalità tra le donne con FV, dopo aggiustamento per età, durata della dialisi e CV severe (RR 4.8, p=0.012) (50). Sia il dato dell'aumentata mortalità in chi ha FV che, l'associazione tra FV e CV è stato evidenziato anche nella popolazione generale (51,52).

II. SCOPO

Obiettivo primario

E' stato di valutare in un adeguato campione di pazienti in trattamento emodialitico la prevalenza del deficit di vitamina K , considerando un cut-off di 0,4 nmol/L (16).

Obiettivo secondario

Valutare il ruolo dello status della Vitamina K nell'ampio scenario delle alterazioni del Metabolismo Minerale Osseo nel paziente emodializzato, con particolare attenzione all'impatto clinico di quest'ultime in termini di Fratture Vertebrali (FV) e Calcificazioni Vascolari (CV).

III. MATERIALI E METODI

1. Popolazione oggetto dello studio

Si tratta di uno studio multicentrico osservazionale trasversale.

Il numero di pazienti da esaminare è stato definito in base ai dati di prevalenza di deficit di vitamina K nella popolazione generale e nella popolazione oggetto dello studio. Supponendo che la prevalenza di deficit della vitamina K sia del 24% nella popolazione generale (15) e del 30% nei dializzati (16) abbiamo calcolato che includendo sul presente studio 400 pazienti sarebbe stato possibile stimare un intervallo di fiducia al 95% con precisione $\pm 4,5\%$. Tale dato era anche in linea anche con quanto riportato dallo studio Framingham (15) nel quale vi era una prevalenza pari al 24% ottenuta considerando un cut-off della vitamina K pari a 0,5 nmol/L. Questo studio condotto sulla popolazione generale, rendeva presumibile che nella popolazione dialitica il deficit di vitamina K potesse avere una prevalenza più alta come quella riscontrata da Pilkey et al in 142 pazienti emodializzati (16).

Lo studio non prevedeva la somministrazione di alcun trattamento specifico per i pazienti.

Lo studio inoltre prevedeva la presenza di un gruppo di controllo sani (donatori del sangue), matched per sesso e età.

2. Criteri di selezione dei pazienti

Criteri di inclusione

1. Consenso informato scritto firmato.
2. Uomini e donne di età > 18 anni.
3. Trattamento emodialitico > 1 anno.

Criteri di esclusione

1. Pazienti con aspettativa di vita inferiore ai 6 mesi.
2. Qualunque evidenza di tumori maligni attivi ad eccezione del basalioma.
3. Patologie della coagulazione.
4. Qualunque condizione che, a giudizio dello sperimentatore, possa impedire la partecipazione del paziente allo studio.

3. Procedure

Dati Biomorali

Ad ogni paziente oltre al prelievo per la comune routine biochimica è stato eseguito un prelievo (2 campioni di siero da 2 cc ciascuno) per la determinazione di 25(OH)D [LIASON[®] 25 OH Vitamin D Assay 310600 (DiaSorin Inc., Stillwater MN, USA)] , BGP totale [LIASON[®] Osteocalcin Assay 310950 (DiaSorin Inc., Stillwater MN, USA)

], ucBGP [Glu-OC EIA Kit MK118 (Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan)], MGP totale (Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, Wien, A), ucMPG [dosata con metodica sperimentale da VitaK,BV Maastricht, The Netherlands, (27)], presso il Laboratorio di Padova, mentre per il dosaggio dei vitameri K (PK, MK4, MK5, MK6 e MK7) con metodica High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) presso il Laboratorio di Perugia.

Dai dati demografici e anamnestici dei pazienti ai dati bioumorali di comune routine, l'inserimento degli stessi, in conformità alla legge sulla privacy, è stato eseguito online da ogni centro partecipante in un sitoweb appositamente creato.

Rx Colonna Dorso Lombare (D5-L4)

Ogni centro è stato fornito di modulo con spiegazione dettagliata della corretta esecuzione della lastra e con precisa indicazione che venisse eseguita da un unico operatore il quale doveva ottemperare quanto segue:

- il paziente doveva essere accuratamente posizionato in decubito laterale in modo che per ciascuna vertebra fosse visibile una sola limitante superiore e una sola inferiore
- per una buona qualità della radiografia era importante che l'operatore scelto rispettasse i seguenti punti:
 - utilizzare la stessa Distanza Fuoco-Pellicola (DFP): era consigliata una DFP di circa 100cm (ogni paziente doveva avere lo stesso tubo radiogeno→ DFP=100cm)

- usare sempre lo stesso punto di incidenza del raggio centrale: in genere si utilizzava D7 per il segmento dorsale e L3 per il segmento lombare (incidenza del raggio centrale su D7 e L3)
- era necessario che D12 venisse rappresentata sia nella Rx del tratto Dorsale che di quello Lombare

Le lastre venivano inviate e centralizzate al CNR, Agin Section di Padova, e valutate a doppio cieco da 2 medici.

La diagnosi di FV veniva eseguita con morfometria vertebrale quantitativa, attraverso software (MorphoXpress), secondo Genant per riduzioni dell'altezza del corpo vertebrale maggiori al 20% (45-47).

Con la medesima lastra veniva eseguito lo score delle CV secondo Witteman (53), quantificando la lunghezza del deposito calcifico lungo la parete dell'Aorta Addominale (Lieve compresa tra 0.1-5cm, Moderata tra 5.1-10cm e severa > 10 cm). Inoltre valutammo la Presenza o Assenza di CV alle Arterie Iliache (Lieve 0.1-3cm, Mderata tra 3.1-5cm e Severa >5cm).

4. Analisi Statistica

Le variabili di tipo categoriale sono state analizzate descrittivamente tramite il conteggio e la percentuale di soggetti in ogni categoria, quelle quantitative tramite la media e la deviazione standard se distribuite normalmente o tramite la mediana, il primo e terzo quartile se con distribuzione diversa dalla normale.

Il deficit di Vitamina K è stato definito considerando come range di normalità i valori compresi tra il 5th e il 95th percentile nella distribuzione dei dati nei soggetti controllo sani (54).

L'identificazioni di eventuali predittori di deficit di vitamina K è stata condotta con la regressione logistica univariata. I predittori risultati significativi ad un livello $\alpha=0,20$ sono stati poi introdotti in un modello multivariato dove la selezione dei predittori significativi è stata condotta con metodo di selezione backward.

IV.RISULTATI

Sono stati reclutati 387 pazienti e 62 controlli sani., I pazienti erano principalmente Maschi (63%). Una parte dei pazienti presentava fattori di rischio cardiovascolare come l'Ipertensione Arteriosa (78.6%) e Diabete Mellito (22%). Una piccola percentuale dei pazienti presentava concomitanti patologie che potevano andare ad interferire con lo Status della Vitamina K (14% a livello epatico e un 1% malassorbimento intestinale) ed anche una storia di pregresse Fratture (6.7% prima della dialisi e 10.4% dopo) (Tabella 1).

Tabella 1. Principali caratteristiche dei soggetti partecipanti allo studio (pazienti e controlli sani)

Parametri	Pazienti Dialisi (n=387)	in	Controlli sani (n=62)
Età (anni) (intervallo) Media ± DS	64.2 ± 14.1 (18 – 89)		56.8 ± 3.9 (51 – 65)
Sesso			
Maschi No (% pz)	244 (63.0)		43 (69.4%)
Femmine No (% pz)	143 (37.0)		19 (30.6%)
BMI (kg/m2) Media ± DS	25.1 ± 4.4		
Tipo di dialisi No (% pz)			
Bicarbonato	189 (48.7)		
Emodiafiltrazione	102 (26.4)		
Biofiltrazione acetato-libera	54 (14.0)		
Emofiltrazione	32 (8.3)		
Altro	10 (2.6)		
Fumatori (attuali ed ex)	136 (36.8%)		
Bevitori (attuali ed ex)	82 (22.7.1%)		
Diabete Mellito	85 (22.0)		
Ipertensione Arteriosa	304 (78.6)		
Angina	64 (16.5)		
Infarto Miocardico	73 (18.95)		

Fibrillazione Atriale	51 (13.2)	
Insufficienza Cardiaca	39 (10.1)	
Arteriopatia periferica	134 (34.6)	
Eventi Cerebrovascolari (Ictus)	41 (10.6) (20 (5.2)	
Paratiroidectomia	26 (6.7)	
Fratture epoca predialitica	26 (6.7)	
Post dialitica	40 (10.4)	
Sindrome da malassorbimento	4 (1.0)	
Epatopatia	54 (14.0)	
Ca mg/dl	9.15±0.68	
Media ± DS		
P mg/dl	4.8±1.28	
Media ± DS		
ALP U/L	83	
Mediana		
PTH pg/ml	244	
Mediana		

- **Risultati relativi allo Status Vitamina K**

La concentrazione del PK e dei vari MK (senza e con aggiustamento dei Trigliceridi) è evidenziata in Tabella 2 e in Fig 1A e B con comparazione tra pazienti e gruppo di controllo sani. In tale tabella si evidenzia un importante deficit del MK7 pari al 35.7%, la cui distribuzione è mostrata in Fig 2A e B; deficit del PK del 23.5% e dell'MK4 del 14.5%.

