ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Αξιολόγηση οστικών παραμέτρων μετά από παρέμβαση με ψάρι

ΧΡΥΣΑΝΘΗ ΓΙΑΛΛΟΥΡΟΥ
Α.Μ: 4421213

Τριμελής Επιτροπή
Κοντογιάννη Μερόπη (επιβλέπουσα)
Αντωνοπούλου Σμαραγδή
Τέντα Ρωξάνη

Αθήνα 2014

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών « Εφαρμοσμένη Διαιτολογία Διατροφή » στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο.

Στην κύρια Κοντογιάννη οφείλω τις θερμές μου ευχαριστίες για την καθοδήγηση και την υποστήριξή της καθ ’ όλη τη διάρκεια διεκπεραίωσης της παρούσας πτυχιακής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην κ. Ρωξάνη Τέντα, χωρίς την βοήθεια της οποίας η ολοκλήρωση αυτής της μελέτης θα ήταν αδύνατη, για το αμείωτο ενδιαφέρον και τη συμπαράστασή της, τόσο κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους όσο και κατά τη συγγραφή του.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου για τις γνώσεις που μου πρόσφεραν.

Ευχαριστίες οφείλω σε όλη την ερευνητική ομάδα για την συλλογή του δείγματος καθώς και για όλα τα δεδομένα που συγκέντρωσαν.

Τέλος, ευχαριστώ από καρδιάς, τους γονείς μου, χωρίς την ηθική και οικονομική στήριξη των οποίων δε θα είχα τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω τις μεταπτυχιακές μου σπουδές.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αδερφό μου και τους φίλους μου Ανδρέα και Ευαγγελία για τη συνεχή συμπαράσταση, την αγάπη και την κατανόηση που έδειξαν όλο αυτόν τον καιρό.

Σας ευχαριστώ!!!

Χ.Γ.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 10

1.1. Λειτουργία των οστών 10

1.2. Φυσιολογία του οστίτη ιστού 11

1.2.1. Οστικά κύτταρα 11

1.2.2. Τύποι οστίτη ιστού 12

1.2.3. Οστική αναδιαμόρφωση (Bone Remodelling) 13

1.2.4. Οστική αναδιαμόρφωση και η ρύθμισή της 13

1.3. Παράγοντες που επηρεάζουν το οστικό μεταβολισμό 15

1.3.1. Ορμόνες 15

1.3.2. Τοπικοί παράγοντες 18

1.4. Ομοιόσταση ασβεστίου 19

1.5. Ομοιόσταση φωσφόρου 20

1.6. Δείκτες οστικού μεταβολισμού 21

1.6.1. RANKL 21

1.6.2. Οστεοπροτεγερίνη (OPG) 21

1.7. Ρυθμιστές του δικτύου RANK, RANKL, OPG 22

1.8. Ο λόγος RANKL / OPG 24

1.8.1. Ο λόγος RANKL / OPG σε μεταβολικές ασθένειες των οστών. 24

1.9. Θρεπτικά συστατικά του ψαριού 25

1.10. Διαιτητικά λιπίδια 26

1.10.1. Βιοδραστικά λιπαρά οξέα 26

1.10.2. Συζευγμένο λινελαϊκό οξύ 28

1.10.3. Πηγές πολυακόρεστων λ.ο 28

1.11. Πολυακόρεστα λ.ο στο μεταβολισμό των οστών 29

1.12. Σκοπός της μελέτης 39

2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ 40

2.1. Συμμετέχοντες 40

2.2. Σχεδιασμός της μελέτης 40

2.3. Αξιολογήσεις της παρέμβασης 41

2.3.1. Ανθρωπομετρικές αξιολογήσεις 41

2.3.2. Αξιολόγηση διαιτητικής και σωματικής δραστηριότητας 41

2.3.3. Εργαστηριακές μετρήσεις 43

2.4. Μέτρηση δεικτών οστικού μεταβολισμού 43

2.5. Στατιστική ανάλυση 43

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 45
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ 53
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 60
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 61

Κατάλογος συντμήσεων:

- $1,25(OH)_2D_3$ - 1,25 διϋδρόξυβιταμίνη D_3
- AA - Arachidonic acid - Αραχιδονικό οξύ
- ALP - Alkaline phosphatase - Αλκαλική φωσφατάση
- BFR - Bone formation rate - Ρυθμός οστικού σχηματισμού
- CLA - Conjugated linoleic acids - Συζευγμένο λινελαϊκό οξύ
- COX - Cyclooxygenase - Κυκλοοξυγονάση
- DGLA - Dihomo-g-linolenic acid - Διόμο- γ - λινολενικό οξύ
- DHA- Docosahexaenoic acid- Εικοσιδυεξαενοϊκό οξύ
- EFA - Essential fatty acids - Απαραίτητα λιπαρά οξέα
- EPA - Eicosapentaenoic acid - Εικοσαπενταενοϊκό οξύ
- GLA - g Linolenic acid - γ- λινολενικό οξύ
- IGF-1 - Insulin-like growth factor - Ινσουλινο μιμητικός αυξητικός παράγοντας 1
- IGFBP - IGF binding proteins - Δεσμευτικές πρωτεΐνες του ινσουλινο-μιμητικού αυξητικού παράγοντα
- IL-1 - Interleukin – Ιντελευκίνη - 1
- L.A - Linoleic acid - Λινελαϊκό οξύ
- LNA - Linolenic acid - A - λινολενικό οξύ
- MC3T3-E1 - Κυτταρικές καλλιέργειες οστεοβλαστών
- PGE - Prostaglandin E - Προσταγλανδίνη Ε
- SBO - Soybean oil - Λάδι σόγιας
- SFA - Saturated fatty acids - Κορεσμένα λιπαρά οξέα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή-Σκοπός: Μελέτες που έγιναν τα τελευταία χρόνια έδειξαν ότι τα λιπαρά οξέα των ψαριών (πολυακόρεστα λιπαρά οξέα) επηρεάζουν τον οστικό μεταβολισμό. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση των οστικών παραμέτρων μετά από παρέμβαση με ψάρι (τσιπούρα) για διάρκεια 8 εβδομάδων.

Μεθοδολογία: Στη μελέτη συμμετείχαν 20 υγιείς άντρες και γυναίκες που κατανάλωναν 380 γρ. τσιπούρα / 2 φορές την βδομάδα για 8 βδομάδες τα οποία έψηναν οι ίδιοι στο φούρνο / σχάρα / κάρβουνα. Αξιολογήθηκαν τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά, οι διατροφικές συνήθειες, η σωματική δραστηριότητα και έγιναν εργαστηριακές μετρήσεις πριν και μετά το τέλος της παρέμβασης. Οι συγκεντρώσεις των δεικτών οστικού μεταβολισμού OPG και RANKL αξιολογήθηκαν με τη μέθοδο Elisa, και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το Graph Pad Prism 5. Η στατιστική ανάλυση έγινε με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 16.0.

Αποτελέσματα:

Όσον αφορά στη διαιτητική πρόσληψη κατά το τέλος της παρέμβασης παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της κατανάλωσης ψαριού (0,1±0,1 έναντι 0,6±0,1, $p<0,001$) . Επίσης σημαντική μείωση παρατηρήθηκε στην κατανάλωση οσπρίων ($p=0.035$), ενώ το ποσοστό της ημερήσιας κατανάλωσης πρωτεϊνών αυξήθηκε στο τέλος της παρέμβασης (14,3±2,56 έναντι 15,4±3,03, $p=0,004$). Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην ημερήσια κατανάλωση υδατανθράκων, λιπών και θερμίδων. Όσον αφορά στους δείκτες οστικού μεταβολισμού (OPG, RANKL) και στο λόγο OPG / RANKL δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές, στο σύνολο του δείγματος αλλά ούτε και στο σύνολο των αντρών και των γυναικών, αντίστοιχα (όλα τα $p>0,05$). Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της μεταβολής της συγκέντρωσης του RANKL και της μεταβολής του δείκτη προσκόλλησης στην Μεσογειακή διατροφή ($r=0,475$, $p=0,034$). Επίσης στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση υπήρξε μεταξύ της μεταβολής της κατανάλωσης θερμίδων και της μεταβολής στο λόγο OPG / RANKL ($r=-0,584$, $p=0,007$) και της μεταβολής της συγκέντρωσης της OPG και της μεταβολής του ΔΜΣ ($r=-0,520$, $p=0,019$). Τέλος, στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση υπήρχε και στην μεταβολή της κατανάλωσης θερμίδων και της μεταβολής της συγκέντρωσης της OPG ($r=-0,606$, $p=0,005$).

Συμπεράσματα: Η κατανάλωση τσιπούρας για οκτώ εβδομάδες δεν φαίνεται να επηρεάζει τον μεταβολισμό των οστών. Θα πρέπει να γίνουν και άλλες μελέτες προκειμένου να διερευνηθεί διεξοδικά η πιθανή επίδραση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στον οστικό μεταβολισμό.

Λέξεις κλειδιά: πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, οστικός μεταβολισμός, οστεοπροτεγερίνη, RANKL

ABSTRACT

Introduction: In studies conducted recently, it was shown that the fatty acids of fish (polyunsaturated fatty acids) affect bone metabolism. The aim of the present study was to assess bone parameters after the intervention with the consumption of bream for 8 weeks.

Methodology: Twenty healthy men and women consumed 380 g. bream / 2 times a week for 8 weeks which were baked by themselves in the oven / grill / charcoal. Anthropometric characteristics, dietary habits and physical activity were evaluated and laboratory measurements were performed, before and after the intervention. Elisa method was used to measure the OPG (Osteoprotegerin) and RANKL (Receptor activator of nuclear factor-kappaB Ligand) levels and data were analyzed using Graph Pad Prism 5. SPSS 16 software was used for the statistical calculations.

Results:

With regard to dietary intake at the end of the intervention, a statistically significant increase in fish consumption was observed at the end of the intervention (0.1±0.1 vs. 0.6±0.1, p<0,001). A significant decrease was observed in legume consumption (p = 0.035), while the percentage of the daily protein intake was increased at the end of the intervention (14.3±2.56 vs. 15.4±3.03, p=0.004). No significant changes were observed in the intake of carbohydrates, fats and calories. With regard to bone metabolism indicators (OPG, RANKL) and the ratio OPG / RANKL no statistically significant changes were observed in the total sample nor to all men and women, respectively (all p>0.05). A statistically significant positive correlation between the change in concentration of RANKL and the change in the index Mediterranean diet adherence was observed (r=0.475, p=0.034). There was also a statistically significant negative correlation between the change in calorie consumption and the change in the ratio OPG / RANKL (r=-0.584, p= 0.007) and the change in concentration of OPG and the change in BMI (r=-0.520, p = 0.019). Finally, there was a statistically significant negative correlation between the calorie consumption change and the change in concentration of OPG (r=-0.606, p=0.005).

Conclusions: In conclusion, the consumption of sea bream for 8 weeks did not appear to alter bone metabolism. However, more studies are needed in order to fully assess the role of polyunsaturated fatty acids on bone metabolism.

Key words: polyunsaturated fatty acids, bone metabolism, osteoprotegerin, RANKL

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το οστό είναι ένα πολυλειτουργικό όργανο που αποτελείται από ένα δομικό πλαίσιο μεταλλοποιημένου πλέγματος που φιλοξενεί χονδροκύτταρα, οστεοβλάστες, οστεοκυττάρα, οστεοκλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρά, μονοκύτταρα, μακροφάγα, λεμφοκύτταρα και αιμοποιητικά κύτταρά. Αυτά τα κύτταρα παράγουν μια ποικιλία βιολογικών ρυθμιστών που ελέγχουν το τοπικό μεταβολισμό των οστών. Το σύστημα καλσιτροπικών ορμονών (όπως είναι η παραθυρεοειδής ορμόνη [PTH], τα οιστρογόνα, η 1,25 διϋδροξυβιταμίνη D3), αυτοκρινείς και παρακρινείς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των προσταγλανδινών, των κυτταροκινών και των αυξητικών παραγόντων, ενορχηστρώνουν τις κυτταρικές δραστηριότητες αναδιαμόρφωσης των οστών για τη αύξηση του μήκους και της διαμέτρου των οστών. *(1)*

Οι οστεοβλάστες πραγματοποιούν την επιμετάλλωση, ενώ οι οστεοκλάστες πραγματοποιούν την οστική απορρόφηση *(2)*. Η συνδυασμένη και συνεργατική δραστηριότητα των οστεοβλαστών και οστεοκλαστών οδηγεί σε μια αρχιτεκτονική οστών που παρέχει μηχανική στήριξη και προστασία και που χρησιμεύει ως ζωτική δεξαμενή μετάλλων, κυρίως ασβεστίου και φωσφόρου, που απαιτούνται για τη διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού. *(1)*

1.1. Λειτουργία των οστών

Οι λειτουργίες των οστών είναι:

- Στηρίζουν το σώμα, αντιστέκονται στη βαρύτητα.
- Προσφέρουν ακαμψία στο σώμα, η οποία καθιστά το βάδισμα δυνατό.
- Προστατεύουν τα εσωτερικά όργανα δημιουργώντας τον θωρακικό κλωβό, τους σπονδύλους και το κρανίο.
- Αποθηκεύουν ασβέστιο, ανόργανα φωσφορικά και άλλα μέταλλα.
- Ο μυελός των οστών παράγει τα κύτταρα του αίματος. (3)

1.2. Φυσιολογία του οστίτη ιστού

Το οστό αποτελείται κυρίως από εξωκυττάρια θεμέλια ουσία αποτελούμενη από πρωτεΐνες και κρυστάλλους υδροξυαπατίτη και από ένα μικρό πληθυσμό κυττάρων. Η θεμέλια ουσία παρέχει αντοχή και σταθερότητα. Τα οστικά κύτταρα αναδιαμορφώνουν το οστό διαρκώς, προκειμένου να εξασφαλίσουν την αύξηση και να επιτρέψουν το σχηματισμό οστού ως απάντηση στις μηχανικές πιέσεις. *(4)*

1.2.1. Οστικά κύτταρα

Στο οστό διακρίνουμε τρία βασικά είδη οστικών κυττάρων, τους οστεοβλάστες, τους οστεοκλάστες και τα οστεοκύτταρα.

1.2.1.i. Οστεοβλάστες

Οι οστεοβλάστες εμπλέκονται στον οστικό σχηματισμό. (4) Οι οστεοβλάστες είναι μονοπύρηνα κύτταρα που προέρχονται από τα μεσεγχυματικά κύτταρα του στρώματος. (5) Οι οστεοβλάστες είναι υπεύθυνοι για την σύνθεση, την έκκριση, την οργάνωση και την επιμετάλλωση των οστών. Το οστεοειδές αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο τύπου Ι και από άλλες μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες, όπως η οστεοποντίνη, οστεονεκτίνη και η οστεοκαλσίνη. Οι οστεοβλάστες εκκρίνουν ποικίλες άλλες μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του οστεοειδούς, συμπεριλαμβανομένων της λαμινίνης, της διγλυκάνης, της ντεκορίνης και της γαλεκτίνης-3. (5,6) Οι οστεοβλάστες εκκρίνουν κολλαγόνο για να σχηματισθεί το περιβάλλον πλέγμα το οποίο ακολούθως ασβεστοποιείται. Μετά το σχηματισμό του, το οστεοειδές κανονικά υφίσταται ταχεία επιμετάλλωση με ασβέστιο και φώσφορο. (7) Οι οστεοβλάστες παράγουν επίσης πολλούς ρυθμιστικούς παράγοντες όπως προσταγλανδίνες, κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες (8-11).

1.2.1.ii. Οστεοκλάστες

Οι οστεοκλάστες είναι μεγάλα πολυπύρηνα κύτταρα που διεγείρουν την οστική απορρόφηση και βρίσκονται στις επιφάνειες αύξησης του οστού. (12,13) Κατά την διάρκεια της οστικής απορρόφησης, οι οστεοκλάστες παράγουν και απελευθερώνουν λυσοσωμικά ένζυμα, ιόντα υδρογόνου και ελεύθερες ρίζες. Οι παράγοντες που αναστέλλουν την απορρόφηση του οστού διεγείρουν και την απόπτωση των οστεοκλαστών. Αυτές οι ενώσεις περιλαμβάνουν τα οιστρογόνα, τα γλυκοκορτικοειδή, τον TGF-b, τα διφωσφονικά και την οστεοπροτεγερίνη που παρόμοια με τους ρυθμιστές της οστεοκλαστικής δραστηριότητας, μπορούν να δρουν απευθείας στους οστεοκλάστες ή έμμεσα μέσω των οστεοβλαστών. (14-18)

1.2.1.iii. Οστεοκύτταρα

Τα οστεοκύτταρα βρίσκονται μέσα στο οστικό πλέγμα και προέρχονται από οστεοβλάστες που έχουν εγκλωβιστεί μέσα στο οστό. Φαίνεται να παίζουν ρόλο στην μεταφορά αλάτων από το εσωτερικό του οστού προς την επιφάνεια αύξησης. Τα οστεοκύτταρα φέρουν επιμήκης κυτταροπλασματικές προεκτάσεις κατά μήκος του οστού και σχηματίζουν στεγανές συνδέσεις με άλλα οστεοκύτταρα. Η οστική ανακατασκευή δημιουργείται σε μια συντονισμένη αλληλεπίδραση μεταξύ της οστεοβλαστικής και της οστεοκλαστικής δραστηριότητας. (4)

1.2.2. Τύποι οστίτη ιστού

Το οστό αποτελείται από δύο είδη οστίτη ιστού, τον φλοιώδη και τον δοκιδώδη. Το φλοιώδες οστό είναι ένα εξωτερικό περίβλημα (φλοιός) των οστών και σχηματίζει το σώμα των μακρών οστών του οργανισμού. Πρόκειται για ένα πυκνό ιστό που αποτελείται κυρίως από άλατα και από συστατικά του εξωκυττάριου πλέγματος, που διακόπτεται μόνο από αγγεία τα οποία διεισδύουν στον πυκνό ιστό και από ένα διάσπαρτο πληθυσμό οστεοκυττάρων που είναι εγκλωβισμένα στο οστό. Τα οστεοκύτταρα αυτά συνδέονται μεταξύ τους και με τους οστεοβλάστες με βοθρία στην επιφάνεια του οστού μέσω των οποίων τα οστεοκύτταρα εκτείνουν κυτταρικές αποφύσεις. Οι συνδέσεις αυτές επιτρέπουν την μεταφορά Ca^{2+} από το εσωτερικό

του οστού στην επιφάνεια, μια διαδικασία που καλείται ως *οστεοκυτταρική οστεόλυση*.

Το δοκιδώδες (ή σπογγώδες ή μυελώδες) οστό αποτελεί το 20% περίπου της συνολικής οστικής μάζας. Βρίσκεται στο εσωτερικό των οστών και είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τους σπονδύλους. Αποτελείται από λεπτές δοκίδες που εκτείνονται από το φλοιό μέχρι τη μυελική κοιλότητα. Το πλέγμα των οστικών δοκίδων συνορεύει σε πολλές περιοχές με οστεοβλάστες και οστεοκλάστες με τα κύτταρα δηλαδή που εμπλέκονται στην οστική ανακατασκευή. Το δοκιδώδες οστό συντίθεται και απορροφάται συνεχώς από τα κύτταρα αυτά. Παρόμοια οστική αναδόμηση παρατηρείται στο φλοιώδη οστό αλλά το ποσοστό αναδόμησης είναι πολύ μικρότερο. *(4)*

1.2.3. Οστική αναδιαμόρφωση (Bone Remodelling)

Η οστική αναδιαμόρφωση περιγράφει τις συνεχείς αλλαγές στο σχήμα των οστών, το μήκος, το πλάτος και όλη την ανάπτυξη ενός ατόμου με σκοπό την αύξηση της σκελετικής μάζας και την μεταβαλλόμενη σκελετική μορφολογία. Η αναδιαμόρφωση είναι υπεύθυνη για το σχήμα των οστών. Η αναδιαμόρφωση των οστών είναι μια προσαρμοστική διαδικασία, παρέχοντας εξειδίκευση στην αύξηση της οστικής μάζας που συνοδεύει την ανάπτυξη του σώματος. Κατά την διαδικασία αναδιαμόρφωσης το 100% των επιφανειών των οστών είναι ενεργό μέχρι να επιτευχθεί το κατάλληλο μέγεθος και σχήμα του οστού. *(19)* Ο συντονισμός της απορρόφησης του οστού και των δραστηριοτήτων σχηματισμού του οστού ονομάζεται «κύκλος οστικής ανακατασκευής». *(18)* Η αναδιαμόρφωση των οστών περιλαμβάνει την απομάκρυνση και την εσωτερική αναδιάρθρωση των παλαιότερων οστών και είναι υπεύθυνη για την διατήρηση της μάζας και της αρχιτεκτονικής των ιστών στο σκελετό του ενήλικα. *(20)*

1.2.4. Οστική αναδιαμόρφωση και η ρύθμισή της

Οι κυτταρικές αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν στον κύκλο αναδιαμόρφωσης χωρίζονται σε πέντε κύριες φάσεις, *την ηρεμία*, *την ενεργοποίηση*, *την απορρόφηση*, *την αντιστροφή* και *το σχηματισμό*. *(21)*

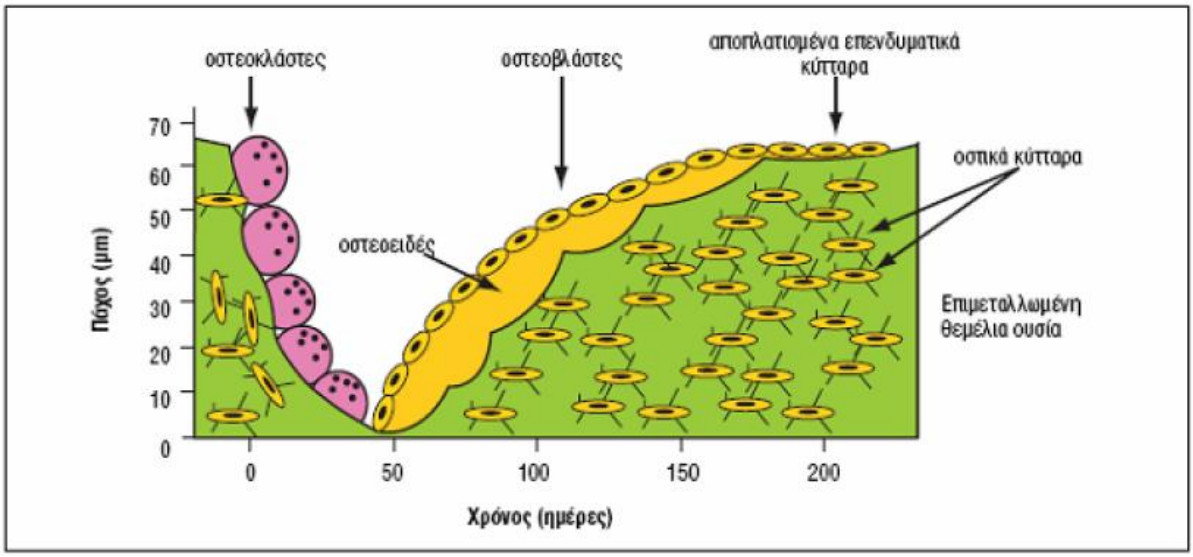
1. Φάση ηρεμίας (quiescent phase): Η ελεύθερη επιφάνεια της μονάδος επιστρώνεται από επενδυτικά κύτταρα τα οποία είναι για την ώρα ανενεργά.

