

## Comunicazioni Orali

© CIC EDIZIONI INTERNAZIONALI

© CIC EDIZIONI INTERNAZIONALI

**INCIDENCE AND COSTS OF HIP FRACTURE VS. STROKES IN ITALY BETWEEN 2000 AND 2005**Giovanni Iolascon<sup>a</sup>, Prisco Piscitelli<sup>a,b</sup>, Alberto Migliore<sup>c</sup>, Alessandra Gimigliano<sup>a</sup>, Raffaele Gimigliano<sup>a</sup><sup>a</sup> Second University of Naples, Naples (Italy); <sup>b</sup> ISBEM, Brindisi (Italy); <sup>c</sup> "San Pietro-Fatebenefratelli" Hospital, Rome (Italy)

**Objectives.** Both hip fractures in the elderly and strokes are known to be a major cause of mortality and disability in Italy. The aim of this study is to analyze incidence and costs of hip fractures in the elderly and strokes in Italy between 2000 and 2005. **Methods.** We examined the national hospitalization database (SDO) at the Italian Ministry of Health. Hip fractures were defined by the following ICD-9CM diagnosis codes: 820.0-820.1. Strokes were defined by ICD-9CM diagnosis codes 430, 431, 432 (hemorrhagic strokes), 433 and 434 (ischemic strokes), 435 (TIA). Analysis of direct costs was based on diagnosis-related groups (DRGs). We adopted a 15% average reduction in order to take into account the regional drop out of DRG rates. About 30% of costs ascribed to DRG 209 and 80% of costs ascribed to DRGs 210, 211, 235 and 236 were attributable to a main diagnosis of hip fracture. DRGs 14 and 15 (TIA) were attributable to a major diagnosis of stroke. **Results.** The number of hospitalizations (Table 1) following hip fractures in the elderly and strokes was continuously growing from 2000 to 2005. On the other hand, direct costs (Table 2) sustained by the National Health System for hip fractures grew from 343 to 467 millions euros (+26,5% across 5 years), while costs attributable to strokes were stable, with a reduction trend more remarkable in patients affected by TIA (-17%).

Table 1/Tabella 1. Hospitalizations due to hip fractures in the elderly and strokes (Italy). Ricoveri per fratture femorali degli anziani e per ictus cerebrali (Italia, 2000-2005).

	2000		2001		2002		2003		2004		2005	
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
<i>Subtotal hip fractures &gt;65</i>												
Subtotale fratture femorali >65	16.037	57.456	16.869	61.485	17.297	63.507	19.720	70.076	19.872	70.881	20.909	73.562
<i>Total hip fractures &gt;65</i>												
<b>Totale Fratture &gt;65</b>	<b>73.493</b>		<b>78.354</b>		<b>80.804</b>		<b>89.796</b>		<b>90.753</b>		<b>94.471</b>	
<i>Subtotal strokes</i>												
Subtotale ictus cerebrali	92.418	85.745	95.056	88.612	99.191	92.381	98.778	91.931	100.306	91.764	100.927	92.331
<i>Total strokes</i>												
<b>Totale ictus cerebrali</b>	<b>178.163</b>		<b>183.668</b>		<b>191.572</b>		<b>190.709</b>		<b>192.070</b>		<b>193.258</b>	

Table 2/Tabella 2. Direct costs (millions euros) of hip fractures in the elderly and strokes in Italy (2000-2005). Costi diretti (milioni di euro) delle fratture femorali degli anziani e degli ictus cerebrali in Italia (2000-2005).

Anno	Strokes overall direct costs >45 Totale costi diretti ospedalieri ictus cerebrali (compresi TIA)	Directs costs TIA only Totale costi diretti Sottogruppo TIA	Hip fractures direct costs > 65 Totale costi diretti ospedalieri fratture femorali >65 anni
2000	576	151	343
2001	574	149	373
2002	589	147	394
2003	573	138	433
2004	570	135	448
2005	560	129	467

**INCIDENZA E COSTI DELLE FRATTURE FEMORALI E DEGLI ICTUS CEREBRALI IN ITALIA DAL 2000 AL 2005**Giovanni Iolascon<sup>a</sup>, Prisco Piscitelli<sup>a,b</sup>, Alberto Migliore<sup>c</sup>, Alessandra Gimigliano<sup>a</sup>, Raffaele Gimigliano<sup>a</sup><sup>a</sup> Seconda Università degli Studi di Napoli; <sup>b</sup> ISBEM, Brindisi; <sup>c</sup> Ospedale San Pietro-Fatebenefratelli, Roma

**Obiettivi.** Le fratture femorali degli anziani e degli ictus cerebrali nella popolazione italiana sono causa non trascurabile di mortalità e disabilità. Obiettivo del presente studio è quello di confrontare l'impatto in termini di salute e di costi per i cittadini e per il SSN nel quinquennio 2000-2005. **Metodi.** Lo studio si basa sull'analisi dei dati dell'archivio "Schede di Dimissione Ospedaliera" (SDO) del Ministero della Salute, relative agli anni 2000-2005. Sono stati identificati i codici ICD-9CM per diagnosi principale di frattura femorale (820.0 e 820.1) e di ictus cerebrale (430, 431, 432 per gli ictus emorragici, 433 e 434 per gli ictus ischemici, 435 per i TIA). I dati sono stati stratificati per 3 gruppi di età (45-64, 65-74, >75 anni). Per il calcolo dell'incidenza sono stati utilizzati i dati di popolazione ISTAT. L'analisi dei costi diretti si basava sui DRG relativi agli interventi ed alla degenza ospedaliera per queste tipologie di diagnosi principale. Erano attribuibili a diagnosi di frattura femorale il 30% del DRG 209 e l'80% dei DRG 210, 211, 235, 236. I DRG considerati per gli ictus cerebrali erano il 14 ed il 15 (TIA). Si praticava inoltre un abbattimento del 15% per tener conto della riduzione media attuata a livello regionale. **Risultati.** Il numero di ricoveri (Tabella 1) per fratture femorali degli anziani e per ictus cerebrale risultava in aumento nell'arco del quinquennio. Tuttavia, mentre i costi diretti (Tabella 2) sostenuti dal SSN per le fratture femorali passavano da 343 a 467 milioni di euro, con un incremento del 26,5% in 5 anni, i costi diretti degli ictus cerebrali, ancorché superiori, restavano stabili (trend in diminuzione), nonostante l'incremento dei ricoveri tra il 2000 ed il 2005, con una riduzione netta nel sottogruppo di pazienti con TIA (-17%).

## “RISK ASSESSMENT” IN OSTEOPOROSIS: COMPARISON AND EVALUATION OF THE BIOMETRIC CHARACTERISTICS OF THE MAIN RISK INDEXES

Stefania Gasparini, Fausto Salaffi, Walter Grassi

Chair of Rheumatology, Università Politecnica delle Marche, Ancona, Ancona (Italy)

**Introduction.** The development of a screening instrument to identify women who are at risk of osteoporosis seems to be the most effective strategy to reduce complications and costs. Many instruments have been proposed with the aim of supporting the decisional process of the clinician in the stratification of the risk of osteoporosis for women in postmenopausal age. **Aims.** The main purpose of this study is to compare the biometric characteristics of a screening algorithm, defined OPERA (Osteoporosis PrEscreening Risk Assessment), recently validated in the Italian population, with those ones of other algorithms proposed by literature. Another aim is to define the “cut-off points” which are discriminant for every single risk index in the Italian population. **Patients and methods.** 169 women between 47 and 86 years old have been recruited (average age 69 years old). All the participants have brought a recent DXA valuation to see (made within 6 months from the check) of the femoral neck and/or of the lumbar spine. Patients have been so divided into the following two groups: Group 1: healthy women in post menopausal age, without osteoporosis; Group 2: women suffering from osteoporosis post menopausal with and without vertebral fractures. All the patients have filled a questionnaire which included socio demographic and clinical parameters, required by the singles risk indexes. Later, for every patient have been calculated the following risk indexes: Osteoporosis Risk Assessment Instrument-ORAI, Osteoporosis Index of Risk-OSIRIS, Simple Calculated Osteoporosis Risk Estimation-SCORE, Age Bulk One or Never Estrogen-ABONE, Osteoporosis Self-Assessment Tool for Asian-OSTA. **Results.** The study of the characteristic operative curves (ROC Curves) for the six index taken in exam, has demonstrated a superimposable discriminant validity. ROC curve of the OPERA index, even if it didn't show a significant difference with the other five indexes, shows, anyway, a highest AUC ( $0,82 \pm 0,32$  with 95% IC,  $0,785-0,878$ ). In particular, OPERA has shown an high sensibility, of 91,4% and a good specificity, of 68,4%. Moreover, it has resulted the index with the most competitor validity. **Conclusion.** The use of these indexes of the osteoporosis risk and, in particular, of the OPERA index can give a quick and cheap strategy to identify women in postmenopausal age which are at risk of osteoporosis and, consequently, at risk of fracture due to fragility. The use of this strategy can improve, in the future, the access to the use of DXA, minimizing the total number of necessary exams and, consequently, reducing the costs.

## “RISK ASSESSMENT” NELL’OSTEOPOROSI: COMPARAZIONE E VERIFICA DELLE CARATTERISTICHE BIOMETRICHE DEI PRINCIPALI INDICI DI RISCHIO

Stefania Gasparini, Fausto Salaffi, Walter Grassi

Cattedra di Reumatologica, Università Politecnica delle Marche, Ancona

**Introduzione.** Lo sviluppo di uno strumento di screening per identificare donne a rischio di osteoporosi appare essere la più efficace strategia per ridurre le complicanze ed i costi. Numerosi strumenti sono stati proposti allo scopo di supportare il processo decisionale del clinico nella stratificazione del rischio di osteoporosi nelle donne in età postmenopausale. **Scopi.** Il principale obiettivo di questo studio è stato quello di comparare le caratteristiche biometriche di un algoritmo di screening definito OPERA (Osteoporosis PrEscreening Risk Assessment), recentemente validato nella popolazione italiana, con quelle di altri algoritmi proposti dalla letteratura. Un ulteriore obiettivo è quello di ridefinire i “cut-off points” discriminanti per ogni singolo indice di rischio nella popolazione italiana. **Pazienti e metodi.** Sono state consecutivamente reclutate 169 donne in età compresa fra 47 e 86 anni (media di  $69 \pm 8$  anni). Tutte le partecipanti hanno portato in visione una recente valutazione DXA (effettuata entro 6 mesi dal controllo) del collo femorale e/o della colonna lombare. Le pazienti sono state così suddivise nei seguenti 2 sottogruppi: Gruppo 1: donne sane in età postmenopausale, non affette da osteoporosi; Gruppo 2: donne affette da osteoporosi postmenopausale con e senza fratture vertebrali. Tutte le pazienti hanno compilato un questionario, il quale comprendeva parametri socio-demografici e clinici richiesti dai singoli indici di rischio. Successivamente, per ogni paziente sono stati calcolati i seguenti indici di rischio: Osteoporosis Risk Assessment Instrument-ORAI, Osteoporosis Index of Risk-OSIRIS, Simple Calculated Osteoporosis Risk Estimation-SCORE, Age Bulk One or Never Estrogen-ABONE, Osteoporosis Self-Assessment Tool for Asian-OSTA. **Risultati.** Lo studio delle curve caratteristiche operative (curve ROC) per i sei indici in esame, ha dimostrato una sovrapponibile validità discriminante. La curva ROC relativa all'indice OPERA, pur non mostrando una significativa differenza con gli altri cinque indici, mostra, tuttavia, una AUC più elevata ( $0,82 \pm 0,32$  con IC al 95%  $0,758-0,878$ ). In particolare, OPERA ha mostrato una elevata sensibilità, pari al 91,4% ed una buona specificità, pari al 68,4%. Inoltre, esso è risultato l'indice con una maggiore validità concorrente. **Conclusioni.** L'impiego di tali indici di rischio di osteoporosi e, in particolare, dell'indice OPERA può fornire una rapida e poco costosa strategia per identificare donne in età postmenopausale a rischio di osteoporosi e conseguentemente a rischio di frattura da fragilità. L'impiego di tale strategia potrà migliorare, in un prossimo futuro, l'accesso all'utilizzo della DXA, minimizzando il numero totale di esami necessari e conseguentemente riducendo i costi.

## NON-CONVENTIONAL STATISTIC ANALYSIS IN THE STUDY OF FRAGILITY FRACTURE RISK FACTORS: ANALYSIS FROM GISMO LOMBARDIA DATABASE

Maurizio Bevilacqua<sup>a</sup>, Enzo Grossi<sup>b</sup>, Giorgio Gandolini<sup>c</sup>, Marco Massarotti<sup>d</sup>, Iacopo Chiodini<sup>e</sup>, Matteo Longhi<sup>f</sup>, Luca Pietrogrande<sup>g</sup>, Ivana Santi<sup>h</sup>

<sup>a</sup> Service of Endocrinology, Hospital "Sacco" of Milan (Italy)

<sup>b</sup> Italian Diagnostic Centre, Milan (Italy)

<sup>c</sup> Unit of Rheumatology, Scientific Institute "Don Gnocchi" of Milan (Italy)

<sup>d</sup> Unit of Rheumatology, Scientific Institute "Humanitas" of Rozzano, Milan (Italy)

<sup>e</sup> Unit of Endocrinology and Diabetology, "IRCCS Policlinico" of Milan (Italy)

<sup>f</sup> Unit of Rheumatology Scientific Institute "Galeazzi" of Milan (Italy)

<sup>g</sup> University of Milan, O.U. of Orthopaedics, "Polo San Paolo", Milan (Italy)

<sup>h</sup> Institute "Pio Albergo Trivulzio" of Milan (Italy)

Innovative statistic analyses promise to be more effective with many complex variables. The Artificial Neural Networks (ANNs) computer algorithms inspired by the highly interactive processing of the human brain, exposed to complex data sets, can learn the underlying laws that associate different variables to a definite outcome. A new non linear mapping method (PST, Semeion Institute), a special kind of evolutionary algorithm belonging to the family of unsupervised artificial adaptive systems, is able to perform a multidimensional scaling of variables finding out their optimal spatial distribution in bidimensional space, revealing hidden "connections" or "associations" between descriptors that can be overlooked relying only on their linear correlation. A cooperative Italian database of 490 osteoporotic women described by 39 variables was analysed to evaluate the capacity of ANNs to recognise patients with ( $VF^+$ ,  $n=214$ ) or without ( $VF^-$ ,  $n=276$ ) vertebral fracture on the basis of classical bone osteoporotic risk factors. The performance of ANN and LR (logistic regression) were assessed by calculating the percentage of correct identifications of  $VF^+$  and  $VF^-$  patients (sensitivity and specificity, respectively) and the prediction accuracy (arithmetic mean between sensitivity and specificity). The results showed that ANNs can be trained to identify  $VF^+$  and  $VF^-$  subjects more accurately than logistic regression. In the same database the association between arterial hypertension (HA) and  $VF^+$ , suggested by conventional statistics (prevalence of AH in  $VF^+$  41.1%, in  $VF^-$ : 31.5%), was studied with PST and Principal Component Analysis (PCA), a linear statistical analysis. A natural clustering of AH and  $VF^+$  was observed with PCA and with PST algorithm as well. With PST algorithm procedure the association among these variables was unquestionable, pointing out the existence of a real interdependence among these two conditions. Further work is required to explain the possible mechanisms of

Model	Sensitivity	Specificity	Overall accuracy
LR	44.26%	54.88%	49.57%
ANNs	63.70%	44.21%	53.96%
ANNs (selected var)	75.00%	75.00%	75.00%

the interdependence between AH and OP, given the complexity of variables associations.

## IMPIEGO DELLA STATISTICA NON CONVENZIONALE NELLO STUDIO DEI FATTORI DI RISCHIO PER FRATTURA DA FRAGILITÀ: ANALISI DEL DATABASE GISMO LOMBARDIA

Maurizio Bevilacqua<sup>a</sup>, Enzo Grossi<sup>b</sup>, Giorgio Gandolini<sup>c</sup>, Marco Massarotti<sup>d</sup>, Iacopo Chiodini<sup>e</sup>, Matteo Longhi<sup>f</sup>, Luca Pietrogrande<sup>g</sup>, Ivana Santi<sup>h</sup>

<sup>a</sup> Servizio di Endocrinologia, Ospedale "Sacco", Milano

<sup>b</sup> Centro Diagnostico Italiano, Milano

<sup>c</sup> Unità di Reumatologia, IRCCS "Don Gnocchi", Milano

<sup>d</sup> Unità di Reumatologia, IRCCS "Humanitas", Rozzano (MI)

<sup>e</sup> Unità di Endocrinologia e Diabetologia, IRCCS Policlinico di Milano

<sup>f</sup> Unità di Reumatologia, IRCCS "Galeazzi", Milano

<sup>g</sup> Università degli Studi di Milano, U.O. di Ortopedia, "Polo San Paolo", Milano

<sup>h</sup> Istituto "Pio Albergo Trivulzio", Milano

Tecniche innovative di analisi statistica promettono di essere più efficaci in presenza di molte variabili complesse. Le Reti Neurali Artificiali (Artificial Neural Networks - ANNs) algoritmi ispirati al processo interattivo tipico del cervello umano, apprendono le sottostanti leggi di associazione tra differenti variabili in rapporto ad un definito evento. Il metodo di mappazione non lineare (PST, Semeion Institute) attraverso una valutazione multidimensionale delle variabili, trova la loro distribuzione ottimale in uno spazio bidimensionale, svelando connessioni inosservate attraverso le correlazioni lineari. Abbiamo analizzato i dati del database cooperativo del GISMO Lombardia (490 donne osteoporotiche descritte da 39 variabili) con le ANNs per verificarne la capacità di riconoscere le pazienti con fratture vertebrali ( $VF^+$ = 214) da quelle senza fratture ( $VF^-$  = 276) sulla base dei comuni fattori di rischio confrontando la loro resa con quella della regressione lineare (LR) e calcolando la percentuale di corrette identificazioni delle pazienti  $VF^+$  e  $VF^-$  (sensibilità e specificità rispettivamente) e l'accuratezza di predizione (media tra sensibilità e specificità). Le ANNs possono essere addestrate ad identificare i pazienti  $VF^+$  e  $VF^-$  più accuratamente della LR. Sulla stessa base dati abbiamo applicato il PST ed un metodo di statistica lineare (Principal Component Analysis (PCA) per verificare una relazione tra pazienti ed ipertensione arteriosa, suggerita dalla statistica tradizionale nella nostra base dati (prevalenza di ipertensione 41.1% in  $VF^+$  e 31.5% in  $VF^-$ ). Una naturale associazione tra ipertensione e  $VF^+$  è stata osservata sia con la PCA che con il PST, che però ha definito questa associazione come non dubbia, suggerendo un'interdipendenza reale tra le due variabili. Ulteriore lavoro è necessario per spiegare questa interdipendenza, data la complessità delle associazioni di variabili.

## LARGE COLLABORATIVE STUDY ON GEOGRAPHIC VARIATION OF *SQSTM1* MUTATIONS IN PAGET'S DISEASE OF BONE IN ITALY

Luigi Gennari<sup>a</sup>, Fernando Gianfrancesco<sup>b</sup>, Marco Di Stefano<sup>c</sup>, Domenico Rendina<sup>d</sup>, Daniela Merlotti<sup>a</sup>, Teresa Esposito<sup>b</sup>, Vincenzo De Paola<sup>a</sup>, Andrea Aloia<sup>b</sup>, Giuseppe Martini<sup>a</sup>, Manuela Mazzetti<sup>c</sup>, Salvatore Gallone<sup>e</sup>, Innocenzo Rainero<sup>e</sup>, Lorenzo Pinessi<sup>e</sup>, Giancarlo Isaia<sup>c</sup>, Pasquale Strazzullo<sup>d</sup>, Ranuccio Nuti<sup>a</sup>, Giuseppe Mossetti<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Department of Internal Medicine, Endocrine-Metabolic Sciences and Biochemistry, University of Siena, Siena (Italy)

<sup>b</sup> Institute of Genetics and Biophysics, CNR (Italian National Research Council), Naples (Italy)

<sup>c</sup> Internal Medicine, University of Turin, Turin (Italy)

<sup>d</sup> Clinical and Experimental Medicine, Second University "Federico II" of Naples, Naples (Italy)

<sup>e</sup> Neurosciences, University of Turin, Turin (Italy)

Paget's disease of bone (PDB) is a chronic disease of the skeleton with a consistent genetic component. The geographic distribution of PDB is not uniform, with a higher prevalence of the disease in populations of British descent. Moreover increased prevalence areas have been described in different Countries. We recently characterized an area of increased prevalence of PDB in the region of Campania, in Southern Italy. Patients from this region also showed increased severity of disease with peculiar phenotypic characteristics and an increased number of familial cases. In this study we examined the clinical characteristics, and the prevalence and type of *SQSTM1* mutations in a large sample of 542 unrelated PDB subjects from several regions including 164 patients from Campania. Ten different *SQSTM1* mutations were observed in 29% and 10% of familial and sporadic PDB cases, respectively. Four of these mutations, M401V, A427D, G425E, and Y383X were novel and have not been previously described. The other mutations, P387L, P392L, M404V, G425R, E396X and G411S have been previously described. A higher prevalence of *SQSTM1* mutations was observed in polyostotic than monostotic cases (7% vs 22%;  $p < 0.005$ ). The distribution of mutations in this sample was more heterogeneous than in other countries, with an increased prevalence of the M404V. In keeping with previous studies, the P392L was however the most common observed mutation in both sporadic and familial cases. Genotype-phenotype analysis confirmed an increased severity of disease and an earlier age of onset in mutations that insert a stop codon. Interestingly, in PDB subjects from Campania a different distribution and number of mutations was observed with respect to the other regions. In particular, in this region less than 20% of familial PDB had *SQSTM1* mutation, as compared to 36% in the other regions. This might imply the presence of mutations in different genes as well the persistence of a possible environmental trigger, or both these conditions.

## VARIAZIONI GEOGRAFICHE DELLE MUTAZIONI DEL GENE *SQSTM1* NEL MORBO DI PAGET IN ITALIA

Luigi Gennari<sup>a</sup>, Fernando Gianfrancesco<sup>b</sup>, Marco Di Stefano<sup>c</sup>, Domenico Rendina<sup>d</sup>, Daniela Merlotti<sup>a</sup>, Teresa Esposito<sup>b</sup>, Vincenzo De Paola<sup>a</sup>, Andrea Aloia<sup>b</sup>, Giuseppe Martini<sup>a</sup>, Manuela Mazzetti<sup>c</sup>, Salvatore Gallone<sup>e</sup>, Innocenzo Rainero<sup>e</sup>, Lorenzo Pinessi<sup>e</sup>, Giancarlo Isaia<sup>c</sup>, Pasquale Strazzullo<sup>d</sup>, Ranuccio Nuti<sup>a</sup>, Giuseppe Mossetti<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Dipartimento di Medicina Interna, Scienze Endocrino-Metaboliche e Biochimica, Università degli Studi di Siena

<sup>b</sup> Istituto di Genetica e Biofisica, CNR, Napoli

<sup>c</sup> Medicina Interna, Università degli Studi di Torino

<sup>d</sup> Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi "Federico II" di Napoli

<sup>e</sup> Neuroscienze, Università degli Studi di Torino

La malattia ossea di Paget (PDB) è un disordine cronico dello scheletro con una forte componente genetica. La distribuzione geografica non è uniforme con un'alta prevalenza nei discendenti delle popolazioni britanniche. Recentemente abbiamo descritto un'area ad elevata prevalenza di PDB nella Campania. I pazienti campani presentano una maggiore severità della malattia, con peculiari caratteristiche fenotipiche ed un aumentato numero di familiari affetti. In questo studio abbiamo esaminato le caratteristiche cliniche, la prevalenza e il tipo di mutazione del gene *SQSTM1* in un'ampia coorte di 542 soggetti affetti da PDB, provenienti da differenti regioni, inclusi 164 campani. Dieci differenti mutazioni nel gene *SQSTM1* sono state osservate nel 25% e 10% dei casi familiari e sporadici, rispettivamente. Quattro di queste mutazioni, M401V, A427D, G425E e Y383X erano sconosciute e mai descritte prima, mentre P387L, P392L, M404V, G425R, E396X e G411S erano già state descritte. È stata osservata una maggiore prevalenza di mutazioni del gene *SQSTM1* nei soggetti poliostotici rispetto a quelli monostotici (7% vs 22%;  $p < 0.005$ ). La distribuzione delle mutazioni è apparsa più eterogenea rispetto agli altri paesi, con un'augmentata prevalenza di M404V. Tuttavia la mutazione P392L è risultata più comune sia nei casi poliostotici che monostotici. Le analisi genotipo-fenotipo hanno confermato una maggiore severità della malattia e una più bassa età d'insorgenza in quei soggetti con mutazioni che determinano un codone di stop. È interessante notare che nei soggetti campani è stata osservata una differente distribuzione nel numero e nella prevalenza delle mutazioni rispetto alle altre regioni. In particolare, in questa regione meno del 20% dei PDB familiari presenta una mutazione sul gene *SQSTM1*, rispetto al 36% osservato nelle altre regioni. Questo potrebbe evidenziare la presenza di mutazioni in differenti geni così come la persistenza di possibili attivatori ambientali, o di entrambe queste situazioni.

## 25-HYDROXYVITAMIN D LEVELS AND ITS EFFECT ON 1,25-DIHYDROXYVITAMIN D (1,25D) LEVELS IN PREDIALYSIS CHRONIC RENAL (CRF) FAILURE AND IN RENAL TRANSPLANTATION (TX)

Marzia Pasquali<sup>a</sup>, Sandro Mazzaferro<sup>a</sup>, Maria Luisa Muci<sup>a</sup>, Franco Citterio<sup>b</sup>, Antonio Gargiulo<sup>b</sup>, Camina Conte<sup>a</sup>, Valeria Fassino<sup>a</sup>, Raffaella Lavini<sup>a</sup>, Giusy Mandanici<sup>a</sup>, Leano Violo<sup>a</sup>, Francesco Pugliese<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Clinical Sciences, University "La Sapienza" of Rome, Rome (Italy); <sup>b</sup> Policlinico "A. Gemelli", Rome (Italy)

Vitamin D status (as indicated by 25-hydroxyvitamin D levels, 25D) is known to affect serum 1,25D levels. We evaluated if the role of vitamin D status is the same in predialysis CRF and in pts submitted to transplantation. Serum 25D and 1,25D averaged respectively 19±13 ng/ml and 26±18 pg/ml in 111 pts with CRF (age 63±15; CCI 40±24 ml/min) and 26±18 ng/ml (p<.0001 vs CRF) and 44±24 pg/ml (p<.0001 vs CRF) in 141 Tx (age 51±11; CCI 54±21 ml/min). The potential role of vitamin D deficit on 1,25D levels was assessed by splitting pts into three groups according to vitamin D status [repletion (REP): >30 ng/ml; insufficiency (INS): 15-30 ng/ml; deficiency (DEF): <15 ng/ml.]. A DEF condition was more likely occur in CRF as compared to Tx (DEF 42% vs 21%). 1,25D levels were always lower in CRF than in Tx, in each of the vitamin D condition considered (DEF 17±9,3 vs 34±16 p<.0001; INS 32±20 vs 46±25 p<.002; REP 35±17 vs 49±25 p<.03, pg/ml). The difference in renal function observed between the two populations, prompted us to evaluate pts separately, according to CCI values <45 or > 45 ml/min. In pts with CCI <45 ml/min (see table), 1,25D levels were lower in CRF as compared to Tx, for any level of 25D; but the two populations were still different for age and renal function.

25OH status	CCI < 45 ml/min						CCI > 45 ml/min					
	DEF		INS		REP		DEF		INS		REP	
	CRF	Tx	CRF	Tx	CRF	Tx	CRF	Tx	CRF	Tx	CRF	Tx
1,25D, pg/ml	15±8	25±19*	24±11	38±17 <sup>^</sup>	23±9	34±16*	25±8	39±12 <sup>°</sup>	44±25	49±27	54±7	64±24
ClCr, ml/min	25±10	32±8*	27±10	35±5 <sup>^</sup>	28±9	35±7	61±15	58±12	71±18	67±17	75±21	73±20
Age, years	72±12	54±14 <sup>°</sup>	73±18	57±8 <sup>°</sup>	77±13	50±12 <sup>°</sup>	57±14	52±8	59±14	48±11	55±15	47±11

CRF vs Tx: \* p<.05; <sup>^</sup> p<.01; <sup>°</sup> p<.001

CRF vs Tx : <sup>°</sup> p<.001

In pts with CCI >45 ml/min (see table), 1,25D levels were similar between CRF and Tx in case of REP and INS but not in case of DEF; significantly, in this analysis age and renal function were not different.

We conclude that vitamin D deficit is a possible cause of 1,25D reduction mainly when renal function is significantly impaired. Moreover, Tx pts seem to accommodate better than CRF pts do to vitamin D deficiency.

## STATO DI REPLEZIONE DI 25-IDROSSI-VITAMINA D E SUA INFLUENZA SUI LIVELLI SIERICI DI 1,25-DIIDROSSI-VITAMINA D (1,25D) NELLA INSUFFICIENZA RENALE CRONICA IN PREDIALISI (IRC) E NEL TRAPIANTO RENALE (Tx)

Marzia Pasquali<sup>a</sup>, Sandro Mazzaferro<sup>a</sup>, Maria Luisa Muci<sup>a</sup>, Franco Citterio<sup>b</sup>, Antonio Gargiulo<sup>b</sup>, Camina Conte<sup>a</sup>, Valeria Fassino<sup>a</sup>, Raffaella Lavini<sup>a</sup>, Giusy Mandanici<sup>a</sup>, Leano Violo<sup>a</sup>, Francesco Pugliese<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Dipartimento di Scienze Cliniche, Università degli Studi "La Sapienza", Roma; <sup>b</sup> Policlinico A. Gemelli, Roma

Abbiamo valutato lo stato di replezione in 25idrossi-Vitamina D (25D) e l'eventuale influenza sui livelli sierici di 1,25D in 111 pz con IRC predialisi (età 63±15 aa, CCr 40±24 ml/min) ed in 141 Tx (età 51±11 aa, CCr 54±21 ml/min). Dividendo le due popolazioni in base allo stato di 25D [replezione (REP): >30 ng/ml; insufficienza (INS): 15-30 ng/ml; deficit (DEF): <15 ng/ml], lo stato di DEF era più frequente nella IRC rispetto al Tx (42% vs 21%). In tutti e tre gli stati di 25D i livelli medi di 1,25D erano più bassi nella IRC rispetto al Tx (DEF 17±9,3 vs 34±16 p<.0001; INS 32±20 vs 46±25 p<.002; REP 35±17 vs 49±25 p<.03, pg/ml) e nella IRC era diversa anche la funzione renale. Data la differenza nel valore medio di CCr tra le due popolazioni le abbiamo suddivise anche in base a due livelli di CCr:<45 e > 45 ml/min. Nel gruppo con CCr <45 ml/min, i livelli di 1,25 sono risultati inferiori nella IRC rispetto al Tx per qualsiasi livello di 25D, ma le due popolazioni erano ancora differenti per CCr ed età (vedi tab.). Nel gruppo con CCr >45 ml/min, i livelli di 1,25D nei tre stati vitaminici erano simili nella IRC e nel Tx tranne che per lo stato di Deficit, mentre CCr ed età risultano paragonabili (vedi tab.). Pertanto, lo stato carenziale di vitamina D sembra diventare una causa di riduzione dei livelli di 1,25D soprattutto quando vi sia una concomitante e significativa insufficienza renale. Nei pazienti Tx sembra esserci una maggiore adattabilità alla carenza di vitamina D.

25 OH	CCr < 45 ml/min						CCr > 45 ml/min					
	DEF		INS		REP		DEF		INS		REP	
	IRC	Tx	IRC	Tx	IRC	Tx	IRC	Tx	IRC	Tx	IRC	Tx
1,25D, pg/ml	15±8	25±19*	24±11	38±17 <sup>^</sup>	23±9	34±16*	25±8	39±12 <sup>°</sup>	44±25	49±27	54±7	64±24
ClCr, ml/min	25±10	32±8*	27±10	35±5 <sup>^</sup>	28±9	35±7	61±15	58±12	71±18	67±17	75±21	73±20
Età, anni	72±12	54±14 <sup>°</sup>	73±18	57±8 <sup>°</sup>	77±13	50±12 <sup>°</sup>	57±14	52±8	59±14	48±11	55±15	47±11

IRC vs Tx: \* p<.05; <sup>^</sup> p<.01; <sup>°</sup> p<.001

IRC vs Tx: <sup>°</sup> p<.001

## PERSISTENT SECONDARY HYPERPARATHYROIDISM AFTER RENAL TRANSPLANTATION: ROLE OF CaSR AND HYPOVITAMINOSIS D

Stefania Sella, Claudio Marcocci<sup>a</sup>, Filomena Cetani<sup>a</sup>, Fatima Silva-Netto, Catia Cattelan, Luciana Bonfante, Giuseppe Realdi, Sandro Giannini

Department of Medical and Surgical Sciences, University Hospital of Padua, Padua (Italy)

<sup>a</sup> Department of Endocrinology and Metabolism, University of Pisa, Pisa (Italy)

Post-transplantation bone disease is influenced by multiple factors. An important risk factor for bone morbidity is represented by persistent secondary hyperparathyroidism (PTH >65 pg/ml). This condition is mainly related to the long-term persistence of parathyroid gland enlargement, the long time required for the involution of parathyroid gland hyperplasia and an alteration in calcium set-point. In addition, some genetic factors, such as the polymorphism of the Vitamin D Receptor (VDR), seem to be responsible for a higher incidence of sporadic primary hyperparathyroidism and secondary hyperparathyroidism in patients with chronic renal insufficiency. VDR polymorphism also predicts higher PTH levels in kidney-transplanted patients. Calcium Sensing Receptor (CaSR) polymorphisms have been demonstrated to play some role in the pathogenesis and severity of sporadic primary hyperparathyroidism and the reduction of the CaSR expression in the parathyroid adenomas might have an importance in the pathogenesis of primary hyperparathyroidism. CaSR expression has been found to be normal in kidney-transplanted patients with SHPT due to diffuse parathyroid hyperplasia, while its expression is down-regulated in those subjects with nodular hyperplastic glands.