Tabella 2. Stato della vitamina K in 387 pazienti in dialisi (ng/ml).

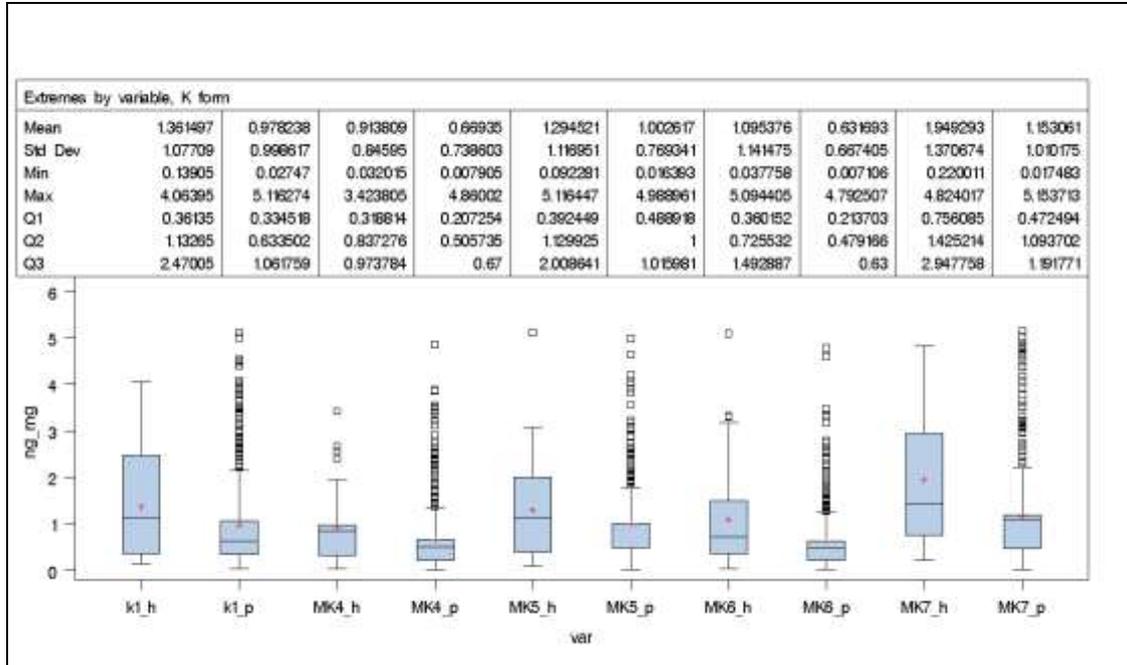
Vitamina K	Intervallo	Media \pm DS	Mediana	Intervallo di normalità**	% pz con Deficienza
PK	0.03 – 5.12	0.98 \pm 1	0.63	0.17 – 3.05	11.1
PK corretto*	0.01 – 5.07	0.7 \pm 0.8	0.43	0.21 – 6.23	23.5
MK4	1 – 4.86	0.67 \pm 0.74	0.51	0.07 – 2.68	8.8
MK4 corretto*	0.01 – 5.19	0.51 \pm 0.67	0.37	0.06 – 4.39	14.5
MK5	2 – 4.99	1 \pm 0.77	1.00	0.10 – 3.07	2.8
MK5 corretto*	0.01 – 5.52	0.75 \pm 0.66	0.75	0.10 – 3.79	7.8
MK6	1 – 4.79	0.63 \pm 0.67	0.48	0.04 – 3.33	3.6
MK6 corretto*	0.00 – 5.31	0.47 \pm 0.59	0.34	0.05 – 3.87	9.6

MK7	2	- 5.15	1.15 ± 1.01	1.09	0.33 – 4.48	18.1
MK7 corretto*		0.00 – 8.89	0.87 ± 0.95	0.70	0.44 – 6.46	35.4

(*corretto per trigliceridi; ** nei controlli sani in accordo con Taylor⁵⁴)

Fig. 1. Distribuzione dei vitameri (ng/ml), senza (A) e con (B) correzione per trigliceridi (mg/dl) (controlli sani = h e pazienti = p)

A non corretti



B corretti per trigliceridi

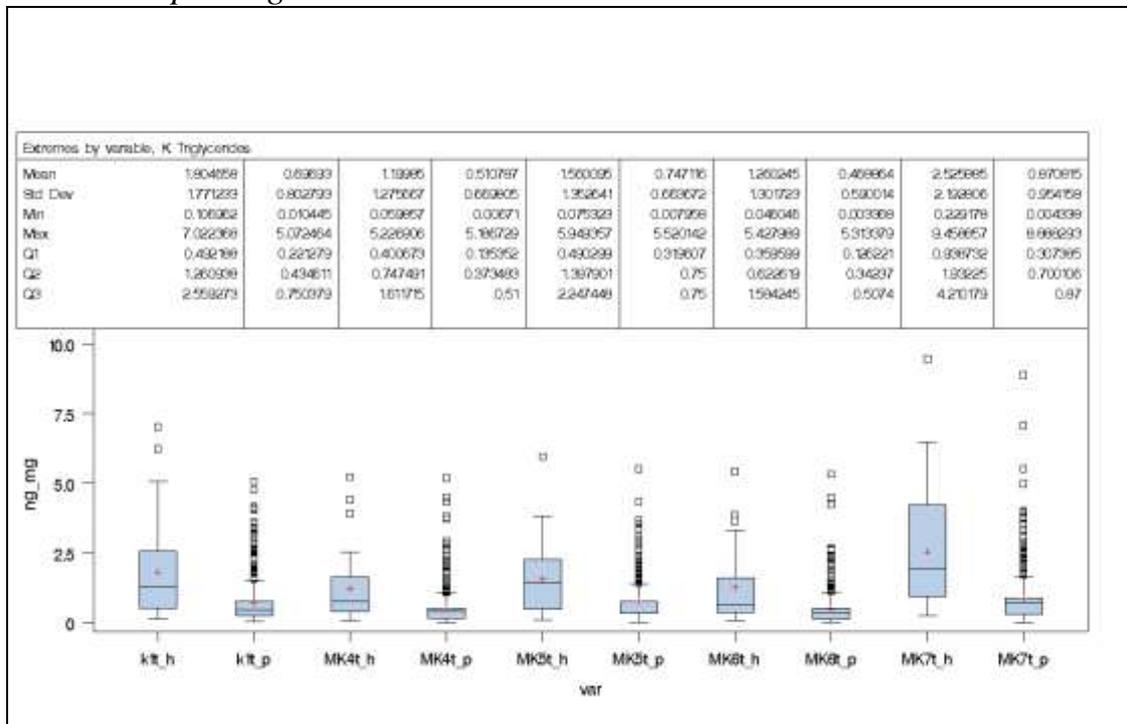
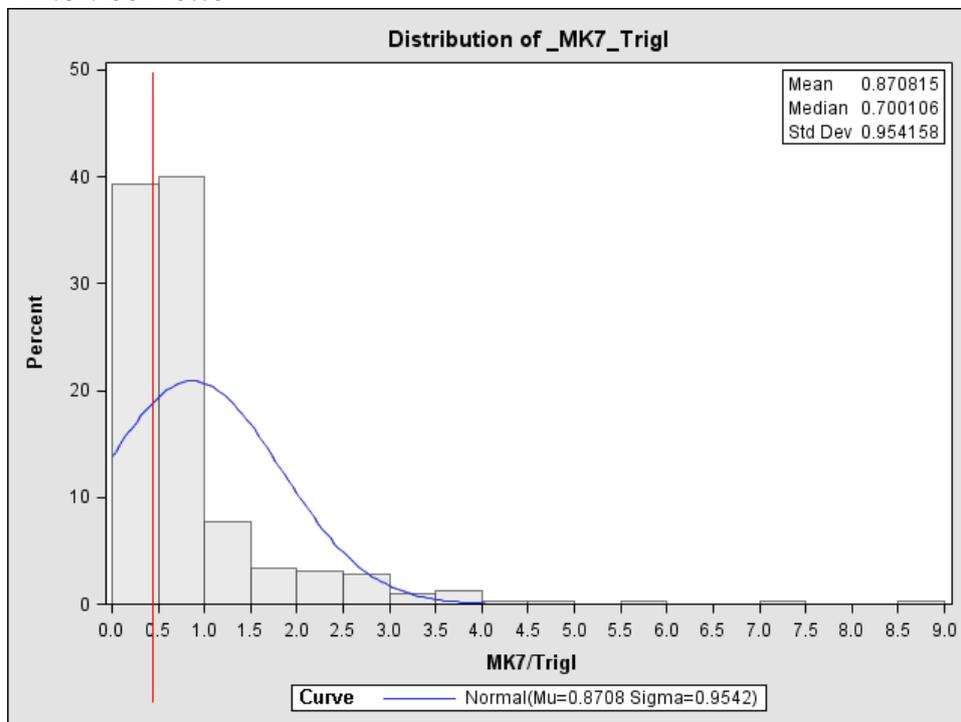
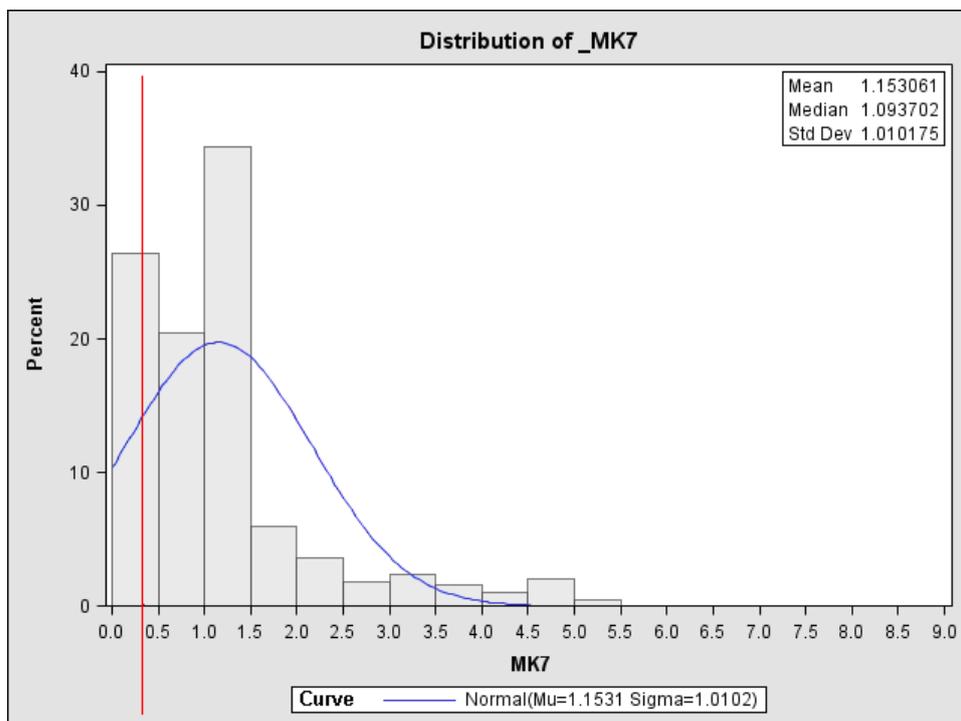


