

**Διατροφικά πρότυπα, αλληλεπίδραση
με γενετικούς παράγοντες σε οστικούς
δείκτες μεταβολισμού**



ΣΤΕΡΓΙΟΥ ΑΘΗΝΑ

ΑΜ: 21132

Επιβλέπων καθηγητής : Δεδούσης Γεώργιος

ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2016

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δεδούσης Γεώργιος, Καθηγητής Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας του Ανθρώπου

Γιαννακούλια Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Διατροφής και Διαιτητικής Συμπεριφοράς

Τσίγκος Κωνσταντίνος, Καθηγητής Διατροφής και Μεταβολισμού

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Γεώργιο Δεδούση, για την ανάθεση του θέματος της πτυχιακής μου εργασίας, καθώς και την κ. Έφη Γρηγορίου, διότι χωρίς την ουσιαστική βοήθεια της δεν θα ήταν εφικτή η ολοκλήρωση της.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τους δικούς μου ανθρώπους που ήταν δίπλα μου όλο αυτό το διάστημα, με ιδιαίτερη αναφορά στη φίλη μου Μάγδα Τζούμα για την πολύτιμη στήριξή της.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	6
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
<i>A.1 ΟΣΤΙΤΗΣ ΙΣΤΟΣ</i>	8
A.1.1 ΣΥΣΤΑΣΗ	8
A.1.2 ΟΣΤΙΚΗ ΑΝΑΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ	9
A.1.3 ΟΣΤΙΚΗ ΜΑΖΑ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΖΩΗΣ	10
<i>A.2 ΤΟ ΠΡΟΒΛΗΜΑ ΤΗΣ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗΣ</i>	12
A.2.1 ΟΡΙΣΜΟΣ	12
A.2.2 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ	13
A.2.3 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗΣ	16
A.2.4 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗ	18
<i>A.3 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΧΕΣΗΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΜΕ ΤΗ ΣΚΕΛΕΤΙΚΗ ΥΓΕΙΑ</i>	23
A.3.1 ΕΞΕΤΑΖΟΝΤΑΣ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΑ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	23
A.3.2 ΕΞΕΤΑΖΟΝΤΑΣ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ	30
<i>A.4 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΧΕΣΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΜΕ ΤΗ ΣΚΕΛΕΤΙΚΗ ΥΓΕΙΑ</i>	33
A.4.1 ΜΕΛΕΤΩΝΤΑΣ ΤΟΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟ rs597319	35
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	37
B. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	38
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	48
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	56
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	61
Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	63

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός: Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι μια ολιστική πολυπαραγοντική προσέγγιση της οστικής μάζας, όπως αυτή αποτυπώνεται από τους δείκτες οστικής υπερηχοτομογραφίας στην πτέρνα, λαμβάνοντας υπόψη την επίδραση διατροφικών προτύπων και του πολυμορφισμού rs597319 καθώς και των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων.

Μεθοδολογία: Η παρούσα έρευνα αποτελεί μία συγχρονική επιδημιολογική μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 974 ενήλικες. Η έρευνα περιελάμβανε διατροφική αξιολόγηση μέσω της συμπλήρωσης έγκυρων ερωτηματολογίων συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων, αξιολόγηση επιπέδων φυσικής δραστηριότητας, ανθρωπομετρήσεις, λήψη ιατρικού ιστορικού, μέτρηση της οστικής πυκνότητας και αιμοληψίες. Για την αξιολόγηση της οστικής μάζας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της οστικής υπερηχομετρίας στην πτέρνα και υπολογίστηκαν οι δείκτες BUA (Broadband Ultrasound Attenuation) και SOS (Speed of Sound). Από τις αιμοληψίες απομονώθηκε DNA με σκοπό την ανίχνευση του πολυμορφισμού rs597319, καθώς επίσης έγινε προσδιορισμός διάφορων βιοχημικών δεικτών που σχετίζονται με τον μεταβολισμό των οστών. Μοντέλα απλής και πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης χρησιμοποιήθηκαν για την διερεύνηση των εξεταζόμενων σχέσεων και για τον έλεγχο πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ανεξάρτητων μεταβλητών. Για τον προσδιορισμό των διατροφικών προτύπων του δείγματος χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση σε κύριες συνιστώσες (PCA).

Αποτελέσματα: Από την PCA (principal component analysis) προέκυψαν 6 διατροφικά πρότυπα, που ερμηνεύουν το 52,24% της μεταβλητότητας. Τα πρότυπα είναι τα εξής: Λαχανικά, ρύζι, φρούτα, ψάρι (μαγειρεμένα και φρέσκα λαχανικά, ρύζι, φρέσκα φρούτα και ψάρι), Γρήγορο φαγητό (λευκό ψωμί και αρτοσκευάσματα, λιπαρό τυρί, επεξεργασμένο κρέας), Δυτικού τύπου διατροφή (κόκκινο κρέας, μακαρόνια, πατάτες, πουλερικά), Υγιεινή διατροφή (γάλα και γιαούρτι με χαμηλά λιπαρά, δημητριακά πρωινού, μη επεξεργασμένο ψωμί και αρτοσκευάσματα, τυρί με χαμηλά λιπαρά), Γλυκά (γαλακτώδη γλυκά, αμυλούχα γλυκά), Πλήρη γαλακτοκομικά (γάλα και γιαούρτι με όλα

τα λιπαρά, όσπρια). Κανένα από τα διατροφικά πρότυπα δεν συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με τους οστικούς δείκτες. Ο rs597319 συσχετίστηκε αρνητικά με τον δείκτη BUA ($b=-0,119$, $p=0,028$). Τέλος, από την μελέτη των αλληλεπιδράσεων φάνηκε ότι στους ετεροζυγώτες η μεγαλύτερη υιοθέτηση του διατροφικού προτύπου “γρήγορο φαγητό” φαίνεται ότι έχει θετική επίδραση στον δείκτη BUA, συγκρινόμενοι με τους ομοζυγώτες ως προς το αλληλόμορφο κινδύνου ($b= 6,026$, $p=0,034$).

Συμπεράσματα: Επιβεβαιώνεται μέσα από την παρούσα μελέτη η αρνητική επίδραση του πολυμορφισμού rs597319 στον δείκτη BUA, όπως αυτή είχε αναδειχθεί από την μετα-ανάλυση της σύμπραξης GEFOS/GENOMOS. Παρόλ' αυτά, περισσότερη έρευνα απαιτείται για την επιβεβαίωση τόσο μιας συνεργιστικής σχέσης της διατροφής με τον πολυμορφισμό όσο και του πιθανού μηχανισμού δράσης της.

ABSTRACT

Objective: The objective of the present study is an holistic multifactorial approach of bone mass, as it is described by the indices of Quantitative Ultrasound Method of the heel. The study examines the effect of dietary patterns and single nucleotide polymorphism (SNP) rs597319 in the indices, as well as the interactions between them.

Method: The current study was a cross-sectional survey conducted in 974 adults. The study included dietary assessment as it is derived by valid semi-quantitative food frequency questionnaire, evaluation of physical activity levels, anthropometric measures, medical history, measures of bone mineral density and blood tests. For the evaluation of bone mass, the method of Quantitative Ultrasound Method of the heel and the indices of BUA (Broadband Ultrasound Attenuation) and SOS (Speed of Sound) were calculated. From the blood tests, DNA was isolated for the detection of rs597319, as well as for the measurement of biochemical markers associated with bone metabolism. To investigate the examined relations, simple linear regression was performed and where there was statistical significance, multivariate analyses were conducted introducing potential confounders. Dietary patterns were derived by Principal Components Analysis (PCA).

Results: Principal components analysis identified 6 dietary patterns explaining 52,24% of the variance in food intake. The dietary patterns were: Vegetables, rice, fruits, fish (cooked and raw vegetables, rice, fresh fruits fish and legumes), Fast food (breads refined, full fat cheese, processed meat), Western diet (red meat, pasta, potatoes, poultry), Healthy diet (low fat milk and yogurt, breakfast cereal, breads non refined, low fat cheese), Sweets (milky sweets, starchy sweets), Full fat dairy (full fat milk and yogurt, legumes). None of these dietary patterns was significantly associated with bone indices. The rs597319 was negatively associated with BUA ($b=-0,119$, $p=0,028$). Finally, the study of interactions reveals that heterozygotes who had a greater adherence to dietary pattern “fast food” had a positive effect on BUA, when they are compared with homozygotes for risk allele ($b= 6,026$, $p=0,034$). 7

Conclusion: Through the present study, it is confirmed the negative effect of rs597319 in BUA for the greek population. This effect was revealed by the meta-analysis of GEFOS/GENOMOS consortium. However, more studies should be done in order to confirm a synergistic association between diet and the SNP and the potential mechanism of action.

Α.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Α.1 ΟΣΤΙΤΗΣ ΙΣΤΟΣ

Α.1.1 ΣΥΣΤΑΣΗ

Τα οστά αποτελούνται από τον στερεότερο τύπο συνδετικού ιστού του ανθρώπινου σώματος που λέγεται οστίτης ιστός. Αποτελούν το 12-15% του σωματικού βάρους στους ενήλικες και η σύσταση τους κατά προσέγγιση είναι: 70% μεταλλικά άλατα, 22% πρωτεΐνη και περίπου 8% νερό. Σε ότι αφορά την περιεκτικότητα των οστών σε μικροστοιχεία, ο σκελετός περιέχει το 99% του συνολικού ασβεστίου του σώματος, το 35% του νατρίου και περίπου το 60% του μαγνησίου [1].

Στο σύνολο του αποτελείται από: α) τρεις κύριους τύπους κυττάρων: τους οστεοβλάστες, τα οστεοκύτταρα και τους οστεοκλάστες β) από την θεμέλια εξωκυττάρια ουσία, η οποία με την σειρά της αποτελείται από i) την οργανική εξωκυττάρια ουσία, που ονομάζεται αλλιώς και οστεοειδές ii) από ανόργανα άλατα που εναποτίθενται στην εξωκυττάρια ουσία με την μορφή κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη $\text{Ca}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ [1].

Το οστεοειδές αποτελείται κυρίως από ίνες κολλαγόνου στις οποίες εναποτίθενται άλατα ασβεστίου και φωσφορικά άλατα, σε συνδυασμό με ιόντα υδροξυλίου σε μορφή κρυστάλλων υδροξυαπατίτη. Η ελαστικότητα του δικτύου που σχηματίζουν οι ίνες κολλαγόνου και η σταθερότητα του υδροξυαπατίτη συνδυάζονται για να δώσουν στο οστό τη μεγαλύτερη ισχύ του. Άλλα συστατικά της θεμέλιας ουσίας του οστού είναι η οστεοκαλσίνη, η οστεοποντίνη και πολλές άλλες πρωτεΐνες [2].

A.1.2 ΟΣΤΙΚΗ ΑΝΑΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ

Η οστική διαμόρφωση και αναδιαμόρφωση είναι τα τελικά κοινά κυτταρικά μονοπάτια κατά τα οποία όλοι οι παράγοντες επηρεάζουν την σύνθεση και δομή του οστού. Η οστική διαμόρφωση είναι η εναπόθεση οστού πάνω σε μια επιφάνεια χωρίς να έχει προηγηθεί οστική απορρόφηση. Η οστική διαμόρφωση λαμβάνει μέρος σε διαφορετικές τοποθεσίες και συμβαίνει κυρίως κατά την διάρκεια της ανάπτυξης. Είναι υπεύθυνη για τις αλλαγές στο μέγεθος και στο σχήμα των οστών [3].

Η αναδιαμόρφωση του οστού αποτελεί μια κυκλική διαδικασία κατά την οποία γίνεται πρώτα επαναρρόφηση του παλαιού οστού και στη συνέχεια εναπόθεση του νέου. Το 4% περίπου της συνολικής επιφάνειας των οστών συμμετέχει κάθε στιγμή στην αναδιαμόρφωση, καθώς ο οστίτης ιστός ανανεώνεται συνεχώς σε συγκεκριμένα σημεία σε όλη την έκταση του σκελετού.

Η αναδιαμόρφωση του οστού είναι μια διαδικασία κατά την οποία γίνεται συνεχής απορρόφηση οστού μέσω της δράσης των οστεοκλαστών και επανασηματισμός του μέσω της δράσης των οστεοβλαστών. Με τη δράση που ασκούν συγκεκριμένες ορμόνες και κυτταροκίνες, η δυναμική αυτή ανακατασκευή του οστίτη οστού έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία νέου, υγιούς οστίτη ιστού. Αρχικά, οι οστεοκλάστες απορροφούν ανόργανα στοιχεία και οργανικά συστατικά του οστού, σχηματίζοντας μικρές κοιλότητες στις επιφάνειες του, ενώ στη συνέχεια ακολουθεί ο σχηματισμός νέου οστίτη οστού. Η διαδικασία της απορρόφησης είναι ταχεία και ολοκληρώνεται μέσα σε λίγες μέρες, ενώ η πλήρωση των κοιλοτήτων αυτών από τους οστεοβλάστες είναι διαδικασία αργή (μπορεί να διαρκέσει από 3 έως 6 μήνες ή και περισσότερο από ένα χρόνο στα ηλικιωμένα άτομα).

Ο εκφυλισμός του σπογγώδους οστού παρατηρείται κυρίως μετά την εμμηνόπαυση, λόγω της αντιστάθμισης της δράσης των οστεοκλαστών. Στα υγιή νεαρά άτομα οι φάσεις της απορρόφησης και του σχηματισμού των οστών είναι στενά συνδεδεμένες, ενώ η οστική μάζα χαρακτηρίζεται από μηδενικό ισοζύγιο. Στα ηλικιωμένα άτομα, η απώλεια οστού περιλαμβάνει αποσύζευξη των δύο αυτών φάσεων

της διαμόρφωσης του οστού, με αύξηση της απορρόφησης σε σχέση με τον σχηματισμό με αποτέλεσμα την απώλεια οστού [2].

A.1.3 ΟΣΤΙΚΗ ΜΑΖΑ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΖΩΗΣ

Η οστική μάζα φτάνει τη μέγιστη τιμή της περίπου 10 χρόνια μετά την παύση της γραμμικής ανάπτυξης και ξεκινά να μειώνεται περίπου την τέταρτη δεκαετία της ζωής και υπολογίζεται ότι φτάνει στο μισό της μέγιστης τιμής της στην ηλικία των 80 ετών [4].

Χρονολογικά, η οστική μάζα παρουσιάζει μια ταχεία γραμμική αύξηση κατά τη διάρκεια της νηπιακής και εφηβικής ηλικίας και μέχρι το 15ο με 20ο έτος οπότε και ολοκληρώνεται η τελείωση των οστών [5]. Στη φάση αυτή υπάρχει υπεροχή της δράσης των οστεοβλαστών έναντι των οστεοκλαστών και η οστική παραγωγή προηγείται της οστικής απορρόφησης [6]. Η ανάπτυξη ολοκληρώνεται στα κορίτσια κατά το 16ο με 18ο έτος και στα αγόρια κατά το 18ο με 20ο έτος της ηλικίας τους [7]. Η οστική μάζα συνεχίζει να αυξάνεται με εναπόθεση νέων στοιβάδων οστίτη ιστού. Στη φάση αυτή η οστεοβλαστική δραστηριότητα υπερέρχει της οστεοκλαστικής [8]. Η αύξηση της οστικής μάζας σταματάει όταν έχει επιτευχθεί η μέγιστη οστική μάζα [7, 9].

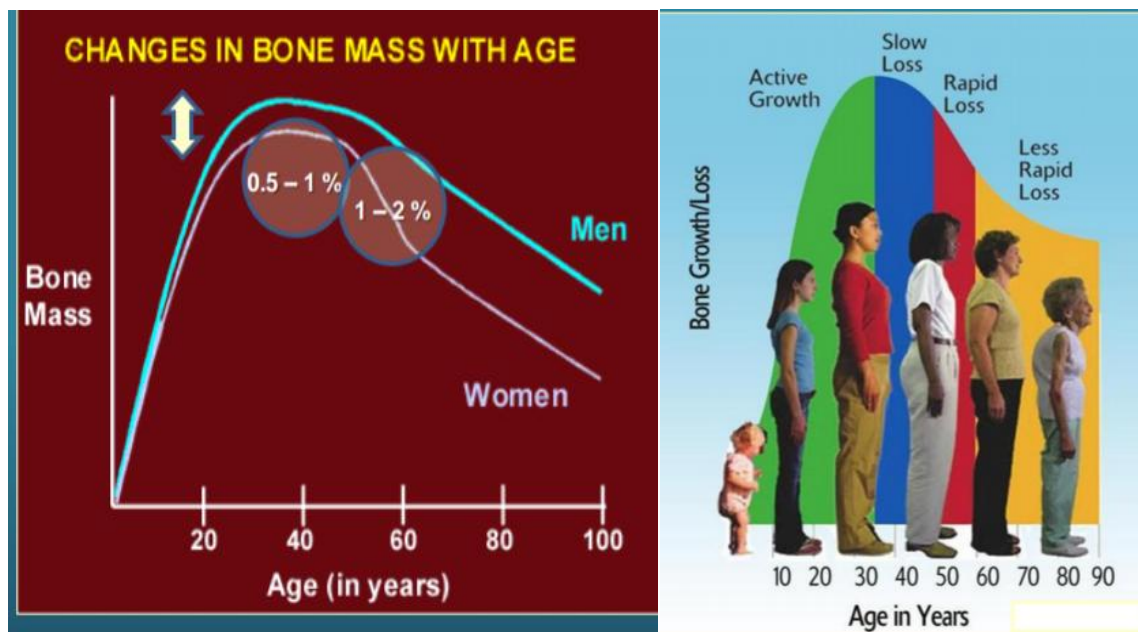
Μέγιστη ή κορυφαία οστική μάζα (peak bone mass) είναι η μέγιστη κατά τη διάρκεια της ζωής επιτυγχανόμενη οστική πυκνότητα. Η χρονική διάρκεια που επιτυγχάνεται η μέγιστη οστική πυκνότητα εξαρτάται από γενετικούς, φυλετικούς και ορμονικούς παράγοντες. Στην Ελλάδα η μέγιστη οστική πυκνότητα βρέθηκε ότι επιτυγχάνεται στους άντρες στο 30ο και στις γυναίκες στο 25ο έτος της ηλικίας τους [9].

Μετά την επίτευξη της μέγιστης τιμής της, η οστική μάζα παραμένει σταθερή για χρόνια και στη συνέχεια αρχίζει να ελαττώνεται [10]. Στους άνδρες παρατηρείται μείωση της οστικής πυκνότητας κατά 4% ανά δεκαετία από τη τρίτη δεκαετία της ζωής τους. Στις γυναίκες δεν παρατηρείται μείωση της οστικής πυκνότητας μέχρι την εμμηνόπαυση. Με την εγκατάσταση της εμμηνόπαυσης χάνουν οστό με ένα σχετικά γρήγορο ρυθμό που

κυμαίνεται από 0,5-1,5% / χρόνο [9, 11]. Η γρήγορη αυτή απώλεια συνεχίζεται για 5-10 χρόνια μετά την εμμηνόπαυση και σταδιακά αυτοπεριορίζεται [11]. Μετά το 65ο έτος της ηλικίας ο ρυθμός οστικής απώλειας δε διαφέρει ιδιαίτερα ανάμεσα στα δύο φύλα [11].

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι στην ενήλικη ζωή η οστική μάζα σε κάθε χρονική στιγμή εξαρτάται από τη μέγιστη οστική μάζα που έχει επιτύχει ο οργανισμός και το ρυθμό της απώλειας που ακολουθεί. Στην **εικόνα 1Α** φαίνεται η πορεία της οστικής μάζας κατά τη διάρκεια της ζωής.

