

# ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΤΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ 23 ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΚΛΩΘΟΥΣ ΜΕ ΤΗΝ ΕΚΒΑΣΗ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΝΟΣΟ ΣΤΑΔΙΟΥ 1-5


Ε.Μάνου<sup>1</sup>, Η.Θώδης<sup>2</sup>, Γ.Άρσος<sup>3</sup>, Σ.Παναγούτσος<sup>2</sup>, Δ.Κατσαμπούκας<sup>3</sup>,  
Δ.Παπαδοπούλου<sup>1</sup>, Β.Βαργεμέζης<sup>2</sup>, Α.Παπαγιάννη<sup>4</sup>, Π.Πασαδάκης<sup>2</sup>

1. Νεφρολογική Κλινική, Γενικό Νοσοκομείο "Παπαγεωργίου" Θεσσαλονίκης,
2. Νεφρολογική Κλινική ΔΠΘ, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο  
Αλεξανδρούπολης,
3. Γ' Εργαστήριο Πυρηνικής Ιατρικής ΑΠΘ, Γενικό Νοσοκομείο "Παπαγεωργίου"  
Θεσσαλονίκης,
4. Νεφρολογική Κλινική ΑΠΘ, Γενικό Νοσοκομείο Ιπποκράτειο Θεσσαλονίκης

# Εισαγωγή

- 📌 Η χρόνια νεφρική νόσος (ΧΝΝ) συνδέεται άρρηκτα με τις διαταραχές των οστών και των μετάλλων (ΔΟΜ)
- 📌 Οι δύο αυτές οντότητες προσδιορίζουν η μια την άλλη, αποτελώντας ουσιαστικά ένα κοινό σύνδρομο, γνωστό διεθνώς με τον όρο Bone and Mineral Disorders in Chronic Kidney Disease (BMD-CKD)
- 📌 Ο άξονας του αυξητικού παράγοντα των ινοβλάστων 23 (Fibroblast Growth Factor, FGF23) και της πρωτεΐνης Κλωθούς (Klotho) συμμετέχει πρώιμα και καθοριστικά στις ΔΟΜ-ΧΝΝ, με αναφορές που συνηγορούν για τον ρόλο του άξονα αυτού στην έκβαση της ΧΝΝ

## Σκοπός της εργασίας

 Η μελέτη της συσχέτισης του FGF23 και της πρωτεΐνης Κλωθούς με την έκβαση ασθενών με χρόνια νεφρική νόσο (ΧΝΝ) σταδίου 1-5, εκτός θεραπείας υποκατάστασης (ΘΥ)

## Ασθενείς-Μέθοδοι (1)

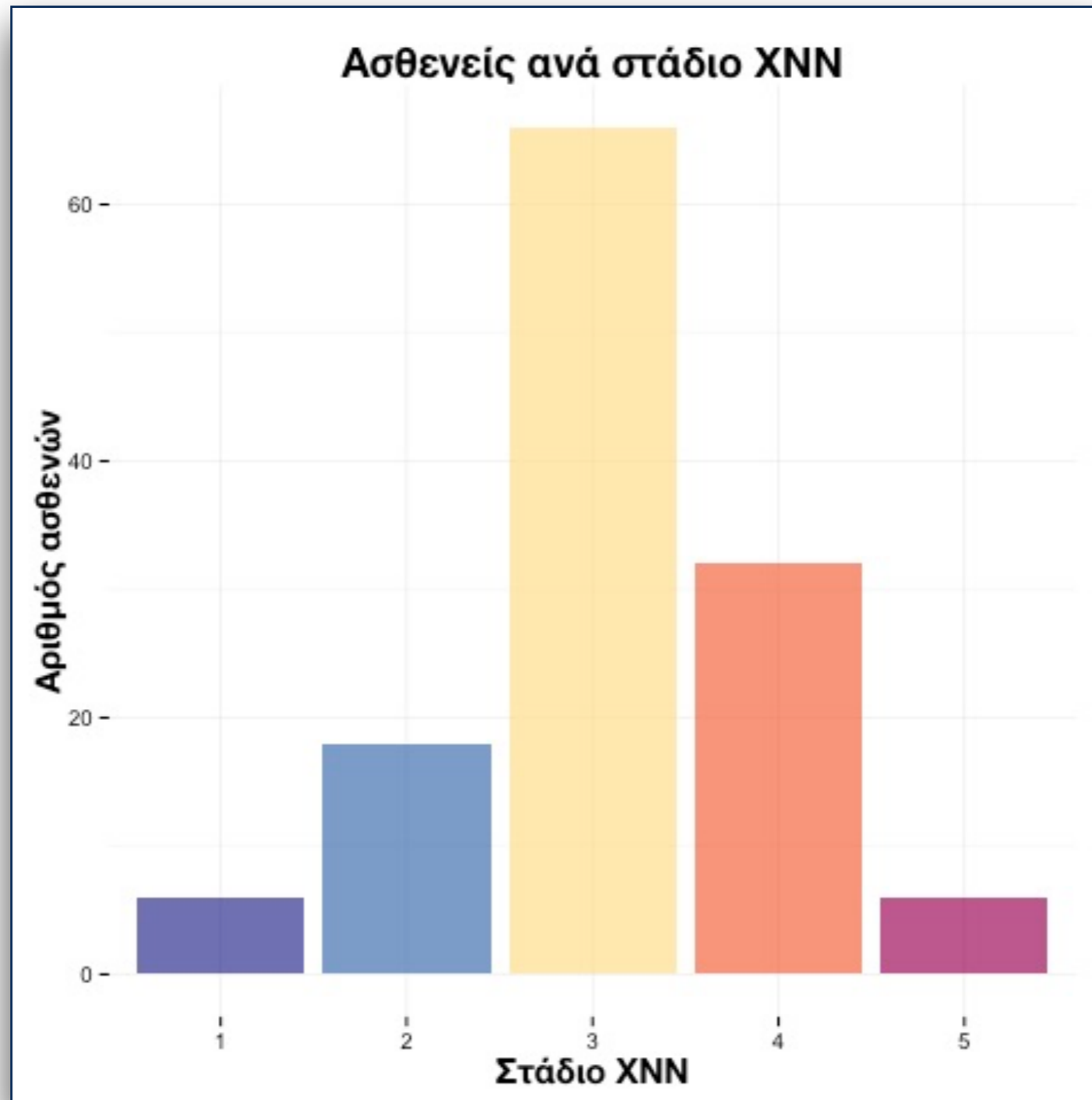
- 📌 Στη μελέτη έλαβαν μέρος 128 ασθενείς (85 άνδρες, μέση ηλικία 64,13 έτη, εύρος: 18-86)
- 📌 Η νεφρική λειτουργία εκτιμήθηκε ραδιοϊσοτοπικά με τη μέτρηση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης, μέσω εξωγενούς χορήγησης Cr-51 EDTA (measured Glomerular Filtration Rate, mGFR)
- 📌 Σε όλους τους ασθενείς έγινε ένας πλήρης αιματολογικός, βιοχημικός και ορμονικός έλεγχος, σχετιζόμενος με τη ΧΝΝ, στον ορό και στα ούρα
- 📌 Οι ασθενείς ταξινομήθηκαν στα 5 στάδια της ΧΝΝ με βάση τα κριτήρια NKF-KDOQI 2002

## Ασθενείς-Μέθοδοι (2)

📌 Οι παράγοντες c-term FGF23 (cFGF23), που αντιστοιχεί στο καρβοξυτελικό άκρο του, και διαλυτή Κλωθώ (soluble Klotho) προσδιορίστηκαν στο πλάσμα των ασθενών με ανοσοενζυμική μέθοδο (ELISA)

📌 Οι ασθενείς παρακολουθήθηκαν έως και 60 μήνες (2-60). Σύνθετο καταληκτικό σημείο της μελέτης ήταν η ένταξή τους σε ΘΥ ή ο θάνατος

# Ασθενείς-Μέθοδοι (3)



# Ασθενείς-Μέθοδοι (4)

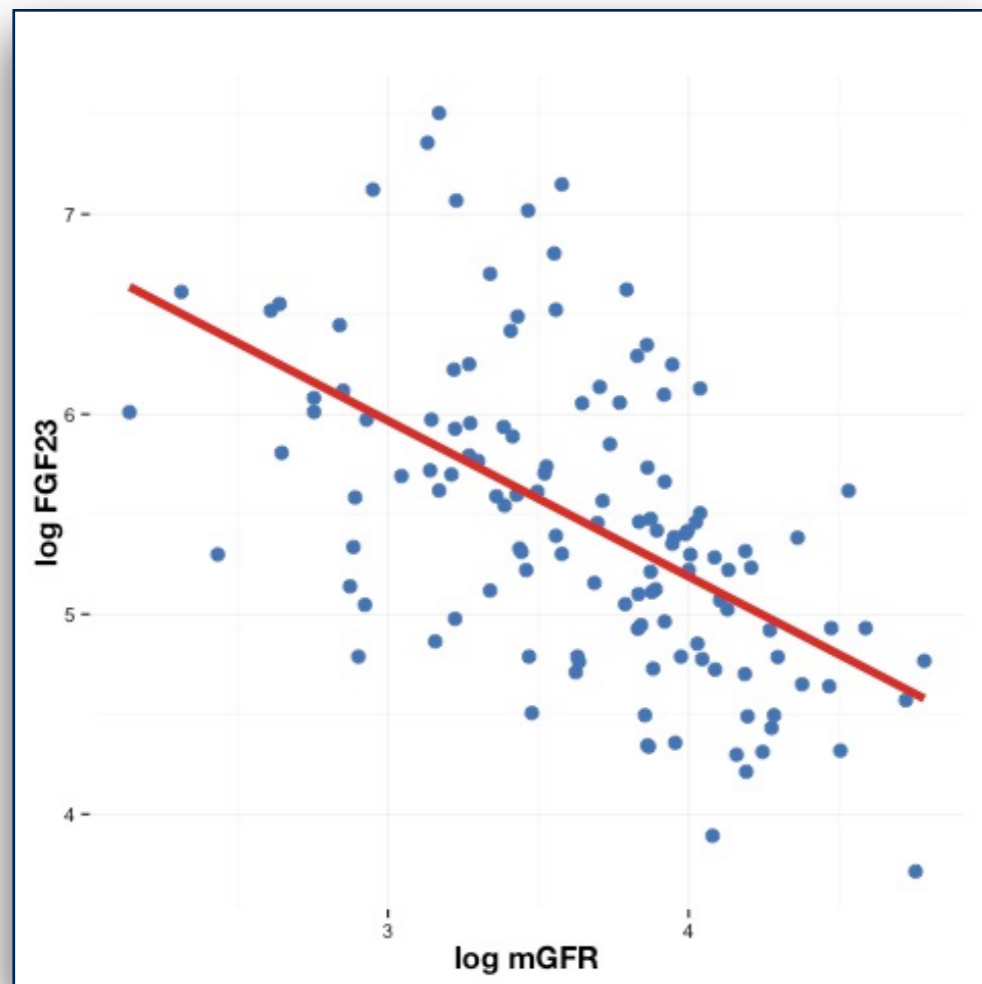
## Στατιστικές μέθοδοι

- 📌 Η στατιστική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα R (R-project for Statistical Computing-[www.r-project.org](http://www.r-project.org))
- 📌 Οι μεταβλητές που δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή μετασχηματίστηκαν στη λογαριθμική κλίμακα (log transformation)
- 📌 Οι δοκιμασίες Student's-Wilcoxon test και η ανάλυση της διακύμανσης (ANOVA) χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη της διαφοράς της μέσης τιμής των διαφόρων μεταβλητών ανάμεσα σε 2 ή περισσότερες ομάδες αντίστοιχα
- 📌 Η μέθοδος της παλίνδρομης συσχέτισης (logistic regression), οι πίνακες συνάφειας (contingency tables) και οι καμπύλες επιβίωσης (Kaplan-Meier και Cox regression) χρησιμοποιήθηκαν στην έκφραση της συσχέτισης των υπό εξέταση μεταβλητών με την τελική έκβαση των ασθενών

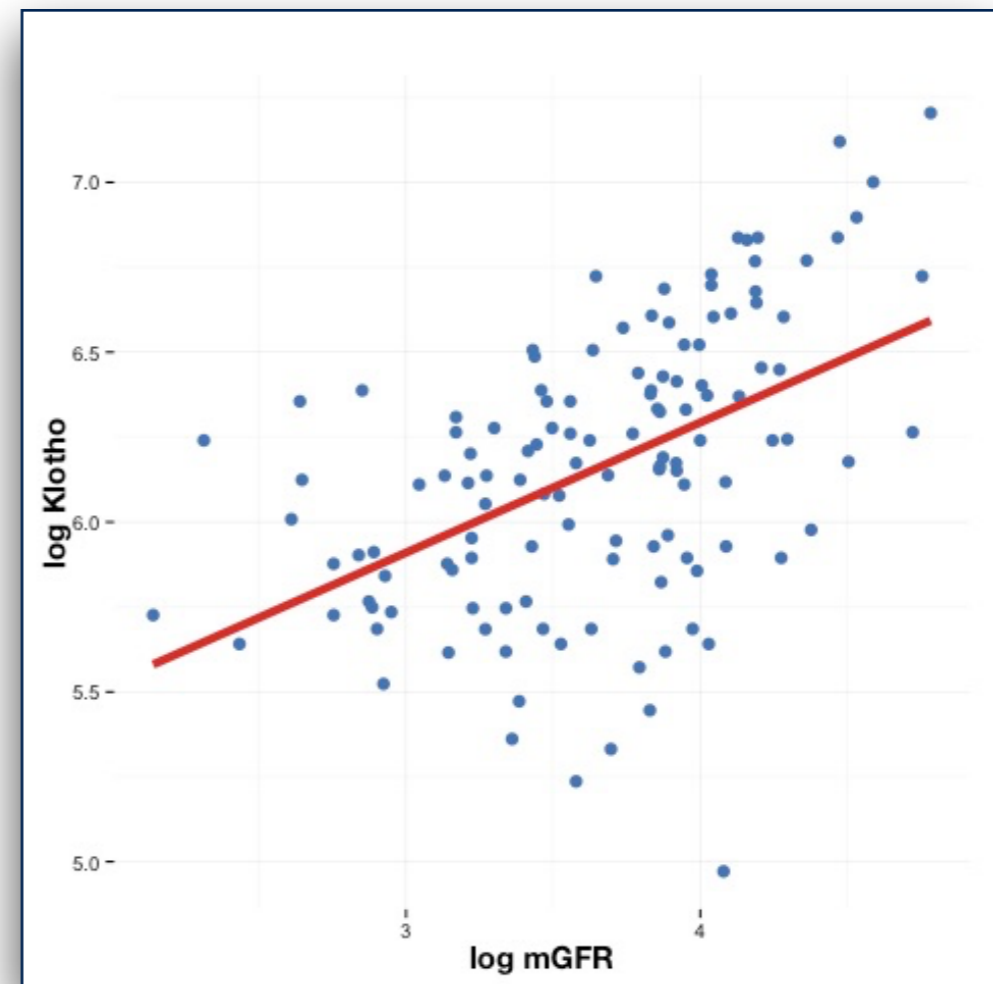


## Αποτελέσματα (1)

📌 Ο FGF23 και η Κλωθώ παρουσίαζαν αρνητική και θετική συσχέτιση, αντίστοιχα, με τον mGFR