Fig. 2A e B. Istogramma che illustra la distribuzione dell'MK7 (ng/ml), non corretto e corretto per i livelli di trigliceridi (mg/dl).

A non corretto



B corretto per trigliceridi



Comparando i dati bioumorali relative al Bone e al Vascular tra pazienti in dialisi e soggetti sani risultano importanti differenze significative tra loro; nei primi infatti: la ucBGP è 11 volte più alta, la BGP totale è 12 volte più elevata, mentre la ucMGP è 3 volte più bassa; viceversa la MGP totale che è il doppio. I livelli di 25 (OH)D sono inferiori del 25.7% nei dializzati (Tabella 3).

Tabella 3. Controlli sani vs pazienti in dialisi

Variables	Controlli sani (n=62)	Pazienti in IRC (n=387)	p value
25-OH-D (ng/ml)			<0.0001
Mediana	40.0	29.0	
25° percentile	36.2	27.2	
75° percentile	44.5	31.5	
BGP totale (mcg/L)			<0.0001
Mediana	15.3	182	
25° percentile	12.8	96.3	
75° percentile	18.2	318.8	
uc BGP (ng/ml)			<0.0001
Mediana	0.88	11.00	
25° percentile	0.54	4.62	
75° percentile	1.60	17.20	
MGP totale (nmol/L)			<0.0001
Mediana	8.0	18.8	
25° percentile	7.0	12.7	
75° percentile	9.0	30.9	
uc MGP (nmol/L)			<0.0001
Mediana	1682.9	569.0	
25° percentile	1286.00	288.0	
75° percentile	2147.5	933.0	

I pazienti con deficit di PK presentavano significativi più bassi livelli di ucBGP (8.7 vs 11.7 ng/ml, $p=0.01$) e più alti livelli di ucMGP (683 vs 519.5 nmol/L, $p=0.03$) mentre i pazienti con deficit di MK6 presentavano più elevati livelli di MGP totale (22.5 vs 17.9 nmol/L, $p=0.01$); nei rimanenti pazienti non vi erano differenze significative tra chi non aveva e chi aveva deficit di vitamina k e i parametri di bone vascular totali e/o decarbossilati..

- **Risultati relativi alle FV**

Oltre la metà dei pazienti presentava FV (55.3%). La comparazione tra pazienti con e senza FV evidenziava una associazione con il Deficit di PK (15.4% vs 5,8%, $p=0.0027$); mentre non c'era nessuna associazione con nessun tipo di MK.

Questo dato era confermato anche dalla regressione logistica dove il deficit di PK era il più forte predittore di FV aumentando la probabilità di 3 volte (Table 4). Al contrario, l'Albumina si dimostrava verosimilmente un fattore protettivo poiché all'aumentare di 1g/dl della stessa si associava una probabilità del 40% di non avere FV (Tabella 4).

Tabella 4. Regressione logistica con presenza di Fratture Vertebrali come Outcome

	Odds Ratio	95% IC	p-value
Sesso (maschio)	1.75	1.13-2.69	0.0118
Età ≥ 67 anni	1.80	1.18-2.76	0.0064
Deficienza Vitamina K1	2.94	1.38-6.26	0.0053
Albumina g/dl	0.60	0.38-0.94	0.0264
Terapia Steroidea	2.41	0.89-6.54	0.0840

- **Risultati relativi alle CV**

La maggior parte dei pazienti presentava CV, in particolare: 80.6% avevano CV dell'Aorta Addominale (AoA) (29.7% Moderate e 30% Severe) e un 56.1% aveva CV a carico delle Arterie Iliache (AI) (29.7% Moderate e 14% Severe). Solamente il 16.5% non avevano nessun tipo di CV mentre più della metà (53.2%) presentavano CV sia a carico dell'AoA che delle AI.

La percentuale di pazienti con Deficit di MK4 era significativamente più alta nei pazienti con CV dell'AoA (10.6% vs 1.3, $p=0.01$); viceversa, il Deficit di MK5 era significativamente più basso in chi presentava CV dell'AoA (6.4% vs 13.3%, $p=0.04$).

La regressione logistica mostrava infatti come il Deficit di MK4 era un predittore di CV dell'AoA aumentando la probabilità di essere ad esse associato di ben 3 volte; al

contrario, il Deficit di MK5 proteggeva da tali CV riducendo la probabilità del 67%.
(Tabella 5).

Tabella 5. Regressione logistica con presenza di Calcificazioni dell’Aorta Addominale come Outcome

	Odds Ratio	95% IC	p-value
Calcificazione Aorta			
Età (anni)	1.05	1.03-1.07	<0.0001
Ipertensione Arteriosa	2.00	1.07-3.75	0.0307
IMA	2.78	1.10-7.05	0.0310
Fratture Vertebrali	1.81	1.03-3.18	0.0389
Deficienza MK4/trigliceridi	2.82	1.13-7.05	0.0266
Deficienza MK5/trigliceridi	0.33	0.13-0.85	0.0217

I pazienti che evidenziavano CV delle AI avevano un Deficit di MK7 significativamente più alto rispetto a coloro che non le avevano (41% vs 28.2%, p=0.009) e alla regressione logistica tale Deficit risultava predittore delle suddette CV (OR 1.61), assieme all’Età (OR 1.86), alla Fibrillazione Atriale (OR 3.10) e alle FV (OR 2.10) (Tabella 6).

Tabella 6. Regressione logistica con la presenza di calcificazioni iliache come outcome

	Odds Ratio	95% IC	p-value
Età ≥ 67 anni	1.86	1.21-2.87	0.0048
Trigliceridi >206 mg/dl	1.67	1.00-2.79	0.0521
Fibrillazione Atriale	3.10	1.49-6.42	0.0024
Fratture Vertebrali	2.10	1.67-3.22	0.0007
Deficienza MK7/trigliceridi	1.61	1.02-2.54	0.0426

Il Deficit di MK4/Trigliceridi e le FV sono predittori sia dell'AoA che delle AI (OR 3.99 95% 1.23–12.93, 2.80 95%CI 1.46-5.37, rispettivamente).

V. DISCUSSIONE

Lo studio ha evidenziato un Deficit di Vitamina K in una frazione significativa di pazienti in dialisi che supera il 35%. Si è inoltre trovato nella stessa popolazione una Prevalenza di FV pari al 55.3% e di CV AoA dell' 80.6% e delle AI del 56.1%. Inoltre il Deficit di Vitamina K si è dimostrato predittore sia di FV che di CV.

Questo è il primo studio che misura in modo globale lo Status della Vitamina K (sia senza che con aggiustamento dei Trigliceridi), includendo sia il dosaggio del PK che quello di più MK (MK4, MK5, MK6 e MK7). Infatti i pochi consistenti precedenti studi avevano misurato solo i livelli di PK (15, 16, 55). In questi studi trovarono un deficit di PK pari al 24% nella popolazione generale (n=672) (15), mentre nella popolazione dialitica un deficit pari al 29% (n=142) a cui si aggiunge ora il nostro dato pari al 23.5% (n=387).