2. Φάση ενεργοποίησης (activation phase): Στη φάση αυτή ένας διεγέρτης των οστεοκλαστών, κινητοποιεί τους προ- οστεοβλάστες που συντηκόμενοι σε πολυπύρηνα γιγαντοκύτταρα σχηματίζουν τους οστεοκλάστες, οι οποίοι συγκεντρώνονται στην επιφάνεια της μονάδας.

3. Φάση οστικής απορρόφησης (resorption phase): Η φάση αυτή διαρκεί 3-4 εβδομάδες στο σπογγώδες και 6-10 εβδομάδες στο φλοιώδες. Κατά την διάρκεια της φάσης αυτής οι επιστρατευμένοι στην ελεύθερη επιφάνεια οστεοκλάστες απορροφούν προοδευτικά την αποτιτανωμένη θεμέλια ουσία αδειάζοντας έτσι το περιεχόμενο της μεταβολικής μονάδας.

4. Φάση κυτταρικής αναστροφής (reversal phase): Στη φάση αυτή οι οστεοκλάστες αποκολλώνται και απομακρύνονται από τον πυθμένα της μεταβολικής μονάδας και στη θέση τους εμφανίζονται οι οστεοβλάστες.

5. Φάση οστικής παραγωγής (formation phase): Στη φάση αυτή που διαρκεί 2-3 μήνες στο φλοιώδες οστό και 145 περίπου ημέρες στο σπογγώδες οστό, οι οστεοβλάστες εναποθέτουν προοδευτικά.



Εικόνα 1: Οστική αναδιαμόρφωση

Αυξητικοί παράγοντες και κυτταροκίνες, που είχαν προηγουμένως παραχθεί από τους οστεοβλάστες και ενσωματώθηκαν στο οστό, είναι διαθέσιμοι σε τοπικό επίπεδο ως αυτοκρινείς / παρακρινείς παράγοντες κατά τη διάρκεια της

οστεοκλαστικής απορρόφησης του οστού. Αυτοί οι παράγοντες κατευθύνουν τον πολλαπλασιασμό και την προσέλκυση νέων οστεοβλαστών στο συγκεκριμένο σημείο και ως εκ τούτου ρυθμίζουν τον κύκλο οστικής αναδιαμόρφωσης. *(8,10,22)*

1.3. Παράγοντες που επηρεάζουν το οστικό μεταβολισμό

Οι δραστηριότητες του σχηματισμού του οστού και απορρόφησης του οστού ρυθμίζονται από ορμόνες και από τους παράγοντες που παράγονται τοπικά στον οστίτη ιστό**.** *(8,10,23,34)*

1.3.1. Ορμόνες

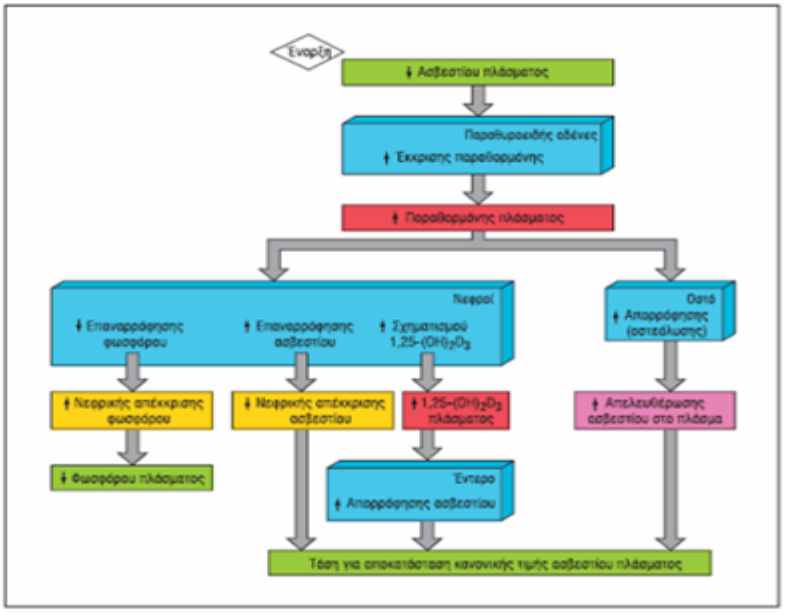
Οι ορμόνες που επηρεάζουν τον οστικό μεταβολισμό είναι η παραθορμόνη, η βιταμίνη D, η καλσιτονίνη, τα οιστρογόνα, τα ανδρογόνα, τα γλυκοκορτικοειδή, οι θυρεοειδές ορμόνες, η αυξητική ορμόνη, η ινσουλίνη και η λεπτίνη.

Οι ορμόνες που εμπλέκονται στη διέγερση του σχηματισμού του οστού είναι η αυξητική ορμόνη *(25)* και τα οιστρογόνα *(26)* ενώ εκείνες που βοηθούν στην απορρόφηση του οστού είναι η 1,25 διυδρόξυβιταμίνη D_3 *(27),* η παραθορμόνη (*28),* οι ορμόνες του θυρεοειδούς *(29)* και τα γλυκοκορτικοστεροειδή, ενώ η καλσιτονίνη αναστέλλει την απορρόφηση του οστού *(30).*

1.3.1.i. Παραθορμόνη

Και τα τρία όργανα τα οποία περιγράφονται παρακάτω υπόκειται σε άμεσο ή έμμεσο λειτουργικό έλεγχο από μία πρωτεϊνική ορμόνη ονομαζόμενη παραθορμόνη και η οποία παράγεται από τους παραθυρεοειδείς αδένες. Οι αδένες αυτοί βρίσκονται πίσω από το θυρεοειδή αδένα. Η παραγωγή της παραθορμόνης ελέγχεται από την συγκέντρωση του εξωκυττάριου ασβεστίου η οποία δρα άμεσα πάνω στα εκκριτικά κύτταρα των αδένων μέσω αντίστοιχων μεμβρανικών υποδοχέων. Η μείωση της συγκέντρωσης του ασβεστίου του πλάσματος διεγείρει την έκκριση της παραθορμόνης. Η παραθορμόνη ασκεί πολλαπλές δράσεις οι οποίες αυξάνουν την συγκέντρωση ασβεστίου στο πλάσμα σώματος, αντισταθμίζοντας έτσι την μειωμένη συγκέντρωση η οποία διεγείρει την έκκριση αυτής της ορμόνης.

- Αυξάνει άμεσα την οστική απορρόφηση από τους οστεοκλάστες η οποία επιφέρει μεταφορά ασβεστίου (και φωσφορικών ιόντων) από το οστό στο εξωκυτταρικό υγρό.
- Διεγείρει άμεσα τον σχηματισμό της 1,25 – διϋδροξυβιταμίνης D_3, η οποία αυξάνει την εντερική απορρόφηση του ασβεστίου. Έτσι η επίδραση της παραθορμόνης στο εντερικό σωλήνα είναι έμμεση.
- Αυξάνει άμεσα την νεφρική σωληναριακή επαναρρόφηση του ασβεστίου, μειώνοντας έτσι την απέκκρισή του στα ούρα.
- Μειώνει άμεσα τη σωληναριακή επαναρρόφηση των φωσφορικών ιόντων αυξάνοντας έτσι την απέκκρισή τους στα ούρα. (3)



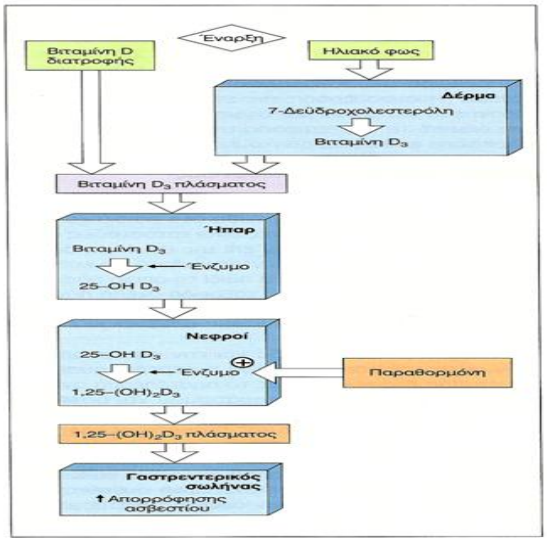
Εικόνα 2: Ο ρόλος της παραθορμόνης στη ρύθμιση των επιπέδων ασβεστίου στο αίμα. *(3)*

1.3.1.ii. 1,25 διϋδρόξυβιταμίνη D_3

Η βιταμίνη D_3 σχηματίζεται από την δράση της υπεριώδους ακτινοβολίας (συνήθως είναι το ηλιακό φώς) στο δέρμα πάνω σε ένα παράγωγο της χοληστερόλης (7 – διυδρόχοληστερόλη). Ένας άλλος τύπος βιταμίνης D, παρόμοιος με την βιταμίνη D_3 προσλαμβάνεται με την τροφή. Λόγω της ενδυμασίας, των περιορισμένων υπαίθριων δραστηριοτήτων ή και της έλλειψης ηλιακού φωτός σε κάποιες χώρες, ο άνθρωπος συχνά εξαρτάται από τη διατροφική λήψη της βιταμίνης D και για αυτό το λόγο το συστατικό αυτό ταξινομήθηκε αρχικά ως βιταμίνη.

Ανεξάρτητα όμως από την πηγή προέλευσής της, η βιταμίνη D_3 μεταβολίζεται πρώτα στο ήπαρ και μετά σε συγκεκριμένα νεφρικά σωληναριακά κύτταρα, με την προσθήκη υδροξυλικών ομάδων. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η 1,25 διυδρόξυ-βιταμίνη D_3 (σύντμηση 1,25 $(OH)_2$ D_3) ονομαζόμενη και *καλσιτριόλη* αποτελεί το δραστικό τύπο της βιταμίνης D. Η κύρια δράση της 1,25 $(OH)_2D_3$ είναι η διέγερση της απορρόφησης ασβεστίου από το έντερο. Γι αυτό, σε ανεπάρκεια της βιταμίνης D η κύρια επίδραση είναι η μειωμένη εντερική απορρόφηση ασβεστίου η οποία επιφέρει μείωση της συγκέντρωσης ασβεστίου στο πλάσμα.

Η κύρια δράση της 1,25 $(OH)_2$ D_3 εντοπίζεται στο έντερο, όπου αυξάνει την απορρόφηση ασβεστίου. Γι αυτό, όταν παρατηρείται ανεπάρκεια ορμόνης D, η εντερική απορρόφηση του ασβεστίου είναι μειωμένη και συνεπακόλουθα είναι μειωμένη και η συγκέντρωση ασβεστίου στο πλάσμα. Η συγκέντρωση της 1,25 $(OH)_2$ D_3 στο αίμα υπόκειται σε φυσιολογικό έλεγχο. Το κύριο σημείο ελέγχου είναι το δεύτερο στάδιο υδροξυλίωσης το οποίο επιτελείται στους νεφρούς. Το ένζυμο το οποίο καταλύει την αντίστοιχη αντίδραση διεγείρεται από την παραθορμόνη. Έτσι, η χαμηλή συγκέντρωση ασβεστίου στο πλάσμα διεγείρει την έκκριση της παραθορμόνης, η οποία με την σειρά της ενισχύει την παραγωγή της 1,25 $(OH)_2D_3$ και αμφότερες οι ορμόνες αυτές συμβάλλουν στην επαναφορά των φυσιολογικών τιμών ασβεστίου στο πλάσμα. *(3)*



Εικόνα 2: Μεταβολισμός βιταμίνης D σε ενεργή μορφή 1,25$(OH)_2D_3$.

1.3.1.iii. Καλσιτονίνη

Η καλσιτονίνη είναι μια ορμόνη που εκκρίνεται από τα «παραθυλακιώδη» κύτταρα τα οποία παρότι βρίσκονται εντός του θυρεοειδούς αδένα αποτελούν αυτούσιες οντότητες διάσπαρτα ανάμεσα στα κύτταρα των θυρεοειδικών θυλακίων. Η καλσιτονίνη ελαττώνει τη συγκέντρωση του ασβεστίου στο πλάσμα κυρίως αναστέλλοντας τη δράση των οστεοκλαστών, μειώνοντας έτσι την οστεόλυση. Η έκκρισή της διεγείρεται από την αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου στο πλάσμα, δηλαδή από το αντίθετο ερέθισμα από εκείνο που προκαλεί την έκκριση της παραθορμόνης και της $1,25(OH)_2D_3$. Η καλσιτονίνη δεν παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της συγκέντρωσης του ασβεστίου στο πλάσμα. Η κύρια δράση της εντοπίζεται στην προστασία του σκελετού του σώματος από υπερβολική οστεόλυση σε ασβεστιοαπαιτητικές περιόδους όπως είναι η ανάπτυξη, η εγκυμοσύνη και η γαλουχία. *(3)*

1.3.2. Τοπικοί παράγοντες

Οι κυτταροκίνες είναι εξωκυτταρικές πρωτεΐνες που εκκρίνονται μέσω δραστικών κυττάρων (effectors cells) που δρουν στα κύτταρα-στόχους με αυτοκρινή ή παρακρινή τρόπο. Οι κυτταροκίνες που εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση του οστού (remodeling) είναι ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (FGF), η ιντερφερόνη (IFN–γ), οι ιντερλευκίνες (IL-1, IL-6), ο αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από τα αιμοπετάλια (PDGF), οι μετατρεπτικοί αυξητικοί παράγοντες (TGFa, TGF-β) και οι ινσουλινομιμητικοί αυξητικοί παράγοντες (IGF-I, IGF-II). *(31-33)* Οι περισσότεροι παράγοντες IL-1 *(34),* IL-6 *(35),* TNF *(24),* EGF *(36),* FGF *(37)* και PDGF *(32)* διεγείρουν την οστική απορρόφηση. Μερικοί από αυτούς του παράγοντες όπως οι IGF-I, IGF-II *(38)* και TGF–β *(39)* ενισχύουν τον σχηματισμό των οστών, ενώ άλλοι όπως οι FGF, PDGF και TGF-β διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων.

Εκτός από τις κυτταροκίνες που δρουν ως τοπικοί τροποποιητές του μεταβολισμού των οστών, ορισμένα εικοσανοειδή (π.χ. προσταγλανδίνες,

λευκοτριένια (LTs)) ασκούν επίσης διεγερτικές επιπτώσεις στο οστικό σχηματισμό και στην οστική απορρόφηση. Το 1970 ο Klein και Rainz *(40)* ανέφεραν ότι οι PGE_1, PGE_2, PGA_1 και PGF-1a αύξησαν την απελευθέρωση ^{45}Ca στο θρεπτικό υλικό σε εμβρυϊκές κυτταρικές καλλιέργειες οστεοβλαστών αρουραίου. Από τότε, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι οι προσταγλανδίνες διεγείρουν το σχηματισμό καθώς και την απορρόφηση του οστού. *(10,41,42,43)*

1.4. Ομοιόσταση ασβεστίου

Στα οστά βρίσκεται μεγάλη ποσότητα ασβεστίου δηλ. 1 κιλό περίπου. Η συνολική ποσότητα στην εξωκυτταρική δεξαμενή αποτελεί ένα μόνο ποσοστό αυτής της ποσότητας δηλ 1 g ή 1000 mg περίπου. Η συνήθης συνολική ημερήσια πρόσληψη του ασβεστίου είναι περίπου 800 - 1200 mg. Τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι η κύρια πηγή πρόσληψης ασβεστίου. Αν και το έντερο απορροφά περίπου το ήμισυ του ασβεστίου που προσλαμβάνεται με την τροφή (500 mg ημερησίως) απεκκρίνει επίσης ασβέστιο από τον οργανισμό (325 mg ημερησίως) κι ως εκ τούτου η καθαρή ημερήσια πρόσληψη του ασβεστίου είναι περίπου 175 mg.

Το δεύτερο κύριο όργανο που ελέγχει την ομοιόσταση του ασβεστίου είναι το οστό, όπου η εναπόθεση ασβεστίου είναι περίπου 280 mg ημερησίως, η οποία ισοσταθμίζεται από την ποσότητα του απορροφούμενου ασβεστίου.

Το τρίτο όργανο που εμπλέκεται είναι οι νεφροί, οι οποίοι διηθούν 10 φορές περίπου το συνολικό εξωκυτταρικό ασβέστιο ημερησίως δηλ. 1000 mg / ημέρα περίπου. Περισσότερο από 98 % αυτού του ασβεστίου επαναπορροφάται και συνεπώς η καθαρή νεφρική αποβολή του ασβεστίου είναι λιγότερη από 2% της διηθούμενης ποσότητας. (4)

Στο πλάσμα το ασβέστιο βρίσκεται σε τρεις φυσικοχημικές μορφές:

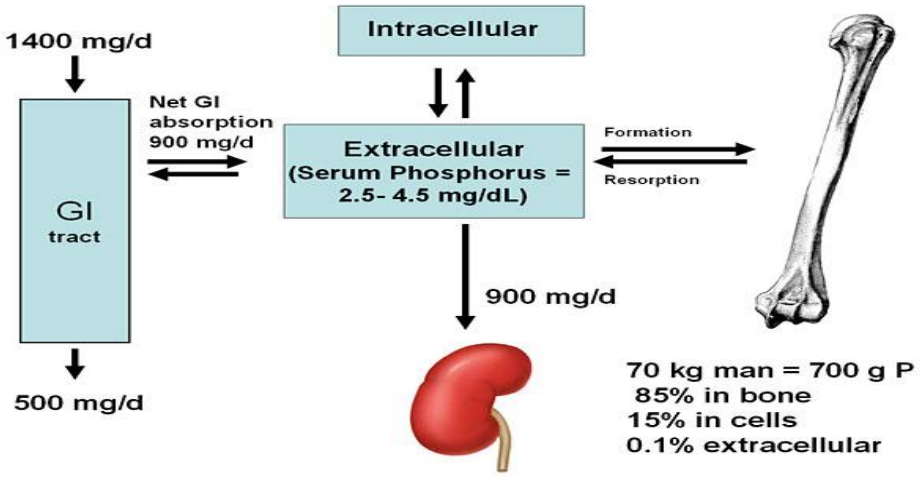
1. Ως ελεύθερη ιονισμένη μορφή.
2. Συνδεδεμένο με ομάδες ανιόντων των πρωτεϊνών του ορού (κυρίως αλβουμίνης).
3. Σε σύμπλεγμα με οργανικά ανιόντα χαμηλού μοριακού βάρους (π.χ. κιτρικά και οξαλικά).