The aim of this study was to evaluate the possible relationships among CaSR polymorphism and parathyroid hormone levels in kidney-transplanted patients. We studied 87 patients (60 males and 27 females), who had undergone renal transplantation 0 to 10 year before, aged 25-65 years (M±DS 52,62±10,78), with serum creatinine < 228 μmol/L. In these patients we studied three polymorphisms of the Calcium-Sensing Receptor: A986S, R990G, Q1011E. They were observed in 35,6%, 11,5% and 1,1% of the patients, respectively. PTH levels did not differ by Calcium Sensing Receptor polymorphisms, neither when genotypes were considered, nor when patients were grouped for the different haplotypes. On the contrary, low serum 25-OH-vitamin D levels were significant predictors of higher PTH levels.

## IPERPARATIROIDISMO SECONDARIO PERSISTENTE DOPO TRAPIANTO DI RENE: RUOLO DEL CaSR E DELL'IPOVITAMINOSI D

Stefania Sella, Claudio Marcocci<sup>a</sup>, Filomena Cetani<sup>a</sup>, Fatima Silva-Netto, Catia Cattelan, Luciana Bonfante, Giuseppe Realdi, Sandro Giannini

Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Azienda Ospedaliera-Università di Padova

<sup>a</sup> Dipartimento di Endocrinologia e Metabolismo, Università di Pisa

La patogenesi dell'osteoporosi dopo trapianto di rene è multifattoriale e la persistenza di iperparatiroidismo secondario (SHPT) (inteso come valori di PTH > 65 pg/ml) costituisce un ulteriore fattore di rischio. Essa è sicuramente legata all'iperplasia paratiroidea, al basso tasso di apoptosi delle cellule paratiroidee, all'alterazione del set-point calcico, all'insufficienza renale cronica residua.

Studi recenti hanno dimostrato come anche i fattori genetici svolgano un ruolo causale importante. Il polimorfismo del recettore della vitamina D (VDR) sembra responsabile di una maggior incidenza di iperparatiroidismo primitivo sporadico e di iperparatiroidismo secondario in pazienti con insufficienza renale cronica e sembra associarsi a livelli più elevati di PTH in pazienti trapiantati di rene. È stato osservato come il polimorfismo del Calcium-Sensing-Receptor (CaSR) sia, almeno in parte, coinvolto nella patogenesi e severità dell'iperparatiroidismo primitivo sporadico e come la ridotta espressione del CaSR negli adenomi paratiroidi svolga un ruolo importante nell'iperparatiroidismo primitivo. L'espressione del CaSR si è dimostrata normale nei pazienti trapiantati di rene con iperparatiroidismo dovuto ad iperplasia diffusa, mentre è down-regolata nei pazienti con iperplasia nodulare.

Nel nostro lavoro abbiamo voluto indagare la possibile correlazione tra il polimorfismo del Calcium-Sensing-Receptor (CaSR) e l'iperparatiroidismo persistente dopo trapianto di rene. Lo studio è stato condotto su 87 pazienti (60 maschi e 27 femmine) trapiantati di rene da 0 a 10 anni, di età compresa tra i 25 ed i 65 anni, con creatininemia ≤227 μmol/L. In questi soggetti sono stati studiati tre polimorfismi del Calcium-sensing receptor: A986S, R990G, Q1011E. 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 i diversi genotipi del CaSR e i livelli di PTH sierico, neppure considerando i diversi aplotipi. Valori ridotti di 25-OH-vitamina D sono invece ampiamente predittivi di elevati valori di PTH.

## CALCIMIMETICS MODULATE VITAMIN D THERAPY IN PATIENTS WITH CHRONIC RENAL FAILURE WITH SECONDARY HYPERPARATHYROIDISM (SPTH)

Elena Dessi<sup>a</sup>, M Chiara Cadoni<sup>b</sup>, Monica Spina<sup>b</sup>, Giuseppe Perpignano<sup>a</sup>, M. Cristina Mereu<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Internal Medical Sciences, University Hospital of Cagliari, Cagliari (Italy)

<sup>b</sup> Nephrology & Dialysis, "San Gavino" Hospital, Monreale (MC), Italy

**Background.** Despite the use of new vitamin D analogs and new calcium-free and aluminum-free phosphate binders, about 3-5% of dialysis patients with secondary hyperparathyroidism (HPT) require surgical parathyroidectomy (PTX). In fact the use of vitamin D is often associated with hypercalcemia, hyperphosphatemia, severe clinical complications (vascular calcifications, calciphylaxis) and refractory hyperparathyroidism (gland nodular hyperplasia). A new agent, Cinacalcet (calcimimetic type 2), is very effective in reducing PTH synthesis and secretions and maintaining calcium, phosphorus levels to K/DOQI's recommended ranges. **Aim.** We treated with Cinacalcet a group of patients on dialysis, affected by severe secondary HPT no responders to traditional therapy, to avoid surgical PTX in our patients. **Methods.** Cinacalcet was done in 23 pz (12 M;11F age 63,5±13 years), medium follow-up of 12,57±7,48 months (from 1 to 27 months) at the beginning a single dose of 30 mg/day and after 1 month increased to 60 mg/day depending on the serum PTH levels; 73% of patients used vit. D (13 bolus os, 6 bolus i.v.) and all phosphorus binders (43% sevelamer 52,5% CaCo3). We have assessed serum intact PTH, calcium-correct, phosphorus, alkaline phosphatase levels at 1, 3, 6, 12, 18 months and the end of follow-up. **Results.** After 1 month therapy, PTH were significantly reduced more than 15% serum bases levels (from 926±431 to 693,5±381,2 pg/ml, p<0,05) and more than 77% after 18 months in all patients (PTH=345±109,3 pg/ml, p<0,01). In 75% of patients, vitamin D was significantly reduced at the end of the study (4,4 mcg to 1,6 mcg; p<0,01); after 3 month 23% of patients started vit. D for low calcium x phosphorus product. Whereas phosphate binders were not reduced in all treated patients; 3 patients drop-out (2 for gastrointestinal adverse events). **Conclusion.** Cinacalcet is efficacious to reduce and to maintain serum PTH, calcium, phosphorus levels at K/DOQI's recommended ranges; it is able to reduce administration of vitamin D and so in our opinion the association Cinacalcet-vitamin D represents a new therapeutic strategy, first of all is useful in patients with hypercalcemia; this treatment avoids surgical parathyroidectomy in many patients (83%). Anyway has to be defined the calcimimetic effects on the vascular calcification, bone turn-over, and his relation with CaSR expressed in different cell types.

## I CALCIOMIMETICI MODULANO LA TERAPIA CON VITAMINA D NEI PAZIENTI CON INSUFFICIENZA RENALE CRONICA AFFETTI DA IPERPARATIROIDISMO SECONDARIO (IPS)

Elena Dessi<sup>a</sup>, M Chiara Cadoni<sup>b</sup>, Monica Spina<sup>b</sup>, Giuseppe Perpignano<sup>a</sup>, M. Cristina Mereu<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Dipartimento Scienze Mediche Internistiche, Azienda Ospedaliera Universitaria, Cagliari

<sup>b</sup> U.O. Nefrologia e Dialisi, P.O. "San Gavino", Monreale (MC)

**Introduzione.** Nonostante l'uso dei nuovi analoghi della vit. D (paracalcitolo) e dei nuovi chelanti privi di calcio e alluminio, più di un terzo dei pazienti con insufficienza renale cronica (IRC) affetto da iperparatiroidismo secondario (IPS) ricorre alla paratiroidectomia (PTX). Infatti all'uso della vit. D sono spesso associati ipercalcemia, iperfosfatemia e comparsa di severe complicanze cliniche (calcificazioni vascolari, calcifilassi) e iperparatiroidismo refrattario (iperplasia nodulare). In questi ultimi anni, il Cinacalcet (calcimimetico tipo II), modulando in maniera allosterica il recettore per il calcio (CaSR), riduce la sintesi e secrezione del PTH, senza aumentare i livelli calcio-fosforo. Numerosi studi a breve e lungo termine hanno dimostrato che nei pazienti in dialisi, il Cinacalcet controlla l'IPS e mantiene i livelli di calcio e fosforo entro i target consigliati dalle linee guida internazionali K/DOQI. **Scopo dello studio.** Abbiamo trattato con Cinacalcet un gruppo di pazienti in dialisi, affetti da IPS severo, non responders alla terapia tradizionale, per verificare la possibilità di evitare l'intervento chirurgico di paratiroidectomia (PTX). **Casistica.** Il Cinacalcet è stato somministrato in 23 pazienti (12M;11F 63,5±13 anni) per un periodo di 12,57±7,48 mesi (da 1 a 27 mesi) alla dose iniziale di 30 mg/die, aumentato a 60 mg/die dopo 1 mese di terapia sulla base dei valori di PTH. Il 73% dei pazienti era in terapia con vit. D (13 in boli per os o 6 per e.v.), tutti in trattamento con chelanti del fosforo (43% con sevelamer, 52,% CaCo3). Abbiamo valutato PTHi, fosfatasi alcalina, calcemia corretta, fosforo a 1, 3, 6, 12, 18 mesi e fine studio. **Risultati.** Dopo 1 mese di terapia i livelli di PTH basali si sono significativamente ridotti del 15,4%, in tutti i pazienti (PTH 693,5±381,2 pg/ml, p<0,05), fino ad arrivare a 77% in meno a 18 mesi di terapia (PTH 345,0±109,3 pg/ml, p<0,01). Nel 75% dei casi abbiamo ridotto la dose di Vit. D (da 4,4 mcg/settimana a 1,6 mcg p<0,01), dopo 3 mesi nel 23% dei pazienti abbiamo inserito la Vit. D per riduzione dei livelli di calcio e fosforo. Mentre non c'è stata riduzione significativa dei chelanti del fosforo in tutti i pazienti trattati; 3 pazienti sono usciti (di cui 2 per effetti collaterali gastrointestinali), 1 perso al follow-up. **Conclusioni.** Il Cinacalcet si è dimostrato efficace nel ridurre e mantenere a lungo termine i livelli di PTH, Ca e P nei ranges raccomandati dalle linee K/DOQI, e questo ha consentito di evitare il ricorso alla chirurgia nell'80% dei casi. Il Cinacalcet ha consentito una riduzione delle dosi di Vit. D, per cui a nostro parere l'associazione Cinacalcet-Vit. D rappresenta una nuova strategia terapeutica e un'ottima combinazione, utile soprattutto nei pazienti con ipercalcemia e questo ha consentito di evitare il ricorso alla chirurgia nell'80% dei casi. Resta ancora da definire l'azione del calcimimetico sulle calcificazioni, e quindi l'impatto sul sistema cardiovascolare, sul turn-over osseo e le sue possibili interferenze sui CaSR presenti anche sugli altri sistemi cellulari.

## THE IMMUNOREGULATING CYTOKINE IL-10 EXERTS PRO-OSTEOCLASTOGENIC EFFECT ON MONOCYTES

Lara Campana<sup>a</sup>, Elisa Benasciutti<sup>b</sup>, Angelo Manfredi<sup>a</sup>, Simone Cenci<sup>b</sup>, Patrizia Rovere-Querini<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Clinical Immunology Unit, <sup>b</sup> Biology of Aging Unit, "San Raffaele" Scientific Institute and "Vita-Salute San Raffaele" University, Milan (Italy)

Monocytes (M0) are precursors of macrophages, dendritic cells and osteoclasts (OCs). Recent studies have identified different macrophage subtypes, including classically activated macrophages (M1), involved in Th1-mediated inflammatory processes; alternatively activated macrophages (M2a), involved in Th2 responses and immune regulation; deactivated macrophages (M2c), involved in matrix deposition and tissue remodelling (Mantovani et al., 2004). While terminal differentiation of M0 products is well described (Gordon and Taylor, 2005), it is not known whether macrophage and OC lineages are mutually exclusive, and if mature macrophages can trans-differentiate into OCs. Thus, we decided to study the plasticity of terminal macrophage and OC differentiation. To this aim, we first expanded and purified primary M0 cells from C57Bl/6 mouse bone marrows with M-CSF (100 ng/ml), and then differentiated them into M1, M2a and M2c in presence of different stimuli for 48 hrs: IFN- $\gamma$  (50 U/ml) or LPS (1  $\mu$ g/mL) for M1; IL-4 (10 ng/ml) + M-CSF (10 ng/ml) for M2a; IL-10 (10 ng/ml) + M-CSF (10 ng/ml) for M2c. To achieve OC differentiation, we treated M0 with M-CSF (10 ng/ml) + RANKL (100 ng/mL) for 7 days. We ascertained differentiation into polarized macrophages by assessing subtype-specific panels of cytokines and membrane markers; OC differentiation was verified and quantified by TRAP staining. To test the plasticity of macrophage polarization, we challenged partially committed and terminally differentiated macrophages with cytokines. We observed that OCgenesis is dramatically reduced in partially committed M1 and M2a cells, as compared to that from M0. Moreover, in terminally differentiated M1 and M2a macrophages, induction of OCgenesis is almost completely blocked. In contrast, cells committed towards M2c polarization by a 3 or 6 hrs pulse with IL-10 displayed enhanced OCgenic capacity in response to RANKL + M-CSF, as compared to M0 controls. Moreover M2c macrophages could still be induced to differentiate into OCs, although not as productively as M0 cells. Our data demonstrate that M2c macrophage and OC lineages are tightly linked. Indeed, M2c commitment stimulates OCgenesis, and fully polarized M2c can trans-differentiate into OCs. Moreover, our data unveil a previously unreported pro-OCgenic role of IL-10, which molecular effector mechanisms are under investigation. Teleologically, lineage affinity between tissue-remodelling macrophages and OCs could play a role in post-inflammatory bone remodelling, with macrophages and OCs preparing new bone formation by osteoblasts.

## LA CITOCHINA IMMUNOREGOLATORIA IL-10 ESERCITA UN EFFETTO PRO-OSTEOCLASTOGENICO SUI MONOCITI

Lara Campana<sup>a</sup>, Elisa Benasciutti<sup>b</sup>, Angelo Manfredi<sup>a</sup>, Simone Cenci<sup>b</sup>, Patrizia Rovere-Querini<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Divisione Immunologica Clinica, <sup>b</sup> Unità di Biologia dell'Invecchiamento, IRCCS "San Raffaele" e Università "Vita Salute San Raffaele", Milano

I monociti (M0) sono i precursori di macrofagi (MF), cellule dendritiche e osteoclasti (OCs). Studi recenti hanno identificato diversi sottotipi macrofagici: MF M1 o attivati per via classica, coinvolti nelle risposte Th1 mediate, i MF attivati alternativamente (M2a), coinvolti nelle risposte Th2 e i MF de-attivati con funzioni di riparo tissutale (M2c) (Mantovani et al., 2004). Benché il processo di differenziazione che porta da monocita a OC sia ben noto, non è chiaro se il lineage dei MF e quello degli OCs siano mutualmente esclusivi oppure no. Pertanto abbiamo deciso di studiare la plasticità della differenziazione terminale dei MF e degli OCs. A questo scopo abbiamo ottenuto monociti partendo da precursori midollari di topi C57Bl/6 femmina, espandendo questi ultimi con M-CSF 100 ng/mL. Abbiamo poi differenziato i MF nelle loro tre polarizzazioni note per 48h. Gli M1 sono coltivati con IFN- $\gamma$  (50  $\mu$ g/ml) o LPS (1  $\mu$ g/mL), gli M2a con IL-4 (10 ng/mL) + M-CSF (10 ng/mL) e gli M2c (10 ng/mL) + M-CSF (10 ng/mL). Per ottenere OCs abbiamo stimolato cellule M0 per 7 giorni con RANK-L (100 ng/mL) + M-CSF (10 ng/mL). La corretta differenziazione macrofagica è stata controllata con un'analisi citofluorimetrica e dosand nei surnatanti di coltura alcune citochine tipiche dei vari sottotipi, quali TNF- $\alpha$ , IL-10 e SDF-1. Per verificare la differenziazione in OCs è stata utilizzata la colorazione TRAP. Abbiamo verificato che sia il trattamento con IFN-g che quello con IL-4+M-CSF riducono l'OCgenesis a tempi precoci e la bloccano quasi totalmente a quelli tardivi (48h di stimolazione). Al contrario, trattamenti di 3h e 6h con IL-10 danno una OCgenesis più abbondante rispetto ai controlli ottenuti differenziando M0 con RANK-L+M-CSF. Infine anche cellule stimulate per 48h con IL-10 sono ancora in grado di originare OCs. I nostri dati dimostrano che il lineage dei macrofagi e quello degli OCs sono strettamente interconnessi. Inoltre, i nostri risultati riportano per la prima volta un effetto pro-osteoclastogenico di IL-10. I meccanismi molecolari alla base di questo effetto sono attualmente oggetto di investigazione. In conclusione si può ipotizzare che il rapporto tra il lineage dei MF e quello degli OCs sia finalizzato alla chiusura della risposta infiammatoria nell'osso e alla facilitazione del riparo in seguito a danno.

## **ADIPOSE TISSUE DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS: EFFECTS OF TWO NANOSTRUCTURED TITANIUM ALLOYS ON DIFFERENTIATION**

**Roberto Zonefrati<sup>a</sup>, Isabella Tognarini<sup>a</sup>, Sabina Sorace<sup>a</sup>, Gianna Galli<sup>a</sup>, Giorgia Donata Zappoli Thyron<sup>a</sup>,  
Anna Maria Carossino<sup>a</sup>, Annalisa Tanini<sup>a</sup>, Fausto Sbaiz<sup>b</sup>, Alessandro Facchini<sup>b</sup>, Maria Luisa Brandi<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Department of Internal Medicine, Medical School, University of Florence, Florence (Italy)

<sup>b</sup> Lima-Lto spa Medical System, Villanova di San Daniele Del Friuli, Udine (Italy)

Several studies with human mesenchymal and osteoprogenitor cell populations have shown strong responses to nanofeatures with increased osteoblastic activity on certain topographies. Previous work in our laboratory has demonstrated that smooth Ti6Al4V surfaces exhibit an osteoinductive action on human adipose tissue derived stromal cells (AMSCs), promoting their differentiation into functional osteoblasts and increasing bone formation. The aim of the present work was to evaluate the ability of nanostructured Ti6Al4V and Ti13Nb13Zr, compared to polystyrene (PS), to promote the differentiation and the maturation into functional osteoblasts on three primary cell lines of AMSCs, using normal human osteoblast cell line (NHObst) as control.

Cells were seeded onto Titanium alloys or PS and cultured for up to 40 days. Morphology, cell adhesion, proliferation, and differentiation were evaluated by Laser Scanning Confocal Microscopy analysis, cell counting, alkaline phosphatase activity evaluation, and mineralization study.

A similar behaviour was observed in term of cell adhesion and proliferation when cells were seeded on the three substrates, both AMSCs and NHObst showing a good viability and growth on all tested surfaces and a statistically higher degree of adhesion on Titanium alloys than on PS. Regarding osteoblastic activity, nanostructured Ti4Al6V and Ti13Nb13V proved to be able to support the maturation into functional osteoblasts in every cell type and interestingly, to enhance in AMSCs the deposition of calcium-containing mineral compared to PS.

In conclusion, our results showed that surface nanonization promotes cellular adhesion and that nanostructured Titanium alloys stimulated the cell differentiation towards an osteoblastic phenotype, leading to interesting alternatives in the design of efficient prostheses.

## **CELLULE MESENCHIMALI STAMINALI ISOLATE DA TESSUTO ADIPOSITO: EFFETTO DI DUE LEGHE NANOSTRUTTURATE SULLA DIFFERENZIAZIONE OSTEOGENICA**

**Roberto Zonefrati<sup>a</sup>, Isabella Tognarini<sup>a</sup>, Sabina Sorace<sup>a</sup>, Gianna Galli<sup>a</sup>, Giorgia Donata Zappoli Thyron<sup>a</sup>,  
Anna Maria Carossino<sup>a</sup>, Annalisa Tanini<sup>a</sup>, Fausto Sbaiz<sup>b</sup>, Alessandro Facchini<sup>b</sup>, Maria Luisa Brandi<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Dipartimento di Medicina Interna, Università degli Studi di Firenze

<sup>b</sup> Lima-Lto spa Medical System, Villanova di San Daniele Del Friuli, Udine

È stato osservato in numerosi studi che le cellule mesenchimali e osteoprogenitrici rispondono fortemente alle nanostrutture, incrementando la loro attività osteoblastica. In un nostro precedente lavoro, è stato dimostrato che la lega del Ti6Al4V con superficie liscia svolge un'azione osteoinduttiva sulle cellule mesenchimali staminali isolate da tessuto adiposo umano (AMSCs), promuovendone la differenziazione in osteoblasti maturi e favorendo l'apposizione di osso. Il presente lavoro si propone di valutare se due leghe di Titanio nanostrutturate (Ti6Al4V e Ti13Nb13Zr) siano capaci di favorire la differenziazione cellulare e la maturazione in osteoblasti maturi di tre linee primarie di AMSCs, rispetto al polistirene da coltura (PS), utilizzando come controllo una linea di osteoblasti umani normali (NHObst).

Le cellule sono state seminate sulle leghe e su PS e coltivate per 40 giorni. La risposta cellulare è stata valutata analizzando la morfologia, l'adesione, la proliferazione, l'attività della fosfatasi alcalina e la mineralizzazione con l'ausilio di differenti metodiche.

Le cellule, seminate sui differenti substrati di crescita, presentano un comportamento simile per quanto riguarda la proliferazione e l'adesione: sia le AMSCs che le NHObst crescono e proliferano bene su tutte le superfici testate e aderiscono significativamente di più alle leghe nanostrutturate. Per quanto riguarda l'attività osteoblastica, invece, il Ti4Al6V ed il Ti13Nb13V si sono dimostrati capaci di promuovere la differenziazione delle AMSCs e la loro maturazione in osteoblasti maturi e soprattutto di incrementare la deposizione di calcio mineralizzato rispetto al PS. In conclusione i nostri risultati mostrano che la presenza di una nanostruttura su superfici utilizzate in ambito ortopedico promuove l'adesione cellulare e che le leghe di Titanio nanostrutturate stimolano la differenziazione verso il fenotipo osteoblastico, aprendo nuove prospettive nella progettazione delle protesi.

## CIRCULATING OSTEOBLAST-LINEAGE CELLS AS A NOVEL MARKER OF POST-MENOPAUSAL OSTEOPOROSIS

Christian Leli, Matteo Pirro, Gianluigi Fabbriciani, Laura Callarelli, Francesco Bagaglia, Lucio Paoletti, Anna Maria Scarponi, Elmo Mannarino

Internal Medicine, Angiology and Arteriosclerosis Diseases, University of Perugia, Perugia (Italy)

Cells expressing antigens of the osteoblast lineage, like alkaline-phosphatase, and of the hemopoietic lineage, like CD34, have been identified in the peripheral blood, are increased in adolescent boys going through the growth spurt, and also increase following fracture. Importantly, these circulating osteogenic cells can mineralize *in vitro* and form bone *in vivo*. Whether a difference in the number of circulating osteoblasts is present between osteoporotic post-menopausal women with or without fractures and non osteoporotic women is unknown. It remains also to be defined the pathophysiological significance of the differential expression of alkaline phosphatase and CD34 antigens in osteoblastic cells of osteoporotic patients. The number of circulating alkaline-phosphatase<sup>POS</sup> and alkaline-phosphatase<sup>POS</sup>/CD34<sup>POS</sup> cells was quantified in peripheral blood by FACS analysis in 50 post-menopausal osteoporotic women and 35 age- and sex-matched non-osteoporotic controls. All participants underwent measurement of lumbar spine and total hip bone mineral density (BMD) by Dual-Energy X-ray Absorbptometry (DEXA). Levels of circulating alkaline-phosphatase<sup>POS</sup> were reduced in osteoporotic post-menopausal women compared with levels measured in non-osteoporotic controls (129±17 n/microL vs 216±25 n/microL, p=0.004), whereas higher levels of circulating alkaline-phosphatase<sup>POS</sup>/CD34<sup>POS</sup> cells were found in osteoporotic than control women (2.8±0.8 n/microL vs 0.7±0.1 n/microL, p=0.04). The number of circulating alkaline-phosphatase<sup>POS</sup> cells was positively correlated with lumbar BMD (rho=0.29, p=0.01) and total hip BMD (rho=0.30, p=0.008) whereas an inverse correlation was found between alkaline-phosphatase<sup>POS</sup>/CD34<sup>POS</sup> cells and lumbar BMD (rho=-0.29, p=0.008) and total hip BMD (rho=-0.27, p=0.017). A reduced number of alkaline-phosphatase<sup>POS</sup> cells was a significant predictor of the presence of low lumbar BMD (beta=0.20, p=0.04) and total hip BMD (beta=0.30, p=0.001), independent of traditional risk factors for osteoporosis. In conclusion, a reduced number of circulating alkaline-phosphatase<sup>POS</sup> cells is a significant determinant of reduced bone mineral density in post-menopausal osteoporotic women. The increased number of alkaline-phosphatase<sup>POS</sup>/CD34<sup>POS</sup> cells in osteoporosis might represent a possible contribute of circulating stem cells with osteogenic potential to osteoporotic bone repair.

## OSTEOBLASTI CIRCOLANTI: NUOVO INDICATORE DI OSTEOPOROSI POST-MENOPAUSALE

Christian Leli, Matteo Pirro, Gianluigi Fabbriciani, Laura Callarelli, Francesco Bagaglia, Lucio Paoletti, Anna Maria Scarponi, Elmo Mannarino

Medicina Interna, Angiologia e Malattie da Arteriosclerosi, Università degli Studi di Perugia

Nell'uomo sono state isolate da sangue periferico cellule che esprimono antigeni di superficie caratteristici della linea osteoblastica, come la fosfatasi alcalina, ed antigeni tipici della linea staminale emopoietica, quale il CD34. Il numero di cellule osteoblastiche in circolo aumenta negli adolescenti durante le fase di accrescimento ed immediatamente dopo una frattura. È stato dimostrato che le cellule della linea osteoblastica isolate nel torrente ematico sono capaci di formare noduli di mineralizzazione *in vitro* e tessuto osseo *in vivo*. Ad oggi non è noto se esista una differenza nel numero di osteoblasti circolanti tra donne osteoporotiche in menopausa con o senza fratture e donne non osteoporotiche. Resta inoltre da definire il significato fisiopatologico dell'espressione degli antigeni fosfatasi alcalina e CD34 da parte degli osteoblasti circolanti di pazienti con osteoporosi. Il numero di osteoblasti circolanti fosfatasi-alcalina<sup>POS</sup> e fosfatasi-alcalina<sup>POS</sup>/CD34<sup>POS</sup> è stato misurato mediante analisi citofluorimetrica nel sangue venoso periferico di 50 donne con osteoporosi post-menopausale ed in 35 donne non osteoporotiche di pari età. I partecipanti allo studio sono stati sottoposti a misurazione della densità minerale ossea (DMO) a livello del rachide lombare L1-L4 e del femore prossimale e del collo femore mediante DEXA. Il numero di osteoblasti circolanti fosfatasi-alcalina<sup>POS</sup> è risultato essere ridotto nelle donne con osteoporosi post-menopausale rispetto a quanto osservato nelle donne non osteoporotiche (129±17 n/microL vs 216±25 n/microL, p=0,004). Al contrario, il numero di osteoblasti circolanti fosfatasi-alcalina<sup>POS</sup>/CD34<sup>POS</sup> è risultato essere più alto nelle donne osteoporotiche che nei controlli sani (2,8±0,8 n/microL vs 0,7±0,1 n/microL, p=0,04). Abbiamo osservato una correlazione positiva tra osteoblasti circolanti fosfatasi-alcalina<sup>POS</sup> e DMO misurata a livello del rachide lombare (rho=0,29, p=0,01) e del femore prossimale (rho=0,30, p=0,008). Il numero di osteoblasti fosfatasi-alcalina<sup>POS</sup>/CD34<sup>POS</sup> è risultato essere correlato negativamente con la DMO del rachide lombare (rho=-0,29, p=0,008) e del femore prossimale (rho=-0,27, p=0,017). Nell'analisi multivariata, un ridotto numero di cellule fosfatasi-alcalina<sup>POS</sup> è risultato essere predittore della ridotta BMD a livello del rachide (beta=0,20, p=0,04) e del femore prossimale (beta=0,30, p=0,001), indipendentemente dall'azione confondente dei fattori di rischio tradizionali dell'osteoporosi. In conclusione, il ridotto numero di osteoblasti circolanti fosfatasi-alcalina<sup>POS</sup> è un fattore determinante la ridotta densità minerale ossea in donne osteoporotiche in post-menopausa. Viceversa, la mobilitazione in circolo di osteoblasti fosfatasi-alcalina<sup>POS</sup>/CD34<sup>POS</sup> con caratteristiche di staminalità potrebbe rappresentare un possibile meccanismo che contribuisce alla consolidazione dell'osso porotico.

## GENETIC AND FUNCTIONAL ANALYSIS IN FOUR ITALIAN KINDREDS WITH FAMILIAL HYPOCALCIURIC HYPERCALCEMIA

Simona Borsari, Filomena Cetani, Elena Pardi, Monica Lemmi, Davide Cervia<sup>a</sup>, Luisella Cianferotti, Chiara Banti, Elena Ambrogini, Edda Vignali, Paola Bagnoli<sup>a</sup>, Aldo Pinchera, Claudio Marcocci

Department of Endocrinology and Metabolism; <sup>a</sup> Department of Biology, Unit of General Physiology, University of Pisa, Pisa (Italy)

Familial hypocalciuric hypercalcemia (FHH) is characterized by moderate and lifelong hypercalcemia, relative hypocalciuria, and inappropriately normal serum PTH levels. Loss-of-function mutations of the CASR are responsible for this disease.

We describe four unrelated FHH kindreds (A, B, C and D). Mutational analysis of the CASR gene was performed on genomic DNA of the probands. Functional studies on three mutations were performed in COS-7 cells transiently expressing the wild-type and mutant CASR. In family A, a novel heterozygous base substitution C to T was detected, determining a change of histidine to tyrosine at codon 595 (H595Y) of exon 7. In family B, a heterozygous mutation was found at codon 748, with a substitution of C to A in exon 7, leading to conversion of proline to histidine (P748H). In family C, an heterozygous C to G substitution determining a change of cysteine to tryptophan at codon 765 (C765W) of exon 7 was detected. In case D, direct sequencing showed a substitution of G to T in the donor splice site of intron 2 (IVS2+1G>C). The absence of these mutations in 50 unrelated healthy subjects could exclude their polymorphic nature. In fura-2-loaded COS-7 cells expressing the wild-type or mutant receptors, the P748H and H595Y mutants produced, in the cytosolic calcium response to increasing extracellular calcium concentrations, a shift to the right relative to the wild-type CASR. In contrast, the co-transfected WT/P748H and WT/H595Y had the same behaviour as the WT. The C765W mutant had a concentration-response curve shifted to the right and the co-transfected WT/C765W had the same EC<sub>50</sub> relative to that of WT. Immunofluorescence experiments revealed an equal quantity of WT, as well as mutant receptors, expressed in transfected COS-7 cells. In addition, COS-7 cells transfected with mutant CASR showed, in western blotting analysis, a response similar to the WT, with respect to intracellular signaling (MAPK activation) to increasing extracellular calcium concentrations.

In conclusion, molecular analysis showed that all kindreds carried unreported CASR mutations, three of them functionally inactivate the receptor.

## ANALISI GENETICA E FUNZIONALE DI QUATTRO FAMIGLIE ITALIANE AFFETTE DA IPERCALCEMIA IPOCALCIURICA FAMILIARE

Simona Borsari, Filomena Cetani, Elena Pardi, Monica Lemmi, Davide Cervia<sup>a</sup>, Luisella Cianferotti, Chiara Banti, Elena Ambrogini, Edda Vignali, Paola Bagnoli<sup>a</sup>, Aldo Pinchera, Claudio Marcocci

Dipartimento di Endocrinologia e Metabolismo; <sup>a</sup> Dipartimento di Biologia, Unità di Fisiologia Generale, Università degli Studi di Pisa

L'ipercalcemia ipocalciurica familiare (FHH) è caratterizzata da modesta ipercalcemia, ipocalciuria relativa e livelli inappropriatamente normali di paratormone (PTH). Dal punto di vista genetico questa malattia è determinata da mutazioni inattivanti del gene del recettore del calcio (CASR).