La Vitamina K2 comprende differenti MK ma in genere spesso viene considerato e quindi indagato solo il MK7, tralasciando gli altri che invece verosimilmente possono avere importanti funzioni biologiche. Inoltre, non tutti gli studi correggono i vitameri per i Trigliceridi e ciò può essere importante poiché la Vitamina K come le altre vitamine liposolubili è trasportata con i Chilomicroni dopo assorbimento intestinale e trasportata al fegato. Il PK rimane in parte nel Fegato (per la produzione dei fattori di coagulazione) e in parte, assieme ai vari MK, è trasportato ai vari tessuti associato alle VLDL e LDL, spiegando così la stretta correlazione tra le concentrazioni dei Trigliceridi e la vitamina K ($r=0.99$) (7,55).

Questo è anche il primo studio che correla il Deficit di Vitamina K (PK e MK) direttamente alla FV e alla CV. Il PK è il più forte predittore di FV e questo nostro dato è conforme sia al ritrovamento di Cheung et al, i quali in uno studio randomizzato e controllato (440 donne in postmenopausa), dove veniva somministrata K1 alla dose di 5mg die, si aveva una ridotta incidenza dell'evento fratturativo nelle pazienti trattate rispetto alle non trattate (56); e al dato di Nakano et al, in cui il PK è risultato predittivo per frattura d'anca (OR 0.072, p=0.016), ma non l'MK7, in una popolazione di anziani giapponesi che presentavano ipovitaminosi K e D (57). Entrambe questi autori trovarono che l'albumina era significativamente più bassa nei pazienti fratturati (p<0.01); tale dato era sovrapponibile a quello del nostro studio in cui un suo miglior status era protettivo dall'evento fratturativo (OR 0.60). Noi non trovammo invece nessuna differenza significativa correlata all'MK7 come peraltro supportato dall'Hordaland Health Study, dove il basso intake di Vitamina K1 ma non di MK7 era associato a frattura dell'anca in 2800 soggetti che vivevano nel Norway e monitorati per 10 anni (58).

Un'altro importante risultato, è che il deficit di MK4 si è dimostrato un predittore di calcificazione aortica, tale dato è stato per la prima volta evidenziato nell'uomo in questo studio ed è comparabile con il dato di Wallin et al a livello cellulare, in cui l'MK4 agisce come un inibitore della CV verosimilmente attraverso una down regulation del gene dell'Osteoprotegrina e della secrezione della medesima (59).

L'MK7 non era un predittore di calcificazione aortica ma lo era per la calcificazione delle arterie Iliache (OR 1.61). A conferma di tale dato il Rotterdam Study ha investigato 4807 pazienti in cui l'intake di MK7 riduceva del 50% le CV e la mortalità cardiovascolare ed inoltre per un 25% la mortalità in toto (60).

Sorprendentemente il deficit di MK5 risultava apparire protettivo nei confronti della calcificazione aortica (OR 0.33); anche tale dato è il primo in letteratura.

Il fatto che MK diversi abbiano verosimili opposte funzioni fa capire come ciascun vitamero K dovrebbe essere ulteriormente indagato.

Relativamente alla prevalenza delle FV diagnosticate attraverso metodica quantitativa, rappresenta a tutt'oggi il più consistente studio a livello internazionale sia per quanto riguarda la popolazione generale che con IRC..

VI. CONCLUSIONI

A tutt'oggi non ci sono Linee Guida (LG) per i pazienti con IRC che indicano supplementazioni della vitamina K nel management terapeutico riguardante le alterazioni del metabolismo minerale osseo (13); mentre da più di 40 anni la comunità scientifica nefrologica ha elaborato un numero infinito di Linee Guida volte a dare Target di livelli ottimali di Ca, P, PTH e 25(OH)D proprio per il paziente in IRC per prevenire la Frattura e la CV. Nel corso di queste decadi le LG hanno indicato valori target di tali bone markers alle volte opposti (agli inizi per esempio il Ca era consigliato a livelli al di sopra della norma ora è l'opposto) tralasciando però l'obiettivo primario del raggiungimento di tali target, ossia la loro correlazione con l'evento fratturativo (ad oggi ci sono in pubmed poco più di 25 paper che hanno investigato in tal senso).

Dal nostro studio, non solo è emerso che nessuno dei parametri biumorali considerati target nelle LG di monitoraggio nel paziente uremico correla né con la FV né con la CV, ma altresì è emerso come invece il deficit di vitamina K sia associato sia alla FV che alle CV. Entrambe tali eventi clinici, nei pazienti in dialisi, sono considerati fattori di rischio sia per morbilità cardiovascolare che mortalità. Noi crediamo dunque che un adeguato intake di Vitamina K dovrebbe essere indicato in associazione all'intake di calcio e Vitamina D al fine di promuovere una corretta calcificazione dell'osso evitando la calcificazione dannosa dei vasi. Recenti studi infatti hanno evidenziato come supplementazioni di Calcio, associate o meno alla vitamina D, in donne in postmenopausa al fine di prevenire l'osteoporosi, siano andate incontro ad un incremento degli eventi cardiovascolari (effetto Calcio paradossoso: Ca in eccesso nei vasi e Ca depleto nell'osso) (61,62).

Dal nostro studio la raccomandazione dell'intake di Vitamina K dovrebbe riguardare sia il PK che i MK4 e MK7 con dosi da valutare in futuri studi controllati e randomizzati, a nostro avviso, non solo nei pazienti con IRC ma anche nella popolazione generale, volti a investigare il ruolo di tali vitameri sia nella prevenzione della salute dell'osso che del vaso.

BIBLIOGRAFIA

1. Shearer MJ. Vitamin K. *Lancet*, Jan 28;345(8944):229-34,1995
2. Schurgers LJ, Vermeer C: Determination of phylloquinone and menaquinones in food. Effect of food matrix on circulating vitamin K concentrations. *Haemostasis* Nov-Dec;30(6):298-307,2000.
3. Bugel S: Vitamin K and Bone Health. *Proc Nutr Soc*, Nov, 62(4): 839-43, 2003.
4. Booth SL, Suttle JW. Dietary intake and adequacy of vitamin K. *J Nutr*. May;128(5):785-8,1998.
5. Kohlmeier M, Salomon A, Saupe J et al: Transport Vitamin K to bone in humans. *J Nutr* 126:1192S-1196S, 1996.
6. Schurgers LJ, Shearer MJ, Soute BA et al. Novel effects of diets enriched with corn oil or with an olive oil/sunflower oil mixture on vitamin K metabolism and vitamin K-dependent proteins in young men. *J Lipid Res*. 2002 Jun;43(6):878-84.
7. Shearer MJ, Newman P. Metabolism and cell biology of vitamin K. *Thromb Haemost*. 2008 Oct;100(4):530-47. Review.
8. Kohlmeier M, Saupe J, Schaefer K et al. Bone fracture history and prospective bone fracture risk of hemodialysis patients are related to apolipoprotein E genotype. *Calcif Tissue Int*. Mar;62(3):278-81,1998.
9. Krueger T, Westenfeld R, Ketteler M et al Vitamin K deficiency in CKD patients: a modifiable risk factor for vascular calcification? *Kidney Int*. Jul;76(1):18-22. Epub 2009 Apr 22,2009.

10. Kurosu M, Begari E. Vitamin K2 in electron transport system: are enzymes involved in vitamin K2 biosynthesis promising drug targets? *Molecules*. 2010 Mar 10;15(3):1531-53. Review.
11. Schurgers LJ, Teunissen KJ, Hamulyák K et al. Vitamin K-containing dietary supplements: comparison of synthetic vitamin K1 and natto-derived menaquinone-7. *Blood*. Apr 15;109(8):3279-83. Dec 7.,2007.
12. Nieves JW: Osteoporosis: the role of micronutrients. *Am J Clin Nutr* 81 (suppl): 1232-1239, 2005
13. Fouque D, Vennegoor M., Ter Wee P et al: EBPG guideline on nutrition. *Nephrol Dial Transplant*, May, 22 Suppl 2:ii45-87, 2007
14. Kohlmeier M, Saupe J, Shearer MJ et al: Bone health of adult hemodialysis patients is related to Vitamin K status. *Kidney Int* 51: 1218-1221, 1997.
15. Neogi T, Booth SL, Zhang Yo et al: Low vitamin k status is associated with osteoarthritis in the hand and knee. *Arthritis & Rheumatism*, Apr, 54:1255-1261, 2006.
16. Pilkey RM, Morton AR, Boffa MB et al. Subclinical vitamin K deficiency in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*. Mar;49(3):432-9, 2007.
17. Schurgers LJ, Cranenburg EC, Vermeer C. Matrix Gla-protein: the calcification inhibitor in need of vitamin K. *Thromb Haemost.*, Oct;100(4):593-603, 2008.
18. Zebboudj AF, Imura M, Bostrom K: Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic 2. *J Biol Chem* 277: 4388-4394, 2002.
19. Murshed M, Schinke T, McKee MD et al. Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *J Cell Biol*. 2004 Jun 7;165(5):625-30, 2004.