Η συνολική συγκέντρωση και των τριών μορφών στο πλάσμα είναι φυσιολογικά μεταξύ 2,2 και 2,7 mM (8,8 - 10,6 mg/dl). Σε υγιή άτομα το 45 % περίπου είναι συνδεδεμένο με μικρά οργανικά ανιόντα. Η ιονισμένη μορφή είναι η

πιο σημαντική όσον αφορά στη ρύθμιση από την παραθορμόνη και συμμετέχει στις περισσότερες βιολογικές δράσεις του ασβεστίου. (4)

1.5. Ομοιόσταση φωσφόρου

Το μεγαλύτερο ποσοστό του φωσφόρου υπάρχει επίσης στα οστά, δηλ. 0,6 κιλά περίπου σε μορφή στοιχειακού φωσφόρου. Μικρότερη ποσότητα < 0,1 κιλό υπάρχει στους μαλακούς ιστούς, κυρίως με τη μορφή οργανοφωσφορικών όπως φωσφολιπίδια, φωσφοπρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και νουκλεοτίδια. Ακόμη μικρότερο ποσοστό (-500 mg) βρίσκεται στο εξωκυττάριο υγρό υπό την μορφή ανόργανου φωσφόρου. Η ποσότητα του φωσφόρου που προσλαμβάνεται με την τροφή είναι περίπου 1.400 mg ημερησίως. Και πάλι τα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν κύριες πηγές πρόσληψης. Η καθαρή απορρόφηση του φωσφόρου από το έντερο είναι περίπου 900 mg ημερησίως. Σε σχετικά σταθερή κατάσταση το οστό έχει μικρό ποσοστό ανακύκλωσης του φωσφόρου περίπου 210 mg / ημέρα. Οι νεφροί διηθούν τη συνολική εξωκυτταρική δεξαμενή φωσφόρου περίπου 14 φορές (-7000 mg ημερησίως) και απορροφούν περίπου 6.100 mg. Για τον λόγο αυτό η καθαρή έκκριση φωσφόρου είναι περίπου 900 mg ημερησίως, ποσό ίδιο με την καθαρή απορρόφηση φωσφόρου από την γαστρεντερική οδό. Η συγκέντρωση του συνολικού φωσφόρου στο πλάσμα κυμαίνεται μεταξύ 0.8 και 1,5 m M (ή 2,5 έως 4,5 mg / dl στοιχειακού φωσφόρου). Περίπου 85 με 90% του διηθούμενου φωσφόρου φιλτράρεται από τους νεφρούς είτε ως ιονισμένο (50%) είτε ως σύμπλοκο (40%) και μόνο ένα μικρό ποσοστό (10-15%) είναι συνδεδεμένο με πρωτεΐνες. *(4)*



Εικόνα 3: Ομοιόσταση φωσφόρου. *(44)*

1.6. Δείκτες οστικού μεταβολισμού

1.6.1. RANKL

Ο RANKL ανακαλύφθηκε σε αναζήτηση του προσδέτη της οστεοπροτεγερίνης. *(45,46)* Έτσι, περιγράφηκε μια πρωτεΐνη που καλείται συνδέτης του ενεργοποιητή του υποδοχέα του πυρηνικού παράγοντα κΒ ή RANK ligand (RANKL), η οποία φαίνεται να είναι ο κύριος διεγέρτης τόσο της διαφοροποίησης των προ-οστοκλαστών σε οστεοκλάστες καθώς και της δραστηριότητας των ώριμων οστεοκλαστών. *(4)* Ο RANKL είναι μέλος των κυτταροκινών του TNF (παράγοντας νέκρωσης όγκων) και είναι συνδεδεμένος στην επιφάνεια τόσο των κυττάρων του στρώματος όσο και των οστεοβλαστών αλλά εκκρίνεται και από τα ίδια τα κύτταρα.

Ο RANKL διεγείρει έναν υποδοχέα που είναι συνδεδεμένος με την μεμβράνη των οστεοκλαστών που καλείται RANK (υποδοχέας για την ενεργοποίηση του πυρηνικού παράγοντα-κΒ) και είναι μέλος της οικογένειας TNF. Τα οστεοβλαστικά κύτταρα και τα κύτταρα στρώματος επίσης παράγουν έναν διαλυτό μέλος της οικογένειας των υποδοχέων TNF που καλείται οστεοπροτεγερίνη (λατινική ονομασία από οστό + protegere = προστατεύω).

1.6.2. Οστεοπροτεγερίνη (OPG)

Η οστεοπροτεγερίνη εντοπίστηκε το 1997 από δύο ομάδες που εργάστηκαν ανεξάρτητα και ο όρος επινοήθηκε για τις προστατευτικές επιδράσεις στα οστά. (λατινική ονομασία από οστό + protegere = προστατεύω). *(47,48,46)* Η οστεοπροτεγερίνη είναι μια πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο TNFRSF11B και αποτελεί έναν υποδοχέα κυτταροκίνης *(47)* Οι επιδράσεις της οστεοπροτεγερίνης in vitro είναι αντίθετες από εκείνες του RANKL και περιλαμβάνουν αναστολή της διαφοροποίησης, της επιβίωσης, της σύντηξης των οστεοκλαστικών πρόδρομων κυττάρων, της οστεοκλαστικής ενεργοποίησης και της απόπτωσης των οστεοκλαστών. *(45,46,49,50-57)* Η οστεοπροτεγερίνη μπορεί να δεσμεύει τον RANKL και να αναστείλει τον πυρηνικό NF-κΒ που αποτελεί πρωταρχικής σημασίας μεταγραφικό παράγοντα σχετιζόμενο με τα γονίδια του ανοσοποιητικού συστήματος επίσης είναι ρυθμιστής της φλεγμονής, της ανοσίας και της διαφοροποίησης των κυττάρων *(47)*. Τα επίπεδά της εξαρτώνται από τη λειτουργία των διαύλων ασβεστίου. Μπορεί να μειώσει την παραγωγή των

οστεοκλαστών με την αναστολή της διαφοροποίησης των πρόδρομων οστεοκλαστών και γενικά ρυθμίζει την οστεοκλαστική λειτουργία.

Η οστεοπροτεγερίνη συνδεόμενη με τον RANKL, προστατεύει το οστό από την οστεοκλαστική δραστηριότητα. Τα γλυκοκορτικοειδή αυξάνουν την παραγωγή RANKL από τα οστεοβλαστικά κύτταρα αλλά μειώνουν την παραγωγή της οστεοπροτεγερίνης. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ότι διατίθεται περισσότερο ελεύθερο RANKL για σύνδεση με το RANK και έτσι τα γλυκοκορτικοειδή αυξάνουν την οστική απώλεια. Η ισορροπία μεταξύ της οστεοπροτεγερίνης και του RANKL που παράγονται από τα οστεοβλαστικά κύτταρα, φαίνεται να παίζει πολύ σημαντικό ρόλο για τη διατήρηση της ομοιόστασης των οστών. *(4)*

Η OPG χρησιμοποιήθηκε σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες για την μείωση της οστικής απορρόφησης καθώς και σε ασθενείς με οστεολυτικές μεταστάσεις. Αυξημένα επίπεδά της έχουν αναφερθεί σε καρδιακές παθήσεις και σε ψυχολογικές διαταραχές. (47) Επίσης, ανασυνδυασμένη ανθρώπινη OPG βρίσκει σήμερα εφαρμογή στην αύξηση της πυκνότητας και της διαμέτρου των οστών. (58)

Πολλές έρευνες αναφέρουν την εμπλοκή της OPG σε παθολογικές καταστάσεις όπως στην αρτηριοσκλήρυνση, στην υπέρταση, στον διαβήτη, στη νεφροπάθεια διαβητικής αιτιολογίας και στο μεταβολικό σύνδρομο, στις περιπτώσεις όπου τα επίπεδα της OPG εμφανίζονται αυξημένα *(58).*

Σε in vivo μελέτες, η έλλειψη οστεοπροτεγερίνης σε knock out ποντίκια οδήγησε σε σοβαρή οστεοπόρωση. Αντίθετα, η υπερέκφραση της οστεοπροτεγερίνης σε διαγονιδιακά ποντίκια *(47)* και η χορήγηση οστεοπροτεγερίνης σε αρουραίους προκάλεσε οστεοπέτρωση. *(47,46)*

1.7. Ρυθμιστές του δικτύου RANK, RANKL, OPG

Σχηματική αναπαράσταση του συστήματος OPG/RANKL/RANK: Ο RANKL φέρει το μήνυμα για την ενεργοποίηση του οστεοκλάστη που μεταφέρεται μέσω του RANK και εκφράζεται σε ένα πρόωρο οστεοβλάστη. Η OPG εμποδίζει την μεταφορά αυτή, ενώνεται και εξουδετερώνει τον RANKL. Η έκφραση των OPG και RANKL ρυθμίζεται από ορμόνες και αυξητικούς παράγοντες όπως τα οιστρογόνα, τα γλυκοκορτικοειδή, η παραθορμόνη, η αυξητική ορμόνη, ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας α και β. *(59)* Η περιοχή του προαγωγέα τόσο του RANKL *(60)* όσο και εκείνη της OPG *(61)* περιέχουν θέσεις σύνδεσης για τον οστεοβλαστικό μεταγραφικό

παράγοντα CBFA-1. *(62)* Ο παράγοντας CBFA-1 είναι απαραίτητος για την διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και την λειτουργία και παραγωγή φυσιολογικού οστού. Σε ποντίκια με ανεπάρκεια CBFA-1, δεν τους έλειπαν μόνο οι ώριμοι οστεοβλάστες αλλά τους έλλειπαν και οι οστεοκλάστες. *(62)* Αυτό υποδηλώνει ότι το CBFA-1 και ο RANKL είναι απαραίτητοι παράγοντες για την φυσιολογία των κυττάρων του οστίτη ιστού.

Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφραση του RANKL και της OPG, καθώς και η έκκριση OPG από τα ανθρώπινα οστεοβλαστικά κύτταρα έχει μελετηθεί εκτενώς. Οι ορμόνες που ρυθμίζουν το RANKL και την OPG είναι οι στεροειδείς ορμόνες (γλυκοκορτικοειδή (*63,64),* 1,25 διυδροξυβιταμίνη D_3 *(65-67),* 17β-οιστραδιόλη *(65))* και οι πεπτιδικές ορμόνες (παραθυρεοειδής ορμόνη *(67-69),* αγγειοδραστικό εντερικό πεπτίδιο). *(70)* Άλλοι ρυθμιστές είναι οι πεπτιδικοί αυξητικοί παράγοντες (μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας β1) (*67,71),* η μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών, *(65)* ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (*72,73)*, η ακτιβίνη Α *(74)* και οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (IL-1, IL-6 και IL-11, TNF-a και TNF–β) και η προσταγλανδίνη E_2. *(63,64,73-76)*

Άλλοι ρυθμιστικοί παράγοντες είναι αγωνιστές και ανταγωνιστές του PPARγ (υπεροξυσώματος πολλαπλασιαστή ενεργοποιητή υποδοχέα g), ο οποίος είναι εξαιρετικά σημαντικός για την διαφοροποίηση των λιποκυττάρων (*79*), του IHH, (Ινδικό σκαντζόχοιρος) ο οποίος είναι απαραίτητος για την διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων (*80)* και τέλος στην διαφοροποίηση του ασκορβικού οξέος*. (81)*

Αξίζει να σημειωθεί, ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες και παράγοντες διαφοροποίησης εμπλέκονται στην διαφοροποίηση των οστεοβλαστών (CBFA - 1), των λιποοκυττάρων και των χονδροκυττάρων. Οι παράγοντες αυτοί αποτελούν μια γενεαλογία η οποία προέρχεται από πολυδύναμα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα. (*82).* Όλη η ρύθμιση του RANKL ή / και της OPG *(59,80,82)* υποδηλώνει ότι υπάρχουν εκτεταμένες αλληλοπαρεμβολές μεταξύ μεσεγχυματικών και οστεοκλαστικών κυττάρων.

Ο λόγος (RANKL / OPG) βρέθηκε ιδιαίτερα αυξημένος σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού και σε ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα. *(83)* Συγκεκριμένα, τα καρκινικά κύτταρα του μαστού παράγουν παραθορμόνη, η οποία διεγείρει την παραγωγή του RANKL και αναστέλλει την έκφραση της OPG στους οστεοβλάστες, με αποτέλεσμα την ενίσχυση της οστεοκλαστογένεσης και της οστικής απορρόφησης

δημιουργώντας έτσι κενές κοιλότητες εντός του οστού στις οποίες μπορούν να επεκταθούν τα καρκινικά κύτταρα. *(83)*

1.8. Ο λόγος RANKL / OPG

1.8.1. Ο λόγος RANKL / OPG σε μεταβολικές ασθένειες των οστών.

Υπάρχουν καινούρια στοιχεία για το ρόλο της RANKL και της OPG στην βιολογία των οστεοκλαστών που βασίζονται σε in vitro μελέτες, σε διαγονιδιακά και σε knock out μοντέλα ζώων αλλά και σε μελέτες σε ανθρώπους με μεταβολικά νοσήματα των οστών.

1.8.1.i. Οστεοπόρωση

Η οστεοπόρωση σχετίζεται με έλλειψη οιστρογόνων. Υπάρχουν in vitro και in vivo στοιχεία που δείχνουν ότι η οστεοπροτεγερίνη μπορεί να διαμεσολαβεί τα προστατευτικά αποτελέσματα των οιστρογόνων στο μεταβολισμό των οστών. Σε in vitro μελέτες, τα οιστρογόνα έχουν βρεθεί να επάγουν τα επίπεδα του mRNA της οστεοπροτεγερίνης σε ανθρώπινους οστεοβλάστες. *(64)*

Σε μια πρόσφατη προοπτική μελέτη, τα επίπεδα οστεοπροτεγερίνης ορού βρέθηκαν να είναι υψηλότερα σε γυναίκες με σακχαρώδη διαβήτη ενώ δεν υπήρχε συσχέτιση με την οστική πυκνότητα και τον κίνδυνο κατάγματος, που είναι τελικά σημεία της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης. *(84)*

1.8.1.ii. Ρευματοειδής αρθρίτιδα

Η οστεοπροτεγερίνη και ο RANKL θεωρούνται πλέον επίσης βασικοί ρυθμιστές στην ρευματοειδή αρθρίτιδα. (*85)* Η αρχική ανακάλυψη της έκκρισης RANKL σε ενεργοποιημένη μορφή στα Τ λεμφοκύτταρα, συνδέει το ανοσοποιητικό σύστημα με το μεταβολισμού των οστών στη ρευματοειδή αρθρίτιδα**.** *(86,87)*

Σε ένα μοντέλο αρουραίου με ρευματοειδή αρθρίτιδα παρατηρήθηκε ότι η έκφραση του RANKL ανιχνεύεται κυρίως σε θέσεις ενεργής φλεγμονής και σχετίζεται με ενισχυμένο οστεοκλαστικό σχηματισμό και ενεργοποίηση, με αποτέλεσμα τη σοβαρή καταστροφή των αρθρώσεων και των οστών.

1.8.1.iii. Νόσος Paget των οστών

Η νόσος Paget χαρακτηρίζεται από αυξημένη οστική απορρόφηση, με αποτέλεσμα να υπάρχουν παραμορφώσεις των οστών, πόνος και κατάγματα. Τα κύτταρα του στρώματος του μυελού των οστών των ασθενών με νόσο Paget υπερεκφράζουν τον RANKL και αυτοί οι οστεοκλάστες φαίνεται να είναι εξαιρετικά ευαίσθητοι τόσο στον RANKL όσο και σε άλλους παράγοντες οστεοκλαστογένεσης. *(88-90)*

1.9. Θρεπτικά συστατικά του ψαριού

Τα ψάρια, 'κλασική αξία' στη Μεσογειακή διατροφή, βρίσκονται στο μέσο της Μεσογειακής πυραμίδας, συστήνεται δηλαδή να καταναλώνονται σε εβδομαδιαία βάση, κατά προτίμηση από 1-3 φορές.

Τα ψάρια του αλμυρού ή του γλυκού νερού είναι από τις πιο θρεπτικές τροφές, καθώς αποτελούν βασική πηγή πρωτεϊνών, μαζί με το κόκκινο κρέας και τα πουλερικά, ενώ παράλληλα μας εφοδιάζουν με ωφέλιμες βιταμίνες και μεταλλικά στοιχεία, όπως είναι ο σίδηρος και οι βιταμίνες του συμπλέγματος Β.

Το 'βαρύ πυροβολικό' του θρεπτικού περιεχομένου των ψαριών είναι τα ω-3 λιπαρά, τα οποία ανήκουν στην ομάδα των 'καλών' πολυακόρεστων λιπαρών, που δρουν προστατευτικά για τον οργανισμό μας, εν αντιθέσει με τα 'κακά' κορεσμένα λιπαρά.

Τα θρεπτικά συστατικά του ψαριού είναι:

- Βιταμίνες: Οι βασικότερες βιταμίνες που περιέχονται στα ψάρια είναι η βιταμίνη Α, απαραίτητη για την ανάπτυξη και την ενίσχυση της φυσικής μας άμυνας, η βιταμίνη D, η οποία συμβάλλει στην καλύτερη απορρόφηση του ασβεστίου από τον οργανισμό, καθώς και οι βιταμίνες του συμπλέγματος Β, με εξέχουσα τη βιταμίνη Β6, απαραίτητη για τη σύνθεση αμινοξέων και την παραγωγή ενέργειας.
- Ανόργανα στοιχεία: Τα ψάρια είναι πλούσια σε φώσφορο αλλά και σε ασβέστιο και μαγνήσιο, τρία μεταλλικά στοιχεία σημαντικά για τη μεταλλοποίηση των οστών. Περιέχουν επιπλέον ψευδάργυρο, ο οποίος παίζει σημαντικό ρόλο στη νευρολογική λειτουργία, ενώ είναι απαραίτητος και για την καλή υγεία του αναπαραγωγικού συστήματος.(91)

1.10. Διαιτητικά λιπίδια

Το λίπος θεωρείται μακροθρεπτικό συστατικό στη διατροφή. Το λίπος δεν παρέχει μόνο ενέργεια, διευκολύνει την απορρόφηση των λιποδιαλυτών βιταμινών (βιταμίνη A, D, E, K) και παίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή και ρύθμιση εικοσανοειδών.

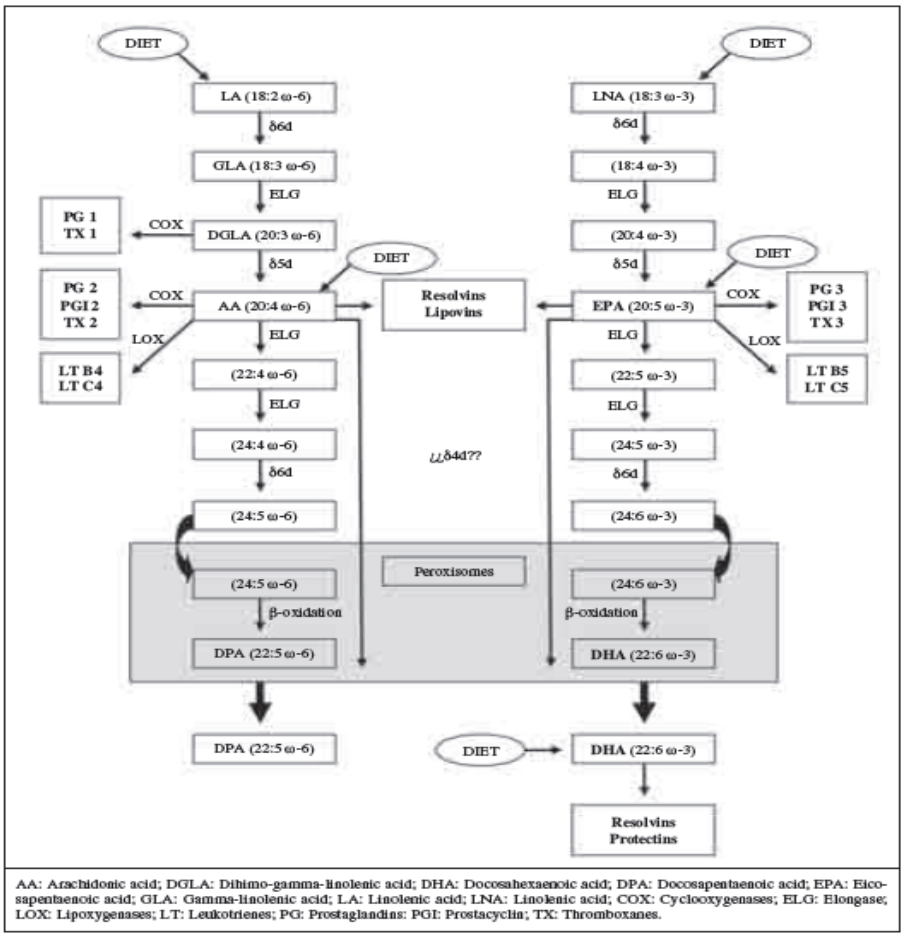
1.10.1. Βιοδραστικά λιπαρά οξέα

Τα ω-3 λιπαρά οξέα αντιπροσωπεύονται από το α – λινολενικό οξύ (18:3 ω-3). Άλλα πολυακόρεστα ω-3 λιπαρά οξέα είναι το εικοσαπεντανοϊκό οξύ και το δοκοσαεξανοϊκό οξύ, τα οποία βρίσκονται κυρίως σε ιχθυέλαια. *(92)* Το α-λινολενικό οξύ (ALA) είναι απαραίτητο να λαμβάνεται με την διατροφή από τους ανθρώπους. *(93,94)* Επαρκής πρόσληψη αυτού άλλα και των υπόλοιπων ω-3 λιπαρών οξέων μακράς αλύσου, είναι ιδιαίτερα σημαντική σε κατηγορίες του πληθυσμού όπως τα βρέφη, τα μικρά παιδιά και οι ασθενείς που χρειάζονται εντερική ή παρεντερική διατροφή. *(92,95,96)* Το δοκοσαεξανοϊκό οξύ παράγεται de novo από θαλάσσια φύκια και αποτελεί συστατικό των ψαριών (περίπου 8 με 20% του Βάρους). Η παραγωγή του στον άνθρωπο επιτυγχάνεται με αποκορεσμό και επιμήκυνση του ALA σε 24:5 ω-3. Σε αυτό το πολύ μακράς αλύσου λιπαρό οξύ γίνεται αποκορεσμός και στη συνέχεια το παραγόμενο λιπαρό οξύ υφίσταται β – οξείδωση για σχηματισμό του DHA. *(97,98)* Τα απαραίτητα λιπαρά οξέα (EFA), λινελαϊκό οξύ (LA) και α - λινολενικό οξύ (LNA) είναι τα κύρια θρεπτικά συστατικά των τροφίμων που χρησιμοποιούνται ως πρόδρομα συστατικά των εικοσανοειδών.

Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) αποτελούνται από δυο κυρίως οικογένειες, τα «ω-6» και «ω-3» λιπαρά οξέα. Το Λινελαϊκό οξύ (LA) και το α-λινολενικό οξύ (ALA) είναι τα απλούστερα μέλη των «ω-6» και «ω-3» πολυακόρεστων λιπαρών οξέων αντίστοιχα. Από βιοχημικής άποψης και οι δύο ομάδες αποτελούνται από 18 άτομα άνθρακα στην αλυσίδα τους, παρουσιάζοντας δύο (LA) ή τρεις (ALA) διπλούς δεσμούς μεταξύ των ατόμων άνθρακα. Η θέση της πρώτης ακορεστότητας, καταμετράται από το μεθυλιωμένο άκρο του λιπαρού οξέως, το οποίο λέγεται ωμέγα – C και έτσι δημιουργούνται τα ονόματα των δύο τάξεων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Από θρεπτικής απόψεως, τα LA και ALA θεωρούνται απαραίτητα λιπαρά οξέα (EFAs), δεδομένου ότι δεν μπορούν να

συντεθούν στο ανθρώπινο σώμα και ως επί το πλείστον προσλαμβάνονται από την τροφή. (99) Τα δυο αυτά λιπαρά οξέα υπόκεινται σε μια σειρά ενζυμικών αντιδράσεων επιμήκυνσης και αποκορεσμού και μετατρέπονται σε μεταβολίτες όπως το αραχιδονικό οξύ (AA), το εικοσιπεντανοϊκό οξύ (EPA) και το εικοσιδυοεξανοϊκό οξύ (DHA). *(100)*

Το α-λινολενικό οξύ (18:3ω-3) είναι η πρόδρομη ένωση για το σχηματισμό μακράς αλύσου ω-3 PUFA, όπως είναι το εικοσαπεντανοϊκό (EPA 20:5ω-3) και δοκοσαεξανοϊκό οξύ (DHA 22:6ω-3), τα οποία μπορούν να παράγουν προ-φλεγμονωδη εικοσανοειδή, προσταγλανδίνης E2 και λευκοτριενίων B4. *(101)* Το LA (18:2ω-6) το οποίο ανήκει στην οικογένεια των ω-6 PUFA μπορεί να μετατραπεί αρχικά σε γ-λινολενικό οξύ (GLA) και στη συνέχεια σε διομο-γ-λινολενικο οξύ (DGLA) και σε αραχιδονικό οξύ (AA). Το AA αποτελεί σημαντικό συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών και είναι πρόδρομος των εικοσανοειδών. *(102)*



AA: Arachidonic acid; DGLA: Dihimo-gamma-linolenic acid; DHA: Docosahexaenoic acid; DPA: Docosapentaenoic acid; EPA: Eicosapentaenoic acid; GLA: Gamma-linolenic acid; LA: Linolenic acid; LNA: Linolenic acid; COX: Cyclooxygenases; ELG: Elongase; LOX: Lipoxygenases; LT: Leukotrienes; PG: Prostaglandins: PGI: Prostacyclin; TX: Thromboxanes.

Εικόνα 4: Μεταβολισμός πολυακόρεστων λ.ο.*(208)*

<u>Τα εικοσανοειδή</u> συντίθενται από ακόρεστα και επιμήκη προϊόντα του LA και του LNA: δίομο-γ-λινολενικό οξύ (DGLA), αραχιδονικό (AA) και εικοσανοπεντανοϊκό

οξύ (EPA) αντίστοιχα. Τα εικοσανοειδή συντίθενται αντίστοιχα, μέσω κυκλοοξυγενάσης (προσταγλανδίνες, θρομβοξάνια), λιποξυγονάσης (λευκοτριένια) και μέσω του ενζυμικού συστήματος της εποξυγενάσης (διάφορα εποξείδια).

Τα δύο απαραίτητα λ.ο (ω–3, ω–6) οδηγούν στην βιοσύνθεση των διακριτών ομάδων των εικοσανοειδών, το καθένα με μοναδικές φυσιολογικές ιδιότητες.
Η υπερκατανάλωση τροφίμων πλούσιων σε ω–6 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και η παραμέληση κατανάλωσης τροφίμων που είναι πηγές ω – 3, μπορεί να οδηγήσει το άτομο προφλεγμονώδεις καταστάσεις. *(103)*

Το προτεινόμενο υπόστρωμα για την κυκλοξυγονάση είναι το αραχιδονικό οξύ που μετατρέπεται πιο εύκολα σε εικοσανοειδή από ότι το εικοσανοπεντανοϊκό οξύ. Τα εικοσανοειδή από ω–6 λ.ο ασκούν πιο έντονη δραστικότητα συναγωνιστή στους υποδοχείς των εικοσανοειδών από εκείνα των ω–3 λ.ο. *(103)* Επομένως η ελάττωση της διαιτητικής αναλογίας ω–6 : ω–3 PUFA θα μπορούσε να εξασθενήσει την ανάπτυξη και την εξέλιξη της νόσου με την μείωση των αποθηκών AA στους ιστούς. Ενδιαφέρον επίσης είναι ότι το γ – λινολενικό οξύ (GLA) και ο μεταβολίτης του, που αποτελείται από 20 άτομα άνθρακα DGLA, έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον λόγω της ιδιότητάς τους να ελαττώνουν την παραγωγή εικοσανοειδών που προέρχεται από το AA. *(104)*

1.10.2. Συζευγμένο λινελαϊκό οξύ

Το συζευγμένο λινελαϊκό οξύ (CLA) είναι το όνομα που χρησιμοποιείται για να περιγράψει την θέση μιας ομάδας και την γεωμετρική ισομέρεια των λ.ο του δεκαοκταδιενοϊκού οξέος (18:2) που περιέχει δύο συζυγείς διπλούς δεσμούς. *(105)*

1.10.3. Πηγές πολυακόρεστων λ.ο

Το λινελαϊκό οξύ (LA) είναι ένα ω-6 λιπαρό οξύ και βρίσκεται σε τροφές όπως οι ξηροί καρποί, τα φυτικά έλαια (π.χ. καλαμπόκι, ηλίανθος, κάρδαμο, σόγια) και η φυτική soft μαργαρίνη. Η πρόσληψη ω - 6 επιτυγχάνεται πιο εύκολα σε σχέση με τα ω - 3 λόγω της περιεκτικότητάς τους στα τρόφιμα. Σημαντικές πηγές ω-3 λιπαρών οξέων αποτελούν τα λιπαρά ψάρια (κολιός, σκουμπρί, σαρδέλα, σολομός, γαύρος, πέστροφα κ.α.), τα καρύδια, η σόγια και οι φυτικές μαργαρίνες τύπου soft λόγω της σύνθεσής τους από κατάλληλα φυτικά έλαια. Το α - λινολενικό οξύ βρίσκεται σε καρύδια και λιναρόσπορο. *(91*). Το EPA και DHA μπορούν να προσληφθούν

απευθείας από διάφορες τροφές όπως τα ψάρια (σολομός, πέστροφα, ρέγκα) και τα οστρακοειδή παρακάμπτοντας το μεταβολισμό του ALA *(100)* Επίσης τα ιχθυέλαια περιέχουν περίπου 30-50% ω-3 PUFA (DHA & EPA) *(99)*

1.11. Πολυακόρεστα λ.ο στο μεταβολισμό των οστών

Οι προσταγλανδίνες μεταβολίζονται από τα πολυακόρεστα λ.ο και θεωρούνται τοπικές ορμόνες ταχείας δράσης, συχνά εμφανίζουν διφασικές ιδιότητες. Η PGE_2 προέρχεται από n - 6 πολυακόρεστα λ.ο, AA και είναι η μεγαλύτερη προσταγλανδίνη στο οστό. Όπως φαίνεται είναι ισχυρός ρυθμιστής της οστικής αναδιαμόρφωσης (remodeling), επιδρά και στην οστική απορρόφηση *(106)* και στον οστικό σχηματισμό. *(107,108)* Υπερβολική παραγωγή της PGE_2 επηρεάζει αρνητικά την οστική αναδιαμόρφωση, ενώ τα χαμηλότερα επίπεδα της PGE_2 πιστεύεται ότι διεγείρουν τον οστικό σχηματισμό σε ζώα που τρέφονται με δίαιτα που περιέχουν μέτρια επίπεδα από τα n – 6 PUFA. *(109)* Τα n – 3 και n – 6 PUFA παρέχονται σαν υπόστρωμα για τα ίδια ένζυμα κατά την μετατροπή των μονοπατιών αλλά μεταβολίζονται με διαφορετικό ρυθμό *(110),* ενώ χαμηλότερη αναλογία διαιτητικού n – 6 και n – 3 PUFA μπορεί να μειώσει την παραγωγή PGE_2. *(111-114)*

Τα λιπίδια παίζουν σημαντικό ρόλο στην βιολογία και σκελετική υγεία των οστών όπως φαίνεται και στον πίνακα 1. Τα n-3 και τα n-6 υποδηλώνουν ότι ο τρίτος και ο έκτος άνθρακας από την τελική μεθυλομάδα αντίστοιχα είναι ακόρεστοι. Τα μακράς αλύσου λ.ο μπορεί να προέρχονται από 18 άτομα άνθρακα, πού είναι πρόδρομες ουσίες για το α–λινολενικό οξύ (ALA 18:3 n-3) και το λινελαϊκό οξύ (LA 18:2 n-6) αντίστοιχα και θεωρούνται ως απαραίτητα λιπαρά οξέα γιατί δεν μπορεί να τα συνθέσει ο οργανισμός. *(115)* Οι σημαντικές πρώτες ύλες σε ότι αφορά την υγεία του οστού είναι το αραχιδονικό οξύ (AA) (20:4 n-6), το εικοσαπενταενοϊκό οξύ (EPA) (20:5 n-3) και το εικοσιδυεξανοϊκό (DHA) (22:6 n-3) Τα κορεσμένα λιπαρά μπορούν να έχουν δυσμενείς επιπτώσεις για την υγεία των οστών (*116,117)*

Μελέτες σε ζώα *(118)* και επιδημιολογικά δεδομένα *(119)* δείχνουν ότι η διατροφή πλούσια σε κορεσμένα λιπαρά μειώνει την πυκνότητα των ανόργανων συστατικών του οστού. Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα οδηγούν σε αύξηση της πυκνότητας των οστών σε παιδιά *(120)* ενώ έρευνες σε κοτόπουλα και αρουραίους έδειξαν ότι τα PUFA και το συζευγμένο λινελαϊκό οξύ επηρεάζουν την αναδιαμόρφωση των οστών. *(111,121,122,113)*

Τα ω - 3 πολυακόρεστα λ.ο., μπορούν να είναι ευεργετικά για τον οστικό σχηματισμό. Από μελέτες σε πειραματόζωα, φαίνεται να αναστέλλουν την δραστηριότητα των οστεοκλαστών και να ενισχύουν την δραστηριότητα των οστεοβλαστών. *(124,125)*

Κατά την διάρκεια των τελευταίων δέκα χρόνων αρκετοί αρθρογράφοι φαίνεται από αρκετές μελέτες να διερευνούν την επίδραση των πολυακόρεστων λ.ο στην υγεία των οστών σε ζώα. *(115,1,125-129)*

Πειραματικά μοντέλα	Λιπίδιο/ λιπαρά οξέα	Απάντηση	Βιβλιογραφία
Κοτόπουλο	Λίπος βουτύρου	• Αύξηση της συγκέντρωσης του IGF - 1. • Αύξηση του ρυθμού οστικού σχηματισμού. • Αύξηση των εξαζαμίνων στον ορό. • Αύξηση του ρυθμού οστικού σχηματισμού στην κνήμη. • Αύξηση της παραγωγής PGE_2.	*(122)*
	Ωμέγα – 3	• Αύξηση του δοκιδώδους οστού. • Αύξηση του ρυθμού οστικού σχηματισμού. • Αύξηση της δραστηριότητας του ALP. • Αύξηση της συγκέντρωσης του ηπατικού IGF – 1. • Μείωση της ex	*(121)*

		vivo παραγωγής PGE_2.	
Ινοβλάστες	EPA	• Αύξηση του σχηματισμού κολλαγόνου.	*(130)*
Χονδροκύτταρα	CLA Ωμέγα – 3 Λιπαρά οξέα	• Αύξηση του σχηματισμού κολλαγόνου. • Μείωση της συγκέντρωσης της PGE_2. • Αύξηση του σχηματισμού κολλαγόνου. • Μείωση της συγκέντρωσης της PGE_2. • Μείωση της σύνθεσης κολλαγόνου.	*(131, 122, 132)*
MC3T3-E1 οστεοβλαστικές κυτταρικές καλλιέργειες	CLA EPA	• Μείωση της συγκέντρωσης της PGE_2. • Αύξηση της οστεοκαλσίνης και της αλκαλικής φωσφατάσης. • Μείωση συγκέντρωσης του PGE_2.	*(1)*

		• Αύξηση της οστεοκαλσίνης και της αλκαλικής φωσφατάσης.	
Αρουραίοι	• CLA • Ωμέγα - 3	• Μείωση της παραγωγής της PGE_2. • Μείωση του ρυθμού επιμετάλλωσης. • Μείωση της συγκέντρωσης IGF - I στον ορό. • Αύξηση των IGFBP σε διατροφή πλούσια σε ωμέγα–6. • Μείωση του IGFBP σε διατροφή πλούσια σε ωμέγα – 3. • Μείωση της παραγωγής PGE_2. • Μείωση της απώλειας αλάτων. υδροξυαπατίτη. • Αύξηση της συγκέντρωσης του IGFBP – 3.	*(113,133)* *(134,112,117,102,133,113, 111)*

		• Μείωση της συγκέντρωσης της PGE_2. • Αύξηση της δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης.	

<u>Πίνακας 1</u>: Επιπτώσεις των λιπών στο οστικό ιστό. (1)

Επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν αντίστροφη σχέση μεταξύ του διαιτητικού λόγου n - 6 προς n - 3 λιπαρά οξέα και της πυκνότητας των ανόργανων στοιχειών των οστών σε ηλικιωμένα άτομα *(136)* καθώς και μεταξύ των κορεσμένων λιπαρών της διατροφής και της πυκνότητας των ανόργανων συστατικών στα οστά των αντρών**.** *(119)*

Έχει αναφερθεί θετική συσχέτιση ανάμεσα στην κατανάλωση εικοσανοειδών EPA και στην οστική πυκνότητα. Συμπληρωματικές δοκιμές επίσης δείχνουν θετικές επιπτώσεις των n - 3 λιπαρών οξέων στην υγεία των οστών. Για παράδειγμα, χορήγηση συμπληρωμάτων EPA, για δώδεκα μήνες οδήγησε σε αύξηση της οστικής πυκνότητας σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. *(137)*

Σε άλλες μελέτες *(138,139)* δίνονταν σε γυναίκες συμπληρώματα λιπών συμπεριλαμβανομένων των γ - λινολενικού οξέος (GLA) (n - 6), EPA, DHA (n - 3). Όταν αυτά τα συμπληρώματα λαμβάνονταν για διάρκεια 16 εβδομάδων, αυξήθηκε η συγκέντρωση των δεκτών οστικού σχηματισμού στον ορό. *(140)* Όταν αυτά τα συμπληρώματα καταναλώνονταν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, τα αποτελέσματα είναι αντιφατικά. Στην μελέτη του Kruger MC και των συνεργατών του *(138)* παρατηρήθηκε αύξηση της οστικής πυκνότητας μετά τη λήψη συμπληρωμάτων n - 3 / GLA σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου που λάμβαναν κορεσμένα λιπαρά οξέα, ενώ σε άλλη μελέτη δεν φάνηκε ευεργετικό αποτέλεσμα από την κατανάλωση των συμπληρωμάτων n - 3 / GLA σε σύγκριση με την κατανάλωση συμπληρωμάτων που δεν περιείχαν λίπος όταν μετρήθηκε η οστική πυκνότητα σε όλο το σώμα**.** *(139)* Στη μελέτη του Kruger MC και των συνεργατών του *(138)* χρησιμοποιήθηκαν πιο

ειδικές μετρήσεις για την οστική πυκνότητα (εξέταση της πυκνότητας των ανόργανων συστατικών του οστού στην σπονδυλική στήλη και στο ισχίο) για ποσοτικοποίηση της αλλαγής της οστικής πυκνότητας με την πάροδο του χρόνου. Σε πρόσφατη μελέτη με 179 εμμηνοπαυσιακές γυναίκες δεν παρουσιάστηκε μεταβολή στην οστική πυκνότητα μετά από κατανάλωση 40 γρ. λιναρόσπορων / ημέρα (9,1 γρ α - λινολενικό οξύ) για 12 μήνες. *(141)* Ομοίως, σε μια ελεγχόμενη τυχαιοποιημένη μελέτη οι ασθενείς με νόσο Crohn's, κατανάλωναν συμπληρώματα 2,7 γρ. / ημέρα με EPA και DHA και αντιοξειδωτικά (βιταμίνη A, C, E και σελήνιο) και το αποτέλεσμα αυτής της μελέτης ήταν ότι δεν προκλήθηκε αλλαγή στους δείκτες οστικής απορρόφησης και οστικού σχηματισμού, ανεξάρτητα από την αύξηση των επιπέδων του πλάσματος σε EPA, DHA και σελήνιο. *(142)*

Οι προσταγλανδίνες παράγονται τοπικά στα οστικά κύτταρα και ρυθμίζουν τόσο το σχηματισμό όσο και την απορρόφηση του οστού. *(42)* Ως προς τη σχέση μεταξύ των διαιτητικών πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA), των προσταγλανδίνων (PGs) και του μεταβολισμού των οστών έχει αναφερθεί ότι τα διαιτητικά λιπίδια (n - 6 και n - 3 PUFA, CLA) ρυθμίζουν την παραγωγή της προσταγλανδίνης E_2 (PGE_2), μεταβάλλουν την συγκέντρωση του IGF - I στον οστίτη ιστό και επηρεάζουν την ταχύτητα σχηματισμού του οστού σε κοτόπουλα και αρουραίους. *(105)* Σε αυτά τα πειράματα**,** τα κοτόπουλα και αρουραίοι κατανάλωναν μακράς αλύσου n-3 λ.ο και παρουσίαζαν αυξημένο ρυθμό σχηματισμού των οστών γεγονός που υποδηλώνει επαγωγή της οστεοβλαστικής δραστηριότητας.

Σε πειράματα που έγιναν σε κυτταρικές καλλιέργειες οστεοβλαστών (MC3T3 - E1), όταν τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία EPA για 48 ώρες παρατηρήθηκε ελάττωση της βιοσύνθεσης της PGE_2 σε σχέση με όταν καλλιεργήθηκαν με την παρουσία AA και IL–1. (μια κυτταροκίνη που σχετίστηκε με την απορρόφηση των οστών (*145)* και με την παραγωγή PGE_2) *(144-147)* Επιπλέον, στα κύτταρα που χορηγήθηκε EPA παρατηρήθηκε αυξημένη δραστικότητα αλκαλικής φωσφατάσης και οστεοκαλσίνης συγκριτικά με τα κύτταρα στα οποία χορηγήθηκαν AA και IL–1. Η αλκαλική φωσφατάση είναι ένα ένζυμο το οποίο παράγεται στα οστά και είναι χρήσιμος δείκτης για την διάγνωση ηπατοχολικής νόσου και νόσου των οστών. *(148-152)*

Η PGE_2 που παράγεται από του οστεοβλάστες, μπορεί να οδηγήσει σε σταδιακή μείωση της σύνθεσης του IGF–I και να επηρεάσει τον οστικό σχηματισμό. (*108)* Η PGE_2 ενισχύει την οστική απορρόφηση και θα μπορούσε να συμβάλλει στη

σύνδεση της οστικής απορρόφησης και στο σχηματισμό νέου οστού μέσω της ικανότητας της PGE_2 να αυξάνει την cAMP και κατά συνέπεια την σύνθεση της IGF-1 από τους οστεοβλάστες. (108) Μελέτες με PUFA σε πειραματόζωα δείχνουν ότι η διαιτητική πρόσληψη PUFA και CLA μπορεί να επηρεάσει άμεσα ή έμμεσα την αναδιαμόρφωση του οστού (μέσω των IGFs), μειώνοντας τον χρόνο της οστικής αναδιαμόρφωσης. *(10,153)* Αντίστροφα, διαιτητικά λιπαρά οξέα ανάλογα με τον τύπο (PUFA ή CLA) και την ποσότητα που προσλαμβάνονται μπορούν να ρυθμίσουν την παραγωγή IGF–I από το οστό μέσω της ικανότητάς τους να ρυθμίζουν τοπικά τη συγκέντρωση της PGE_2. *(121,113,154,155)*

Επιπλέον οι ινοβλάστες, μια κατηγορία κυττάρων που παράγει επίσης κολλαγόνο, εμφάνισαν αύξηση του πολλαπλασιασμού τους όταν εκτέθηκαν σε καλλιεργητικό μέσο εμπλουτισμένο με EPA σε σχέση με όταν εκτέθηκαν με AA μετά από in vitro δοκιμασία του τραύματος. *(130)* Σε πρωτογενείς καλλιέργειες χονδροκυττάρων πτηνών αξιολογήθηκαν οι επιπτώσεις των CLA, στο μεταβολισμό των λ.ο, στη σύνθεση κολλαγόνου και στην παραγωγή PGE_2. *(132)* Η χορήγηση CLA, LA στα χονδροκύτταρα επηρέασε την σύνθεση κολλαγόνου με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Το αραχιδονικό μειώνει την σύνθεση κολλαγόνου σε αντίθεση με τα CLA και τα EPA που διεγείρουν την σύνθεση κολλαγόνου. Τέλος, η χορήγηση CLA και EPA οδήγησε σε μειωμένη παραγωγή PGE_2 ενώ η χορήγηση L.A και AA οδήγησε σε αυξημένη παραγωγή PGE_2 σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου. Αυτά τα πειράματα δείχνουν ότι CLA μπορεί να επηρεάζει θετικά στην λειτουργία του χόνδρου και να μειώσει την παραγωγή της προφλεγμονώδους PGE_2.

