

Mgr biol. Joanna Marowska(1), lek. med. Elżbieta Jelonek(2), mgr chemii Maria Kobylińska(1), dr n. med. Marzena Olszaniecka(2), dr n. med. Michał Lebidowski(2), prof. dr hab. n. med. Roman S. Lorenc(1)1. Zakład Biochemii i Medycyny Doświadczalnej, Instytut Pomnik - Centrum Zdrowia Dziecka Kierownik: prof. dr hab. n. med. Roman S. Lorenc2. Klinika Rehabilitacji Ogólnej, Instytut Pomnik - Centrum Zdrowia Dziecka Kierownik: dr n. med. Michał Lebidowski

Osteogenesis imperfecta (OI, wrodzona łamliwość kości) jest uogólnionym schorzeniem tkanki łącznej o heterogennym podłożu genetycznym (1,2), którego przyczyną są mutacje w genach COL1A1 i COL1A2, kodujących łańcuchy alfa1 i alfa2 kolagenu typu I - głównego białka strukturalnego zewnątrzkomórkowej macierzy kości, skóry i ścięgien (3). Przeważającą większość (ok. 85%) stanowią mutacje punktowe, prowadzące do zastąpienia glicyny, zajmującej co trzecią pozycję w łańcuchach polipeptydowych kolagenu typu I, przez inne aminokwasy (4). Fenotypy OI występują w populacji z częstością od 1:5000 do 1:10000. Schorzenie jest dziedziczone w sposób autosomalny dominujący, a u rodziców chorego może występować mozaikowatość pod względem tkankowej dystrybucji mutacji (5). Zgodnie z kwalifikacją Sillence'a (6), wyróżnia się 4 typy OI. Typ I (postać łagodna) obejmuje pacjentów z ilościowym defektem kolagenu, wynikającym ze zmniejszonej produkcji białka wskutek braku ekspresji zmutowanego allelu. Typy III i IV (postacie od cienkich do umiarkowanych) charakteryzują się defektem jakościowym, gdy zmutowane łańcuchy polipeptydowe ulegają inkorporacji do cząsteczek kolagenu, zaburzając jego strukturę. Typ II (postać najcieńsza) jest letalny in utero lub w okresie perinatalnym OI charakteryzuje się osteopenią, łamliwością kości, deformacją szkieletu, zahamowaniem wzrostu, przewlekłymi bólami kostnymi i ograniczeniem sprawności motorycznej (7). Nasilenie objawów klinicznych w postaciach nieletalnych jest uzależnione od typu OI - najmniejsze w typie I, największe w typie III. Przyczynowe leczenie OI nie jest obecnie możliwe. Nadzieje na przyszłość związane są z opracowaniem specyficznego hamowania ekspresji zmutowanego allelu (antisense suppression) w typach II-IV, dzięki czemu dochodziłoby do biochemicznej transformacji ciężkich form OI do postaci łagodnej, analogicznej do typu I (8), zasadniczym problemem jest jednak uzyskanie absolutnej swoistości wyłączenia zmutowanego allelu. Leczenie objawowe polega na zaopatrzeniu ortopedycznym, chirurgicznej korekcji deformacji szkieletu, terapii złamań oraz rehabilitacji, której celem jest uzyskanie i utrzymanie optymalnego stanu funkcjonalnego pacjenta. W ostatnich latach wskazuje się także na korzystny efekt leczenia antyresorpcyjnego (9-12) z zastosowaniem bisfosfonianów zawierających azot, które nie powodują defektów mineralizacji. Uzasadnieniem dla podjęcia tego typu leczenia jest niska masa kości, a także ich podwyższona resorpcja u pacjentów z OI (13), aczkolwiek w kwestii tej istnieją ciągłe kontrowersje (14). Ponieważ w większości opisanych przypadków obserwowano poprawę stanu klinicznego chorych dzieci, której nie towarzyszyły poważne skutki uboczne, próbę leczenia bisfosfonianami pacjentów z OI podjęto także w Klinice Rehabilitacji Ogólnej IP-CZD. Celem niniejszej pracy była biochemiczna ocena dynamiki wczesnych i długoterminowych zmian resorpcji tkanki kostnej w trakcie jednego cyklu terapii antyresorpcyjnej, ustalenie schematu pomiaru markerów resorpcji zapewniającego wiarygodne monitorowanie przebiegu leczenia, a także ocena jego bezpieczeństwa dla rosnącego szkieletu w aspekcie zachowania zdolności tkanki kostnej do modelowania i przebudowy wewnętrznej. PACJENCI Leczenie pamidronianem rozpoczęto u 6 dzieci w wieku 7-16 lat z rozpoznaniem ciężkich postaci (typy III-IV) osteogenesis imperfecta wg klasyfikacji Sillence'a (6), znacznym niedoborem wysokości ciała i gęstości kości w odcinku L2-L4 kręgosłupa lędźwiowego, deformacjami szkieletu, ograniczeniem sprawności ruchowej i podwyższonym wydalaniem z moczem markerów resorpcji kości - pirydynoliny (PYR) i deoksypirydynoliny (DPYR).