$r=0,53$ ,  $p<0,0001$

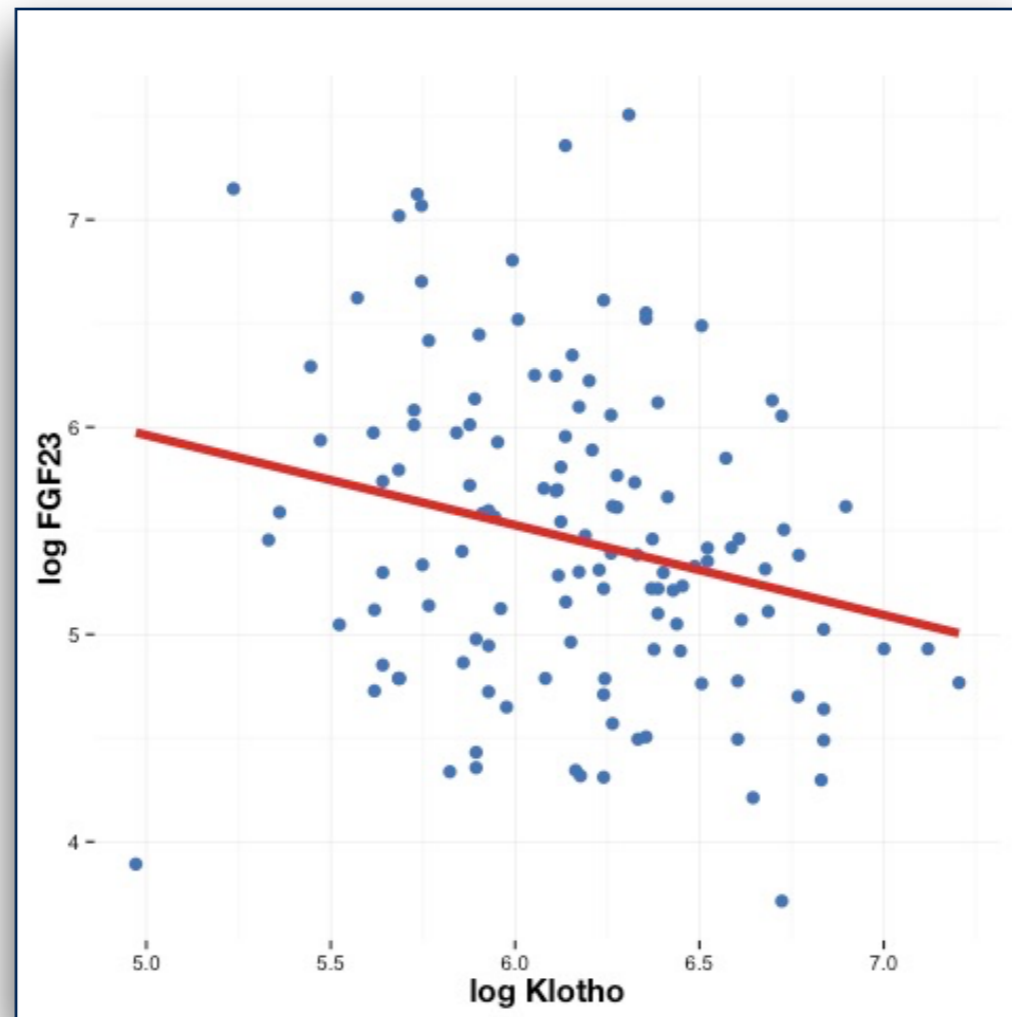


$r=0,47$   $p=0,0004$



## Αποτελέσματα (2)

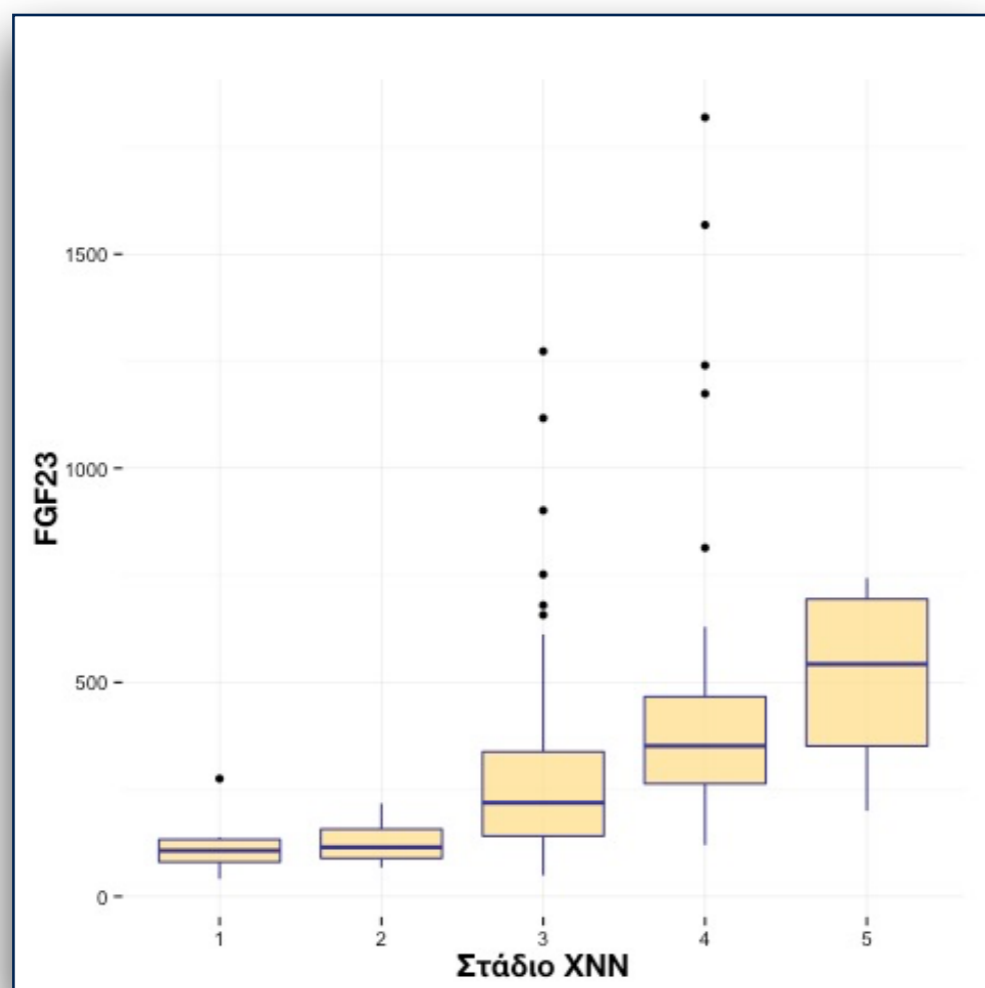
- 📌 Ο FGF23 και η Κλωθώ παρουσίαζαν αρνητική συσχέτιση μεταξύ τους



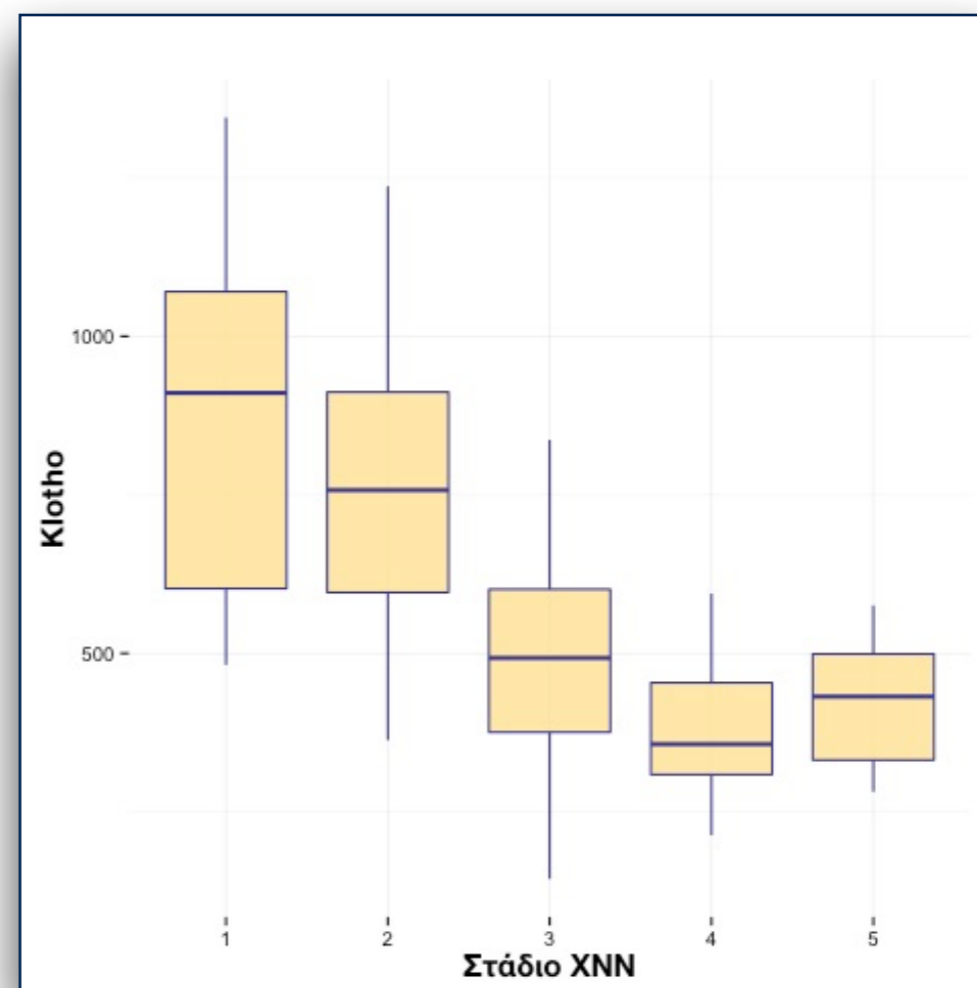
$$r=0,2, p=0,006$$

## Αποτελέσματα (3)

📌 Η ανάλυση της διακύμανσης (ANOVA- Kruskal-Wallis test) έδειξε σημαντική διαφορά των επιπέδων του FGF23 και της Κλωθούς ανάμεσα στα 5 στάδια της ΧΝΝ



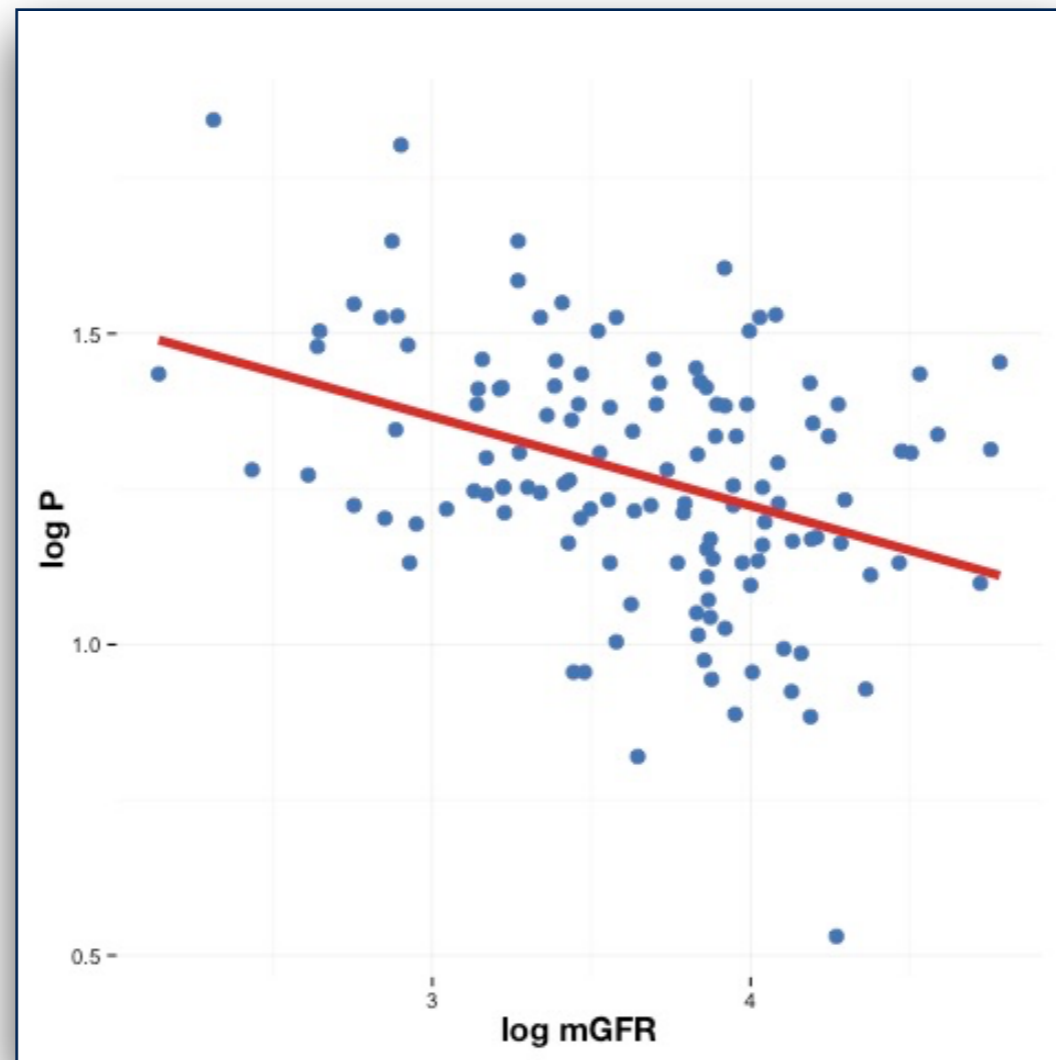
$p=0,0008$



$p=0,0004$

## Αποτελέσματα (4α)

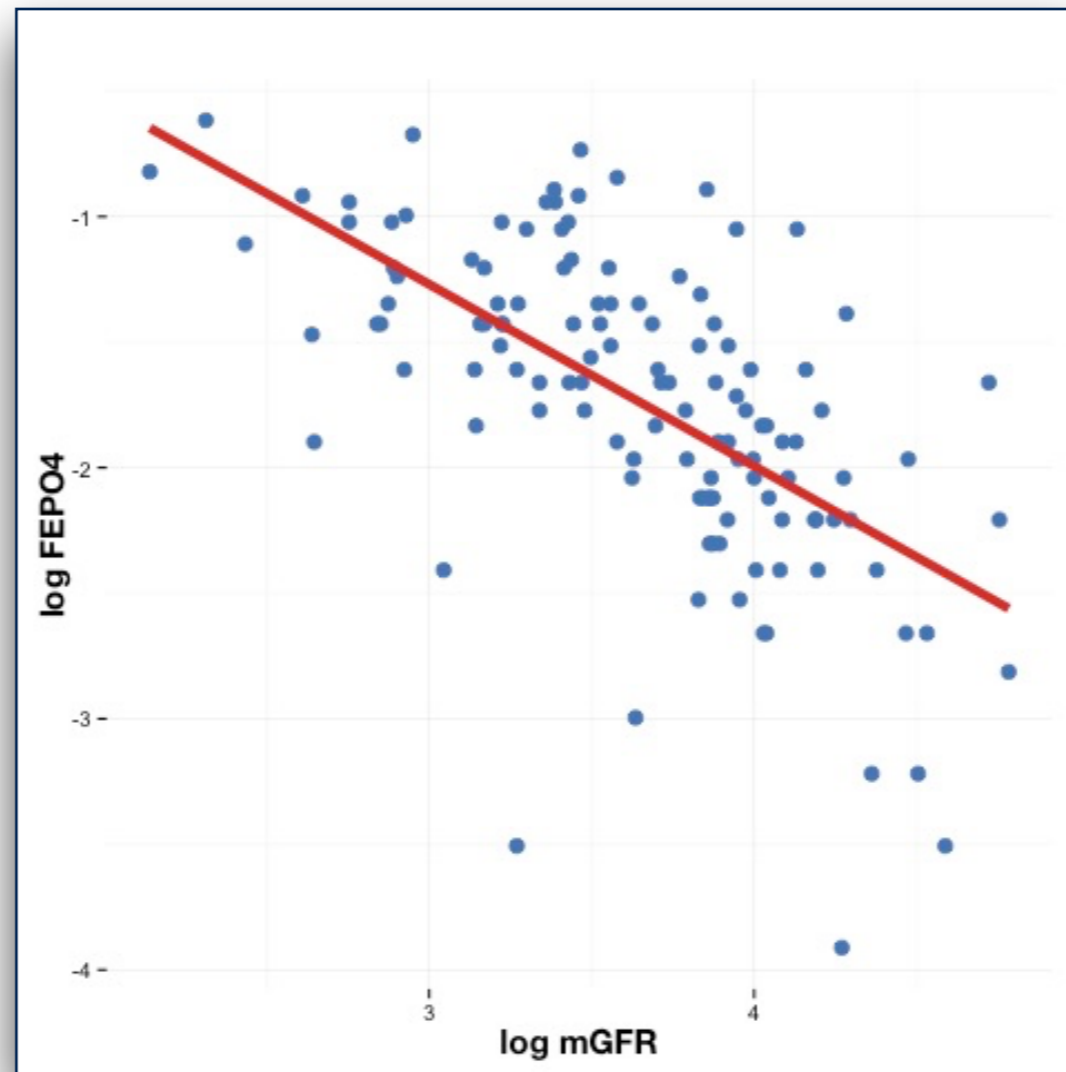
- 📌 Ο φώσφορος του ορού (P) παρουσιάζει αρνητική συσχέτιση με τον mGFR