Ο Watkins και οι συνεργάτες του *(122)* αναφέρουν ότι το λίπος του βουτύρου αυξάνει τον οστικό σχηματισμό στα κοτόπουλα σε σχέση με αυτά που η δίαιτά τους περιείχε υψηλές ποσότητες από n–6 λιπαρά οξέα. Η αύξηση του οστικού σχηματισμού των οστών στα κοτόπουλα που τρέφονται με βούτυρο συνδέθηκε με τη μείωση των επιπέδων του AA και την ex vivo παραγωγή της PGE_2 στα οστά. Συνδέθηκε επίσης με υψηλά επίπεδα εξοζαμίνων στο ορό (συστατικά των πρωτεϊνών του οστού) και υψηλά επίπεδα IGF–I στα οστά. Οι ευεργετικές επιπτώσεις του λίπους του βουτύρου μπορούν να αποδοθούν στο CLA (το λίπος του γάλακτος περιέχει 1,5% CLA).

Σε έρευνα του Watkins *(1)* σε αρουραίους, φάνηκε ότι διατροφή πλούσια σε CLA οδήγησε σε διαφορές στον εντοπισμό του CLA σε διάφορα όργανα και ιστούς. Συγκεκριμένα, ο εγκέφαλος παρουσιάζει χαμηλότερη συγκέντρωση των ισομορφών

του CLA ενώ οι ιστοί των οστών (περιόστεο και μυελό των οστό) περιέχουν υψηλότερες ποσότητες**.** *(133)* Επιπλέον το CLA καταστέλλει το αραχιδονικό που προέρχεται από την βιοσύνθεση των εικοσανοειδών *(113,133)*

Πρωταρχικό βήμα για την ρύθμιση της παραγωγής PGE_2 είναι τα επίπεδα κυκλοξυγονάσης. Έχει δειχθεί ότι τα λιπαρά οξέα ρυθμίζουν την έκφραση και την δραστικότητα του ενζύμου της κυκλοξυγονάσης. Για παράδειγμα ο Nanji και οι συνεργάτες του *(209)* δείχνουν ότι τα κορεσμένα λιπαρά μειώνουν τα επίπεδα της COX-2 στο ήπαρ αρουραίων. Σε άλλη μελέτη σε ζώα, οι αρουραίοι που τρέφονται με δίαιτα πλούσια σε καλαμποκέλαιο (υψηλής περιεκτικότητας σε n-6 PUFA) εμφανίζουν αύξηση στην έκφρασης της COX-2, ενώ όσοι τρέφονται με δίαιτα υψηλή σε ιχθυέλαιο (υψηλής περιεκτικότητας σε n-3 PUFA) δείχνουν καταστολή της έκφρασης της COX-1. *(156)* Πρόσφατα, ο Curtis και οι συνεργάτες του, *(157)* έδειξαν σε καλλιέργειες χονδροκυττάρων, μείωση των επιπέδων mRNA COX–2 σε απάντηση στην έκθεσης σε n-3 PUFA. Επομένως, μπορεί να θεωρηθεί ότι τα CLA μπορούν να επηρεάζουν την παραγωγή PGE_2 μέσω του ενζυμικού συστήματος του COX, που φαίνεται να ασκεί φυσιολογικές δράσεις στα οστά.

Απογαλακτισμένοι αρσενικοί αρουραίοι που τρέφονται με AIN-93G δίαιτα που περιέχει 70 γρ. / κιλό λάδι σόγιας [SBO πηγή n – 6 PUFA] ή μουρουνέλαιο [πηγή n – 3 PUFA] το οποίο αναμειγνύεται με λάδι κάρδαμου [MSO] με ή χωρίς προσθήκη CLA) για 42 ώρες, εμφάνισαν μεταβολές στη συγκέντρωση IGFBP-3 στον ορό**.** *(111)* Συγκεκριμένα, διατροφή με CLA οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της IGFBP-3 σε αρουραίους που τρέφονται με SBO αλλά μειώνεται σε αυτούς που τρέφονται με MSO. Στο οστό της κνήμης παρατήρησαν μειωμένη εναπόθεση μεταλλικών στοιχείων και μειωμένο ρυθμό οστικού σχηματισμού. Παρόλα αυτά ο ρυθμός σχηματισμού των οστών είναι μεγαλύτερος στη δίαιτα με MSO. Σε μια άλλη πρόσφατη μελέτη, αρουραίοι που τρέφονται με δίαιτα με χαμηλό λόγο n–6 / n–3 PUFA εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα αλκαλικής φωσφατάσης στο οστό και χαμηλότερα επίπεδα PGE_2 από ότι αυτοί που τρέφονται με δίαιτα με υψηλό λόγο n–6 / n–3 PUFA *(111).* Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα διαιτητικά PUFA και CLA επηρεάζουν τον μεταβολισμού των οστών και τους δείκτες οστικού σχηματισμού σε αρουραίους.

Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι αυξάνοντας την παραγωγή της PGE_2 σε κοτόπουλα μέσω δίαιτας που περιέχει σογιέλαιο, μειώθηκε ο ρυθμός σχηματισμού των οστών σε σχέση με κοτόπουλα που τους δόθηκε δίαιτα υψηλή σε n – 3 PUFA.

(154) Μια εξήγηση για αυτό το φαινόμενο είναι ότι η υπερπαραγωγή PGE_2 σχετίζεται με αυξημένη αναλογία n–6/ n–3 λ.ο που διαταράσσει τον οστικό σχηματισμό μέσω μειωμένης οστεοβλαστικής δραστηριότητας. *(121)* Η επίδραση του PGE_2 ρυθμίζεται μερικώς μέσω της ρύθμισης της παραγωγής της IGF-1 τόσο σε μεταγραφικό (mRNA) όσο και σε μεταφραστικό επίπεδο (επίπεδο πρωτεΐνης). *(158)* Ως εκ τούτου, οι αναβολικές επιπτώσεις του χαμηλού διαιτητικού λόγου n–6 / n–3 λ.ο πιστεύεται ότι προκαλούνται μέσω αλλαγών στο σύστημα IGF και ακολούθως μεταβάλλεται η παραγωγή PGE_2.

Η παραγωγή της PGE_2 μπορεί επίσης να μειωθεί μέσω της χορήγησης n – 6 PUFA, GLA. (109) Επιπρόσθετα, μειώνοντας την σύνθεση της PGE_2, η διαιτητική GLA μπορεί να ενισχύσει την παραγωγή της PGE_1 η οποία έχει αντιφλεγμονώδεις δράσεις που μπορούν να είναι επωφελείς στο οστό. *(109, 159)* Συνδυάζοντας τα GLA και τα EPA στην δίαιτα αυξάνονται σημαντικά τα επίπεδα του EPA στον ορό αλλά δεν αυξάνονται τα επίπεδα του ορού σε AA γεγονός που υποδηλώνει ότι ο συνδυασμός συμπληρώματος GLA / EPA μπορεί να εφαρμοστεί για να μειώσει την σύνθεση προφλεγμονωδών μεταβολιτών AA στο σώμα. (*160)*

Ο Tian και οι συνεργάτες του *(161)* έδειξαν ότι η έγχυση συνεχούς PGE_2 σε αρουραίους οδήγησε σε απώλεια οστικής μάζας με διέγερση οστικής απορρόφησης σε μεγαλύτερο βαθμό από το οστικό σχηματισμό. Αντίθετα, η διακεκομμένη χορήγηση PGE_2 οδήγησε στην αύξηση του οστικού σχηματισμού *(161)* Ωστόσο, διαφορετικά αποτελέσματα στον οστικό σχηματισμό, στην οστεοκλαστογένεση και στην οστική απορρόφηση έχουν αναφερθεί σε in vitro συστήματα, ανάλογα με τη διάρκεια χορήγησης και τη συγκέντρωση της PGE_2. Η PGE_2 δείχνει ότι διεγείρει την οστεοκλαστογένεση σε καλλιέργειες μυελού των οστών σε ποντίκια *(162)* και σε καλλιέργειες κυττάρων σπλήνα. *(163)*

Πρόσφατα, ο Tsutsumi και οι συνεργάτες του *(164)* έδειξαν ότι οι ινοβλάστες, οι οποίοι εκκρίνουν επίσης RANKL, απουσία του υποδοχέα EP4, δεν μπορούν να παράγουν RANKL μετά από χορήγηση PGE_2 σε knock out ποντίκια. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η σηματοδότηση της PGE_2 διαμεσολαβείται από τον υποδοχέα EP4, όπως και η παραγωγή του RANKL στα κύτταρα αυτά και η διέγερση της οστεοκλαστογένεσης.

Ο Liu και οι συνεργάτες του προτείνουν ένα νέο μηχανισμό δράσης της PGE_2, *(163)* καθώς υποστηρίζουν ότι η οστεοκλαστογένεση που προκαλείται από την PGE_2 και την IL–6 λαμβάνει χώρα μέσω αναστολής της παραγωγής της

οστεοπροτεγερίνης (OPG) και μέσω επαγωγής της παραγωγής του RANKL από τους οστεοβλάστες καθώς και της ρύθμισης της έκφρασης του RANK από οστεοκλάστες.

Ο Atkinson και οι συνεργάτες του *(117)* έδειξαν ότι αρσενικοί Fisher αρουραίοι που τρέφονταν με DHA μετά τον απογαλακτισμό τους, εμφάνισαν σημαντική αύξηση του οστικού σχηματισμού σε σύγκριση με ζώα που τρέφονταν με n–6 PUFA.

Πρόσφατα, ο Poulsen και οι συνεργάτες του το *2008 (163)* έδειξε ότι τα προϊόντα του COX από AA και GLA επάγουν την παραγωγή RANKL σε MC3T3 – E1 / 4 κύτταρα ποντικιών, ενώ το EPA και το DHA δεν την επηρεάζουν Ομοίως σε 2 άλλες μελέτες *(113,166),* έδειξαν ότι το AA ανέστειλαν την έκκριση της OPG από οστεοβλάστες. Τα AA διέγειραν επίσης την έκκριση της RANKL σε αυτό το σύστημα, μειώνοντας έτσι τον λόγο OPG / RANKL. Το DHA κατέστειλαν επίσης την έκκριση OPG, αλλά δεν είχε καμία επίδραση στην έκκριση της RANKL. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το AA επάγει την οστεοκλαστογένεση επηρεάζοντας το λόγο OPG / RANKL ενώ το DHA δεν φαίνεται να έχει σημαντική επίδραση ούτε στην OPG ούτε στο RANKL.

Τέλος, σε μοντέλα ποντικών για τη μελέτη αυτοάνοσων νοσημάτων φάνηκε ότι η κατανάλωση ιχθυελαίων προκαλεί σημαντική ελάττωση στην έκφραση του mRNA του RANKL και ενισχύει την έκφραση του mRNA της OPG. Αυτό συνάδει με τη θεωρία ότι τα n–3 PUFA έχουν προστατευτική δράση στο οστό και μπορεί αυτό να οφείλεται σε μεταβολή της αναλογίας του RANKL / OPG. *(167)*

Δεν υπάρχουν αντίστοιχες μελέτες που να μελετούν τις παραμέτρους του οστικού μεταβολισμού μετά από παρέμβαση με ψάρι στην Ελλάδα.

1.12. Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της μελέτης είναι η αξιολόγηση παραμέτρων του οστικού μεταβολισμού μετά από παρέμβαση με ψάρι (380 γραμμάρια τσιπούρας) διάρκειας οκτώ εβδομάδων σε υγιείς άντρες και γυναίκες.

2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1. Συμμετέχοντες

Οι συμμετέχοντες για να λάβουν μέρος σε αυτή την μελέτη, έπρεπε να πληρούν τα ακόλουθα κριτήρια:
(1) ηλικία μεταξύ 30 και 65 ετών,
(2) δείκτης μάζας σώματος (βάρος σε κιλά / ύψος σε m^2)(BMI) μεταξύ 24 και 31 kg / m^2.

Τα κριτήρια αποκλεισμού ήταν:
(1) εγκυμοσύνη
(2) δίαιτα απώλειας βάρους
(3) λήψη συμπληρωμάτων διατροφής
(4) λήψη φαρμακευτικής αγωγής

Στους συμμετέχοντες που λάμβαναν φαρμακευτική αγωγή για διαταραχές του θυρεοειδούς αδένα, στις γυναίκες που βρίσκονταν υπό θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης και στους συμμετέχοντες που λάμβαναν σίδηρο ή συμπληρώματα φυλλικού οξέος, ή αντισυλληπτικά, επιτράπηκε να λάβουν μέρος στη μελέτη υπό την προϋπόθεση ότι θα συνέχιζαν τη λήψη των φαρμάκων τους κατά τη διάρκεια της μελέτης.

2.2. Σχεδιασμός της μελέτης

Είκοσι φαινομενικά υγιείς άνδρες και γυναίκες συμμετείχαν στη μελέτη για διάρκεια 8 εβδομάδων καταναλώνοντας 380 γραμμάρια ψάρι (τσιπούρα) δύο φορές την εβδομάδα.
Στην αρχή της παρέμβασης δόθηκαν στους συμμετέχοντες προφορικές και γραπτές οδηγίες σχετικά με την προετοιμασία του ψαριού. Συγκεκριμένα, ζητήθηκε από τους συμμετέχοντες να ψήνουν το ψάρι (στο φούρνο, στη σχάρα ή στα κάρβουνα), χρησιμοποιώντας μπαχαρικά και καρυκεύματα της επιλογής τους, διατηρώντας όμως την ίδια μαγειρική προετοιμασία κάθε φορά. Τους ζητήθηκε επίσης να διατηρήσουν τις διατροφικές τους συνήθειες και την σωματική τους δραστηριότητα

κατά τη διάρκεια της παρέμβασης και να απέχουν από κάθε προσπάθεια απώλειας βάρους κατά τη διάρκεια της εν λόγω περιόδου. Τέλος, τα άτομα ενημερώθηκαν να αποφύγουν τη λήψη κάποιας φαρμακευτικής αγωγής, όπως η ασπιρίνη, αντιβιοτικά ή οποιοδήποτε αντιφλεγμονώδη και αναλγητικά φάρμακα.
Το πρωτόκολλο της μελέτης εγκρίθηκε από την επιτροπή δεοντολογίας του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου και πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι. *(168)* Πριν την έναρξη της παρέμβασης, όλοι οι συμμετέχοντες ενημερώθηκαν για τους στόχους και τις διαδικασίες της μελέτης και έδωσαν την έγγραφη συγκατάθεσή τους.

2.3. Αξιολογήσεις της παρέμβασης

Στη αρχή και στο τέλος της παρέμβασης πραγματοποιήθηκε ανθρωπομετρική αξιολόγηση, αξιολόγηση των διατροφικών συνήθειων και της σωματικής δραστηριότητας καθώς και λήψη αίματος για τις εργαστηριακές μετρήσεις

2.3.1. Ανθρωπομετρικές αξιολογήσεις

Το σωματικό βάρος των συμμετεχόντων μετρήθηκε με ψηφιακή ζυγαριά (Seca robusta 813, Αμβούργο, Γερμανία), με ακρίβεια 100 g και το ύψος με ακρίβεια 0,5 εκατοστών. Ο δείκτης μάζας σώματος (BMI) υπολογίστηκε ως βάρος (kg) διαιρούμενο με το τετράγωνο του ύψους (m^2). Η περίμετρος της μέσης υπολογίστηκε με ταινία ακρίβειας 0,1 εκατοστών. Η μέτρηση της περιφέρειας της μέσης διεξήχθη εις διπλούν και στη συνέχεια υπολογίστηκε η μέση τιμή των δύο μετρήσεων.
Επιπλέον, μετρήθηκε η συστολική και η διαστολική αρτηριακή πίεση των ατόμων που δύο φορές, με διαφορά 2 λεπτών, σε καθιστή θέση, χρησιμοποιώντας ένα αυτοματοποιημένο πιεσόμετρο Omron M4 και υπολογίστηκε και καταγράφηκε ο μέσος όρος των δύο μετρήσεων.

2.3.2. Αξιολόγηση διαιτητικής και σωματικής δραστηριότητας

Η συνήθης διατροφική πρόσληψη των συμμετεχόντων κατά τον τελευταίο μήνα εκτιμήθηκε μέσω ενός ημι-ποσοτικού ερωτηματολόγιου συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων με 76 διαφορετικά τρόφιμα (FFQ), το οποίο αναπτύχθηκε

και δοκιμάστηκε για την επαναληψιμότητα του και την σχετική ισχύ του στον ελληνικό πληθυσμό (169)

Με βάση τα δεδομένα του FFQ υπολογίστηκαν, η ημερήσια πρόσληψη ενέργειας και μακροθρεπτικών συστατικών. Επιπλέον, η διαιτητική πρόσληψη των ομάδων τροφίμων εκφράστηκε ως μερίδες ανά ημέρα, χρησιμοποιώντας τα μεγέθη που προβλέπονται από τον πίνακα σύνθεσης τροφίμων του Υπουργείου Γεωργίας των Ηνωμένων Πολιτειών (170) και του ελληνικού πίνακα σύνθεσης τροφίμων (171).

Προκειμένου να αξιολογηθεί το επίπεδο υιοθέτησης μεσογειακής διατροφής, χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης προσκόλλησης στη Μεσογειακή Διατροφή (Med Diet Score) (172). Ειδικότερα, για τον υπολογισμό του δείκτη προσκόλληση ελήφθησαν υπόψη η κατανάλωση των ειδών διατροφής από τις 9 ομάδες τροφίμων (μη επεξεργασμένα δημητριακά, πατάτες, φρούτα, λαχανικά, όσπρια, ψάρια, κρέας και προϊόντα κρέατος, πουλερικά και πλήρη γαλακτοκομικά προϊόντα), καθώς και ελαιόλαδο και τα αλκοολούχα ποτά. Για την κατανάλωση των τροφίμων που είναι κοντά σε αυτό το διατροφικό πρότυπο, αποδόθηκε σκορ 0 στην έλλειψη κατανάλωσης ενώ τα αποτελέσματα 1 έως 5 αποδόθηκαν στην σπάνια κατανάλωση ως την κατανάλωση σε καθημερινή βάση, αντίστοιχα.

Όσον αφορά στην κατανάλωση τροφίμων που είναι μακριά από αυτό το πρότυπο, αποδόθηκαν τα αντίθετα σκορ (δηλ. 0 για σχεδόν καθημερινή κατανάλωση έως 5 για την σπάνια ή καθόλου κατανάλωση). Ειδικά, για την κατανάλωση της πατάτας, αποδόθηκε σκορ 0 έως 3 καθόλου έως μικρή ημερήσια κατανάλωση αντίστοιχα, ενώ μια βαθμολογία 5 αποδόθηκε για κατανάλωση από μια έως δύο μερίδες ανά ημέρα, και το σκορ 4 για την καθημερινή κατανάλωση δύο ή περισσότερων μερίδων. Το εύρος του σκορ της Μεσογειακής Διατροφής είναι 0-55. Υψηλότερες τιμές του διατροφικού σκορ αντιστοιχούν σε μεγαλύτερη προσκόλληση στη μεσογειακή διατροφή.

Η κατανάλωση του ψαριού από τους συμμετέχοντες και η συμμόρφωση στο πρωτόκολλο της μελέτης, παρακολουθήθηκε μέσω ενός ημερολογίου καταγραφής τροφίμων. Πιο συγκεκριμένα, οι συμμετέχοντες κλήθηκαν να σημειώσουν τις ημέρες που κατανάλωναν ψάρια, σε εβδομαδιαία βάση και να επιστρέψουν τα συμπληρωμένα ημερολόγια στο τέλος της παρέμβασης.

Η σωματική δραστηριότητα των συμμετεχόντων αξιολογήθηκε μέσω ενός σύντομου αυτοαναφερόμενου ερωτηματολογίου (ερωτηματολόγιο φυσικής δραστηριότητας του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου), το οποίο αναπτύχθηκε και

ελέγχθηκε για την αξιοπιστία του σε Έλληνες ενήλικες (173). Σε αυτό το ερωτηματολόγιο καταγράφεται η σωματική δραστηριότητα που αναφέρουν οι συμμετέχοντες και εξετάζεται ο χρόνος που δαπανάται σε μέτριες και υψηλής έντασης δραστηριότητες. Επιπλέον, καταγράφονται οι ώρες ύπνου. Το ερωτηματολόγιο αυτό είναι με βάση τα μεταβολικά ισοδύναμα όλων των δραστηριοτήτων της προηγούμενης εβδομάδας, συμπεριλαμβανομένων των δραστηριοτήτων στην εργασία, τον ελεύθερο χρόνο και την ανάπαυση ή τον ύπνο. Στη συνέχεια υπολογίζεται για κάθε συμμετέχοντα η συνολική ημερήσια ενεργειακή δαπάνη και το μέσο επίπεδο σωματικής δραστηριότητας, δηλαδή ο λόγος της συνολικής ημερήσιας ενεργειακής δαπάνης διαιρούμενος με τους μεταβολικούς ρυθμούς ηρεμίας.

2.3.3. Εργαστηριακές μετρήσεις

Πραγματοποιήθηκε αιμοληψία μετά από 10-ωρη νηστεία. Οι συμμετέχοντες κλήθηκαν να αποφύγουν την εκτέλεση έντονης άσκησης την ημέρα πριν από την αιμοληψία, καθώς και να μην καπνίσουν το ίδιο πρωί. Τους ζητήθηκε επίσης να μην λάβουν αντιφλεγμονώδη φάρμακα, ασπιρίνη ή αντιβιοτικά για δύο εβδομάδες ούτε και αναλγητικά φάρμακα για πέντε ημέρες πριν από κάθε αιμοληψία.