20. Munroe PB, Olgunturk RO, Fryns JP et al. Mutations in the gene encoding the human matrix Gla protein cause Keutel syndrome. Nat Genet. Jan;21(1):142-4,1999
21. Meier M, Weng LP, Alexandrakis E et al. Tracheobronchial stenosis in Keutel syndrome. Eur Respir J, Ma:17(3):566-9, 2001.
22. Luo G, Ducy P, McKee MD et al: Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. Nature 386:78-81, 1997.
23. Shearer MJ: Role of vitamin k and GLA proteins in the pathophysiology of osteoporosis and vascular calcification. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 3(6):433-438, 2000.
24. Sigrist M, Bungay P, Taal MW et al. Vascular calcification and cardiovascular function in chronic kidney disease. Nephrol Dial Transplant. Mar;21(3):707-14. Epub 2005 Nov 1, 2006.
25. Raggi P, Boulay A, Chasan-Taber S et al. Cardiac calcification in adult hemodialysis patients. A link between end-stage renal disease and cardiovascular disease? J Am Coll Cardiol.Feb 20;39(4):695-701,2002.
26. Goodman WG, Goldin J, Kuizon BD et al. Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. N Engl J Med., May 18;342(20):1478-83, 2000.
27. Cranenburg EC, Vermeer C, Koos R et al. The circulating inactive form of matrix Gla Protein (ucMGP) as a biomarker for cardiovascular calcification. J Vasc Res.;45(5):427-36. Epub 2008 Apr 10, 2008.
28. Schurgers LJ, Barreto Dv, Barreto FC et al. The circulating inactive form of matrix Gla Protein is a surrogate marker for Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease: A Preliminary Report. Clin J Am Soc Feb 4, 2010.

29. Price PA, Parthermore JG, Deftos LJ: New biochemical marker for bone metabolism. Measurement by radioimmunoassay of bone GLA protein in the plasma of normal subjects and patients with bone disease. *J Clin Invest* 66:878-883, 1980.
30. Zhang R, Ducy P, Karsenty G. 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits Osteocalcin expression in mouse through an indirect mechanism. *J Biol Chem*. 1997 Jan 3;272(1):110-6.
31. Nakao M, Nishiuchi Y, Nakata M, Kimura T et al. Synthesis of human osteocalcins: gamma-carboxyglutamic acid at position 17 is essential for a calcium-dependent conformational transition. *Pept Res*. Jul-Aug;7(4):171-4,1994
32. Koshihara Y, Hoshi K. Vitamin K2 enhances osteocalcin accumulation in the extracellular matrix of human osteoblasts in vitro. *J Bone Miner Res*. 1997 Mar;12(3):431-8
33. Razzaque MS. Osteocalcin: a pivotal mediator or an innocent bystander in energy metabolism? *Nephrol Dial Transplant*. 2011 Jan;26(1):42-5. Epub 2010 Dec 3.
34. Ingram RT, Park Y, Clarke BL et al: Age and gender-related changes in the distribution of the osteocalcin in the extracellular matrix of normal male and female bone. *J Clin Invest* 93:989-997, 1994.
35. Shearer MJ: Vitamin k. *Lancet* 345:229-234, 1995.
36. Ducy P, Desbois C, Boyce P et al: Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382: 448-452, 1996
37. Sasaki N, Kusano E, Takahashi H et al. Vitamin K2 inhibits glucocorticoid-induced bone loss partly by preventing the reduction of osteoprotegerin (OPG). *J Bone Miner Metab*.;23(1):41-7,2005.

38. Fusaro M, D'angelo A, Gallieni M. Vertebral fractures in patients on dialysis: a clinically relevant problem with insufficient investigation. *NDT Plus* (6):464-465,2008.
39. Alem MA, Sherrard DJ, Gillen DL, et al. Increased risk of hip fracture among patients with end-stage renal disease. *Kidney Int*;58:396-9, 2000.
40. Atsumi K, Kushida K, Yamazaki K, et al. Risk factors for vertebral fractures in renal osteodystrophy. *Am J Kidney Dis*; 33:287-93,1999.
41. Rodríguez-García M, Gómez-Alonso C, Naves-Díaz M, et al. Prevalence of vertebral fractures and aortic calcifications in hemodialysis patients: comparison with a population of the same age and sex. *Nefrologia*; 23 (Suppl 2):106-11, 2003.
42. Jamal SA, Gilbert J, Gordon C, et al. Cortical pQCT measures are associated with fractures in dialysis patients. *J Bone Miner Res*; 21:543-8, 2006.
43. Rodríguez-García M, Gómez-Alonso C, Naves-Díaz M, Díaz-López JB, Díaz-Corte C, Cannata-Andía JB. Asturias Study Group. Vascular calcifications, vertebral fractures and mortality in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*; 24:239-46,2009.
44. Riggs BL, Hodgson SF, O'Fallon WM et al. Effect of fluoride treatment on the fracture rate in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med*. Mar 22;322(12):802-9, 1990.
45. Genant HK, Wu CY, van Kuijk C et al. Vertebral fracture assessment using a semiquantitative technique. *J Bone Miner Res.*, Sep;8(9):1137-48,1993.
46. Guglielmi G, Diacinti D, van Kuijk C et al. Vertebral morphometry: current methods and recent advances. Eur Radiol. Jul;18(7):1484-96. Epub 2008 Mar 20, 2008.
47. Guglielmi G, Stoppino LP, Placentino MG et al. Reproducibility of a semi-automatic method for 6-point vertebral morphometry in a multi-centre trial. Eur J Radiol. Jan;69(1):173-8. Epub 2007 Dec 19,2009.

48. Arboleya L, Díaz-Curiel M, Del Río L et al. Prevalence of vertebral fracture in postmenopausal women with lumbar osteopenia using MorphoXpress(R) (OSTEOXPRESS Study). *Aging Clin Exp Res.*, Jan 28. [Epub ahead of print], 2010.
49. Lindsay R, Silverman SL, Cooper C et al. Risk of new vertebral fracture in the year following a fracture. *JAMA.*, Jan 17;285(3):320-3, 2001.
50. Rodríguez-García M, Gómez-Alonso C, Naves-Díaz M, Diaz-Lopez JB, Diaz-Corte C, Cannata-Andía JB; Asturias Study Group. Vascular calcifications, vertebral fractures and mortality in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.*, Jan;24(1):239-46. Epub 2008 Aug 25, 2009.
51. Hasserijs R, Karlsson MK, Nilsson BE et al. European Vertebral Osteoporosis Study Prevalent vertebral deformities predict increased mortality and increased fracture rate in both men and women: a 10-year population-based study of 598 individuals from the Swedish cohort in the European Vertebral Osteoporosis Study. *Osteoporos Int.* Jan;14(1):61-8, 2003.
- 52.** Naves M, Rodríguez-García M, Díaz-López JB et al Progression of vascular calcifications is associated with greater bone loss and increased bone fractures. *Osteoporos Int.* Aug;19(8):1161-6. Epub 2008 Jan 8, 2008.
53. Witteman JC, Grobbee DE, Valkenburg HA et al. J-shaped relation between change in diastolic blood pressure and progression of aortic atherosclerosis. *Lancet* 343: 504-507, 1994.
54. Taylor JM, Cumberland WG, Meng X, Giorgi JV, Normal range estimation for repeated immunologic measures. *Clin Diagnostic Lab Immunol* 1996; 3; 139-142
55. Sadowski JA, Hood SJ, Dallal GE, Garry PJ. Phylloquinone in plasma from elderly and young adults: factors influencing its concentration. *Am J Clin Nutr* 1989; 50: 100-8

56. Cheung AM, Tile L, Lee Y et al. Vitamin K supplementation in postmenopausal women with osteopenia (ECKO Trial): a randomized controlled trial. *PLOS medicine* 2008; 5: 1461-1472.
57. Nakano T, Tsugawa N, Kuwabara A et al. High prevalence of hypovitaminosis D and K in patients with hip fracture. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2011; 20: 56-61.
58. Apalset EM, Gjesdal CG, Eide GE, Teil GS. Intake of vitamin K1 and K2 and risk of hip fractures: The Hordaland Health Study. *Bone* 2011; 49: 990-5
59. Wallin R, Schurgers L, Wajih N. Effects of the blood coagulation vitamin K as an inhibitor of arterial calcification. *Thromb Res* 2008; 122: 411-417
60. Geleijnse JM, Vermeer C, Grobbee DE et al: Dietary intake of Menaquinone is associated with a reduced risk of coronary heart disease: The Rotterdam Study. *J Nutr*, 134:3100-5, 2004.
61. Bolland MJ, Barber PA, Doughty RN et Al Vascular events in healthy older women receiving calcium supplementation: randomized controlled trial. *BMJ* 2008; **336**: 262-6
62. Bolland MJ, Grey A, Avenell A, Gambie GD, Reid IR. Calcium supplements with or without vitamin D and risk of cardiovascular events: reanalysis of the Women's Health Initiative limited access dataset and meta-analysis. *BMJ* 2011 online doi:10.1136/bmj.d2040

APPENDICE 1

IL TRATTAMENTO CON GLI INIBITORI DI POMPA PROTONICA E' ASSOCIATO AD UN'AUMENTATO RISCHIO DI CALCIFICAZIONI VASCOLARI NEI PAZIENTI CON INSUFFICIENZA RENALE CRONICA

Nella valutazione della terapia dello Studio Kappa (Studio K), inaspettatamente abbiamo riscontrato un dato non noto in letteratura, ossia i pazienti in trattamento con Inibitori di Pompa Protonica (PPI) presentavano una associazione significativa con le Calcificazioni Vascolari (CV).