$$r=0,36, p=0,008$$

## Αποτελέσματα (4β)

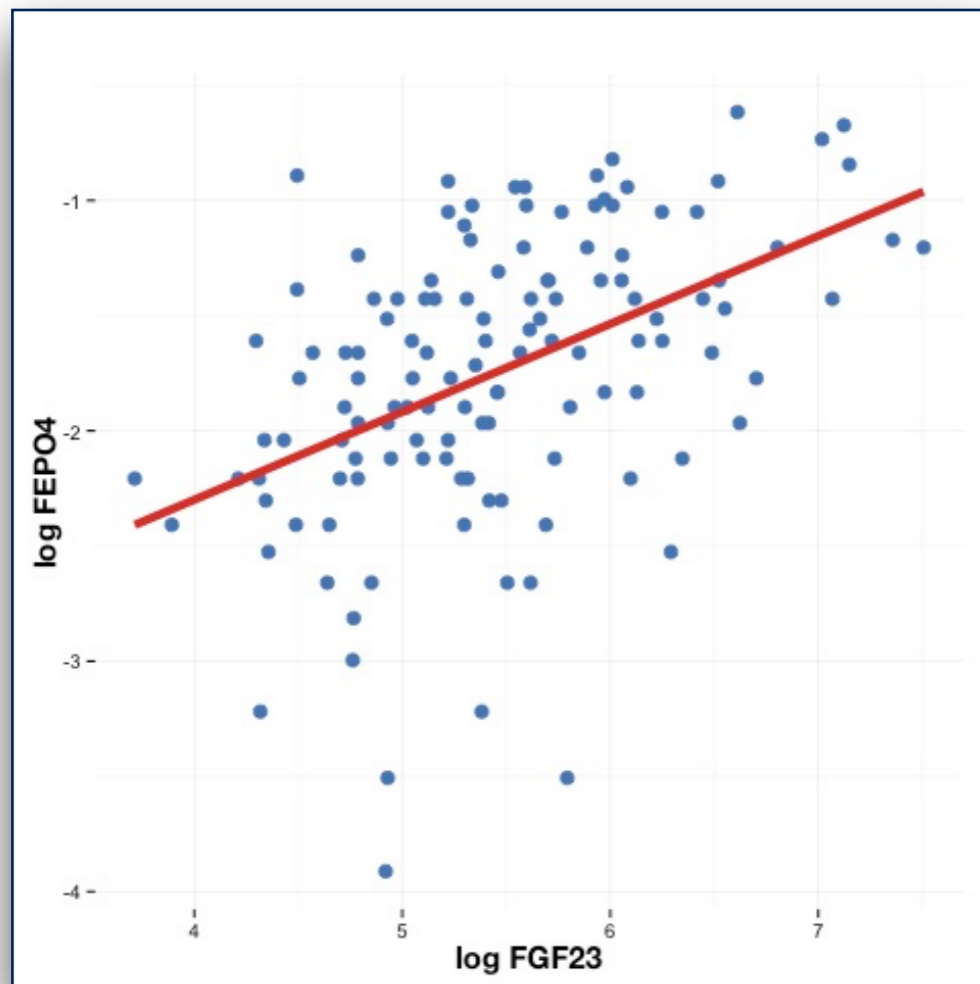
📌 Το ίδιο και η κλασματική απέκκρισή του (FEPO4) στα ούρα



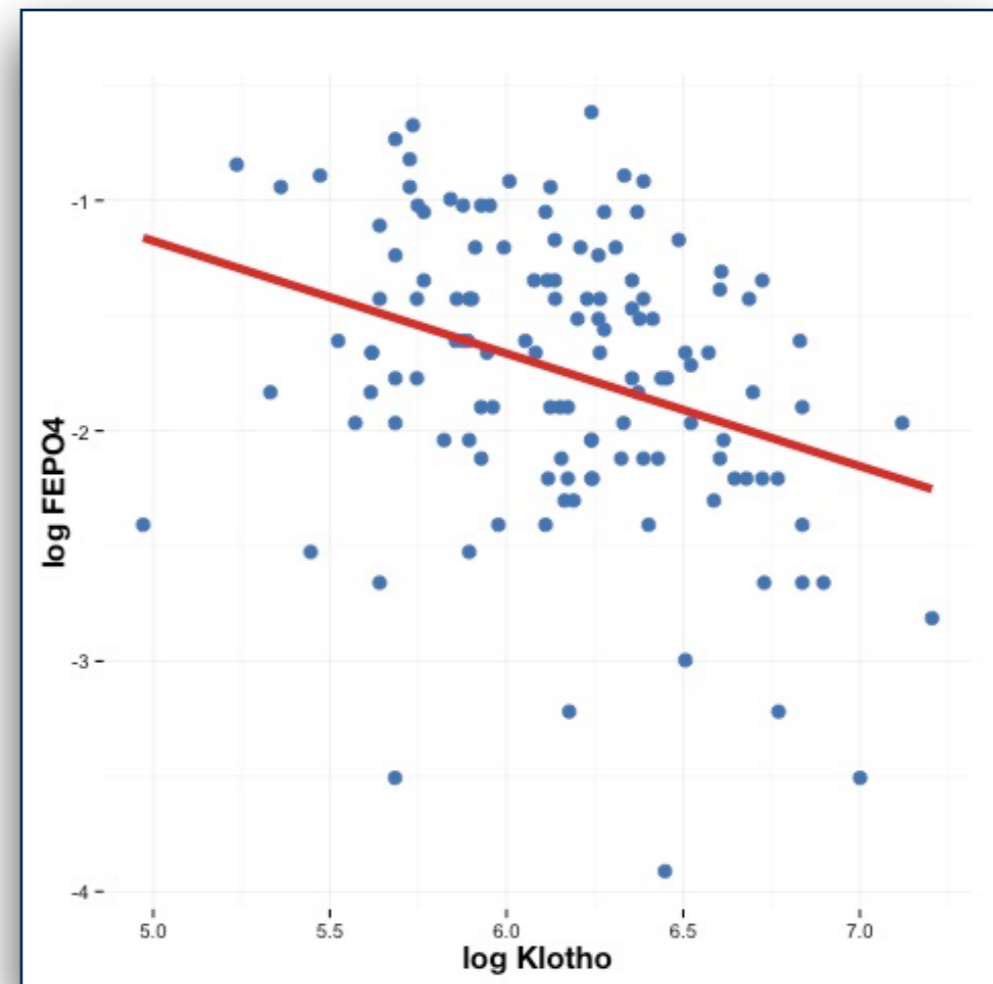
$$r=0,6, p<0,0001$$

## Αποτελέσματα (4γ)

📌 Ο FGF23 και η Κλωθώ παρουσίαζαν θετική και αρνητική συσχέτιση, αντίστοιχα, με την FEPO4



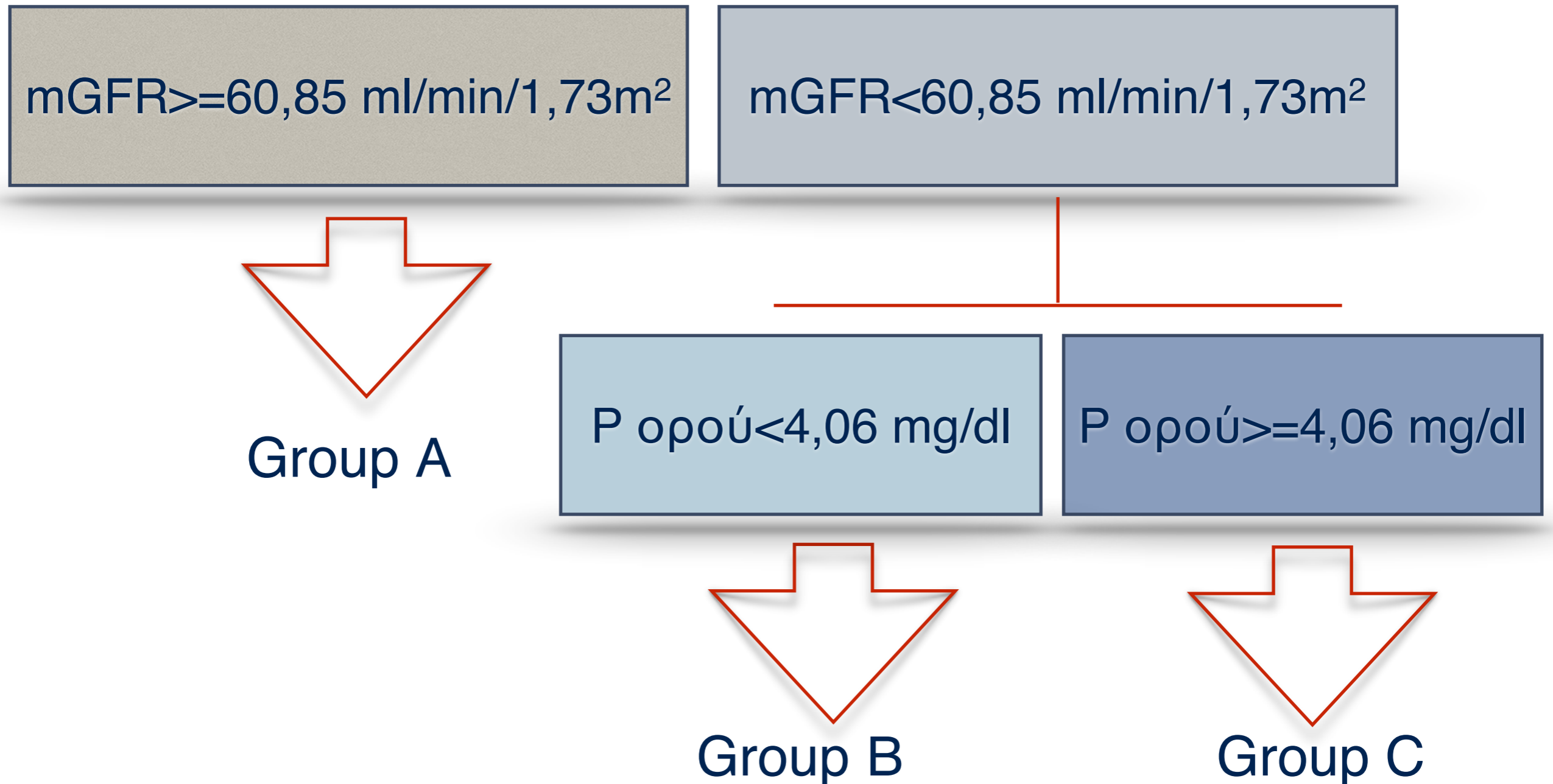
$r=0,4$ ,  $p=0,001$



$r=0,3$ ,  $p<0,0001$

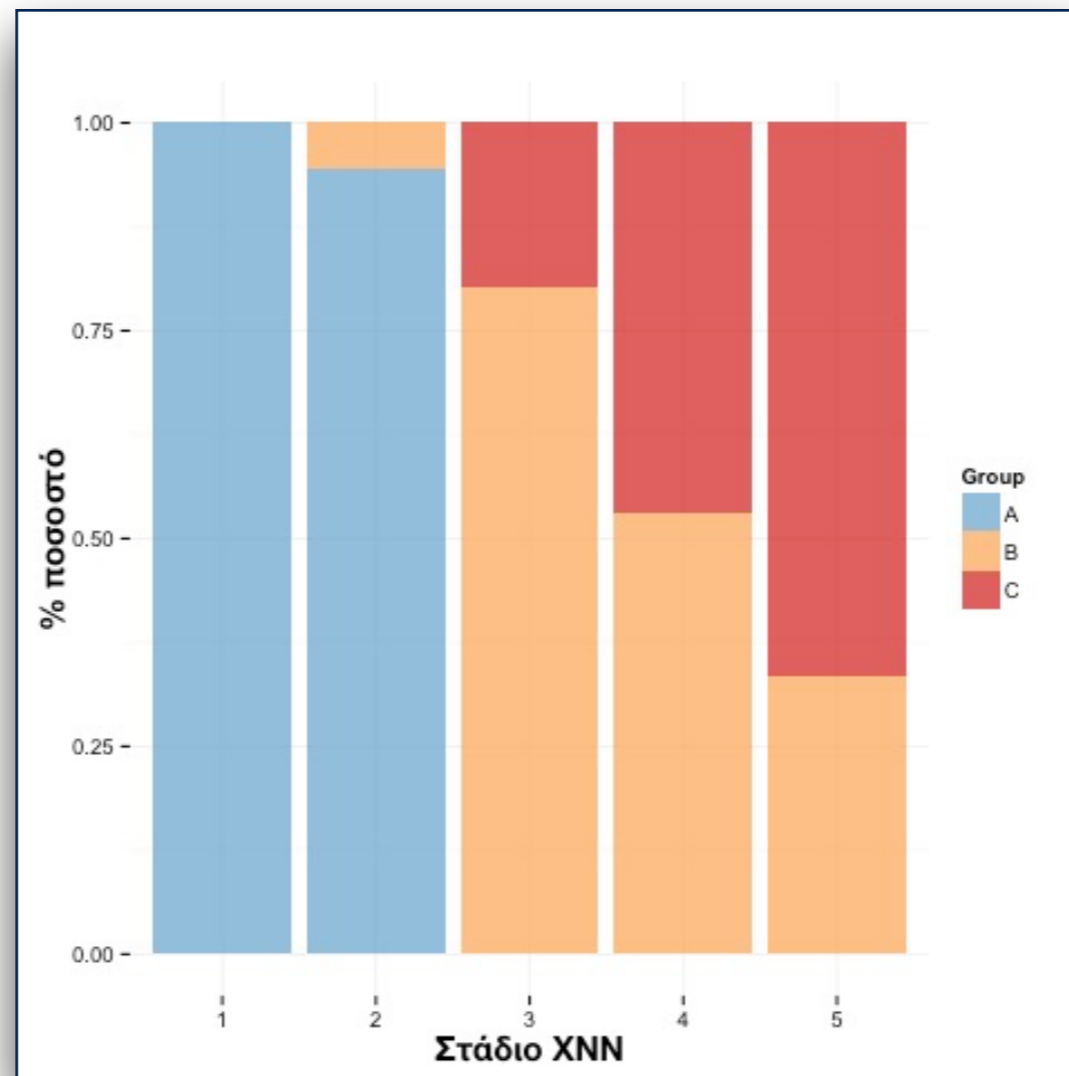
## Αποτελέσματα (5)

📌 Η πολλαπλή συσχέτιση με τη μέθοδο του δενδρογράμματος (regression tree) κατέταξε τους ασθενείς σε 3 διακριτές ομάδες (regression groups)