Charakterystykę pacjentów przed leczeniem przedstawiono w tabeli

1. <http://www.osteoforum.org.pl/gif/tab1-s1.gif> Rozpoznanie OI postawiono na podstawie obrazu klinicznego i radiologicznego. Protokół leczenia uzyskał akceptację Komitetu Etyki IP-CZD, a rodzice i dzieci wyrazili świadomą zgodę na terapię. Rodzice jednego z pacjentów wycofali zgodę na kontynuację leczenia, w związku z czym długotrwała obserwacja obejmuje 5 dzieci. LECZENIE Pamidronian dwusodowy (kwas 3-amino-1-hydroksypropylideno-1,1-bisfosfoniowy, Aredia, Ciba-Geigy, Bazylea, Szwajcaria) podawano cyklicznie w ciągu 3 kolejnych dni w postaci wlewów dożylnych (3-5 h), w dawce 1 mg/kg/d, rozcieńczonej w 250-500 ml izotonicznego płynu fizjologicznego. Przedział czasu dzielący poszczególne cykle podawania wynosił 4 miesiące. W celu uniknięcia hipokalcemii pacjenci otrzymywali ponadto wapń w postaci Calcium carboni***** (1200 mg/d) i witaminę D3 (800 IU/d). POMIARY Biochemiczne markery resorpcji kości oznaczano w surowicy i moczu. Krew pobierano od pacjentów na czczo przed infuzją pamidronianu oraz po 1, 2, 3 i 7 dobach cyklu leczenia. W surowicy oznaczano produkt degradacji C-telopeptydu kolagenu typu I, stosując zestaw Serum CrossLaps One Step ELISA firmy Osteometer BioTech A/S, Kopenhaga, Dania (dar firmy A New Therapy Co., Ltd, Warszawa). Metoda oparta jest na zastosowaniu dwóch wysoce specyficznych przeciwciał monoklonalnych, rozpoznających sekwencję AHD-beta-GGR łańcucha alfa1 kolagenu typu I, w której reszta kwasu asparaginowego (D) uległa beta-izomeryzacji (15). W trakcie pojedynczej inkubacji przeciwciała wychwytyują dwa beta-izomeryzowane epitopy, połączone wiązaniem sieciującym. Wewnątrz i międzyoznaczeniowy błąd precyzji wynosi poniżej 8% (dane producenta). Zakres referencyjny stężeń Serum CrossLaps w surowicy dzieci i młodzieży nie jest dostępny. Dla kobiet premenopauzalnych wynosi on 1748 ± 740 pmol/L (15). Pierwsze poranne zbiórki moczu wykonywano w ciągu 3 dni poprzedzających podanie pamidronianu, następnie codziennie do 9 dnia hospitalizacji. Po zakończeniu hospitalizacji pacjenci wykonywali samodzielnie zbiórki moczu w domu, średnio w odstępach 2-tygodniowych, a zamrożone próbki przywozili w lodzie przy okazji najbliższej wizyty w szpitalu. W moczu oznaczano stężenie całkowitej pirydynoliny (PYR) i deoksypirydynoliny (DPYR) przy zastosowaniu metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) połączonej z fluorymetryczną detekcją (16). Wewnątrz i międzyoznaczeniowy błąd precyzji wynosi poniżej 7%. Wyniki normalizowano na kreatyninę. Z-score obliczano na podstawie opracowanych w Zakładzie Biochemii i Medycyny Doświadczalnej IP-CZD wartości referencyjnych dla dzieci i młodzieży w wieku 3-18 lat (17). Pomiar gęstości minerału kostnego (BMD) w odcinku L2-L4 kręgosłupa wykonano metodą DEXA na aparacie Lunar DPX-L przed rozpoczęciem leczenia. Wyniki pacjentów porównano z własnymi wartościami referencyjnymi. WYNIKI Przed rozpoczęciem leczenia antyresorpcyjnego pacjenci charakteryzowali się niską gęstością kości w obrębie kręgosłupa lędźwiowego (BMD ZS = $-5,12 \pm 3,29$) oraz podwyższoną resorpcją kości, ocenianą na podstawie wydalania z moczem pirydynoliny i deoksypirydynoliny (PYR ZS = $3,55 \pm 2,46$; DPYR ZS = $2,90 \pm 2,94$) (tab. 1). Pamidronian w dawce 1 mg/kg/d powodował niemal natychmiastową supresję resorpcji kości (ryc. 1), wykrywaną przez sCTX już po pierwszej dobie cyklu leczenia (zmiana o $-26 \pm 11\%$ w stosunku do wartości wyjściowej, $p=0,002$), przez PYR i DPYR - po dwóch (odpowiednio $-43 \pm 7\%$ i $-54 \pm 9\%$, $p<0,0001$ dla obu). Maksymalną odpowiedź sCTX ($-77 \pm 12\%$, $p<0,0001$) obserwowano po trzech, PYR i DPYR - po sześciu dobach od rozpoczęcia leczenia (odpowiednio $-56 \pm 9\%$ i $-70 \pm 6\%$, $p<0,0001$), co korespondowało z obniżeniem się średniej wartości Z-score dla PYR od $3,55 \pm 2,46$ do $-0,32 \pm 1,77$, a dla DPYR od $2,90 \pm 2,94$ do $-1,30 \pm 1,30$. Wielkości maksymalnej odpowiedzi sCTX i DPYR na leczenie antyresorpcyjne nie różniły się znamienne (p=0,2264), podczas gdy odpowiedź PYR była mniejsza (sCTX vs PYR: p=0,0076; PYR vs DPYR: p=0,0001). Stanowiło to przyczynę podwyższenia o ok. 50% stosunku molarnego PYR/DPYR w ciągu pierwszego tygodnia cyklu (ryc.