Dei 387 pazienti dello studio K il 76.2% (n=295) erano in trattamento con PPI. Le caratteristiche principali dei pazienti in trattamento e non con PPI sono mostrate in Tabella 1.

Table 1. Main characteristics of the patients by PPI status.

	Patients on chronic PPI treatment (n=295)	Patients not on chronic PPI treatment (n=92)	p-value
Gender, female, n (%)	121 (41.0)	24 (26.1)	0.0098
Age, years, mean±SD	64.21±13.63	63.97±15.44	0.8837
Weight, kg, mean±SD	69.75±14.71	71.58±14.17	0.2926
Height, cm, mean±SD	166.52±9.16	169.12±9.39	0.0182
BMI, kg/cm ² , mean±SD	25.07±4.49	24.98±4.17	0.8704
Current or former smoker, n (%)	115 (39.0)	37 (40.7)	0.7748
Current or former alcohol drinker, n (%)	63 (22.4)	19 (23.8)	0.8022
<u>Medical history</u>			
Dialysis vintage, months, median	51.00	47.50	0.4002
Type of dialysis, n (%)			
Bicarbonate dialysis	143 (48.5)	46 (50.0)	0.8841
Hemofiltration (HF)	24 (8.1)	8 (8.7)	
Hemodiafiltration (HDF)	81 (27.5)	21 (22.8)	
Acetate free biofiltration (AFB)	39 (13.2)	15 (16.3)	
Other types of dialysis	8 (2.7)	2 (2.2)	
Previous kidney transplant, n (%)	37 (12.5)	17 (18.5)	0.1514
Hypertension, n (%)	235 (79.7)	69 (75.0)	0.3416
Angina, n (%)	57 (19.3)	7 (7.6)	0.0083
Myocardial infarction, n (%)	62 (21.0)	11 (12.0)	0.0524
Atrial fibrillation, n (%)	45 (15.3)	6 (6.5)	0.0306
Heart failure, n (%)	31 (10.5)	8 (8.7)	0.6140

	Patients on chronic PPI treatment (n=295)	Patients not on chronic PPI treatment (n=92)	p-value
Diabetes Mellitus, n (%)	64 (21.7)	21 (22.8)	0.8190
Peripheral vascular disease, n (%)			
No	189 (64.1)	64 (69.6)	0.3962
Asymptomatic	75 (25.4)	23 (25.0)	
Intermittent claudication	25 (8.5)	3 (3.3)	
Amputation	6 (2.0)	2 (2.2)	
Cerebrovascular accident, n (%)			
No	262 (75.7)	84 (91.3)	0.7011
Stroke	17 (5.8)	3 (3.3)	
Other type	16 (5.4)	5 (5.4)	
Vertebral fractures, n (%)	163 (55.3)	51 (55.4)	0.9757
<u>Routine biochemical profile</u>			
Ca, mg/dl, mean±SD	9.15±0.85	9.06±0.66	0.3849
P, mg/dl, mean±SD	4.77±1.27	4.75±1.27	0.8800
Alkaline phosphatase, U/L, median	84.00	76.50	0.0418
PTH, pg/ml, median	248.00	212.50	0.1868
Albumin, g/dl, mean±SD	3.82±0.51	3.80±0.43	0.7299
CRP, mg/L, median	1.90	1.00	0.0302
KT/V, mean±SD	1.25±0.27	1.27±0.25	0.5450
Aluminium, mcg/L, median	12.00	13.00	0.7864
Total cholesterol, mg/dl, mean±SD	168.37±39.62	169.35±46.53	0.8435
Tryglicerides, mg/dl, median	152.00	132.50	0.1283

	Patients on chronic PPI treatment (n=295)	Patients not on chronic PPI treatment (n=92)	p-value
HDL Cholesterol, mg/dl, mean±SD	42.10±12.64	43.01±12.93	0.5477
LDL Cholesterol, mg/dl, mean±SD	93.04±35.03	97.14±43.22	0.3763
25(OH)D, ng/ml median	28.80	31.85	0.2724
BGP total, mcg/L, median	187.00	163.00	0.9962
BGP decarboxylated, ng/ml, median	11.10	10.05	0.1626
MGP total, nmol/L, median	18.90	17.80	0.9230
MGP decarboxylated, nmol/L, median	557.00	609.90	0.9226

Dalla Tabella si evidenzia che vi era una maggior prevalenza significativa di pazienti affetti da Angina e Fibrillazione Atriale nel gruppo in trattamento con PPI (+11.7% p=0.0083 and +8.8% p=0.0306, respectively) e una maggior prevalenza al limite della significatività per IMA sempre presente nei pazienti in trattamento con PPI (+9% p=0.0524). Inoltre, sia la Fosfatasi Alcalina che la Proteina C reattiva erano più alte nei pazienti trattati con PPI (7.5 U/L p=0.0418 and 0.9 mg/L, respectively).

La prevalenza di CV Aortica (AoA) e delle Arterie Iliache (AI) era significativamente più alta nei pazienti trattati con PPI: 168 (57.0%) vs 38 (41.3%) (p=0.0086) (Fig 1A).

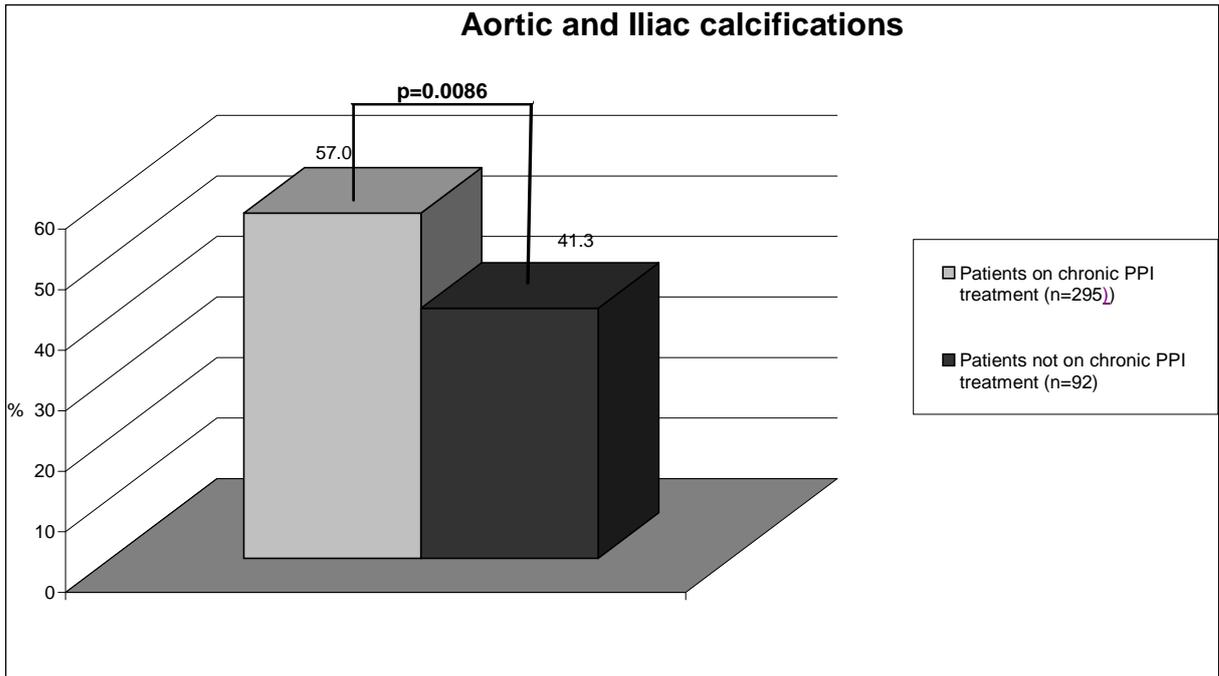


Fig. 1A. Pazienti in trattamento con PPI e associazione con CV sia AoA che delle AI.

Significative differenze erano trovate anche considerando singolarmente la CV AoA

(Fig. 1B, +12.2%, $p=0.0254$) e delle AI (Fig 1C, +13.6%, $p=0.0211$).