## Αποτελέσματα (6)

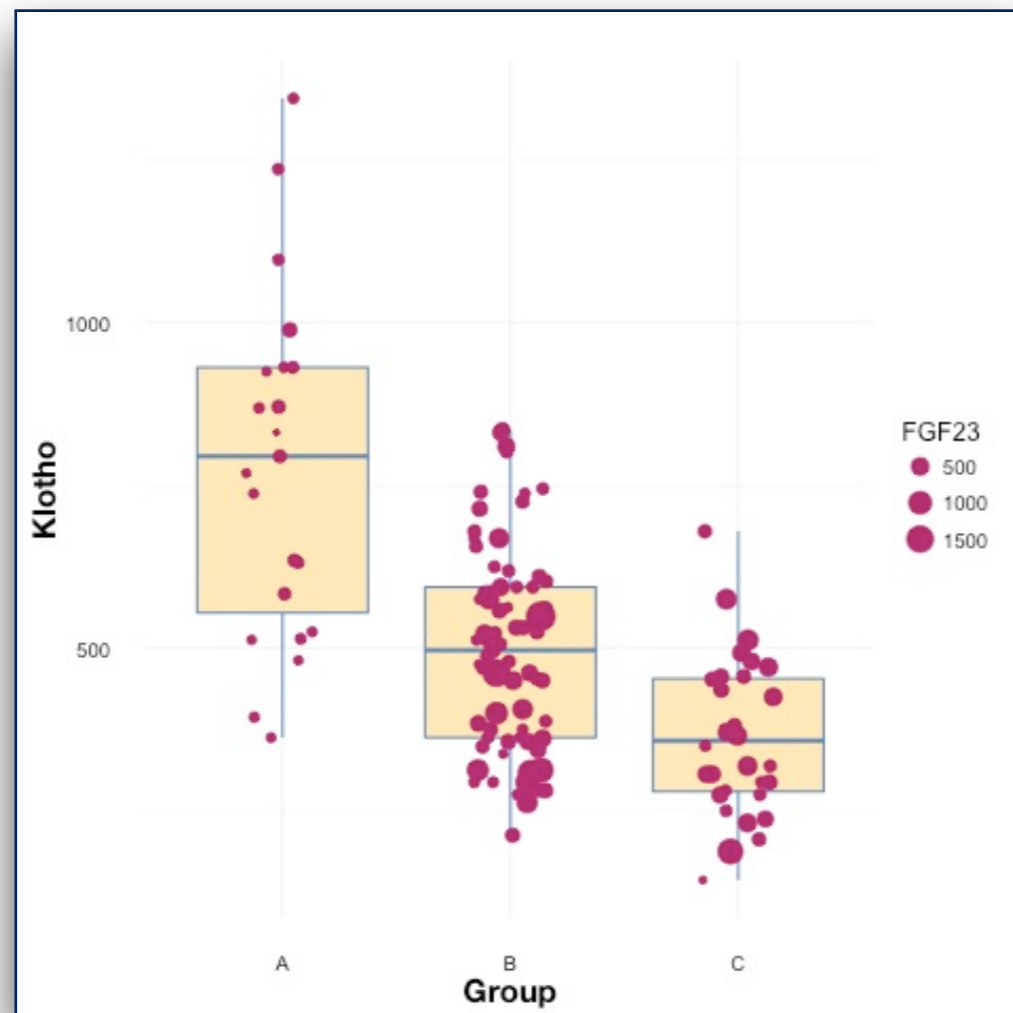
📌 Τα 3 regression groups συσχετίζονταν σημαντικά με τα 5 στάδια της ΧΝΝ ( $p < 0,0001$ )



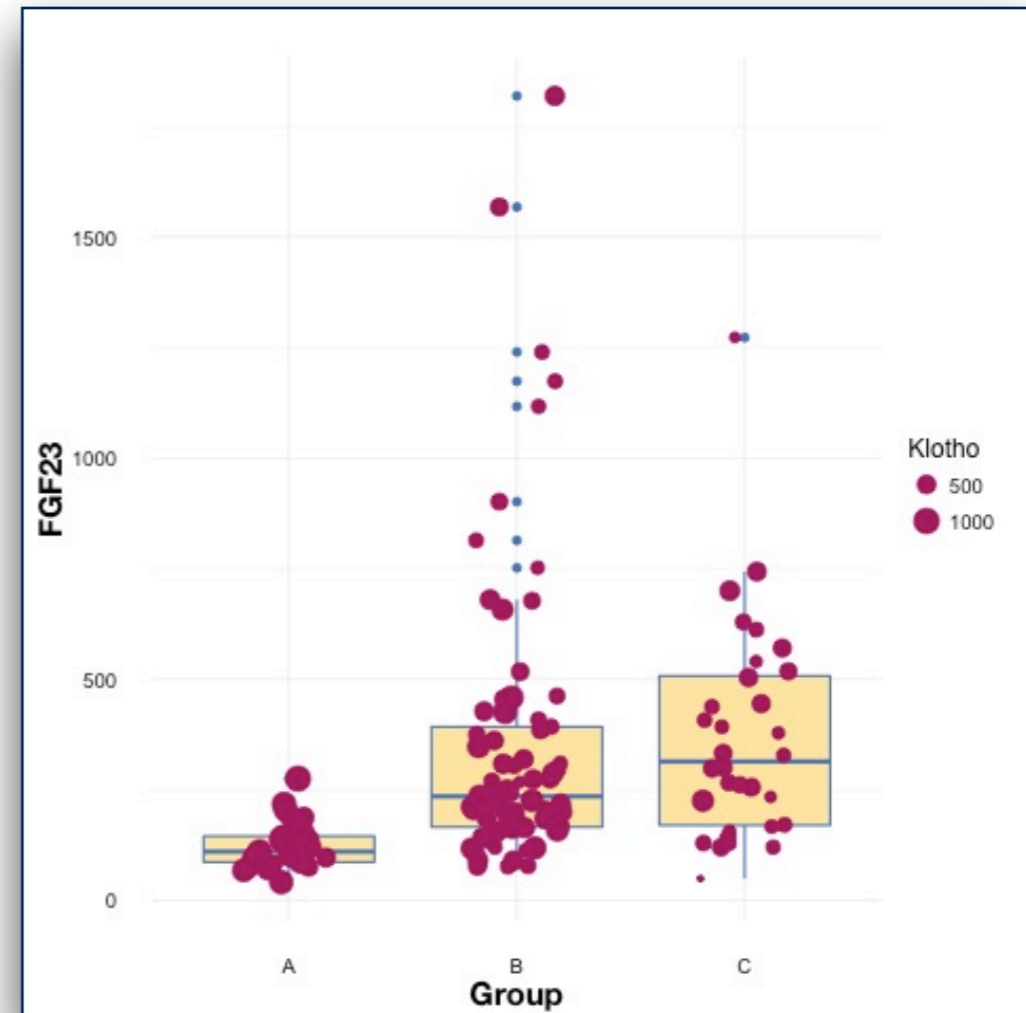
Group	A	B	C
Klotho mean, quantiles	778.54 (554.74-931.75)	497.95 (363.00-594.25)	364.16 (280.19-453.61)

## Αποτελέσματα (7)

- 📌 Η ανάλυση της διακύμανσης (ANOVA- Kruskal-Wallis test) έδειξε σημαντική διαφορά των επιπέδων της Κλωθούς και του FGF23 ανάμεσα στα 3 groups



$p=0,0002$

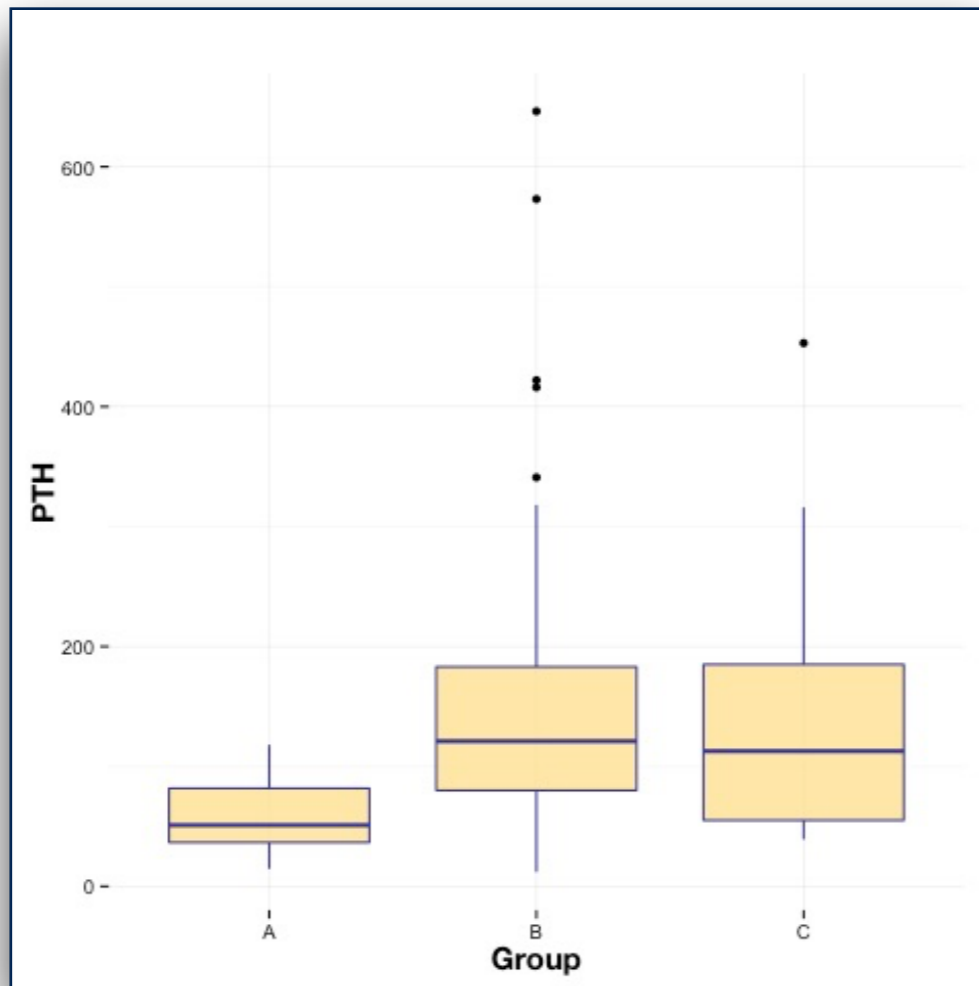


$p=0,002$

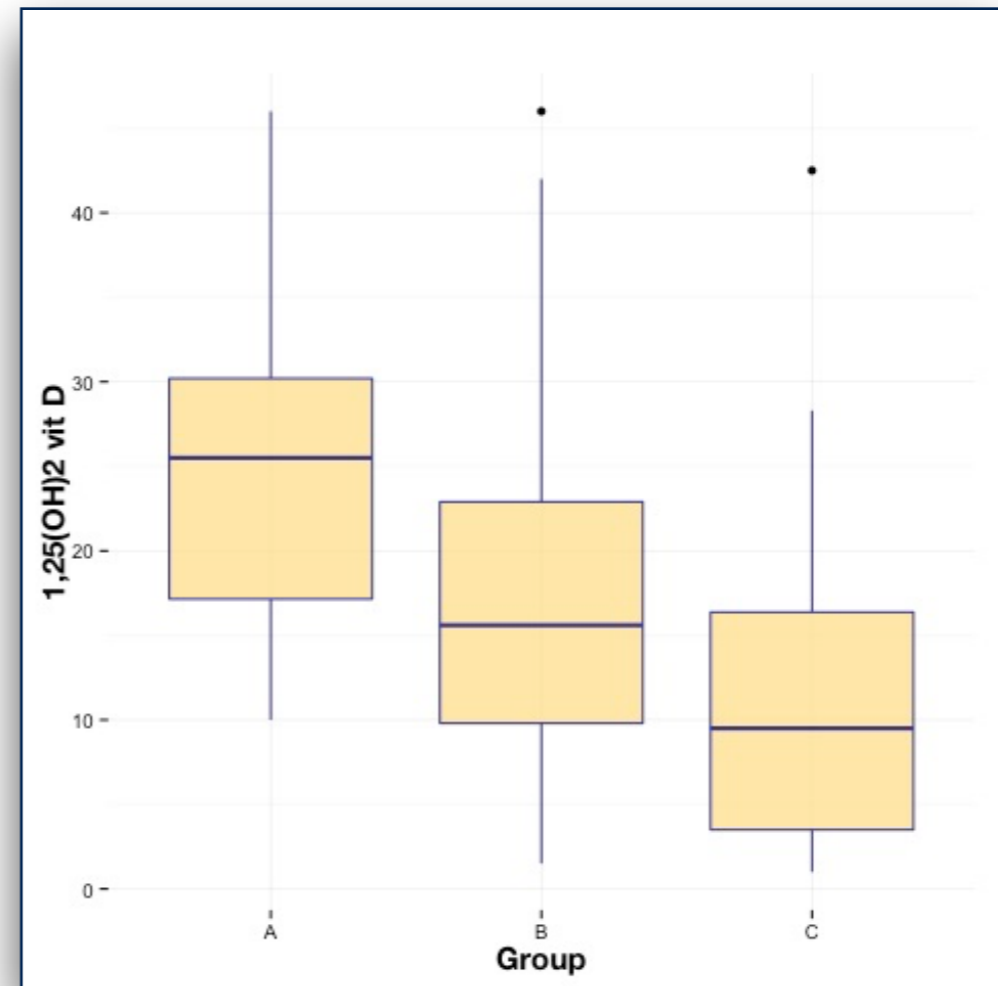


## Αποτελέσματα (8)

- 📌 Το ίδιο ίσχυε και για άλλες παραμέτρους του οστικού μεταβολισμού, όπως η παραθορμόνη (PTH) και η ενεργός μορφή της βιταμίνης D ( $1,25(\text{OH})_2 \text{ vit D}$ )