2.4. Μέτρηση δεικτών οστικού μεταβολισμού

Οι συγκεντρώσεις των δεικτών οστικού μεταβολισμού OPG και RANKL αξιολογήθηκαν με τη μέθοδο Elisa. Συγκεκριμένα, στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των επιπέδων OPG και ampli-RANKL τα κιτ της εταιρείας Biomedica (Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, Wien, Austria). Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της OPG και της RANKL έγινε με το λογισμικό GraphPad Prism 5.

2.5. Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 16.0. Έγινε έλεγχος κανονικότητας των μεταβλητών με το τεστ Kolmogorf - Smirnov. Όσον αφορά στις ποσοτικές συνεχείς μεταβολές, επειδή δεν εντοπίστηκε κανονική κατανομή, χρησιμοποιήθηκε ως κριτήριο ο συντελεστής συσχέτισης του Spearman.

Για τον ίδιο λόγο χρησιμοποιήθηκε το Wilcoxon test που είναι το αντίστοιχο του t-test για εξαρτημένες μεταβλητές. Όσες μεταβλητές είχαν κανονική κατανομή έγινε t-test για τις εξαρτημένες μεταβλητές. Υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των μεταβλητών. Ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας σε όλες τις συσχετίσεις θεωρήθηκε το 5%.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στο πίνακα 1 παρουσιάζονται τα βασικά χαρακτηριστικά του δείγματος. Συνολικά στην μελέτη έλαβαν μέρος 20 άτομα, 10 άντρες και 10 γυναίκες. Η μέση ηλικία τους ήταν 42 ετών. Το 35% του δείγματος ήταν ενεργοί καπνιστές, ενώ ο μέσος όρος του Δείκτη μάζας σώματος του δείγματος ήταν 29,2 kg / m^2.

Πίνακας 1: Περιγραφικά χαρακτηριστικά του δείγματος.

Περιγραφικά χαρακτηριστικά	**Μέσος όρος ± τυπική απόκλιση ή N (%)**
Φύλο	
Άντρες	10 (50 %)
Γυναίκες	10 (50 %)
Ηλικία (έτη)	42,0 ± 8,45
Κάπνισμα	
Μη καπνιστές	10 (50 %)
Πρώην καπνιστές	3 (15 %)
Καπνιστές	7 (35 %)
Κάπνισμα (έτη καπνίσματος)	17,6 ± 13,7
Αριθμός των τσιγάρων που καταναλώνουν την ημέρα (αρ. τσιγάρων / ημέρα)	10,9 ± 11,1
Δείκτης μάζας σώματος (ΔΜΣ) (kg / m^2)	29,2 ± 3,78
Περίμετρος μέσης (cm)	97,3 ± 11,4

Πίνακας 2 : Οι ομάδες τροφίμων στην αρχή και στο τέλος της παρέμβασης.

Ομάδες τροφίμων	Αρχή της παρέμβασης	Τέλος της παρέμβασης	p-value
Μη επεξεργασμένα δημητριακά (μερίδα / ημέρα)	0,8 ± 1,08	0,7 ± 0,9	0,272
Πατάτα (μερίδα / ημέρα)	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,2	0,306
Φρούτα (μερίδα / ημέρα)	1,1 ± 0,9	0,9 ± 0,7	**0,053**
Λαχανικά (μερίδα / ημέρα)	1,9 ± 0,9	1,8 ± 0,8	0,538
Όσπρια (μερίδα / ημέρα)	0,4 ± 0,3	0,3 ± 0,2	**0,035**
Ψάρι (μερίδα / ημέρα)	0,1 ± 0,1	0,6 ± 0,1	**< 0,001**
Κόκκινο κρέας και προϊόντα κρέατος (μερίδα / ημέρα)	1,3 ± 0,6	1,4 ± 0,7	0,629
Πουλερικά (μερίδα / ημέρα)	0,5 ± 0,6	0,5 ± 0,4	0,752

Πλήρη γαλακτοκομικά προϊόντα (μερίδα / ημέρα)	0,9 ± 0,9	0,7 ± 0,7	0,118
Ελαιόλαδο (μερίδα / ημέρα)	1,0 ± 0,6	1,0 ± 0,5	0,849
Αλκοόλ (μερίδα / ημέρα)	0,7 ± 0,6	0,7 ± 0,7	0,640
Δείκτης προσκόλλησης στην μεσογειακή διατροφή (Med Diet score) (0-55)	25, 9 ± 5,7	27,1 ± 4,4	0,210

Σχετικά με τις αλλαγές στη διαιτητική πρόσληψη κατά το τέλος της παρέμβασης παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην ημερήσια κατανάλωση των οσπρίων και του ψαριού (Πίνακας 2). Επίσης παρατηρήθηκε μια τάση για μείωση της ημερήσιας κατανάλωσης φρούτων.

Πίνακας 3: Η κατανάλωση θερμίδων και μακροθρεπτικών συστατικών στην αρχή και στο τέλος της παρέμβασης.

	Αρχή της παρέμβασης	**Τέλος της παρέμβασης**	**p- value**
Ημερήσια θερμιδική πρόσληψη (kcal /	2173 ± 510	2063 ± 542	0,191

ημέρα)			
Ημερήσιο ποσοστό κατανάλωσης υδατανθράκων (% / ημέρα)	39,1 ± 6,25	37,7 ± 5,66	0,263
Ημερήσιο ποσοστό κατανάλωσης πρωτεϊνών (% / ημέρα)	14,3 ± 2,65	15,4 ± 3,03	**0,004**
Ημερήσιο ποσοστό κατανάλωσης λίπους (% / ημέρα)	46,7 ± 6,39	46,9 ± 5,73	0,794

Αντίστοιχα, η ημερήσια πρόσληψη πρωτεϊνών ήταν στατιστικά σημαντικά διαφορετική στην αρχή και στο τέλος της παρέμβασης, ενώ δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο ποσοστό της ημερήσια κατανάλωσης υδατανθράκων, λιπών και θερμίδων (Πίνακας 3).

Κατά την διάρκεια της παρέμβασης παρατηρήθηκε μη στατιστικά σημαντική διαφορά στο δείκτη μάζας σώματος, στο σωματικό βάρος και στην περίμετρο μέσης ($p > 0,05$). Η φυσική δραστηριότητα βρέθηκε επίσης να μην έχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην αρχή και στο τέλος της παρέμβασης ($p > 0,05$).

Ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση του σωματικού βάρους (kg) στην αρχή και στο τέλος της παρέμβασης ήταν 82,5 ± 16,5 και 82,8 ± 16,9 αντίστοιχα. Ο δείκτης μάζας σώματος (kg / m^2) και η φυσική δραστηριότητα (ώρες / ημέρα) στην αρχή της παρέμβασης είχαν ως μέση τιμή 29,2 ± 3,78 και 1,42 ± 1,98 αντίστοιχα, ενώ η μέση τιμή στο τέλος της παρέμβασης ήταν 29,2 ± 3,86 και 1,42 ± 0,2 αντίστοιχα. Η περίμετρος μέσης (cm) είχε μέσο όρο και τυπική απόκλιση 97,3 ± 11,35 στην αρχή της παρέμβασης και 97,49 ± 11,14.στο τέλος της παρέμβασης

Πίνακας 4: Οι δείκτες οστικού μεταβολισμού στην αρχή και στο τέλος της παρέμβασης.

Δείκτες οστικού μεταβολισμού	**Αρχή της παρέμβασης**	**Τέλος της παρέμβασης**	**p- value**
[1]OPG (pmol /L)	3,13 ± 1,19	3,95 ± 2,94	0,351
[2]RANKL (pmol /L)	0,288 ± 0,208	0,263 ± 0,16	0,251
OPG / RANKL	18,4 ± 20,14	22,2 ± 20,38	0,235
Άντρες			
OPG (pmol /L)	3,36 ± 1,34	4,69 ± 4,07	0,721
RANKL (pmol /L)	0,288 ± 0,135	0,279 ± 0,138	0,646
OPG / RANKL	20,4 ± 26,8	25,3 ± 25,7	0,476
Γυναίκες			
OPG (pmol /L)	2,89 ± 1,04	3,2 ± 0,646	0,203

RANKL (pmol /L)	0,288 ± 0,271	0,248 ± 0,183	0,314
OPG / RANKL	16,4 ± 11,3	19,1 ± 14,0	0,359

[1] OPG – οστεοπροτεγερίνη.

[2] RANKL – συνδέτης του ενεργοποιητή του υποδοχέα του πυρηνικού παράγοντα κΒ

Αναφορικά με τους υπό εξέταση δείκτες οστικού μεταβολισμού, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην συγκέντρωση του RANKL και στην OPG στο σύνολο του δείγματος αλλά ούτε και στο σύνολο των αντρών και των γυναικών, αντίστοιχα (Πίνακας 4).

Πίνακας 5: Οι συσχετίσεις μεταξύ των μεταβολών των δεικτών οστικού μεταβολισμού και των επιλεγμένων μεταβλητών στο τρόπο ζωής.

	Μεταβολή στη συγκέντρωση της OPG		**Μεταβολή στη συγκέντρωση του RANKL**		**Μεταβολή στο λόγο OPG / RANKL**	
	Δείκτης συσχέτισης[1]	**p-value**	**Δείκτης συσχέτισης**	**p-value**	**Δείκτης συσχέτισης**	**p-value**
Μεταβολή στο δείκτη προσκόλλησης στην Μεσογειακή διατροφή	0,207	0,381	0,475	**0,034**	0,148	0,535
Μεταβολή στην κατανάλωση θερμίδων (kcal / ημέρα)	-0,606	**0,005**	0,110	0,645	-0,584	**0,007**

Μεταβολή στο ποσοστό του λίπους (% / ημέρα)	-0,212*	0,369	-0,301	0,198	-0,030	0,900
Μεταβολή στη σωματική δραστηριότητα (ώρες / ημέρα)	0,393	0,087	0,154	0,518	0,273	0,244
Μεταβολή στην κατανάλωση ψαριού (μερίδες / ημέρα)	-0,169*	0,477	-0,213	0,367	-0,139	0,560
Μεταβολή στην κατανάλωση οσπρίων (μερίδες / ημέρα)	-0,064*	0,789	-0,247	0,295	-0,383	0,095
Μεταβολή στην κατανάλωση φρούτων (μερίδες / ημέρα)	-0,101	0,673	-0,197	0,405	0,044	0,855
Μεταβολή του ΔΜΣ (m^2/kg)	-0,520	**0,019**	0,106	0,656	-0,249	0,289

[1] Όλες οι συσχετίσεις πραγματοποιήθηκαν με το δείκτη Spearman εκτός από τις συσχετίσεις με * , οι οποίες πραγματοποιήθηκαν με το δείκτη Pearson.

Στη συνέχεια διερευνήθηκαν πιθανές συσχετίσεις ανάμεσα στις αλλαγές που πραγματοποιήθηκαν στους δείκτες οστικού μεταβολισμού και στις αλλαγές της διαιτητικής πρόσληψης (Πίνακας 5). Παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της μεταβολής της συγκέντρωσης του RANKL και της μεταβολής του δείκτη

προσκόλλησης στην μεσογειακή δίαιτα. Παρατηρήθηκε επίσης στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ της μεταβολής της κατανάλωσης θερμίδων και της μεταβολής στο λόγο OPG / RANKL, καθώς και της μεταβολής του ΔΜΣ και της μεταβολής της συγκέντρωσης της OPG. Τέλος, στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση υπήρχε και στην μεταβολή της κατανάλωσης θερμίδων και της μεταβολής της συγκέντρωσης της OPG.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η παρέμβαση με τσιπούρα για 8 βδομάδες σε άντρες και γυναίκες δεν επηρέασε τους δείκτες οστικού μεταβολισμού οστεοπροτεγερίνη (OPG) και RANKL και το λόγο OPG/ RANKL στο σύνολο του δείγματος αλλά ούτε και στο σύνολο των αντρών και των γυναικών αντίστοιχα. Αυτό ίσως να οφείλεται στους περιορισμούς της μελέτης.

Ένα από τα ευρήματα της μελέτης ήταν ότι η ημερήσια κατανάλωση οσπρίων και ψαριών παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές στην αρχή και στο τέλος της παρέμβασης. Οι μερίδες των οσπρίων μειώθηκαν ενώ οι μερίδες των ψαριών αυξήθηκαν. Η διαφορά της ημερήσιας κατανάλωσης οσπρίων ήταν πάρα πολύ μικρή αν και ήταν στατιστικά σημαντική αυτό οφείλεται στους περιορισμούς της μελέτης, η αύξηση της ημερήσιας κατανάλωσης ψαριού οφείλεται στο ότι οι εθελοντές κατανάλωναν 380 γρ. τσιπούρα δυο φορές την βδομάδα. Επίσης παρατηρήθηκε μια τάση μείωσης της κατανάλωσης φρούτων κατά την διάρκεια της παρέμβασης παρόλα αυτά δεν ήταν στατιστικά σημαντική διαφορά.. Επιπλέον βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο ποσοστό της ημερήσιας πρόσληψης πρωτεϊνών, ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στο ημερήσιο ποσοστό κατανάλωση υδατανθράκων, λίπους και στην ημερήσια κατανάλωση θερμίδων. Αυτό το αποτέλεσμα ήταν αναμενόμενο λόγω της κατανάλωσης δυο φορές την εβδομάδα ψάρι. Το ψάρι αποτελείται από πρωτεΐνες γι αυτό και παρατηρήθηκε αυτή η αύξηση. Το ψάρι περιέχει πολυακόρεστα λιπαρά οξέα παρόλα αυτά δεν επηρεάστηκε το ποσοστό του λίπους που κατανάλωνε το δείγμα. Αυτό δείχνει ότι τα πολυακόρεστα λ.ο αντικατάστησαν κάποιο άλλο είδος λίπους (κορεσμένα ή μονοακόρεστα) ή οι πηγές πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που κατανάλωνε το δείγμα αντικαταστήθηκε από την κατανάλωση του ψαριού. Παρόλα αυτά δεν έχουμε δεδομένα σχετικά με τα είδη του λίπους που κατανάλωνε το δείγμα αυτής της μελέτης.

Επιπρόσθετα, βρέθηκε στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ της μεταβολής της συγκέντρωσης της οστεοπροτεγερίνης καθώς και μεταξύ της μεταβολής των θερμίδων και της μεταβολής του λόγου OPG/RANKL.Συσχετίζοντας τη μεταβολή του ΔΜΣ και τη μεταβολή της συγκέντρωσης της OPG στο τέλος της παρέμβασης, παρατηρήθηκε ότι η συσχέτιση μεταξύ τους ήταν αρνητική, δηλαδή

αύξηση στα επίπεδα του ΔΜΣ στο τέλος της παρέμβασης σχετιζόταν με μείωση των συγκεντρώσεων της OPG, επίσης κατά το τέλος της παρέμβασης.
Αυτό ίσως να οφείλεται στις επιδράσεις του ΔΜΣ στα οστά. Έχουν γίνει πολλές μελέτες σχετικά με το ΔΜΣ και τον οστικό μεταβολισμό και φαίνεται ότι η παχυσαρκία και τα άτομα με ψυχογενή ανορεξία έχουν διαφορετικά ερεθίσματα που επηρεάζουν τον οστικό μεταβολισμό. Ο ΔΜΣ επηρεάζει τον οστικό μεταβολισμό μέσω διαφόρων μηχανισμών όπως είναι η ανεπάρκεια βιταμίνης D, τα επίπεδα της παραθορμόνης, ο άξονας υπόφυσης- υποθάλαμου-γονάδες , ο άξονας αυξητικής ορμόνης και IGF-1, ο άξονας υποθάλαμου-υπόφυση-επινεφρίδια, το σπλαχνικό και υποδόριο λίπος, τα επίπεδα λεπτίνης, τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης, τα επίπεδα της PPY, τα επίπεδα της γκρελίνης, τα επίπεδα τα ινσουλίνης και τα επίπεδα του NPY. *(174)* Θετική συσχέτιση μεταξύ της μεταβολής του δείκτες προσκόλληση στην Μεσογειακή διατροφή (Μ.Δ) και της μεταβολής της συγκέντρωσης του RANKL. Θα περιμέναμε ότι ο δείκτης προσκόλλησης στην Μεσογειακή Διατροφή θα είχε αρνητική συσχέτιση το δείκτη RANKL γιατί η ΜΔ προτείνει αυξημένη κατανάλωση πολυακόρεστων λ.ο και μειωμένη κατανάλωση κορεσμένων λ.ο. Τα πολυακόρεστα λ.ο επηρεάζουν θετικά τον οστικό μεταβολισμό, παρόλα αυτά το δικό μας εύρημα ίσως να οφείλεται στους περιορισμούς της μελέτης.

Παρόμοιες μελέτες εξέτασαν την επίδραση των ω - 3 λιπαρών οξέων στους οστικούς δείκτες με ποικίλα αποτελέσματα. Τα μακράς αλύσου πολυακόρεστα λιπαρά οξέα δείχνουν να επιδρούν στις κυτταρικές μεμβράνες και στον υποδοχέα RANK που βρίσκεται στους οστεοκλάστες οι οποίοι ελέγχουν την οστεοκλαστογένεση. *(124,165,166)* Αντίθετα σε κάποιες μελέτες σε ανθρώπους βρέθηκε επίδραση των ω - 3 λιπαρών οξέων στους δείκτες οστικού μεταβολισμού *(139)* κυρίως στις δεοξυπυριδινολίνες και στο N - τελοπεπτίδιο του κολλαγόνου. *(175,138,110,176)* Σε αυτές τις μελέτες φάνηκε, ότι το αραχιδονικό διεγείρει την έκκριση του RANKL μειώνοντας έτσι τον λόγο OPG / RANKL. Το εικοσιδυεξανοϊκό οξύ κατέστειλε επίσης την έκκριση της OPG, αλλά δεν είχε καμία επίδραση στην έκκριση του RANKL. Το ΑΑ ενίσχυσε την οστεοκλαστογένεση επηρεάζοντας το λόγο OPG / RANKL ενώ το DHA δεν φάνηκε να έχει σημαντική επίδραση ούτε στην OPG ούτε στο RANKL. Στις περισσότερες μελέτες υποστηρίζεται ότι τα n - 3 PUFA έχουν προστατευτική δράση στο οστό και η δράση αυτή διαμεσολαβείται από το σύστημα RANK / RANKL / OPG. *(167)* Συγκεκριμένα, έχουν δείξει ότι επηρεάζουν τους δείκτες οστικού σχηματισμού τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ποντικούς σε κυτταρικές

σειρές οστεοβλαστών όταν η παραγωγή της PGE_2 είναι ελαττωμένη. *(148-152)* Σε άλλες μελέτες *(139,138)* διερεύνησαν την επίδραση συμπληρωμάτων λινολενικού οξέος (GLA) (n - 6), EPA και DHA (n - 3) σε ένα δείγμα γυναικών. Όταν αυτά τα συμπληρώματα καταναλώθηκαν για 16 βδομάδες οι δείκτες οστικού σχηματισμού στον ορό παρουσίασαν αύξηση. *(140)* Ο Cornish και οι συνεργάτες του, *(177)* μελέτησαν την επίδραση των κορεσμένων λιπαρών οξέων στην οστεοκλαστογένεση.

Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες σχετικά με τα ω – 3 και τον οστικό μεταβολισμό. Μελέτες που έγιναν σε ανθρώπους έδειξαν ότι δείχνουν ότι τα διαιτητικά λιπίδια μπορούν να επηρεάσουν την υγεία των οστών. *(123,125)* Μια μελέτη ανέφερε ότι η έλλειψη μακράς αλύσου πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μπορεί να επιφέρει δυσμενείς επιπτώσεις στο οστό. (165) Το 1931 ο Borland και ο Jackson *(178)* ανέφεραν ότι η ανεπάρκεια των απαραίτητων λιπαρών οξέων (EPA) οδηγεί σε σοβαρή οστεοπόρωση. Τα μακράς αλύσου πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (LCPUFAs) με μήκος αλυσίδας μεγαλύτερο από 18 άτομα άνθρακα είναι επωφελή για την υγεία των οστών. *(111,179)* Σε μια ανασκόπηση των Kruger και Horrobin (110*)* υποστηρίζεται ότι τα n - 3 και n - 6 πολυακόρεστα λ.ο, μπορεί να έχουν ευεργετική δράση για τα οστά όταν καταναλωθούν σε κατάλληλες ποσότητες. Επιπρόσθετα ο Crowin και οι συνεργάτες του *(109)* έδειξαν ότι τα κορεσμένα λ.ο στην δίαιτα είναι αντιστρόφως ανάλογα με την οστική πυκνότητα.

Ο Salari και οι συνεργάτες του *(115)* συγκέντρωσαν δεδομένα από αρκετές μελέτες και μέρος των δεδομένων της μετά ανάλυσης είναι διαθέσιμα. Προτείνουν ότι τα ω - 3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα φαίνεται να αναστέλλουν την απορρόφηση και να προωθούν το σχηματισμό οστού, επιπρόσθετα ο λόγος n - 6 προς n - 3 λιπαρών οξέων στην δίαιτα μπορεί να είναι σημαντικός. *(117)* Ο Martinez – Ramirez και συνεργάτες του *(180)* έδειξαν ότι ο υψηλότερος λόγος μονοακόρεστου λίπους στη δίαιτα σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο κατάγματος σε ηλικιωμένους. Η ίδια μελέτη επίσης έδειξε στον ίδιο πληθυσμό, αυξημένο κίνδυνο για κάταγμα με υψηλή πρόσληψη ω - 6 λ.ο.