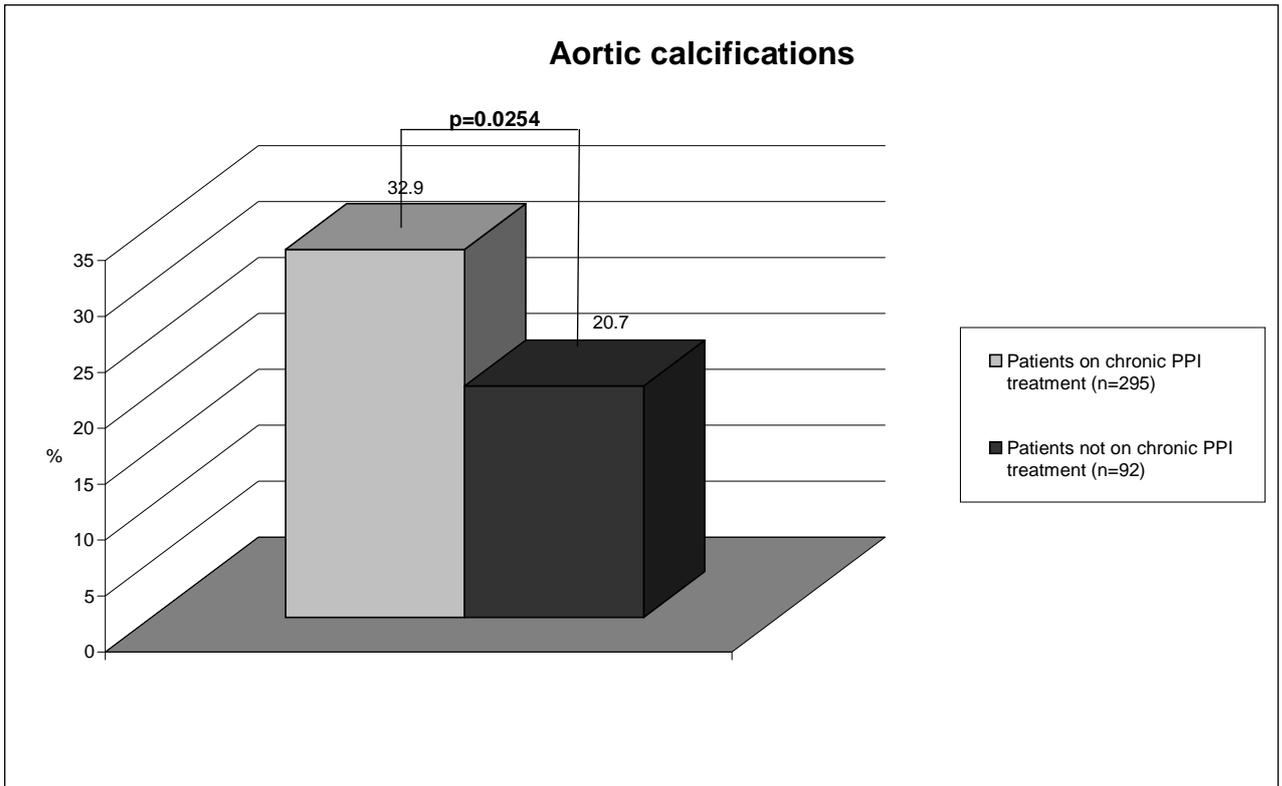


Fig. 1B. Pazienti in trattamento con PPI e associazione con CV AoA.

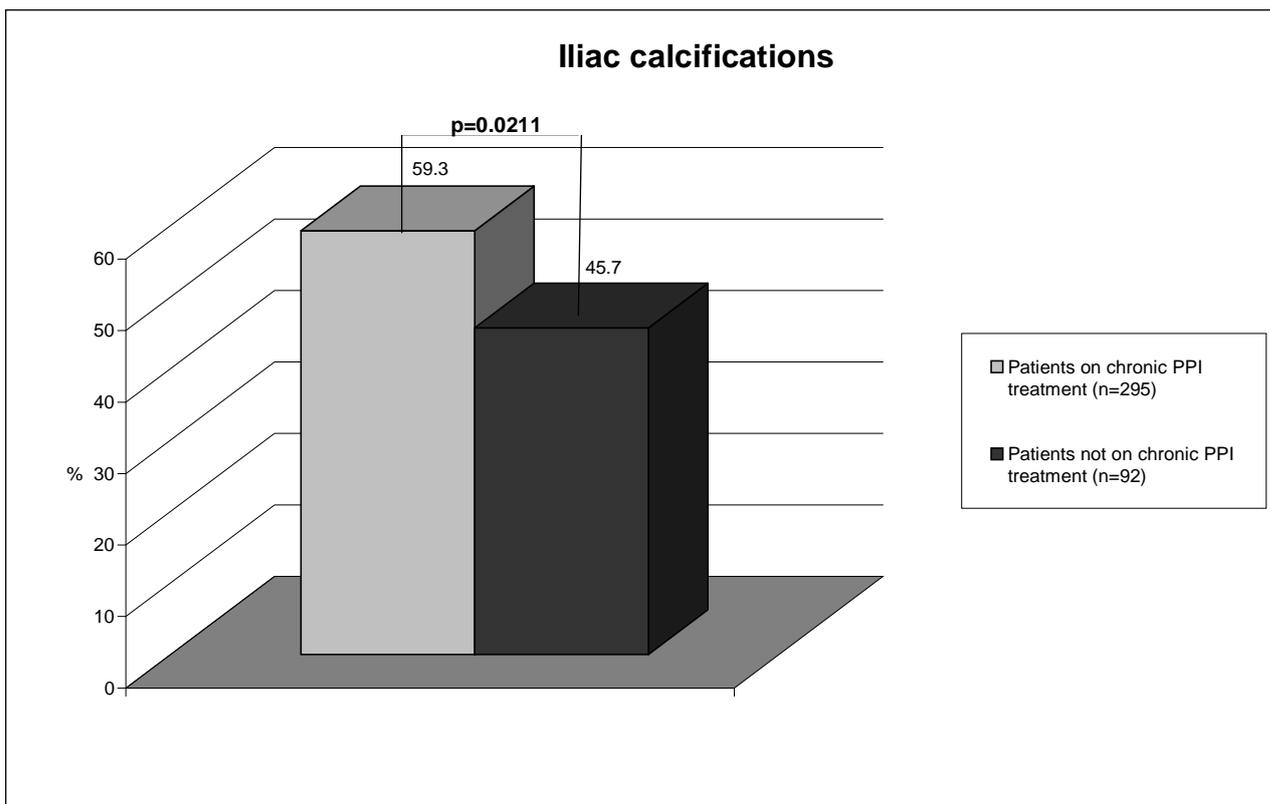


Fig. 1C. Pazienti in trattamento con PPI e associazione con CV AI

Dopo regressione logistica sia per CV AoA severa (Tabella 2) che per moderate e severe CV AI (Tabella 3) apparivano essere significativamente correlate con PPI trattamento evidenziando un OR variabile da 2.15 a 2.66 a seconda del sito vascolare considerato.

Table 2. Logistic regression model with severe aortic calcifications (vs none, mild or moderate).

	Severe aortic calcifications		
	vs None, Mild or Moderate		
	OR	95% CI	p-value
Age \geq 67 years	4.05	2.41-6.79	<0.0001
Gender, male	2.20	1.31-3.71	0.0030
Triglycerides \geq 260 mg/dl	2.46	1.44-4.19	0.0010
Warfarin treatment	3.74	1.88-7.43	0.0002
PPI chronic treatment	2.15	1.17-3.98	0.0144

Table 3. Multinomial logistic regression model with outcome iliac calcifications.

	Mild iliac calcifications vs None			Moderate iliac calcifications vs None			Severe iliac calcifications vs None		
	OR	95% CI	p-value	OR	95% CI	p-value	OR	95% CI	p-value
Age									
\geq 67 years	1.68	0.87-3.25	0.1241	2.14	1.30-3.55	0.0030	3.01	1.53-5.93	0.0039
Gender, male	0.65	0.34-1.27	0.2099	1.46	0.87-2.47	0.1521	2.22	1.08-4.56	0.0292
Triglycerides									
\geq 147 mg/dl	1.30	0.68-2.50	0.4265	1.52	0.93-2.50	0.0978	1.95	1.01-3.76	0.0477
Warfarin treatment	1.55	0.45-5.33	0.4871	3.30	1.41-7.72	0.0060	5.92	2.31-15.15	0.0002
PPI chronic treatment	0.86	0.42-1.77	0.6883	2.24	1.21-4.16	0.0107	2.66	1.12-6.30	0.0267

A nostra conoscenza questo dato è il primo in letteratura che vede il trattamento con PPI associato ad un aumentato rischio di CV. Un recente lavoro retrospettivo Danese ha evidenziato che in pazienti in trattamento con aspirina in seguito ad un primo IMA l'associazione con PPI portavo ad un incremento degli eventi cardiovascolari (1).

In letteratura invece è noto come il trattamento prolungato con PPI sia associato ad un aumentato rischio fratturativo (2,3). Una possibile chiave di lettura potrebbe essere la ipomagnesemia conseguente all'uso di PPI, verosimilmente dovuta alla diminuzione della concentrazione di acido cloridrico la quale porterebbe ad una down regulation dell'espressione e del funzionamento del TRPM6 (*Transient Receptor Potential Melastatin6* → un trasportatore transcellulare saturabile deputato all'assorbimento attivo del Mg nel colon) (4). L'ipomagnesemia però comporta anche una riduzione dell'attività di un'altro trasportatore deputato all'assorbimento attivo del Mg nel colon, della stessa famiglia di quello appena citato, TRPM7 con conseguente peggioramento dell'ipomagnesemia stessa; ed inoltre una riduzione dei livelli di importanti proteine inibitrici delle CV, quali: BMP7 (Bone Morphogenetic Protein 7), Osteopontina e MGP (5). Di recente Kircelli et al ha dimostrato in cellule muscolari lisce bovine dei vasi (BVSMC) effetti importanti del Mg dose dipendenti quali: inibizione attività dell'ALP, riduzione dell'espressione dei geni associati al processo di transdifferenziazione delle BVSMC a cellule osteoblastiche (Cbfa1, Msx2), riduzione dell'entrata di Ca a livello della Media, aumentati livelli di MGP e preservazione dell'apoptosi delle BVSMC (6). L'ipomagnesemia potrebbe essere dunque una verosimile spiegazione dell'aumento delle CV associate al trattamento dei PPI rilevato nello studio K.