Εικόνα Α1: Πορεία οστικής μάζας κατά τη διάρκεια της ζωής



A.2 ΤΟ ΠΡΟΒΛΗΜΑ ΤΗΣ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗΣ

A.2.1 ΟΡΙΣΜΟΣ

Η οστεοπόρωση είναι ένα συστηματικό νόσημα που χαρακτηρίζεται από χαμηλή οστική αντοχή και επιδείνωση της μικρο-αρχιτεκτονικής οστικής δομής, με συνέπεια την αυξημένη ευθραυστότητα των οστών και την πρόκληση αναίτιων καταγμάτων [12-13]. Η οστική αντοχή αντανακλά μαζί τα δύο κύρια χαρακτηριστικά, την οστική ποιότητα και την οστική πυκνότητα[13].

Η οστεοπόρωση στα πρώτα στάδια της συνήθως δεν διαγιγνώσκεται και παραμένει ασυμπτωματική. Δεν εκδηλώνεται κλινικά παρά μόνο όταν προκύψουν κατάγματα [14].

Εικόνα Α2: *Εικόνα αλλοίωσης στο εσωτερικό των οστών*



A.2.2 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

Παγκοσμίως η μέθοδος της απορροφησιομετρίας διπλοενεργειακής δέσμης ακτίνων X (Dual-energy X-ray Absorptiometry, DXA) θεωρείται η μέθοδος εκλογής για την μέτρηση της οστικής πυκνότητας και κατατάσσεται με τη μέθοδο της ογκομετρικής ποσοτικής υπολογιστικής τομογραφίας (Volumetric Quantitative Computed Tomography vQCT) στις πρωτεύουσες μεθόδους [εικόνα A3] [9].

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, το κριτήριο για τη διάγνωση της οστεοπόρωσης είναι η οστική πυκνότητα να είναι μικρότερη από 2,5 σταθερές αποκλίσεις (standard deviations, SD) από τη μέση τιμή νεαρών γυναικών (T-score) μετρημένη με τη μέθοδο διπλής απορροφησιομετρίας ακτίνων X (DXA). Τα κριτήρια αυτά αναφέρονται σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες Καυκάσιας φυλής [Πίνακας A1] [15]. Όσον αφορά τους άνδρες, για άνδρες ηλικίας >65 ετών τα κριτήρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διάγνωση της οστεοπόρωσης. Για άνδρες 50-65 ετών απαιτείται ο προσδιορισμός και άλλων παραγόντων καταγματικού κινδύνου[16-17]. Ενώ για προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, καθώς και για άνδρες <50 ετών που έχουν επιτύχει την κορυφαία οστική μάζα προτείνεται η χρησιμοποίηση του Z-score. Το αποτέλεσμα των μετρήσεων θεωρείται “μέσα στο αναμενόμενο για την ηλικία” αν ο εξεταζόμενος έχει τιμές Z-score μεγαλύτερες του 2 και “κατώτερο του αναμενομένου για την ηλικία” αν είναι μικρότερες του -2 [14].

Εικόνα A3: Αναπαράσταση μέτρησης οστικής πυκνότητας με DEXA



Πίνακας Α1: Διαγνωστικά κριτήρια για τη διάγνωση της οστεοπόρωσης.

Διαγνωστική κατηγορία	Μέτρηση οστικής πυκνότητας
Φυσιολογική	T-score > -1SD
Οστεοπενία	-1SD $\geq$ T-score > -2.5SD
Οστεοπόρωση	T-score $\leq$ -2.5SD
Εγκατεστημένη οστεοπόρωση	T-score $\leq$ -2.5SD + 1 τουλάχιστον κάταγμα ευθραυστότητας

Παρόλο που η μέθοδος της DXA χρησιμοποιείται ευρέως τόσο σε κλινικό όσο και σε ερευνητικό επίπεδο έχει κάποιους σημαντικούς περιορισμούς: α) η εκτίμηση της οστικής πυκνότητας μπορεί να μεταβάλλεται αρκετά από το μέγεθος του οστού, επειδή αναλογεί σε δισδιάστατη προβολή του οστού ενώ οι αποκλίσεις της τρίτης διάστασης αγνοούνται. Η δυνητική αυτή αιτία συστηματικών λαθών θα μπορούσε να φανεί σημαντική όταν συγκρίνονται άτομα με διαφορετικό σωματότυπο. β) δεν παρέχονται πληροφορίες για την γεωμετρική κατανομή του φλοιώδους και του σπογγώδους ιστού ούτε για τη σύνθεση και γ) οι μετρήσεις επηρεάζονται από την σύνθεση των μαλακών ιστών που περιβάλλουν το οστό [18].

Αν και η BMD αποτελεί τον κύριο προγνωστικό παράγοντα για κίνδυνο οστεοπορωτικού κατάγματος, η μέτρηση της ποσοτικής υπερηχοτομογραφίας (QUS) έχει βρεθεί πρόσφατα ότι μπορεί να δώσει επιπλέον πληροφορίες για τον κίνδυνο κατάγματος [19]. Η ποσοτική υπερηχοτομογραφία είναι μια τεχνική εύκολα εφαρμόσιμη, οικονομική, με ικανοποιητική διαθεσιμότητα, ενώ τα μηχανήματα είναι μικρά, μεταφέρονται εύκολα και δεν χρησιμοποιούν ιονίζουσα ακτινοβολία [19-20].

Η μέθοδος QUS παρέχει πληροφορίες που αφορούν τη μέση τιμή οστικής πυκνότητας (BMD), καθώς και το QUS T-score, δηλαδή τις σταθερές αποκλίσεις από τις οποίες διαφέρει η BMD του εξεταζομένου από τη BMD υγιών ατόμων αναφοράς. Επίσης προκύπτουν οι παράμετροι της ταχύτητας μετάδοσης του ήχου (SOS) και της

εξασθένησης της δέσμης ηχητικών κυμάτων (BUA). Η ταχύτητα μετάδοσης του ήχου αναφέρεται στη διαίρεση του χρόνου μετάδοσης των ηχητικών κυμάτων προς το μήκος του οστού που μελετάται. Η μονάδα μέτρησης εκφράζεται σε m/s. Η εξασθένηση της δέσμης ηχητικών κυμάτων έχει μονάδα μέτρησης το dB/MHz ενώ φαίνεται ότι εκτιμά κατά προσέγγιση τον κίνδυνο κατάγματος. Τόσο η BUA όσο και η SOS φαίνεται ότι σχετίζονται άμεσα με την ποσότητα της οστικής μάζας (Bone Mineral Content, BMC) όσο και την BMD και έμμεσα με στοιχεία αρχιτεκτονικής και μηχανικών ιδιοτήτων των οστών (παράμετρος BUA), την ελαστικότητα και ακαμψία (παράμετρος SOS), παράγοντες που εκτιμούν ως ένα σημείο την μηχανική αντοχή και την αστοχία υλικού. [14, 21]. Τέλος, μπορεί να παρέχεται ο δείκτης ακαμψίας (Stiffness Index, SI) που βασίζεται στην BUA και SOS και ο οποίος σχετίζεται με τον καταγματικό κίνδυνο [14, 22].

Ο International Osteoporosis Foundation (IOF) συνιστά να εφαρμόζεται η μέθοδος στη πτέρνα [εικόνα A4] και να χρησιμοποιείται για την εκτίμηση του κινδύνου κατάγματος αλλά όχι για την κατάταξη των ασθενών σε φυσιολογικούς, οστεοπενικούς και οστεοπορωτικούς, αλλά σε χαμηλού (QUS T-score ≥ 0), μέσου (>-1 QUS T-score <0) και υψηλού κινδύνου κατάγματος (QUS T-score ≤ -1) [14, 22].

Εικόνα A4: Μέθοδος ποσοτικής υπερηχοτομογραφίας στην πτέρνα



A.2.3 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗΣ

Σε Ευρωπαϊκό και Παγκόσμιο Επίπεδο

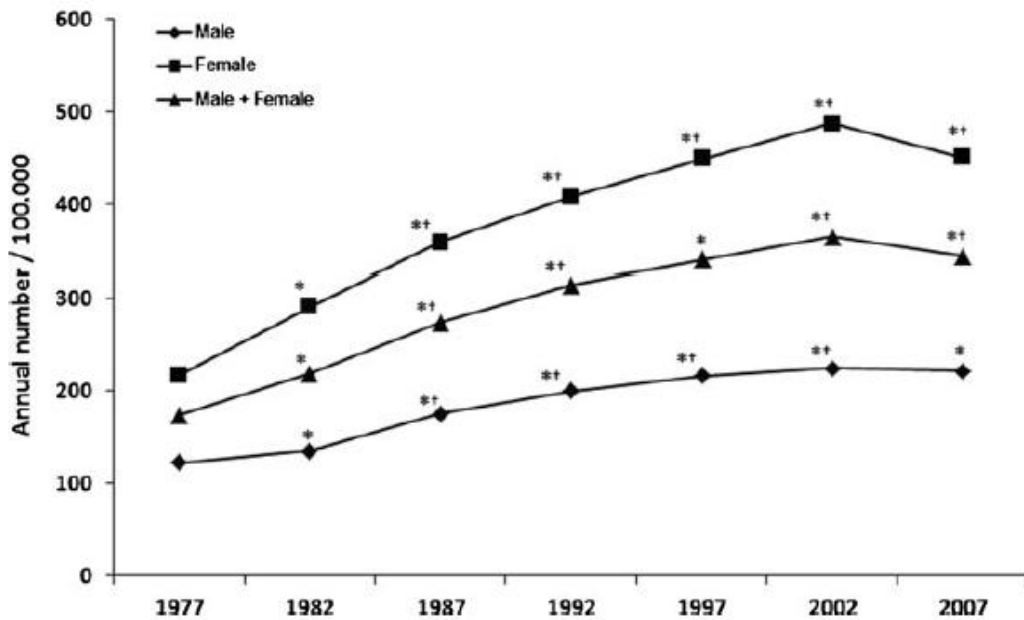
Η οστεοπόρωση επηρεάζει εκατοντάδες χιλιάδες άτομα σε παγκόσμιο επίπεδο και κυρίως τις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες [23]. Τα επιδημιολογικά δεδομένα δείχνουν ότι 1 στις 3 γυναίκες και 1 στους 5 άνδρες πάνω από την ηλικία των 50 ετών θα υποστούν οστεοπορωτικό κάταγμα [24]. Σύμφωνα με τα διαγνωστικά κριτήρια του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, περίπου το 6% των ανδρών και το 21% των γυναικών ηλικίας 50-84 έχουν οστεοπόρωση επηρεάζοντας 27,6 εκ. άνδρες και γυναίκες στην Ευρώπη το 2010. Η οστεοπόρωση προκαλεί πάνω από 8,9 εκ. κατάγματα ετησίως εκ των οποίων το 1/3 αυτών συμβαίνουν στην Ευρώπη [25].

Ο παγκόσμιος πληθυσμός άνω των 65 ετών προβλέπεται να διπλασιαστεί από 506 εκ. που ήταν το 2008 σε 1,3 δις το 2040, 14% του συνολικού παγκόσμιου πληθυσμού. Λόγω των δημογραφικών αλλαγών σχετικά με την ηλικιακή δομή του πληθυσμού ο αριθμός των ατόμων με οστεοπόρωση θα αυξηθεί από 27,5 εκ. που ήταν το 2010 σε 33,9 εκ. το 2025. Ο αριθμός των καταγμάτων αναμένεται να αυξηθεί από 3,5 εκ. το 2010 σε 4,5 εκ. το 2025 [14, 23]

Στην Ελλάδα

Όσον αφορά τα κατάγματα ισχίου στην Ελλάδα υπάρχουν επιδημιολογικά δεδομένα που καταγράφονται και αναλύονται στατιστικά από το 1977 και ανά πενταετία [διάγραμμα A1].

διάγραμμα Α1: Συχνότητα καταγμάτων ισχίου στην Ελλάδα από το 1977 και ανά 5-ετία



Το 2007, 14.055 ασθενείς ηλικίας άνω των 50 ετών υπέστησαν κάταγμα ισχίου: 9.850 (70,1%) γυναίκες και 4.205 (29,9%) άνδρες. Σε σύγκριση με το 1977 που τα κατάγματα του ισχίου ήταν 5.100 παρουσιάζεται αύξηση της τάξεως του 175,5%.

Η σχέση γυναίκες/άνδρες στο σύνολο των καταγμάτων είναι 2,47. Ειδικότερα όσον αφορά τις τρεις ηλικιακές ομάδες διαπιστώνεται ότι άνδρες και γυναίκες ηλικίας 50-69 ετών εμφανίζουν σχεδόν σταθερή επίπτωση των καταγμάτων του ισχίου στο χρονικό διάστημα παρατήρησης των 25 ετών. Η επίπτωση των καταγμάτων του ισχίου στην ηλικιακή ομάδα 70-79 ετών μετά την ραγδαία αύξηση την οποία εμφάνισε την δεκαετία 1977-1987 δεν παρουσίασε ιδιαίτερη μεταβολή κατά το διάστημα 1987-2002. Τη μεγαλύτερη επιβάρυνση, όμως, παρουσιάζει η ομάδα των ατόμων ηλικίας μεγαλύτερης των 80 ετών, η οποία φέρει το κύριο βάρος της αύξησης της επίπτωσης των καταγμάτων του ισχίου στην Ελλάδα το 1977-2002. Συγκεκριμένα, το 48,12% των

ασθενών με κάταγμα ισχίου το έτος 2002 ήταν ηλικίας μεγαλύτερης των 80 ετών, ενώ αυτή η ηλικιακή ομάδα το 22,49% του συνόλου το έτος 1977.

Η προσαρμοσμένη με την ηλικία επίπτωση του κατάγματος ισχίου στην Ελλάδα την περίοδο 1977-2007, όπου $*p \leq 0.05$, στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με το 1977, $+ p \leq 0.05$ στατιστικά σημαντική διαφορά με την προηγούμενη μέτρηση [26].

A.2.4 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ ΟΣΤΕΟΠΩΡΩΣΗ

A.2.4.1 ΜΗ ΜΕΤΑΒΛΗΤΟΙ

ΦΥΛΟ

Η οστεοπόρωση τύπου I προσβάλλει κατά κύριο λόγο γυναίκες. Η αναλογία μεταξύ γυναικών είναι 6:1, αναλογία που μειώνεται σε 2:1 για την οστεοπόρωση τύπου II [1]. Αυτό μπορεί να ερμηνευτεί μερικώς από την χαμηλότερη κορυφαία οστική μάζα που επιτυγχάνουν οι γυναίκες και μερικώς από την απότομη πτώση στην παραγωγή των οιστρογόνων που βιώνουν μετά την εμμηνόπαυση [14, 27]. Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί, ότι οι άνδρες φαίνεται να έχουν μεγαλύτερα ποσοστά θνησιμότητας μετά από κάταγμα στο ισχίο σε σχέση με τις γυναίκες [28-29].

ΦΥΛΗ

Τα άτομα της Λευκής και Ασιατικής φυλής παρουσιάζουν περισσότερα οστεοπορωτικά κατάγματα συγκριτικά με τα άτομα της Μαύρης και της Ισπανόφωνης φυλής, τα οποία εμφανίζουν μεγαλύτερη οστική πυκνότητα [2, 30].

ΗΛΙΚΙΑ

Η πλειοψηφία των καταγμάτων ισχίου συμβαίνουν σε ανθρώπους ηλικίας 50ετών και πάνω. Αυτό οφείλεται μερικώς στην μείωση της οστικής πυκνότητας που συμβαίνει με την πάροδο της ηλικίας τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες. Αλλά η

ηλικία μπορεί να είναι και παράγοντας κινδύνου ανεξάρτητα της οστικής πυκνότητας [31-32].

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΗ

Η γενετική προδιάθεση υπολογίζεται πως καθορίζει το 50-85% της οστικής μάζας με πολυάριθμα γονίδια να την επηρεάζουν [33]. Αυτά φαίνεται πως ανάλογα με το φύλο, την ηλικία, το σωματικό βάρος του ατόμου εκφράζονται σε διαφορετικό βαθμό, επηρεάζοντας ανάλογα την οστική πυκνότητα [34].

A.2.4.2 ΜΕΤΑΒΛΗΤΟΙ

ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Η διατροφή φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην ανάπτυξη του οστού, την επίτευξη της γενετικά προκαθορισμένης μέγιστης οστικής μάζας όσο και στην επιτάχυνση ή καθυστέρηση της οστικής απώλειας. Πληθώρα θρεπτικών συστατικών όπως ασβέστιο, βιταμίνη D, μαγνήσιο, έχουν συσχετιστεί θετικά με την σκελετική υγεία ενώ άλλα δείχνουν να έχουν επιβαρυντική επίδραση σε αυτή, αυξάνοντας μακροπρόθεσμα τον κίνδυνο οστεοπόρωσης [35].

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΕΝΗ ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

Η ακινισία σε ποικίλους βαθμούς αποτελεί αιτία απώλειας οστικής μάζας. Η διατήρηση υγιών οστών απαιτεί την έκθεση των οστών σε εξωτερικές πιέσεις. Οι πιέσεις που ασκούνται στα οστά λόγω της σύσπασης των μυών και τη διατήρηση του σώματος σε όρθια θέση έναντι της έλξης της βαρύτητας, διεγείρουν τη λειτουργία των οστεοβλαστών. Τα οστά τα οποία δεν υποβάλλονται σε φυσιολογική χρήση χάνουν τη

μάζα τους με μεγάλη ταχύτητα. Τα άτομα που είναι αναγκασμένα σε κατάκλιση ή αυτά που δεν έχουν την ικανότητα της ελεύθερης κίνησης, διατρέχουν το μεγαλύτερο κίνδυνο. Η έλλειψη άσκησης και ο καθιστικός τρόπος ζωής που ακολουθείται για πολλά χρόνια, συμβάλλουν επίσης σημαντικά – αν και σε μικρότερο βαθμό – στην απώλεια οστικής μάζας [2].

ΔΕΙΚΤΗΣ ΜΑΖΑΣ ΣΩΜΑΤΟΣ

Ο χαμηλός δείκτης μάζας σώματος (ΔΜΣ) σχετίζεται με χαμηλότερη κορυφαία οστική μάζα και με αρνητική επίδραση στην οστική απώλεια. Αυτό μπορεί να είναι το αποτέλεσμα της μειωμένης περιφερικής παραγωγής οιστρογόνων από τον λιπώδη ιστό όσον αφορά τις γυναίκες, του χαμηλότερου μηχανικού φορτίου στον σκελετό και των μεταβολικών επιδράσεων στην σύσταση σώματος [36].

Μετα-ανάλυση δώδεκα προοπτικών μελετών με συνολικό αριθμό δείγματος 60.000 άντρες και γυναίκες, φανέρωσε πως ο χαμηλός ΔΜΣ αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης οστεοπορωτικών καταγμάτων. Συγκεκριμένα, άτομα με ΔΜΣ της τάξεως του 20 kg/m^2 διατρέχουν το διπλάσιο κίνδυνο εμφάνισης οστεοπορωτικών καταγμάτων σε σχέση με άτομα με ΔΜΣ 25 kg/m^2 ενώ άτομα με ΔΜΣ 30 kg/m^2 έχουν μόλις 17% λιγότερες πιθανότητες συγκριτικά με τα άτομα με ΔΜΣ 25 kg/m^2 [37].

ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΑΛΚΟΟΛ

Η αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ αναγνωρίζεται ευρέως ως αιτία δευτεροπαθούς οστεοπόρωσης, ειδικά στους άνδρες [38]. Η δράση του οινοπνεύματος στον οστικό μεταβολισμό οφείλεται στην επίδραση του στον μεταβολισμό της βιταμίνης D ή στην άμεση τοξική επίδραση του στα οστεοκύτταρα, ιδιαίτερα στους οστεοβλάστες [39]. Η αυξημένη κατανάλωση φαίνεται να συσχετίζεται με αυξημένο καταγματικό κίνδυνο και κίνδυνο κατάγματος του ισχίου. Οι επιδράσεις πιο μέτριων καταναλώσεων δε

θεωρούνται τοξικές για την σκελετική υγεία. Η οριακή πρόσληψη για τον αυξημένο κίνδυνο φαίνεται να είναι περίπου 100 g την εβδομάδα για τις γυναίκες, αλλά για τους άνδρες φαίνεται ότι είναι πιο ψηλά [38].

ΚΑΠΝΙΣΜΑ

Άτομα με ιστορικό καπνίσματος ή οι ενεργοί καπνιστές είναι σε αυξημένο κίνδυνο για κάθε τύπο κατάγματος, συγκρινόμενοι με τους μη καπνιστές. Ο κίνδυνος διαφαίνεται μεγαλύτερος στην περίπτωση του κατάγματος στο ισχίο[40]. Γυναίκες που καπνίζουν περισσότερα από 20 τσιγάρα την ημέρα θεωρούνται ότι έχουν αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση οστεοπόρωσης. Αυτό πιθανόν οφείλεται στο γεγονός ότι οι καπνίστριες είναι μικρότερου σωματικού βάρους, έχουν νωρίτερα εμμηνόπαυση, καταβολίζουν γρηγορότερα τα εξωγενώς χορηγούμενα οιστρογόνα και μάλλον το κάπνισμα έχει άμεση τοξική επίδραση στους οστεοβλάστες. Επομένως, ο κίνδυνος εμφάνισης οστεοπόρωσης είναι αυξημένος στους καπνιστές τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες [41].

ΚΑΦΕΪΝΗ

Μεγάλες προσλήψεις καφεΐνης (>8 ποτήρια καφέ/ημέρα) αυξάνουν ραγδαία την απέκκριση ασβεστίου στα ούρα. Αντίθετα, πρόσληψη 1- 2 φλιτζάνια καφέ την ημέρα, φαίνεται να επηρεάζει ελάχιστα το ισοζύγιο ασβεστίου. Η σχέση ανάμεσα στην πρόσληψη καφεΐνης και την απώλεια οστού οφείλεται ενδεχομένως σε μείωση της οστικής απορρόφησης ασβεστίου που προκαλείται στις περιπτώσεις αυτές, καθώς και στο ότι άτομα που καταναλώνουν αυξημένες προσλήψεις καφεΐνης, σημειώνουν παράλληλα μειωμένη πρόσληψη γάλακτος [41]. Η μεγάλη κατανάλωση καφεΐνης σε συνδυασμό με το κάπνισμα σε δείγμα ενηλίκων γυναικών 30-65 και σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες έδειξε να σχετίζεται αρνητικά με την οστική πυκνότητα

[42-43]. Στην καφεΐνη των αναψυκτικών τύπου κόλα, φαίνεται μάλιστα να αποδίδεται και η αντίστοιχη αρνητική συσχέτιση αναψυκτικών και BMD [44].

ΠΡΩΩΡΗ ΕΜΜΗΝΟΠΑΥΣΗ

Η απώλεια οστικής μάζας σχετίζεται άμεσα με τα χρόνια που έχουν περάσει από την εμμηνόπαυση και τόσο αυτή η χρονική περίοδος όσο και η ηλικία εμμηνόπαυσης καθορίζουν την απώλεια οστικής μάζας που θα επέλθει με την πάροδο του χρόνου. Κατά μέσο όρο, μετά την εμμηνόπαυση η γυναίκα χάνει φυσιολογικά οστόν με ρυθμό 0,5-1,5% το χρόνο. Ο ρυθμός αυτός είναι γρηγορότερος τα πέντε πρώτα μετεμμηνοπαυσιακά χρόνια, ακολούθως δε μειώνεται προοδευτικά μέχρι το 15^ο μετεμμηνοπαυσιακό χρόνο. Συνήθως η εμμηνόπαυση παρουσιάζεται το 45^ο-55^ο έτος της ηλικίας, αλλά προοδευτική ελάττωση των οιστρογόνων έχει αρχίσει αρκετά χρόνια πριν. Πρόωρη θεωρείται η εμμηνόπαυση που εμφανίζεται πριν το 40^ο έτος της ζωής. Στις περιπτώσεις αυτές η συχνότητα οστεοπόρωσης είναι αυξημένη και οι γυναίκες πρέπει να υποβάλλονται σε προληπτική αγωγή [41].

ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ

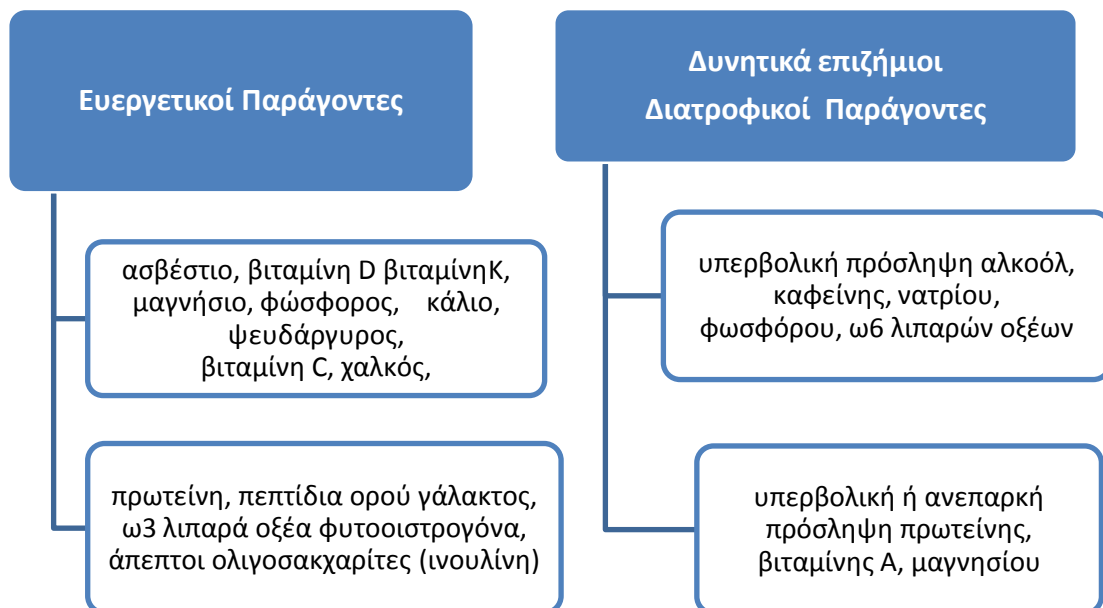
Η ανεπάρκεια οιστρογόνων στις γυναίκες επιταχύνει την οστική απώλεια με παρόμοιο τρόπο με αυτό που συμβαίνει στις μετα-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Την ίδια στιγμή μειώνεται το ισχυρό χτίσιμο της οστικής πυκνότητας που συνήθως συμβαίνει στην εφηβεία και την νεότερη ενήλικη ζωή. Αυτό πιθανότατα να σχετίζεται τόσο με ορμονική ανισορροπία όσο και διατροφικούς παράγοντες [5].

A.3 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΧΕΣΗΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΜΕ ΤΗ ΣΚΕΛΕΤΙΚΗ ΥΓΕΙΑ

A.3.1 ΕΞΕΤΑΖΟΝΤΑΣ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΑ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

Η διατροφή αναγνωρίζεται ως ένας από τους μεταβλητούς παράγοντες που επηρεάζουν την διατήρηση του οστού [45]. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, αρκετά από τα θρεπτικά συστατικά που καταναλώνουμε μπορεί δυνητικά να έχουν θετική ή αρνητική επίδραση στην σκελετική υγεία [εικόνα A5] Επιδρούν στα οστά με διάφορους τρόπους συμπεριλαμβανομένων πιθανών μεταβολών στη δομή των οστών, στο ρυθμό οστικού μεταβολισμού, στο ενδοκρινικό ή/και παρακρινικό σύστημα και στην ομοιόσταση του ασβεστίου και άλλων μετάλλων ή ιχνοστοιχείων [46].

Εικόνα A5: Επίδραση Θρεπτικών Συστατικών στην Σκελετική Υγεία



ΑΣΒΕΣΤΙΟ

Το ασβέστιο είναι το πιο άφθονο μέταλλο στον οργανισμό. Περίπου 1,2 kg περιέχονται στο ανθρώπινο σώμα, με το 99% αυτού να εντοπίζεται στα οστά και στα δόντια [47]. Μια επαρκής πρόσληψη ασβεστίου καθορίζει την ανάπτυξη της μέγιστης οστικής μάζας κατά το τέλος της εφηβικής περιόδου και βελτιώνει την προοδευτική απώλεια της οστικής μάζας με την ηλικία [48]. Υψηλότερες διατροφικές προσλήψεις ασβεστίου έχουν συσχετιστεί με υψηλότερη οστική μάζα σε παιδιά, νέους, ενήλικες καθώς και σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες [35, 49]. Το εύρημα αυτό παρουσιάζει ενδιαφέρον καθώς έχει εκτιμηθεί ότι 10% αύξηση στην μέγιστη οστική μάζα επιφέρει μείωση του κινδύνου οστεοπορωτικών καταγμάτων κατά την διάρκεια της ενήλικης ζωής κατά 50% ή ισοδύναμα καθυστέρηση εμμηνόπαυσης κατά 13 χρόνια.

Η ποσότητα του ασβεστίου που απορροφάται από τον οργανισμό εξαρτάται από την ηλικία και την διατροφή. Σε βρέφη και παιδιά που οι ανάγκες είναι αυξημένες, λόγω ανάπτυξης του σκελετού, η απορρόφηση του προσλαμβανόμενου ασβεστίου είναι περίπου στο 75%. Στους ενήλικες, από το ασβέστιο που λαμβάνεται καθημερινά με την τροφή μόνο το 30% περίπου απορροφάται από το έντερο, ενώ στις εγκύους το 50%[41].

Έλλειψη ασβεστίου κατά την περίοδο σχηματισμού των οστών συνεπάγεται χαμηλότερη κορυφαία οστική μάζα και σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο καταγμάτων, τόσο στη νεαρή όσο και στην ενήλικη ζωή, ενώ γενικά τα άτομα αυτά δεν αποκτούν την γενετικώς προκαθορισμένη οστική μάζα. Μια τέτοια διαφορά, ενώ φαίνεται μικρή, είναι αρκετή για να αντιστοιχηθεί σε μία 25-50% διαφορά στην επίπτωση καταγμάτων ισχίου κατά την ενήλικη ζωή [35, 41].

ΦΩΣΦΟΡΟΣ

Ο φώσφορος είναι ένα απαραίτητο στοιχείο για την οστική διαμόρφωση καθώς απαιτείται για την ορθή επιμετάλλωση του σκελετού [49]. Η κατανάλωση φωσφόρου δεν φαίνεται να επηρεάζει την σκελετική ομοιόσταση στα φυσιολογικά όρια κατανάλωσης (RDA=700mg/d), ωστόσο υπερβολικές προσλήψεις ειδικά όταν συνδυάζονται με χαμηλή κατανάλωση ασβεστίου μπορεί να είναι τοξικές. Οι υψηλές προσλήψεις φωσφόρου σε συνδυασμό με τη χαμηλή κατανάλωση ασβεστίου μπορεί να οδηγήσουν σε δευτεροπαθή υπερπαραθυρεοειδισμό και οστική απώλεια. Η διαιτητική πρόσληψη του φωσφόρου συνίσταται να είναι τέτοια ώστε να εξασφαλίζεται η αναλογία ασβέστιο: φωσφόρο ίση με 1:1 [35].

BITAMINH D

Η βιταμίνη D είναι ένα σημαντικό θρεπτικό συστατικό για τη διατήρηση της σκελετικής υγείας. Οι κύριες λειτουργίες της βιταμίνης D είναι η ρύθμιση της νεφρικής απορρόφησης ασβεστίου και η κινητοποίηση ασβεστίου από τα οστά με αποτέλεσμα τη διατήρηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου του ορού [50].

Η βιταμίνη D εντοπίζεται σε λίγα τρόφιμα. Είναι βιταμίνη που διαλύεται στο λίπος για το λόγο αυτό περιέχεται σε τρόφιμα που περιέχουν λιπαρά, όπως τα λιπαρά ψάρια, το αυγό, η κρέμα γάλακτος, το δέρμα από τα πουλερικά και το κόκκινο κρέας και το βούτυρο. Η βιομηχανία τροφίμων έχει προχωρήσει στον εμπλουτισμό κάποιων προϊόντων με βιταμίνη D, όπως του γάλακτος και του γιαουρτιού, της μαργαρίνης, χυμών και δημητριακών πρωινού. Σήμερα, τα εμπλουτισμένα τρόφιμα αποτελούν βασικές διατροφικές πηγές της βιταμίνης D[14, 46].

Ο καθοριστικός, λοιπόν, παράγοντας για την διατήρηση των επιπέδων της βιταμίνης D είναι η ενδογενής της σύνθεση που πραγματοποιείται όταν το δέρμα εκτείνεται σε UVB ακτινοβολία [46]. Πιο συγκεκριμένα, η UVB ακτινοβολία απορροφάται από την 7-δευδροχοληστερόλη που υπάρχει στο δέρμα για να σχηματιστεί

η προβιταμίνη D3, ένα ασταθές μόριο, που γρήγορα μετατρέπεται σε βιταμίνη D3 μέσω της θερμότητας. Η βιταμίνη D3 βγαίνει στον εξωκυττάριο χώρο και αναρροφάται εντός των τριχοειδών από την πρωτεΐνη σύνδεσης της βιταμίνης D (DBP). Μέσω των τριχοειδών, η βιταμίνη D μεταφέρεται στο ήπαρ που υφίσταται υδροξυλίωση και σχηματίζεται η 25-υδροξύβιταμίνη D. Η τελευταία συνδέεται πάλι στην DBP και μεταφέρεται στα νεφρά όπου ελευθερώνεται εντός του νεφρικού σωληναρίου και υφίσταται υδροξυλίωση ώστε να σχηματιστεί η 1,25-διυδροξύβιταμίνη D, η οποία είναι και η βιολογικά ενεργή μορφή της βιταμίνης D και υπεύθυνη για την ομοιοστασία του ασβεστίου [50].

Δεδομένα δείχνουν ότι η έλλειψη βιταμίνης D συμβάλλει σημαντικά στην οστεοπόρωση λόγω της μη επαρκούς επαναρρόφησης του ασβεστίου, της αυξημένης οστικής απώλειας, της εξασθένησης των μυών και της αποδυναμωμένης οστικής μικροαρχιτεκτονικής. Η αύξηση της βιταμίνης D μπορεί να μειώσει σημαντικά τον κίνδυνο οστικών καταγμάτων στους ηλικιωμένους [51].

Η έλλειψη βιταμίνης D έχει ως αποτέλεσμα την ανεπαρκή επιμετάλλωση του οστού, που στα παιδιά οδηγεί σε καθυστέρηση της ανάπτυξης και σε οστικές παραμορφώσεις γνωστές ως ραχίτιδα. Στους ενήλικες, η ίδια κατάσταση είναι γνωστή ως οστεομαλακία. Στις βιομηχανικές χώρες, η ραχίτιδα και η οστεομαλακία συναντώνται σπάνια. Ωστόσο, ελλείψεις μετρίου βαθμού της βιταμίνης D είναι συνηθισμένες και μπορεί να είναι πιθανή προδιάθεση για οστεοπόρωση. Η επαρκής πρόσληψη βιταμίνης D κατά την εγκυμοσύνη κρίνεται απαραίτητη, καθώς υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι μητέρες με έλλειψη της 25-υδροξύβιταμίνης D γεννούν παιδιά με μειωμένη οστική μάζα, το οποίο μπορεί να αποτελέσει παράγοντα κινδύνου για οστεοπόρωση στην μετέπειτα ζωή [52].

ΠΡΩΤΕΪΝΗ

Η πρωτεΐνη αποτελεί περίπου το 50% του όγκου του οστού και το ένα τρίτο της μάζας του. Η οστική αυτή πρωτεΐνη υφίσταται συνεχή ανακατασκευή και μεταβολισμό. Η πρωτεΐνη έχει χαρακτηριστεί τόσο ως επιβαρυντική αλλά και ως ωφέλιμη για την σκελετική υγεία. Παρόλο που η γενική πεποίθηση ήταν ότι οι δίαιτες υψηλές σε πρωτεΐνη (ειδικά οι δίαιτες υψηλές σε ζωική πρωτεΐνη) οδηγούν σε αύξηση της νεφρικής απέκκρισης ασβεστίου και σε οστική απώλεια, φαίνεται ουσιαστικά ότι σχετίζονται με αυξημένη οστική μάζα και λιγότερα κατάγματα όταν η πρόσληψη ασβεστίου είναι επαρκής.

Επιπρόσθετα, η σκελετική υγεία δεν αφορά απλά τα οστά αλλά όλο το μυοσκελετικό σύστημα. Έτσι, η απώλεια οστικής μάζας (οστεοπενία) και απώλεια μυϊκής μάζας (σαρκοπενία) που επέρχονται με την ηλικία είναι στενά συνδεδεμένες. Οι παράγοντες, λοιπόν, που επηρεάζουν τον μυϊκό αναβολισμό, συμπεριλαμβανομένης και της πρόσληψης πρωτεΐνης, επηρεάζουν και την οστική μάζα [53].

Ω-3 ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ

Μετα-ανάλυση που συμπεριέλαβε 10 κλινικές δοκιμές δε μπόρεσε να αποδείξει αν τα ω-3 λιπαρά οξέα μπορούν να έχουν κάποια θετική επίδραση στην σκελετική υγεία. 4 κλινικές δοκιμές, από τις οποίες οι 3 πραγματοποιούσαν συγχρόνηση ασβεστίου και ω-3 λιπαρών οξέων υπέδειξαν ότι τα ω-3 λιπαρά οξέα επηρεάζουν θετικά την οστική πυκνότητα. Από την άλλη, όμως, 5 από τις μελέτες δεν κατέληξαν σε κάποια συσχέτιση. Επομένως, χρειάζεται επιπλέον έρευνα για την αποσαφήνιση της σχέσης [54].

BITAMINH K

Η βιταμίνη K παίζει σημαντικό ρόλο για τον σκελετό καθώς δρα ως συμπαραάγοντας στη μεταμεταφραστική καρβοξυλίωση διάφορων οστικών πρωτεϊνών, με

την οστεοκαλσίνη να είναι πιο άφθονη [47]. Αρκετές είναι οι δημοσιευμένες έρευνες που υποδεικνύουν το σημαντικό ρόλο της βιταμίνης Κ για την βελτιστοποίηση της οστικής υγείας, αυξάνοντας την BMD στα οστεοπορωτικά άτομα και μειώνοντας τα ποσοστά καταγμάτων [55]. Η φυλλοκινόνη είναι η πιο μελετημένη μορφή βιταμίνης Κ σε σχέση με την σκελετική υγεία. Σε μελέτες παρατήρησης έχουν αναφερθεί αντίστροφες σχέσεις μεταξύ της προσλαμβανόμενης φυλλοκινόνης, της κυκλοφορούσας φυλλοκινόνης και της οστικής απώλειας στους ηλικιωμένους.