Κάποιες μελέτες σε ανθρώπους δείχνουν ότι τα πολυακόρεστα λ.ο μπορούν να αυξήσουν το οστικό σχηματισμό και να επηρεάσουν την κορυφαία οστική μάζα *(175)* Δυο μελέτες έδειξαν επίσης πιθανή θετική συσχέτιση μεταξύ του μονοακόρεστου λίπους της διατροφής και της οστικής πυκνότητας. *(181,182)* Επιπλέον, έχει αναφερθεί θετική σχέση μεταξύ της κατανάλωσης εικοσανοειδών EPA και της οστικής πυκνότητας. *(137)* Συμπληρωματικές δοκιμές επίσης

αναδεικνύουν τις θετικές επιπτώσεις των n - 3 λιπαρών οξέων στην υγεία των οστών. *(137)* Δώδεκα μήνες χορήγηση συμπληρωμάτων EPA για παράδειγμα, οδήγησε σε αύξηση της οστικής πυκνότητας σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση. *(137)* Αντίθετα, σε πρόσφατη μελέτη σε 179 εμμηνοπαυσιακές γυναίκες δεν βρέθηκε κάποια αλλαγή στην οστική πυκνότητα μετά από κατανάλωση 40 γρ. λιναρόσπορων / ημέρα (9,1 γρ α-λινολενικό οξύ) για 12 μήνες. *(141)*

Μελέτες σε πειραματόζωα έδειξαν την πρόκληση καταγμάτων σε νεογέννητους αρουραίους που είχαν ανεπάρκεια διαιτητικών απαραίτητων λιπαρών οξέων. (*110)* Έρευνες σε κοτόπουλα και αρουραίους έδειξαν ότι τα PUFA και το συζευγμένο λινελαϊκό οξύ επηρεάζουν τις ιστομορφομετρικές μετρήσεις στην αναδιαμόρφωση των οστών. *(154,127,113,111)* Τα ω-3 πολυακόρεστα λ.ο, φαίνεται να αναστέλλουν την δραστηριότητα των οστεοκλαστών και να ενισχύουν την δραστηριότητα των οστεοβλαστών. *(124,125).* Σε μεγάλο αριθμό μελετών που έγιναν σε ζώα φάνηκε, ότι ζώα που είχαν καταναλώσει πολυακόρεστα λ.ο, εμφάνισαν αύξηση στη συγκέντρωση μετάλλων του οστού, στην οστική μάζα, στο μηριαίο πάχος και στο μήκος των οστών. Τα n-3 PUFAs αυξάνουν επίσης τη δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP) σε αρσενικούς αρουραίους καθώς και στα επίπεδα του IGF-1 και της IGFBP3. *(183,113,1)*

Ο μηχανισμός δράσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στα οστά είναι περίπλοκος και χρειάζεται ακόμα αρκετές έρευνες ώστε να αποσαφηνιστεί πλήρως. Οι δείκτες που μετρήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν ο RANKL και η OPG. Ο RANKL φαίνεται να είναι ο κύριος διεγέρτης τόσο της διαφοροποίησης των προ-οστοκλαστών σε οστεοκλάστες καθώς και της δραστηριότητας των ώριμων οστεοκλαστών. *(4)* Η οστεοπροτεγερίνη ανακαλύφθηκε το 1997 από δύο ομάδες που εργάστηκαν ανεξάρτητα και ο όρος επινοήθηκε για τις προστατευτικές επιδράσεις της στα οστά. (λατινική ονομασία από οστό + protegere = προστατεύω). *(47,48,46)*

Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) αποτελούνται από δυο κυρίως οικογένειες, τα «ω-6» και «ω-3» λιπαρά οξέα. Το Λινελαϊκό οξύ (LA) και το α-λινολενικό οξύ (ALA) είναι τα απλούστερα μέλη των «ω-6» και «ω-3» πολυακόρεστων λιπαρών οξέων αντίστοιχα. Από βιοχημικής άποψης, και οι δύο ομάδες αποτελούνται από 18 άτομα άνθρακα στην αλυσίδα τους, παρουσιάζοντας δύο (LA) ή τρεις (ALA) διπλούς δεσμούς μεταξύ των ατόμων άνθρακα. Η θέση της πρώτης ακορεστότητας, καταμετράται από το μεθυλιωμένο άκρο του λιπαρού οξέως, το οποίο λέγεται ωμέγα – C, και έτσι δημιουργούνται τα ονόματα των δύο τάξεων

πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Από θρεπτικής απόψεως, τα LA και ALA θεωρούνται απαραίτητα λιπαρά οξέα (EFAs), δεδομένου ότι δεν μπορούν να συντεθούν στο ανθρώπινο σώμα και ως επί το πλείστον προσλαμβάνονται από την τροφή *(99).* Τα δυο αυτά λιπαρά οξέα υπόκεινται σε μια σειρά ενζυμικών αντιδράσεων επιμήκυνσης και αποκορεσμού και μετατρέπονται σε μεταβολίτες όπως το αραχιδονικό οξύ (AA), το εικοσιπεντανοϊκό οξύ (EPA) και το εικοσιδυοεξανοϊκό οξύ (DHA) *(100)* Το α-λινολενικό οξύ (18:3ω-3) είναι η πρόδρομη ένωση για το σχηματισμό μακράς αλύσου ω-3 PUFA, όπως είναι το εικοσαπεντανοϊκό (EPA 20:5ω-3) και εικοσιδυοεξανοϊκό οξύ (DHA 22:6ω-3), τα οποία μπορούν να μειώσουν την παραγωγή προ-φλεγμονωδών εικοσανοειδών προσταγλανδίνης E2 και λευκοτριενίων B4 *(101)*

Το LA (18:2ω-6) το οποίο ανήκει στην οικογένεια των ω-6 PUFA μπορεί να μετατραπεί αρχικά σε γ-λινολενικό οξύ (GLA) και στη συνέχεια σε διομο-γ-λινολενικό οξύ (DGLA) και σε αραχιδονικό οξύ (AA). Το AA αποτελεί σημαντικό συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών και είναι πρόδρομος των εικοσανοειδών.

Οι προσταγλανδίνες (PGs) και συγκεκριμένα η προσταγλανδίνη E_2 είναι ισχυρός ρυθμιστής της οστικής αναδιαμόρφωσης (remodeling) επιδρά και στην οστική απορρόφηση *(106)* και στον οστικό σχηματισμό. *(107,108)* Τα ω-3 πολυακόρεστα λ.ο επηρεάζουν την οστική απορρόφηση μέσω της μείωσης της παραγωγής ουσιών με προφλεγμονώδη δράση όπως οι προσταγλανδίνες.*(129)* Τα πολυακόρεστα λ.ο. και η χαμηλή δόση της προσταγλανδίνης θα μπορούσε να ενισχύει την περιεκτικότητα των ανόργανων αλάτων μέσω διαφόρων μηχανισμών. *(184)* Τα κοτόπουλα που κατανάλωναν μουρουνέλαιο (n-3 PUFA) είχαν υψηλότερα επίπεδα αλκαλικής φωσφατάσης (ALP) στον ορό και αυξημένο ρυθμό σχηματισμού οστών σε σχέση με αυτά που κατανάλωναν έλαιο σόγιας. (n-6 PUFA). *(111,154)* Η επίδραση των πολυακόρεστων λ.ο θα μπορούσε να ασκηθεί μέσω της διαφοροποίησης και της μείωσης της σύνθεσης της προσταγλανδίνης E_2, μέσω της αλλαγής της δραστηριότητας της ALP *(111,154).* Η ALP είναι χρήσιμος δείκτης για την διάγνωση της ηπατοχολικής νόσου και της νόσου των οστών. Η προσταγλανδίνη E_2 δρα μέσω της αναστολής της οστεοπροτεγερίνης και της διέγερση και της έκκρισης της παραγωγής του RANKL από τους οστεοβλάστες καθώς και μέσω της αυξημένης ρύθμισης της έκφρασης του RANKL από τους οστεοκλάστες.Η PGE_2 διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των

πρόδρομων οστεοβλαστικών κυττάρων σε κύτταρα κρανιακού θόλου σε μοντέλα αρουραίων. *(185)*

Οι IGFs απελευθερώνονται κατά την διάρκεια της οστεοκλαστικής δραστηριότητας, της απορρόφησης και δρουν με αυτοκρινή ή παρακρινή τρόπο για να διεγείρουν το σχηματισμό των νέων οστικών κυττάρων και την παραγωγή του οστεοειδούς *(111)* Το IGF-1 δρα ως ρυθμιστής της λειτουργίας των κυττάρων των οστών και διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των προ-οστεοβλαστών, αυξάνοντας έτσι τον αριθμό των κυττάρων που είναι ικανά να παράγουν οστεοειδές. Επιπλέον το IGF-1 αυξάνει την έκφραση του κολλαγόνου που ευθύνεται για τις αναβολικές επιπτώσεις του οστίτη ιστού. *(186,187)* Οι IGFs κρίνονται αναγκαίες για την διατήρηση της κανονικής αλληλεπίδρασης μεταξύ του οστεοβλάστη και του οστεοκλάστη που υποστηρίζου την οστεοκλαστογένεση μέσω της ρύθμισης της έκφρασης RANKL και RANK. Τα πολυακόρεστα λ.ο που προέρχονται από τη διατροφή, μπορεί να αυξήσουν ή να μειώσουν την παραγωγή της IGF-1 στο οστό μέσω της ικανότητάς τους να διαμορφώνουν την τοπική συγκέντρωση ΑΑ μεταβολιτών της προσταγλανδίνης E_2. *(113,108,187)* Η PGE_2 προωθεί την έκφραση των IGFBP (IGF δεσμευτικές πρωτεΐνες). *(186,188,189)* Η IGFBP-3 είναι ισχυρός ρυθμιστής της IGF και της συνολικής αύξησης και ανάπτυξης. Σε μια μελέτη που έγινε το 2003 *(125)* ανάφεραν ρύθμιση της επίδρασης των πολυακόρεστων λ.ο στην έκφραση του Cbfa-1 των οστεοβλαστών στο κρανίο εμβρυικού ποντικού: ΑΑ, EPA, LA τα οποία διεγείρουν την έκφραση του Cbfa-1 αλλά το CLA (συζευγμένο λινελαϊκό οξύ) μείωσε τα επίπεδα της πρωτεΐνης του Cbfa-1 μετά από 14 μέρες θεραπείας. Οι επιδράσεις που παρατηρήθηκαν ίσως οφείλονται στην αυξημένη παραγωγή της PGE_2. Σε ποντίκια που κατανάλωναν EPA και DHA εξετάστηκε η δραστηριότητα TRAP ο οποίος θεωρείται ότι είναι ένας δείκτης ωρίμανσης οστεοκλαστών σε σχέση με τα ω-6 λ.ο. Τα DHA προκάλεσε μειωμένη ενεργοποίηση NP-kappa-b και p38MARK σε σύγκριση με EPA και αυτό προκάλεσε αναστολή ειδικών γονιδίων οστεοκλαστών όπως TRAP, καθεψίνη, c FOS, TNF-a. *(124,190)*

Η Ιντελευκίνη -1, η ιντερλευκίνη-6, ο παράγοντας νέκρωσης όγκου άλφα επηρεάζουν τον οστικό σχηματισμό και την δραστηριότητα των οστεοκλαστών στην απορρόφηση του οστού και συνεπώς διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο μαζί με άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες στον έλεγχο της οστικής απορρόφησης. *(191)* Τροποποίηση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών από το προφίλ των πολυακόρεστων λ.ο θα μπορούσε να έχει θετική επίδραση στην αύξηση και στην

ανάπτυξη των οστών. *(125,128,191-194)* Τα ΑΑ διεγείρουν την έκφραση της ιντερλευκίνης 1α, ιντερλευκίνης 1β, TNF-a, και του MCS-F. *(195)* Ο M-CSF που απελευθερώνεται από οστεοβλάστες (ως αποτέλεσμα της δράσης της παραθορμόνης) ενώ ασκεί παρακρινή δράσεις στους οστεοκλάστες. Ο M-CSF προσδένεται σε υποδοχείς των οστεοκλαστών επηρεάζει την διαφοροποίηση, και τελικά, οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα ασβεστίου στο πλάσμα μέσω οστεόλυσης.*(196)* Οι αλλαγές στις διατροφικές μας συνήθειες μπορούν να αυξήσουν την πρόσληψη ω-3 πολυακόρεστων λ.ο. που θα μπορούσαν να επηρεάζουν την παραγωγή ιντερλευκίνης-1, ιντερλευκίνης-6, και TNF-a, τα οποία με την σειρά τους τροποποιούν την υγεία των οστών. *(197,126,115)*

Η λιποξυγονάσης (LOX) είναι ένα ένζυμο παράγει τους μεσολαβητές των λιπιδίων (ρεσολβίνες, προτεκτίνες, λιποξίνες, δοκοσανοειδή) έχουν αντι-φλεγμονώδεις δραστηριότητες. (*198,199)* Οι ρεσολβίνες και οι λιποξίνες αναστέλλουν τη φλεγμονή που προκαλείται από απορρόφηση οστού και συνεπώς μπορεί να παρέχει ένα μηχανισμό με τον οποίο τα n-3 PUFAs προστατεύουν έναντι της απώλειας των οστών. Η RvE1 μειώνει την ανάπτυξη και τον σχηματισμό οστεοκλαστών στην κοιλότητα καθώς και τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών.

Μεταξύ των σημαντικών μηχανισμών της δράσης PUFA είναι οι επιπτώσεις τους στη μεταγραφή του γονιδίου PPAR. *(200,201) Ο* PPARγ φαίνεται να ρυθμίζει την λειτουργία του IGF-1 *(202)* Έχει περιγραφεί ο ανασταλτικός ρόλος της PPARγ στην ωρίμανση διαφόρων οστεοβλαστικών κυτταρικών σειρών. *(202-204)* Τα χαμηλότερα επίπεδα των ενεργοποιητών του PPARγ επηρεάζουν την δραστικότητα αλκαλικής φωσφατάσης, και την έκφραση των γονιδίων του οστεοβλάστη, αλλά επηρεάζουν και τα υψηλά επίπεδα των ειδικών προσδέτων PPARγ κιγλιταζόνη και τρογλιταζόνη που ανέστειλαν την ωρίμανση. *(202-205)* Ο PPARγ παίζει ένα ρόλο στη διέγερση της οστεοκλαστογένεσης. (205) Η θέση σύνδεσης της PPARγ είναι αρκετά ετερόκλητη, αλλά το α-λινολενικό, λινελαϊκό και το αραχιδονικό οξύ, καθώς και η προσταγλανδίνη 15d-PGJ_2 είναι από τους πιο ισχυρούς φυσικούς προσδέτες της PPARγ. *(206,207)*

Στα πλεονεκτήματα της μελέτης συμπεριλαμβάνονται οι αναλυτικές και συνδυαστικές αξιολογήσεις (ανθρωπομετρική αξιολόγηση, αξιολόγηση διατροφικών συνήθειων διατροφής και σωματικής δραστηριότητας και εργαστηριακές μετρήσεις) που πραγματοποιήθηκαν κατά την διάρκεια παρέμβασης. Επίσης δεν έχουν γίνει

πολλές αντίστοιχες μελέτες στην Ελλάδα, που να έχουν μελετήσει σε διατροφική παρέμβαση την εμπλοκή των συγκεκριμένων δεικτών οστικού μεταβολισμού.

Αντίθετα στους πιθανούς περιορισμούς περιλαμβάνονται το μικρό δείγμα της μελέτης, καθώς και η ελλιπής πληροφόρηση σχετικά με το είδος των προσλαμβανόμενων λιπαρών οξέων πριν και μετά την παρέμβαση. Επίσης, μειονέκτημα αποτελεί και το γεγονός ότι οι ανακλήσεις βασίζονται στην μνήμη των συμμετεχόντων τόσο αναφορικά με την κατανάλωση τροφίμων όσο και αναφορικά με τη φυσική δραστηριότητα.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά η κατανάλωση τσιπούρας για 8 βδομάδες δεν φαίνεται να επηρεάζει τον μεταβολισμό των οστών, καθώς δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στους δείκτες οστικού μεταβολισμού που εξετάστηκαν. Παρόλα αυτά θα πρέπει να γίνουν και άλλες μελέτες προκειμένου να διερευνηθεί διεξοδικά η πιθανή επίδραση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στον οστικό μεταβολισμό.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Watkins B., Lippman H., Le Boutellier L., Li Y., Seifert M. Bioactive fatty acids: role in bone biology and bone cell function. Prog Lipid Res 2001; 40 : 125 – 48.
2. Gr. Baron R. In: Favus MJ., editor. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. New York: Raven Press, 1993; p. 2 – 9.
3. Vander A. Φυσιολογία του ανθρώπου. Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδη, 2001, σελίδες: 175, 717 – 720.
4. Boron., Walter F. Ιατρική φυσιολογία κυτταρική και μοριακή προσέγγιση. Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης, 2006, σελίδες: 1412 – 1414.
5. Aubin JE., Turksen K., Heersche JNM In: Noda M., Young MF. Cellular and molecular biology of bone. New York: Academic Press 1993; 1 – 45.
6. Young MF., Ibaraki K., Kerr JM., Heegaard A In: Noda M. Cellular and molecular biology of bone. San Diego: Academic Press 1993; 191 – 234.
7. Ducy P., Desbois C., Boyce B., Pinero G., Story B., Dunstan C., et al. Increased bone formation in osteocalcin – deficient mice. Nature 1996; 448 – 452.
8. Baylink DJ., Finkelman RD., Mohan S.J. Growth factors to stimulate bone formation. Bone Miner Res 1993; 565 - 572.
9. Mundy GR. Cytokines and growth factors in the regulation of bone remodeling. J Bone Miner Res 1993; 505 – 510.
10. Raisz LG. Bone cell biology: new approaches and unanswered. J Bone Miner Res 1993; 457 – 465.
11. Canalis E. In., Favus MJ. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. New York: Raven Press 1993; 33 – 37.
12. Hayashi S-I., Yamane T., Miyamoto A., Hemmi H., Tagaya H., et al. Commitment and differentiation of stem cells to the osteoclast lineage. Biochem Cell Biol 1998; 911 – 922.
13. Susan A. Steitz, Mei Y. Speer, Marc D. McKee, Lucy Liaw, Manuela Almeida et al. Osteopontin Inhibits Mineral Deposition and Promotes Regression of Ectopic Calcification. Am J Pathol 2002; 161: 2035 – 2046.

14. Blair HC., Schlesinger PH., Ross FP., Teitelbaum SL. Recent advances toward understanding osteoclast physiology. Clin Orthop Rel Res 1993; 294: 7 – 22.
15. Suda T., Takahashi N., Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation. Endocr Rev 1992; 13: 66 – 80.
16. Vaes G. Cellular biology and biochemical mechanism of bone resorption. A review of recent developments on the formation, activation, and mode of action of osteoclasts. Clin Orthop Relat Res.1988; 231: 239 – 271.
17. Greenfield EM., Bi Y. Miyauchi A. Regulation of osteoclast activity. Life sci 1999; 65: 1087 – 1102.
18. Raisz, L.G. Physiology and Pathophysiology of Bone Remodeling. Clinical Chemistry 1999; 45: 1353 – 1358.
19. G., Karsenty. Genetics of skeletogenesis. Dev Genet 1998; 22: 301 – 313.
20. HM., Frost. Bone remodeling and its relationship to metabolic bone disease. USA 1973 Thomas (BOOK).
21. Parfitt AM. In., Kanis JA. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. 1st edition. 1990 1 – 27.
22. Mundy GR. Cytokines and growth factors in the regulation of bone remodeling.J Bone Miner Res 1993; 8: S505 - S510
23. Ng KW., Romas E., Donnan L., Findlay DM. Bone biology. Baillieres Clin Endocrinol Metab 1997; 11: 1 – 22.
24. Watrous DA., Andrews BS. The metabolism and immunology of bone. Semin Arthritis Rheum 1989; 19: 45 – 65.
25. Nilsson A., Ohlsson C., Isaksson OG., Lindahl A., Isgaard J. Hormonal regulation of longitudinal bone growth. Eur J Clin Nutr 1994; 48: S150 - S160.
26. Chow J., Tobias JH., Colston KW., Chambers TJ**.** Estrogen maintains trabecular bone volume in rats not only by suppression of bone resorption but also by stimulation of bone formation. J Clin Invest 1992; 89: 74 – 78.
27. Raisz LG., Fall PM. Biphasic effect of prostaglandin E_2 on bone formation in cultured fetal rat calvariae: Interaction with cortisol. Endocrinology 1990; 126: 1654 – 1659.
28. Kream BE., Petersen DN., Raisz LG. Parathyroid hormone blocks the stimulatory effect of insulin –like growth factor –I on collagen synthesis in cultured 21 - day fetal rat calvariae. Bone 1990; 11: 411 – 415.