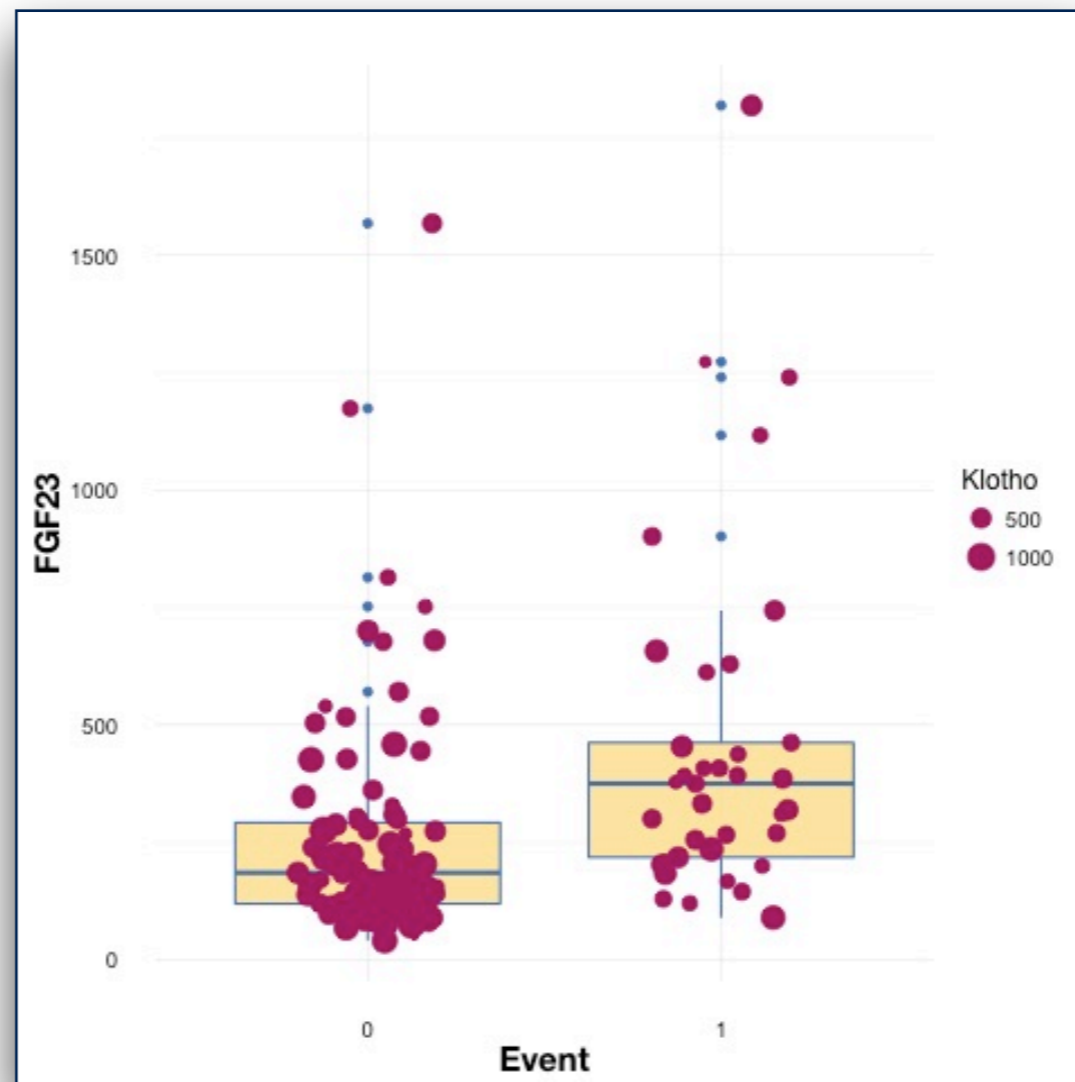
$p=0,01$



$p=0,007$

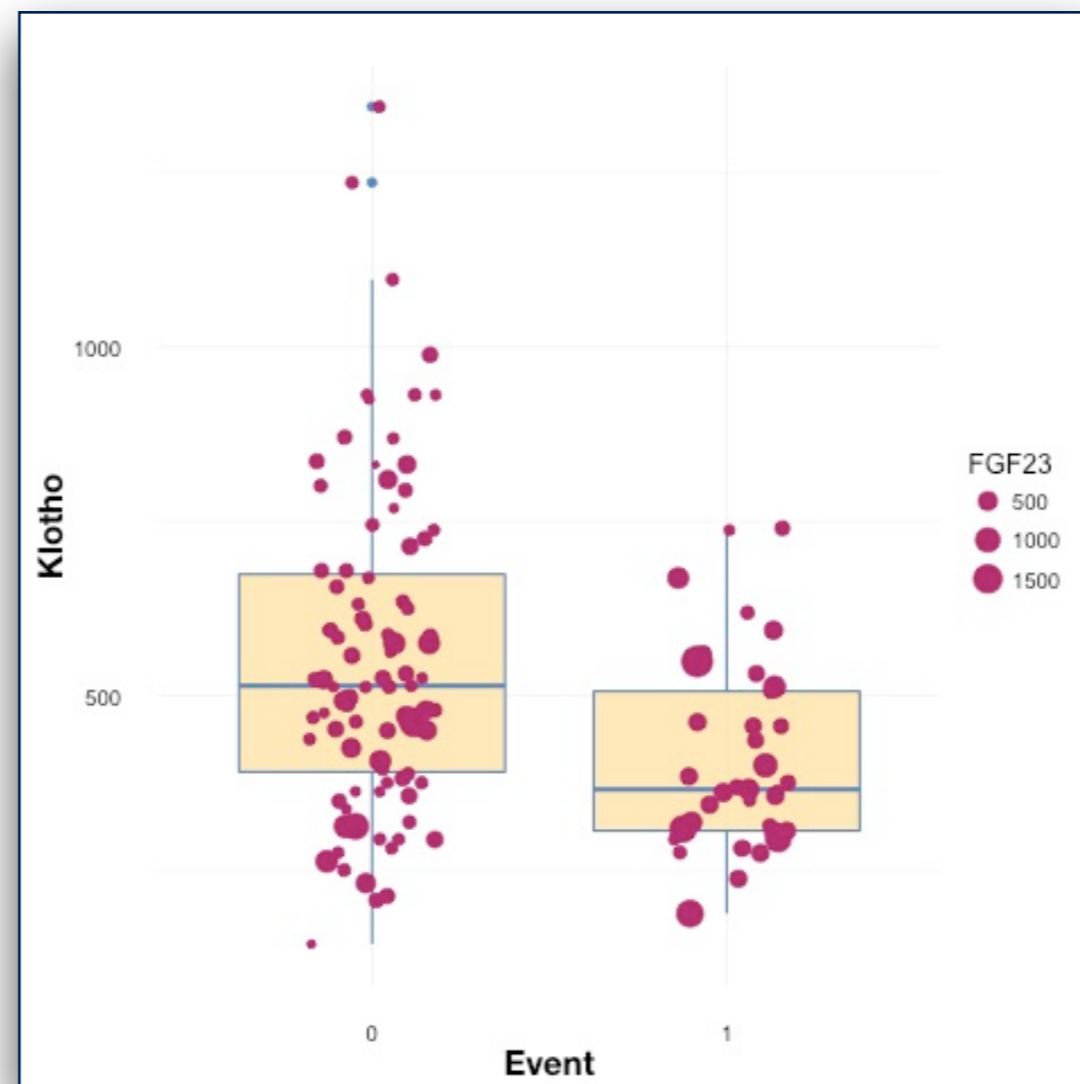
## Αποτελέσματα (9)

- 📌 Η διαφορά ανάμεσα στους μέσους όρους των επιπέδων του FGF23 σε σχέση με την ένταξη σε ΘΥ και τον θάνατο (event) ήταν σημαντική ( $p=0,01$ )



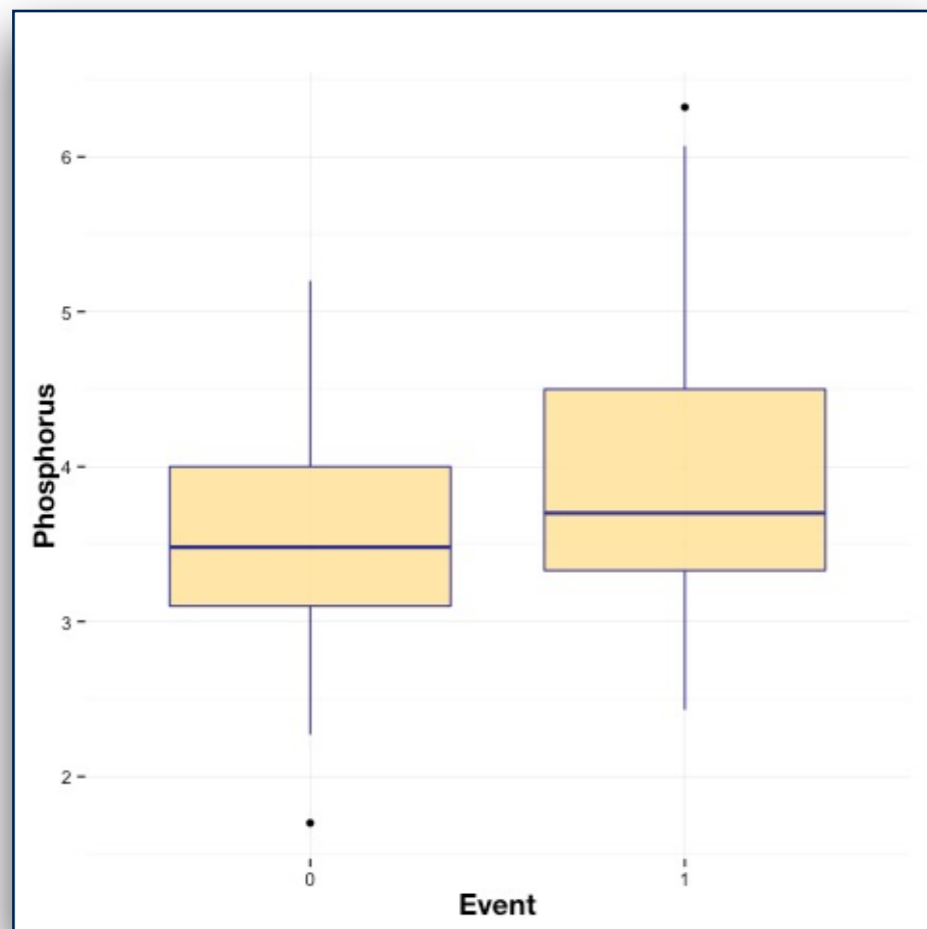
## Αποτελέσματα (10)

📌 Η διαφορά ανάμεσα στους μέσους όρους των επιπέδων της Κλωθούς σε σχέση με την ένταξη σε ΘΥ και τον θάνατο (event) ήταν σημαντική ( $p=0,01$ )

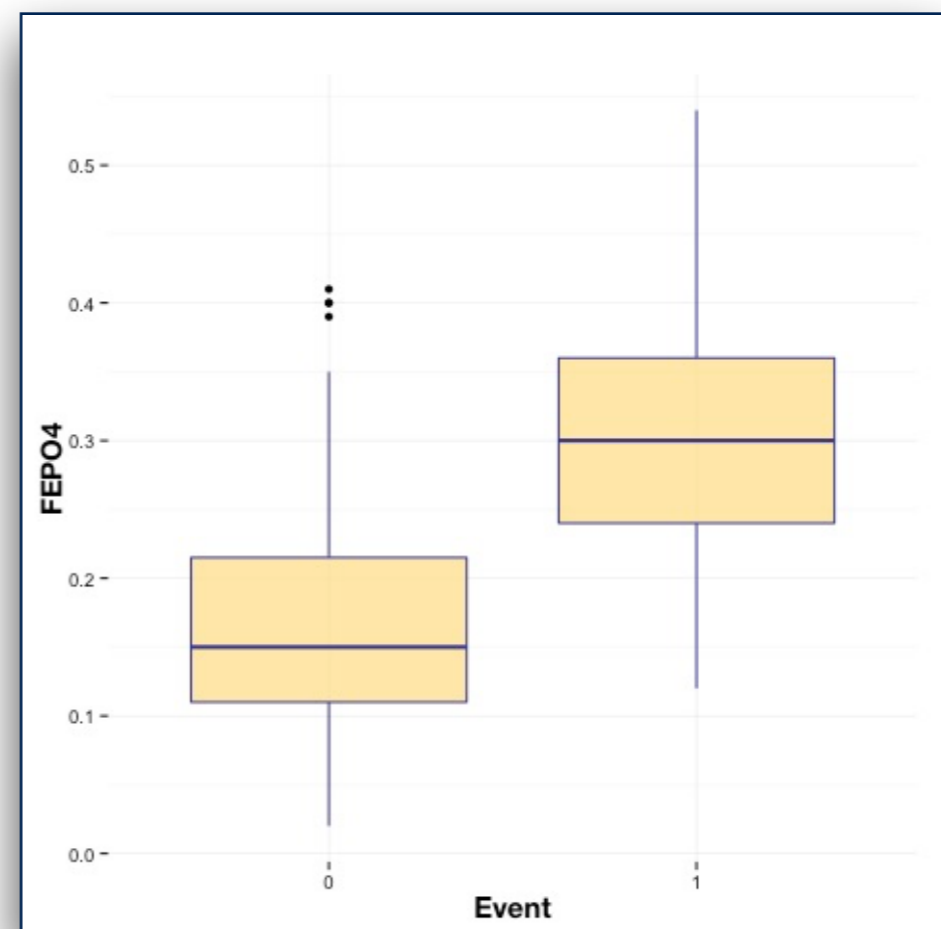


## Αποτελέσματα (11α)

📌 Παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στους μέσους όρους των επιπέδων και άλλων παραμέτρων του οστικού μεταβολισμού σε σχέση με την ένταση σε ΘΥ και τον θάνατο (event)



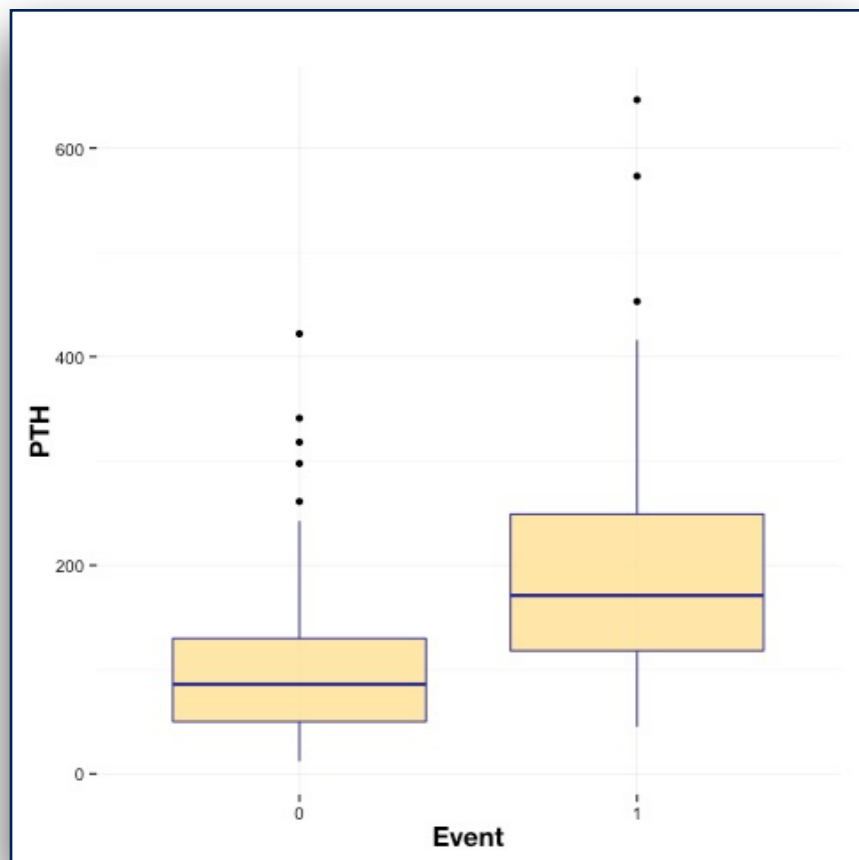
$p=0,01$



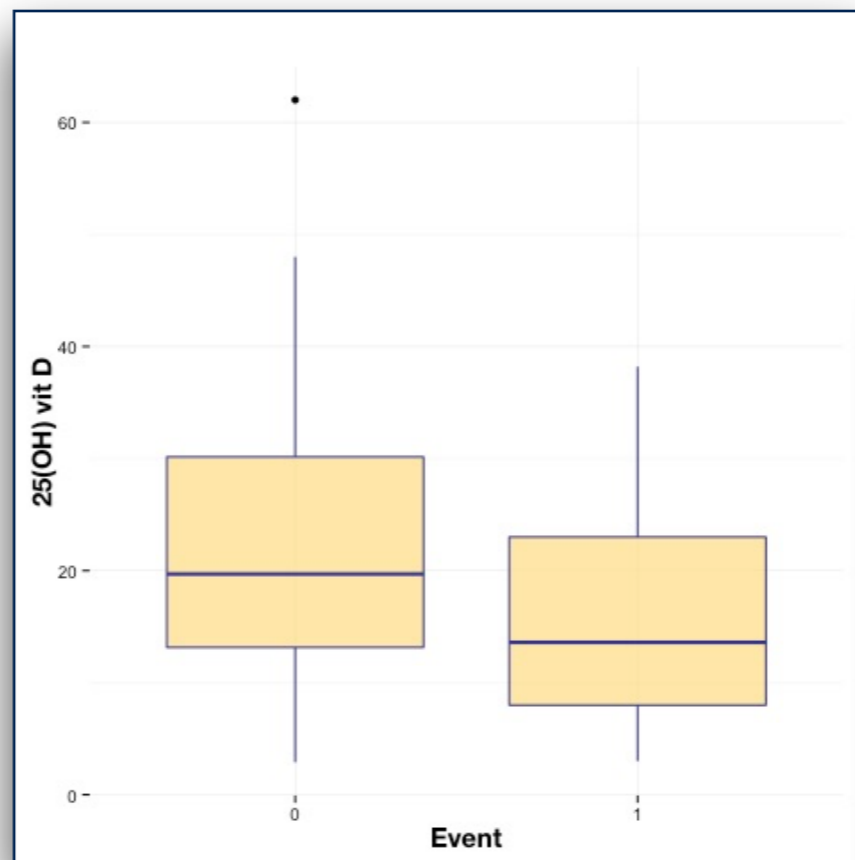
$p<0,0001$

# Αποτελέσματα (11β)

📌 Παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στους μέσους όρους των επιπέδων και άλλων παραμέτρων του οστικού μεταβολισμού σε σχέση με την ένταση σε ΘΥ και τον θάνατο (event)