Ωστόσο, αποτελέσματα τυχαιοποιημένων, ελεγχόμενων κλινικών δοκιμών δεν υποστηρίζουν μια προστατευτική επίδραση της φυλλοκινόνης στην οστική απώλεια του ισχίου στους ηλικιωμένους, προτείνοντας ότι οι θετικές συσχετίσεις στις μελέτες παρατήρησης μπορεί να αντανakλούν την επίδραση υγιεινών γενικά τύπων διατροφής στην σκελετική υγεία [56].

Τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή μελέτησε τη χορήγηση φυλλοκινόνης σε συνδυασμό με ασβέστιο και βιταμίνη D για χρονική περίοδο 2 ετών υποδεικνύοντας μια μέτρια συνεργιστική δράση στην ενίσχυση της οστικής πυκνότητας [57].

ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΟΣ Β ΚΑΙ ΒΙΤΑΜΙΝΗ C

Τα μέχρι τώρα δεδομένα από πειραματικές μελέτες υποδεικνύουν διάφορα μηχανιστικά μονοπάτια για τις επιδράσεις τις Β6, του φυλλικού οξέος και της Β12 στη φυσιολογία του οστού. Τα αποτελέσματα από μελέτες παρατήρησης είναι αντικρουόμενα σχετικά με τις βιταμίνες του συμπλέγματος Β και τους οστικούς δείκτες, ωστόσο, η πλειοψηφία των κλινικών δοκιμών δεν έχει καταδείξει κάποια προστατευτική δράση αυτών στον οστικό μεταβολισμό ή στην μείωση του καταγματικού κινδύνου [58].

Όσον αφορά την βιταμίνη C αποτελεί σημαντικό συμπαράγοντα σύνθεσης του κολλαγόνου, της υδροξυπρολίνης και της υδροξυλυσίνης και φαίνεται να επάγει την κινητοποίηση της αλκαλικής φωσφατάσης, που αποτελεί δείκτη σχηματισμού οστεοβλαστών. Επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν θετική συσχέτιση μεταξύ βιταμίνης C

και οστικής μάζας, ενώ χαμηλές προσλήψεις συνδέονται με ταχύτερο ρυθμό οστικής απώλειας. Μάλιστα από μία μελέτη προέκυψε ότι υψηλότερη βιταμίνη C σχετιζόταν με λιγότερα κατάγματα. Ωστόσο, κλινικές μελέτες που να τεκμηριώνουν αιτιολογικά αυτές τις συσχετίσεις φαίνεται να εκλείπουν μέχρι σήμερα [35].

ΝΑΤΡΙΟ

Το νάτριο θεωρείται από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν την απέκκριση ασβεστίου στα ούρα. Επειδή το νάτριο και το ασβέστιο μοιράζονται τα ίδια συστήματα μεταφοράς στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, κάθε 2,3g νατρίου που αποβάλλονται από τα νεφρά συμπαρασύρουν 40-60mg ασβεστίου. Σε ενήλικες γυναίκες βρέθηκε ότι κάθε επιπλέον γραμμάριο νατρίου την ημέρα αντιστοιχεί σε 1% επιπλέον απώλεια οστού το χρόνο και ότι η απώλεια αυτή μπορεί να προληφθεί με μείωση της ποσότητας του προσλαμβανόμενου νατρίου και αύξηση της ποσότητας του ασβεστίου. Γενικά, μία πρόσληψη άλατος της τάξης των 6g (2400mg νατρίου), ιδιαίτερα κατά την περίοδο επίτευξης της κορυφαίας οστικής μάζας, θεωρείται ιδανική για την ομοιοστάση του ασβεστίου και μπορεί να αποτελέσει ευεργετικό μέσο για την πρόληψη της οστεοπόρωσης [41].

ΜΑΓΝΗΣΙΟ

Το μαγνήσιο είναι ένα μέταλλο που σχηματίζει μέρος των οστικών ανόργανων μετάλλων. Περίπου το 60% του μαγνησίου βρίσκεται στο σκελετό, όπου θεωρείται ότι ενισχύει την ποιότητα του οστού, επηρεάζοντας την ανάπτυξη κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη [41]. Η διατήρηση της ομοιοστασίας του στον οργανισμό φαίνεται να είναι καθοριστικής σημασίας για την διατήρηση της οστικής υγείας. Πειραματικές και επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι τόσο η χαμηλή όσο και η υψηλή ποσότητα μαγνησίου έχουν επιβλαβείς επιδράσεις στα οστά. Η έλλειψη μαγνησίου συμβάλλει στην οστεοπόρωση αφενός άμεσα, μέσω αύξησης της οστεοκλαστικής δραστηριότητας και

μείωση της οστεοβλαστικής, αφετέρου έμμεσα μέσω της έκκρισης παραθορμόνης και προώθησης χαμηλού βαθμού φλεγμονής . Από την άλλη πλευρά, οι μηχανισμοί που να εξηγούν την αρνητική επίδραση υψηλών επιπέδων μαγνησίου στην οστική υγεία δεν είναι καλά μελετημένοι [59].

Α.3.2 ΕΞΕΤΑΖΟΝΤΑΣ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ

Η πιο συνηθισμένη προσέγγιση μέχρι τώρα για να εξετάσουμε πιθανές συσχετίσεις ανάμεσα στη διαιτητική πρόσληψη και την σκελετική υγεία βασίζεται στη μελέτη μεμονωμένων θρεπτικών συστατικών (ή σε ποικιλία αυτών). Παρόλο που αυτή η παραδοσιακή ανάλυση είναι πολύτιμη για την κατανόηση της επίδρασης συγκεκριμένων συστατικών, όπως το ασβέστιο, στην σκελετική υγεία, υπολείπεται ακόμα αρκετή πληροφορία, ενώ υπάρχουν σημαντικοί εννοιολογικοί και μεθοδολογικοί περιορισμοί. Τα άτομα καταναλώνουν γεύματα αποτελούμενα από διάφορα τρόφιμα που περιέχουν ένα συνδυασμό θρεπτικών συστατικών που είναι πιθανόν να αλληλοσυσχετίζονται, να αλληλεπιδρούν ή να δρουν συνεργιστικά. Προτείνεται, λοιπόν μια ολιστική διαιτητική προσέγγιση, η οποία εξετάζει την επίδραση διατροφικών προτύπων για την πρόληψη και την αντιμετώπιση χρόνιων νοσημάτων. Η προσέγγιση αυτή ίσως αποδειχθεί πιο πολύτιμη στη μελέτη των συσχετίσεων μεταξύ διατροφής και βιολογικών δεικτών απ' ότι η μελέτη μεμονωμένων θρεπτικών συστατικών ή διατροφικών ομάδων [60-62].

Τα διατροφικά πρότυπα μπορούν να οριστούν με μια εκ των προτέρων (a priori) ανάλυση, βασισμένη στα διαθέσιμα επιστημονικά δεδομένα που αφορούν την σχέση συγκεκριμένων τροφίμων ή θρεπτικών συστατικών με ασθένειες (π.χ. Μεσογειακή διατροφή), ή με διερευνητική προσέγγιση (a posteriori ανάλυση) που αφορά την συγχώνευση των μεμονωμένων διατροφικών τους συνηθειών σε ομοιογενείς υποομάδες [63-64].

ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΣΚΕΛΕΤΙΚΗ ΥΓΕΙΑ

Ένας περιορισμένος αριθμός μελετών, έχει εξετάσει τη συσχέτιση της Μεσογειακής Διατροφής και της σκελετικής υγείας ενώ τα αποτελέσματα τους είναι αντικρουόμενα [65]. Μελέτη που διεξήχθη σε δείγμα ενήλικων 200 Ισπανίδων γυναικών έδειξε ότι παράμετροι της Μεσογειακής Διατροφής σχετίζονται στατιστικά σημαντικά με αυξημένη BMD. Επίσης, προοπτική μελέτη 8 Ευρωπαϊκών Χωρών έδειξε ότι η προσκόλληση στη Μεσογειακή Διατροφή φαίνεται να είναι προστατευτική έναντι στα περιστατικά κατάγματος του ισχίου, ειδικά όσον αφορά τους άνδρες. Ωστόσο, μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε δείγμα 220 ενήλικων περιεμμηνοπαυσιακών Ελληνίδων δεν κατάφερε να αναδείξει μια τέτοια συσχέτιση. Παρ' όλα αυτά, η ίδια μελέτη συσχέτισε θετικά ένα διατροφικό πρότυπο με πολλές ομοιότητες με τη Μεσογειακή Διατροφή (υψηλή κατανάλωση ψαριών και ελαιολάδου και χαμηλή κατανάλωση κόκκινου κρέατος) με δείκτες της οστικής μάζας [65]. Απαιτούνται, λοιπόν, επιπλέον μελέτες μεγάλες σε κλίμακα για να αποσαφηνιστεί ο ρόλος της Μεσογειακής Διατροφής στην σκελετική υγεία [62, 66].

ΔΙΑΙΤΑ DASH

Η δίαιτα DASH (Dietary Approaches to Stop Hypertension) είναι μια δίαιτα πλούσια σε ασβέστιο που δίνει έμφαση στα φρούτα, τα λαχανικά και στα γαλακτοκομικά με χαμηλά λιπαρά. Τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή συσχέτισε το μοντέλο αυτό με δείκτες σκελετικής υγείας. Πιο συγκεκριμένα, επιστρατεύθηκαν 186 ενήλικες άνδρες και γυναίκες οι οποίοι κατανάλωσαν για 2 εβδομάδες μια δίαιτα ελέγχου υψηλή σε Na, χωρίστηκαν τυχαία σε ομάδες που κατανάλωναν δίαιτες με χαμηλή, μέτρια ή υψηλή συγκέντρωση σε Na. Φάνηκε, λοιπόν, μια σημαντική μείωση στον οστικό μεταβολισμό, που έχει δείχθει ότι συσχετίζεται με μειωμένη οστική απώλεια και καταγματικό κίνδυνο. Η θετική αυτή επίδραση στον οστικό μεταβολισμό μπορεί να είναι αποτέλεσμα πολλών παραγόντων συμπεριλαμβανομένης της υψηλότερης πρόσληψης ασβεστίου, καλίου και

μαγνησίου, της χαμηλότερης οξύτητας αλλά και των αντιοξειδωτικών και των φυτοχημικών που βρίσκονται στα φρούτα και τα λαχανικά [67].

ΔΙΑΙΤΑ ΥΨΗΛΟΥ ΟΞΙΝΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ

Υπάρχει η υπόθεση ότι οι σύγχρονες δίαιτες προωθούν την οστεοπόρωση μέσω της μεταβολικής παραγωγής όξινου φορτίου που προκαλεί την απομάκρυνση μετάλλων από τα οστά με σκοπό να αντισταθμιστεί η οξύτητα. Τα αποτελέσματα μετα-ανάλυσης έδειξαν μια γραμμική συσχέτιση μεταξύ των αλλαγών στο εκκρινόμενο ασβέστιο και στις αλλαγές του εκκρινόμενου όξινου φορτίου χωρίς όμως να μπορούν να αποδείξουν ότι το ασβέστιο αυτό προέρχεται από τα οστά [68]. Επίσης, το γεγονός ότι συστατικά που παράγουν όξινο φορτίο όπως οι πρωτεΐνες, που φαίνεται ότι είναι ωφέλιμες στην σκελετική υγεία αλλά και αλκαλικά μέταλλα, όπως το κάλιο που φαίνεται να έχει μικρό όφελος γενικά, θέτουν υπό αμφισβήτηση αν υπάρχει σχέση αιτίας μεταξύ διατροφικού όξινου φορτίου και της οστεοπόρωσης [69].

“ΕΚ ΤΩΝ ΥΣΤΕΡΩΝ” ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ

Άλλες μελέτες προσπάθησαν να αποτυπώσουν τις διατροφικές συνήθειες του δείγματος που μελετούσαν σε συγκεκριμένα διατροφικά πρότυπα τα οποία και στη συνέχεια συσχετίστηκαν με δείκτες σκελετικής υγείας. Πιο συγκεκριμένα, δεδομένα από την μελέτη Framingham έδειξαν ότι δίαιτα βασισμένη στα φρούτα, τα λαχανικά και τα δημητριακά ήταν προστατευτική όσον αφορά την οστική μάζα στους άνδρες ενώ μια δίαιτα χαμηλή σε θρεπτικά συστατικά και υψηλή σε γλυκά συσχετίστηκε με χαμηλή οστική μάζα τόσο σε άνδρες όσο και σε γυναίκες [70]. Παρόμοιο είναι και το διατροφικό πρότυπο στο οποίο κατέληξε μελέτη με δείγμα υγιείς ενήλικες Κορεάτες. Με άλλα λόγια ένα διατροφικό πρότυπο πλούσιο σε γαλακτοκομικά, φρούτα και ολικής άλεσης δημητριακά φαίνεται να συσχετίζεται θετικά με τη σκελετική υγεία [71]. Μελέτη σε αγροτικό πληθυσμό προεμμηνοπαυσιακών γυναικών της Ιαπωνίας έδειξε ότι ένα 'υγιεινό'

πρότυπο, χαρακτηριζόμενο από υψηλές συγκεντρώσεις πράσινων και σκούρων κίτρινων λαχανικών, μανιταριών, ψαριών και οστρακοειδών, και φρούτων παρουσιάζει θετική συσχέτιση με την BMD [72].

Επιπροσθέτως, έχει μελετηθεί η επίδραση των χορτοφαγικών διατροφικών προτύπων στην σκελετική υγεία. Οι χορτοφάγοι που συμπεριλαμβάνουν στην διατροφή τους αυγά και γάλα φαίνεται να έχουν φυσιολογική οστική μάζα συγκρινόμενοι με τους μη χορτοφάγους [73]. Ωστόσο, μια σχετικά πιο πρόσφατη ανασκόπηση κατέληξε στο συμπέρασμα ότι τα ευρήματα συνήθως υποστηρίζουν την υπόθεση ότι οι αυστηροί χορτοφάγοι έχουν χαμηλότερη οστική πυκνότητα από τους μη χορτοφάγους [74].

A.4 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΧΕΣΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΜΕ ΤΗ ΣΚΕΛΕΤΙΚΗ ΥΓΕΙΑ

Η οστική μάζα είναι ένα κλασσικό πολύπλοκο γνώρισμα που εκτός από τους περιβαλλοντικούς και τους ηλικιοεξαρτώμενους παράγοντες καθορίζεται σε σημαντικό βαθμό και από το γενετικό υπόβαθρο [75].

Μελέτες που εξετάζουν την κληρονομικότητα σε διδύμους και οικογένειες αναφέρουν ότι διάφοροι οστικοί παράμετροι υπόκεινται σε σημαντικό γενετικό έλεγχο. Πιο συγκεκριμένα, η κληρονομικότητα που αφορά τις παραμέτρους της οστικής υπερηχοτομογραφίας της πτέρνας κυμαίνεται στο 45% με 74% [76] ενώ για την κεντρική οστική πυκνότητα αγγίζει το 84% και για την κορυφαία οστική μάζα το 50-85% [77].

Οι γενικές διαφορές της οστικής μάζας μεταξύ των ατόμων μπορούν να ερμηνευτούν από γενετικές διαφορές με μικρή επίδραση. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από τα αποτελέσματα μελετών συσχέτισεων γονιδιωματικής σάρωσης (genome-wide association studies, GWAS), όπου ανιχνεύτηκαν μικρές επιδράσεις από διάφορες κοινές μεταλλάξεις μέσα ή κοντά σε γονίδια [75]. Οι μελέτες γονιδιωματικής

συσχέτισης δίνουν τη δυνατότητα διερεύνησης χιλιάδων πολυμορφικών θέσεων σε σύντομο χρονικό διάστημα. Στοχεύουν στην ποσοτικοποίηση της γενετικής ποικιλομορφίας ενός πληθυσμού και στη συσχέτιση γενετικών δεικτών με συγκεκριμένους φαινοτύπους [78-79]. Τα τελευταία λοιπόν χρόνια, οι μελέτες αυτές υπήρξαν ένα σημαντικό εργαλείο για την εξερεύνηση του πολύπλοκου γενετικού χαρακτήρα της οστικής μάζας.

Πριν τις μελέτες GWAS, οι χρησιμοποιούμενες προσεγγίσεις για την ταυτοποίηση πολυμορφισμών ήταν η ανάλυση σύνδεσης και η μελέτη συσχέτισης υποψηφίων γονιδίων. Η αποτυχία των μελετών σύνδεσης να αναδείξουν γενετικούς τόπους που να επιβεβαιώνονται από άλλες μελέτες ή μετα-αναλύσεις, έκανε τους ερευνητές να στρέψουν την προσοχή τους στη μελέτη συσχέτισης υποψηφίων γονιδίων. Σύμφωνα με αυτή την προσέγγιση, γίνεται ανάλυση των πολυμορφισμών στα υποψήφια γονίδια, τα οποία έχουν κάποιον ρόλο στην βιολογία των οστών και μελετάται η σχετική επίδραση ενός συγκεκριμένου αλληλομόρφου ή απλοτύπου σε ένα ποσοτικό γνώρισμα [14, 80].

Ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων έχουν χαρακτηριστεί ως πιθανά υποψήφια για την ρύθμιση της οστικής μάζας και την τάση για οστεοπορωτικά κατάγματα. Σε αυτά περιλαμβάνονται:

- γονίδια των ασβεστιοτρόπων ορμονών και υποδοχέων τους (υποδοχέας της βιταμίνης D, παραθορμόνη, υποδοχέας παραθορμόνης, καλσιτονίνη, υποδοχέας καλσιτονίνης),
- γονίδια ορμονών φύλου και υποδοχέων τους (υποδοχείς οιστρογόνων, αρωματάση),
- γονίδια κυτταροκινών που επιδρούν στον οστικό μεταβολισμό (ινσουλινομιμητικός αυξητικός παράγοντας I, μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας β, παράγοντας νέκρωσης όγκων α, ιντερλευκίνη 6),
- γονίδια της θεμέλιας ουσίας των οστών (κολλαγόνο τύπου I),

- γονίδια μορίων του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt/β-κατενίνης (πρωτεΐνες Wnt, πρωτεΐνη 5 σχετιζόμενη με τον υποδοχέα της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας, β-κατενίνη, πρωτεΐνες Dickkopf 1, Sfrps, Kremens, σκληροστίνη),
- γονίδια του ρυθμιστικού συστήματος OPG/RANK/RANKL (οστεοπροτεγερίνη, ενεργοποιητής του υποδοχέα του πυρηνικού παράγοντα κΒ και το υπόστρωμά του),
- άλλα γονίδια όπως η απολιποπρωτεΐνη E, η αναγωγή του μεθυλενοτετραϋδροφυλλικού, ο υποδοχέας γ ενεργοποιούμενου από επαγωγείς υπεροξειδιοσωμάτων κ.α. [79, 81].

Όμως, οι μελέτες που διερευνούν τους γενετικούς πολυμορφισμούς με σχέση με τους οστικούς φαινοτύπους δεν έχουν ακόμα αναδείξει γενετικούς δείκτες με υψηλή σημαντικότητα σε μεγάλους πληθυσμούς ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικά εργαλεία στην κλινική πράξη. Έτσι, λοιπόν, έχει εισαχθεί η χρήση ισχυρότερων τεχνικών μελέτης όπως είναι οι μελέτες GWAS που αναφέρθηκαν παραπάνω[14]. Μετα-ανάλυση που πραγματοποιήθηκε από τη σύμπραξη GEFOS/GENOMOS σε 13 μελέτες GWAS ανέδειξε 25 πολυμορφισμούς ενός μόνο νουκλεοτιδίου (SNPs) με πιθανή συσχέτιση με τους δείκτες οστικής υπερηχοτομογραφίας.