In questo studio abbiamo descritto 4 famiglie italiane affette da FHH, non correlate tra loro (A, B, C, D).

L'analisi genetica della porzione codificante e dei relativi siti di *splicing* del gene del CASR è stata eseguita su DNA genomico dei probandi delle varie famiglie ed estesa ai familiari affetti. Studi funzionali di 3 mutazioni sono stati successivamente effettuati su cellule COS-7 trasfettate con il recettore *wild-type* o mutato.

Nella famiglia A è stata identificata la sostituzione eterozigote C>T, che determina il cambio aminoacidico da istidina a tirosina a livello del codone 595 (H595Y) dell'esone 7. Nella famiglia B è stata rilevata una mutazione eterozigote al codone 748 dell'esone 7, con transizione C>A e conseguente conversione di prolina in istidina (P748H). La trasversione C>G, evidenziata nella famiglia C, determina la sostituzione di una cisteina con un triptofano nell'esone 7 (C765W). Nel caso D, il sequenziamento ha rilevato la sostituzione G>C nel sito donatore di *splicing* dell'introne 2 (IVS2+1 G>C). L'assenza di queste mutazioni in 50 soggetti sani non correlati esclude la loro natura polimorfica. Il dosaggio del calcio intracellulare è stato eseguito su cellule COS-7 trasfettate con il recettore WT o mutato marcate con *fura-2*. Nei mutanti P748H, H595Y e C765W la curva del calcio citosolico in risposta a concentrazioni crescenti di calcio extracellulare risultava slittata verso destra rispetto alla relativa curva del CASR WT. La curva ottenuta da cellule cotrasfettate WT/P748H e WT/H595Y era invece pressoché sovrapponibile a quella del CASR WT, quella relativa al cotrasfettato WT/C765W presentava la stessa EC<sub>50</sub> del recettore WT. L'espressione del CASR sulla superficie di cellule trasfettate con il recettore WT o mutato risultava, da esperimenti di immunofluorescenza, molto simile. L'attivazione della via MAP-chinasica, valutata tramite *western blot*, non variava nel caso di cellule trasfettate con il recettore WT o mutato.

In conclusione, l'analisi molecolare ha evidenziato quattro nuove mutazioni del gene CASR, tre delle quali risultano funzionalmente inattivanti.

## COMPARISON OF INTRAVENOUS AND INTRAMUSCULAR NERIDRONATE REGIMENS FOR THE TREATMENT OF PAGET'S DISEASE OF BONE

Daniela Merlotti<sup>a</sup>, Domenico Rendina<sup>b</sup>, Giuseppe Mossetti<sup>b</sup>, Luigi Gennari<sup>a</sup>, Vincenzo De Paola<sup>a</sup>, Gianpaolo De Filippo<sup>b</sup>, Giuseppe Martini<sup>a</sup>, Annalisa Avanzati<sup>a</sup>, Pasquale Strazzullo<sup>b</sup>, Ranuccio Nuti<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Internal Medicine, Endocrine-Metabolic Sciences and Biochemistry, University of Siena, Siena (Italy)

<sup>b</sup> Department of Clinical and Experimental Medicine, "Federico II" University Medical School of Naples, Naples (Italy)

Aminobisphosphonates represent the most common treatment for Paget's disease of bone (PDB), with the potential for sustained remission. Intravenous regimens with different compounds demonstrated improved efficacy and compliance with respect to oral regimens. In a recent study we demonstrated that either zoledronate (4 mg) and neridronate (200 mg) given as a single intravenous infusion showed a similar efficacy in achieving biochemical remission at 6 and 12 months in up to 90% of patients non-responders to pamidronate. In this study we compared the effects of a same neridronate dose (200 mg) given as intravenous (i.v.) (100 mg infusion over a 2-hours period for 2 consecutive days) or intramuscular (i.m.) (25 mg once a week for 1 month) regimen in 56 patients with active PDB. Randomization was stratified according to baseline total alkaline phosphatase (ALP) levels and previous bisphosphonate treatment. All patients were advised to receive calcium plus vitamin D supplementation throughout the study period (1 g of calcium and 800 UI colecalciferol per day). Blood samples were collected at baseline and after 3, 6, and 12 months. The primary efficacy endpoint was the rate of therapeutic response at 6 months, defined as normalization of ALP levels or a reduction of at least 75% in total ALP excess. Serum levels of bone ALP, C-terminal telopeptides of Type I collagen, and 25-hydroxyvitamin D (25 OH-D) were also measured. A significant 40-50% decrease in ALP levels was observed with both regimens after 3 months. At 6 months, 92% and 96% of patients receiving i.v. and i.m. neridronate, respectively had a therapeutic response. Normalization of ALP levels at 6 months was achieved in 89% of patients in i.v. group and in 93% of patients in i.m. group. Interestingly, the response to treatment was significantly correlated with baseline ALP and 25 OH-D levels at 6 months. The decrease in ALP levels was highest in patients with higher baseline total or bone specific ALP levels and with higher 25 OH-D levels at 6 months. Normalization in ALP levels was maintained at 12 months in 22/27 (81.5%) and 24/29 (83%) of patients, in i.v. and i.m. neridronate groups, respectively. Both regimens were well tolerated. The only side effect was an acute phase response, occurring in 11-13% of the patients. In conclusion, both i.m. and i.v. neridronate regimens (at a cumulative dosage of 200 mg in 12 months) showed a similar efficacy in achieving biochemical remission in up to 90% of patients with active PDB.

## CONFRONTO TRA LA SOMMINISTRAZIONE ENDOVENOSA E INTRAMUSCOLARE DI NERIDRONATO NEL TRATTAMENTO DELLA MALATTIA OSSEA DI PAGET

Daniela Merlotti<sup>a</sup>, Domenico Rendina<sup>b</sup>, Giuseppe Mossetti<sup>b</sup>, Luigi Gennari<sup>a</sup>, Vincenzo De Paola<sup>a</sup>, Gianpaolo De Filippo<sup>b</sup>, Giuseppe Martini<sup>a</sup>, Annalisa Avanzati<sup>a</sup>, Pasquale Strazzullo<sup>b</sup>, Ranuccio Nuti<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Dipartimento di Medicina Interna, Scienze Endocrino-Metaboliche e Biochimica, Università degli Studi di Siena

<sup>b</sup> Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Napoli "Federico II"

I bisfosfonati rappresentano il più comune trattamento per la malattia ossea di Paget (PDB), in quanto in grado di indurre una remissione biochimica di malattia nella maggior parte dei pazienti. Vari composti farmacologici somministrati per via endovenosa hanno dimostrato una maggiore efficacia ed una maggiore compliance rispetto alla terapia orale. Recentemente abbiamo dimostrato che sia lo zoledronato (4 mg) che il neridronato (200 mg) somministrati in una singola infusione hanno un'efficacia simile nell'indurre la remissione biochimica della malattia a 6 e 12 mesi in oltre il 90% dei pazienti non-responders al pamidronato. In questo studio abbiamo invece confrontato gli effetti della stessa dose di neridronato (200 mg) somministrata per via endovenosa (ev) (100 mg in 2 ore per 2 giorni consecutivi) o intramuscolare (im) (25 mg una volta a settimana per un mese) in 56 pazienti con PDB attivo. La randomizzazione è stata stratificata in accordo ai livelli di fosfatasi alcalina ossea totale (ALP) e al precedente trattamento con bisfosfonati. A tutti i pazienti è stato consigliato di assumere un supplemento di calcio e vitamina D durante il periodo dello studio (1 g di calcio e 800 UI di colecalciferolo/die). I prelievi di sangue sono stati effettuati a 3, 6 e 12 mesi. L'end point primario dello studio è stato la valutazione della risposta terapeutica a 6 mesi, definita come normalizzazione della ALP o riduzione di almeno il 75% dell'eccesso di ALP. Sono stati misurati anche i livelli sierici di ALP ossea, i crosslaps sierici (CTX), e la 25-idrossivitamina D (25 OH-D). Abbiamo osservato una significativa riduzione del 40-50% nei livelli di ALP con entrambi i regimi di somministrazione dopo 3 mesi. A 6 mesi, abbiamo ottenuto una risposta terapeutica nel 92% e nel 96% dei pazienti trattati con neridronato ev e im, rispettivamente. La normalizzazione dell'ALP a 6 mesi è stata osservata nel 89% dei pazienti del gruppo ev e nel 93% dei pazienti del gruppo im. Inoltre, la risposta terapeutica è risultata significativamente correlata con i livelli basali di ALP e con quelli di 25 OH-D a 6 mesi. La riduzione dei livelli di ALP è stata maggiore nei pazienti con i livelli basali più elevati di ALP totale e ossea e con livelli più elevati di 25 OH-D a 6 mesi. La normalizzazione nei livelli di ALP è stata mantenuta a 12 mesi in 22/27 (81.5%) e 24/29 (83%) dei pazienti trattati con neridronato ev e im, rispettivamente. Entrambe le somministrazioni sono risultate ben tollerate. L'unico effetto collaterale è stato una reazione di fase acuta, osservata nel 11-13% dei pazienti. In conclusione, entrambe le somministrazioni di neridronato ev e im (ad un dosaggio cumulativo di 200 mg in 12 mesi) hanno mostrato un'efficacia simile nell'indurre la remissione biochimica di malattia in più del 90% dei pazienti con PDB attivo.

## IMMUNOHISTOCHEMICAL AND GENETIC CHARACTERIZATION OF THE ATYPICAL PARATHYROID ADENOMA

Alfredo Scillitani<sup>a</sup>, Vito Guarnieri<sup>a</sup>, Michele Bisceglia<sup>a</sup>, Claudia Battista<sup>a</sup>, Salvatore Minisola<sup>b</sup>, Iacopo Chiodini<sup>c</sup>, Lucia Anna Muscarella<sup>a</sup>, Raffaella Viti<sup>a</sup>, David E.C. Cole<sup>d</sup>

<sup>a</sup> IRCCS "Casa Sollievo della Sofferenza" Hospital, San Giovanni Rotondo, Foggia (Italy)

<sup>b</sup> "Sapienza" University of Rome, Rome (Italy)

<sup>c</sup> University of Milan, Milan (Italy)

<sup>d</sup> Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

Molecular studies of non-malignant parathyroid tumours suggest that the atypical parathyroid adenoma (AA) may be an intermediate stage of progression to parathyroid carcinoma. Various investigators have suggested that HRPT2 mutations may be found in this sub-type of adenoma, but systematic immunohistochemical and molecular study of a single cohort has not been reported. Although parafibromin immunostaining has been proposed as an adjunct tool for the diagnosis of parathyroid carcinoma, its usefulness in AA has not yet been defined. From our centre, eleven cases of AA were available for study (5 women; 6 men; age 53±17 years). The criteria for AA classification were: (i) presence of fibrous bands and/or (ii) excess mitoses and/or (iii), capsular invasion. Screening of exons and exon-intron boundaries for germline mutations in genomic DNA from peripheral blood showed: 2/11 patients with germline truncating mutations (c.679\_680delAG; c.685\_688delAGAG). Tumor tissue was subjected to LOH analysis and mutation screening of exons 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 11 and 14 encompassing more than 90% of point mutations. One somatic mutation (c.231C>G) was identified in the patient with c.679\_680delAG and LOH was observed in another. Thus, in total, at least three of the 11 patients showed genetic alterations. Parafibromin immunoreactivity, assessed in 10/11 tumours, showed: complete (~100%) expression in 3; partial expression in 5 and none in 2. Although the loss of parafibromin immunostaining was prevalent in atypical adenomas, it was not clearly associated with the presence of genetic mutation, suggesting that immunohistochemistry cannot substitute for molecular analysis. Studies on larger case series will better define the place of this technique in AA assessment and help identify patients needing closer clinical follow-up.

## CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE ED IMMUNOISTOCHEMICA DELL'ADENOMA ATIPICO DELLE PARATIROIDI

Alfredo Scillitani<sup>a</sup>, Vito Guarnieri<sup>a</sup>, Michele Bisceglia<sup>a</sup>, Claudia Battista<sup>a</sup>, Salvatore Minisola<sup>b</sup>, Iacopo Chiodini<sup>c</sup>, Lucia Anna Muscarella<sup>a</sup>, Raffaella Viti<sup>a</sup>, David E.C. Cole<sup>d</sup>

<sup>a</sup> IRCCS "Casa Sollievo della Sofferenza", Ospedale San Giovanni Rotondo, Foggia

<sup>b</sup> Università degli Studi "Sapienza", Roma

<sup>c</sup> Università degli Studi di Milano

<sup>d</sup> Dipartimento di Medicina di Laboratorio e Patobiologia, Università di Toronto (Canada)

Studi molecolari nei tumori paratiroidei suggeriscono che l'adenoma atipico (AA) possa essere uno stadio intermedio di progressione verso il carcinoma paratiroideo. Vari Autori hanno individuato la presenza di mutazioni del gene HRPT2 in questo tipo di adenoma, ma ad oggi non sono stati riportati studi sistematici molecolari e di immunoistochimica, sufficientemente ampi, provenienti da una singola coorte. L'esame di immunoistochimica della parafibromina è stato proposto come mezzo diagnostico per la diagnosi di carcinoma delle paratiroidi, mentre la sua utilità negli AA non è stata definita. Abbiamo studiato undici casi di AA (5 donne; 6 uomini; di età 53±17 anni). Il criterio per la classificazione di AA è stato: (1) la presenza di bande di fibrosi e/o (2) di mitosi, e/o (3) invasione capsulare, in assenza di invasione vascolare e metastasi. Abbiamo cercato la presenza di mutazioni costituzionali sui 17 esoni della parafibromina e quelle somatiche sugli esoni 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 11 e 14 (questi ultimi comprendono oltre il 90% delle mutazioni puntiformi identificate). In 2/11 pazienti è stata identificata una mutazione costituzionale (c.679\_680delAG; c.685\_688delAGAG) e nel paziente con la mutazione c.679\_680delAG e' stata identificata una mutazione somatica (c.231C>G). Inoltre il tessuto tumorale è stato sottoposto all'analisi di LOH che è stata osservata in un altro AA. In totale, 3 degli 11 pazienti con AA hanno mostrato delle alterazioni genetiche. L'esame di immunoistochimica della parafibromina in 10/11 AA ha evidenziato: espressione completa (~100%) in 3, espressione parziale in 5 e assenza di espressione in 2. I nostri dati mostrano che la perdita di immunoreattività alla parafibromina è frequente negli AA ma non è associata alla presenza di mutazioni genetiche pertanto essa non può sostituire l'analisi molecolare.

## DEPRESSION SYNDROME, SSRI THERAPY AND OSTEOPOROSIS IN ELDERLY PEOPLE

**Alessandro Grippa, Tiziana Pipicella, Giovanni Gaglio, Antonino Granata, Enzo Russo, Ferdinando D'Amico**

*Department of Geriatrics and Long-Term Care Unit, Laboratory of Psychogeriatrics, Service of Prevention, Diagnosis and Therapy of Osteoporosis, Hospital of Patti - Azienda USL n. 5, Messina (Italy)*

The Depression Syndrome is associated to osteoporosis because of a deterioration of the hypothalamus-hypophysis-adrenocortical axis. This causes a progressive loss of bone mineral mass (BMD) through endocrine factors such as hypercortisolism, hypogonadism, hyposecretion of GH. SSRI antidepressants can provoke a bone mass loss by blocking the serotonin conveyors in osteoblasts and osteocytes.

The aim of this study is to reveal the connections between depression and osteoporosis and between SSRI antidepressant and osteoporosis in a group of elderly people.

98 patients of the Department of Geriatrics and Long-term care unit of the Hospital of Patti were included in this study. We investigated the medical history for antidepressant treatment, then used the following instruments:

- 1) Geriatric Depression Scale (15 items GDS) and Mini Mental State Examination
- 2) Bone Densitometry (DEXA)
- 3) Barthel Index for self-sufficiency and CIRS Index for comorbidity.

The group was split in two after the results of GDS: Group A -46 Depressed (GDS>6; Male 8, Female 38, mean age 79±8); Group B -52 non-depressed (M 7, F 45 74±9). In group A T-SCORE average showed a higher incidence of osteoporosis compared to Group B. In Group A subjects treated with SSRI showed lower scores of T-SCORE compared to those treated with other antidepressants or to those not treated.. Comorbidity and disability in Group A were more prevalent than in Group B and the cognitive decline was consequently more severe in the depressed subjects.

**Conclusions.** Depression is predictive of osteoporosis in elderly people. Depressed eldest subjects treated with SSRI show a further bone mass loss clearly seen through DEXA. Worse disability, comorbidity and cognitive decline associated to depression are predictive of osteoporosis.

## SINDROME DEPRESSIVA, TERAPIA CON SSRI ED OSTEOPOROSI NELL'ANZIANO

**Alessandro Grippa, Tiziana Pipicella, Giovanni Gaglio, Antonino Granata, Enzo Russo, Ferdinando D'Amico**

*Struttura Complessa di Geriatria e Lungodegenza, Laboratorio di Psicogeriatria, Servizio di Prevenzione, Diagnosi e Terapia della Osteoporosi, P.O. Patti - Azienda USL n. 5, Messina*

La sindrome depressiva risulta essere associata con l'osteoporosi a causa di un'alterazione stress-correlata dell'asse ipotalamo-ipofisi-corticosurrene, che può determinare progressiva perdita di massa minerale ossea (BMD) mediante fattori endocrini come ipercortisolismo, ipogonadismo, iposecrezione di GH. Gli antidepressivi della classe SSRI (Inibitori Selettivi della Ricaptazione della Serotonina) possono determinare perdita di massa ossea bloccando i trasportatori della serotonina presenti su osteoblasti ed osteociti.

L'obiettivo dello studio consiste nell'evidenziare in una popolazione di anziani le correlazioni tra depressione ed osteoporosi ed inoltre tra assunzione di antidepressivi della classe SSRI ed osteoporosi.

È stato studiato un gruppo di 98 soggetti afferenti alla U.O.C. di Geriatria e Lungodegenza del P.O. "Barone Ignazio Romeo" di Patti.

È stata eseguita anamnesi per farmaci antidepressivi, quindi sono stati utilizzati i seguenti metodi di studio:

- 1) Valutazione dello stato psicoaffettivo mediante le scale Geriatric Depression Scale (GDS a 15 items), e Mini Mental State Examination (MMSE)
- 2) Densitometria Ossea a doppio raggio fotonico (DEXA)
- 3) Valutazione del livello di autosufficienza (Barthel Index) e Comorbidità (Indice di Severità di Comorbidità -CIRS).

Sulla base dei risultati evidenziati alla GDS gli anziani sono stati suddivisi in 2 gruppi: Gruppo A - Depressi (con punteggio GDS superiore a 6): 46 (M8 F38, Età media 79±8), Gruppo B - Non depressi (punteggio GDS inferiore a 6): 52 (M7 F45, 74±9). La media dei punteggi T-SCORE rilevati dei soggetti del Gruppo A (L2-L4: -2.12; Femore: -2.64) evidenziavano una più elevata incidenza di osteoporosi rispetto ai soggetti non depressi (Gruppo B: L2-L4 media T-Score -1.88, Femore -2.23). Inoltre coloro che assumevano SSRI, piuttosto che altri antidepressivi o nessun farmaco, presentavano all'interno del gruppo A valori più bassi di T-Score rispetto alla media dei soggetti affetti da depressione (L2-L4: media -2.42, Femore -2.77). La comorbidità e la disabilità all'interno del gruppo A avevano una prevalenza maggiore rispetto al Gruppo B, così come era più evidente un maggiore decadimento cognitivo nei soggetti depressi.

**Conclusioni.** La depressione risulta essere predittiva di osteoporosi nell'anziano. Anziani depressi che assumono SSRI presentano una ulteriore perdita di massa ossea evidenziabile alla DEXA. Maggiore disabilità, comorbidità e declino cognitivo associate alla depressione risultano predittive di osteoporosi.

## LONG TERM ALENDRONATE THERAPY: SUPPRESSION OR NORMALIZATION OF BONE TURNOVER?

Serena Pancheri, Francesco Bertoldo, Sonia Zenari, Stefania Boldini, Benedetta Giovanazzi, Mirko Zanatta, Francesco Caliari, Luca Dalle Carbonare, Vincenzo Lo Cascio

Department of Biomedical and Surgical Sciences, University of Verona, Verona (Italy)

The increased rates of bone turnover (BT) predict fracture risk and the reduction of bone turnover is one of the mechanisms by which bisphosphonates (BPs) reduce the fracture risk. The goal of antiresorptive therapies is to reduce BT markers within the lower half of the reference interval for healthy premenopausal women. In clinical trials with prolonged alendronate administration in postmenopausal osteoporosis the levels of BT achieved a stable nadir levels within the first year of treatment. However some concerns frequently arise about the risk of an oversuppression of BT, particularly in subjects with low baseline BT. We compare the changes of BT (expressed as serum  $\beta$ CTX) in an ambulatory population of 250 osteoporotic women treated for more than 5 years with alendronate 70 mg/week plus ca/vit D with the recently published Italian premenopausal (46-50 y) normative reference values of  $\beta$ CTX ( $\beta$ CTX  $0.26 \pm 0.13$  ng/ml; Adami S. et al., *Calcif Tiss Int* 2008). Interestingly the  $\beta$ CTX values reached a stable nadir levels at the 4th year of therapy ( $-57 \pm 1.5\%$ ). The percent changes were significantly different at each time point when the low BT pts (LBT:  $\beta$ CTX < 500 ng/ml) were compared with the high BT pts (HBT:  $\beta$ CTX > 500 ng/ml) but the nadir was reached for both groups at the same time point and at the same absolute values. The absolute levels of  $\beta$ CTX (mean $\pm$ ds; ng/ml) are reported in the table. At the 3<sup>rd</sup> year of alendronate  $\beta$ CTX achieved the normal range in both HBT and LBT but only after the 4th year it was below the lower half of the normal range. The levels of  $\beta$ CTX were not significantly different between HBT and LBT at 3, 4, 5 and >5 years of treatment. In conclusion in this "real world" clinical practice study the nadir of BT is achieved later than reported in clinical trials and it remains stable in the ideal target range all treatment long. Finally the lack of BT oversuppression suggests that long term treatment with BP is safe even in LBT subjects.

	Baseline	3 y	4 y	5 y	>5 y
All (n 250)	0.53 $\pm$ 0.25	0.29 $\pm$ 0.20 #	0.23 $\pm$ 0.15°	0.23 $\pm$ 0.13	0.23 $\pm$ 0.11
LBT (n 117)	0.35 $\pm$ 0.10	0.27 $\pm$ 0.18 #	0.22 $\pm$ 0.15°	0.21 $\pm$ 0.12	0.22 $\pm$ 0.09
HBT (n 133)	0.75 $\pm$ 0.21	0.32 $\pm$ 0.21 #	0.24 $\pm$ 0.14°	0.25 $\pm$ 0.14	0.24 $\pm$ 0.11

# p=0.01 vs baseline and ° p=0.02 vs 3 y.

## TRATTAMENTO CON ALENDRONATO A LUNGO TERMINE: SOPPRESSIONE O NORMALIZZAZIONE DEL TURNOVER OSSEO?

Serena Pancheri, Francesco Bertoldo, Sonia Zenari, Stefania Boldini, Benedetta Giovanazzi, Mirko Zanatta, Francesco Caliari, Luca Dalle Carbonare, Vincenzo Lo Cascio

Dipartimento di Scienze Biomediche e Chirurgiche, Università degli Studi di Verona

L'aumento del turnover osseo (BT) predice il rischio fratturativo e la sua riduzione è uno dei meccanismi attraverso cui i bisfosfonati (BP) riducono il rischio fratturativo. Il target terapeutico è la riduzione dei BT markers a livelli pari alla metà inferiore del range di normalità per le donne premenopausali. Nei trial clinici la prolungata somministrazione di alendronato per osteoporosi postmenopausale determina il nadir dei livelli di BT dopo un anno di trattamento. Rimangono delle perplessità sui rischi di una eccessiva soppressione del turnover soprattutto in pazienti con bassi livelli di BT. Abbiamo comparato le variazioni dei livelli di BT (valutato come  $\beta$ CTX sierico) nel corso di più di 5 anni di trattamento con alendronato 70 mg/settimana in una popolazione ambulatoriale di 250 donne osteoporotiche con i livelli di riferimento del  $\beta$ CTX per le donne italiane in premenopausa (46-50 anni) recentemente pubblicati ( $\beta$ CTX  $0.26 \pm 0.13$  ng/ml; Adami S. et al. *Calcif Tiss Int* 2008). Nella popolazione studiata il nadir dei livelli di  $\beta$ CTX veniva raggiunto al quarto anno di terapia ( $-57 \pm 1,5\%$ ). La riduzione percentuale dai valori basali dei livelli di  $\beta$ CTX era significativamente diversa ad ogni controllo se venivano comparati i soggetti a basso turnover (LBT:  $\beta$ CTX < 500 ng/mL) con quelli ad alto turnover (HBT:  $\beta$ CTX > 500 ng/ml) ma il nadir veniva raggiunto in entrambi i gruppi al quarto anno di terapia con il medesimo valore assoluto. I valori assoluti di  $\beta$ CTX sono riportati nella tabella (media $\pm$ DS; ng/ml). Il range di normalità del  $\beta$ CTX veniva raggiunto in entrambi i gruppi dopo 3 anni di terapia con alendronato ma solo dopo il quarto anno di terapia i livelli di  $\beta$ CTX si collocavano nella metà inferiore del range di normalità. I livelli di  $\beta$ CTX non erano significativamente differenti tra i soggetti HBT e quelli LBT a 3, 4, 5 e più di 5 anni di terapia. In conclusione in questo studio "real world" di pazienti trattati con alendronato a lungo termine, il nadir del BT viene raggiunto più tardi rispetto ai dati

	Basale	3 anni	4 anni	5 anni	>5 anni
Tutti (n 250)	0.53 $\pm$ 0.25	0.29 $\pm$ 0.20 #	0.23 $\pm$ 0.15°	0.23 $\pm$ 0.13	0.23 $\pm$ 0.11
LBT (n 117)	0.35 $\pm$ 0.10	0.27 $\pm$ 0.18 #	0.22 $\pm$ 0.15°	0.21 $\pm$ 0.12	0.22 $\pm$ 0.09
HBT (n 133)	0.75 $\pm$ 0.21	0.32 $\pm$ 0.21 #	0.24 $\pm$ 0.14°	0.25 $\pm$ 0.14	0.24 $\pm$ 0.11

# p=0.01 vs basale e ° p=0.02 vs 3 anni

riportati nei trial clinici e rimane stabile nel range di normalità per tutta la durata della terapia. La mancanza di una eccessiva soppressione del BT suggerisce che la terapia a lungo termine con BP è sicura anche in pazienti a LBT.

## PSEUDOARTHROSIS OF THE FRACTURE OF THE TIBIA: TREATMENT WITH TERIPARATIDE

Giovanni Massaro, Gabriele Stabile, Ezio Marrocco, Giancarlo Zizzi

Orthopaedics and Traumatology, "Alfredo Fiorini" Hospital, Terracina, Latina (Italy)

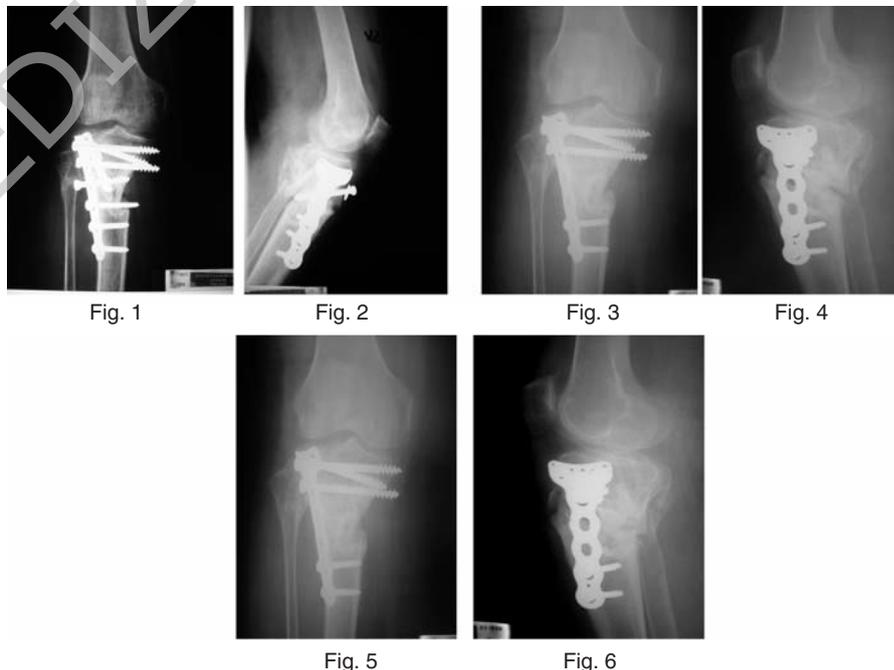
In November 2006 a 66 year old woman, limping and with pain due to traumatic fracture of the tibia surgically treated in January 2006, was consulted by our Day Surgery. Radiography showed limited bone healing, reduced calcium activity and signs of bone resorption. One of the screws was in the fracture, the other was loosening (Figs. 1, 2). She undertook a cycle of CEMP for 3 months without any reduction of pain. Radiography showed no signs of healing. The biochemical markers (osteocalcin, c-terminal telopeptide, PTH, bone specific alkaline phosphatase) showed a low bone turnover activity therefore in March 2007; the patient underwent the surgical removal of the screws and subsequent treatment with Teriparatide 20 mcg/day for 3 months. Radiography after 3 months from surgery (Figs. 3, 4) confirmed a clear healing of the fracture. Clinically the patient did not suffer pain and did not limp. After 3 months from the end of treatment with Teriparatide we confirmed an increase of bone tissue and the disappearance of bone resorption (Figs. 5, 6). **Conclusion.** The clinical case confirms the osteo inductive effect of teriparatide with a faster healing mechanism of fractures, even non vertebral, showing also having a potential role in the treatment of pseudoarthrosis.

## PSEUDOARTROSI DELLA DIAFISI PROSSIMALE DELLA TIBIA: UTILIZZO DEL TERIPARATIDE

Giovanni Massaro, Gabriele Stabile, Ezio Marrocco, Giancarlo Zizzi

Ortopedia e Traumatologia, Ospedale "Alfredo Fiorini", Terracina (LT)

Donna di 66 anni, visitata nel novembre 2006, con importante sintomatologia dolorosa e deficit della deambulazione, riporta la frattura scomposta della diafisi prossimale della tibia trattata in altra sede con placca e viti nel gennaio 2006. Dalle radiografie si apprezzano: "...limitati segni di reazione ossea...tono calcico sensibilmente ridotto..." e segni di riassorbimento osseo con una vite che si trova nel focolaio di frattura e un'altra che si è mobilizzata (Figg. 1, 2). A marzo 2007, previa valutazione dei valori sierici dell'osteocalcina, del c-telopeptide, del paratormone, dell'isoenzima osseo della fosfatasi ossea, che evidenziano un basso turnover osseo, la paziente è sottoposta ad intervento chirurgico di rimozione delle viti e terapia con teriparatide (TPTD) alla dose di 20 mcrg/die per tre mesi. Al controllo radiografico (Figg. 3, 4) eseguito a tre mesi dall'intervento e al termine del trattamento farmacologico con TPD abbiamo avuto conferma clinica del netto miglioramento della sintomatologia: la paziente è in grado di deambulare senza zoppia con recupero totale della flessione-estensione del ginocchio e scomparsa del dolore. Al follow-up radiografico a 3 mesi dal trattamento con teriparatide abbiamo notato apposizione di nuovo tessuto osseo e la scomparsa dei segni radiografici di riassorbimento osseo (Figg. 5, 6). **Conclusioni.** Il caso clinico conferma l'effetto osteoinduttivo del teriparatide attraverso una più rapida guarigione delle fratture anche non vertebrali. Inoltre il TPTD potrebbe avere un ruolo potenzialmente importante nel trattamento di alcune forme di pseudoartrosi in particolare dove il metabolismo osseo risulta compromesso. Pertanto si potrebbe ipotizzare la possibilità di un trattamento medico con TPTD sia come prevenzione ma anche in caso di fallimento del mezzo di sintesi in presenza di pseudoartrosi clinicamente dolorosa laddove le condizioni cliniche generali del paziente e locali della frattura (osteoporosi severa) non permettano un nuovo intervento chirurgico.