1).<http://www.osteoforum.org.pl/gif/ryc1a.gif> Przed rozpoczęciem leczenia nie stwierdzono korelacji poziomów sCTX z PYR ($r=-0,386$, NS) i DPYR ($r=0,039$, NS), jednak zmiany poziomów markerów po podaniu pamidronianu wykazywały silną, znamioną korelację (sCTX vs PYR: $r=0,853$, sCTX vs DPYR: $r=0,889$, $p<0,0001$). Wydalanie pirydynoliny i deoksypirydynoliny z moczem było znamienne skorelowane zarówno przed ($r=0,869$, $p=0,0247$), jak i w trakcie leczenia ($r=0,950$, $p<0,0001$). W okresie maksymalnej supresji resorpcji kości wydalanie DPYR spadło u niektórych pacjentów poniżej dolnej granicy przedziału referencyjnego (ryc. 2), jednak było to zjawisko przejściowe.

<http://www.osteoforum.org.pl/gif/rycina2a.gif> <http://www.osteoforum.org.pl/gif/rycina2c.gif>

Dynamika długoterminowych zmian wydalania PYR i DPYR z moczem w czasie jednego cyklu leczenia pamidronianem charakteryzowała się dużą niejednorodnością, dlatego też przedstawiono ją w postaci mediany i zakresu (tab. 2) oraz indywidualnych wartości wyrażonych w Z-score (ryc. 2).