A.4.1 ΜΕΛΕΤΩΝΤΑΣ ΤΟΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟ rs597319

Ο πολυμορφισμός ενός μόνο νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphism) rs597319 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 11 του ανθρώπινου γονιδιώματος, ενώ ο ακριβής γενετικός του τόπος είναι ο 11q14.2. Ο πολυμορφισμός αυτός βρίσκεται σε εσωνική περιοχή του γονιδίου που κωδικοποιεί την διαμεμβρανική πρωτεΐνη 135 (transmembrane protein 135, TMEM 135). Ο rs597319 αναδείχθηκε μέσα από μετα-ανάλυση της σύμπραξης GEFOS/GENOMOS επί 13 μελετών GWAS με σκοπό τον εντοπισμό πιθανών γενετικών τόπων που σχετίζονται με τους δείκτες της οστικής υπερηχοτομογραφίας αλλά και με την οστική πυκνότητα όπως αυτή προσδιορίζεται από

τη μέθοδο DXA. Αξίζει να αναφερθεί ότι ο πολυμορφισμός συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά και με τους δυο δείκτες της οστικής υπερηχοτομογραφίας (BUA, SOS). Η συσχέτιση και στις δύο περιπτώσεις ήταν αρνητική. Τέλος, το αλληλόμορφο G είναι αυτό που χαρακτηρίστηκε ως αλληλόμορφο κινδύνου για τη συσχέτιση με χαμηλότερες τιμές BUA και SOS [77].

Η διαμεμβρανική πρωτεΐνη 135 είναι μια πολυμεμβρανική πρωτεΐνη με 7 διαμεμβρανικές έλικες με μεγάλη σταθερότητα. Υπάρχουν ομολογίες μεταξύ της TMEM 135 και της διαμεμβρανικής περιοχής πρωτεΐνης που αποτελεί σημαντική συνιστώσα του Wnt μονοπατιού [82].

Το γονίδιο TMEM 135 φαίνεται ότι καθορίζει τη διαφοροποίηση των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων σε λιποκύτταρα ή οστεοβλάστες επάγοντας την οστεοβλαστογένεση [82]. Τα λιπώδη κύτταρα του μυελού των οστών και οι οστεοβλάστες μοιράζονται κοινά πρόδρομα μόρια, ενώ ολοένα αυξάνεται το ενδιαφέρον τελευταία για το ρόλο της αύξησης του λίπους του μυελού σε οστεοπορωτικές καταστάσεις και στις μεταβολικές ενδοσυσχετίσεις μεταξύ των γειτονικών τύπων κυττάρων [83].

Δεδομένα από τη μελέτη ENCODE [77] δείχνουν ότι 2 SNPs στην εσωνική περιοχή του γονιδίου TMEM135 και σε κοντινή απόσταση από τον rs597319 (rs502580 και rs603140, και τα 2 με υψηλή ανισορροπία σύνδεσης με τον rs597319 [$r^2 > 0.92$], και οι δυο στενά συνδεδεμένοι με τις παραμέτρους QUS σε διερευνητικές μελέτες [$P \sim 1.3 \times 10^7$ και για τα δυο]) συσχετίζονται με δυο μεταγραφικούς παράγοντες σε κυτταρικές σειρές οστεοβλαστών. Είναι ενδιαφέρον ότι αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες συσχετίζονται με την σκελετική ανάπτυξη και την οστική πυκνότητα.

Επίσης, το γονίδιο της TMEM 135 έχει αναφερθεί ότι συσχετίζεται με την μακροζωία και ταχύτητα βαδίσματος στους ανθρώπους [77].

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ολοένα και περισσότερες μελέτες το τελευταίο διάστημα, σε παγκόσμιο επίπεδο, διενεργούν συσχετίσεις μεταξύ διατροφικών προτύπων με οστικούς δείκτες με σκοπό την εύρεση και την καθιέρωση διατροφικών οδηγιών προστατευτικών για την σκελετική υγεία. Τα μέχρι τώρα δεδομένα συνεχίζουν να αυξάνονται προς αυτήν την κατεύθυνση, ωστόσο σε ελληνικό επίπεδο μόνο μία μελέτη έως τώρα προσπάθησε να προσεγγίσει τις διατροφικές συνήθειες του πληθυσμού και να τις συσχετίσει με την οστική μάζα.

Λαμβάνοντας υπόψη αυτό το βιβλιογραφικό κενό, αρχικός σκοπός της παρούσας ερευνητικής μελέτης, είναι ο προσδιορισμός των διατροφικών προτύπων που ακολουθούνται από δείγμα ενηλίκων του ελληνικού πληθυσμού και η συσχέτιση τους με οστικούς δείκτες.

Επιπλέον, δεδομένου ότι η οστική μάζα είναι ένα πολύπλοκο χαρακτηριστικό με ισχυρή γενετική προδιάθεση, η παρούσα μελέτη επιχειρεί να εξετάσει εάν η συσχέτιση του πολυμορφισμού rs597319 με τους δείκτες οστικής υπερηχοτομογραφίας που αναδείχθηκε προσφάτως, επιβεβαιώνεται στον ελληνικό πληθυσμό.

Τέλος, σημαντική θέση κατέχουν οι αλληλεπιδράσεις των παραπάνω παραγόντων κινδύνου μεταξύ τους, με σκοπό να διερευνηθεί εάν μεταβάλλουν το συνολικό κίνδυνο για μειωμένη οστική μάζα και τον κίνδυνο για εμφάνιση οστεοπόρωσης. Η μελέτη μεμονωμένων παραγόντων κινδύνου, χωρίς τη διερεύνηση και κατανόηση των αλληλεπιδράσεων τους, έχει μικρή πρακτική και κλινική σημασία. Έτσι, λοιπόν, η μελέτη έχει ως τελικό σκοπό να διερευνήσει την αλληλεπίδραση των διαφορετικών διατροφικών προτύπων και του πολυμορφισμού rs597319 στους δείκτες οστικής υπερηχοτομογραφίας.

B. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Πληθυσμός της μελέτης

Στη παρούσα επιδημιολογική μελέτη χρησιμοποιήθηκε δείγμα ατόμων μεγάλου ηλικιακού εύρους, Ελληνικής καταγωγής και χωρίς συγγένεια εξ' αίματος, ώστε ο πληθυσμός να είναι φυλετικά ομοιογενής. Επίσης, δεδομένου ότι η οστική πυκνότητα αλλά και οι παράγοντες κινδύνου που την επηρεάζουν μεταβάλλονται με την ηλικία, η συμμετοχή ατόμων μεγάλου εύρους ηλικιών στη μελέτη κρίθηκε απαραίτητη ώστε η συσχέτιση μεταξύ οστικής πυκνότητας και παραγόντων κινδύνου να είναι ολοκληρωμένη. Έτσι, το συνολικό δείγμα αποτελείται ενήλικο μικτό πληθυσμό >18 ετών. Στις μελέτες παρατήρησης απαιτείται μεγάλος αριθμός ατόμων ώστε να επιτευχθεί υψηλή στατιστική δύναμη. Ο πληθυσμός της παρούσας μελέτης είναι 974 άτομα.

Ο πληθυσμός στρατολογήθηκε σε διάφορους δήμους και κοινότητες της Ελλάδας με σκοπό την εκπροσώπηση περιοχών σε εθνικό επίπεδο. Ο Σύλλογος Υποστήριξης Ασθενών με Οστεοπόρωση οργανώνει εκδηλώσεις ενημέρωσης και ευαισθητοποίησης του κοινού σχετικά με το πρόβλημα της οστεοπόρωσης στο νομό Αττικής και σε διάφορους νομούς της χώρας. Οι εκδηλώσεις αυτές γίνονται σε συνεργασία με τους αντίστοιχους Δήμους και Κοινότητες, η διάρκειά τους είναι 2 ημέρες και η συμμετοχή είναι ελεύθερη και δωρεάν. Οι εκδηλώσεις ανακοινώνονται και διαφημίζονται από το Σύλλογο και τις υπεύθυνες αρχές Τοπικής Αυτοδιοίκησης. Ο πληθυσμός αυτός ενημερώθηκε για τους σκοπούς της μελέτης από τους αρμόδιους φορείς τοπικής αυτοδιοίκησης και οι ενδιαφερόμενοι δήλωσαν την εθελοντική τους συμμετοχή.

Κριτήρια αποκλεισμού

Άτομα με γνωστό ιστορικό μεταβολικών παθήσεων των οστών (όπως νόσο Paget, οστεομαλακία, ατελή οστεογένεση, νεφρική οστεοδυστροφία κ.λ.π.) αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Άτομα με ενδοκρινοπάθειες (πρωτοπαθή υπερπαραθυρεοειδισμό, υποπαραθυρεοειδισμό, θυρεοτοξίκωση, παθήσεις υπόφυσης και επινεφριδίων όπως νόσο Cushing, νόσο Addison), κακοήθειες, παθήσεις του συνδετικού ιστού, σύνδρομο δυσαπορρόφησης, φλεγμονώδεις παθήσεις του εντέρου (ελκώδης κολίτιδα, νόσος Crohn), κίρρωση ήπατος, ηπατική ανεπάρκεια και νεφρική ανεπάρκεια αποκλείστηκαν, επίσης, από τη μελέτη. Η πρόωρη εμμηνόπαυση (<40 ετών) και η αμηνόρροια >1 έτους αποτέλεσαν κριτήρια αποκλεισμού. Επίσης, αποκλείστηκαν από τη μελέτη άτομα που βρίσκονταν φαρμακευτική αγωγή η οποία επηρεάζει το μεταβολισμό των οστών όπως ορμονική θεραπεία υποκατάστασης, αναβολικά στεροειδή ή προγεστερόνη, διφωσφονικά, τεριπαρατίδη, καλσιτονίνη, βιταμίνη D, τιβολόνη, γλυκοκορτικοειδή, αντιεπιληπτικά, τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά, αντιπηκτικά. Τέλος, οι εθελοντές έπρεπε να μην κάνουν κατάχρηση αλκοόλ και να μην έχουν νοητικές ή ψυχιατρικές διαταραχές που να εμποδίζουν τη συμμετοχή τους στη μελέτη.

Εφόσον η μελέτη στοχεύει στην αξιολόγηση παραγόντων κινδύνου για ιδιοπαθή οστεοπόρωση, τα παραπάνω κριτήρια χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό τον αποκλεισμό ατόμων με άλλες παθήσεις των οστών ή με παράγοντες πρόκλησης δευτεροπαθούς οστεοπόρωσης [2].

Δημογραφικά δεδομένα

Για τη συλλογή των δημογραφικών δεδομένων σχεδιάστηκε ερωτηματολόγιο το οποίο παρέχει πληροφορίες σχετικά με την ημερομηνία γέννησης, την καταγωγή, το επίπεδο εκπαίδευσης, την οικογενειακή κατάσταση, την επαγγελματική κατάσταση, το τόπο κατοικίας και αναλυτικά στοιχεία επικοινωνίας (διεύθυνση κατοικίας, τηλέφωνο).

Ιατρικό ιστορικό

Επίσης, για τη λήψη πληροφοριών σχετικά με το ιατρικό ιστορικό σχεδιάστηκε ερωτηματολόγιο που περιλαμβάνει ερωτήσεις σχετικά με: παθήσεις και ιστορικό παθήσεων (με έμφαση σε εκείνες που περιλαμβάνονται στα κριτήρια αποκλεισμού), την ηλικία εμμηναρχής και εμμηνόπαυσης, πιθανό ιστορικό αμηνόρροιας, χειρουργικές επεμβάσεις με έμφαση στις επεμβάσεις που οδηγούν σε εμμηνόπαυση (υστερεκτομή), κάπνισμα, αριθμό κύσεων, μήνες θηλασμού, ιστορικό καταγμάτων του περιφερικού σκελετού, κληρονομικότητα για οστεοπόρωση, κατάγματα και για άλλες παθήσεις των οστών, λήψη φαρμάκων και ιστορικό λήψης φαρμάκων (με έμφαση σε εκείνα που περιλαμβάνονται στα κριτήρια αποκλεισμού) και πιθανό ιστορικό μακροχρόνιας ακινητοποίησης. Μεταξύ των αναφερόμενων καταγμάτων του περιφερικού σκελετού, καταγράφηκαν ξεχωριστά εκείνα που προέκυψαν από χαμηλής βίας τραύμα. Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν στοχεύουν στην αξιολόγηση παρουσίας κριτηρίων αποκλεισμού και στη καταγραφή κλινικών (κατάγματα, εμμηναρχή, εμμηνόπαυση), περιβαλλοντικών (κάπνισμα) και γενετικών (κληρονομικότητα) παραγόντων κινδύνου.

Διατροφική αξιολόγηση

Για την αξιολόγηση της διατροφικής πρόσληψης και των διατροφικών συνηθειών χρησιμοποιήθηκαν έγκυρα ερωτηματολόγια συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων (ΕΣΚΤ). Οι μέθοδοι της ανάκλησης 24ώρου και του ΕΣΚΤ είναι οι πιο έγκυρες μέθοδοι αξιολόγησης της διατροφικής πρόσληψης και των διατροφικών συνηθειών για ομάδες πληθυσμού [84]. Τα ΕΣΚΤ περιλαμβάνουν μεγάλο αριθμό τροφίμων. Ο καθορισμός των μερίδων γίνεται είτε με φωτογραφίες 3 μερίδων είτε με τη χρήση εργαλείων εκτίμησης όπως πχ. 1 φλιτζάνι τσαγιού (250ml). Η συχνότητα κατανάλωσης κατηγοριοποιείται σε ποτέ, σπάνια, 1-3 φορές το μήνα, 1-2 φορές την εβδομάδα, 3-4 φορές την εβδομάδα, 5-6 φορές την εβδομάδα, καθημερινά/φορές την ημέρα. Καταγράφεται η συχνότητα

κατανάλωσης πρωινού, μεσημεριανού γεύματος, δείπνου, παραδοσιακών φαγητών, φρέσκων ή μη φαγητών (1-2/εβδομ. ή 3-4/εβδομ. ή 5-6/εβδομ. ή καθημερινά) και snacks (0-6/ημέρα).

Αξιολόγηση φυσικής δραστηριότητας

Για την αξιολόγηση της φυσικής δραστηριότητας χρησιμοποιήθηκε έγκυρο ερωτηματολόγιο για ενήλικες. Με τις μεθόδους αυτές αξιολογούνται οι δραστηριότητες κατά την εργασία και οι δραστηριότητες εκτός εργασίας (άθλησης, αναψυχής) ως προς το είδος, τη συχνότητα και τη διάρκεια αυτών.

Συλλογή δεδομένων ερωτηματολογίων

Την ημέρα εξέτασης, κατά τη διάρκεια συνέντευξης, συμπληρώθηκαν τα ερωτηματολόγια δημογραφικών δεδομένων, ιατρικού ιστορικού, η ανάκληση 24ώρου, το ΕΣΚΤ και το ερωτηματολόγιο αξιολόγησης της φυσικής δραστηριότητας για τον ενήλικο πληθυσμό. Επιβεβαιώθηκε η ασυμφωνία με τα κριτήρια αποκλεισμού και έγινε η κωδικοποίηση των δεδομένων του εξεταζόμενου. Επίσης, υπογράφηκε από τον εξεταζόμενο το συμφωνητικό εθελοντικής συμμετοχής.

Μέτρηση ανθρωπομετρικών παραμέτρων

Οι ανθρωπομετρικές παράμετροι που επιλέχθηκαν είναι το ύψος, το βάρος και ο Δείκτης Μάζας Σώματος (Body Mass Index, BMI). Το ύψος επιλέγεται ως ένας χαρακτηριστικός φαινότυπος του μεγέθους του σκελετού. Το βάρος και το BMI επιλέγονται ως παράγοντες που επηρεάζουν την οστική πυκνότητα σε όλα τα στάδια της ζωής.

Το σωματικό βάρος μετρήθηκε με μηχανικό ζυγό ακριβείας στο πλησιέστερο 0.5Kg με ελαφρύ ρουχισμό και χωρίς παπούτσια. Ο εξεταζόμενος τοποθετήθηκε στο ζυγό όρθιος, ακίνητος στο κέντρο της πλατφόρμας του ζυγού. Ζητήθηκε να κοιτάζει ευθεία χωρίς να στηρίζεται κάπου.

Το ύψος μετρήθηκε στο πλησιέστερο 0.5cm με σταθερό κατακόρυφο αναστημόμετρο. Μετρήθηκε από την κορυφή του κρανιακού θόλου μέχρι το επίπεδο των πελμάτων. Ο εξεταζόμενος τοποθετήθηκε στο αναστημόμετρο όρθιος, χωρίς παπούτσια και κάλτσες, με τις πτέρνες ενωμένες, τα γόνατα ίσια, τους ώμους χαλαρούς και τις παλάμες να ακουμπούν στους μηρούς. Οι πτέρνες, οι γλουτοί, το θωρακικό κύρτωμα της σπονδυλικής στήλης και η οπίσθια επιφάνεια του κρανίου εφάπτονται στον κατακόρυφο άξονα του οργάνου. Ζητήθηκε από τον εξεταζόμενο να τοποθετεί το κεφάλι του στη θέση Frankfort horizontal plane, δηλαδή σε θέση στην οποία η ευθεία γραμμή μεταξύ του χαμηλότερου σημείου του οφθαλμικού κόγχου και της χόνδρινης προβολής μπροστά από το εξωτερικό άνοιγμα του περυγίου του αυτιού να είναι οριζόντια. Σε αυτή τη θέση, ο εξεταζόμενος εισπνέει βαθιά ώστε να εκταθεί η σπονδυλική στήλη και λαμβάνεται η μέτρηση [85].

Ο δείκτης μάζας σώματος υπολογίζεται με τον τύπο:

$$\text{BMI} = \text{ΒΑΡΟΣ (Kg)} / \text{ΥΨΟΣ}^2 (\text{m}^2)$$

Μέτρηση οστικής πυκνότητας

Η μέτρηση έγινε με τη μέθοδο ποσοτικής υπερηχοτομογραφίας (Quantitative Ultrasound, QUS) στο οπίσθιο τμήμα της πτέρνας. Η μέθοδος QUS είναι μη ιονίζουσα τεχνική που χρησιμοποιεί ηχητικά κύματα με σκοπό τον προσδιορισμό της οστικής πυκνότητας. Η μέθοδος αυτή μετράει την εξασθένιση της ηχητικής δέσμης (broadband ultrasound attenuation, BUA, μονάδα μέτρησης dB/MHz), την μεταβολή της ταχύτητας των κυμάτων (speed of sound, SOS, μονάδα μέτρησης m/s) και τον δείκτη δυσκαμψίας (stiffness index), ο οποίος είναι ένας συνδυασμός κανονικοποιημένης SOS και BUA και

θεωρείται ότι βελτιώνει την τον συντελεστή της ποικιλομορφίας των SOS και BUA ($SI=0.67 * BUA + 0.28 * SOS - 240$). Η μέτρηση έγινε με τη τοποθέτηση του γυμνού δεξιού άκρου ποδός στην υποδοχή του μηχανήματος.