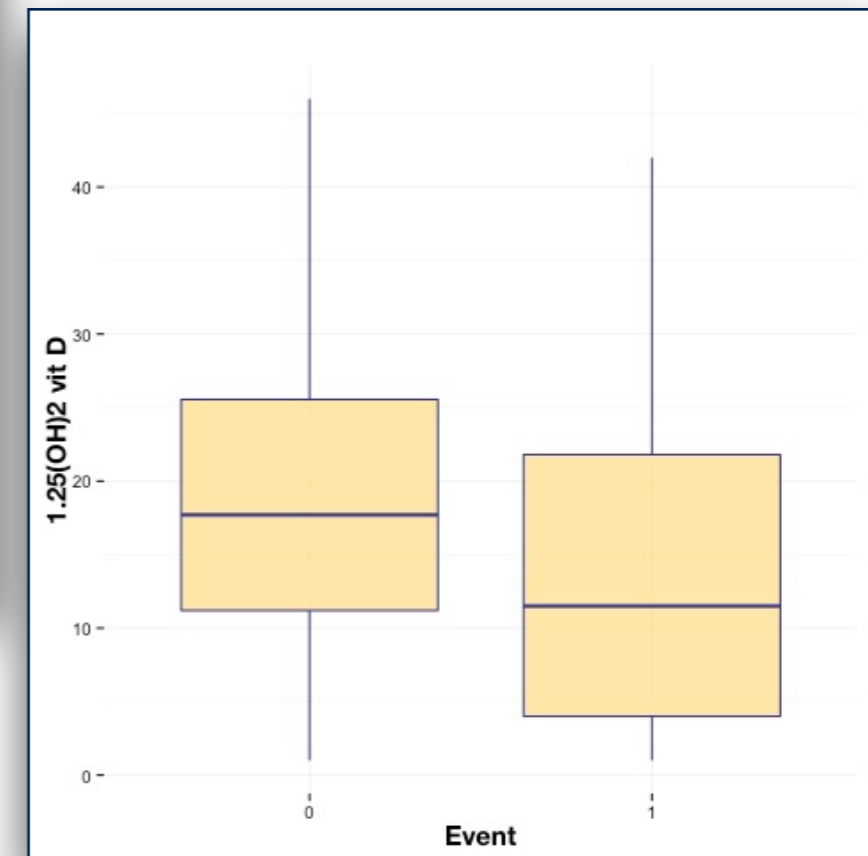


$p=0,006$



$p=0,006$

$p=0,009$



## Αποτελέσματα (12)

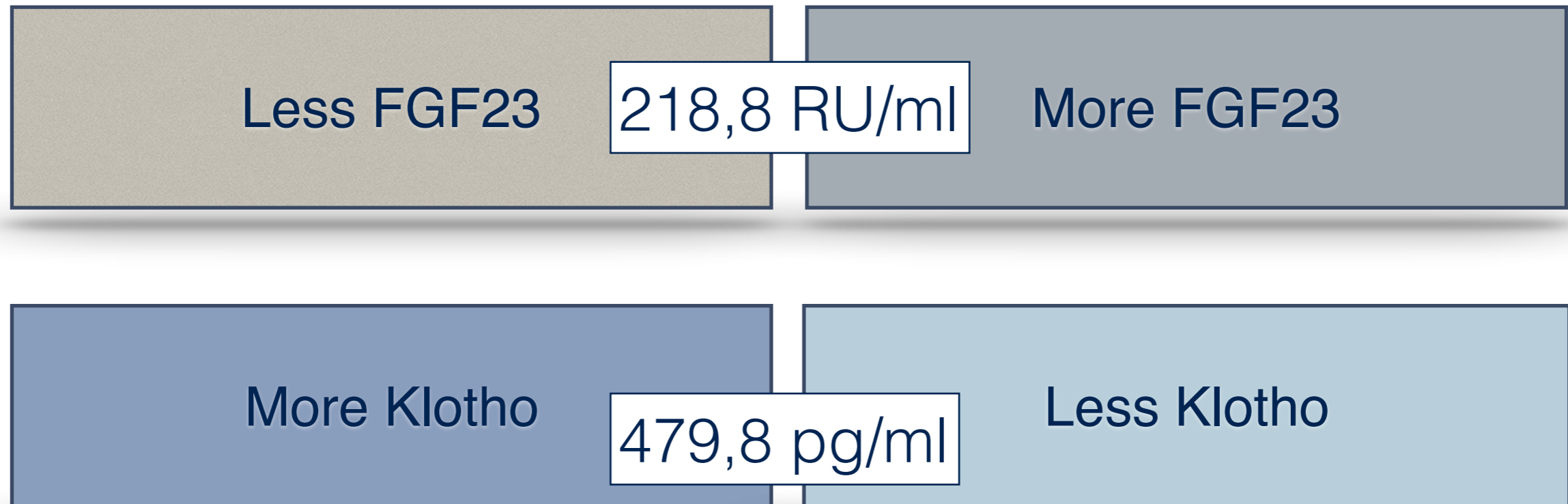
📌 Η ανάλυση της παλίνδρομης συσχέτισης (logistic regression) έδειξε ότι εκτός από τους κλασικούς παράγοντες συσχέτισης της ΧΝΝ με το τελικό στάδιο (mGFR και αιμοσφαιρίνη (Hb)) ο FGF23, η Κλωθώ, καθώς και ο Ρ ορού και η κλασματική απέκκρισή του στα ούρα σχετίζονταν επίσης σημαντικά με την έκβαση των ασθενών (event)

Παράμετροι	p
FGF23	0,002
Κλωθώ	0,0009
Ρ ορού	0,02
Κλασματική απέκκριση του Ρ	0,001
mGFR	0,002
Hb	0,007

## Αποτελέσματα (13α)

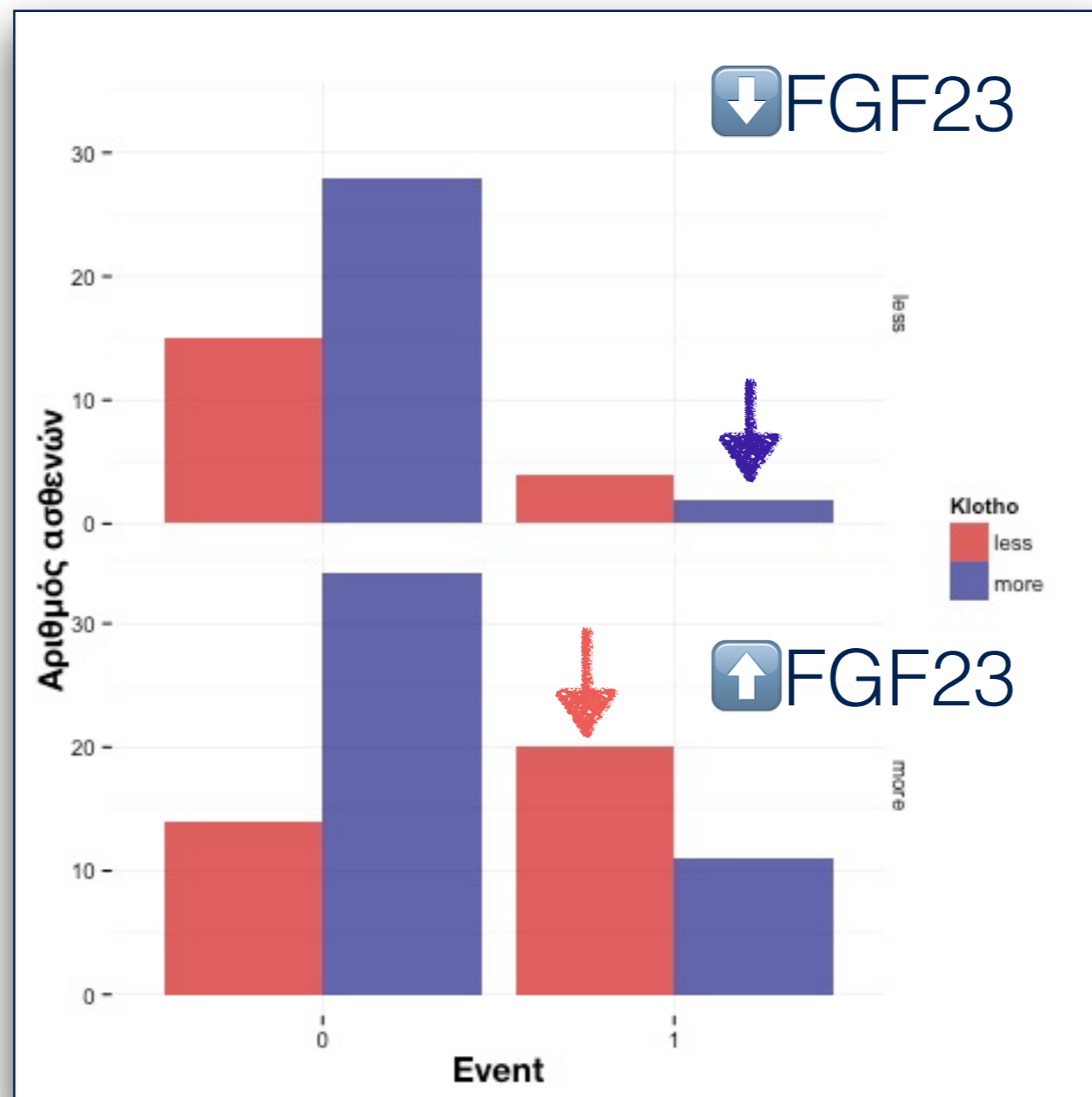
📌 Οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σε 4 διαφορετικές ομάδες με βάση τη διάμεση τιμή (less, more) του FGF23 και της Κλωθούς

📌 Οι ομάδες αυτές ήταν οι εξής: 1.Less FGF23-More Klotho, 2.Less FGF23-Less Klotho, 3.More FGF23-More Klotho, 4.More FGF23-Less Klotho



## Αποτελέσματα (13β)

📌 Διάγραμμα που δείχνει την κατανομή του καταληκτικού σημείου (event) στις 4 ομάδες (FGF23/Klotho), σε απόλυτο αριθμό ασθενών





## Αποτελέσματα (13γ)

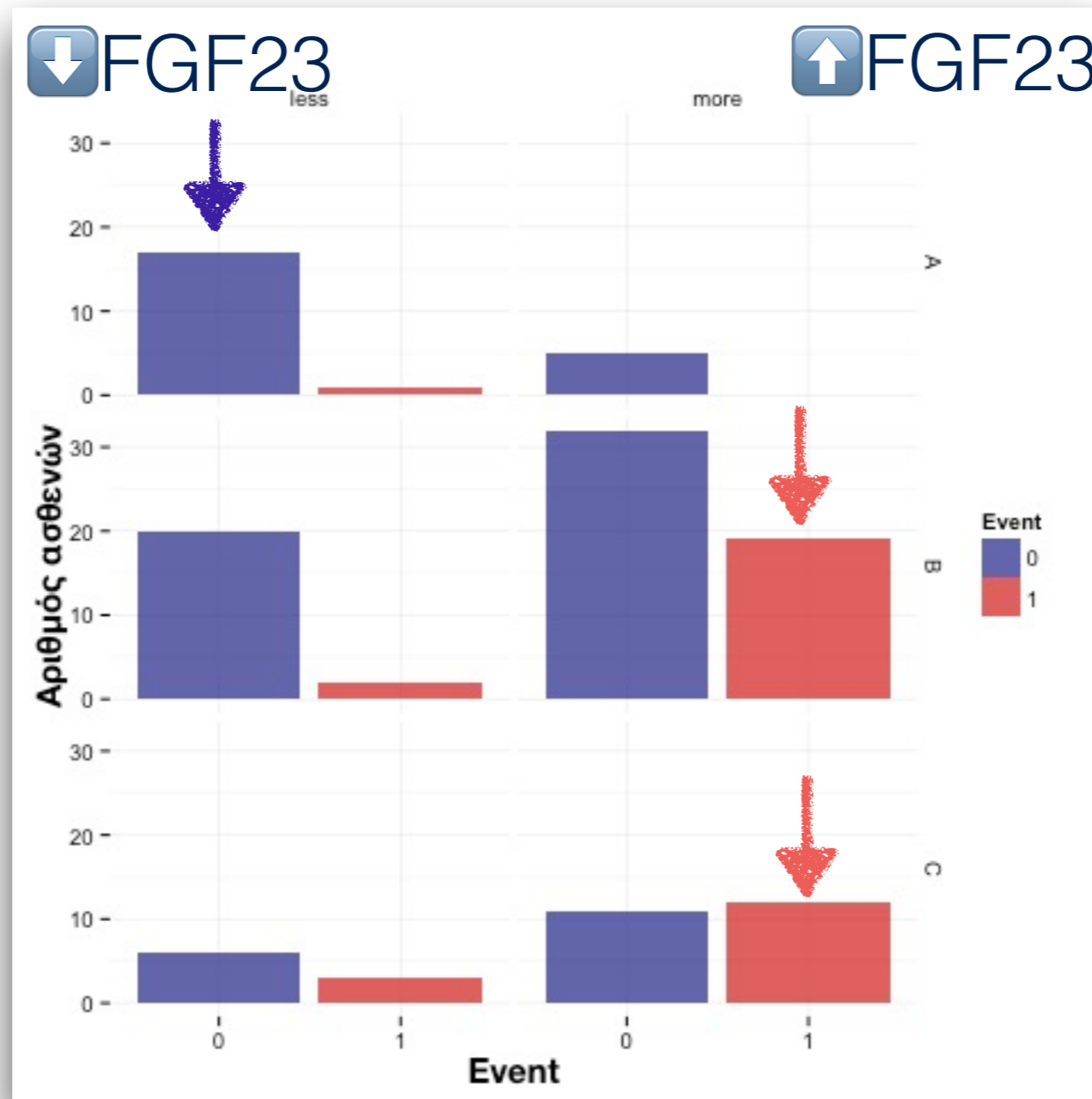
📌 Πίνακας που δείχνει τον αριθμό και τα ποσοστά των ασθενών, ως προς το καταληκτικό σημείο, στις 4 ομάδες με βάση τη διάμεση τιμή του FGF23 και της Κλωθούς

Test for independence of all factors:  
Chisq = 24.12, df = 4, p-value = 0.05

		Klotho less		Klotho more	
Event	FGF23	less	more	less	more
0		15	14	28	34
1		4	20	2	11
		19	34	30	45
0		78,95%	41,18%	93,33%	75,56%
1		21,05%	58,82%	6,67%	24,44%

## Αποτελέσματα (13δ)

📌 Διάγραμμα που δείχνει την κατανομή του καταληκτικού σημείου (event) στα 3 regression groups, σε απόλυτο αριθμό ασθενών