2).<http://www.osteoforum.org.pl/gif/tab2-s1.gif> Stwierdzono, że po miesiącu od podania pamidronianu wydalanie PYR i DPYR powróciło u 4 pacjentów do wartości zbliżonych do wyjściowych (tab. 2, ryc. 2), wykazując w dalszej części cyklu indywidualne fluktuacje, połączone z niewielką tendencją wzrostową lub spadkową. Jedynie u pacjentki GK, charakteryzującej się bardzo wysokim poziomem markerów przed leczeniem, wydalanie PYR i DPYR pozostało obniżone o ok. 50% w ciągu całego cyklu, znajdując się jednak powyżej górnej granicy zakresu referencyjnego (ryc. 2).

DYSKUSJA

Bisfosfoniany, syntetyczne analogi pirofosforanu odporne na enzymatyczną hydrolizę, ulegają specyficznej akumulacji w tkance kostnej, gdzie są potężnymi inhibitorami osteoklastycznej resorpcji kości (18). Celem zastosowania tych związków w leczeniu osteogenesis imperfecta jest próba zwiększenia masy kostnej pacjentów i redukcji ryzyka złamań, a także poprawa sprawności ruchowej i zmniejszenie przewlekłego bólu. Bisfosfoniany wpływają na zwiększenie masy kostnej dzięki temu, że zahamowanie resorpcji kości nie pociąga za sobą natychmiastowego zmniejszenia kościotworzenia, powodując czasową poprawę bilansu tkanki przez redukcję tzw. przestrzeni przebudowy (19). Oczekiwany efekt jest tym większy, im większa jest różnica między aktualną masą kości, a fizjologicznym poziomem równowagi, wyznaczonym przez mechaniczną stymulację szkieletu (20). Próby objawowego leczenia bisfosfonianami dzieci z ciężkimi postaciami OI są podejmowane od końca lat osiemdziesiątych. Opublikowane wyniki, obejmujące kilkuletni (do 7 lat) okres obserwacji, wskazują na poprawę stanu klinicznego większości pacjentów, zmniejszenie obrotu metabolicznego kości i zwiększenie ich gęstości, a także redukcję częstości złamań (9-12). Wprawdzie nie obserwowano poważnych skutków ubocznych terapii (w tym opóźnienia gojenia złamań), jednak stosowanie bisfosfonianów w okresie wzrastania organizmu może być potencjalnie niebezpieczne w przypadku długotrwałego, nadmiernego zahamowania obrotu tkanki kostnej, który jest podstawą jej odnowy, naprawy mikrozłamań oraz modelowania. Dlatego też celem naszej pracy była wnikliwa biochemiczna ocena dynamiki zmian resorpcji tkanki kostnej u dzieci z osteogenesis imperfecta, leczonych cyklicznie podawanym pamidronianem. Antyresorpcyjny efekt pamidronianu ujawnił się już w pierwszych dniach leczenia, czego dowodem było znamienne obniżenie poziomu CrossLaps w surowicy i wydalania z moczem pirydynoliny i deoksypirydynoliny. Czułość zastosowanych markerów, mierzona szybkością i rozmiarem odpowiedzi na leczenie, przedstawiała się następująco: sCTX>DPYR>PYR. Najstabsza i najpóźniejsza odpowiedź pirydynoliny na terapię antyresorpcyjną sugeruje znaczący udział jej pozakostnych źródeł w całkowitej puli w moczu. W okresie maksymalnego zahamowania resorpcji kości wydalanie PYR i DPYR nie spadło znacząco poniżej dolnej granicy przedziału referencyjnego, poziom supresji wydaje się, więc bezpieczny (pozostaje do ustalenia, czy zastosowany schemat podawania pamidronianu i jego dawka dają zamierzony efekt terapeutyczny w postaci zwiększenia masy kostnej i zmniejszenia częstości złamań). Supresja