Αιμοληψία

Μετά από 12ώρη νηστεία ελήφθησαν χωρίς εφαρμογή περίδεσης από κάθε εξεταζόμενο συνολικά 15mL φλεβικού αίματος, σε 2 φιαλίδια. Το πρώτο δείγμα περιέχει 5mL σε φιαλίδιο με αντιπηκτικό EDTA (Ethylene diamine tetra-acetic acid) και το δεύτερο περιέχει 10mL σε φιαλίδιο χωρίς αντιπηκτικό. Το πρώτο δείγμα χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση DNA και αποθηκεύεται στους 4°C, έως ότου χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση DNA και το δεύτερο δείγμα χρησιμοποιήθηκε για άμεση απομόνωση ορού. Η απομόνωση ορού γίνεται με φυγοκέντρηση του δείγματος στις 3000rpm για 10 λεπτά και ο ορός παραλαμβάνεται με πιπέτα και αποθηκεύεται σε φιαλίδια στους -20°C.

Για την απομόνωση DNA χρησιμοποιήθηκε συμπυκνωμένο παρασκεύασμα λευκοκυττάρων (buffy coat) το οποίο απομονώθηκε με την εξής διαδικασία: το δείγμα αίματος στα φιαλίδια με το αντιπηκτικό φυγοκεντρείται στις 3000rpm για 10 λεπτά. Μετά την φυγοκέντρηση τα ερυθροκύτταρα καταβυθίζονται στον πυθμένα του φιαλιδίου ενώ το πλάσμα μεταφέρεται στο επάνω μέρος. Ενδιάμεσα από τα ερυθροκύτταρα και το πλάσμα υπάρχει μια λεπτή στοιβάδα η οποία περιέχει τα συμπυκνωμένα λευκά και τα αιμοπετάλια αυτή η στοιβάδα αποτελεί το buffy coat. Χρησιμοποιώντας αποστειρωμένη πιπέτα απομακρύνουμε το πλάσμα έως και 1-2 χιλιοστά πάνω από την στοιβάδα του buffy coat και στη συνέχεια λαμβάνουμε το buffy coat μαζί με το υπόλοιπο πλάσμα και μία μικρή ποσότητα από ερυθροκύτταρων (1-2χιλιοστά) και το αποθηκεύουμε σε φιαλίδιο στους -80°C έως ότου να χρησιμοποιηθεί για απομόνωση DNA.

Μέτρηση βιοχημικών δεικτών.

Στα δείγματα ορού που συλλέχθηκαν έγινε μέτρηση των επιπέδων των ακόλουθων δεικτών:

- 25(OH)D
- Ολικό μόριο παραθορμόνης (intact parathormone, 1-84)
- Ολικό ασβέστιο
- Φωσφόρος
- Οστικό κλάσμα αλκαλικής φωσφατάσης
- Κρεατινίνη

Οι δείκτες 25(OH)D₃, παραθορμόνη, ολικό ασβέστιο, φωσφόρος αφορούν το σύστημα ομοιοστασίας του ασβεστίου και διαταραχή αυτών αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου για εμφάνιση οστικών διαταραχών. Τα επίπεδα της 25(OH)D αντανακλούν τα αποθέματα της βιταμίνης D στο σώμα και χρησιμοποιούνται ως οι πιο αξιόπιστοι δείκτες για την μέτρηση της βιταμίνης D. Τέλος, ελέγχθηκε η λειτουργία των νεφρών (κρεατινίνη) με σκοπό τον αποκλεισμό ατόμων νεφρική δυσλειτουργία.

Απομόνωση γενετικού υλικού (DNA) και ποσοτικός προσδιορισμός συγκέντρωσης DNA

- Η απομόνωση DNA έγινε με τη συσκευή απομόνωσης DNA iPrepTM και χρησιμοποιήθηκε το iPrepTMPureLinkTMgDNA Blood Kit. Το συγκεκριμένο κιτ επιτρέπει την σύντομη και αυτοματοποιημένη απομόνωση γενομικού DNA από φρέσκα ή συντηρημένα στην κατάψυξη δείγματα αίματος ή από συμπυκνωμένο

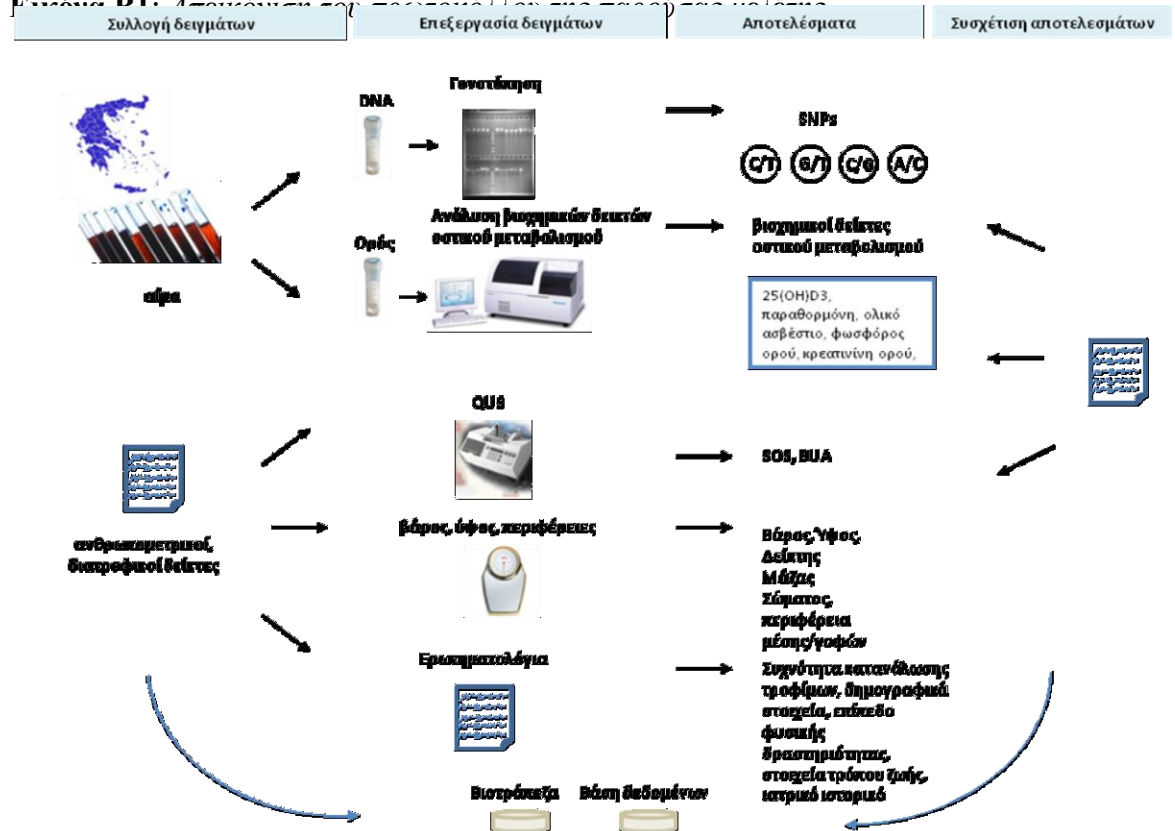
παρασκεύασμα λευκοκυττάρων. Το DNA απομονώνεται από τα δείγματα μέσα σε 30 λεπτά χωρίς τη χρήση φυγοκέντρου. Η συγκεκριμένη συσκευή μπορεί να απομονώσει νουκλεϊκά οξέα από 13 δείγματα κάθε φορά, χρησιμοποιώντας την τεχνολογία που βασίζεται στα μαγνητικά μικροσφαιρίδια. Τα κύτταρα λύνονται με τη χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος Lysis και οι πρωτεΐνες πέπτονται με πρωτεϊνάση K. Το προϊόν που προκύπτει αναμιγνύεται με τα μαγνητικά μικροσφαιρίδια (Dynabeads), τα οποία δεσμεύονται στο DNA και στη συνέχεια το δεσμευμένο με μικροσφαιρίδια DNA απομονώνεται από το διάλυμα με χρήση μαγνητικού διαχωρισμού. Τα μικροσφαιρίδια πλένονται πλήρως με το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης για να απομακρυνθούν οι προσμείξεις. Το γενομικό DNA στη συνέχεια εκλύεται στο διάλυμα έκλυσης, σε τελικό όγκο 200μL και αποθηκεύεται στους -20°C, με σκοπό να χρησιμοποιηθεί αργότερα για γονοτυπική ταυτοποίηση.

- Προσδιορισμός της συγκέντρωσης DNA: Η ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης DNA γίνεται με μέθοδο φθορισμομετρίας. Μια φθορίζουσα χρωστική η οποία έχει την ικανότητα να δεσμεύεται σε μόρια δίκλωνου DNA προστίθεται στα δείγματα. Στη συνέχεια, τα δείγματα φωτομετρούνται σε φωτόμετρο φθορισμού και με βάση την απορρόφηση της φθορίζουσας ουσίας προσδιορίζεται η συγκέντρωσή τους. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης γίνεται με τη χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς, η οποία δημιουργείται μετά από φωτομέτρηση δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης DNA.

Ανίχνευση του πολυμορφισμού

Η μέθοδος iPlex Gold χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του πολυμορφισμού. Συνοπτικά, τα προϊόντα της αντίδρασης PCR χρησιμοποιούνται στην αντίδραση iPlex με τελικό αποτέλεσμα την εκλεκτική επιμήκυνση των αντίστοιχων αλληλομόρφων με ολιγονουκλεοτίδια μεταβλητής μάζας, τα οποία ανιχνεύονται τελικά με φασματοφωτομετρία μάζας (matrix-assisted laser desorption/ionisation, time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS).

Ενότητα D1: Αποκρίνιση σε παρατηρήσεις και παρεμβάσεις



ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε χρησιμοποιώντας το στατιστικό πρόγραμμα SPSS, έκδοση 21.0. Οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέσες τιμές $\pm$ τυπική απόκλιση, ενώ οι κατηγορικές μεταβλητές παρουσιάζονται ως σχετικές συχνότητες ή ως ποσοστά. Η κανονικότητα της κατανομής των υπό εξέταση ποσοτικών μεταβλητών καθορίστηκε με τον έλεγχο Kolmogorov-Smirnov.

Για τον προσδιορισμό των διατροφικών προτύπων χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση σε κύριες συνιστώσες (Principal Component Analysis, PCA). Η PCA είναι μια πολυπαραγοντική τεχνική που πραγματοποιεί ενδοσυσχετίσεις μεταξύ των αρχικών μεταβλητών-τροφίμων. Έτσι, χρησιμοποιώντας αυτή τη μέθοδο, τα διατροφικά πρότυπα και οι συμπεριφορές που προκύπτουν είναι ασυσχέτιστα μεταξύ τους, παρακάμπτοντας με αυτόν τον τρόπο το πρόβλημα της συσχέτισης των συνήθων διατροφικών μεταβλητών. Η ορθογώνια περιστροφή (Varimax) χρησιμοποιήθηκε για να αντληθούν οι βέλτιστες μη συσχετιζόμενες συνιστώσες (διατροφικά πρότυπα). Ο αριθμός των συνιστωσών που διατηρήθηκαν αποφασίστηκε βάσει του ποσοστού της ερμηνευόμενης διακύμανσης από τις συνιστώσες [64].

Μοντέλα απλής και πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης (χρησιμοποιώντας τους δείκτες οστικής υπερηχοτομογραφίας ως εξαρτημένες μεταβλητές) χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο για συγχυτικούς παράγοντες (ηλικία, βάρος, ύψος, PAL) και για τον έλεγχο πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ανεξάρτητων μεταβλητών (διατροφικά πρότυπα και SNPs). Το όριο στατιστικής σημαντικότητας σε όλες τις αναλύσεις ορίστηκε ως $p < 0,05$.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα περιγραφικά χαρακτηριστικά των ατόμων του πληθυσμού της μελέτης παρουσιάζονται στον **πίνακα Γ1**.

Πίνακας Γ1: Συνολικά Περιγραφικά Χαρακτηριστικά του πληθυσμού

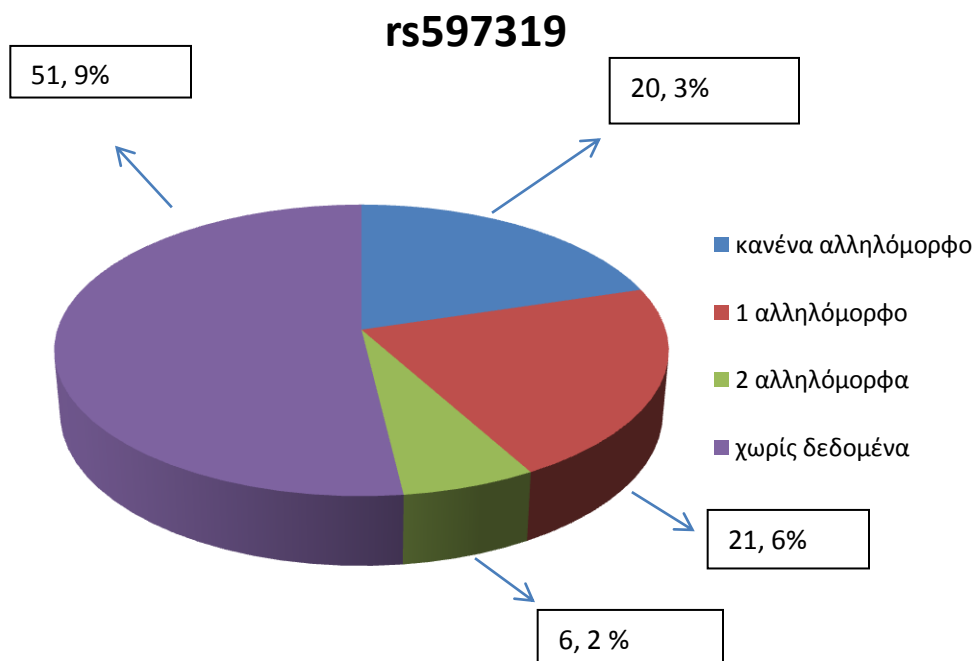
Χαρακτηριστικά Πληθυσμού	Τιμές
Αριθμός ατόμων	974
Ηλικία (έτη)	49,58±13,54
Φύλο γυναικείο (%)	84,6
Αστική περιοχή (%)	72,51
Αγροτική περιοχή (%)	27,49
Ανθρωπομετρικά Χαρακτηριστικά	
Δείκτης μάζας σώματος (kg/m ²)	27,53±5.6
Βιοχημικοί Δείκτες	
Βιταμίνη D ορού (ng/mL)	20,0±7.95
Ασβέστιο ορού (mg/dL)	9,37±0.74
Φώσφορος (mg/dL)	3,54±0.65
Παραθορμόνη (pg/mL)	40,16±15.55
Παράμετροι οστικής υπερηχοτομογραφίας	
BUA (db/MHz)	115,09±16,31
SOS (m/s)	1553±85,72
Stiffness Index	91,31±19,68

Άλλα Χαρακτηριστικά	
Ενέργεια (kcal/ημέρα)	1809.42±625.25
Φυσική δραστηριότητα (PAL)	1,38±0,25
Έκθεση στον ήλιο τους χειμερινούς μήνες (ώρες/εβδ.)	5.47±5.36
Έκθεση στον ήλιο τους καλοκαιρινούς μήνες (ώρες/εβδ.)	12.15±10.44

Όλες οι μεταβλητές εκφράζονται ως τιμή ± τυπική απόκλιση ή ως ποσοστό.

Στην συνέχεια παρουσιάζεται ο επιπολασμός των αλληλόμορφων κινδύνου για το SNP [rs597319] στο σύνολο του δείγματος [σχήμα Γ1].

Σχήμα Γ1: Επιπολασμός των αλληλόμορφων κινδύνου για το SNP [rs597319] στο σύνολο του δείγματος



Πίνακας Γ2: Συντελεστές και σκορ που προέκυψαν από την PCA (principal component analysis) σχετικά με τα καταναλισκόμενα τρόφιμα

Ομάδα Τροφίμων	1	2	3	4	5	6
Μη επεξεργασμένα αρτοσκευάσματα	0,204	-0,123	-0,12	0,529	0,131	-0,118
Επεξεργασμένα αρτοσκευάσματα	0,016	0,848	0,119	-0,068	0,101	0,023
Επεξεργασμένα δημητριακά πρωινού	-0,076	-0,001	-0,022	0,706	0,058	0,349
Τυριά πλούσια σε λιπαρά	0,197	0,659	0,106	-0,019	0,169	0,052
Τυριά χαμηλά σε λιπαρά	0,099	0,189	-0,036	0,487	-0,283	-0,191
Ψάρια	0,494	-0,162	0,154	0,032	-0,109	-0,083
Φρέσκα φρούτα	0,521	0,013	-0,158	0,230	0,333	0,046
Όσπρια	0,419	0,081	-0,029	-0,014	-0,152	0,447
Πουλερικά	-0,028	0,111	0,555	0,364	-0,186	-0,143
Κόκκινο κρέας	0,118	0,146	0,767	-0,032	-0,071	0,033
Γάλα πλήρες, γιαούρτι πλήρες	-0,049	-0,007	0,107	-0,035	0,044	0,829
Γάλα, γιαούρτι χαμηλό σε λιπαρά	0,077	-0,002	-0,042	0,729	-0,008	-0,039
Επεξεργασμένα ζυμαρικά	0,116	0,088	0,629	-0,140	0,158	0,148
Επεξεργασμένο ρύζι	0,558	0,072	0,299	0,072	-0,019	0,179
Γαλακτώδη γλυκά	-0,026	0,064	0,149	0,061	0,784	-0,083
Αμυλώδη γλυκά	-0,114	0,284	0,000	-0,068	0,534	0,055
Μαγειρεμένα λαχανικά	0,751	0,023	0,075	0,004	-0,039	0,083
Ωμά λαχανικά	0,669	0,085	0,005	0,073	-0,037	-0,125

Επεξεργασμένο κρέας	-0,141	0,818	0,120	0,110	0,010	-0,043
Πατάτες	0,069	0,043	0,612	-0,2	0,212	0,018
Ποσοστό ερμηνευόμενης διακύμανσης	10,92 5	10,24	9,51	9,16	6,5	5,92

Από την PCA (principal component analysis) προέκυψαν 6 διατροφικά πρότυπα που ερμηνεύουν το 52,24% της ολικής διακύμανσης της διατροφικής πρόσληψης [πίνακας Γ2]. Καθώς οι υψηλότερες απόλυτες τιμές δείχνουν ότι η διατροφική παράμετρος συνεισφέρει περισσότερο στην ανάπτυξη του προτύπου, τα διατροφικά πρότυπα προέκυψαν ως εξής:

- **Πρότυπο 1** (Λαχανικά, ρύζι, φρούτα, ψάρι): μαγειρεμένα και φρέσκα λαχανικά, ρύζι, φρέσκα φρούτα και ψάρι
- **Πρότυπο 2** (Γρήγορο φαγητό): λευκό ψωμί και αρτοσκευάσματα, λιπαρό τυρί, επεξεργασμένο κρέας
- **Πρότυπο 3** (Δυτικού τύπου διατροφή): κόκκινο κρέας, μακαρόνια, πατάτες, πουλερικά
- **Πρότυπο 4** (Υγιεινή διατροφή): γάλα και γιαούρτι με χαμηλά λιπαρά, δημητριακά πρωινού, μη επεξεργασμένο ψωμί και αρτοσκευάσματα, τυρί με χαμηλά λιπαρά
- **Πρότυπο 5** (Γλυκά): γαλακτώδη γλυκά, αμυλούχα γλυκά
- **Πρότυπο 6** (Πλήρη γαλακτοκομικά): γάλα και γιαούρτι πλήρη, όσπρια

Πίνακας Γ3: Αδρές συσχετίσεις μεταξύ διατροφικών προτύπων με τους δείκτες οστικής υπερηχοτομογραφίας: απλές γραμμικές παλινδρομήσεις στο σύνολο του δείγματος (αδρόι παράμετροι b)

	BUA (db/MHz)		SOS (m/s)	
	Crude b	p-value	Crude b	p-value
Διατροφικό πρότυπο 1	-0,6	0,12	-0,07	0,059
Διατροφικό πρότυπο 2	0,13	0,001	0,034	0,385
Διατροφικό πρότυπο 3	0,05	0,18	0,014	0,730
Διατροφικό πρότυπο 4	0,06	0,14	0,038	0,33
Διατροφικό πρότυπο 5	0,03	0,41	0,070	0,07
Διατροφικό πρότυπο 6	0,02	0,96	-0,015	0,703

Crude b: αδρή παράμετρος συσχέτισης

Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε $p < 0,05$

Στον **πίνακα Γ3** παρουσιάζονται οι συσχετίσεις μεταξύ των διατροφικών προτύπων και των δεικτών οστικής υπερηχοτομογραφίας (BUA, SOS). Ως εξαρτημένες μεταβλητές ορίστηκαν τα διατροφικά πρότυπα ενώ ως ανεξάρτητες οι δείκτες οστικής υπερηχοτομογραφίας.