## Αποτελέσματα (13ε)

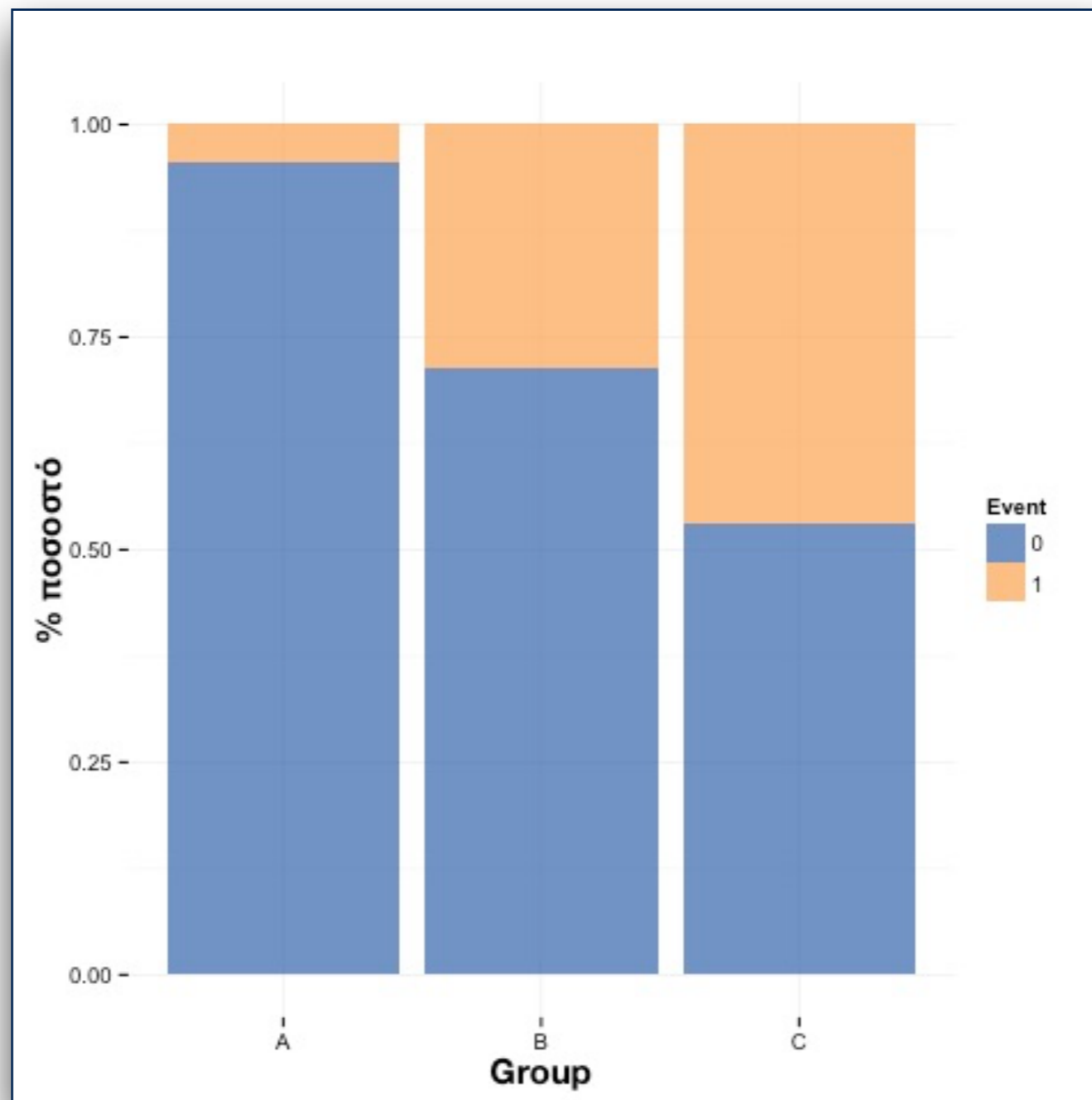
📌 Πίνακας που δείχνει τον αριθμό και τα ποσοστά των ασθενών, ως προς το καταληκτικό σημείο, στα 3 regression groups

Test for independence of all factors:  
 $\text{Chisq} = 41.87$ ,  $\text{df} = 7$ ,  $\text{p-value} = 0.005$

Event	FGF23	Group A		Group B		Klotho C	
		less	more	less	more	less	more
0		17	5	20	32	6	11
1		1	0	2	19	3	12
		18	5	22	51	9	23
0		94,44%	100,00%	90,91%	62,75%	66,67%	47,83%
1		5,56%	0,00%	9,09%	37,25%	33,33%	52,17%

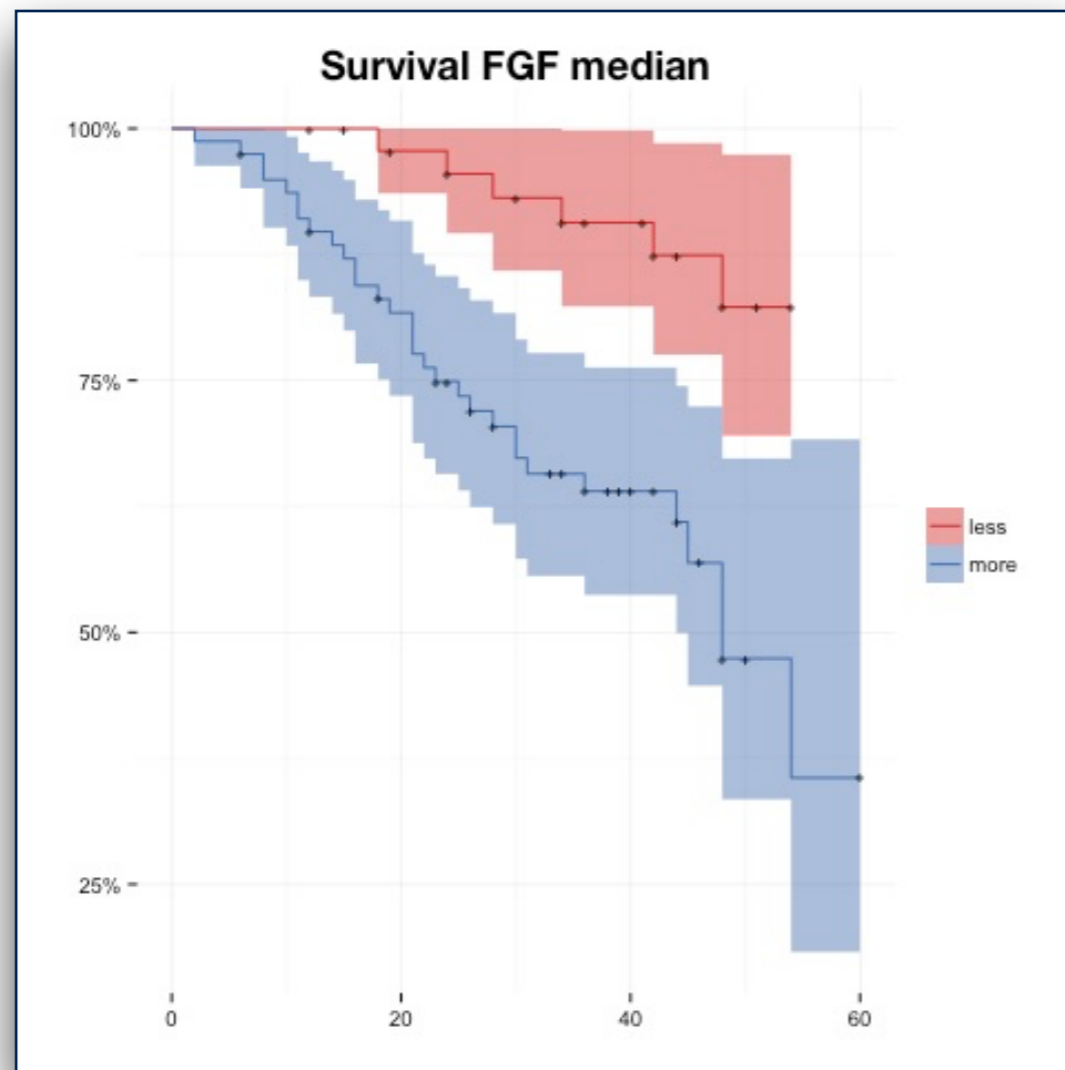
## Αποτελέσματα (13στ)

- 📌 Διάγραμμα που δείχνει την κατανομή του καταληκτικού σημείου (event) στα 3 regression groups ( $p=0,002$ )

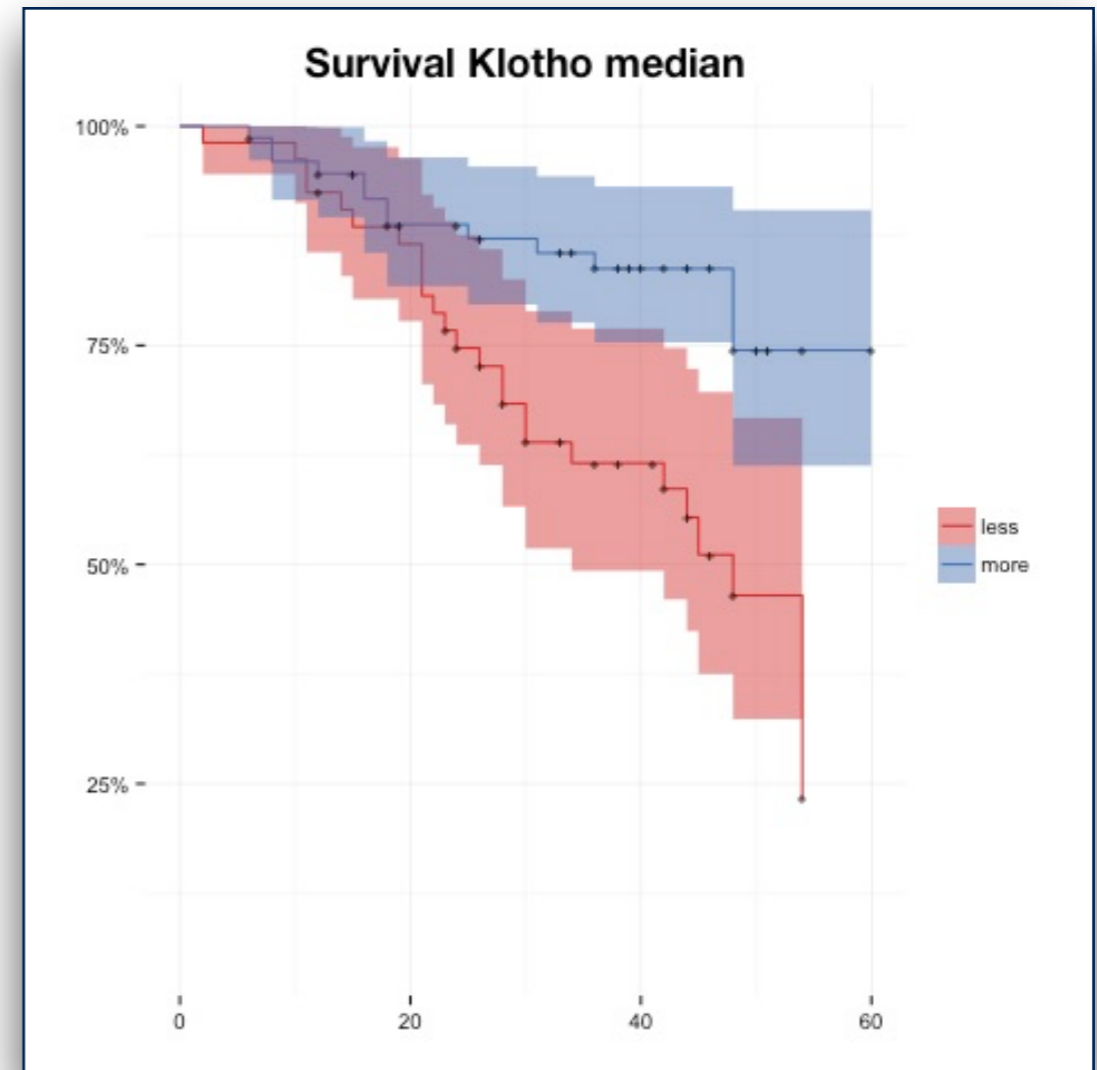


## Αποτελέσματα (14α)

📌 Οι καμπύλες επιβίωσης (Kaplan-Meier) έδειξαν σημαντική διαφορά, ως προς το καταληκτικό σημείο, μεταξύ των ασθενών που είχαν επίπεδα FGF23 και Κλωθούς μικρότερα ή μεγαλύτερα από τη διάμεση τιμή των 2 παραμέτρων