resorpcji kości była ponadto u czworga dzieci przejściowa, powracając do wartości zbliżonych do wyjściowych po około 30 dniach od rozpoczęcia terapii. Jedynie u pacjentki GK, charakteryzującej się bardzo wysokimi podstawowymi poziomami PYR i DPYR (Z-score > 8), wydalanie markerów pozostało obniżone o ok. 50% przez cały cykl leczenia (120 dni), jednak wyrażone w wartościach bezwzględnych fluktuowało w pobliżu górnej granicy przedziału referencyjnego. Tak duże różnice w odpowiedzi pacjentów na leczenie pamidronianem wskazują na konieczność indywidualnego monitorowania jego przebiegu. Szczególnym problemem przy biochemicznej ocenie resorpcji kości u pacjentów z genetycznym defektem jakościowym kolagenu typu I (typy III i IV OI) jest interpretacja wyników pomiarów markerów. W moczu niektórych pacjentów z OI obserwowano np. wysoki stosunek molarny PYR/DPYR (BP i MK, tab. 1) przed leczeniem, który nie był uzasadniony współistniejącymi z OI schorzeniami. Wydaje się więc, że odzwierciedla on zaburzone proporcje obu rodzajów wiązań sieciujących w kolagenie macierzy kostnej, wskazując na zwiększenie stopnia hydroksylacji reszt lizyny w trakcie potranslacyjnej modyfikacji nieprawidłowego białka (21), co z kolei jest skutkiem opóźnionego tworzenia potrójnej helisy w obszarze N-końcowym cząsteczki w stosunku do zlokalizowania mutacji (22). Konsekwencją zwiększonej zawartości hydroksylizyny w kolagenie będzie preferencyjne powstawanie wiązań sieciujących typu pirydynoliny, zbudowanych z trzech reszt hydroksylizyny, kosztem m.in. deoksypirydynoliny, składającej się z dwóch reszt hydroksylizyny i jednej reszty lizyny (23). Z tego względu należy zachować ostrożność przy interpretacji wyników, gdyż wydalanie PYR może dawać zawyżoną, a DPYR zaniżoną ocenę rzeczywistego poziomu resorpcji kości. Interesującą obserwacją jest także brak korelacji poziomów sCTX w surowicy z wydalaniem pirydynoliny i deoksypirydynoliny z moczem przed leczeniem, podczas gdy zmiany w poziomach markerów, zachodzące w trakcie leczenia, wykazują silną i znamioną korelację. Wskazuje to na możliwość zaburzonej b-izomeryzacji asparagianu z sekwencji aminokwasów Asp-Gly w obrębie C-końcowego fragmentu telopeptydu łańcucha $\alpha 1$ (24), rozpoznawanego przez monoklonalne przeciwciała zastosowane w metodzie oznaczania. Tak więc Serum CrossLaps nie dają prawdopodobnie wiarygodnej oceny podstawowego poziomu resorpcji kości u dzieci z OI, są jednak czułym markerem odpowiedzi na leczenie. Reasumując, leczenie dzieci z osteogenesis imperfecta pamidronianem podawanym cyklicznie powoduje szybką, lecz u większości pacjentów przejściową supresję resorpcji kości, której poziom wydaje się bezpieczny. Wielkość odpowiedzi deoksypirydynoliny i sCTX na terapię jest podobna, obydwa markery mogą, więc być stosowane do jej monitorowania, jednak sCTX jest prawdopodobnie niewiarygodnym wskaźnikiem podstawowego tempa resorpcji u dzieci z OI. W schorzeniach typu OI, w których może dochodzić do strukturalnych zmian w kolagenie tkanki kostnej, należy zachować szczególną ostrożność przy interpretowaniu poziomów markerów obrotu kostnego, opartych na pomiarach produktów metabolizmu tego białka, rozważając możliwość zwiększonej potranslacyjnej modyfikacji cząsteczek (z preferencyjnym tworzeniem pirydynoliny w procesie sieciowania), a także zlokalizowania mutacji w epitopie rozpoznawanym przez przeciwciała stosowane w immunologicznych metodach oznaczania.