Η μόνη στατιστικά σημαντική συσχέτιση που αναδείχθηκε από τη διενέργεια της απλής γραμμικής παλινδρόμησης είναι του διατροφικού προτύπου 2 ή “γρήγορο φαγητό” με τον δείκτη BUA ($b = 0,13$, $p = 0,001$). Η συσχέτιση αυτή είναι θετική.

Πίνακας Γ4: Αδρές συσχετίσεις μεταξύ του SNP [rs597319] με τους δείκτες οστικής υπερηχοτομογραφίας: απλές γραμμικές παλινδρομήσεις στο σύνολο του δείγματος (αδρόι παράμετροι b)

	BUA (db/MHz)		SOS (m/s)	
	Crude b	p-value	Crude b	p-value
rs597319	-0,120	0,034	-0,055	0,333

Crude b: αδρή παράμετρος συσχέτισης

Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε $p < 0,05$

Στον **πίνακα Γ4** παρουσιάζονται οι συσχετίσεις μεταξύ του πολυμορφισμού rs597319 και των δεικτών οστικής υπερηχοτομογραφίας (BUA, SOS). Ως εξαρτημένη μεταβλητή ορίστηκε ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός ενώ ως ανεξάρτητες οι δείκτες οστικής υπερηχοτομογραφίας.

Η διενέργεια της απλής γραμμικής παλινδρόμησης ανέδειξε στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση του πολυμορφισμού rs597319 με τον δείκτη BUA ($b = -0,120$, $p = 0,034$).

Πίνακας Γ5: Πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση που εξετάζει τις συσχέτιση του δείκτη οστικής υπερηχοτομογραφίας BUA (ανεξάρτητες μεταβλητές) με το διατροφικό πρότυπο 2 και το SNP rs597319, με διόρθωση για πιθανούς συγχυτικούς παράγοντες*

	BUA (db/MHz)	
	Adjusted b	p-value
Διατροφικό πρότυπο 2	0,007	0,91
rs597319	-0,119	0,028

Adjusted b: διορθωμένη παράμετρος γραμμικής συσχέτισης

Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε $p < 0,05$

*Πραγματοποιήθηκε διόρθωση για φύλο, ηλικία, BMI, PAL

Στον **πίνακα Γ5** παρουσιάζεται η συσχέτιση του δείκτη οστικής υπερηχοτομογραφίας BUA με το διατροφικό πρότυπο 2 και τον πολυμορφισμό rs597319 μετά από προσαρμογή του μοντέλου για ορισμένους πιθανούς συγχυτικούς παράγοντες. Σκοπός ήταν να εξεταστεί αν οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις που βρέθηκαν από την απλή γραμμική παλινδρόμηση θα παρέμεναν όταν ορισμένοι συγχυτικοί παράγοντες λαμβάνονταν υπόψη. Οι συγχυτικοί παράγοντες που προστέθηκαν στα μοντέλα ήταν το φύλο, η ηλικία, το BMI και το PAL.

Τα αποτελέσματα της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης έδειξαν ότι η θετική συσχέτιση του διατροφικού προτύπου 2 με τον δείκτη BUA παύει να υφίσταται στο πλήρες μοντέλο σε αντίθεση με τη συσχέτιση του πολυμορφισμού rs597319 που παραμένει στατιστικά σημαντική ($b=-0,119$, $p=0,028$).

Πίνακες 6 και 7: Αλληλεπιδράσεις διατροφικών προτύπων και των SNPs στους δείκτες οστικής υπερηχοτομογραφίας, με διόρθωση για πιθανούς συγχυτικούς παράγοντες

	BUA (db/MHz)	
	B	p-value
[rs597319=0] * Διατρ. Πρότυπο 2	2,273	0,424
[rs597319=1] * Διατρ. Πρότυπο 2	6,023	0,034
[rs597319=2] * Διατρ. Πρότυπο 2	0 ^a	-

Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε $p<0,05$

*Πραγματοποιήθηκε διόρθωση για φύλο, ηλικία, BMI, PAL

	BUA (db/MHz)	
	B	p-value
[rs597319=2] * Διατρ. Πρότυπο 2	-2,273	0,44
[rs597319=1] * Διατρ. Πρότυπο 2	3,750	0,055
[rs597319=0] * Διατρ. Πρότυπο 2	0 ^a	

Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε $p < 0,05$

*Πραγματοποιήθηκε διόρθωση για φύλο, ηλικία, BMI, PAL

Από τα αποτελέσματα της διερεύνησης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του πολυμορφισμού και του διατροφικού προτύπου 2 ή αλλιώς “γρήγορο φαγητό” (**Πίνακας 6**) φαίνεται ότι οι τα άτομα που έχουν ένα αλληλόμορφο κινδύνου σε σχέση με αυτά που έχουν δύο αλληλόμορφα κινδύνου εάν ακολουθήσουν σε μεγαλύτερο βαθμό το πρότυπο 2 τότε παρατηρείται μια επιπλέον θετική επίδραση στον δείκτη BUA ($b = 6,026$, $p = 0,034$). Ωστόσο, τα άτομα που δεν έχουν κανένα αλληλόμορφο κινδύνου σε σχέση με τους ομοζυγώτες ως προς το αλληλόμορφο κινδύνου δε φάνηκε να παρουσιάζουν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά.

Από τον **πίνακα 7** φαίνεται ότι τα άτομα που έχουν ένα αλληλόμορφο κινδύνου σε σύγκριση με τους ομοζυγώτες που δεν έχουν κανένα αλληλόμορφο κινδύνου εάν ακολουθήσουν το πρότυπο 2 σε μεγαλύτερο βαθμό, δεν παρουσιάζουν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά. Το ίδιο ισχύει και για τους ομοζυγώτες ως προς το αλληλόμορφο.

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη συμμετείχαν 974 ενήλικες ηλικίας 18-86 ετών. Το δείγμα συλλέχθηκε σε περιοχές από όλη την Ελλάδα λαμβάνοντας υπόψη παράγοντες όπως το φύλο και η ηλικία. Σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση των επιμέρους επιδράσεων της διατροφής και του γενετικού υπόβαθρου, καθώς και της αλληλεπίδρασης τους στο φαινότυπο της οστικής μάζας όπως αυτός περιγράφεται από τους δείκτες οστικής υπερηχοτομογραφίας, BUA και SOS. Πιο συγκεκριμένα, έγινε προσπάθεια διερεύνησης των διατροφικών συνηθειών του δείγματος μέσω της εξαγωγής διατροφικών προτύπων χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της ανάλυσης σε κύριες συνιστώσες (Principal Component Analysis, PCA). Η ανάλυση σε διατροφικά πρότυπα λαμβάνει υπόψη τις επιδράσεις της διατροφής ως σύνολο, συμπεριλαμβανομένων των αλληλεπιδράσεων και των συνεργιστικών επιδράσεων μεταξύ των θρεπτικών συστατικών και των ομάδων τροφίμων. Εφόσον τα θρεπτικά συστατικά και οι ομάδες τροφίμων δεν καταναλώνονται μεμονωμένα, τα διατροφικά πρότυπα αντανακλούν καλύτερα τις διατροφικές συνήθειες από ότι η μελέτη των θρεπτικών συστατικών [84]. Παρόλο που οι μελέτες συσχέτισης διατροφικών προτύπων ολοένα και αυξάνονται, έχοντας ως απώτερο σκοπό την προσέγγιση και την καθιέρωση διατροφικών οδηγιών και συμπεριφορών προστατευτικών για την σκελετική υγεία και την αυξημένη απώλεια οστικής μάζας, σε ελληνικό επίπεδο μόνο μία μελέτη έχει επιχειρήσει κάτι παρόμοιο [62]. Δεδομένης της μεγάλης επίδρασης των γενετικών παραγόντων στους δείκτες οστικής μάζας, που συγκεκριμένα για τους δείκτες οστικής υπερηχοτομογραφίας της πτέρνας αγγίζει το 45-74%, επιχειρήσαμε να μελετήσουμε την επίδραση του πολυμορφισμού rs597319, που πρόσφατα αναδείχθηκε ως γενετικός τόπος με στατιστικά σημαντική επίδραση στους δείκτες BUA και SOS της υπερηχοτομογραφίας στην πτέρνα. Η καινοτομία, ωστόσο, της παρούσας ερευνητικής εργασίας έγκειται στην προσπάθεια προσδιορισμού τυχόν αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διατροφικών προτύπων και του πολυμορφισμού στους οστικούς δείκτες. Μέχρι στιγμής, ελάχιστες είναι οι μελέτες σε παγκόσμιο επίπεδο που έχουν επιχειρήσει κάτι παρόμοιο για την επίδραση τους στην ανθρώπινη υγεία.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήσαμε αρχικά την συσχέτιση των διατροφικών προτύπων με τους δείκτες οστικής υπερηχοτομογραφίας. Μόνο ένα από τα έξι διατροφικά πρότυπα κατάφερε να συσχετιστεί στατιστικά σημαντικά με τους δείκτες. Πιο συγκεκριμένα, το πρότυπο του “γρήγορου φαγητού” που περιέχει λευκό ψωμί και αρτοσκευάσματα, τυρί πλούσιο σε λιπαρά και επεξεργασμένο κρέας συσχετίστηκε θετικά με την παράμετρο BUA, υποδεικνύοντας μια θετική επίδραση στην οστική πυκνότητα. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε αντίθεση με αυτά άλλων παρόμοιων μελετών που είτε συσχέτισαν αρνητικά παρόμοια διατροφικά πρότυπα, όπως στην περίπτωση του Karamati et al.[85] όπου υψηλή κατανάλωση γαλακτοκομικών πλούσιων σε λιπαρά, εντοσθίων κόκκινου και επεξεργασμένου κρέατος και μη επεξεργασμένων δημητριακών συσχετίστηκε αρνητικά με την οστική πυκνότητα, είτε δεν ανέδειξαν κάποια επίδραση στην οστική πυκνότητα όπως στις μελέτες των Tucker et al.[70] - υψηλή κατανάλωση κρέατος, γαλακτοκομικών και αρτοσκευασμάτων- και Kontogianni et al. [62] -υψηλή κατανάλωση κρέατος, γαλακτοκομικών προϊόντων, δημητριακών και ελαιολάδου-. Παρ’όλ’ αυτά η παρατηρούμενη συσχέτιση μπορεί να ερμηνευθεί από τη συνεισφορά του επεξεργασμένου κρέατος και των πλούσιων σε λιπαρά τυριών. Με άλλα λόγια, τα τυριά είναι πλούσιες πηγές ασβεστίου, πρωτεΐνης και άλλων θρεπτικών συστατικών (π.χ. κάλιο και μαγνήσιο) με θετικές επιδράσεις στην σκελετική υγεία. Κλινικές δοκιμές έχουν αναδείξει μια σημαντική θετική συσχέτιση των γαλακτοκομικών με δείκτες οστικού μεταβολισμού, την οστική μάζα και την οστική πυκνότητα [86]. Επιπρόσθετα, το επεξεργασμένο κρέας είναι πλούσια πηγή πρωτεΐνης. Δεδομένα δείχνουν ότι η υψηλή κατανάλωση πρωτεΐνης μπορεί να είναι ευεργετική για την σκελετική υγεία ειδικά στους ηλικιωμένους [87]. Συμπερασματικά, μια δίαιτα, με επαρκή πρόσληψη ασβεστίου και πρωτεΐνης μπορεί να είναι ευεργετική για την οστική μάζα [53].

Μια ακόμα μελέτη όσον αφορά τον ελληνικό πληθυσμό επιχείρησε να διερευνήσει αν η υιοθέτηση κάποιου διατροφικού προτύπου θα συσχετιζόταν με δείκτες της οστικής μάζας. Η μελέτη αυτή είχε ως δείγμα περι-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες ενώ η οστική πυκνότητα προσδιορίστηκε με τη μέθοδο DXA. Η μελέτη έδειξε ότι ένα πρότυπο χαρακτηριζόμενο από υψηλή κατανάλωση ψαριών και ελαιολάδου και με χαμηλή

πρόσληψη κόκκινου κρέατος φαίνεται να είναι προστατευτικό όσον αφορά την οστική μάζα. Αξίζει να σημειωθεί ότι το πρότυπο αυτό προσομοιάζει αρκετά στο πρότυπο της Μεσογειακής Διατροφής [62].

Στην συνέχεια, εξετάσαμε την συσχέτιση των δεικτών οστικής υπερηχοτομογραφίας με τον πολυμορφισμό rs597319. Ο πολυμορφισμός αυτός αναδείχθηκε από μετα-ανάλυση 13 μελετών συσχετίσεων γονιδιωματικής σάρωσης (GWAS) της σύμπραξης GEFOS/GENOMOS που σκοπό είχε την προσέγγιση των γενετικών παραγόντων που επιδρούν στους δείκτες BUA και SOS και στην οστική πυκνότητα, όπως αυτή προέκυψε από τη μέθοδο DXA [77]. Ο rs597319 συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με την παράμετρο BUA ($b = -0,120$, $p = 0,034$), καταδεικνύοντας μια αρνητική επίδραση στην οστική πυκνότητα. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται να επιβεβαιώσει για τον ελληνικό πληθυσμό την αρνητική συσχέτιση που είχε καταδειχθεί από την μετα-ανάλυση. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην μετα-ανάλυση ο rs597319 είχε συσχετιστεί στατιστικά σημαντικά και με αρνητική τάση τόσο με την παράμετρο BUA, όσο και την παράμετρο SOS αλλά και με την οστική πυκνότητα όπως αυτή υπολογίστηκε με τη μέθοδο DXA. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί ίσως να αποδοθεί σε κάποιες επιδράσεις του γονιδίου TMEM 135, σε εσωνική περιοχή του οποίου βρίσκεται ο πολυμορφισμός. Πιο συγκεκριμένα, το γονίδιο αυτό φαίνεται να σχετίζεται άμεσα σε κάποιο βαθμό με την οστεοβλαστογένεση καθώς επίσης συσχετίσεις έχουν βρεθεί και με την ταχύτητα βαδίσματος στους ανθρώπους. Έτσι, η αλλαγή στην έκφραση του γονιδίου το οποίο μπορεί να σχετίζεται με τον πολυμορφισμό, μπορεί να ερμηνεύσει την αρνητική συσχέτιση με την οστική πυκνότητα είτε μέσω της άμεσης επίδρασης του στην οστεοβλαστογένεση είτε μέσω της έμμεσης επίδρασης του λόγω του μειωμένου μηχανικού φορτίου που ασκείται στην πτέρνα ως αποτέλεσμα των πιο αργών κινήσεων.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πολλαπλές γραμμικές συσχετίσεις για την περαιτέρω διερεύνηση των προηγούμενων σχέσεων, με σκοπό τον υπολογισμό των διορθωμένων συσχετίσεων για ορισμένους πιθανούς συγχυτικούς παράγοντες. Στόχος δηλαδή, ήταν να εξεταστεί αν οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις που βρέθηκαν από την απλή γραμμική συσχέτιση θα παρέμεναν, όταν πιθανοί συγχυτικοί παράγοντες λαμβάνονταν υπόψη.

Από τις διορθωμένες συσχετίσεις παρατηρούμε ότι η συσχέτιση μεταξύ του διατροφικού προτύπου “γρήγορο φαγητό” και του δείκτη BUA χάνει την στατιστική σημαντικότητα της στο πλήρες μοντέλο. Οι πιθανοί συγχυτικοί παράγοντες που προστέθηκαν ήταν: φύλο, ηλικία, BMI, PAL. Δεν ισχύει όμως το ίδιο και για τον πολυμορφισμό, ο οποίος διατηρεί την στατιστικά σημαντική αρνητική σχέση με τον δείκτη BUA και στο πλήρες μοντέλο. Το γεγονός ότι το διατροφικό πρότυπο χάνει τη στατιστική σημαντικότητα του υποδεικνύει το σημαντικό ρόλο των συγχυτικών παραγόντων. Με πιο απλά λόγια, θα μπορούσαμε να παρατηρήσουμε ότι το συγκεκριμένο διατροφικό πρότυπο ακολουθείτε κυρίως από άτομα νεαρότερης ηλικίας που εξ ορισμού έχουν αυξημένη οστική μάζα σε σύγκριση με άτομα μεγαλύτερης ηλικίας. Επίσης, το πρότυπο αυτό μπορεί να συσχετιστεί με αυξημένο σωματικό βάρος και ΔΜΣ που επίσης φαίνεται να έχουν θετική επίδραση στην οστική μάζα.

Παρά την χαμηλή στατιστική σημαντικότητα της σχέσης του διατροφικού προτύπου στο πλήρες μοντέλο, προχωρήσαμε στην διερεύνηση της αλληλεπίδρασης του προτύπου αυτού και του rs597319 στον οστικό δείκτη BUA. Το αποτέλεσμα που προέκυψε ήταν ότι τα άτομα που φέρουν ένα αλληλόμορφο κινδύνου για τον πολυμορφισμό ακολουθώντας το πρότυπο “γρήγορο φαγητό” σε μεγαλύτερο βαθμό, φαίνεται ότι έχουν μία επιπλέον θετική επίδραση στην οστική μάζα σε σχέση με τους ομοζυγώτες ως προς το αλληλόμορφο κινδύνου ($p=0,034$). Θετική επίδραση τείνει να φανεί για τους ετεροζυγώτες που υιοθετούν το διατροφικό πρότυπο “γρήγορο φαγητό” σε μεγαλύτερο βαθμό, συγκρινόμενοι με τους ομοζυγώτες που δε φέρουν κανένα αλληλόμορφο κινδύνου ($p=0,055$). Ωστόσο, δεν αναδεικνύεται κάποια αλληλεπίδραση του προτύπου στους φέροντες δυο αλληλόμορφα σε σχέση με αυτούς που δε φέρουν κανένα αλληλόμορφο. Πιθανώς, να απαιτείται μεγαλύτερο δείγμα ατόμων με καλύτερη αντιστοιχία ομοζυγωτών – ετεροζυγωτών για να επιβεβαιωθεί τυχόν αλληλεπίδραση μεταξύ των παραγόντων. Στην μέχρι τώρα, βιβλιογραφία δεν υπάρχουν παρόμοιες μελέτες πάνω στον συγκεκριμένο πολυμορφισμό για να συγκριθούν τα ευρήματα.