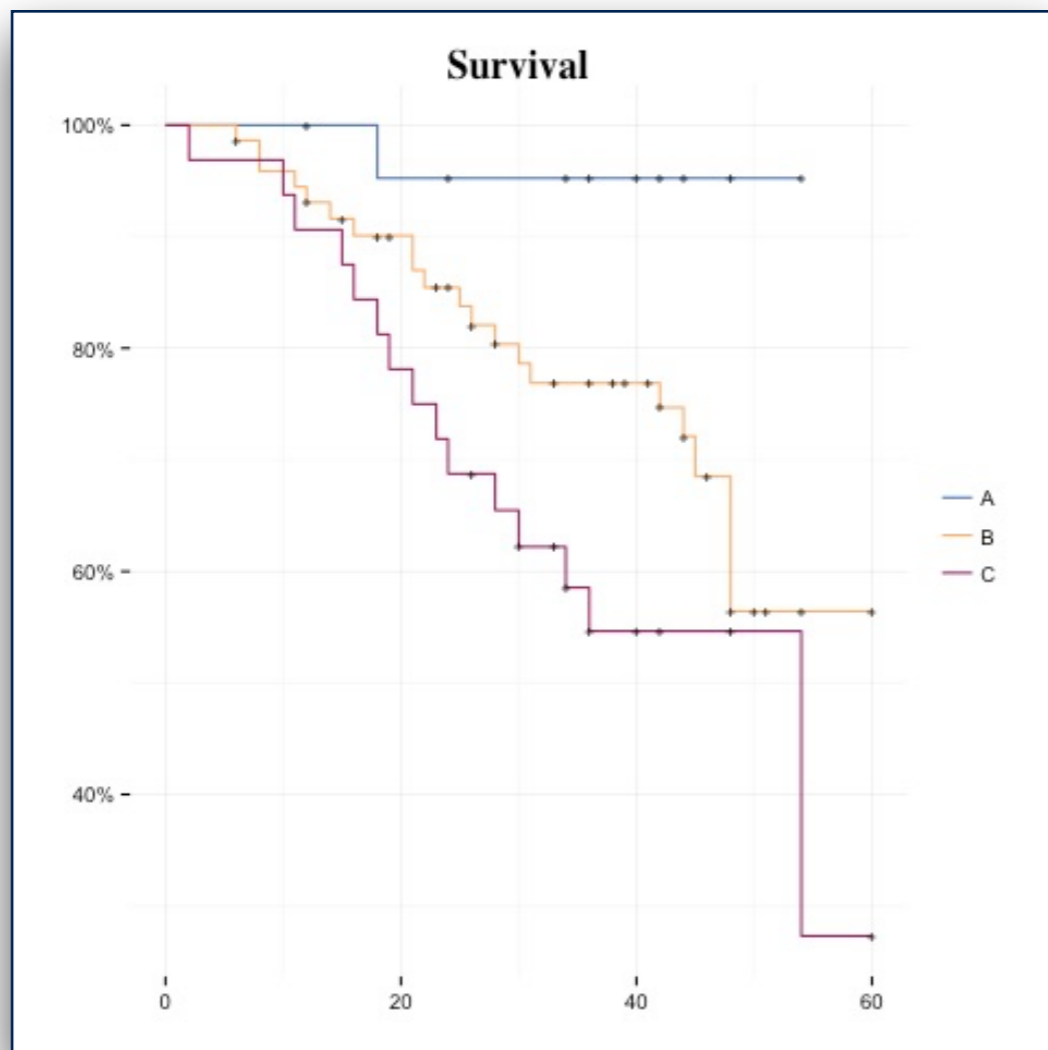
$p=0,0004$



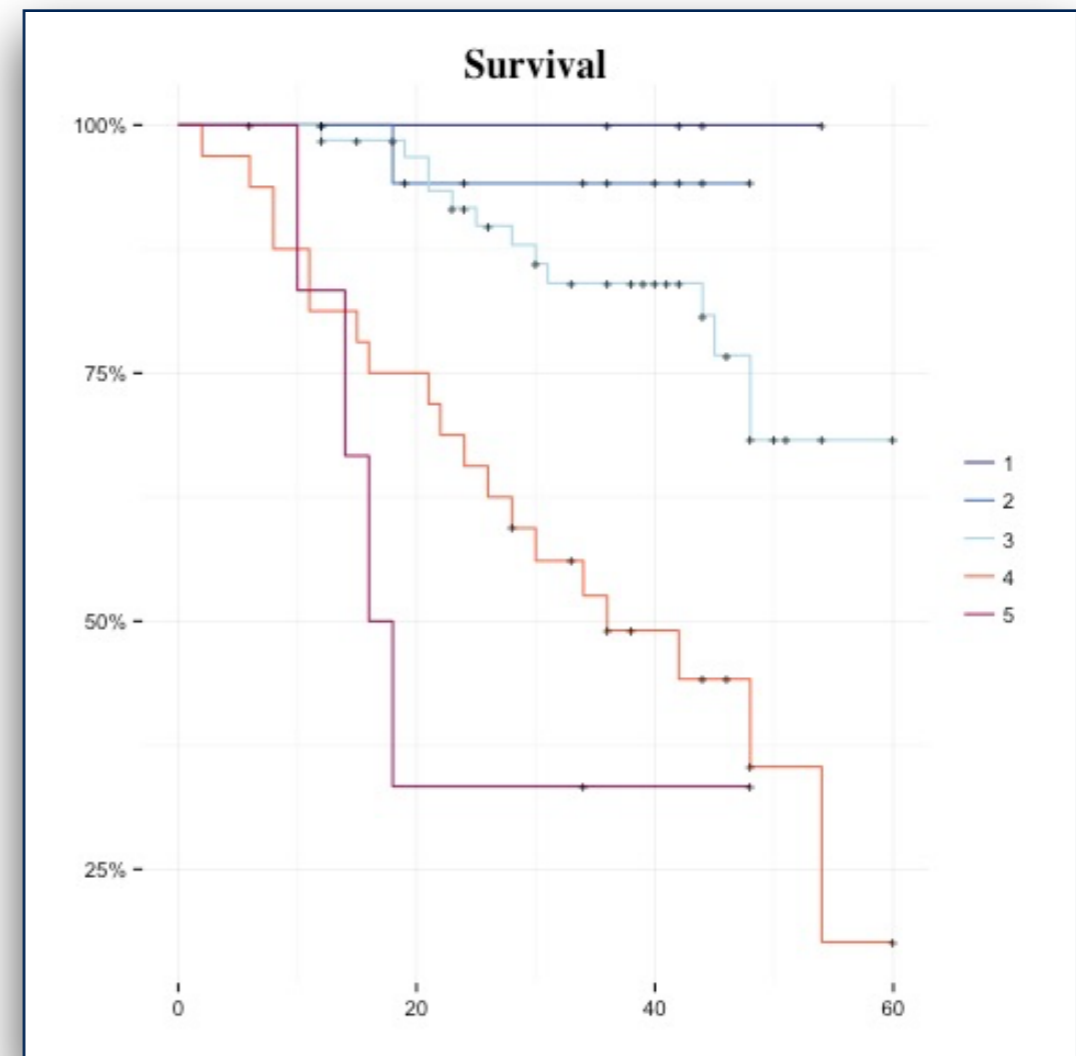
$p=0,001$

## Αποτελέσματα (14β)

- 📌 Οι καμπύλες επιβίωσης (Kaplan-Meier) έδειξαν σημαντική διαφορά, ως προς το καταληκτικό σημείο, μεταξύ των 5 σταδίων της XNN και των 3 regression groups



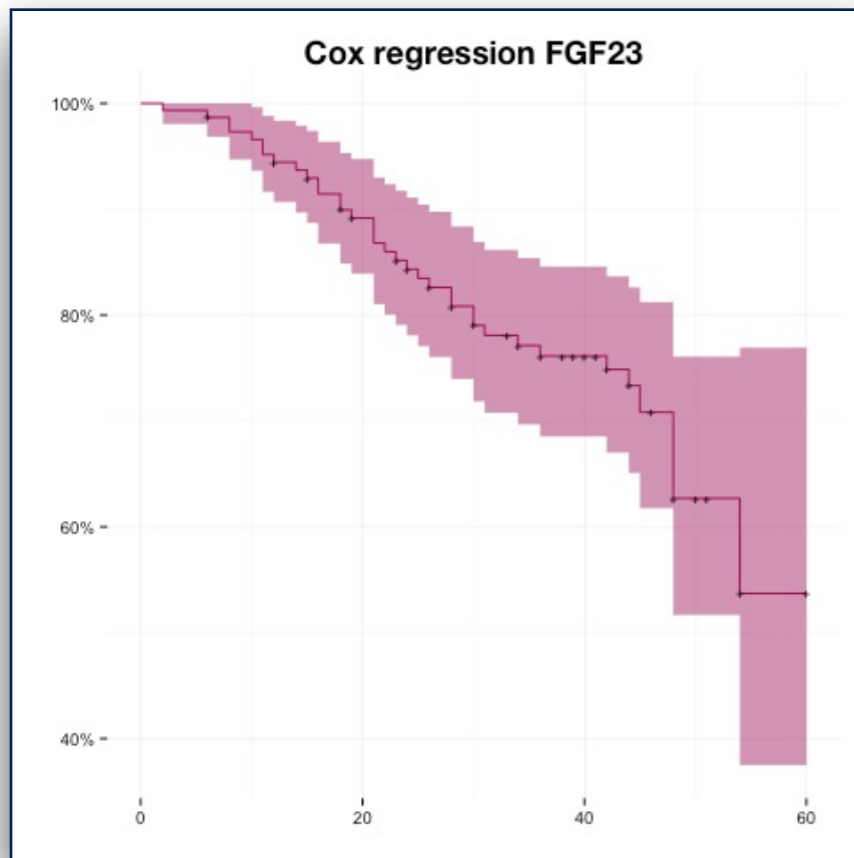
$p=0,008$



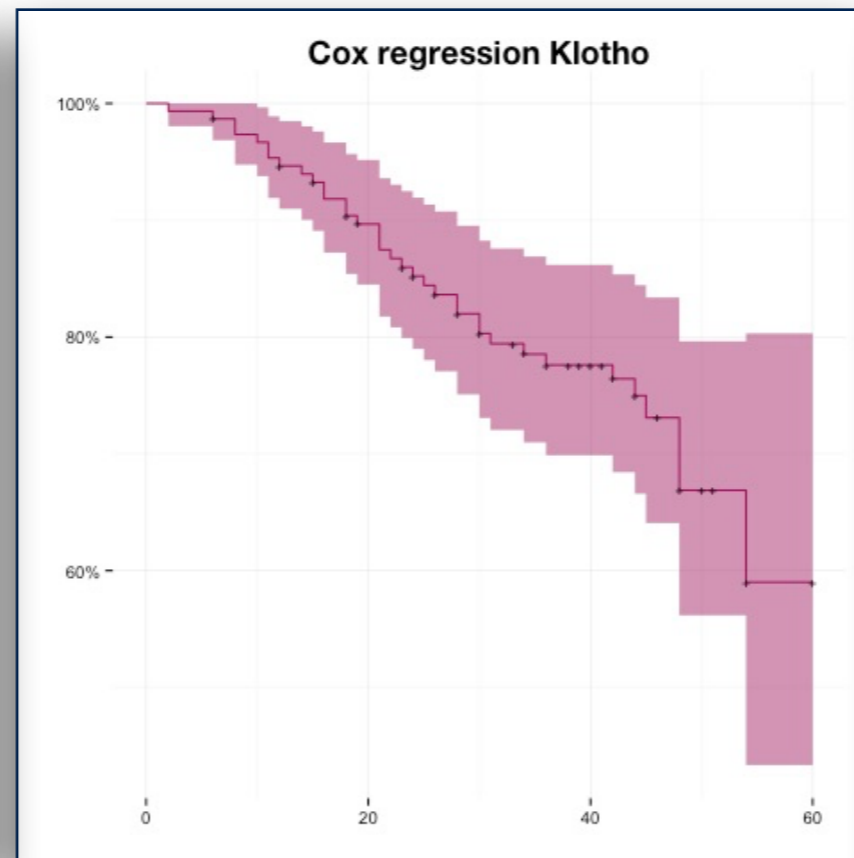
$p=0,008$

## Αποτελέσματα (15α)

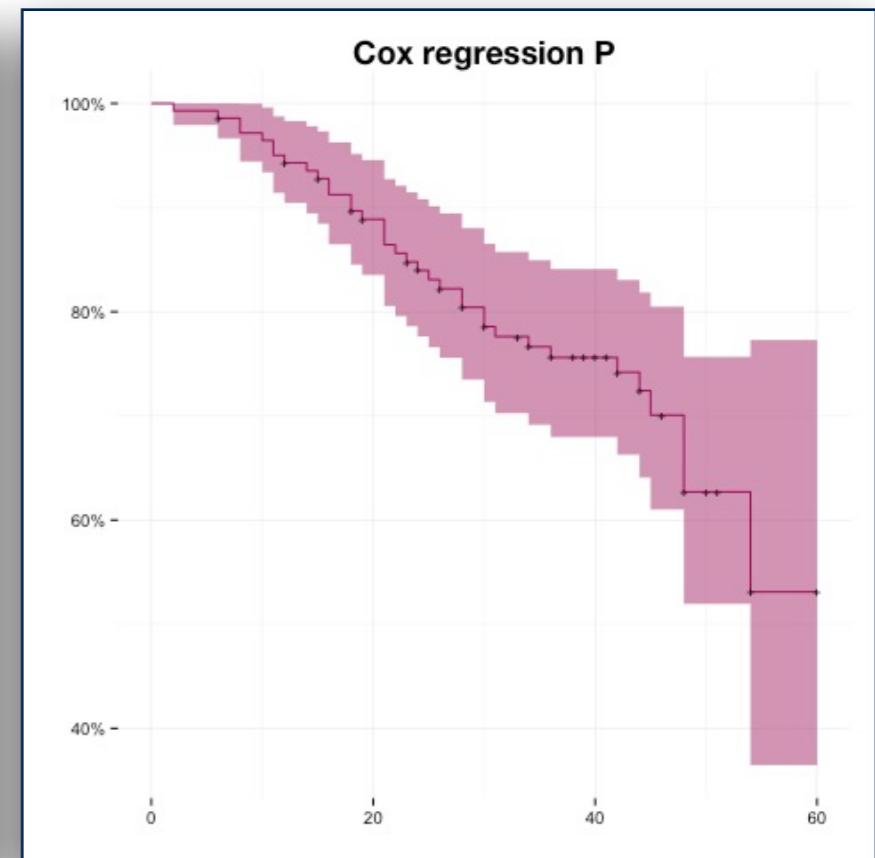
📌 Η Cox regression ανάλυση επίσης επιβεβαίωσε τη σημαντική διαφορά, ως προς το καταληκτικό σημείο, με βάση τα επίπεδα του FGF23, της Κλωθούς και του P



$p=0,0006$










$p=0,001$



$p=0,007$

## Αποτελέσματα (15β)

 Η προσθήκη συν-μεταβλητών (covariates) στην Cox regression έδειξε ότι κυρίως ο FGF23 και οριακά η Κλωθώ παρέμειναν ανεξάρτητοι παράγοντες που συμβάλλουν στην έκβαση των ασθενών προς το καταληκτικό σημείο

-  Λόγος της διαμέτρου της μέσης προς εκείνης των ισχίων (waist to hip ratio)
-  Λευκωματινουρία
-  Ρ ορού
-  1,25 (OH)<sub>2</sub> vit D
-  Παρουσία σακχαρώδη διαβήτη
-  Παρουσία καρδιαγγειακής νόσου

 FGF23:  $p=0,008$

 Κλωθώ:  $p=0,05$

log rank test  $p=0,006$

log rank test  $p=0,02$



## Συζήτηση (1)

📌 Κατά την εξέλιξη της ΧΝΝ από το στάδιο 1 στο στάδιο 5 παρατηρείται σταδιακή αύξηση των επιπέδων του FGF23 και παράλληλη μείωση των επιπέδων της Κλωθούς, γεγονός που συνηγορεί για τον σημαντικό ρόλο του άξονα FGF23-Κλωθούς στη ΧΝΝ

📌 Η αντιστρόφως ανάλογη σχέση των 2 βιοδεικτών εξηγεί ως έναν βαθμό τις αντίθετες δράσεις τους στην εξέλιξη της ΧΝΝ

## Συζήτηση (2)

- 📌 Οι συσχετίσεις του P με αυτούς τους βιοδείκτες (FGF23 και Κλωθώ) επιβεβαιώνεται με πολλούς τρόπους και είναι ενδεικτική της αλληλένδετης σχέσης τους με τον μεταβολισμό του P στη ΧΝΝ
- 📌 Τα επίπεδα της νεφρικής λειτουργίας, με βάση τον ρυθμό σπειραματικής διήθησης, και ο P του ορού φαίνεται ότι μπορούν να κατανείμουν τους ασθενείς σε 3 σαφώς διακριτές ομάδες που παρουσιάζουν, σε πολλά επίπεδα, σημαντική αντιστοιχία με τα 5 στάδια της ΧΝΝ
- 📌 Η Κλωθώ και σε μικρότερο βαθμό ο FGF23 διαφέρουν σημαντικά ανάμεσα στις 3 παραπάνω ομάδες

## Συζήτηση (3)

📌 Τόσο ο FGF23 όσο και η Κλωθώ φαίνεται να σχετίζονται με την έκβαση των ασθενών, κυρίως προς το τελικό στάδιο της ΧΝΝ, αλλά και προς τον θάνατο, με ισχυρότερη πιθανώς τη θέση του FGF23 σε αυτή τη συσχέτιση

📌 Η συμβολή και των 2 βιοδεικτών στην έκβαση των ασθενών παραμένει σημαντική, μετά την προσαρμογή των δεδομένων ως προς τον λόγο της διαμέτρου της μέσης προς εκείνης των ισχίων (ως δείκτη καρδιαγγειακού κινδύνου), τα επίπεδα της λευκωματινουρίας, του φωσφόρου, της  $1,25(\text{OH})_2 \text{ vit D}$ , την παρουσία σακχαρώδη διαβήτη και καρδιαγγειακής νόσου

## Συμπεράσματα

- 📌 Ο FGF23 και η πρωτεΐνη Κλωθώ αποτελούν 2 σημαντικούς βιοδείκτες που συμμετέχουν ενεργά τόσο στην παθογένεια, όσο και στην έκβαση της ίδιας της ΧΝΝ
- 📌 Οι διαταραχές τους και ιδιαίτερα τα υψηλά επίπεδα του FGF23 και τα χαμηλά της Κλωθούς σχετίζονται με χειρότερη έκβαση των ασθενών
- 📌 Στα στάδια 3-5 (τιμή  $mGFR < 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ), τιμές P στα ανώτερα φυσιολογικά όρια ( $\sim 4,1 \text{ mg/dl}$ ) φαίνεται να σχετίζονται με τη παρουσία ιδιαίτερα χαμηλών επιπέδων Κλωθούς, γεγονός που αφενός επιβεβαιώνει τη σχέση της τελευταίας με τον P και αφετέρου επηρεάζει δυσμενώς την έκβαση των ασθενών αυτών