## **CIRCULATING OSTEOBLASTS IN SEVERE POST-MENOPAUSAL OSTEOPOROSIS: A NEW TARGET FOR TERIPARATIDE**

**Gianluigi Fabbriciani, Matteo Pirro, Christian Leli, Laura Callarelli, Francesco Bagaglia, Lucio Paoletti, Anna Maria Scarponi, Elmo Mannarino**

*Institute of Internal Medicine, Angiology and Arteriosclerosis Diseases, University of Perugia, Perugia (Italy)*

The prevention of fractures has been accepted as a pivotal strategy to decreasing mortality and morbidity among osteoporotic subjects. Teriparatide increases bone mechanical strength and decreases the risk of vertebral and nonvertebral osteoporotic fractures. Moreover, it promotes fracture healing in patients with complicated fractures and non-unions. The precise mechanisms by which teriparatide exerts its osteo-anabolic effects is not fully understood. Recently, cells positive for osteogenic markers like osteocalcin and alkaline phosphatase have been isolated in peripheral circulation. They represent 1-2% of mononuclear cells, their prevalence is greater in adolescents than in adults and increases after a fracture. Hence, it is believed that circulating osteoblasts play a key role in bone formation. Whether circulating osteoblasts represent a possible target for teriparatide action is still unknown. The number of circulating osteoblasts was quantified in peripheral blood by FACS analysis in 10 post-menopausal osteoporotic women with multiple vertebral fractures before and after a 4-week therapy with injectable teriparatide at a daily dose of 20 mg. Five age-matched severe osteoporotic women served as controls. Circulating osteoblasts were defined as alkaline-phosphatase positive cells. All participants underwent measurement of total hip and neck bone mineral density (BMD) by Dual-Energy X-ray Absorptiometry (DEXA), semiquantitative vertebral fracture analysis and a back pain's visual analog scale (VAS, range 0-100). Mean age was  $74.7 \pm 7.8$  years. Mean total hip and neck T-score were  $(-1.4 \pm 2.0$  and  $-2.9 \pm 1.4$ , respectively). The mean number of prevalent vertebral fracture was  $6 \pm 3$ . At baseline, the number of circulating osteoblasts was comparable between patients on either teriparatide or no osteo-inductor therapy and VAS score too. After 4 weeks teriparatide therapy, the number of circulating alkaline phosphatase positive cells increased by 80% (from  $64.7 \pm 28$  to  $114.9 \pm 44$  n/microL,  $p < 0.05$ ) and VAS score decreased by 70% (from  $74 \pm 33$  to  $23 \pm 13$ ,  $p < 0.05$ ). Conversely, the number of circulating osteoblasts and VAS score remained unchanged in the control group. We conclude that circulating osteoblasts could be a novel target for teriparatide action on building bone and fracture repair. It is also possible that analgesic effect of teriparatide in women with advanced osteoporosis is sustained by an increased availability of circulating osteoblasts that heal and stabilize pre-existing fractures or microdamages.

## **OSTEOBLASTI CIRCOLANTI NELL'OSTEOPOROSI POST-MENOPAUSALE SEVERA: UN NUOVO BERSAGLIO DEL TERIPARATIDE**

**Gianluigi Fabbriciani, Matteo Pirro, Christian Leli, Laura Callarelli, Francesco Bagaglia, Lucio Paoletti, Anna Maria Scarponi, Elmo Mannarino**

*Istituto di Medicina Interna, Angiologia e Malattie da Arteriosclerosi, Università degli Studi di Perugia*

La prevenzione delle fratture rappresenta una strategia in grado di ridurre la mortalità e la morbilità dei soggetti con osteoporosi. Il teriparatide aumenta la resistenza meccanica dello scheletro, riduce il rischio di fratture osteoporotiche vertebrali e non vertebrali e promuove il processo di riparazione delle fratture in pazienti con ritardi di consolidazione e pseudoartrosi. L'esatto meccanismo attraverso il quale il teriparatide esercita il suo effetto osteo-anabolico non è ancora definitivamente chiaro. Di recente sono state isolate nel sangue periferico cellule che esprimono antigeni propri della linea osteoblastica, quali osteocalcina e fosfatasi alcalina. Tali cellule rappresentano l'1-2% delle cellule mononucleate presenti in circolo, il loro numero è maggiore negli adolescenti rispetto a soggetti adulti ed aumenta rapidamente dopo una frattura. Si ritiene quindi che gli osteoblasti circolanti svolgano un ruolo chiave nel processo di neoformazione ossea. Ad oggi non è ancora noto tuttavia se gli osteoblasti circolanti possano rappresentare un bersaglio d'azione del teriparatide. Noi abbiamo misurato mediante analisi citofluorimetrica il numero degli osteoblasti circolanti in 10 donne affette da osteoporosi post-menopausale con fratture vertebrali multiple in condizioni basali e dopo 28 giorni di terapia con teriparatide 20 mg/die ed in 5 donne affette da osteoporosi grave di pari età non trattate nello stesso intervallo di tempo con farmaci osteo-anabolici. Gli osteoblasti circolanti sono stati definiti come cellule fosfatasi alcalina positive. I partecipanti allo studio hanno eseguito misurazione della densità minerale ossea a livello del femore (totale e collo) mediante DEXA, valutazione semiquantitativa delle fratture vertebrali prevalenti e valutazione della rachialgia mediante scala analogica visiva (VAS, range 0-100). L'età media era  $74,7 \pm 7,8$  anni. Il T-score medio a livello del femore totale e collo era  $-1,4 \pm 2,0$  e  $-2,9 \pm 1,4$  rispettivamente. Il numero di fratture vertebrali prevalenti era pari a  $6 \pm 3$ . Il numero degli osteoblasti circolanti in condizioni basali era confrontabile nei due gruppi così come il punteggio VAS. Dopo 4 settimane di terapia con teriparatide, si è osservato un aumento significativo del numero di cellule fosfatasi alcalina positive di circa l'80% (da  $64,7 \pm 28$  a  $114,9 \pm 44$  n/microL,  $p < 0,05$ ) ed una riduzione di circa il 70% del punteggio VAS (da  $74 \pm 33$  a  $23 \pm 13$ ,  $p < 0,05$ ). Il numero degli osteoblasti circolanti ed il punteggio VAS non si sono modificati nel gruppo controllo. Alla luce di tali risultati è possibile concludere che l'incremento del numero degli osteoblasti circolanti possa rappresentare un nuovo meccanismo attraverso cui il teriparatide contribuisce all'induzione della sintesi ossea ed alla riparazione delle fratture. È anche possibile che l'effetto antalgico del teriparatide in pazienti con osteoporosi avanzata sia sostenuto da un'augmentata disponibilità in circolo di osteoblasti in grado di promuovere il processo di consolidazione di pre-esistenti fratture e microdanni ossei.

## OSTEOCLAST FORMATION AND SURVIVAL IN MULTIPLE MYELOMA BONE DISEASE PATIENTS: ROLE OF DcR3

Silvia Colucci<sup>a</sup>, Angela Oranger<sup>a</sup>, Giacomina Brunetti<sup>a</sup>, Giorgio Mori<sup>b</sup>, Matteo Centonze<sup>a</sup>, Rita Rizzi<sup>c</sup>, Vincenzo Liso<sup>c</sup>, Maria Grano<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Human Anatomy and Histology, University of Bari, Bari (Italy)

<sup>b</sup> Department of Biomedical Sciences, University of Foggia, Foggia (Italy)

<sup>c</sup> Hematology Section, Department of Internal Medicine and Public Medicine, University of Bari, Bari (Italy)

Decoy Receptor 3 (DcR3), a member of the TNF receptor superfamily, is known to be involved in cell survival and osteoclast (OC) formation. In this study, we show that human myeloma cell lines (HMCLs), as well as malignant plasma cells and T lymphocytes from multiple myeloma (MM) bone disease patients, directly produce DcR3. By binding FasL this molecule inhibits OC apoptosis. In fact, the use of a neutralizing anti-DcR3 antibody induces a reduction of cell viability, the activation of caspase-8 and -3, and DNA fragmentation. Furthermore, we show that DcR3 supports OC formation in samples from MM patients through the upregulation of RANKL and TNF $\alpha$  by T lymphocytes and only TNF $\alpha$  by CD14+ cells. Finally, we detected high levels of DcR3 in the sera of MM patients. In conclusion, our data provide the first evidence of the expression of DcR3 in MM, and the involvement of this molecule in supporting the survival and formation of OCs from MM bone disease patients.

The production of DcR3 by T lymphocytes confers these cells a role in the pathogenesis of bone disease associated with MM.

## FORMAZIONE E SOPRAVVIVENZA DI OSTEOCLASTI IN PAZIENTI AFFETTI DA MIELOMA MULTIPLO: RUOLO DI DcR3

Silvia Colucci<sup>a</sup>, Angela Oranger<sup>a</sup>, Giacomina Brunetti<sup>a</sup>, Giorgio Mori<sup>b</sup>, Matteo Centonze<sup>a</sup>, Rita Rizzi<sup>c</sup>, Vincenzo Liso<sup>c</sup>, Maria Grano<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Dipartimento di Anatomia Umana e Istologia, Università degli Studi di Bari

<sup>b</sup> Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Foggia

<sup>c</sup> Sezione di Ematologia, Dipartimento di Medicina Interna e Medicina Pubblica, Università degli Studi di Bari

Decoy Receptor 3 (DcR3), è una molecola appartenente alla superfamiglia dei recettori TNF, nota per essere coinvolta nella sopravvivenza cellulare e nella formazione degli osteoclasti (OC). In questo lavoro dimostriamo che linee cellulari mielomatose umane (HMCLs) e plasmacellule maligne e linfociti T, ottenuti da soggetti affetti da mieloma multiplo (MM) con osteolisi, sono in grado di produrre DcR3. Questa molecola inibisce l'apoptosi degli OC mediante interazione con FasL. Infatti l'utilizzo di un anticorpo neutralizzante anti-DcR3 induce riduzione della vitalità cellulare, attivazione di caspasi-8 e -3 e frammentazione del DNA. Dimostriamo inoltre che DcR3 supporta la formazione di OC attraverso un aumento della produzione di RANK-L e TNF $\alpha$  da parte dei linfociti T isolati dai soggetti affetti da MM, e di TNF $\alpha$  da parte delle cellule CD14+, ottenute dagli stessi pazienti. Inoltre, come in altri tumori, risultano elevati livelli sierici di DcR3 nei soggetti affetti da MM. In conclusione, i nostri dati dimostrano per la prima volta l'espressione di DcR3 nel MM, nonché l'importanza di questa molecola nel supportare la sopravvivenza e la formazione di OC derivanti da soggetti affetti da MM con lesioni osteolitiche.

La produzione di DcR3 da parte dei linfociti T conferisce a queste cellule un importante ruolo nella patogenesi delle lesioni ossee associate al MM.

## CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE (CGRP) MODULATES WNT SIGNALING IN HUMAN OSTEOBLAST-LIKE CELLS BY INVOLVING PKA PATHWAY

Emanuela Mrak<sup>a</sup>, Gianluigi Moro<sup>b</sup>, Francesco Guidobono<sup>c</sup>, Alessandro Rubinacci<sup>a</sup>, Isabella Villa<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Bone Metabolic Unit; <sup>b</sup> Department of Orthopaedics, "San Raffaele" Scientific Institute; <sup>c</sup> Department of Pharmacology, Chemotherapy and Medical Toxicology, University of Milan, Milan (Italy)

Bone tissue contains CGRP-immunoreactive nerve fibers whose concentration increases during bone development and regeneration suggesting that this neuropeptide could be involved in the local regulation of bone remodeling. In human osteoblast-like cells (hOB), CGRP increases proliferation and modulates osteoclastogenesis by inhibiting OPG production through PKA activation. Since PKA is involved in PTH dependent  $\beta$ -catenin activation, we hypothesized that CGRP could exert its anabolic effects by inducing Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. For this purpose primary culture of human osteoblast-like cells were exposed to CGRP  $10^{-8}$  M and  $\beta$ -catenin gene expression and protein amount was evaluated after 15 and 60 min treatment. The results showed an increase of  $\beta$ -catenin protein levels after CGRP treatment.  $\beta$ -catenin protein levels induced by CGRP at 60min treatment were comparable to those induced by PTH. LiCl treatment was used as a positive control since it is known to increase endogenous  $\beta$ -catenin by blocking glycogen synthase-3-kinase  $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), the enzyme responsible for  $\beta$ -catenin degradation. Pre-treatment of hOBs with the specific receptor antagonist of CGRP, CGRP<sub>8-37</sub> ( $10^{-8}$  M), inhibited the observed effect on  $\beta$ -catenin, thus indicating that CGRP stabilizes  $\beta$ -catenin levels in a specific receptor mediated manner. CGRP was able to induce also a significant increase in  $\beta$ -catenin mRNA expression as shown by Real Time PCR. The effect was inhibited by pretreatment with CGRP<sub>8-37</sub> thus confirming the specificity of the result observed.  $\beta$ -catenin levels were measured by western blot in the nuclear fraction obtained from total cell lysates of hOBs exposed to  $10^{-8}$  M CGRP for 15, 30 and 60 min. CGRP treatment increased nuclear localization of  $\beta$ -catenin and pre-treatment with CGRP<sub>8-37</sub> prevented  $\beta$ -catenin nuclear migration as shown by immunofluorescence experiments. To demonstrate the involvement of PKA signaling in the CGRP induced increment of  $\beta$ -catenin levels, hOBs were pretreated with  $2 \times 10^{-6}$  M H89, a specific PKA inhibitor. H89 pretreatment prevented the CGRP induced  $\beta$ -catenin stabilization. Accordingly, pretreatment with  $2 \times 10^{-6}$  M H89 prevented PTH induced increment of  $\beta$ -catenin levels, thus providing additional evidence that PKA signaling is involved in the stabilization of the  $\beta$ -catenin levels. These data suggest that the action exerted by CGRP in bone is, at least in part, mediated by the activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling.

## CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE (CGRP) MODULA IL SEGNALE INTRACELLULARE WNT/ $\beta$ -CATENINA ATTRAVERSO L'ATTIVAZIONE DI PKA

Emanuela Mrak<sup>a</sup>, Gianluigi Moro<sup>b</sup>, Francesco Guidobono<sup>c</sup>, Alessandro Rubinacci<sup>a</sup>, Isabella Villa<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Unità Metabolismo dell'Osso; <sup>b</sup> Dipartimento di Ortopedia, IRCCS "San Raffaele"; <sup>c</sup> Dipartimento di Farmacologia, Chemioterapia e Tossicologia Medica, Università degli Studi di Milano

L'aumento di fibre nervose CGRP positive rilevato durante lo sviluppo e la rigenerazione del tessuto osseo, suggerisce che questo neuropeptide possa essere direttamente coinvolto nella regolazione locale del rimodellamento osseo. In osteoblasti umani in coltura (hOB) il CGRP induce la proliferazione cellulare e, attraverso l'attivazione di PKA, inibisce l'espressione di OPG modulando indirettamente l'osteoclastogenesi. Recentemente è stato dimostrato che alcune azioni anaboliche del PTH sono mediate dal segnale intracellulare Wnt/ $\beta$  catenina attraverso l'attivazione di PKA. Pertanto abbiamo ipotizzato che anche il CGRP potesse essere in grado di modulare questo signaling. Abbiamo quindi trattato hOB con CGRP  $10^{-8}$  M ed abbiamo analizzato l'espressione e i livelli proteici di  $\beta$ -catenina a 15 e 60 min di trattamento. In hOB, il CGRP aumenta i livelli di  $\beta$ -catenina ai tempi esaminati e a 60 min l'effetto del CGRP è paragonabile a quello del PTH. Il LiCl è stato usato come controllo positivo poiché determina un aumento di  $\beta$ -catenina agendo da inibitore dell'enzima glycogen synthase-3-kinase  $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), responsabile appunto della degradazione di  $\beta$ -catenina. Il pretrattamento con l'antagonista recettoriale del CGRP, CGRP<sub>8-37</sub> ( $10^{-8}$  M), inibisce l'aumento di  $\beta$  catenina indotto dal CGRP, indicando la specificità dell'effetto osservato. Anche l'espressione di  $\beta$ -catenina aumenta in modo specifico dopo trattamento con CGRP, come dimostrato dai risultati ottenuti con real time PCR. Esperimenti di western blot condotti su frazioni nucleari di lisati totali di osteoblasti trattati con CGRP per 15, 30, 60 min hanno dimostrato che il peptide è in grado di determinare la localizzazione nucleare di  $\beta$ -catenina. L'accumulo nucleare di  $\beta$ -catenina CGRP dipendente è specifico poiché il pretrattamento con CGRP<sub>8-37</sub> lo previene, come dimostrato da esperimenti di immunofluorescenza. L'aumento dei livelli di  $\beta$ -catenina da parte del CGRP implica l'attivazione di PKA poiché pretrattando hOB con H89, un inibitore specifico di PKA, l'effetto stimolatorio del CGRP viene inibito. I dati ottenuti indicano che l'azione che il CGRP esercita nell'osso è mediata, almeno in parte, dall'attivazione del segnale intracellulare di Wnt/ $\beta$  catenina.

## PREADIPOCYTE CELL MODEL TO TEST THE ROLE OF PHEX ON OSTEOBLAST DIFFERENTIATION

Alessia Gozzini, Laura Masi, Sabina Sorace, Isabella Tognarini, Gianna Galli, Silvia Parrini, Ivana Pela<sup>a</sup>, Annalisa Tanini, Maria Luisa Brandi

Metabolic Bone Diseases Unit, Department of Internal Medicine, University of Florence, Florence (Italy)

<sup>a</sup> Department of Pediatrics, University of Florence, Meyer Children's Hospital, Florence (Italy)

X-linked hypophosphatemia (XLH), the most prevalent form of inherited rickets, is characterized by defective bone mineralization, hypophosphatemia due to renal phosphate (Pi) wasting, and abnormal vitamin D metabolism. The *PHEX* gene, a Phosphate regulating gene with homologies to Endopeptidases on the X chromosome, localized at Xp22.11, was identified as the candidate gene for XLH. It codifies a 749 amino acid protein, expressed in various tissues including bones. Although the precise physiological role of *PHEX* is unknown, its homology to the M13 family of Zn-metalloendopeptidases suggests a role in regulating the activity of extracellular peptide/s that act in an autocrine, paracrine or endocrine fashion in the regulation of renal Pi reabsorption and skeletal mineralization. To date, more than 200 loss of function mutations of *PHEX* have been identified. In the present study we described a novel heterozygous donor splice site mutation (IVS9+1G>T) of *PHEX*, identified in a 3 years old female child affected by XLH. Our aim was to elucidate the effect of this mutation on splicing event and on osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) obtained from the patient. Two primary cultures of ADSCs, PA4 and PA9 cells, were obtained from the patient and from a healthy child, respectively, and induced into the osteoblastic phenotype. Our preliminary results indicated that this mutation causes partial or entire inclusion of intron 9 sequence in the mature mRNA, presumably leading to a truncated protein. Immunocytochemical analysis of *PHEX* in PA4 cells showed cellular mosaic in regarding to the expression of the X-linked mutated *PHEX* allele. The role of *PHEX* in osteoblastogenesis and mineralization process was investigated after 14 days from osteogenic induction by monitoring alkaline phosphatase (ALP) activity, mineralization, and synthesis and distribution of extracellular matrix proteins, osteopontin (OPN), osteocalcin (OCN) and type I alpha 1 collagen (COLIA1). PA4 and PA9 induced cells were highly positive for ALP staining with the capability to deposit mineralized matrix. Nevertheless, an impaired mineralization was observed in PA4 cells that deposited an altered calcified matrix not organized into compact nodules and not adhering to the cells. LSCM analysis showed that the osteogenic induction stimulated the synthesis of extracellular COLIA1 fibrils at similar level in both primary cell lines, and an increased OPN expression together with an *ex novo* OCN synthesis only in PA9 cells. Although the mutation was expressed in a proportion of PA4 cells due to random X-chromosome inactivation, obtained data are sufficient to suggest that *PHEX* activity is required for proper bone formation and controls bone matrix mineralization likely through regulation of bone proteins' synthesis and deposition.

## COLTURE CELLULARI DI PREADIPOCITI PER STUDIARE IL RUOLO DI PHEX NELLA DIFFERENZIAZIONE OSTEOBLASTICA

Alessia Gozzini, Laura Masi, Sabina Sorace, Isabella Tognarini, Gianna Galli, Silvia Parrini, Ivana Pela<sup>a</sup>, Annalisa Tanini, Maria Luisa Brandi

Unità di Malattie del Metabolismo Minerale e Osseo, Dipartimento di Medicina Interna, Università degli Studi di Firenze

<sup>a</sup> Dipartimento di Pediatria, Università degli Studi di Firenze, Ospedale Pediatrico Meyer, Firenze

Il rachitismo ipofosfatemico legato al cromosoma X (XLH), forma prevalente di rachitismo ereditario, è caratterizzato da mineralizzazione ossea difettiva, ipofosfatemica dovuta a perdita renale di fosfato (Pi) e metabolismo della vitamina D anomalo. Il gene *PHEX* (locus Xp22.11), un gene regolatore del Pi con omologia per le endopeptidasi sul cromosoma X, è stato identificato come gene candidato per XLH. *PHEX* codifica una proteina di 749 amminoacidi, espressa in vari tessuti compreso l'osso. Sebbene non sia noto l'esatto ruolo fisiologico di *PHEX*, la sua omologia con la famiglia M13 delle Zn-metalloendopeptidasi ne suggerisce un ruolo nella regolazione dell'attività di peptidi/e extracellulari che agiscono in modo autocrino, paracrino o endocrino nel controllo del riassorbimento renale di Pi e della mineralizzazione scheletrica. Ad oggi sono state descritte più di 200 mutazioni di *PHEX* che causano una perdita di funzione. Nel presente studio abbiamo descritto una nuova mutazione in eterozigosi di un sito di splicing donatore (IVS9+1G>T) di *PHEX*, scoperta in una bambina di 3 anni affetta da XLH. Il nostro scopo è stato studiare l'effetto di tale mutazione sul processo di splicing e sulla differenziazione osteogenica di cellule staminali mesenchimali derivate da tessuto adiposo (ADSCs) della paziente. Dal tessuto adiposo della paziente e di un bambino sano sono state allestite due colture primarie di ADSCs, PA4 e PA9, successivamente indotte in senso osteogenico. Dati preliminari indicano che la mutazione causa l'inclusione parziale o totale dell'introne 9 nel mRNA maturo e la sintesi di una proteina tronca. L'analisi immunocitochimica di *PHEX* evidenzia un mosaicismo di espressione della proteina dovuta alla trascrizione dell'allele *PHEX* mutato. Il ruolo di *PHEX* nell'osteoblastogenesi e nel processo di mineralizzazione è stato valutato dopo 14 giorni di induzione osteogenica attraverso l'analisi dell'attività della fosfatasi alcalina (ALP), della mineralizzazione e della sintesi e distribuzione delle proteine della matrice extracellulare, osteopontina (OPN), osteocalcina (OCN) e collagene di tipo I alfa 1 (COLIA1). Le cellule PA4 and PA9 indotte erano altamente positive alla colorazione per ALP e capaci di depositare matrice mineralizzata. Tuttavia, nelle cellule PA4 era presente un difetto di mineralizzazione per cui la matrice calcificata era alterata e non organizzata in noduli compatti e non aderente alle cellule. L'analisi LSCM ha mostrato che l'induzione osteogenica stimolava la sintesi delle fibrille extracellulari di COLIA1 in modo simile in entrambe le linee cellulari, ed un aumento dell'espressione di OPN e della sintesi *ex novo* di OCN solo nelle cellule PA9. Nonostante la parziale espressione della mutazione dovuta all'inattivazione casuale del cromosoma X, i dati ottenuti sono sufficienti ad indicare che l'attività di *PHEX* è necessaria per una corretta formazione dell'osso e controlla la mineralizzazione della matrice extracellulare probabilmente attraverso la regolazione della sintesi e della deposizione delle proteine della matrice ossea.

## PREVALENCE IN A DENSITOMETRIC SCREENING OF CLINICAL RISK FACTORS FOR OSTEOPOROTIC FRACTURE REPORTED IN THE "AIFA NOTA 79"

Maurizio Rossini<sup>a</sup>, Daniele Agostinelli<sup>b</sup>, Maria Rosaria Ambrosio<sup>c</sup>, Roberto D'Avino<sup>d</sup>, Emilio D'Erasmus<sup>e</sup>, Pierluigi De Remigis<sup>f</sup>, Antonella Esposito<sup>g</sup>, Giovanni Iolascon<sup>h</sup>, Giuseppe Guglielmi<sup>i</sup>, Mario Guido Nicolosi<sup>l</sup>, Franco Pellegrini<sup>m</sup>, Alessandro Ragno<sup>n</sup>, Francesca De Terlizzi<sup>o</sup>

<sup>a</sup> O.U. of Rheumatology, OCM Borgo Trento, University of Verona, Verona (Italy); <sup>b</sup> Hospital of Terlizzi, Menopause Laboratory, Terlizzi, Bari (Italy); <sup>c</sup> Section of Endocrinology, Department of Biomedical Sciences and Advanced Therapies, University of Ferrara, Ferrara (Italy); <sup>d</sup> O.U. of Orthopaedics and Traumatology, "S. Eugenio" Hospital of Rome (Italy); <sup>e</sup> Department of Clinical Sciences, University "La Sapienza" of Rome, Rome (Italy); <sup>f</sup> Institute of Internal Medicine, University of Chieti, Chieti (Italy); <sup>g</sup> Rheumatology, Second University of Naples, Naples (Italy); <sup>h</sup> Department of Orthopaedic, Traumatologic, Rehabilitative and Plastic-Reconstructive Sciences, Second University of Naples, Naples (Italy); <sup>i</sup> Department of Radiology, University of Foggia, S. Giovanni Rotondo (Italy); <sup>l</sup> Hospital Division "B", Obstetrics & Gynaecology, "S. Anna" Hospital, Turin (Italy); <sup>m</sup> Hospital of Penne, Pescara (Italy); <sup>n</sup> O.U. of Internal Medicine, "Regina Apostolorum" Hospital, Albano Laziale, Rome (Italy); <sup>o</sup> Igea, Carpi (Italy)

The database involved 9159 women with mean age of 60.7±8.9 years (mean age at menopause 49.2±4.5 years), AD-SoS mean T-score -2.3±1.7 and Z-score -1.0±1.5. Familiar history for vertebral fracture was reported only in 1.2% of patients. Precocious menopause was reported in 13.6% of screened women. The results (%) in the different age

Age ranges	Rheumatoid arthritis	Previous wrist fracture	Chronic steroid treatment	Previous vertebral fracture
50	1.6	0.8	3.5	0.2
55	2.0	1.5	6.6	0.3
60	2.9	1.7	8.7	0.8
65	3.0	2.7	10.2	2.1
70	3.8	4.4	11.5	2.2
75	7.9	5.8	15.6	2.7
80	10.9	7.8	17.2	2.0
>85	14.4	8.1	2.07	0.0

ranges of other clinical risk factors are reported in the table.

These results help to understand the impact of various clinical risk factors for fracture for the different age ranges in the postmenopausal women reported in our screening program; the low prevalence observed for the familiar history of vertebral fractures and previous vertebral fractures is probably due to difficulties in collecting this information.

## PREVALENZA IN UNO SCREENING DENSITOMETRICO DEI FATTORI DI RISCHIO CLINICI PER FRATTURA OSTEOPOROTICA CONSIDERATI DALLA NOTA 79

Maurizio Rossini<sup>a</sup>, Daniele Agostinelli<sup>b</sup>, Maria Rosaria Ambrosio<sup>c</sup>, Roberto D'Avino<sup>d</sup>, Emilio D'Erasmus<sup>e</sup>, Pierluigi De Remigis<sup>f</sup>, Antonella Esposito<sup>g</sup>, Giovanni Iolascon<sup>h</sup>, Giuseppe Guglielmi<sup>i</sup>, Mario Guido Nicolosi<sup>l</sup>, Franco Pellegrini<sup>m</sup>, Alessandro Ragno<sup>n</sup>, Francesca De Terlizzi<sup>o</sup>

<sup>a</sup> U.O. Reumatologia OCM Borgo Trento Università degli Studi di Verona; <sup>b</sup> Presidio Ospedaliero di Terlizzi, Ambulatorio per la Menopausa, Terlizzi, Bari; <sup>c</sup> Sezione di Endocrinologia Dipartimento di Scienze Biomediche e Terapie Avanzate, Università degli Studi di Ferrara; <sup>d</sup> U.O.C. di Ortopedia e Traumatologia Ospedale S. Eugenio, Roma; <sup>e</sup> Dipartimento di Scienze Cliniche, Università "La Sapienza" di Roma; <sup>f</sup> Istituto di Medicina Interna, Università degli Studi di Chieti; <sup>g</sup> Reumatologia Università degli Studi "Federico II", Napoli; <sup>h</sup> Dipartimento Scienze Ortopediche, Traumatologiche, Riabilitative e Plastico-Ricostruttive, Seconda Università degli Studi di Napoli; <sup>i</sup> Dipartimento di Radiologia, Università degli Studi di Foggia - S. Giovanni Rotondo; <sup>l</sup> Divisione Ospedaliera B, Ostetricia e Ginecologia, Ospedale S. Anna, Torino; <sup>m</sup> Ospedale di Penne, Pescara; <sup>n</sup> U.O. di Medicina Interna - Ospedale "Regina Apostolorum" - Albano Laziale, Roma; <sup>o</sup> Igea, Carpi

Sono disponibili i dati relativi a 9159 donne di età media pari a 60.7±8.9 anni (età media alla menopausa 49.2±4.5), con AD-SoS medio pari a -2.3±1.7 di T-score e -1.0±1.5 di Z-score. Una storia familiare per fratture vertebrali era riportata mediamente solo nell'1.2% delle pazienti, la menopausa precoce nel 13.6%. I risultati (%) per classi di età degli altri fattori clinici di rischio per frattura

Classi di età	Artrite reumatoide	Progressa frattura polso	Terapia cortisonica cronica	Pregresse fratture vertebrali
50	1.6	0.8	3.5	0.2
55	2.0	1.5	6.6	0.3
60	2.9	1.7	8.7	0.8
65	3.0	2.7	10.2	2.1
70	3.8	4.4	11.5	2.2
75	7.9	5.8	15.6	2.7
80	10.9	7.8	17.2	2.0
>85	14.4	8.1	2.07	0.0

sono riportati nella tabella.

Questi risultati contribuiscono a chiarire quale sia l'impatto, diversificato per l'età delle pazienti, dei vari fattori di rischio clinici per frattura considerati dalla Nota 79 in donne sottoposte a screening densitometrico e come la prevalenza di alcuni di essi (la storia familiare per fratture vertebrali e le pregresse fratture vertebrali) sia probabilmente sottostimata per la difficoltà di rilievo.

## EFFECT OF THIAZOLIDINEDIONES ON BONE METABOLISM IN DIABETIC PATIENTS

**Benedetta Carteni, Monica D'Adamo, Barbara Micchelini, Valeria Guglielmi, Giulia Donadel, Davide Lauro, Massimo Federici, Renato Lauro, Paolo Sbraccia**

*Department of Internal Medicine, University of Rome "Tor Vergata", Rome (Italy)*

Thiazolidinediones (TZDs) have been shown *in vitro* to have an effect on bone metabolism through the inhibition of osteoblasts differentiation and function. Studies in mice treated with rosiglitazone (ROSI) have confirmed this finding showing decreased bone mass. Furthermore recent studies have documented the effect of 12 weeks of ROSI treatment in post-menopausal women on bone metabolism showing reduced levels of bone formation.

The aim of our study was to assess the association between TZDs treatment and bone metabolism.

To this end, we studied a group of 20 diabetic subjects treated with TZDs (18 pioglitazone, 2 ROSI; 12M/8F; aged  $62.3 \pm 1.9$ ) alone or in association with other oral hypoglycaemic agents (OHA) and/or insulin (TZD group), compared to 18, age and sex -matched diabetics treated with other OHA and/or insulin (No-TZD group); both treatments lasted for at least 6 months. The two groups did not differ as regard to metabolic control (HbA1c), disease duration and BMI. All subjects underwent DEXA scan to evaluate bone mass at the lumbar and femoral site; evaluation of bone metabolism was performed by serum measurement of bone formation markers alkaline phosphatase, total and bone isoforms (ALP, B-ALP), and osteoprotegerin (OPG), and bone resorption marker C-telopeptide of collagen (CTX-I), whereas calcium metabolism was assessed by measurement of serum calcium and phosphate, plasma parathyroid hormone (PTH), 25-OH Vitamin D<sub>3</sub>.

Bone mineral density (BMD) at the hip was similar in the two groups, whereas BMD at the lumbar spine was significantly lower in the TZD group vs. No-TZD (Z-score  $0.05 \pm 0.34$  vs.  $1.12 \pm 0.36$ ,  $p=0.03$ ), although values were in the normal range for both groups. Serum calcium and phosphate levels, PTH, OPG and 25-OH VitD<sub>3</sub> were not different in the two groups. CTX-I was higher in TZD vs. No-TZD ( $0.27 \pm 0.03$  ng/ml vs.  $0.17 \pm 0.02$  ng/ml,  $p=0.01$ ), whereas the difference between serum B-ALP levels in the two groups approached the statistical significance, with the TZD group showing lower levels ( $21.64 \pm 1.6$  UI/L vs.  $29.39 \pm 9.3$  UI/L). Moreover, bone metabolism markers levels did not correlate with HbA1c, disease duration, age, and years since menopause (in females).