Si rendono necessari futuri studi finalizzati ad investigare il link tra CV e uso dei PPI, non solo nei pazienti con IRC, ma anche nella popolazione generale visto il loro largo consumo.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Charlot M, Grove EL, Hansen PR, et al. Proton pump inhibitor use and risk of adverse cardiovascular events in aspirin treated patients with first time myocardial infarction: nationwide propensity score matched study. *BMJ*. 2011; 342: d2690. doi: 10.1136/bmj.d2690
- 2 Yu EW, Bauer SR, Bain PA, Bauer DC. Proton pump inhibitors and risk of fractures: a meta-analysis of 11 international studies. *Am J Med*. 2011;124(6):519-526.
- 3 Ngamruengphong S, Leontiadis GI, Radni S, Dentino A, Nugent K. Proton pump inhibitors and risk of fracture: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Am J Gastroenterol*. 2011; 106(7):1209-1218.
- 4 Regolisti G, Cabassi A, Parenti E et al. Severe hypomagnesemia during long-term treatment with a proton pump inhibitor. *Am J Kidney Dis*. 2010 Jul;56(1):168-74. Epub 2010 May 20.
- 5 Montezano AC, Zimmerman D, Yusuf H et al. Vascular smooth muscle cell differentiation to an osteogenic phenotype involves TRPM7 modulation by magnesium. *Hypertension*. 2010 Sep;56(3):453-62. Epub 2010 Aug 9.
- 6 Kircelli F, Peter ME, Sevinc Ok E et al. Magnesium reduces calcification in bovine vascular smooth muscle cells in a dose-dependent manner. *Nephrol Dial Transplant*. 2011 Jul 12. [Epub ahead of print]

APPENDICE 2

STUDIO K E MORTALITA'

I pazienti dello studio K furono reclutati tra il febbraio e ottobre dell'anno 2009. Al di là degli obiettivi dello studio, che essendo un cross-sectional per definizione non poteva prevedere la valutazione della sopravvivenza noi siamo andati comunque a valutarla nel dicembre 2011 (distanza media baseline-follow up: 2.7 ± 0.5 anni). I soggetti deceduti durante tale follow-up erano 77 (19.9%). Le cause di mortalità erano prevalentemente di origine cardiovascolare (Tabella 1).

Tabella 1. Mortalità nel campione totale.

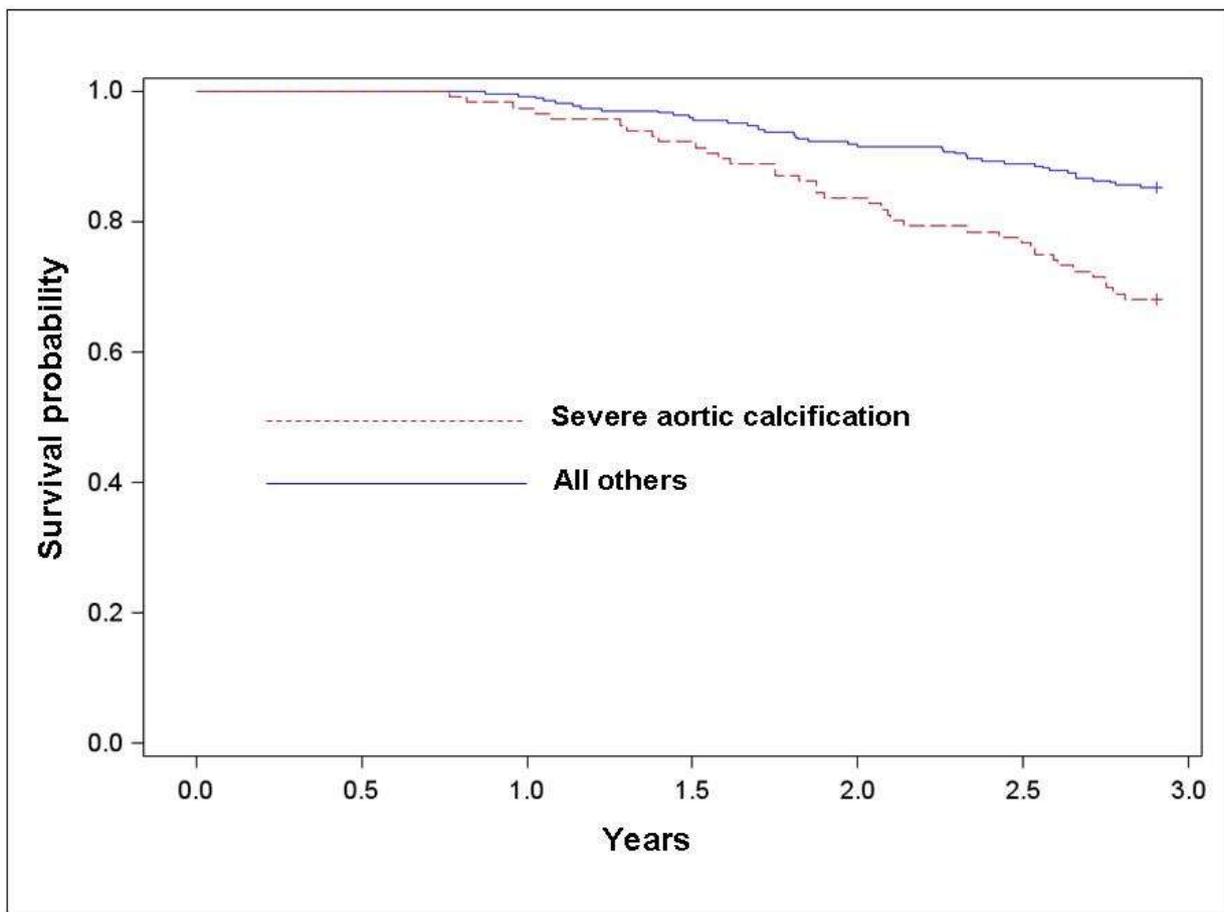
	n=387
Soggetti deceduti, n (%)	77 (19.9)
<i>Causa del decesso, n (%)</i>	
Morte improvvisa	2 (2.6)
Cardiovascolare	49 (63.6)
Neoplasia	5 (6.5)
Infettiva	11 (14.3)
Altro non cardiovascolare	10 (13.0)

Le CV dell'AoA e delle AI erano più comuni nei deceduti (90.9% vs 78.1% $p=0.01$ and 66.2% vs 53.6% $p=0.04$, respectively); le differenze erano più pronunciate quando erano

considerate solo le CV di grado severo (48.1%vs25.5% $p=0.0001$; 23.4%vs11.6% $p=0.007$) (Fig. 1).

Fig 1. Survival curve by presence of severe aortic calcifications

(log rank test $p < 0.0001$)



Fra i deceduti la ALP e la PCR erano significativamente più alte (99.0vs80.0pg/dl $p=0.0002$; 1.85vs1.54mg/L $p=0.03$, rispettivamente); mentre era significativamente più bassa la MGP totale (15.0vs19.7 nmol/L $p=0.02$). Seppur non significativi, i pazienti

deceduti avevano più FV (62·3% vs 53·6% p=0·16) e più bassi livelli di ucMGP (477 vs 584 nmol/L P=0·14). ALP e PCR erano predittori di mortalità (Tabella 1).

Table 1. Logistic regression with mortality as outcome

	HR	95% CI	p-value
Age (increase by 1 year)	1.047	1.024 - 1.070	<0.0001
PCR (increase by 1 Unit)	1.029	1.017 - 1.042	<0.0001
ALP (increase by 10 Units)	1.049	1.012 - 1.082	0.0056
Cerebrovascular event	1.917	1.046 - 3.515	0.0354
Angina	1.602	0.943-2.723	0.0813

Relativamente ai più bassi livelli di MGP totale (la quale include la parte carbossilata biologicamente attiva) tra i pazienti deceduti, recentemente Schlieper ha rilevato lo stesso dato di più bassi livelli di MGP carbossilata defosforilata associati ad aumentata mortalità (1). Anche l'associazione tra ALP e mortalità è già stata riportata in letteratura (2).

BIBLIOGRAFIA

1. Schlieper G, Westenfeld R, Kruger T et al. Circulating nonphosphorylated carboxylated matrix Gla protein predicts survival in ESRD. *J Am Soc Nephrol* 2011; **22**: 387-395
2. Drechsler C, Verduijn M, Pilz S et al. Bone alkaline phosphatase and mortality in dialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011; **6**: 1752-9