Όλα τα παραπάνω ευρήματα, θα πρέπει, ωστόσο, να ερμηνευτούν, υπό το πρίσμα των περιορισμών και των πλεονεκτημάτων της παρούσας μελέτης. Αναφορικά με τους περιορισμούς, η συγχρονική φύση της μελέτης δεν μας επιτρέπει να εξάγουμε

αιτιολογικές συσχετίσεις, μιας και δεν ικανοποιείται η βασική προϋπόθεση της χρονικής αλληλουχίας που απαιτείται για να οριστεί η σχέση μεταξύ ενός παράγοντα και της νόσου. Ως εκ τούτου, μόνο υποθέσεις μπορούν να γίνουν μεταξύ των εξεταζόμενων σχέσεων. Παρόλ'αυτά, το σχετικά μεγάλο δείγμα της μελέτης το οποίο συλλέχθηκε από πολλές περιοχές της Ελλάδας καθώς και παράγοντες όπως το φύλο, η ηλικία που λήφθηκαν υπόψη κατά τη συλλογή του, μπορεί να θεωρηθεί ένα από τα πλεονεκτήματα της παρούσας μελέτης. Η αξιολόγηση της οστικής μάζας έγινε με τη μέθοδο της οστικής υπερηχομετρίας στην πτέρνα που αν και βρίσκει την επιστημονική κοινότητα, όλο και περισσότερο θετική στην εφαρμογή της καθώς μπορεί να συνεκτιμά περισσότερα χαρακτηριστικά για την μικροαρχιτεκτονική της οστικής μάζας, ωστόσο οι περισσότερες μελέτες σε ενήλικους πληθυσμούς χρησιμοποιούν τη μέθοδο DXA. Αξίζει να αναφερθεί ότι συντελεστές συσχέτισης του Pearson μεταξύ της οστικής υπερηχοτομογραφίας στην πτέρνα και της κεντρικής DXA στο ισχίο ή την σπονδυλική στήλη είναι της τάξης 0,4-0,6 [88]. Σχετικά με την διατροφική αξιολόγηση, η καταγραφή έγινε με τη βοήθεια ερωτηματολογίων συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων (ΕΣΚΤ). Παρόλ' αυτά επειδή η μέθοδος αυτή βασίζεται στη μνήμη του ερωτηθέντος καθώς και ότι μερικά από τα ερωτηματολόγια αυτοδηλώθηκαν χωρίς επίβλεψη, ως μειονέκτημα της μελέτης μπορεί να θεωρηθεί η πιθανή υπο- ή υπερεκτίμηση των διατροφικών συνηθειών.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοψίζοντας, η παραπάνω ερευνητική εργασία διερεύνησε σε δείγμα ενήλικου ελληνικού πληθυσμού τη σχέση της διατροφής, ερμηνευόμενης σε διατροφικά πρότυπα, και των δεικτών οστικής υπερηχοτομογραφίας στην πτέρνα καθώς και τη σχέση του πολυμορφισμού rs597319 με τους δείκτες αυτούς. Απώτερος σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της αλληλεπίδρασης των παραπάνω παραγόντων στους οστικούς δείκτες.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης των ευρημάτων η μελέτη αυτή φαίνεται να επιβεβαιώνει για τον ελληνικό πληθυσμό την ύπαρξη αρνητικής συσχέτισης μεταξύ του πολυμορφισμού rs597319 με τον δείκτη BUA, σχέση που είχε αναδειχθεί από μετα-ανάλυση διερευνητικών μελετών συσχετίσεων γονιδιωματικής σάρωσης (GWAS) σε ευρωπαϊκό επίπεδο. Επίσης, κανένα από τα 6 διατροφικά πρότυπα που φάνηκε ότι προσεγγίζουν τις διατροφικές συνήθειες του δείγματος δεν κατάφερε να συσχετιστεί στατιστικά σημαντικά με τους οστικούς δείκτες. Τέλος, η διερεύνηση της αλληλεπίδρασης των παραπάνω παραγόντων, έδειξε ότι η υιοθέτηση του διατροφικού προτύπου “γρήγορο φαγητό” έχει επιπλέον οφέλη στα άτομα που έχουν ένα αλληλόμορφο κινδύνου σε σχέση με αυτούς που έχουν δύο. Παρ’όλα αυτά επιτακτική είναι η ανάγκη περισσότερης έρευνας προς αυτήν την κατεύθυνση για επιβεβαίωση τόσο μιας συνεργιστικής σχέσης όσο και του πιθανού μηχανισμού δράσης.

Παρόλ’ αυτά, η μελέτη είναι μία από τις λίγες μέχρι στιγμής που έχουν επιχειρήσει την συσχέτιση διατροφικών προτύπων και γενετικών παραγόντων γενικά για την ανθρώπινη υγεία. Η σκελετική υγεία είναι αποτέλεσμα πολύπλοκων αλληλοσυσχετίσεων μεταξύ της γενετικής προδιάθεσης και του περιβάλλοντος μέσα στο οποίο τα γονίδια εκφράζονται. Από τη σύλληψη μέχρι και τον θάνατο, η ανθρώπινη υγεία και κατ’έκταση και των οστών διαμορφώνεται από τη διατροφή, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η διαιτητική πρόσληψη είναι ένας κυριος περιβαλλοντικός παράγοντας που αλληλεπιδρά με τα γονίδια. Διαφαίνονται, λοιπόν, πιθανά οφέλη της χρησιμοποίησης του γενετικού υποβάθρου στο σχεδιασμό εξατομικευμένης διατροφής

για την πρόληψη χρόνιων νοσημάτων όπως η οστεοπόρωση. Παρόλ' αυτά υπάρχει πολύς δρόμος ακόμη για την αποσαφήνιση αυτών των αλληλεπιδράσεων.

E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Μανιός, Ι., ed. *Διατροφική Αξιολόγηση* 2006.
2. Kathleen Mahan, S.E.-S., ed. *Krause's Κλινική Διατροφή* 2014.
3. Seeman, E., *Age- and menopause-related bone loss compromise cortical and trabecular microstructure*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2013. **68**(10): p. 1218-25.
4. Mundy, G.R., *Pathogenesis of osteoporosis and challenges for drug delivery*. Adv Drug Deliv Rev, 2000. **42**(3): p. 165-73.
5. IOF, I.O.F.
6. Marcus R, F.D., Nelson DA, Rosen CJ, ed. *Osteoporosis*. 2008.
7. Seeman, E., *Bone quality: the material and structural basis of bone strength*. J Bone Miner Metab, 2008. **26**(1): p. 1-8.
8. Andreoli T.E, C.C., Bennett JC, Plum F. Cecil ed. *Βασική Παθολογία*. 2000: Αθήνα
9. Λυρίτης, Γ., *Μεταβολικά Νοσήματα των οστών* 2007: Αθήνα
10. Ahlborg, H.G., et al., *Bone loss and bone size after menopause*. N Engl J Med, 2003. **349**(4): p. 327-34.
11. Rosen CJ, B.M., *Mechanisms of disease: is osteoporosis the obesity of bone?* Nat Clin Pract Rheumatol., 2007.
12. Consensus Development Conference Diagnosis, p.a.t.o.o. 1993.
13. WHO, 1994.
14. Λυρίτης, Γ.Π., ed. *Μεταβολικά νοσήματα των οστών* 2013.
15. WHO, *Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis*.
16. *Position statement : executive summary. The Writing Group for the International Society for Clinical Densitometry (ISCD) Position Development Conference*. J Clin Densitom, 2004. **7**(1): p. 7-12.
17. *Diagnosis of osteoporosis in men, premenopausal women, and children*. J Clin Densitom, 2004. **7**(1): p. 17-26.
18. Russo, C.R., et al., *Aging bone in men and women: beyond changes in bone mineral density*. Osteoporos Int, 2003. **14**(7): p. 531-8.
19. Moayyeri, A., et al., *Quantitative ultrasound of the heel and fracture risk assessment: an updated meta-analysis*. Osteoporos Int, 2012. **23**(1): p. 143-53.
20. Μπαλτάς, Χ., ed. *Η αξία της Ποσοτικής Υπερηχομετρίας (QUS) στην πρόβλεψη των οστεοπορωτικών καταγμάτων* ed. E. Ακτινολογία. 2006.
21. Chin, I.-N.S., *Calcaneal quantitative ultrasound as a determinant of bone health status: what properties of bone does it reflect?* 2013.
22. National Osteoporosis Foundation, O.C.u. (2002).
23. Hernlund, E., et al., *Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA)*. Arch Osteoporos, 2013. **8**: p. 136.
24. Kanis, J.A., et al., *Long-term risk of osteoporotic fracture in Malmo*. Osteoporos Int, 2000. **11**(8): p. 669-74.

25. Johnell, O. and J.A. Kanis, *An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures*. Osteoporos Int, 2006. **17**(12): p. 1726-33.
26. Lyritis, G.P., et al., *Incidence of hip fractures in Greece during a 30-year period: 1977-2007*. Osteoporos Int, 2013. **24**(5): p. 1579-85.
27. Guggenbuhl, P., *Osteoporosis in males and females: Is there really a difference?* Joint Bone Spine 2009.
28. Haney, E.M. and M.M. Bliziotes, *Male osteoporosis: new insights in an understudied disease*. Curr Opin Rheumatol, 2008. **20**(4): p. 423-8.
29. Ebeling, P.R., *Osteoporosis in men*. Curr Opin Rheumatol, 2013. **25**(4): p. 542-52.
30. Cauley, J.A., *Defining ethnic and racial differences in osteoporosis and fragility fractures*. Clin Orthop Relat Res, 2011. **469**(7): p. 1891-9.
31. G. Albrand, F.M., *Independent predictors of all osteoporosis-related fractures in healthy postmenopausal women: the OFELY study*. Bone 2003.
32. B. Abrahamsen , P.V., *Ten-year absolute risk of osteoporotic fractures according to BMD T score at menopause: the Danish Osteoporosis Prevention Study*. J Bone Miner Res., 2006.
33. P. Ravn , G.C., *Low body mass index is an important risk factor for low bone mass and increased bone loss in early postmenopausal women. Early Postmenopausal Intervention Cohort (EPIC) study group*. J Bone Miner Res., 1999.
34. Karasik, D., et al., *Age, gender, and body mass effects on quantitative trait loci for bone mineral density: the Framingham Study*. Bone, 2003. **33**(3): p. 308-16.
35. JW, N., *Osteoporosis: the role of micronutrients*. Am J Clin Nutr., 2005.
36. WHO. 2000.
37. De Laet C1, K.J., Odén A, , *Body mass index as a predictor of fracture risk: a meta-analysis*. Osteoporos Int. , 2005.
38. Kanis JA1, J.H., *Alcohol intake as a risk factor for fracture*. Osteoporos Int., 2005.
39. de Vernejoul, M.C., et al., *Evidence for defective osteoblastic function. A role for alcohol and tobacco consumption in osteoporosis in middle-aged men*. Clin Orthop Relat Res, 1983(179): p. 107-15.
40. Kanis, J.A., et al., *Smoking and fracture risk: a meta-analysis*. Osteoporos Int, 2005. **16**(2): p. 155-62.
41. Ζαμπέλας, Α., ed. *Κλινική διαιτολογία και διατροφή με στοιχεία παθολογίας*. 2011.
42. J. Ilich , R.A.B., *To drink or not to drink: how are alcohol, caffeine and past smoking related to bone mineral density in elderly women?* J Am Coll Nutr., 2002.
43. MacInnis, R.J., et al., *Determinants of bone density in 30- to 65-year-old women: a co-twin study*. J Bone Miner Res, 2003. **18**(9): p. 1650-6.
44. KLTucker, K.M., *Colas, but not other carbonated beverages, are associated with low bone mineral density in older women: The Framingham Osteoporosis Study*. Am J Clin Nutr. , 2006.
45. de França NA1, C.M., *Dietary patterns and bone mineral density in Brazilian postmenopausal women with osteoporosis: a cross-sectional study*. Eur J Clin Nutr. , 2016.
46. Cashman, K.D., *Diet, nutrition, and bone health*. J Nutr, 2007. **137**(11 Suppl): p. 2507S-2512S.
47. Lanham-New, S.A., *Importance of calcium, vitamin D and vitamin K for osteoporosis prevention and treatment*. Proc Nutr Soc, 2008. **67**(2): p. 163-76.
48. *NIH Consensus conference. Optimal calcium intake. NIH Consensus Development Panel on Optimal Calcium Intake*. JAMA, 1994. **272**(24): p. 1942-8.

49. Nutr., C.R.F.S., *The role of nutrients in bone health, from A to Z*. 2006
50. Sunyecz, J., *The use of calcium and vitamin D in the management of osteoporosis*. Ther Clin Risk Manag., 2008.
51. *Nutrition and bone health: with particular reference to calcium and vitamin D. Report of the Subgroup on Bone Health, Working Group on the Nutritional Status of the Population of the Committee on Medical Aspects of the Food Nutrition Policy*. Rep Health Soc Subj (Lond), 1998. **49**: p. iii-xvii, 1-24.
52. Harvey NC, M.R., Javaid MK, et al., *Maternal 25(OH)-vitamin-D status in late pregnancy and mRNA expression of placental calcium transporter predict intrauterine bone mineral accrual in the offspring*. Bone. 2007, 2006.
53. Heaney, R.P. and D.K. Layman, *Amount and type of protein influences bone health*. Am J Clin Nutr, 2008. **87**(5): p. 1567S-1570S.
54. Orchard, T.S., et al., *A systematic review of omega-3 fatty acids and osteoporosis*. Br J Nutr, 2012. **107 Suppl 2**: p. S253-60.
55. Weber, P., *Vitamin K and bone health*. Nutrition, 2001. **17**(10): p. 880-7.
56. Shea, M.K. and S.L. Booth, *Update on the role of vitamin K in skeletal health*. Nutr Rev, 2008. **66**(10): p. 549-57.
57. Bolton-Smith, C., et al., *Two-year randomized controlled trial of vitamin K1 (phylloquinone) and vitamin D3 plus calcium on the bone health of older women*. J Bone Miner Res, 2007. **22**(4): p. 509-19.
58. Dai, Z. and W.P. Koh, *B-vitamins and bone health--a review of the current evidence*. Nutrients, 2015. **7**(5): p. 3322-46.
59. Castiglioni, S., et al., *Magnesium and osteoporosis: current state of knowledge and future research directions*. Nutrients, 2013. **5**(8): p. 3022-33.
60. Jacques, P.F. and K.L. Tucker, *Are dietary patterns useful for understanding the role of diet in chronic disease?* Am J Clin Nutr, 2001. **73**(1): p. 1-2.
61. Hu, F.B., *Dietary pattern analysis: a new direction in nutritional epidemiology*. Curr Opin Lipidol, 2002. **13**(1): p. 3-9.
62. Kontogianni, M.L., Yannakoulia M, Malagaris I, Panagiotakos , Yiannakouris N., *Association between dietary patterns and indices of bone mass in a sample of Mediterranean women*. Nutrition, 2009.
63. Benetou, V., et al., *Mediterranean diet and incidence of hip fractures in a European cohort*. Osteoporos Int, 2013. **24**(5): p. 1587-98.
64. Παναγιωτάκος, Δ., ed. *Μεθοδολογία της Έρευνας και της Ανάλυσης Δεδομένων για τις επιστήμες της υγείας*. 2011: Αθήνα
65. Romero Perez, A. and A. Rivas Velasco, *Adherence to Mediterranean diet and bone health*. Nutr Hosp, 2014. **29**(5): p. 989-96.
66. Rivas, A., et al., *Mediterranean diet and bone mineral density in two age groups of women*. Int J Food Sci Nutr, 2013. **64**(2): p. 155-61.
67. Lin, P.H., et al., *The DASH diet and sodium reduction improve markers of bone turnover and calcium metabolism in adults*. J Nutr, 2003. **133**(10): p. 3130-6.
68. Fenton, T.R., et al., *Meta-analysis of the quantity of calcium excretion associated with the net acid excretion of the modern diet under the acid-ash diet hypothesis*. Am J Clin Nutr, 2008. **88**(4): p. 1159-66.
69. Nicoll, R. and J. McLaren Howard, *The acid-ash hypothesis revisited: a reassessment of the impact of dietary acidity on bone*. J Bone Miner Metab, 2014. **32**(5): p. 469-75.
70. Tucker, K.L., et al., *Bone mineral density and dietary patterns in older adults: the Framingham Osteoporosis Study*. Am J Clin Nutr, 2002. **76**(1): p. 245-52.

71. Shin, S., *Joung A fruit, milk and whole grain dietary pattern is positively associated with bone mineral density in Korean healthy adults*. Eur J Clin Nutr., 2015.
72. Okubo, H., et al., *Dietary patterns associated with bone mineral density in premenopausal Japanese farmwomen*. Am J Clin Nutr, 2006. **83**(5): p. 1185-92.
73. Smith, A.M., *Veganism and osteoporosis: a review of the current literature*. Int J Nurs Pract, 2006. **12**(5): p. 302-6.
74. SA, N., *Do vegetarians have a normal bone mass?* Osteoporos Int., 2004.
75. Boudin, E., et al., *Genetic control of bone mass*. Mol Cell Endocrinol, 2015.
76. Lee, M., et al., *Genome-wide linkage scan for quantitative trait loci underlying normal variation in heel bone ultrasound measures*. J Nutr Health Aging, 2012. **16**(1): p. 8-13.
77. Moayyeri, A., et al., *Genetic determinants of heel bone properties: genome-wide association meta-analysis and replication in the GEFOS/GENOMOS consortium*. Hum Mol Genet, 2014. **23**(11): p. 3054-68.
78. Pearson TA1, M.T., *How to interpret a genome-wide association study*. JAMA 2008.
79. Rivadeneira, F., et al., *Twenty bone-mineral-density loci identified by large-scale meta-analysis of genome-wide association studies*. Nat Genet, 2009. **41**(11): p. 1199-206.
80. Richards, J.B., H.F. Zheng, and T.D. Spector, *Genetics of osteoporosis from genome-wide association studies: advances and challenges*. Nat Rev Genet, 2012. **13**(8): p. 576-88.
81. Richards, J.B., et al., *Collaborative meta-analysis: associations of 150 candidate genes with osteoporosis and osteoporotic fracture*. Ann Intern Med, 2009. **151**(8): p. 528-37.
82. Scheideler, M., et al., *Comparative transcriptomics of human multipotent stem cells during adipogenesis and osteoblastogenesis*. BMC Genomics, 2008. **9**: p. 340.
83. Fazeli, P.K., et al., *Marrow fat and bone--new perspectives*. J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(3): p. 935-45.
84. AC, F.-W., *Dietary Patterns, Genes, and Health: Challenges and Obstacles to be Overcome*. Curr Nutr Rep., 2015.
85. M. Karamati M, M.J., *Dietary patterns in relation to bone mineral density among menopausal Iranian women*. Calcif Tissue Int. , 2012.
86. Rizzoli, R., *Dairy products, yogurts, and bone health*. Am J Clin Nutr, 2014. **99**(5 Suppl): p. 1256S-62S.
87. Cao, J.J. and F.H. Nielsen, *Acid diet (high-meat protein) effects on calcium metabolism and bone health*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2010. **13**(6): p. 698-702.
88. Gonnelli, S., et al., *Quantitative ultrasound and dual-energy X-ray absorptiometry in the prediction of fragility fracture in men*. Osteoporos Int, 2005. **16**(8): p. 963-8.