In summary our data show that TZD treated diabetic subjects have higher levels of bone resorption compared to a control group (No-TZD), and slightly, although not significant, lower levels of bone formation.

Our findings appear in agreement with recent *in vitro* study showing a novel role for PPAR $\alpha$  in osteoclast differentiation.

## RUOLO DEI TIAZOLIDINEDIONI NELLA REGOLAZIONE DEL METABOLISMO OSSEO IN PAZIENTI DIABETICI

**Benedetta Carteni, Monica D'Adamo, Barbara Micchelini, Valeria Guglielmi, Giulia Donadel, Davide Lauro, Massimo Federici, Renato Lauro, Paolo Sbraccia**

*Dipartimento di Medicina Interna, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"*

Alcune evidenze sperimentali sottolineano l'effetto dei Tiazolidinedioni (TZD) sul tessuto osseo: studi *in vitro* e su modelli animali hanno dimostrato un effetto negativo del rosiglitazone (ROSI) sul metabolismo osseo, con inibizione del differenziamento e della funzione degli osteoblasti e riduzione della formazione ossea; in uno studio in donne in menopausa, un breve trattamento con ROSI ha determinato diminuzione dei marcatori di formazione ossea.

Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare gli effetti di entrambi i TZD attualmente disponibili, sul metabolismo osseo di pazienti diabetici. Un gruppo di 20 pz. diabetici in trattamento con TZD (18 Pioglitazone/2 ROSI; 12M/8F; età  $62.3 \pm 1.9$ ) in monoterapia o associati con altri ipoglicemizzanti orali e/o insulina (TZD), è stato confrontato con un gruppo di 18 pz. diabetici, sovrapponibili per età e sesso, HbA1C, durata di malattia e BMI, in trattamento con altri ipoglicemizzanti orali e/o insulina (No-TZD); i pazienti di entrambi i gruppi erano in terapia farmacologica da almeno 6 mesi. La Densità Minerale Ossea (BMD) è stata misurata con densitometria DEXA a livello lombare e femorale; sono stati valutati: marcatori di formazione ossea Fosfatasi Alcalina Totale e ossea (ALP, B-ALP) e Osteoprotegerina (OPG); il marcatore di riassorbimento osseo  $\beta$ -cross-laps (frammenti C-terminali del collagene I – CTX-I); metabolismo fosfo-calcico: livelli sierici di calcio, fosforo, Paratormone (PTH) e 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>. La BMD del femore è risultata sovrapponibile nei due gruppi, mentre la BMD lombare ha mostrato valori significativamente inferiori nel gruppo TZD rispetto al No-TZD (Z-score  $0.05 \pm 0.34$  vs.  $1.12 \pm 0.36$ ,  $p=0.03$ ) sebbene nei limiti della norma. I livelli di calcio e fosforo, PTH, OPG e 25-OH-D<sub>3</sub> non hanno mostrato differenze significative nei due gruppi. Tuttavia, i livelli ematici di  $\beta$ -cross-laps sono risultati significativamente più elevati nel gruppo TZD ( $0.27 \pm 0.03$  ng/ml vs.  $0.17 \pm 0.02$  ng/ml,  $p=0.01$ ), mentre i livelli di B-ALP sono solo lievemente inferiori nel gruppo TZD ( $21.64 \pm 1.6$  UI/L vs.  $29.39 \pm 9.3$  UI/L  $p=0.09$ ). Inoltre i livelli dei marcatori del metabolismo osseo non correlano con HbA1c, durata di malattia, età e anni dalla menopausa (nelle donne). I nostri dati mostrano che pz. trattati con TZD hanno più alti livelli di riassorbimento osseo e valori non significativamente inferiori di formazione ossea rispetto al gruppo di controllo e sembrano in accordo con recenti studi *in vitro* che dimostrano un inedito ruolo del PPAR $\alpha$  nel differenziamento degli osteoclasti.

## EFFECTS OF ANTIPILEPTIC DRUGS ON BONE DENSITY IN AMBULATORY PATIENTS: A 15 YEAR LONGITUDINAL STUDY

Carla Caffarelli<sup>a</sup>, Stefano Gonnelli<sup>a</sup>, Alice Cadirni<sup>a</sup>, Katie Del Santo<sup>a</sup>, Raffaele Rocchi<sup>b</sup>, Ranuccio Nuti<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Internal Medicine, Endocrine-Metabolic Science and Biochemistry, University of Siena, Siena (Italy)

<sup>b</sup> Department of Neuroscience, University of Siena, Siena (Italy)

Increased fracture rates have been described in patients with epilepsy. Some studies have found that chronic therapy with antiepileptic drugs (AEDs) causes abnormalities in calcium metabolism. In particular, the AEDs most commonly associated with metabolic bone diseases include phenobarbital, phenytoin, and carbamazepine, all inducers of the hepatic cytochrome P450 enzyme system with consequent increased catabolism of vitamin D, resulting in decreased absorption of calcium, secondary hyperparathyroidism and decreased bone mineral density (BMD). This study aimed to evaluate the effect of long-term AEDs therapy on bone density in a group of ambulatory epileptic patients consecutively referred to the out-patient clinic for the diagnosis and treatment of epilepsy who had participated in a previous study carried out in 1993. Twenty-six subjects (aged  $51.2 \pm 13.0$  years) under treatment with AEDs drugs for at least 10 years were studied. In all we measured serum calcium, phosphorus, alkaline phosphatase (ALP), urinary calcium 24/h and BMD by using a DXA device (QDR 4500, Hologic, USA) at radius (BMD-UD), at lumbar spine (BMD-LS), at femoral neck (BMD-FN) and at total femur (BMD-TF). A Food Frequency Questionnaire was used for calculation of dietary calcium intake. Patients records were used to obtain cumulative dose (CD) of AEDs drugs. BMD at radius was reduced with respect to the evaluation carried out in 1993; however the two measurements were significantly correlated ( $p < 0.05$ ). A significant correlation was found between CD of phenytoin and BMD at all sites ( $p < 0.05$ ). A significant, even if moderate correlation was found between carbamazepine and BMD at ultradistal radius but not with axial BMD. No significant relationship was found between phenobarbital CD and BMD in all sites. By dividing the subjects on the basis of the CD of phenytoin we observed that BMD T-score values were significantly lower in subjects that had taken more than 200 gr of phenytoine. Moreover a significant correlation was found for ALP with phenytoin and phenobarbital ( $p < 0.05$ ) but not between ALP and carbamazepine ( $p = 0.23$ ). Our findings show that CD of AEDs is inversely related to BMD at all axial sites and wrist. In particular, we found a positive association between a higher CD of AEDs and osteoporosis. We can conclude that BMD screening is warranted in subjects with long-term AEDs exposure.

## INFLUENZA DEI FARMACI ANTIEPILETTICI SULLA DENSITÀ MINERALE OSSEA IN PAZIENTI AMBULATORIALI: STUDIO LONGITUDINALE DI 15 ANNI

Carla Caffarelli<sup>a</sup>, Stefano Gonnelli<sup>a</sup>, Alice Cadirni<sup>a</sup>, Katie Del Santo<sup>a</sup>, Raffaele Rocchi<sup>b</sup>, Ranuccio Nuti<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Dipartimento di Medicina Interna, Scienze Endocrino-Metaboliche e Biochimica, Università degli Studi di Siena

<sup>b</sup> Dipartimento di Neuroscienze, Università degli Studi di Siena

I pazienti affetti da epilessia presentano un rischio di fratture maggiore rispetto alla popolazione generale. Questo rischio è legato non solo alla maggiore incidenza di cadute in occasione delle crisi o agli effetti sedativi dei farmaci stessi, ma anche agli effetti metabolici dei farmaci antiepilettici. In particolare all'effetto d'induzione del sistema enzimatico del citocromo P450 con conseguente aumento del catabolismo della Vit D. Scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare l'influenza dei farmaci antiepilettici sulla densità minerale ossea (BMD) e sul metabolismo osseo. Sono stati studiati i pazienti (età media  $51.2 \pm 13.0$  anni) afferiti consecutivamente presso il Centro per la Diagnosi e Cura dell'Epilessia di Siena per un controllo della loro patologia a condizione che avessero partecipato ad uno studio condotto nel 1993 che prevedeva una valutazione del metabolismo fosfo-calcico ed una BMD del polso con metodo DXA. In tutti 26 soggetti così selezionati, abbiamo valutato calcemia, fosforemia, fosfatasi alcalina (FA) e calciuria delle 24 h, inoltre abbiamo valutato l'intake calcico mediante un questionario di frequenza. In tutti i soggetti abbiamo misurato la BMD a livello lombare (BMD-LS), femorale (femoral neck: BMD-FN, total hip: BMD-TF) ed a livello del polso con la valutazione di tutte le sottoregioni (ultradistale, UD-BMD, mediadistale MID-BMD e totale TP-BMD) con metodica DXA (QDR 4500, Hologic, USA). La valutazione densitometrica ha mostrato valori medi di T-score compatibili con osteopenia sia a livello del rachide lombare che di tutte le sottoregioni del polso e del femore. I valori di BMD espressi come T-score sono risultati correlati con quelli osservati nel 1993. Abbiamo rilevato una correlazione inversa significativa tra il dosaggio totale di fenitoina e la BMD a livello del rachide lombare, del femore e del polso. Invece la dose totale di carbamazepina è risultata positivamente correlata solo con la UD-BMD. Dividendo i pazienti in base alla dose totale di fenitoina abbiamo osservato che i soggetti che avevano assunto una dose cumulativa superiore a 200 gr presentavano valori di BMD significativamente ridotti rispetto a quelli trattati con una dose cumulativa inferiore. La FA è risultata significativamente correlata con la dose cumulativa di fenitoina e fenobarbitale ( $p < 0.05$ ) ma non con la carbamazepina ( $p = 0.23$ ). In conclusione, i risultati del nostro studio suggeriscono che i pazienti in trattamento con i farmaci antiepilettici presentano una riduzione della BMD a livello del rachide lombare, delle sottoregioni femorali e di tutte le sottoregioni del polso. Pertanto nei pazienti che assumono farmaci antiepilettici per lungo tempo è indicata una valutazione della BMD.

## A RANDOMIZED-CONTROLLED TRIAL OF ALENDRONATE AND INDAPAMIDE ALONE OR IN COMBINATION IN THE MANAGEMENT OF IDIOPATHIC HYPERCALCIURIA ASSOCIATED WITH OSTEOPOROSIS: FINAL RESULTS

Antonella Barone<sup>a</sup>, Andrea Giusti<sup>a</sup>, Giulio Pioli<sup>b</sup>, Giuseppe Girasole<sup>c</sup>, Vincenzo Siccardi<sup>c</sup>, Monica Razzano<sup>a</sup>, Monica Pizzonia<sup>a</sup>, Ernesto Palummeri<sup>a</sup>, Gerolamo Bianchi<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Gerontology, Galliera Hospital, Genoa (Italy)

<sup>b</sup> Gerontology, Santa Maria Hospital, Reggio Emilia (Italy)

<sup>c</sup> Rheumatology, Colletta Hospital, Arenzano (Italy)

The role of bisphosphonates (BPs) in the treatment of patients with idiopathic hypercalciuria (IHC) associated with osteoporosis is still uncertain. To evaluate the effect of alendronate alone or in combination with indapamide on bone mineral density (BMD) and 24-hours calciuria (CaU), 77 post-menopausal women with IHC (CaU > 4mg/kg/die) and low BMD [T-score < -2.0 at lumbar spine (LS), femoral neck (FN) or total hip (TH)] from two centres of Northern Italy, were randomised to receive: indapamide 2.5 mg daily alone (24 patients, IND group), alendronate 70 mg weekly alone (27 patients, ALN group) or the combination therapy (26 patients, ALE + IND group). Throughout the study, all subjects received daily calcium supplements, depending on their dietary intake, to maintain a daily input of 1,000 mg. Patients were instructed to increase water intake up to 2000 ml daily. The percentage change of BMD at LS, FN and TH, and the variation of 24-hours CaU from baseline at 1-year were the primary outcomes. Serum calcium, PTH and bone alkaline phosphatase were also measured. Patients in the 3 groups were similar with regard to baseline characteristics. After 1-year, CaU values significantly decreased from baseline in all groups (IND, 239±78 vs. 364±44, p<.001) (ALN, 279±68 vs. 379±79, p<.001) (ALE + IND, 191±68 vs. 390±55, p<.001). The mean % decrease of CaU in ALE + IND group (-50%) was significantly greater compared to ALN (-24%, p<.001) and IND (-35% p=.012). BMD did not significantly changed from baseline after 1 year of treatment with indapamide (LS: +1±3.1%; FN: -0.3±3.5%; TH: -0.4±3.1%), while showed a significant increase from baseline in the other 2 groups (ALN; LS: +5.8±4.2%, p<.001; FN: +3.9±7.9%, p=.018; TH: +2±3.6%, p=.006) (ALE + IND; LS: +8.2±5.3%, p<.001; FN: +4.9±6.7%, p=.007; TH: +2.9±4.2%, p=.004). In addition, patients in the combination group (ALE + IND) showed a significantly higher increase of BMD at LS compared to ALN (p=.04). These results show a benefit on BMD and CaU, of BPs' therapy in IHC associated with osteoporosis. The combination therapy demonstrated a reduction of CaU and an increase in LS BMD superior to that observed with alendronate alone. Our results support a new potential approach with BPs associated to thiazide diuretics or indapamide in the management of post-menopausal women with IHC and associated bone loss.

## RISULTATI FINALI DI UNO STUDIO RANDOMIZZATO E CONTROLLATO SULL'EFFETTO DI ALENDRONATO ED INDAPAMIDE IN DONNE POST-MENOPAUSALI AFFETTE DA IPERCALCIURIA IDIOPATICA ASSOCIATA AD OSTEOPOROSI

Antonella Barone<sup>a</sup>, Andrea Giusti<sup>a</sup>, Giulio Pioli<sup>b</sup>, Giuseppe Girasole<sup>c</sup>, Vincenzo Siccardi<sup>c</sup>, Monica Razzano<sup>a</sup>, Monica Pizzonia<sup>a</sup>, Ernesto Palummeri<sup>a</sup>, Gerolamo Bianchi<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Gerontologia, Ospedali Galliera, Genova

<sup>b</sup> Gerontologia, Ospedale Santa Maria, Reggio Emilia

<sup>c</sup> Reumatologia, Ospedale Colletta, Arenzano

Il ruolo dei bisfosfonati (BPs) nel trattamento di pazienti affetti da ipercalciuria idiopatica (IHC) ed osteoporosi rimane incerto. Con lo scopo di valutare l'effetto, sulla densità minerale ossea (DMO) e sulla calciuria delle 24 ore (CaU), dell'alendronato e dell'indapamide in monoterapia o in associazione, abbiamo randomizzato 77 donne post-menopausali, affette da IHC (CaU > 4mg/kg/die) e con ridotta DMO [T-score < -2.0 lombare (LS), femore collo (FN) o femore totale (TH)] in tre gruppi di trattamento: indapamide 2.5 mg/die (24 pazienti, gruppo IND), alendronato 70 mg/settimanale (27 pazienti, gruppo ALN) e alendronato + indapamide (26 pazienti, gruppo ALE + IND). Nel corso dello studio le pazienti hanno ricevuto un supplemento di calcio allo scopo di mantenere un apporto giornaliero di 1000 mg, ed hanno ricevuto istruzioni di mantenere un apporto idrico di circa 2 litri. Gli outcomes primari erano: la variazione percentuale della DMO nei tre siti esaminati e la variazione della calciuria delle 24 ore dopo un anno di terapia. Il calcio sierico, il PTH e la fosfatasi alcalina ossea sono stati misurati al basale e dopo 12 mesi. I tre gruppi erano simili rispetto alle principali caratteristiche basali. Dopo un anno, la CaU ha mostrato un significativo decremento rispetto al basale in tutti i gruppi (IND, 239±78 vs. 364±44, p<.001) (ALN, 279±68 vs. 379±79, p<.001) (ALE + IND, 191±68 vs. 390±55, p<.001). La variazione percentuale media nel gruppo ALE + IND (-50%) risultava significativamente superiore rispetto agli altri due gruppi: ALN (-24%, p<.001); IND (-35% p=.012). Dopo 1 anno di trattamento con indapamide in monoterapia, la DMO non mostrava variazioni significative rispetto al basale (LS: +1±3.1%; FN: -0.3±3.5%; TH: -0.4±3.1%). Al contrario, la DMO evidenziava un significativo incremento negli altri due gruppi (ALN; LS: +5.8±4.2%, p<.001; FN: +3.9±7.9%, p=.018; TH: +2±3.6%, p=.006) (ALE + IND; LS: +8.2±5.3%, p<.001; FN: +4.9±6.7%, p=.007; TH: +2.9±4.2%, p=.004). I pazienti in terapia di associazione mostravano dopo un anno, un incremento della DMO lombare significativamente maggiore rispetto ai pazienti trattati con alendronato in monoterapia (p=.04). Questi risultati evidenziano un effetto positivo, in termini di incremento densitometrico e di riduzione della CaU, dei BPs nel trattamento dell'ipercalciuria idiopatica associata ad osteoporosi. La terapia di associazione ha dimostrato un decremento della CaU ed un incremento della DMO superiore ai singoli farmaci in monoterapia. In conclusione i nostri risultati supportano un nuovo potenziale approccio con i bisfosfonati in associazione ai diuretici tiazidici o indapamide nel trattamento di donne post-menopausali con ipercalciuria idiopatica associata ad osteoporosi.

## VERTEBRAL FRACTURES PREVALENCE IN HIV INFECTED PATIENTS

Luca Pietrogrande<sup>a</sup>, Emanuela Raimondo<sup>a</sup>, Gentian Cuko<sup>a</sup>, Maddalena Casana<sup>b</sup>, Teresa Bini<sup>b</sup>, Paola Cicconi<sup>b</sup>, Laura Comi<sup>b</sup>, Alberto Magenta<sup>c</sup>, Luca Tagliabue<sup>d</sup>, Antonella d'Arminio Monforte

<sup>a</sup> Orthopaedic Clinic, <sup>b</sup> Clinic of Infectious and Tropical Diseases, <sup>c</sup> Radiology, and <sup>d</sup> Nuclear Medicine; Department of Medicine, Surgery and Odontoiatrics, University of Milan, "S. Paolo" Hospital, Milan (Italy)

The association between HIV and osteoporosis is well known, but there are only few publications about fragility fractures in these patients. Some lifestyles and hormonal disequilibrium prevail in HIV patients and are often associated with low BMD levels and bone metabolism disorders. Among these poor physical activity, reduced calcium and vitamin D intake, smoke, alcohol abuse, depression, opiates abuse, low testosterone levels. The virus itself contribute to bone resorption acceleration due to the high production of specific inflammatory cytokines by over-stimulated T lymphocytes like interleukins, TNF, RANKL and M-CSF. The high aggressive antiretroviral therapy (HAART), that reduced HIV mortality and increased patients' mean age, seems to fast the overturning of bone structure particularly following to the use of some drugs like zidovudine. All the studies till now has valuated the prevalence of osteopenia and osteoporosis only evaluating the bone mineral density (BMD) but there are not disposable results about vertebral fractures and vertebral deformity prevalence. The aim of this transversal study is to define silent vertebral fracture and vertebral deformity prevalence in 33 HIV infected patients naïve or on HAART therapy and to evaluate if there is any correlation between decreasing BMD obtained with DEXA and a higher risk of vertebral fractures or deformities. For each patient were collected anamnestic data about osteoporosis risk factors and HIV infection, laboratory results about immunological state and bone metabolism, lumbar and femoral DEXA results, dorso lumbar spine morphometric measures. A multivariate logistic analysis has been done, considering the presence of any evident fracture correlated to the adjusted presence of osteopenia/osteoporosis as outcome variable and also an univariate and multivariate linear regression analysis to link the number of evident fractures to morphometric results and BMD. Through 33 patients considered 33.3% were females (mean age 43 y) with a mean BMI of 23.5 (20.7-25.3). 22 patients (66.7%) showed a DEXA T-score  $<-1$  e  $>-2,5$  while 6 of them (18.2%) a DEXA T-score  $<-2,5$ ; 12 (36.4%) had vertebral deformity, with median Spine Deformity Index (SDI)  $\geq 1$ . There were no increase among patients with osteopenia in vertebral deformity (66,7% SDI  $\geq 1$ ; 66,4% SDI  $< 1$ ). In patients with osteoporosis, vertebral deformity was shown in 33.3% subjects while 9.52% in those with SDI  $< 1$  (chisq  $p=1$ ). In multivariate linear regression analysis, SDI resulted inversely correlated with spine T-score and BMI and directly correlated with months of antiretroviral therapy exposure.

## PREVALENZA DI FRATTURE VERTEBRALI IN PAZIENTI HIV POSITIVI

Luca Pietrogrande<sup>a</sup>, Emanuela Raimondo<sup>a</sup>, Gentian Cuko<sup>a</sup>, Maddalena Casana<sup>b</sup>, Teresa Bini<sup>b</sup>, Paola Cicconi<sup>b</sup>, Laura Comi<sup>b</sup>, Alberto Magenta<sup>c</sup>, Luca Tagliabue<sup>d</sup>, Antonella d'Arminio Monforte

<sup>a</sup> Clinica Ortopedica, <sup>b</sup> Clinica Malattie Infettive e Tropicali, <sup>c</sup> Radiologia e <sup>d</sup> Medicina Nucleare; Dipartimento di Medicina, Chirurgia ed Odontoiatria, Università degli Studi di Milano, Ospedale "San Paolo"

L'associazione tra HIV ed osteoporosi è nota, ma mancano dati in letteratura sulle fratture da osteoporosi in questi pazienti. Alcuni stili di vita e squilibri ormonali che sono spesso prevalenti tra i pazienti HIV positivi sono associati a bassi livelli di BMD e disordini del metabolismo osseo. Tra questi la scarsa attività fisica, un ridotto introito di calcio e vitamina D, il fumo di sigaretta, l'abuso di alcool, stati depressivi, l'uso di oppiacei e bassi livelli di testosterone. Il virus stesso può inoltre contribuire direttamente al processo di accelerato riassorbimento osseo grazie all'aumento della produzione di citochine pro-infiammatorie specifiche in seguito alla sovrastimolazione dei linfociti T, come le interleuchine, TNF, RANKL e M-CSF. La terapia antiretrovirale altamente aggressiva (HAART), che ha contribuito alla riduzione della mortalità HIV correlata con conseguente aumento dell'età media di questi pazienti, sembra favorire un più rapido sovvertimento della struttura ossea legato in particolare all'utilizzo di specifici farmaci antiretrovirali come la zidovudina. Tutti gli studi condotti fino ad ora hanno stimato la prevalenza di osteopenia e/o osteoporosi valutando la densità minerale ossea (BMD) ma non sono disponibili dati sulla prevalenza di fratture e deformità vertebrali. L'obiettivo di questo studio trasversale è quello di determinare la prevalenza di fratture vertebrali silenti e deformità vertebrale in una coorte di 33 pazienti HIV positivi naïve o in terapia antiretrovirale e valutare se il riscontro di una riduzione dei valori di massa ossea (BMD) ottenuti con metodica DEXA sia correlabile ad un elevato rischio di incorrere in deformità e fratture vertebrali. Per ogni paziente sono stati raccolti dati anamnestici sui fattori di rischio per l'osteoporosi e sulla malattia virale, dati di laboratorio sulla situazione immunologica e sul metabolismo osseo, valori densitometrici lombari e femorali, misurazioni morfometriche della colonna dorsolombare. È stata quindi effettuata una analisi logistica multivariata con variabile di outcome la presenza di almeno 1 frattura evidente alla morfometria in relazione alla presenza di osteopenia e/o osteoporosi aggiustate per altri parametri confondenti e un'analisi di regressione lineare univariata e multivariata per correlare il numero di fratture evidenti alla morfometria e il BMD. Dei 33 pazienti valutati il 33,3% era di sesso femminile (età media 43 a) con BMI medio 23,5 (20,7-25,3). Di questi alle analisi DEXA 22 pazienti (66,7%) hanno mostrato un T-score  $<-1$  e  $>-2,5$  e 6 pazienti (18,2%) un T-score  $<-2,5$ ; 12 pazienti (36,4%) hanno presentato deformità vertebrali, con un valore medio di Spine Deformity Index (SDI)  $\geq 1$ . Nello specifico tra i pazienti con osteopenia non è stato riscontrata un'aumentata incidenza di deformità vertebrali (66,7% SDI  $\geq 1$ ; 66,4% SDI  $< 1$ ). Nei pazienti con osteoporosi la presenza di deformità vertebrali è stata riscontrata nel 33,3% dei soggetti contro solo il 9,52% di pazienti con SDI  $< 1$  (chisq  $p=1$ ). Nelle analisi di regressione lineare multivariate l'SDI è risultato inversamente correlato con i valori di T-score e di BMI e direttamente correlato con i mesi di esposizione alla terapia antiretrovirale.

## ONE YEAR DXA RESULTS FROM A PROSPECTIVE MULTI-CENTRE STUDY ON A SHORT ANATOMIC, LATERAL FLARE FEMORAL IMPLANT

Carlina V. Albanese, Ian Learmonth, Laura Pavan, Francesco S. Santori, Viviana De Tullio, Roberto Passariello

Department of Radiological Sciences, University of Rome "La Sapienza", Rome (Italy)

Bone resorption of the proximal femur is a common issue with total hip arthroplasty (THA). One of the main factors that affect bone remodelling is prosthesis design and the resultant stress distribution. By promoting a proximal load transfer, short stem prostheses allow a more physiological stress distribution. This can reduce the potential for stress shielding and encourage the preservation of the metaphyseal bone stock. The availability of non-invasive techniques to evaluate biological bone remodelling after THA, such as Dual energy X-ray Absorptiometry (DXA), are crucial in the current orthopaedic practice. DXA is an accurate and reliable measure of bone mineral density (BMD). We present a longitudinal evaluation of the changes in BMD measured by DXA method after THA using the DePuy PROXIMA™ hip, an anatomic, proximally fixed femoral implant that fits almost entirely within the metaphyseal region of the femur. *Methods.* A total of 20 patients were recruited as part of an ongoing long-term multi-centre clinical trial. The operations took place between February and October 2006 and all patients received a DePuy PROXIMA™ hip. There were 9 females and 11 males, with a mean age of 59 (range 40-70). The mean weight was 76 kg (range 48-106) and the mean height was 171cm (range 160-187). DXA scans were taken at 3, 6 and 12 months post-operatively using a Hologic QDR 4500-A. Due to the distinctive geometry of the stem, the conventional Gruen zones were reduced from seven to five (zone 1, 2, 4, 6, 7), zones 3 and 5 were eliminated. Therefore, a five Region of Interest (ROI) protocol of analysis was developed. The amount of BMD was recorded for each ROI and the overall BMD was summarised in the ROIs net average. *Results.* All 20 patients were scanned at 3, 6 and 12 months. Eighteen of the 20 cases (90%) showed an increase in mean BMD between 3 and 6 months, 16 cases (80%) showed an increase between 3 and 12 months. Increases in BMD were also noted in all Gruen zones; the highest increases were observed in zones 2 and 6 between 3 and 6 months, in zones 1 and 6 between 3 and 12 months. *Discussion.* Maintaining or improving BMD in early post-operative period after THA is considered crucial in terms of long-term success of the arthroplasty. Preservation of bone stock is also crucial for a possible revision procedure. The design of the DePuy PROXIMA™ hip is such that the load distribution is concentrated in the proximal femur with stress distributed in the medial and lateral bone of the femoral metaphysis, which in turn leads to a more pronounced increase in BMD in these two areas. *Conclusions.* The early results of this study suggest that by producing a more proximal loading the use of the DePuy PROXIMA™ hip lead to positive bone remodelling in the proximal periprosthetic bone; this might reduce the potential for stress shielding.

## RISULTATI AD UN ANNO DI UNO STUDIO PROSPETTICO MULTICENTRICO SU UN IMPIANTO FEMORALE ANATOMICO, LATERAL FLARE A STELO CORTO

Carlina V. Albanese, Ian Learmonth, Laura Pavan, Francesco S. Santori, Viviana De Tullio, Roberto Passariello

Dipartimento di Scienze Radiologiche, Università degli Studi di Roma "La Sapienza"

Il riassorbimento osseo del femore prossimale è un'evenienza molto comune nell'artroprotesi dell'anca (THA). Uno dei maggiori fattori che influiscono sul rimodellamento osseo è costituito dal disegno protesico e dalla conseguente distribuzione del carico. Le protesi a stelo corto determinano il trasferimento del carico a livello prossimale consentendo una distribuzione più fisiologica, che riduce a sua volta il rischio di stress shielding preservando il bone stock metafisario. La disponibilità di tecniche non invasive per la valutazione biologica del rimodellamento osseo dopo THA come la Dual energy X-ray Absorptiometry (DXA) rivestono un'importanza cruciale nell'ambito della pratica ortopedica. La DXA è un metodo accurato per misurare la bone mineral density (BMD). In questo studio, presentiamo i risultati delle variazioni longitudinali della BMD misurata con tecnica DXA dopo intervento di THA con utilizzo dello stelo anatomico a fissazione prossimale DePuy PROXIMA™ che viene interamente inserito nella regione metafisaria del femore. *Metodi.* Sono stati selezionati 20 pazienti nell'ambito di un trial multicentrico ancora in corso. Gli interventi sono stati eseguiti tra febbraio e ottobre 2006 in tutti i pazienti è stato posizionato uno stelo DePuy PROXIMA™ hip. La popolazione studiata comprendeva 9 femmine e 11 maschi con età media di 59 anni (range 40-70). Il peso medio era di 76 kg (range 48-106) e l'altezza media di 171cm (range 160-187). Le scansioni DXA sono state eseguite a 3, 6 and 12 mesi dopo l'intervento utilizzando una macchina Hologic QDR 4500-A. Per la peculiarità geometrica dello stelo le 7 regioni convenzionali di Gruen sono state ridotte da sette a cinque (regione 1, 2, 4, 6, 7), le regioni 3 e 5 sono state eliminate. Quindi, è stato sviluppato un protocollo di analisi con 5 Region of Interest (ROI). Sono stati analizzati i valori della BMD di ogni ROI e tutti i singoli valori delle BMD sono stati sommati ed indicati in termini di ROIs net average. *Risultati.* Tutti i pazienti inclusi sono stati scannerizzati a 3, 6 e 12 mesi. Diciotto su i 20 pazienti (90%) hanno dimostrato un aumento della BMD tra 3 e 6 mesi, 16 casi (80%) ha dimostrato un aumento tra 3 e 12 mesi. L'aumento della BMD è stato osservato in tutte le regioni di Gruen, l'incremento più alto è stato riportato nelle regioni 2 e 6 tra 3 e 6 mesi e nelle regioni 1 e 6 tra 3 e 12 mesi. *Discussione.* Il mantenimento o l'aumento della BMD nell'immediato periodo post-chirurgico dopo intervento di THA è considerato un aspetto cruciale in termini di successo della sopravvivenza dell'artroplastica. Il mantenimento del bone stock è anche un parametro importante per le possibili procedure di revisione. Il design dello stelo femorale DePuy PROXIMA™ è tale che il carico di distribuzione è concentrato nel femore prossimale con le forze distribuite nell'osso mediale e laterale della metafisi femorale che a sua volta determina un più pronunciato aumento della BMD in queste due aree. *Conclusioni.* I risultati preliminari dello studio suggeriscono che la DePuy PROXIMA™ producendo un carico più prossimale durante l'uso del femore determina un rimodellamento osseo periprotetico positivo che a sua volta potrebbe ridurre il rischio di stress shielding.

## AGE-RELATED EXPRESSION OF RUNX-2 IN PERIPHERAL MONOCYTIC CELLS

**Mirko Zanatta, Luca Dalle Carbonare, Maria Teresa Valenti, Luca Donatelli, Francesco Bertoldo, Vincenzo Lo Cascio**

*Department of Biomedical and Surgical Sciences, Internal Medicine D, University of Verona, Verona (Italy)*

RUNX-2 is widely accepted as a master gene regulator in osteoblast development and bone formation. It is firstly expressed in the embryonic ossification process but it is also necessary for osteoblastic differentiation during growth and ageing. Anyway little is known about the regulation of its activity and about the age-related differences of its expression.

The aim of our study is the analysis of RUNX-2 expression during growth and ageing.

We enrolled 40 healthy volunteers (20 males and 20 females) aged between 10 and 50. Lymphocytic cells were isolated from peripheral blood, RNA was extracted and RUNX-2 expression was studied using real-time PCR.

Preliminary data reveal that RUNX-2 expression is higher during the second decade while it decreases progressively during the third decade by 40%.

Our work shows that RUNX-2 expression is age-related and it changes significantly during growth and ageing.

Since RUNX-2 is activated very early during osteoblast differentiation, its absence impairs the correct ossification process and its alteration is associated with some known genetic skeletal pathology we might consider it as an important gene in the regulation of bone metabolism and turnover and might be in the future a possible target gene in the treatment of several bone fragility disease.

## ESPRESSIONE ETÀ-CORRELATA DEL RUNX-2 IN CELLULE MONONUCLEATE ISOLATE DA SANGUE PERIFERICO

**Mirko Zanatta, Luca Dalle Carbonare, Maria Teresa Valenti, Luca Donatelli, Francesco Bertoldo, Vincenzo Lo Cascio**

*Dipartimento di Scienze Biomediche e Chirurgiche, Istituto di Medicina Interna, Università degli Studi di Verona*

Il RUNX-2 è un master gene nella regolazione del differenziamento osteoblastico e nello sviluppo dello scheletro. Esso viene attivato nell'embrione nelle prime fasi del processo di ossificazione, ma è indispensabile anche nella differenziazione osteoblastica durante la crescita e l'invecchiamento. Tuttavia poco si conosce sui meccanismi che regolano l'espressione di RUNX-2 e su come questa si modifichi con l'età.

Lo scopo della nostra ricerca è di studiare eventuali differenze nell'espressione di RUNX-2 in diverse fasce d'età.

Abbiamo reclutato 40 volontari sani (20 maschi e 20 femmine) compresi tra i 10 e i 50 anni. Abbiamo isolato i linfociti da sangue periferico, estratto l'RNA ed eseguita valutazione dell'espressione del RUNX2 mediante real time PCR.

I dati preliminari mostrano una espressione massima del RUNX-2 durante la seconda decade di vita. Essa cala progressivamente nel corso della terza decade con una riduzione di circa il 40%. Il nostro lavoro mostra come l'espressione del RUNX-2 si modifichi in modo significativo nel corso della crescita e dell'invecchiamento.

In considerazione del fatto che RUNX-2 è attivato molto precocemente nel differenziamento osteoblastico, che in sua assenza vengono a mancare i corretti processi di ossificazione e che una sua alterazione è coinvolta in alcune note patologie genetiche dello scheletro, è possibile considerarlo un gene fondamentale nella regolazione del metabolismo e del turnover scheletrico e un possibile futuro gene target nella terapia delle malattie fragilizanti dell'osso.

## **HYPERPHOSPHATASIA: A UNIQUE TYPE WITHOUT MUTATIONS IN TNFRSF11A (RANK), TNFRSF11B (OPG), OR SQSTM1 (SEQUESTOSOME 1)**

**Maria Luisa Mascia<sup>a</sup>, Salvatore Minisola<sup>a</sup>, Alfredo Scillitani<sup>b</sup>, Vito Guarnieri<sup>b</sup>, Giuseppe Guglielmi<sup>b</sup>, Claudia Battista<sup>b</sup>, Paola Ballanti<sup>a</sup>, Elisabetta Romagnoli<sup>a</sup>, Xiafang Zhang<sup>c</sup>, Steven Mumm<sup>c</sup>, Michael P. Whyte<sup>c</sup>**

<sup>a</sup> *University of Rome "La Sapienza", Rome (Italy)*

<sup>b</sup> *"Casa Sollievo della Sofferenza" Hospital, S. Giovanni Rotondo, Foggia (Italy)*

<sup>c</sup> *Shriners Hospital for Children and Washington University School of Medicine, St Louis, MO, USA*

We report a 49 year old man with a seemingly unique form of hyperphosphatasia. His mother had a presumptive diagnosis of Paget's disease of bone (PDB). At age 27 years, he developed widespread skeletal pain. His general practitioner recorded serum total alkaline phosphatase activity (ALP) elevated almost ten-fold, while liver function testing and principal parameters of calcium homeostasis were normal. Since 1997, he had several hospitalizations for bone pain unresponsive to non-steroidal anti-inflammatory drugs. Calcitonin for two years briefly relieved his bone pain; then he received bisphosphonates but with brief normalization of serum ALP only with i.v. pamidronate and zoledronate. Nevertheless, sequential Tc-99m methylene diphosphonate bone scans showed progressive involvement of new bones. Distinct radiographic features were multiple osteolytic areas of the skull, enlargement of the first and second lumbar vertebrae, and selective sclerotic lesions of the long bones together with normal epiphyses and the lack of progression of the indistinctly marginated osteolytic lesions. Histopathologic, histomorphometric, and ultrastructural analysis of affected bone revealed some similarities with PDB (increased trabecular remodelling and paramyxovirus-like structures in the osteoclast nuclei). However, in contrast to advanced PDB, trabecular bone volume was decreased (not increased) and trabeculae were disconnected. Moreover, osteoclasts were not "hypernucleated". There was no mental retardation. Mutation analysis of TNFRSF11A (exon 1), TNFRSF11B and SQSTM1 (exon 6, 7 and 8) genes did not reveal a mutation. Our patient's clinical and radiographic and histopathological features appear unique. This disorder, that may be familial and genetically based, should be added to the hyperphosphatasia syndromes.

## **UN CASO UNICO DI IPERFOSFATASIA SENZA MUTAZIONI DEL TNFRSF11A (RANK), TNFRSF11B (OPG), SQSTM1 (SEQUESTOSOME 1)**

**Maria Luisa Mascia<sup>a</sup>, Salvatore Minisola<sup>a</sup>, Alfredo Scillitani<sup>b</sup>, Vito Guarnieri<sup>b</sup>, Giuseppe Guglielmi<sup>b</sup>, Claudia Battista<sup>b</sup>, Paola Ballanti<sup>a</sup>, Elisabetta Romagnoli<sup>a</sup>, Xiafang Zhang<sup>c</sup>, Steven Mumm<sup>c</sup>, Michael P. Whyte<sup>c</sup>**

<sup>a</sup> *Università degli Studi di Roma "La Sapienza"*

<sup>b</sup> *"Casa Sollievo della Sofferenza" Hospital, S. Giovanni Rotondo, Foggia*

<sup>c</sup> *Shriners Hospital for Children and Washington University School of Medicine, St Louis, MO, USA*

Riportiamo il caso di un uomo di 49 anni affetto da una forma apparentemente unica di iperfosfatasia. Sua madre era affetta da malattia di Paget dell'osso (PDB). All'età di 27 anni ha cominciato a lamentare dolori scheletrici diffusi. Le analisi routinarie mettevano in evidenza valori elevati di fosfatasi alcalina sierica totale (ALP) dieci volte maggiori rispetto al limite superiore, mentre i valori di funzionalità epatica e i principali parametri del ricambio minerale risultavano normali. Dal 1997 aveva eseguito diversi ricoveri per il persistere della sintomatologia dolorosa ossea che non rispondeva ai farmaci anti-infiammatori non steroidei. La terapia con calcitonina per 2 anni aveva alleviato lievemente i dolori ossei e parzialmente ridotto i valori di ALP; in seguito, il paziente era stato sottoposto a trattamento con bisfosfonati ottenendo, però, una transitoria normalizzazione della ALP sierica solo con pamidronato e zoledronato e.v.. Tuttavia, scintigrafie scheletriche total body con Tc-99 metilen-bisfosfonato eseguite durante un arco di tempo di oltre dieci anni avevano documentato un progressivo coinvolgimento di nuovi segmenti scheletrici. L'esame radiografico dello scheletro dimostrava multiple aree osteolitiche del cranio, ingrandimento e sclerosi della prima e seconda vertebra lombare, sclerosi delle ossa lunghe senza interessamento epifisario e mancata progressione delle lesioni litiche indistintamente demarcate. L'analisi della biopsia della cresta iliaca rivelava alcune similitudini con la malattia ossea di Paget (rimodellamento trabecolare aumentato e strutture paramyxovirus-simili all'interno dei nuclei degli osteoclasti). Tuttavia, in contrasto alla PDB avanzata, il volume osseo trabecolare era diminuito (non incrementato), le trabecole disconnesse e gli osteoclasti non erano ipernucleati. Il paziente non era affetto da ritardo mentale. L'analisi dei geni TNFRSF11A (esone 1), TNFRSF11B e SQSTM1 (esoni 6, 7 e 8) non rilevava nessuna mutazione. Le caratteristiche cliniche, radiologiche ed istopatologiche del nostro paziente sembrano uniche. Questo disordine, che potrebbe avere una base familiare e genetica, dovrebbe essere aggiunto alle sindromi iperfosfatasemiche.

## **A NOVEL SECRETED OSTEOCLASTOGENIC FACTOR OF ACTIVATED T CELLS (SOFAT) INDUCES OSTEOCLASTS IN A RANKL- INDEPENDENT MANNER**

**M. Neale Weitzmann**

*Division of Endocrinology & Metabolism & Lipids, Department of Medicine, Emory University School of Medicine, Atlanta, Georgia, USA*

The inflammatory autoimmune disease Rheumatoid Arthritis (RA) leads to severe focal bone erosions in afflicted joints, as well as the development of a generalized systemic osteoporosis. Chronic T cell activation is central to both the etiology of RA, and to the bone destruction associated with this malady. Activated T cells potently induce bone turnover by secreting cytokines that regulate both osteoclast and osteoblast formation and activity. We previously reported novel cytokine-like activities in media from activated T cells that potently induced osteoblastic IL-6 production, an inflammatory cytokine and stimulator of osteoclastogenesis, and an activity that directly stimulated osteoclast formation independently of the key osteoclastogenic cytokine Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL). Using biochemical purification, mass-spectrometry, and recombinant DNA technologies, we have identified, cloned and expressed a single novel cytokine possessing both the capacity to induce osteoblastic IL-6 production, and osteoclastogenesis in the absence of RANKL. We named this cytokine Secreted Osteoclastogenic Factor of Activated T Cells (SOFAT). SOFAT is a secreted fragment of a threonine synthase-like 2 homolog, an enzyme previously thought to have no function in mammals. SOFAT may act to exacerbate inflammation and bone turnover under inflammatory conditions and in autoimmune disease.

## **UN NUOVO FATTORE OSTEOCLASTOGENICO SECRETO DAI LINFOCITI T ATTIVATI (SOFAT) STIMOLA GLI OSTEOCLASTI ATTRAVERSO UN MECCANISMO RANKL-INDIPENDENTE**

**M. Neale Weitzmann**

*Division of Endocrinology & Metabolism & Lipids, Department of Medicine, Emory University School of Medicine, Atlanta, Georgia, USA*

L'artrite reumatoide (AR), una malattia infiammatoria autoimmune, determina gravi lesioni ossee focali nelle articolazioni colpite e la comparsa di osteoporosi sistemica diffusa. La cronica attivazione dei linfociti T è fondamentale nell'eziologia dell'AR e nella distruzione di tessuto osseo associata alla malattia. I linfociti T attivati sono potenti induttori del turnover osseo, secernendo citochine che modulano la formazione e l'attività di osteoclasti e osteoblasti. Abbiamo in precedenza dimostrato *in vitro* nuove attività citochiniche dei linfociti T attivati, quali l'induzione di una marcata produzione osteoblastica di IL-6, una citochina infiammatoria che stimola anche l'osteoclastogenesi, e un'azione diretta di induzione della formazione di osteoclasti che appare indipendente dal RANKL (Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand), la citochina chiave nella formazione degli osteoclasti. Utilizzando tecnologie di purificazione biochimica, spettrometria di massa e DNA ricombinante, abbiamo identificato, clonato e indotto l'espressione di una nuova distinta citochina che ha la capacità di indurre sia la produzione osteoblastica di IL-6 sia l'osteoclastogenesi in assenza di RANKL. Abbiamo denominato questa citochina SOFAT (Secreted Osteoclastogenic Factor of Activated T Cells). SOFAT è un frammento di secrezione di un omologo dell'enzima simil-treonina sintetasi di tipo 2, enzima che si riteneva non avesse alcuna funzione nei mammiferi. SOFAT potrebbe agire esacerbando l'infiammazione e accelerando il turnover osseo in presenza di flogosi e nelle patologie autoimmuni.

## EVALUATION OF 11 $\beta$ -HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE (HSD) TYPE 1 AND 2 ACTIVITIES IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS USING CULTURED BONE FRAGMENTS

Maria Luisa Sartori<sup>a</sup>, Andrea Dovio<sup>a</sup>, Chiara Sciolla<sup>a</sup>, Silvia De Francia<sup>b</sup>, Andrea Raffaelli<sup>c</sup>, Alessandro Saba<sup>d</sup>, Paolo Clerico<sup>e</sup>, Piero Salvadori<sup>d</sup>, Alberto Angeli<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Internal Medicine I and <sup>b</sup> Pharmacology, Department of Clinical and Biological Sciences, University of Turin, Turin (Italy)

<sup>c</sup> CNR – Institute of Chimica dei Composti Organo Metallici, Pisa (Italy)

<sup>d</sup> Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale, University of Pisa, Pisa (Italy)

<sup>e</sup> Dipartimento di Ortopedia, Traumatologia e Medicina del Lavoro, University of Turin, Turin (Italy)

Individual susceptibility to glucocorticoids (GCs) in terms of therapeutic and adverse effects varies considerably and is difficult to predict clinically. Moreover, GC sensitivity varies among tissues and changes as a function of inflammation. We assessed 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (11 $\beta$ -HSD) type 1 and 2 activities in patients with rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA) requiring joint surgery, by measuring interconversion of cortisol (F)-cortisone (E) in trabecular bone chips from operated joints. Twenty-seven RA (M/F 5/22, age: median 63, range 21-77 yr) and 13 OA patients (M/F 3/10, age 72, 68-87 yr) entered the study. OA patients were older than RA, and showed lower C-reactive protein levels. Of RA patients, 23 were on chronic GC therapy; of OA patients, only two were on GCs. Trabecular bone specimens came from knee (RA: n=17; OA: n=4), hip (RA: n=8, OA: n=9), hand (RA: n=1) and shoulder (RA: n=1). Both reductase and oxidase activities were expressed in bone fragments; reductase activity was higher in terms of steroid molecules released in the medium in both groups. Reductase activity was marginally higher in RA than in OA patients. Female RA patients showed lower reductase activity than male ones. In RA patients reductase activity positively correlated with WBC count; when female patients were analyzed separately, this positive correlation was confirmed and a further correlation with neutrophil count became apparent. Oxidase activity was similar in RA and OA patients. It tended to be lower in RA females than in the male counterpart; in RA females it negatively correlated with PCR. Our data are consistent with increased generation of active GC in trabecular bone from rheumatoid joints. Sex-related and drug-induced differences in reductase activity need further exploration. Patterns of expression of 11 $\beta$ -HSD1 and -2 are likely to have consequences on inflammation and bone integrity in such patients.

## VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ENZIMATICA 11 $\beta$ -IDROSSISTEROIDODEIDROGENASI (HSD) DI TIPO 1 E 2 IN FRAMMENTI OSSEI DI PAZIENTI AFFETTI DA ARTRITE REUMATOIDE

Maria Luisa Sartori<sup>a</sup>, Andrea Dovio<sup>a</sup>, Chiara Sciolla<sup>a</sup>, Silvia De Francia<sup>b</sup>, Andrea Raffaelli<sup>c</sup>, Alessandro Saba<sup>d</sup>, Paolo Clerico<sup>e</sup>, Piero Salvadori<sup>d</sup>, Alberto Angeli<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Medicina Interna I e <sup>b</sup> Farmacologia, Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche, Università degli Studi di Torino

<sup>c</sup> CNR – Istituto di Chimica dei Composti Organo Metallici, Pisa

<sup>d</sup> Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale, Università degli Studi di Pisa

<sup>e</sup> Dipartimento di Ortopedia, Traumatologia e Medicina del Lavoro, Università degli Studi di Torino

La sensibilità individuale agli effetti terapeutici ed avversi dei glicocorticoidi (GC) è molto variabile ed è difficilmente prevedibile su base clinica. Inoltre, la sensibilità ai GC varia nei diversi tessuti e si modifica in corso di infiammazione. Abbiamo studiato l'attività enzimatica 11 $\beta$ -idrossisteroidodeidrogenasi (HSD) di tipo 1 e 2 in pazienti affetti da artrite reumatoide (AR) e in pazienti affetti da osteoartrosi (OA), sottoposti a chirurgia articolare, misurando l'interconversione di cortisolo (F)-cortisone (E) in frammenti di osso trabecolare. Hanno partecipato allo studio 27 pazienti affetti da AR (M/F 5/22, età mediana 63 anni, range 21-77 anni) e 13 pazienti affetti da OA (M/F 3/10, età mediana 72, 68-87 anni). I pazienti con OA erano più anziani dei pazienti con AR, e mostravano livelli di proteina C-reattiva più bassi. Dei pazienti con AR, 23 erano in terapia cronica con GC; dei pazienti con OA solo due erano in trattamento con GC. I frammenti di osso trabecolare provenivano da ginocchio (AR: n=17; OA: n=4), anca (AR: n=8; OA: n=9), mano (AR: n=1) e spalla (AR: n=1). Nei frammenti ossei erano espresse le attività enzimatiche 11 $\beta$ -HSD sia di tipo 1 che di tipo 2; in entrambi i gruppi, l'attività reductasica era maggiore in termini di molecole steroidee rilasciate nel mezzo di coltura. L'attività reductasica tendeva ad essere più alta nei pazienti con AR che in quelli con OA. Le pazienti con AR mostravano un'attività reductasica più bassa rispetto ai pazienti di sesso maschile. Nei pazienti con AR l'attività reductasica correlava positivamente con la conta dei globuli bianchi; quando le pazienti erano analizzate separatamente dagli uomini, veniva confermata questa correlazione positiva e si riscontrava un'ulteriore correlazione positiva con la conta dei neutrofili. L'attività ossidasica era simile nei pazienti con AR e con OA, e nel gruppo dei pazienti con AR tendeva ad essere più bassa nelle donne; in queste correlava negativamente con la PCR. I nostri dati sono coerenti coll'ipotesi che nell'osso trabecolare delle articolazioni colpite da AR si verifichi un aumento di produzione di glicocorticoidi attivi, con possibili ricadute su infiammazione ed integrità dell'osso. Le differenze nell'attività reductasica legate al sesso ed indotte da farmaci necessitano di ulteriori approfondimenti.

## MUTATIONAL ANALYSIS OF BETA-CATENIN EXON 3 IN PARATHYROID ADENOMAS AND CARCINOMAS

Elena Pardi, Filomena Cetani, Simona Borsari, Chiara Banti, Federica Saponaro, Giuseppe Viccica, Piero Berti<sup>a</sup>, Paolo Miccoli<sup>a</sup>, Aldo Pinchera, Claudio Marcocci

Department of Endocrinology and Metabolism; <sup>a</sup> Department of Surgery, University of Pisa, Pisa (Italy)

Single benign adenoma is responsible for 80-85% of primary hyperparathyroidism (PHPT), while carcinoma accounts for 1% of all sporadic cases. In addition, tumours with histological aspects of carcinoma, but without distant metastasis, are defined atypical adenomas. Wnt signaling pathway abnormalities have been described in many human tumours and, recently, alterations and cytoplasmic accumulation of  $\beta$ -catenin, a key signal mediator of the Wnt signaling pathway, have been reported in a subset of sporadic parathyroid adenomas. The exon 3 of *CTNNB1* gene, encoding  $\beta$ -catenin, can be considered a "hotspot" for mutational activation of  $\beta$ -catenin in many human tumours, because it contains serine-threonine aminoacids, potential targets for GSK-3 $\beta$  phosphorylation.

The aim of the study was to investigate abnormalities of the regulation of  $\beta$ -catenin in parathyroid tumorigenesis. Genomic DNA from 90 sporadic parathyroid adenomas, 21 carcinomas and 6 atypical adenomas was extracted and the exon 3 of the *CTNNB1* gene was PCR-amplified and direct sequencing was performed using ABI Prism 310 sequencer. Potential mutations of target residues prevent degradation of  $\beta$ -catenin.

Direct sequencing of exon 3 of the *CNNTB1* gene showed absence of stabilizing mutations in any pathologic specimens.

Our results suggest and confirm that Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway abnormalities are rarely, if at all, involved in the development of sporadic benign as well as malignant parathyroid tumours.

## ANALISI MUTAZIONALE DELL'ESONE 3 DELLA BETA-CATENINA IN ADENOMI E CARCINOMI PARATIROIDEI

Elena Pardi, Filomena Cetani, Simona Borsari, Chiara Banti, Federica Saponaro, Giuseppe Viccica, Piero Berti<sup>a</sup>, Paolo Miccoli<sup>a</sup>, Aldo Pinchera, Claudio Marcocci

Dipartimento di Endocrinologia e Metabolismo; <sup>a</sup> Dipartimento di Chirurgia, Università degli Studi di Pisa

L'adenoma unghiandolare delle paratiroidi è responsabile di circa l'80-85% dei casi di iperparatiroidismo primario (PHPT) sporadico, mentre il carcinoma paratiroideo ha una frequenza <1%. L'adenoma atipico delle paratiroidi presenta caratteristiche istologiche tipiche del carcinoma, ma non sviluppa metastasi a distanza.

Molti tumori umani presentano anomalie della via di segnale Wnt e, recentemente, sono state descritte alterazioni, con conseguente accumulo intracitoplasmatico, a carico della  $\beta$ -catenina, una proteina che agisce come trasduttore del segnale lungo la via Wnt, in un gruppo di adenomi sporadici delle paratiroidi. L'esone 3 del gene *CTNNB1*, che codifica la  $\beta$ -catenina, può essere considerato un "hotspot" per l'attivazione mutazionale della  $\beta$ -catenina, in quanto contiene aminoacidi serina e treonina, potenziali bersagli della fosforilazione da parte della chinasi GSK-3 $\beta$ .

Lo scopo di questo studio è verificare l'eventuale presenza di mutazioni nell'esone 3 del gene *CTNNB1*, con particolare attenzione ai siti di fosforilazione della  $\beta$ -catenina, in un'ampia casistica di tumori benigni e maligni delle paratiroidi.

Il DNA genomico è stato estratto da 90 adenomi sporadici, 21 carcinomi e 6 adenomi atipici delle paratiroidi, l'esone 3 del gene *CTNNB1* è stato amplificato tramite PCR e direttamente sequenziato utilizzando il sequenziatore automatico ABI Prism 310. Eventuali mutazioni dei residui bersaglio prevengono la degradazione della  $\beta$ -catenina, e favoriscono il suo ruolo di potenziale proto-oncogene.

Il sequenziamento dell'intero esone 3 del gene *CNNTB1* non ha evidenziato mutazioni stabilizzanti la  $\beta$ -catenina in alcun tessuto patologico analizzato.

I nostri risultati suggeriscono che anomalie della via di segnale Wnt/ $\beta$ -catenina siano raramente, se non affatto, coinvolte nello sviluppo dei tumori paratiroidi, sia benigni che maligni.

## INTRAMUSCULAR NERIDRONATE IN POSTMENOPAUSAL WOMEN WITH LOW BONE MINERAL DENSITY

**Ombretta Viapiana<sup>a</sup>, Silvano Adami<sup>a</sup>, Francesco Bertoldo<sup>b</sup>, Leonardo Sartori<sup>c</sup>, Ombretta Di Munno<sup>d</sup>, Paolo Filippini<sup>e</sup>, Claudio Marcocci<sup>f</sup>, Bruno Frediani<sup>g</sup>, Ernesto Palummeri<sup>h</sup>, Carmelo Erio Fiore<sup>i</sup>, Daniele Costi<sup>j</sup>, Maurizio Rossini<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Rheumatology Unit, University of Verona, Verona (Italy)

<sup>b</sup> Medicine D, University of Verona, Verona (Italy)

<sup>c</sup> Medical Clinic I, University of Padua, Padua (Italy)

<sup>d</sup> Department of Internal Medicine, Rheumatology Unit, University of Pisa, Pisa (Italy)

<sup>e</sup> General Medicine, Hospital of Umbertide, Perugia (Italy)

<sup>f</sup> Department of Endocrinology & Metabolism, University of Pisa, Pisa (Italy)

<sup>g</sup> Rheumatology, University of Siena, Siena (Italy)

<sup>h</sup> "Galliera" Hospitals, Genoa (Italy)

<sup>i</sup> "L. Condorelli" Medical Clinic, University of Catania, Catania (Italy)

<sup>j</sup> Medical Clinic, University of Parma, Parma (Italy)

Neridronate is an amino-bisphosphonate that can be given intramuscularly (IM) that was tested in a phase 2 clinical trial in 188 postmenopausal osteoporotic women randomized to IM treatment with: 25 mg neridronate every two weeks, neridronate 12.5 mg or 25 mg every four weeks, or placebo. All patients received calcium and vitamin D supplements. The patients were treated over 12 months with 2 year post-treatment follow up. After 12 month treatment all 3 doses were associated with significant BMD increases at both the total hip and spine. A significant dose-response relationship over the 3 doses was observed for the BMD changes at the total hip but not at the spine. Bone alkaline phosphatase decreased significantly by 40-55% in the neridronate treated patients with insignificant dose response relationship. Serum type I collagen C-telopeptide decreased by 58 to 79% with a significant dose-response relationship ( $p < 0.05$ ). Two years after treatment discontinuation BMD declined by 1-2% in each dose group with values still significantly higher than baseline at both the spine and the total hip. Bone turnover markers progressively increased after treatment discontinuation and on the second year of follow-up the values were significantly higher than pre-treatment baseline. The results of this study indicate that IM neridronate might be of value for the limited number of patients intolerant to oral bisphosphonates and unwilling or unable to undergo an IV infusion of bisphosphonates.

## EFFETTO DEL NERIDRONATO PER VIA INTRAMUSCOLARE IN DONNE IN MENOPAUSA CON BASSA MASSA OSSEA

**Ombretta Viapiana<sup>a</sup>, Silvano Adami<sup>a</sup>, Francesco Bertoldo<sup>b</sup>, Leonardo Sartori<sup>c</sup>, Ombretta Di Munno<sup>d</sup>, Paolo Filippini<sup>e</sup>, Claudio Marcocci<sup>f</sup>, Bruno Frediani<sup>g</sup>, Ernesto Palummeri<sup>h</sup>, Carmelo Erio Fiore<sup>i</sup>, Daniele Costi<sup>j</sup>, Maurizio Rossini<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Unità di Reumatologia, Università degli Studi di Verona

<sup>b</sup> Medicina D, Università degli Studi di Verona

<sup>c</sup> Clinica Medica I, Università degli Studi di Padova

<sup>d</sup> Dipartimento di Medicina Interna, U.O. di Reumatologia, Università degli Studi di Pisa

<sup>e</sup> Medicina Generale, Ospedale di Umbertide (PG)

<sup>f</sup> Dipartimento di Endocrinologia e Metabolismo, Università degli Studi di Pisa

<sup>g</sup> Reumatologia, Università degli Studi di Siena

<sup>h</sup> Ospedali "Galleria", Genova

<sup>i</sup> Clinica Medica "L. Condorelli", Università degli Studi di Catania

<sup>j</sup> Clinica Medica, Università degli Studi di Parma

Il neridronato è un aminobisfosfonato che può essere somministrato per via intramuscolare (IM). Presentiamo i risultati di un trial clinico di fase 2 che ha coinvolto 188 donne osteoporotiche in menopausa che sono state randomizzate ad uno dei seguenti trattamenti somministrati sempre per via IM: 25 mg di neridronato ogni 2 settimane, 25 mg di neridronato ogni 4 settimane, 12,5 mg di neridronato ogni 2 settimane o placebo. Tutte le pazienti hanno assunto supplementi di calcio e vitamina D e sono state trattate per 12 mesi con un successivo follow-up di 2 anni. Dopo 12 mesi di terapia tutti i 3 i trattamenti attivi hanno prodotto significativi aumenti della BMD femorale e lombare. L'entità della risposta densitometrica è risultata essere dose dipendente a livello del femore ma non a livello lombare. La fosfatasi alcalina ossea si è ridotta in maniera statisticamente significativa del 40 -55% nei pazienti trattati con neridronato senza una significativa relazione dose-effetto. Al contrario il calo del C-telopeptide del collagene di tipo I (risultato compreso tra il 58 ed il 79%) presentava una significativa correlazione con la dose somministrata ( $p < 0,05$ ). Alla fine dei 2 anni di follow-up senza terapia, malgrado un calo dell'1-2% registrato in ciascun gruppo di trattamento, i livelli di BMD sono risultati comunque significativamente superiori rispetto al baseline sia a livello femorale che lombare. I marker di turnover osseo dopo la sospensione del trattamento sono andati incontro ad un progressivo aumento e alla fine del secondo anno di follow-up hanno raggiunto valori significativamente superiori a quelli registrati prima di avviare la terapia. In conclusione i risultati di questo studio dimostrano che il neridronato potrebbe essere utile in quei pazienti che non tollerano la terapia orale con bisfosfonati e che non desiderano o non possono sottoporsi a trattamenti infusionali.

## EFFECTS OF LONG-ACTING SOMATOSTATIN ANALOGS ON VITAMIN D STATUS IN PATIENTS WITH ACROMEGALY

Gherardo Mazziotti<sup>a,b</sup>, Antonio Bianchi<sup>c</sup>, Vincenzo Cimino<sup>c</sup>, Stefania Bonadonna<sup>a</sup>, Teresa Porcellì<sup>c</sup>, Laura De Marinis<sup>c</sup>, Andrea Giustina<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Medical and Surgical Sciences, Section of Endocrinology, Hospital of Montichiari, University of Brescia, Brescia (Italy)

<sup>b</sup> Division of Internal Medicine, "Carlo Poma" Hospital, Mantova (Italy)

<sup>c</sup> Department of Endocrinology, Catholic University of Rome, Rome (Italy)

Acromegaly is a rare disease characterized by a growth hormone (GH) hypersecretion which is sustained, in the most cases, by a GH-secreting pituitary adenoma. Long-acting somatostatin analogs (SSA) the most widespread drugs for treatment of acromegaly leading to biochemical control in 50-75% of patients with beneficial effects on chronic complications of the disease. Indeed, there is evidence that SSA may have beneficial effects on bone turnover and osteoporotic vertebral fractures which occur with high prevalence in patients with active acromegaly. The data on vitamin D status in acromegaly are scanty and controversial. In this study we aimed at evaluating the effects of SSA on vitamin D status in acromegaly. One-hundred-forty-three patients (82 F, 61 M; mean age 49 years, range: 25-88) with acromegaly were retrospectively evaluated for serum 25OHvitamin D, calcium and parathyroid hormone (PTH) values before and after long-acting SSA treatment (mean duration of treatment 7 years, range: 1-30). Before starting SSA treatment, serum 25OH vitamin D and PTH values were  $31.3 \pm 1.6$  ng/ml and  $32 \pm 0.9$  pg/ml, respectively. Hypovitaminosis D (25OHvitamin D < 30 ng/ml) was found in 67 patients (46.8%) of whom nobody had severe hypovitaminosis D (25 OH-vitamin D < 10 ng/ml). Hypovitaminosis D was significantly correlated with the age of patients ( $\rho=0.18$ ,  $p=0.03$ ), being significantly more prevalent in elderly as compared with the adults patients (61.5% vs. 36.8%;  $p=0.02$ ). During SSA treatment, a significant decrease in serum vitamin D values was demonstrated (from  $31.3 \pm 1.6$  ng/ml to  $13.7 \pm 0.7$  ng/ml;  $P<0.001$ ), with a significant increase in serum PTH values (from  $32 \pm 0.9$  pg/ml to  $50.1 \pm 1.7$  pg/ml;  $P=0.001$ ). One-hundred-twenty-three patients (86%) showed hypovitaminosis D ( $p<0.001$  vs. pre-terapia), which was severe (25OH-vitamin D values < 10 ng/ml) in 61 patients. No significant difference in hypovitaminosis D rate was demonstrated between patients with active disease (24 cases) and those with controlled disease by SSA (119 cases) (87.4% vs. 79.2%;  $p=0.5$ ). Moreover, the occurrence of new cases of hypovitaminosis D did not significantly correlate with the age and sex of the patients and with the duration of the treatment. In conclusion, these findings suggest that SSA may cause hypovitaminosis D in patients with acromegaly, regardless of the biochemical control of disease and the duration of the treatment. Future studies will demonstrate the mechanisms of this undesired effects and will clarify the impact on osteoporosis caused by GH-excess.

## EFFETTI DEGLI ANALOGHI DELLA SOMATOSTATINA SULLO STATO VITAMINICO D NEI PAZIENTI CON ACROMEGALIA

Gherardo Mazziotti<sup>a,b</sup>, Antonio Bianchi<sup>c</sup>, Vincenzo Cimino<sup>c</sup>, Stefania Bonadonna<sup>a</sup>, Teresa Porcellì<sup>c</sup>, Laura De Marinis<sup>c</sup>, Andrea Giustina<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Servizio di Endocrinologia, Ospedale di Montichiari, Università di Brescia

<sup>b</sup> Divisione di Medicina Interna, Ospedale "Carlo Poma" Mantova

<sup>c</sup> Dipartimento di Endocrinologia, Università Cattolica del S. Cuore di Roma

L'acromegalia è una malattia causata da un eccesso di ormone della crescita (GH) sostenuto nella maggior parte dei casi da un adenoma ipofisario GH secernente. Gli analoghi della somatostatina (SSA) a lento rilascio, rappresentano i farmaci di prima scelta per il trattamento dell'acromegalia, portando ad un controllo dell'ipersecrezione ormonale nel 50-70% dei pazienti con effetti benefici sulle complicanze croniche della malattia. In particolare, vi sono dati che suggeriscono come gli SSA possano avere effetti benefici sull'osso con normalizzazione del turnover osseo e riduzione del rischio di fratture. I dati sullo stato vitaminico D nei pazienti acromegalici prima e dopo trattamento sono scarsi e piuttosto controversi. Nel presente studio abbiamo valutato retrospettivamente lo stato vitaminico D in una larga popolazione di pazienti acromegalici prima e dopo trattamento con analoghi della SSA. Sono stati studiati 143 pazienti acromegalici (82 donne e 61 maschi; età media 49 anni, range: 25-88) trattati con SSA per una durata media di 7 anni (range: 1-30 anni). Prima dell'inizio della terapia i livelli medi di 25OH-vitamina D e paratormone sierici (PTH) erano rispettivamente  $31.3 \pm 1.6$  ng/ml and  $32 \pm 0.9$  pg/ml. Un'ipovitaminosi D (25OHvitamina D < 30 ng/ml) era presente in 67 pazienti (46.8%) ed in nessun caso i livelli di 25 OH-vitamina D erano < 10 ng/ml (ipovitaminosi D severa). L'ipovitaminosi D pre-terapia era significativamente correlata all'età dei pazienti ( $\rho=0.18$ ,  $p=0.03$ ), in quanto risultava essere significativamente più frequente nei soggetti anziani (> 65 anni) rispetto ai restanti soggetti (61.5% vs. 36.8%;  $p=0.02$ ). Dopo trattamento con SSA, i livelli di 25OHvitamina D si riducevano significativamente (da  $31.3 \pm 1.6$  ng/ml a  $13.7 \pm 0.7$  ng/ml;  $P<0.001$ ) e quelli di PTH aumentavano significativamente (da  $32 \pm 0.9$  pg/ml a  $50.1 \pm 1.7$  pg/ml;  $P=0.001$ ). 123 pazienti (86%) presentavano una ipovitaminosi D ( $p<0.001$  vs. pre-terapia), con valori di 25OHvitamina D < 10 ng/ml in 61 pazienti. La percentuale di ipovitaminosi D non era significativamente differente nei pazienti con acromegalia controllata (119 casi) rispetto a quelli con malattia attiva (24 casi) (87.4% vs. 79.2%;  $p=0.5$ ). Inoltre la comparsa di nuovi casi di ipovitaminosi D non era correlata con l'età dei pazienti, la durata della terapia ed il sesso dei pazienti. In conclusione questo studio suggerisce che gli SSA possono causare ipovitaminosi D in pazienti con acromegalia, indipendentemente dal controllo biochimico della malattia e dalla durata della terapia. Futuri studi consentiranno di chiarire i meccanismi alla base di tale effetto indesiderato e l'impatto dell'ipovitaminosi D non corretta sulla malattia osteoporotica dei pazienti acromegalici.

## PREVALENCE OF FRACTURES IN OSTEOPOROTIC AND OSTEOPENIC ITALIAN WOMEN: BASELINE RESULTS FROM THE PROTEO-1 STUDY

Antonio Del Puente<sup>a</sup>, Silvano Adami<sup>b</sup>, Gerolamo Bianchi<sup>c</sup>, Luigi Di Matteo<sup>d</sup>, Giancarlo Isaia<sup>e</sup>, Salvatore Minisola<sup>f</sup>, on behalf of the PROTEO-1 Study Group

<sup>a</sup> Rheumatology University "Federico II" of Naples, Naples (Italy)

<sup>b</sup> Hospital of Valeggio, Verona (Italy)

<sup>c</sup> Hospital "La Colletta", Genoa (Italy)

<sup>d</sup> U.O.C. of Rheumatology ASL, Pescara (Italy)

<sup>e</sup> Hospital "San Giovanni Battista", Le Molinette, Turin (Italy)

<sup>f</sup> Policlinico Umberto I, Rome (Italy)

**Background.** Osteoporosis is a major public health issue. Recently there have been remarkable advances in knowledge on osteoporosis epidemiology, pathophysiology and management; moreover further progress are made constantly. In Italy there are few data on post menopausal osteoporotic and osteopenic population, especially concerning osteoporosis diagnostic and therapeutic approach. **Objectives.** To (i) assess the prevalence of patients without femoral and/or vertebral fractures (based on clinical/radiological evidence) in a post-menopausal osteoporotic and osteopenic population; and (ii) describe the pattern of main risk factors for fracture in the sub-sample of women without femoral/vertebral fractures at baseline. **Methods.** PROTEO-1 is a multicenter longitudinal observational study. Inclusion criteria: post menopausal female patients aged 50-85 years, with DEXA: BMD T-score spine  $<-2$  and femoral neck/total  $<-2$ ; US: heel-bone stiffness T-score  $<-2$ , phalanx AD-SoS T-score  $<-3$ . Exclusion criteria: secondary osteoporosis (iatrogenic osteoporosis included) and participation in any clinical trial. **Results.** 4198 post menopausal female patients meeting the inclusion-exclusion criteria were consecutively enrolled in 72 Italian Centres for Osteoporosis. The fractured patients (1408) were older than the non fractured ones (mean $\pm$ SD age are respectively: 69.49 $\pm$ 7.98 and 65.04 $\pm$ 8.16 years;  $p<0.001$ ). 93% of fractured patients received full reimbursement for osteoporosis treatment according to Italian Regulations (Nota 79). The prevalence of women without femoral and/or vertebral fractures was 66%; 64% of them reported pain symptoms. The mean BMI of non fractured patients was 25.08 $\pm$ 3.84. Non-fractured population showed the following risk pattern: 24% were current or past smokers, 61% did not do physical activity, 21% had family history of frailty fractures, 22% had low visual acuity, 14% were under benzodiazepines. 78% of patients without femoral and/or vertebral fractures had  $\geq 2$  risk factors for fracture. The first-level exams were done in  $<50\%$  of cases. Only 20% of non fractured patients received full reimbursement for osteoporosis treatment. **Conclusion.** PROTEO-1 is the first Italian large survey about current clinical practice for prevention, diagnosis and treatment of primary osteoporosis in post menopausal women. Preliminary results are a starting point for a reflection on the risk profile and the features of the non fractured population.

## PREVALENZA DI FRATTURE IN DONNE ITALIANE OSTEOPOROTICHE ED OSTEOPENICHE: RISULTATI AL BASALE DELLO STUDIO PROTEO-1

Antonio Del Puente<sup>a</sup>, Silvano Adami<sup>b</sup>, Gerolamo Bianchi<sup>c</sup>, Luigi Di Matteo<sup>d</sup>, Giancarlo Isaia<sup>e</sup>, Salvatore Minisola<sup>f</sup>, a nome del Gruppo di Studio PROTEO-1

<sup>a</sup> Reumatologia, Università degli Studi Federico II, Napoli

<sup>b</sup> Ospedale di Valeggio, Verona

<sup>c</sup> Ospedale "La Colletta", Genova

<sup>d</sup> U.O.C. di Reumatologia, ASL, Pescara

<sup>e</sup> Azienda Ospedaliera San Giovanni Battista, Le Molinette, Torino

<sup>f</sup> Policlinico Umberto I, Roma

**Introduzione.** L'osteoporosi è un serio problema di salute pubblica. Le conoscenze su epidemiologia, fisiopatologia e trattamento dell'osteoporosi si sono recentemente ampliate e ulteriori progressi si stanno rapidamente compiendo. C'è carenza di dati sulla caratterizzazione delle donne in post-menopausa osteopeniche od osteoporotiche in Italia e sui percorsi di diagnosi e prevenzione primaria. **Obiettivi.** Valutare la (i) prevalenza di donne senza fratture femorali e/o vertebrali (con evidenze cliniche/radiologiche) in una popolazione di donne in post-menopausa osteopeniche od osteoporotiche; (ii) distribuzione dei principali fattori di rischio nel sottocampione di donne non fratturate alla visita basale. **Metodi.** PROTEO-1 è uno studio osservazionale di coorte longitudinale multicentrico. I criteri di inclusione sono genere femminile, post-menopausa, età tra 50 e 85 anni con i seguenti valori densitometrici: DEXA: BMD T-score colonna  $<-2$  e femore neck o total  $<-2$ ; Ultrasuoni: calcagno stiffness T-score  $<-2$ , falange AD-SoS T-score  $<-3$ . Criteri di esclusione sono: osteoporosi secondarie comprese quelle iatrogene e partecipazione a sperimentazione clinica. **Risultati.** Sono state consecutivamente arruolate in 72 centri per l'Osteoporosi Italiani 4198 donne in post-menopausa rispondenti ai criteri di inclusione-esclusione. 1408 sono le donne con fratture femorali e/o vertebrali, le quali in media hanno età maggiore di quelle non fratturate (età media $\pm$ SD è 69.49 $\pm$ 7.98 anni per le fratturate e 65.04 $\pm$ 8.16 anni per le non fratturate;  $p<0.001$ ) e nel 93% dei casi sono in Nota 79. La prevalenza di donne senza fratture femorali e/o vertebrali è risultata pari al 66%, di cui il 64% con significativa sintomatologia dolorosa. La loro BMI media è 25.08 $\pm$ 3.84. Tali pazienti presentano il seguente profilo di rischio: il 24% sono fumatrici o ex-fumatrici, il 61% non svolge attività fisica, il 21% ha storia familiare di fratture da fragilità, il 22% presenta scarsa acuità visiva, il 14% assume benzodiazepine. Il 78% delle pazienti senza fratture cliniche al basale presenta 2 o più fattori di rischio di frattura. Gli esami di I livello (VES, emocromo, ecc.) sono effettuati in  $<50\%$  dei casi. Solo il 20% ha accesso alla Nota 79. **Conclusioni.** PROTEO-1 è la prima indagine Italiana condotta su un ampio campione di soggetti sulla pratica clinica corrente per la prevenzione, diagnosi e trattamento dell'osteoporosi primaria in donne in post-menopausa. I risultati preliminari offrono spunti di riflessione sulle caratteristiche della popolazione dello studio e sul suo profilo di rischio.

## **IN PERIODONTAL DISEASE TRAIL-MEDIATED OSTEOBLAST APOPTOSIS CONTRIBUTE TO ALVEOLAR BONE LOSS**

**Giorgio Mori, Giacomina Brunetti, Silvia Colucci, Angela Oranger, Francesca Sardone, Paolo Pignataro, Claudio Mori, Maria Grano**

*Department of Biomedical Sciences, University of Foggia, Foggia (Italy)*

Alveolar bone loss, that characterizes periodontal disease (Pd), is due to an increased osteoclast resorption and a decreased osteoblast (OB) bone formation. In the present study we hypothesized that activity and survival of OBs, locally present in alveolar bone of Pd patients, are altered. Thus, we studied OBs obtained from alveolar bone fragments of Pd patients, and we compared the results with ones coming from healthy donors. We demonstrated that OBs from Pd patients weakly express OB phenotype respect to the control cells. In particular, the alkaline phosphatase activity and the collagen type I production, as well as the formation of mineralized nodules, typical markers of differentiated OBs, were significantly lower in Pd patients. Subsequently we found that OBs obtained from alveolar bone of periodontitis patients (Pp) undergo apoptosis in the presence of TRAIL. Thus we studied the intracellular apoptotic pathway induced by TRAIL, TRAIL death (DR4, DR5) and decoy (DcR1, DcR2) receptors expression in OBs from Pp, and we measured the concentration of the molecule in the sera of Pp. We demonstrated that, in OBs from Pp, following TRAIL stimulation, DNA fragmentation and activation of caspase-8 and 3 occurred in a shorter time; moreover a higher amount of both caspases was activated respect to control OBs. Moreover, we demonstrated the down-regulation of DcR2 in OBs from Pp and finally we detected higher TRAIL levels in the serum of the patients.

In conclusion our data suggest that OBs from Pp weakly express their phenotype and are more sensitive to TRAIL-induced apoptosis respect to the controls. This could be due to the down-regulation of DcR2 driving to an imbalanced ratio between death and decoy receptors. Our findings highlight a role of TRAIL in the pathogenesis of Pd.

## **IN CORSO DI PARODONTOPATIA L' APOPTOSI DEGLI OSTEOBLASTI MEDIATA DA TRAIL CONTRIBUISCE ALLA PERDITA DI OSSO ALVEOLARE**

**Giorgio Mori, Giacomina Brunetti, Silvia Colucci, Angela Oranger, Francesca Sardone, Paolo Pignataro, Claudio Mori, Maria Grano**

*Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Foggia*

La perdita di tessuto osseo alveolare che caratterizza la malattia parodontale (Mp) è dovuta ad un aumento del riassorbimento da parte degli osteoclasti e ad una diminuzione di osteodeposizione da parte degli osteoblasti (OB). In questo studio abbiamo ipotizzato che nei pazienti affetti da Mp siano modificate sia l'attività che la sopravvivenza degli OB localizzati a livello dell'osso alveolare. Per questo abbiamo studiato gli OB ottenuti da frammenti di osso alveolare di soggetti affetti da Mp e abbiamo confrontato i risultati con quelli ottenuti da donatori sani. Abbiamo dimostrato che gli OB ottenuti da pazienti affetti da Mp esprimevano un fenotipo osteoblastico più debole rispetto alle cellule di controllo, in particolare l'attività della fosfatasi alcalina, la produzione di collagene I e la formazione di noduli di matrice mineralizzata, marker tipici degli OB differenziati, erano significativamente più bassi negli OB dei pazienti affetti da Mp. Abbiamo successivamente scoperto che gli OB ottenuti dall'osso alveolare di pazienti parodontopatici (Pp) andavano incontro ad apoptosi in presenza di TRAIL. Per questo motivo abbiamo studiato la cascata del segnale intracellulare indotto da TRAIL, l'espressione da parte degli OB ottenuti da Pp dei recettori di morte (DR4, DR5) e decoy (DcR1, DcR2) per TRAIL, e abbiamo misurato la concentrazione della molecola nei sieri dei Pp. Abbiamo dimostrato che negli OB ottenuti da Pp, dopo la stimolazione con TRAIL, la frammentazione del DNA e l'attivazione delle caspasi-3 e 8 avveniva in tempi più rapidi; inoltre rispetto agli OB di controllo veniva anche attivata una maggiore quantità di entrambe le caspasi. È stato anche dimostrato che DcR2 era inibito negli OB ottenuti da Pp e che nei sieri prelevati dai Pp i livelli di TRAIL erano più alti che nei controlli.

In conclusione i nostri dati suggeriscono che gli OB ottenuti da Pp esprimono più debolmente il loro fenotipo e sono più sensibili all'effetto apoptotico di TRAIL rispetto a quelli ottenuti dai controlli. Ciò potrebbe essere dovuto all'alterazione del rapporto tra i recettori di morte e i recettori decoy determinato dall'inibizione di DcR2. I risultati ottenuti evidenziano un ruolo di TRAIL nella patogenesi delle parodontopatie.

## **BISPHOSPHONATE-ASSOCIATED OSTEONECROSIS OF THE JAW IN ONCOLOGY AND OSTEOPOROSIS PATIENTS. FREQUENCIES FROM THE WESTERN SICILY- PROMaB (Azienda Universitaria Policlinico) e ARNAS (Azienda Civico) PALERMO**

**Giuseppina Campisi<sup>a</sup>, Luigi Solazzo<sup>b</sup>, Anna Musciotto<sup>a</sup>, Ilenia Pepe<sup>c</sup>, Giovam Battista Rini<sup>c</sup>, Matteo D'Angelo<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Department of Stomatological Sciences, University of Palermo, Palermo (Italy)

<sup>b</sup> Maxillo-Facial Surgery Unit, Civico Hospital, Palermo (Italy)

<sup>c</sup> Department of Clinical Medicine and Emergent Pathologies, University of Palermo, Palermo (Italy)

Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw (BRONJ) represents one of the most important emerging complications of bisphosphonates (BP) treatment, mainly by i.v. regimen (e.g. pamidronate or zoledronate), at long or medium term, for malignancy-associated hypercalcemia and prevention of bone fractures in patients with metastatic bone disease (breast or prostate cancer) or multiple myeloma. Recently, literature has also focused on the onset, although lower, also in patients taking oral BF, for the therapy of osteoporosis and skeletal diseases other than cancer. Hence, it has been arisen in the scientific and medical communities the need to create and disseminate information, know-how and protocols among the several specialists (e.g. rheumatologists, geriatrics, orthopaedic specialists, dentists, oncologist, haematologist), involved in BRONJ. In this direction, it has been recently built-up, at the Faculty of Medicine – Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico (AOUP) “P. Giaccone” – University of Palermo, a task-force named PROMaB (Prevention and Research on ONJ by BF) by a multidisciplinary team which from 2006 carries out activities of I and II prevention of BRONJ as well as its treatment. To date, PROMaB collects 36 cases of BRONJ (23 F; 14 M) of which 11 (30%) in therapy with BP for osteoporosis. To this datum it is to be added that from A.R.N.A.S. Ospedali Civico e Benfratelli – “G. Di Cristina e M. Ascoli” – Palermo up to reach the prevalence in the Western Sicily of 73 cases of BRONJ (52 F; 21 M) of which 19 (26%) in therapy with BP for osteoporosis. It seems that both ONJ related to BP *per os* and IV BP have generally anamnesis positive for tooth extraction during BF treatment and an osteomyelitic process at the beginning of the osteo-necrotic event; hence, early diagnosis and adequate management are basically warranted. Finally, especially in presence of an uncertain oral and dental care a thorough dental and oral examination should be considered before the start of both oral and intravenous BP therapy, suggesting that prevention is currently the most reliable tool to reduce the risk of BRONJ.

## **OSTEONECROSI DEI MASCELLARI DA BISFOSFONATI IN PAZIENTI ONCOLOGICI ED OSTEOPOROTICI. DATI DI FREQUENZA DALLA SICILIA OCCIDENTALE- PROMaB (Azienda Universitaria Policlinico) E ARNAS (Azienda Civico) PALERMO**

**Giuseppina Campisi<sup>a</sup>, Luigi Solazzo<sup>b</sup>, Anna Musciotto<sup>a</sup>, Ilenia Pepe<sup>c</sup>, Giovam Battista Rini<sup>c</sup>, Matteo D'Angelo<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Dipartimento di Scienze Stomatologiche, Università degli Studi di Palermo

<sup>b</sup> UO Chirurgia Maxillo-Facciale, Azienda Ospedaliera Civico, Palermo

<sup>c</sup> Dipartimento di Medicina Clinica e Patologie Emergenti, Università degli Studi di Palermo

L'osteonecrosi dei mascellari (ONJ) rappresenta una emergente complicanza, a medio-lungo termine, descritta originariamente in pazienti con ipercalcemia maligna, metastasi ossee (da carcinoma mammario o prostatico) o mieloma multiplo trattati con bisfosfonati (BF) per via parenterale (e.g. pamidronato o zoledronato). Di recente, la letteratura ha attenzionato e riportato la rara evenienza di ONJ anche in pazienti in trattamento con BF orali per la cura e/o prevenzione dell'osteoporosi e di disordini ossei non tumorali. La comunità scientifica e medica ha pertanto avvertito la necessità di creare e divulgare informazione, competenze e protocolli operativi tra i parecchi specialisti (e.g. reumatologi, geriatri, ortopedici, odontoiatri, oncologi, ematologi) coinvolti nella gestione dei pazienti con ONJ da BF. In quest'ottica, è stata costituita con sede presso la Facoltà di Medicina e Chirurgia - Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico (AOUP) “P. Giaccone” – Università di Palermo, una task force - gruppo PROMaB - (Prevenzione e Ricerca sull'Osteonecrosi dei Mascellari da BF) da un team multidisciplinare che dal 2006 svolge attività di prevenzione primaria e secondaria delle ONJ da BF, oltre ad occuparsi dei relativi trattamenti della patologia.

Ad oggi, PROMaB conta 36 casi di ONJ (23 F; 14 M) di cui 11 (30%) in terapia con BF per la cura dell'osteoporosi. A tale misura campionaria si aggiungono per il bacino di utenza della Sicilia occidentale i casi di ONJ da BF riferiti alla UO Chirurgia Maxillo-Facciale-Az. Osped. Civico per un totale di 73 casi di ONJ da BF (52 F; 21 M) di cui 19 (26%) in terapia con BF per la cura dell'osteoporosi. A tutt'oggi si considera che ONJ da BF *per os* e da BF per via parenterale riportano una comune anamnesi positiva per estrazioni dentarie in corso di terapia con BF e un processo osteomielitico prodromico di ONJ, in entrambi intercettazione precoce e terapia adeguata sono oltremodo raccomandabili. Soprattutto nei casi di incerta qualità e costanza di “oral and dental care” uno scrupoloso esame clinico odontostomatologico dovrebbe sempre essere considerato prima di iniziare la terapia con BF orali o sistemici per ridurre efficacemente il rischio di ONJ da BF.

## EFFECTS OF INTERMEDIATE DOSES OF GLUCOCORTICOIDS ON BONE TURNOVER AND CIRCULATING DKK-1, MIF, SOLUBLE RANKL AND OPG IN PATIENTS WITH INTERSTITIAL LUNG DISEASE. A THREE-MONTH LONGITUDINAL STUDY

Enrico Palmas<sup>a</sup>, Andrea Dovio<sup>a</sup>, Laura Saba<sup>a</sup>, Gilberto Calzolari<sup>a</sup>, Lorena Mercante<sup>b</sup>, Carlo Albera<sup>b</sup>, Alberto Angeli<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Internal Medicine I and <sup>b</sup> Clinic of Respiratory Diseases, Department of Clinical and Biological Sciences, University of Turin, Turin (Italy)

**Background.** Interstitial lung diseases (ILDs) are currently treated with glucocorticoids (GCs), which inhibit bone formation and increase resorption, leading to osteoporosis. Dynamics of changes of bone turnover and mechanisms of increased resorption have not been explored in patients with ILDs receiving GCs at intermediate, rapidly tapered-down doses.

**Methods.** Serum bone turnover markers, soluble RANKL (sRANKL), osteoprotegerin (OPG), Dickkopf-1 (Dkk-1) and macrophage migration inhibitory factor (MIF) were measured longitudinally throughout 3 months of GC therapy (initial dose: prednisone 25-50 mg/die) in 12 patients with ILDs.

**Results.** GCs caused a rapid decrease of osteocalcin ( $P < 0.001$  by multiple measures ANOVA), persistent up to week 4, with a subsequent progressive raise until week 12; levels comparable to baseline, however, were not attained. The levels of C-telopeptide of type I collagen (CTX) raised rapidly ( $P = 0.03$ ) and remained elevated throughout the study. No significant effect was noticed on serum calcium and phosphorus. Serum OPG showed an early and persistent decrease ( $P < 0.01$ ) while sRANKL did not significantly change; however, sRANKL/OPG ratio progressively increased ( $P = 0.02$ ). No significant effect was noticed on serum MIF and Dkk-1.

**Conclusions.** A regimen of intermediate doses of GCs with rapid tapering down is able to alter in a few days the balance between bone resorption and formation. Our data lend support to the preventive use of antiresorptive drugs in patients starting such regimens. Less availability of OPG in the bone microenvironment deserves attention among mechanisms accounting for early increased bone resorption.

## STUDIO LONGITUDINALE DEGLI EFFETTI DI DOSI INTERMEDIE DI GLUCOCORTICOIDI SUL TURNOVER OSSEO E SUI LIVELLI CIRCOLANTI DI DKK-1, MIF, RANKL SOLUBILE E OSTEOPROTEGERINA IN PAZIENTI CON INTERSTIZIOPATIA POLMONARE

Enrico Palmas<sup>a</sup>, Andrea Dovio<sup>a</sup>, Laura Saba<sup>a</sup>, Gilberto Calzolari<sup>a</sup>, Lorena Mercante<sup>b</sup>, Carlo Albera<sup>b</sup>, Alberto Angeli<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Medicina Interna I e <sup>b</sup> Clinica della Malattie dell'Apparato Respiratorio, Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche, Università degli Studi di Torino

**Premessa.** Le interstiziopatie polmonari sono trattate con glicocorticoidi (GC), che inibiscono la neoformazione ossea ed incrementano il riassorbimento, favorendo l'insorgenza di osteoporosi. Non sono stati approfonditi l'andamento delle variazioni del turnover osseo ed i meccanismi dell'aumentato riassorbimento nei pazienti con interstiziopatie polmonari trattati con dosi intermedie di GC.

**Metodi.** In 12 pazienti con interstiziopatia polmonare sono stati dosati longitudinalmente durante 3 mesi di terapia con GC (dose iniziale: 25-50 mg di prednisone/die) i marcatori sierici di turnover osseo osteocalcina e CTX, RANKL solubile (sRANKL), osteoprotegerina (OPG), Dickkopf-1 (Dkk-1) e il fattore inibitore della migrazione dei macrofagi (MIF).

**Risultati.** I GC hanno indotto una rapida riduzione dei livelli di osteocalcina ( $P < 0.001$  all'ANOVA per misure ripetute), mantenutasi fino alla 4<sup>a</sup> settimana, con un successivo progressivo incremento fino alla 12<sup>a</sup> settimana, che tuttavia non ha raggiunto livelli paragonabili a quelli basali. I livelli di CTX hanno mostrato un rapido incremento ( $P = 0.03$ ), persistente per tutta la durata dello studio. Non abbiamo osservato significative variazioni di calcemia e fosforemia. L'OPG sierica ha mostrato una precoce e persistente diminuzione ( $P < 0.01$ ), mentre i valori di sRANKL non hanno subito cambiamenti significativi; il rapporto sRANKL/OPG è cresciuto progressivamente ( $P = 0.02$ ). Non abbiamo osservato significative variazioni dei livelli sierici di MIF e Dkk-1.

**Conclusioni.** Un trattamento con GC a dosi intermedie, ridotte in modo rapido, è in grado di modificare, in pochi giorni, il rapporto tra riassorbimento e neoformazione ossea. I nostri dati supportano l'utilizzo preventivo di farmaci antirassorbitivi nei pazienti che inizino questi trattamenti. Tra i meccanismi responsabili dell'iniziale aumento del riassorbimento, merita attenzione una possibile minore disponibilità di OPG nel microambiente osseo.

## FALL PREVENTION AFTER HIP FRACTURE IN ELDERLY WOMEN: A QUASI-RANDOMIZED CONTROLLED STUDY

Marco Di Monaco<sup>a</sup>, Fulvia Vallero<sup>a</sup>, Elena De Toma<sup>b</sup>, Lucia De Lauso<sup>b</sup>, Rosa Tappero<sup>b</sup>, Alberto Cavanna<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Osteoporosis Research Centre; <sup>b</sup> Division of Physical Medicine and Rehabilitation, "San Camillo" Hospital of Turin (Italy)

Hip-fracture survivors are at high risk for new fractures, including a recurrent fracture of the hip at the contralateral side, because of both bone fragility and high incidence of falls. To avoid new fractures, it is mandatory to perform fall-preventive interventions, besides treating osteoporosis in this group of high-risk subjects. However, the implementation of preventive programmes after hip fracture is low, and few studies have focused on hip-fracture patients to optimize strategies targeted at fall prevention. Our aim was to assess the effectiveness of a single post-discharge home visit conducted by an occupational therapist in reducing the risk of falling after hip fracture in elderly women. Ninety-five of 119 women aged 60 years or older, living in the community, who sustained a fall-related hip fracture, were included in this quasi-randomized controlled trial. The women were recruited for the study during acute in-patient rehabilitation, and were allocated to intervention or control groups alternately. All the women underwent an interdisciplinary programme targeted at fall prevention during in-patient rehabilitation, as a part of the usual rehabilitation protocol and were treated with a daily oral supplementation of vitamin D (880 UI) plus calcium (1 g) together with a medication for secondary prevention of fragility fractures. Additionally, the 45 women in the intervention group received a single home visit by an occupational therapist at a median of 20 days (interquartile range 11; range 6 to 44 days) after discharge from our rehabilitation hospital. The occupational therapist assessed environmental hazards, behaviors in activities of daily living, and use of assistive devices and suggested targeted modifications to prevent falls. The home visit took a mean duration of 60 minutes (range 45 to 70 minutes). Falls were recorded at a six-month follow-up. Thirteen of the 50 women in the control group sustained 20 falls during 9231 days whereas six of the 45 women in the intervention group sustained nine falls during 8970 days. After adjustment for observation periods, ability to function in basic activities of daily living assessed before the beginning of the observation period by using the Barthel index score, and body height, we found a significantly lower proportion of fallers in the intervention group: the odds ratio was 0.275 (95% CI 0.081 to 0.937,  $p=0.039$ ). We conclude that a single home visit by an occupational therapist after discharge from a rehabilitation hospital significantly reduced the risk of falling in a sample of elderly women following an original hip fracture.

## PREVENZIONE DELLE CADUTE DOPO UNA FRATTURA DI FEMORE IN DONNE ANZIANE: UNO STUDIO QUASI-RANDOMIZZATO E CONTROLLATO

Marco Di Monaco<sup>a</sup>, Fulvia Vallero<sup>a</sup>, Elena De Toma<sup>b</sup>, Lucia De Lauso<sup>b</sup>, Rosa Tappero<sup>b</sup>, Alberto Cavanna<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Centro di Ricerca sull'Osteoporosi; <sup>b</sup> Divisione di Medicina Fisica e Riabilitazione, Presidio Sanitario "San Camillo", Torino

I soggetti che sopravvivono dopo una frattura di femore sono ad alto rischio di subire nuove fratture, inclusa una seconda frattura femorale, data la concomitanza di fragilità ossea ed elevata incidenza di cadute. Per ridurre il numero di nuove fratture in questo gruppo di persone ad alto rischio è dunque razionale mettere in atto interventi di prevenzione delle cadute, oltre a trattare l'osteoporosi. Tuttavia, l'attuazione di programmi preventivi dopo la frattura di femore è scarsa, e pochi studi hanno valutato l'efficacia di strategie d'intervento volte specificamente alla prevenzione delle cadute dopo frattura femorale. Il nostro scopo era quello di valutare l'efficacia nella riduzione del rischio di caduta di una singola visita domiciliare di un terapeuta occupazionale, effettuata dopo la dimissione ospedaliera a seguito della prima frattura di femore in donne anziane. Abbiamo incluso nel nostro studio quasi-randomizzato e controllato 95 donne (da un campione iniziale di 119), di età maggiore o uguale a 60 anni, che vivevano in casa (non in istituto) e che avevano subito una frattura di femore in corso di un episodio di caduta. Le donne sono state arruolate durante il ricovero nel nostro reparto di riabilitazione intensiva di post-acuzie e sono state assegnate con criterio casuale di semplice alternanza al gruppo di intervento o a quello di controllo. Tutte le donne hanno fruito di un intervento interdisciplinare per la prevenzione delle cadute durante il ricovero, come componente dell'usuale protocollo riabilitativo, e sono state trattate con supplementazione quotidiana di vitamina D (880 UI) e calcio (1 g), oltre a ricevere un farmaco per la prevenzione secondaria delle fratture. In aggiunta a questo trattamento standard, le 45 donne del gruppo di intervento hanno ricevuto una visita domiciliare da parte di un terapeuta occupazionale ad una mediana di 20 giorni (range interquartile 11; range da 6 a 44 giorni) dopo la dimissione dall'ospedale. Nel corso della visita domiciliare il terapeuta occupazionale ha valutato i rischi ambientali, i comportamenti nelle attività di base di vita quotidiana e l'uso di ausili, suggerendo modificazioni mirate per la prevenzione delle cadute. La durata media della visita domiciliare è stata di 60 minuti (range da 45 a 70 minuti). Tra le 50 donne del gruppo di controllo, 13 hanno subito un totale di 20 cadute in un periodo complessivo di osservazione di 9231 giorni, mentre sei delle 45 donne del gruppo di intervento hanno subito nove cadute in 8970 giorni. Dopo correzione per il periodo di osservazione, l'autonomia nelle attività di base di vita quotidiana valutata mediante indice di Barthel all'inizio del periodo di osservazione, e la statura corporea la proporzione di donne che subiva almeno una caduta era significativamente più bassa nel gruppo di intervento: l'odds ratio era pari a 0.275 (95% IC 0.081-0.937,  $p=0.039$ ). Possiamo concludere che una singola visita domiciliare da parte di un terapeuta occupazionale effettuata dopo la dimissione ospedaliera ha ridotto significativamente il rischio di caduta in un campione di donne anziane con esito di recente frattura femorale.

## CIRCULATING DKK-1 LEVELS ARE REDUCED IN YOUNG SUBJECTS WITH LOW BONE MASS

Vincenzo De Paola, Luigi Gennari, Daniela Merlotti, Giuseppe Martini, Annalisa Avanzati, Beatrice Franci, Stella Campagna, Barbara Lucani, Ranuccio Nuti

Department of Internal Medicine, Endocrine-Metabolic Sciences and Biochemistry, University of Siena, Siena (Italy)

Primary osteoporosis predominantly affects postmenopausal women and elderly men. However, low bone mineral density also occurs in middle-aged men and premenopausal women. Even though the pathogenesis of low bone mass in these individuals may be heterogeneous, several results suggest that a low bone turnover with a possible osteoblast dysfunction may be responsible of these forms of osteoporosis in both sexes. DKK-1 is an inhibitor of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway, which is a critical signaling pathway for osteoblast differentiation. It has been recently shown that DKK-1 protein levels are detectable in the serum and elevation in DKK1 levels has been associated with decreased osteoblastic bone formation occurring in multiple myeloma or, *in vitro*, during glucocorticoid treatment. In order to better characterize the structural and metabolic basis of reduced bone mass in young adults, we measured circulating DKK-1 levels (DKK-1 enzyme immunoassay, Biomedica, Wien) in adult men (n=50, mean age 46.5 $\pm$ 9.6) and premenopausal women (n=23, mean age 43.4 $\pm$ 7.1) with low bone density, in subjects with senile or postmenopausal osteoporosis (n=60, mean age 65.3 $\pm$ 8.8) as well as in young (n=40, mean age 45.4 $\pm$ 8.2) and elderly (n=50, mean age 68.3 $\pm$ 10.1) controls with normal bone density. The lower limit of detection was 0.38 pmol/l. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation were 5.7% and 9.2%, respectively. All samples were run in duplicate. In controls, DKK-1 levels decreased significantly with age (r= -0.42; p < 0.05), and this decrease was higher in males than in females. Moreover, in normal subjects circulating DKK-1 were positively correlated with parathyroid hormone (r=0.39; p < 0.05) in both sexes and negatively correlated with bone alkaline phosphatase in women (r=-0.30; p < 0.05). Interestingly, an unexpected decreased concentration of DKK-1 was observed in the group of premenopausal women and young adult men with low bone density with respect to age- and sex-matched controls (17.9 $\pm$ 8.9 vs. 42.9 $\pm$ 8.1; p < 0.001), as well as to older controls (17.9 $\pm$ 8.9 vs. 35.4 $\pm$ 12.2; p < 0.001). No statistically significant differences in DKK-1 were observed between elderly osteoporotic and non osteoporotic subjects. Longitudinal analysis in 34 of the 60 subjects showed a significant 33% decrease in DKK-1 levels during bisphosphonate treatment. In conclusion adult males aged 50 yrs or less and premenopausal females with low bone mass show an unexpected decrease in circulating DKK-1 levels, likely representing a homeostatic counteracting mechanism to limit the reduction in osteoblast activity.

## RIDOTTI LIVELLI CIRCOLANTI DI DKK-1 IN SOGGETTI GIOVANI CON BASSA MASSA OSSEA

Vincenzo De Paola, Luigi Gennari, Daniela Merlotti, Giuseppe Martini, Annalisa Avanzati, Beatrice Franci, Stella Campagna, Barbara Lucani, Ranuccio Nuti

Dipartimento di Medicina Interna, Scienze Endocrino-Metaboliche e Biochimica, Università degli Studi di Siena

L'osteoporosi primitiva interessa prevalentemente le donne in postmenopausa e gli uomini anziani. Tuttavia, ridotti livelli di densità minerale ossea si registrano anche in giovani adulti e nelle donne in premenopausa. Sebbene la patogenesi della bassa massa ossea in questi soggetti possa essere eterogenea, vari studi suggeriscono che il basso turnover osseo legato ad una probabile disfunzione degli osteoblasti potrebbe essere responsabile di queste forme di osteoporosi in entrambi i sessi. Il DKK-1 è un inibitore del pathway di segnale del Wnt/ $\beta$ -catenina, che è un pathway cruciale nella differenziazione degli osteoblasti. Recentemente si è visto che i livelli proteici di DKK-1 sono misurabili a livello sierico e il loro aumento è stato associato ad un decremento della neoformazione mediata dagli osteoblasti nel mieloma multiplo o, *in vitro*, durante il trattamento con glucocorticoidi. Per meglio determinare la fisiopatologia della ridotta massa ossea nei giovani adulti, abbiamo misurato i livelli circolanti di DKK-1 (DKK-1 enzyme immunoassay, Biomedica, Wien) negli uomini (n=50, età media 46.5 $\pm$ 9.6) e nelle donne in premenopausa (n=23, età media 43.4 $\pm$ 7.1) con bassa densità minerale ossea, in soggetti con osteoporosi senile o postmenopausale (n=60, media 65.3 $\pm$ 8.8) così come in controlli giovani (n=40, età media 45.4 $\pm$ 8.2) e controlli anziani (n=50, età media 68.3 $\pm$ 10.1) con valori normali di densità minerale ossea. Il limite più basso registrato è stato 0.38 pmol/l. I coefficienti di variazione intra ed inter-sperimentali sono stati del 5.7% e del 9.2%, rispettivamente. Tutti i campioni sono stati testati in doppio. Nei controlli, i livelli di DKK-1 decrescono significativamente con l'età (r=-0.42; p < 0.05), e questo decremento è maggiore negli uomini che nelle donne. Tuttavia, nei controlli i livelli circolanti di DKK-1 correlano positivamente con i livelli di ormone paratiroideo (r=0.39; p < 0.05) in entrambi i sessi e correlano negativamente con i livelli fosfatasi alcalina ossea nelle donne (r=-0.30; p < 0.05). È interessante notare che abbiamo registrato un inaspettato decremento dei livelli di DKK-1 nelle donne in premenopausa e nei giovani adulti con bassa massa ossea rispetto ai controlli di pari età e sesso (17.9 $\pm$ 8.9 vs. 42.9 $\pm$ 8.1; p < 0.001), così come rispetto ai controlli anziani (17.9 $\pm$ 8.9 vs. 35.4 $\pm$ 12.2; p < 0.001). Non abbiamo osservato significative differenze nei livelli di DKK-1 tra i soggetti osteoporotici anziani e quelli non osteoporotici. Le analisi longitudinali su 34 dei 60 soggetti hanno evidenziato un decremento significativo del 33% nei livelli di DKK-1 durante il trattamento con bisfosfonati. In conclusione gli uomini adulti ( $\leq$  50 anni) e le donne in premenopausa con bassa massa ossea hanno mostrato un inaspettato decremento dei livelli circolanti di DKK-1, il che evidenzia un meccanismo omeostatico che limita la riduzione nell'attività degli osteoblasti.

## MOLECULAR GENETIC ANALYSIS IN THE DIAGNOSIS OF TUMORAL CALCINOSIS

Laura Masi, Alessia Gozzini, Antonietta Amedei, Alberto Falchetti, Gemma Marcucci, Annalisa Tanini, Maria Luisa Brandi

*Metabolic Bone Diseases Unit, Department of Internal Medicine, University of Florence, Florence (Italy)*

Tumoral Calcinosis (TC) is a rare congenital disorder characterized by ectopic calcifications around large joints, hyperphosphatemia due to an increased renal tubular phosphate reabsorption, and normal or elevated calcitriol levels. TC is often diagnosed in childhood, but characteristic masses have been discovered in the infancy and in the old age, and its differential diagnosis with other syndromes characterized by extraskeletal calcifications may be difficult. The patients have usually a positive family history, manifest the disease before 20 years of age and have multiple lesions. There is no gender preference. The clinical consequences of TC are extremely invalidating for the patients. So far, the main treatments available for TC patients are limited to the surgical removal of recurrent subcutaneous calcified masses and to dietary Pi deprivation. Only recently the genetic basis of TC started to be recognized. At present, TC was characterized in 20 patients worldwide through the identification of disease causing mutations in three genes: 16 different inactivating mutations in UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 gene (*GALNT3*); 3 inactivating mutations in the fibroblast growth factor 23 gene (*FGF23*); and a homozygous missense mutation in the *KLOTHO* gene (*KL*). In our Centre on rare metabolic bone disorders we were able to collect 12 cases of TC and, at present, we have identified in the *GALNT3* gene, a previously described G to A transition (at cDNA position 1524+1 starting from the ATG) and two novel homozygous mutations, a missense mutation Arg261Gln and a transition at the conserved splice acceptor site of intron 1 (IVS1-2A>G), and in the *FGF23* gene, a novel homozygous missense mutation His41Gln in two TC unrelated subjects. Mutational analysis is important for an early recognition of the disease, for prevention of its complications and for family screening. However, several clinical cases of TC remain without a genetic characterization and the molecular mechanisms involved in the aetiology of extraskeletal calcifications in TC are still unrecognized. So, we are planning to screen our TC patients negative for *GALNT3* or *FGF23* mutation, for mutations in genes encoding for other phosphatonins, such as MEPE and sFRP4; for *FGF23* interacting proteins, such as *FGF23* receptors (FGFR-1c, 2c, 3c and 4) and the co-receptor *KLOTHO*. Moreover, we will perform functional studies of mutated genes by using cellular models, either obtained from patients or engineered by transfection methods, to understand the molecular basis of TC. These results should improve the already available data from the literature, contributing to build up a mutational analysis program for the genetic diagnosis of TC and representing the basis for future targeted therapies in TC.

## L'ANALISI GENETICA NELLA DIAGNOSI DELLA CALCINOSI TUMORALE

Laura Masi, Alessia Gozzini, Antonietta Amedei, Alberto Falchetti, Gemma Marcucci, Annalisa Tanini, Maria Luisa Brandi

*Unità di Malattie del Metabolismo Minerale e Osseo, Dipartimento di Medicina Interna, Università degli Studi di Firenze*

La Calcinosi Tumorale (TC) è una rara malattia congenita caratterizzata da calcificazioni ectopiche che si formano principalmente intorno alle grandi articolazioni, da iperfosfatemia dovuta ad un aumento del riassorbimento del fosfato a livello dei tubuli renali e da livelli di calcitriolo normali o elevati. La TC è spesso diagnosticata nell'età pediatrica, ma le sue caratteristiche masse si possono trovare nell'infanzia e nella tarda età, e la sua diagnosi differenziale con altre sindromi caratterizzate da calcificazioni extrascheletriche può essere difficile. I pazienti affetti da TC hanno solitamente una storia familiare positiva, e manifestano la patologia prima dei 20 anni e con lesioni multiple. Non c'è una predisposizione sessuale. Le conseguenze cliniche della TC sono estremamente invalidanti per i pazienti. Fino ad oggi i principali trattamenti disponibili per i pazienti affetti da TC sono limitati alla rimozione chirurgica delle masse calcificate sottocutanee e ad una dieta povera di fosfati. Solo recentemente si è cominciato a far luce sulla base genetica della TC. Ad oggi, in 20 soggetti affetti da TC è stata identificata la mutazione che causa la patologia in tre geni distinti: 16 mutazioni inattivanti nel gene N-acetil-alfa-D-galattosammina: polipeptide N-acetilgalattosamminiltrasferasi 3 (*GALNT3*); 3 mutazioni inattivanti nel gene del fattore di crescita dei fibroblasti 23 (*FGF23*); ed una mutazione inattivante nel gene *KLOTHO* (*KL*). Nel nostro Centro sulle Malattie del Metabolismo Minerale ed Osseo abbiamo raccolto 12 casi di TC e, ad oggi, abbiamo identificato, nel gene *GALNT3*, una transizione G>A precedentemente descritta alla posizione c.1524+1 (partendo dall'ATG), e due nuove mutazioni in omozigosi, una mutazione missense Arg261Gln ed una transizione a livello di un sito di splicing accettore altamente conservato, a livello dell'introne 1 (IVS1-2A>G), e, nel gene *FGF23*, una nuova mutazione in omozigosi His41Gln in due pazienti non correlati. L'analisi mutazionale è importante per un riconoscimento precoce della malattia, per la prevenzione delle sue complicazioni e per lo screening familiare. Tuttavia, diversi casi clinici di TC rimangono senza una caratterizzazione genetica ed i meccanismi molecolari coinvolti nell'eziologia delle calcificazioni extrascheletriche nella TC sono ancora sconosciute. Perciò, abbiamo previsto di proseguire lo studio sui pazienti in cui non è stata trovata alcuna mutazione di *GALNT3* e *FGF23*, eseguendo l'analisi mutazionale di geni codificanti altre fosfatoinine, come MEPE and sFRP4, o proteine che interagiscono con *FGF23*, come i recettori per *FGF23* (FGFR-1c, 2c, 3c and 4) ed il co-recettore *KLOTHO*. Inoltre stiamo allestendo lo studio funzionale dei geni mutati, utilizzando modelli cellulari ottenuti sia dai pazienti stessi sia ingegnerizzati mediante metodi di trasfezione, per capire la base molecolare della TC. Questi risultati potrebbero migliorare i dati già disponibili in letteratura, contribuendo alla costruzione di un programma di analisi mutazionale per la diagnosi genetica di TC, e costituendo la base per le future terapie "a bersaglio" nella cura della TC.

## CLINICAL AND BIOCHEMICAL PROFILE OF RECURRENT STONE FORMING PATIENTS WITH METABOLIC SYNDROME

Giorgia Zampa<sup>a</sup>, Giuseppe Mossetti<sup>a</sup>, Domenico Rendina<sup>a</sup>, Gianpaolo De Filippo<sup>b</sup>, Pasquale Strazzullo<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Clinical and Experimental Medicine, "Federico II" University Medical School, Naples (Italy)

<sup>b</sup> Pediatric Endocrinology Unit, "Gaetano Rummo" Hospital, Benevento (Italy)

Metabolic syndrome (MetS) and nephrolithiasis (NL) are common disorders presenting similar epidemiological characteristics. MetS is considered a fundamental risk factor for chronic kidney diseases, including NL. MetS constitutive elements are also considered to be risk factors for NL. Aim of this case-control study was to evaluate the clinical and biochemical profile of stone formers (SF) with MetS. We examined 526 Caucasian recurrent SF (M:F 266:260, mean age 43.2±7.6 years, BMI 27.8±3.1 kg/m<sup>2</sup>) and 214 Caucasian healthy control subjects (M:F 111:103, mean age 40.7±8.1 years, BMI 26.1±3.5 kg/m<sup>2</sup>) from Southern Italy. The MetS diagnosis was made according to the American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute criteria.

In study cohort, 184 SF (35%; M:F 81:103, mean age 50.4±6.6 years, BMI 30.4±2.7 kg/m<sup>2</sup>) fitted criteria for diagnosis of MetS. Compared to SF without MetS, SF with MetS were older and showed higher mean age of NL onset, lower family history score for NL and lower male/female ratio. Among metabolic risk factor for NL, stone forming patients with MetS had higher urinary 24h-volume as well as higher 24h-urinary excretion of calcium, sodium, oxalate and urate. A model of logistic regression analysis indicates that age and 24h-urinary sodium excretion were independent risk factors for NL occurrence in stone forming patients with MetS.

The study results indicate that 24h-urinary excretion of sodium is the principal metabolic risk factor for NL in stone forming patients with MetS. This setting is also characterised by a lower family history score for NL and by higher mean age of NL onset.

## PROFILO CLINICO E BIOCHIMICO DEI PAZIENTI CON NEFROLITIASI RECIDIVANTE E SINDROME METABOLICA

Giorgia Zampa<sup>a</sup>, Giuseppe Mossetti<sup>a</sup>, Domenico Rendina<sup>a</sup>, Gianpaolo De Filippo<sup>b</sup>, Pasquale Strazzullo<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Napoli "Federico II"

<sup>b</sup> Unità Operativa Semplice di Endocrinologia Pediatrica, Azienda Ospedaliera di Rilievo Nazionale "Gaetano Rummo", Benevento

La sindrome metabolica (MetS) e la nefrolitiasi (NL) sono patologie molto frequenti con caratteristiche epidemiologiche simili. La MetS è considerata un fattore di rischio per lo sviluppo di malattie croniche renali, inclusa la nefrolitiasi, e le sue principali componenti (obesità, ipertensione e disordini del metabolismo dei carboidrati) sono considerate fattori di rischio metabolici per la NL. L'obiettivo di questo studio caso-controllo è quello di valutare le caratteristiche cliniche e biochimiche dei pazienti calcolotici con MetS. Lo studio è stato condotto su 526 soggetti affetti da calcolosi renale ricorrente (M:F 266:260, età media 43.2±7.6 anni, BMI 27.8±3.1 kg/m<sup>2</sup>) e 214 controlli sani (M:F 111:103, età media 40.7±8.1 years, BMI 26.1±3.5 kg/m<sup>2</sup>), tutti caucasici e provenienti dal sud Italia. La diagnosi di sindrome metabolica è stata formulata in accordo ai criteri della American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute.

Nella popolazione studiata abbiamo riscontrato 184 soggetti calcolotici con diagnosi clinica di MetS (35%; M:F 81:103, età media 50.4±6.6 anni, BMI 30.4±2.7 kg/m<sup>2</sup>). Rispetto ai soggetti calcolotici senza MetS, i soggetti calcolotici con MetS presentano un'età media più alta, una età media d'insorgenza della NL più avanzata, un rapporto più basso maschio/femmina nonché un indice di familiarità per NL minore. Lo studio dei fattori di rischio metabolici per la NL ha evidenziato che i soggetti calcolotici con MetS hanno un maggiore volume urinario delle 24 ore ed una maggiore escrezione urinaria nelle 24 ore di sodio, calcio, ossalato ed acido urico. Un modello di analisi di regressione logistica multivariata ha identificato l'escrezione urinaria di sodio nelle 24 ore e l'età anagrafica come fattori di rischio indipendenti per la NL nei soggetti con MetS.

I risultati dello studio indicano come l'escrezione urinaria di sodio nelle 24 ore sia il fattore di rischio metabolico più importante per la NL nei pazienti calcolotici con MetS. Quest'ultimi presentano un indice di familiarità per nefrolitiasi più basso con età d'esordio della NL più avanzata.

## **PERSISTENT SECONDARY HYPERPARATHYROIDISM AFTER RENAL TRANSPLANTATION: EFFECTS OF THERAPY WITH CHOLECALCIFEROL**

**Catia Cattelan, Stefania Sella, Sara Zordan, Luciana Bonfante, Augusto Antonello, Giuseppe Realdi, Sandro Giannini**

*Departments of Medical and Surgical Sciences, University Hospital of Padua, Padua (Italy)*

Hypovitaminosis D is a frequent condition in kidney-transplanted patients. Vitamin D insufficiency/deficiency is an important risk factor for the persistence and severity of secondary hyperparathyroidism (SHPT) and thus for skeletal morbidity. The aim of this study was to evaluate the effect of a therapy with vitamin D on PTH levels in kidney-transplanted patients.

We studied 50 patients (38 males and 11 females), who had undergone kidney transplantation 0 to 10 year before, aged 30-70 years ( $M \pm DS$  52,62 $\pm$ 10,78), with serum creatinine  $\leq$  227  $\mu$ mol/L. After four weeks of pharmacological wash-out, all patients underwent an evaluation of biochemical parameters of bone metabolism: 25-OH vitamin D, serum calcium, phosphate, PTH and creatinine ( $t_0$ ). The same parameters were re-evaluated after 4 ( $t_1$ ) and 8 ( $t_2$ ) months of therapy with vitamin D (cholecalciferol, 30 drops once a week equal to 7500 IU), respectively. At  $t_0$ , all patients showed 25-OH vitamin D levels lower than 75 nmol/L ( $M \pm DS$  32,02 $\pm$ 14,95 nmol/L=insufficiency). After 4 months of therapy, vitamin D levels increased to 62,98 $\pm$ 13,71, not yet up the normal value. After 8 months of therapy, there was a further increase in vitamin D levels. ( $M \pm DS$  70,28 $\pm$ 20,20). At the end of the study period, only in 18% of patients 25-OH vitamin D was normal ( $>$ 75 nmol/L). As far as PTH levels were concerned, we observed a slight decrease of its value. In conclusion, it is possible that kidney-transplanted patients may need higher values of vitamin D with respect to those given in the present study, for achieving full vitamin D repletion and thus a more important decrease in PTH levels.

## **IPERPARATIROIDISMO SECONDARIO PERSISTENTE DOPO TRAPIANTO DI RENE: EFFETTI DELLA TERAPIA CON COLECALCIFEROLO**

**Catia Cattelan, Stefania Sella, Sara Zordan, Luciana Bonfante, Augusto Antonello, Giuseppe Realdi, Sandro Giannini**

*Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Azienda Ospedaliera, Università di Padova*

L'ipovitaminosi D è una condizione frequente nei pazienti trapiantati di rene. Essa rappresenta un fattore di rischio importante per la persistenza e la severità dell'iperparatiroidismo secondario e quindi per fragilità ossea. Lo scopo di questo studio è stato valutare l'effetto della terapia con colecalciferolo sui livelli di PTH in pazienti trapiantati di rene. Sono stati studiati 50 soggetti (38 maschi e 11 femmine), trapiantati di rene da 0 a 10 anni, di età compresa tra i 25 ed i 65 anni ( $M \pm DS$  52,62 $\pm$ 10,78), con creatinemia  $\leq$  227  $\mu$ mol/L. I pazienti sono stati sottoposti, dopo quattro settimane di wash-out farmacologico, al dosaggio sierico di 25-idrossi-colecalciferolo (25-OH vitamina D), calcio, fosforo, PTH, creatinina al basale ( $t_0$ ) e dopo 4 ( $t_1$ ) e 8 ( $t_2$ ) mesi di trattamento con colecalciferolo (30 gocce settimanali pari a 7.500 U.I./settimana), rispettivamente. Al tempo  $t_0$  i pazienti presentavano livelli di 25-OH vitamina D indicativi di un quadro di insufficienza ( $M \pm DS$  32,02 $\pm$ 14,95 nmol/L). Dopo circa 4 mesi di trattamento i valori di 25-idrossicalciferolo sono aumentati a 62,98 $\pm$ 13,71, valore peraltro ancora subottimale. Dopo 8 mesi di terapia i valori di 25-idrossicalciferolo sono ulteriormente aumentati ( $M \pm DS$  70,28 $\pm$ 20,20). Solo 18 pazienti (36%) hanno raggiunto un valore di 25-idrossicalciferolo maggiore di 75 nmol/l, indicativi di un quadro di sufficienza. Per quanto riguarda i livelli di PTH sono state osservate lievi riduzioni dei valori ematici. In conclusione, è probabile che il fabbisogno vitaminico D sia maggiore del dosaggio adoperato in questo studio e che più alti livelli sierici di 25-OH-vitamina D siano necessari per indurre una più marcata soppressione del PTH in questi pazienti.

## CIRCULATING RESISTIN LEVELS IN PATIENTS WITH PRIMARY HYPERPARATHYROIDISM

Dario Cotesta, Luigi Petramala, Laura Zinamosca, Sabrina Cerci<sup>a</sup>, Giorgio De Toma<sup>b</sup>, Massimiliano Celi<sup>c</sup>, Sebastiano Filetti, Emilio D'Erasmus, Claudio Letizia

Department of Clinical Sciences, Chair of Internal Medicine, University of Rome "Sapienza", Rome (Italy)

<sup>a</sup> Hospital of Frascati (Rome, Italy)

<sup>b</sup> Department of Surgery "P. Valdoni", University of Rome "Sapienza", Rome (Italy)

<sup>c</sup> Hospital "S. Carlo di Nancy", Rome (Italy)

Primary hyperparathyroidism (PHPT) is relatively common endocrine disorder, often presenting incidental hypercalcemia. In the last years this chronic disease is associated with high cardiovascular morbidity and mortality. Resistin is a protein involved in glucose homeostasis, lipid metabolism, and insulin action. In mice it is expressed mainly in adipose tissue while in humans both adipocyte and inflammatory cells contribute to its production.

In this study we sought to examine whether plasma resistin concentrations are associated with some metabolic, haemodynamic or bone metabolism parameters in patients with PHPT. In our study we enrolled 67 consecutive patients with PHPT and 46 healthy subject (HS).

Twenty (29.8%) patients with PHPT presented metabolic syndrome (as defined by Adult Treatment Panel III criteria) and thirty-nine (58%) are hypertensives.

Plasma resistin levels ( $4.68 \pm 3.3$  ng/ml) were significantly higher than those of HS ( $p < 0.001$ ) and, in particular, in PHPT patients with metabolic syndrome ( $6.23 \pm 5.1$  ng/ml;  $p < 0.001$ ).

Plasma resistin were negatively correlated serum triglycerides, urinary calcium and phosphorus excretion and positively with lumbar spine bone mineral density and blood pressure.

In conclusion we found that plasma resistin levels in PHPT are associated with bone metabolism and haemodynamic parameters. Furthermore plasma resistin levels are significantly increased in PHPT patients with metabolic syndrome.

## LIVELLI CIRCOLANTI DI RESISTINA IN PAZIENTI AFFETTI DA IPERPARATIROIDISMO PRIMITIVO

Dario Cotesta, Luigi Petramala, Laura Zinamosca, Sabrina Cerci<sup>a</sup>, Giorgio De Toma<sup>b</sup>, Massimiliano Celi<sup>c</sup>, Sebastiano Filetti, Emilio D'Erasmus, Claudio Letizia

Dipartimento di Scienze Cliniche, Cattedra di Medicina Interna, Università degli Studi "Sapienza", Roma

<sup>a</sup> Ospedale di Frascati, Roma

<sup>b</sup> Dipartimento di Chirurgia "P. Valdoni", Università degli Studi "Sapienza", Roma

<sup>c</sup> Ospedale "S. Carlo di Nancy", Roma

L'iperparatiroidismo primario (PHPT) è una malattia endocrina di comune riscontro che spesso si presenta con il riscontro occasionale di ipercalcemia. Negli ultimi anni questa malattia è stata associata con l'aumento della morbilità e della mortalità cardiovascolare. La resistina è una proteina coinvolta nella omeostasi del glucosio, nel metabolismo lipidico e nell'azione dell'insulina. Nei topi è espressa principalmente nel tessuto adiposo mentre negli uomini sia gli adipociti che le cellule infiammatorie contribuiscono alla sua produzione.

In questo studio abbiamo cercato di esaminare se le concentrazioni plasmatiche di resistina fossero associate con alcuni parametri metabolici, emodinamici o del metabolismo osseo nei pazienti con PHPT. Nel nostro studio abbiamo arruolato 67 pazienti consecutivi con PHPT, confrontati con 46 soggetti sani (HS).

20 pazienti (29,8%) con PHPT presentavano la sindrome metabolica (definita secondo i criteri dell'Adult Treatment Panel III) e 39 (58%) erano ipertesi.

I livelli plasmatici di resistina ( $4,68 \pm 3,3$  ng/ml) erano significativamente più alti rispetto a quelli dei soggetti sani (HS) ed, in particolare nei pazienti affetti da PHPT che presentavano la sindrome metabolica ( $6,23 \pm 5,1$  ng/ml;  $p < 0,001$ ).

I livelli plasmatici di resistina si correlavano negativamente con i trigliceridi plasmatici, con la calciuria e la fosfaturia e si correlavano positivamente con la densità minerale ossea a livello della colonna vertebrale e con la pressione arteriosa.

In conclusione, abbiamo riscontrato che nei pazienti affetti da PHPT esiste un'associazione tra i livelli plasmatici di resistina, il metabolismo minerale ed i parametri emodinamici. Inoltre i livelli plasmatici di resistina sono significativamente aumentati nei pazienti affetti da PHPT con sindrome metabolica.

## VISCERAL FAT INCREASES BONE MINERAL DENSITY AND THE RISK OF VERTEBRAL FRACTURES IN POST-MENOPAUSAL OSTEOPOROSIS

Anna Maria Scarponi, Matteo Pirro, Gianluigi Fabbriciani, Massimo Raffaele Mannarino, Christian Leli, Laura Callarelli, Maria Rosaria Manfredelli, Elmo Mannarino

Internal Medicine, Angiology and Arteriosclerosis Diseases, University of Perugia, Perugia (Italy)

Increased body weight and body mass index have a protective effect against osteoporosis and have been associated with a reduced risk of any fracture in the general population. The protective effect of high body mass index on osteoporosis and bone fractures has been explained by a combination of mechanical and hormonal factors. However, the association between fat distribution, and particularly visceral fat and bone mineral density is less clear. Hence, we investigated the relationship between the amount of visceral fat and bone mineral density in post-menopausal women with or without osteoporosis.

Seventy post-menopausal women with (n. 40) or without osteoporosis (n. 30) underwent measurement of lumbar spine, total hip and neck bone mineral density (BMD) by Dual-Energy X-ray Absorbptometry and semiquantitative assessment of prevalent vertebral fractures by morphometric X-ray radiography (method of Genant). The visceral fat volume was measured in all participants by ultrasonography as follows: [visceral fat volume]= $-9.008+1.191 \times [\text{distance between the internal surface of the abdominal muscle and the splenic vein (mm)}]+0.987 \times [\text{distance between the internal surface of the abdominal muscle and the posterior wall of the aorta on the umbilicus (mm)}]+3.644 \times [\text{thickness of the fat layer of the posterior right renal wall (mm)}]$ .

Visceral fat volume was significantly reduced in osteoporotic post-menopausal women compared with that measured in non-osteoporotic controls ( $145 \pm 7 \text{ cm}^2$  vs  $166 \pm 8 \text{ cm}^2$ ,  $p < 0.05$ ). In the whole cohort, visceral fat volume was positively correlated with lumbar BMD ( $r = 0.40$ ,  $p = 0.001$ ), total hip BMD ( $r = 0.57$ ,  $p < 0.001$ ), neck BMD ( $r = 0.458$ ,  $p < 0.001$ ) and lumbar, total hip and neck T-scores ( $r = 0.41$ ,  $p = 0.001$ ;  $r = 0.57$ ,  $p < 0.001$ ; and  $r = 0.45$ ,  $p < 0.001$ , respectively). However, osteoporotic women with vertebral fractures had higher visceral fat volume than non-fractured osteoporotic women ( $162 \pm 10 \text{ cm}^2$  vs  $133 \pm 8 \text{ cm}^2$ ,  $p = 0.03$ ).

In conclusion, an increased amount of visceral fat is a significant determinant of increased bone mineral density in post-menopausal osteoporotic women, but it is however associated with an increased risk of osteoporotic vertebral fractures.

## IL GRASSO VISCERALE INCREMENTA LA DENSITÀ MINERALE OSSEA ED IL RISCHIO DI FRATTURE VERTEBRALI NELL'OSTEOPOROSI POST-MENOPAUSALE

Anna Maria Scarponi, Matteo Pirro, Gianluigi Fabbriciani, Massimo Raffaele Mannarino, Christian Leli, Laura Callarelli, Maria Rosaria Manfredelli, Elmo Mannarino

Medicina Interna, Angiologia e Malattie da Arteriosclerosi, Università degli Studi di Perugia

Sebbene sia stata dimostrata una associazione inversa tra peso corporeo e rischio di fratture nella popolazione generale, la relazione tra grasso viscerale e densità minerale ossea (DMO) non è ancora del tutto chiara. Lo scopo del presente studio è stato quello di esaminare la relazione tra il volume del grasso viscerale e la DMO in donne in età post-menopausale affette o non da osteoporosi.

Settanta donne in post-menopausa (n. 40) e senza osteoporosi (n. 30) hanno eseguito valutazione della DMO a livello del rachide lombare L1-L4, del femore prossimale e del collo del femore mediante densitometria a raggi X (DEXA), valutazione semiquantitativa delle fratture vertebrali prevalenti (metodo di Genant) e quantificazione del volume del grasso viscerale mediante ecografia. Il volume del grasso viscerale è stato calcolato secondo la seguente formula: [volume del grasso viscerale]=  $-9,008+1,109 \times [\text{distanza tra la superficie interna del muscolo addominale e la vena splenica (mm)}]+0,987 \times [\text{distanza tra la superficie interna del muscolo addominale e la parete posteriore dell'aorta addominale nell'area a livello dell'ombelico (mm)}]+3,644 \times [\text{spessore dello strato di grasso della parete posteriore del rene di destra (mm)}]$ .

È stata riscontrata una riduzione statisticamente significativa del volume del grasso viscerale nelle donne con osteoporosi rispetto ai controlli ( $145 \pm 18 \text{ cm}^2$  vs  $166 \pm 8 \text{ cm}^2$ ,  $p < 0,05$ ). Nell'intera coorte dei partecipanti, è stata rilevata una correlazione positiva tra volume del grasso viscerale e DMO a livello del rachide lombare L1-L4 ( $r = 0,40$ ,  $p = 0,001$ ), del femore prossimale ( $r = 0,57$ ,  $p < 0,001$ ), del collo femorale ( $r = 0,458$ ,  $p < 0,001$ ), del T-score a livello lombare, del femore prossimale e del collo femorale (rispettivamente:  $r = 0,41$ ,  $p < 0,001$ ;  $r = 0,57$ ,  $p < 0,001$ ;  $r = 0,45$ ,  $p > 0,001$ ). Le donne con osteoporosi conclamata per la presenza di fratture vertebrali presentano una maggiore rappresentazione del grasso viscerale rispetto alle donne osteoporotiche non fratturate ( $162 \pm 10 \text{ cm}^2$  vs  $133 \pm 8 \text{ cm}^2$ ,  $p = 0,03$ ).

In conclusione, in donne con osteoporosi post-menopausale, l'espansione del compartimento adiposo viscerale si associa ad un aumento della densità minerale ossea cui corrisponde però un maggiore rischio di fratture vertebrali.