29. Klaushofer K., Hoffmann O., Gleispach H., Leis HJ., Czerwenka E., et al. Bone-resorbing activity of thyroid hormones is related to prostaglandin production in cultured neonatal mouse calvaria. J Bone Miner Res 1989; 4: 305 – 312.
30. Lin HY., Harris TL., Flannery MS., Aruffo A., Kaji EH., et al. Expression cloning of an adenylate cyclase-coupled calcitonin receptor. Science 1991; 254: 1022 – 1024.
31. Canalis E. In., Favus MJ. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. New York: Raven Press 1993; 33-37.
32. Canalis E., McCarthy TL., Centrella M. Effect of platelet derived growth factor on bone formation in vitro. J Cell Physiol 1989; 140: 530 – 537.
33. Canalis E., Centrella M., McCarthy TL. Regulation of insulin like growth factor II production in bone culture. Endocrinology 1991; 129: 2457 – 2462.
34. Marusic A., Raisz LG. Cortisol modulates the actions of interleukin-1 alpha on bone formation, resorption, and prostaglandin production in cultured mouse parietal bones. Endocrinology. 1991; 129: 2699 – 2706.
35. Ishimi Y., Miyaura C., Jin CH., Akatsu T., Abe T., et al. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. J Immunol 1990; 145: 3297 – 3303.
36. Lorenzo JA., Quinton J., Sousa S., Raisz LG. Effects of DNA and prostaglandin synthesis inhibitors on the stimulation on bone resorption by epidermal growth factor in fetal rat long bone cultures. J Clin Invest 1986; 77: 1897 – 1902.
37. Simmons HA., Raisz LG. Effect of acid and basic fibroblast growth factor and heparin on resorption of cultures fetal rat long bones. J Bone Miner Res 1991; 6: 1301 – 1305.
38. McCarthy TL., Centrella M., Canalis E. Regulatory effects of insulin like growth factor 1 and 11 on bone collagen synthesis in rat calvarial cultures. Endocrinology. 1989; 124: 301 – 309.
39. Centrella M., McCarthy TL., Canalis E. Transforming growth factor beta is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast – enriched cell cultures from fetal rat bone. J Biol Chem 1987; 262: 2869 – 2874.
40. Klein DC., Raisz LG. Prostaglandins: stimulation of bone resorption in tissue culture. Endocrinology 1970; 86: 1436 – 1440.
41. Kawaguchi H., Pilbeam CC., Harrison JR., Raisz LG. The role of prostaglandins in the regulation of bone metabolism. Clin Orthop Rel Res 1995; 313: 36 – 46.

42. Marks SC., Miller SC. Prostaglandins and the skeleton: The legacy and challenges of two decades of research. Endocrinol J 1993; 1: 337 – 344.
43. Norrdin RW., Jee WS., High WB. The role of prostaglandins in bone in vivo. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 1990; 41: 139 – 149.
44. Jaime Uribarri., Mona S. Calvo, Mandana Arabi. Current Dietary Phosphorus Intake Are there Potential Implications for Public Health? Presented by the Sackler Institute for Nutrition Science The New York Academy of Sciences 2013 ,April 19.
45. Lacey DL., Timms E., Tan H-L., Kelley MJ., Dunstan CR., et al. Osteoprotegerin (OPG) ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. Cell 1998; 93: 165 – 176.
46. Yasuda H., Shima N., Nakagawa N., Yamaguchi K., Kinosaki M., et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin / osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE / RANKL. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 3597 – 3602.
47. Simonet WS., Lacey DL., Dunstan CR., Kelley M., Chang M-S., et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell 1997; 89: 309 – 319.
48. Tsuda E., Goto M., Mochizuki S-I., Yano K., Kobayashi F., et al. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. Biochem Biophys Res Commun 1997; 234: 137 – 142.
49. Udagawa N., Takahashi N., Yasuda H., Mizuno A., Itoh K., et al. Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development. Endocrinology 2000; 141: 3478 – 3484.
50. Jimi E., Akiyama S., Tsurukai T., Okahashi N., Kobayashi K., et al. Osteoclast differentiation factor acts as a multifunctional regulator in murine osteoclast differentiation and function. J Immunol 1999; 163: 434 – 442.
51. Fuller K., Wong B., Fox S., Choi Y., Chambers TJ. TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. J Exp Med 1998; 188: 997 – 1001.
52. Burgess TL., Qian Y., Kaufman S., Ring BD., Van G., et al. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. J Cell Biol 1999; 145: 527 – 538.

53. Lacey DL., Tan H-L., Lu J., Kaufman S., Van G., et al. Osteoprotegerin ligand modulates murine osteoclast survival in vitro and in vivo. Am J Pathol 2000; 157: 435 – 448.
54. O'Brien EA., Williams JHH., Marshall MJ. Osteoprotegerin ligand regulates osteoclast adherence to the bone surface in mouse calvaria. Biochem Biophys Res Commun 2000; 274: 281 – 290.
55. Miyamoto A., Kunisada T., Hemmi H., Yamane T., Yasuda H., et al. Establishment and characterization of an immortal macrophage-like cell line inducible to differentiate to osteoclasts. Biochem Biophys ResCommun 1998; 242: 703 – 709.
56. Akatsu T., Murakami T., Nishikawa M., Ono K., Shinomiya N., et al. Osteoclastogenesis- inhibitory factor suppresses osteoclast survival by interfering in the interaction of stromal cells with osteoclast. Biochem Biophys Res Commun 1998; 250: 229 – 234.
57. Hakeda Y., Kobayashi Y., Yamaguchi K., Yasuda H., Tsuda E., et al. Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) directly inhibits bone resorbing activity of isolated mature osteoclasts. Biochem Biophys Res Commun 1998; 251: 796 – 801.
58. Khosla S. Mini review: the OPG/RANKL/RANK system. Endocrinology 2001; 142: 5050-5055.
59. Hofbauer LC., Khosla S., Lacey DL., Dunstan CR., Boyle WJ., et al. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. J Bone Miner Res 2000; 15: 2 – 12.
60. Gao Y-H., Shinki T., Yuase T., Kataoka-Enomoto H., Komori T., et al. Potential role of cbfa1, an essential transcriptional factor for osteoblast differentiation, in osteoclastogenesis: regulation of mRNA expression of osteoclast differentiation factor (ODF). Biochem Biophys Res Commun 1998; 252: 697 – 702.
61. Thirunavukkarasu K., Halladay DL., Miles RR., Yang X., Galvin RJ., et al. The osteoblast – specific transcription factor cbfa1 contributes to the expression of osteoprotegerin, a potent inhibitor of osteoclast differentiation and function. J Biol Chem 2000; 275: 25163 – 25172.
62. Ducy P., Schinke T., Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. Science 2000; 289: 1501 – 1504.

63. Vidal NOA., Brändström H., Jonsson KB., Ohlsson C. Osteoprotegerin mRNA is expressed in primary human osteoblast-like cells: down-regulation by glucocorticoids. J Endocrinol 1998; 159: 191 – 195.
64. Hofbauer LC., Gori F., Riggs BL., Lacey DL., Dunstan CR., et al. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. Endocrinology 1999; 140: 4382 – 4389.
65. Hofbauer LC., Dunstan CR., Spelsberg TC., Riggs BL., Khosla S. Osteoprotegerin production by human osteoblast lineage cells is stimulated by vitamin D, bone morphogenetic protein-2, and cytokines. Biochem Biophys Res Commun 1998; 250: 776 – 781.
66. Horwood NJ., Elliott J., Martin TJ., Gillespie MT. Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells. Endocrinology 1998; 139: 4743 – 4746.
67. Murakami T., Yamamoto M., Yamamoto M., Ono K., Nishikawa M., et al. Transforming growth factor-β1 increases mRNA levels of osteoclastogenesis inhibitory factor in osteoblastic / stromal cells and inhibits the survival of murine osteoclast-like cells. Biochem Biophys Res Commun 1998 ; 252: 747 – 752.
68. Lee SK,. Lorenzo JA. Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. Endocrinology 1999; 140: 3552 – 3561.
69. Onyia JE., Miles RR., Yang X., Halladay DL., Hale J., et al. In vivo demonstration that parathyroid hormone 1–38 inhibits the expression of osteoprotegerin in bone with the kinetics of an immediate early gene. J Bone Miner Res 2000; 15: 863 – 871.
70. Mukohyama H., Ransjo M., Taniguchi H., Ohyama T., Lerner UH. The inhibitory effects of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on osteoclast formation are associated with upregulation of osteoprotegerin and downregulation of RANKL and RANK. Biochem Biophys Res Commun 2000; 271: 158 – 163.
71. Takai H., Kanematsu M., Yano K., Tsuda E., Higashio K., et al. Transforming growth factor-β stimulates the production of osteoprotegerin /

osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. J Biol Chem 1998; 273: 27091 – 27096.

72. Nakagawa N., Yasuda H., Yano K., Mochizuki Si., Kobayashi N., et al. Basic fibroblast growth factor induces osteoclast formation by reciprocally regulating the production of osteoclast differentiation factor and osteoclastogenesis inhibitory factor in mouse osteoblastic cells. Biochem Biophys Res Commun 1999; 265: 158 – 163.
73. Nakagawa N., Yasuda H., Yano K., Mochizuki Si., Kobayashi N., et al. Basic fibroblast growth factor inhibits osteoclast formation induced by 1α,25-dihydroxyvitamin D3 through suppressing the production of osteoclast differentiation factor. Biochem Biophys Res Commun 1999; 265: 45 – 50.
74. Fuller K., Bayley KE., Chambers TJ. Activin A is an essential cofactor for osteoclast induction. Biochem Biophys Res Commun 2000; 268: 2 – 7.
75. Vidal ONA., Sjögren K., Eriksson BI., Ljunggren Ö., Ohlsson C. Osteoprotegerin mRNA is increased by interleukin-1α in the human osteosarcoma cell line MG-63 and in human osteoblast- like cells. Biochem Biophys Res Commun 1998; 248: 696 – 700.
76. Brändström H., Jonsson KB., Vidal O., Ljunghall Ohlsson C., Ljunggren Ö. Tumor necrosis factor-α and -β upregulate the levels of osteoprotegerin mRNA in human osteosarcoma MG-63 cells. Biochem Biophys Res Commun 1998; 248: 454 – 457.
77. O'Brien CA., Gubrij I., Lin S-C., Saylors RL., Manolagas SC. STAT3 activation in stromal/osteoblastic cells is required for induction of the receptor activator of NF - κB ligand and stimulation of osteoclastogenesis by gp130-utilizing cytokines or interleukin-1 but not 1:25 – dihydroxyvitamin D3 or parathyroid hormone. J Biol Chem 1999; 274: 19301 – 19308.
78. Brändström H., Jonsson KB., Ohlsson C., Vidal O., Ljunghall S., et al. Regulation of osteoprotegerin mRNA levels by prostaglandin E2 in human bone marrow stroma cells. Biochem Biophys Res Commun 1998; 247: 338 – 341.
79. Mbalaviele G., Abu-Amer Y., Meng A., Jaiswal R., Beck S., et al. Activation ofperoxisome proliferator-activated receptor – γ pathway inhibits osteoclast differentiation. J Biol Chem 2000; 275: 14388 – 14393.
80. Akiyama H., Shigeno C., Iyama K-I., Ito H., Hiraki Y., et al. Indian hedgehog in the late-phase differentiationin mouse chondrogenic EC cells, ATDC5:

upregulationof type X collagen and osteoprotegerin ligand mRNAs. Biochem Biophys Res Commun 1999; 257: 814 – 820.

81. Otsuka E., Kato Y., Hirose S., Hagiwara H. Role of ascorbic acid in the osteoclast formation: induction of osteoclast differentiation factor with formation of the extracellular collagen matrix. Endocrinology 2000; 141: 3006 – 3011.
82. Pittenger MF., Mackay AM., Beck SC., Jaiswal RK., Douglas R., et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999; 284: 143 – 147.
83. Jung K., Lein M., Stephan C., Von Hösslin K., Semjonow A., Sinha P., Loening SA., Schnorr D. Comparison of 10 serum bone turnover markers in prostate carcinoma patients with bone metastatic spread: diagnostic and prognostic implications. Int J Cancer. 2004; 111: 783-791.
84. Browner WS., Lui LY., Cummings SR. Associations of serum osteoprotegerin levels with diabetes, stroke, bone density, fractures, and mortality in elderly women. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86: 631 – 637.
85. Hofbauer LC., Heufelder AE. The role of osteoprotegerin and receptor activator of NF-κB ligand in the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2001; 44: 253 – 259
86. Horwood NJ., Kartsogiannis V., Quinn JMW., Romas E., Martin TJ., et al. Activated T cells support osteoclast formation in vitro. Biochem Biophys Res Commun 1999; 265: 144 – 150.
87. Kong Y-Y., Yoshida H., Sarosi I., Tan H-L., Timms E., et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. Nature 1999; 397: 315 – 323.
88. Menaa C., Barsony J., Reddy SV., Cornish J., Cundy T., et al. 1:25-ihydroxyvitamin D3 hypersensitivityof osteoclast precursors from patients with Paget's disease.J Bone Miner Res 2000; 15: 228 – 236.
89. Menaa C., Reddy SV., Kurihara N., Maeda H., Anderson D., et al. Enhanced RANK ligand expression and responsivity of bone marrow cells in Paget's disease of bone. J Clin Invest 2000; 105: 1833 – 1838.
90. Neale SD., Smith R., Wass JA., Athanasou NA. Osteoclast differentiation from circulating mononuclear precursors in Paget's disease is hypersensitive to 1:25-dihydroxyvitamin D3 and RANKL. Bone 2000; 27: 409 – 416.

91. Κατερίνα Βαμβούκα, Αβραάμ Καζής. Περιμένοντας τον πελαργό. Διατροφή στην εγκυμοσύνη. MedNutrition Wellness 2013, σελίδες 17-18.
92. Hollman RT., Johnson SB., Hatch TF. A case of human linolenic acid deficiency involving neurological abnormalities. Am J Clin Nutr 1982; 35: 617.
93. Neuringer M., Connor WE. n-3 Fatty acids in the brain and retina: evidence for their essentiality. Nutr Rev 1986; 44: 285-294.
94. Neuringer M., AndersonGJ., Connor WE. The essentiality of n-3 fatty acids for the development and function of the retina and brain. Ann Rev Nutr 1988; 8: 517-541
95. Nelson GJ., Chamberlain JG. The effect of dietary a-linolenic acid on blood lipids and lipoproteins in humans. In cunnane SC, Thompson LU (eds): “Flaxseed in Human Nutrition.” Champaign,IL: AOAC Press 1995; 99-127.
96. Bjerve KS., Mostad IL., Thoresen L. Alpha- linolenic acid deficiency in patients on long-term gastric-tube feeding: estimation of linolenic acid and long chain unsaturated n-3 fatty acid requirement in man. Am J Clin Nutr 1987; 45: 66-77.
97. Voss A, Reinhart M, Sankarappa S and Sprecher H. The metabolism of 7, 10, 13, 16, 19-docosapentaenoic acid to 4, 7, 10,13, 16, 19-docosahexaenoic acid in rat liver is independent of a 4-desaturase. J Biol Chem 1991; 266: 19995-20000.
98. Moore SA, Hurt E, Yoder E, Sprecher H and Spector AA. Docosahexaenoic acid synthesis in human skin fibroblasts involves peroxisomal retroconversion of tetracosahexaenoic acid. J Lipid Res 1995; 36: 2433-2443.
99. Russo G.L. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. Biochem Pharmacol. 2009; 77: 937-946.
100. Engler, Marguerite M., Engler, Mary B. Omega-3 Fatty Acids: Role in Cardiovascular Health and Disease. Journal of Cardiovascular Nursing 2006; 21: 17-24.
101. Kromhout Daan, Yasuda Satoshi, Johanna M. Geleijnse, Hiroaki Shimokawa. Fish oil and omega-3 fatty acids in cardiovascular disease: do they really work? European Heart Journal 2012; 33: 436–443.
102. MI Gurr. Lipids in nutrition and health: a reappraisal. American Oil Chemists Society,1999.

103. Lands WEM., Libelt B., Morris A., Kramer NC., Prewitt TE., et al. Maintenance of lower proportions of n-6 eicosanoid precursors in phospholipids of human plasma in response to added dietary n-3 fatty acids. Biochim Biophys Acta 1992; 1180: 147 – 162.
104. Fan Y-Y., Chapkin RS. Importance of dietary gamma – linolenic acid in human health and nutrition. J Nutr 1998; 128: 1411 – 1414
105. Watkins BA., Li Y., Seifert MF., Yurawecz MP., Mossoba MM., et al. Advances in conjugated linoleic acid research: vol. 1. Champaign: AOCS Press, 1999; 1: 253 – 275.
106. Collins DA., Chambers TJ. Effect of prostaglandins E_1, E_2, and F_2a on osteoclast formation in mouse bone marrow cultures. J Bone Miner Res 1991; 6: 157 – 164.
107. Jee WSS., Ma YF. The in vivo anabolic actions of prostaglandins in bone. Bone 1997; 21: 297 – 304.
108. McCarthy TL., Centrella M., Raisz LG., Canalis E. Prostaglandin E2 stimulates insulin-like growth factor I synthesis in osteoblast - enriched cultures from fetal rat bone. Endocrinology 1991; 128: 2895 – 2900.
109. Corwin RL. Effects of dietary fats on bone health in advanced age. Prostaglandin Leukot Essent Fatty Acid 2003; 68: 379 – 386.
110. Kruger MC., Horrobin DF. Calcium metabolism, osteoporosis and essential fatty acids: a review. Prog Lipid Res 1997; 36: 31 – 51.
111. Watkins BA., Li Y., Allen KG., Hoffmann WE., Seifert MF. Dietary ratio of (n - 6) / (n - 3) polyunsaturated fatty acids alters the fatty acid composition of bone compartments and biomarkers of bone formation in rats. J Nutr 2000; 130: 2274 – 2284.
112. Kokkinos PP., Shaye R., Alam BS., Alam SQ. Dietary lipids, prostaglandin E2 levels, and tooth movement in alveolar bone of rats. Calcif Tissue Int 1993; 53: 333 – 337.
113. Li Y., Seifert MF., Ney DM., Grahn M., Grant AL., et al. Dietary conjugated linoleic acids alter serum IGF - I and IGF binding protein concentrations and reduce bone formation in rats fed (n - 6) or (n - 3) fatty acids. J Bone Miner Res 1999; 14: 1153 –1162.

114. Weiler HA., Fitzpatrick-Wong SC. Dietary long-chain polyunsaturated fatty acids minimize dexamethasone-induced reductions in arachidonic acid status but not bone mineral content in piglets. Pediatr Res 2002; 51: 282 – 289.
115. Salari P., Rezaie A., Larijani B., Abdollahi M. A systematic review of the impact of n - 3 fatty acids in bone health and osteoporosis. Med Sci Monit 2008; 14: RA37 – RA44.
116. Moyad MA. An introduction to dietary/supplemental omega-3 fatty acids for general health and prevention: Part I. Urol Oncol 2005; 23: 28 – 35.
117. Atkinson TG., Barker HJ., Meckling-Gill KA.: Incorporation of long chain n - 3 fatty acids in tissues and enhanced bone marrow cellularity with docosahexaenoic acid feeding in post-weanling Fischer 344 rats. Lipids 1997; 32: 293 – 302.
118. Wohl GR., Loehrke L., Watkins BA., Zernicke RF. Effects of high - fat diet on mature bone mineral content, structure, and mechanical properties. Calcif Tissue Int 1998; 63: 74 – 79.
119. Corwin RL., Hartman TJ., Macsuga SA., Graubard BI. Dietary saturated fat intake is inversely associated with bone density in humans: analysis of NHANES III. J Nutr 2006; 136: 159 – 165.
120. Gunnes M., Lehmann EH. Dietary calcium, saturated fat, fiber and vitamin C as predictors of forearm cortical and trabecular bone mineral density in healthy children and adolescents. Acta Paediatr 1995; 84: 388 – 392.
121. Watkins BA., Shen C-L., Allen KGD., Seifert MF. Dietary (n - 3) and (n - 6) polyunsaturates and acetylsalicylic acid alter ex vivo PGE_2 biosynthesis, tissue IGF - I levels, and bone morphometry in chicks. Bone Miner Res 1996; 11: 1321 – 1332.
122. Watkins BA., Shen C-L., McMurtry JP., Xu H., Bain SD., et al. Dietary lipids modulate bone prostaglandin E_2 production, insulin-like growth factor-I concentration and formation rate in chicks. J Nutr 1997; 127: 1084 – 1091.
123. BA., Shen C-L., McMurtry JP., Xu H., Bain SD., et al. Dietary lipids modulate bone prostaglandin E_2 production, insulin-like growth factor-I concentration and formation rate in chicks. J Nutr 1997; 127: 1084 – 1091.
124. Sun D., Krishnan A., Zaman K., Lawrence R., Bhattacharya A., et al. Dietary n – 3 fatty acids decrease osteoclastogenesis and loss of bone mass in ovariectomized mice. J Bone Miner Res 2003; 18: 1206 - 1216.

125. Watkins BA., Li Y., Lipman HE., Feng S. Modulatory effect of omega 3 polyunsaturated fatty acids on osteoblast function and bone metabolism. Prostaglandin Leukot Essent Fatty Acid 2003; 68: 387 – 398.
126. Fernandes G., Bhattacharaya A., Rahman M., Zaman K., Banu J. Effects of n - 3 fatty acids on autoimmunity and osteoporosis. Front Biosci 2008; 13: 4015 – 4020.
127. Heaney RP., Carey R., Harkness L. Roles of vitamin D, n - 3 polyunsaturated fatty acid, and soy isoflavones in bone health. J Am Diet Assoc 2005: 700 – 702.
128. Das UN. Essential fatty acids and osteoporosis. Nutrition 2000; 16: 386 – 390.
129. Shen C., Yeh JK., Rasty J., Li Y., Watkins BA. Protective effect of dietary long chain n-3 polyunsaturated fatty acids on bone loss in gonad-intact middle aged male rats. Br J Nutr 2006; 95: 462 – 468.
130. Hankenson KD., Watkins BA., Schoenlein IA., Allen KGD., Turek JJ. Omega-3 fatty acids enhance ligament fibroblast collagen formation in association with changes in interleukin-6 production. Proc Soc Exp Biol Med 2000; 223: 88 – 95.
131. Seifert M.F., Watkins B.A. Role of dietary lipid and antioxidants in bone metabolism. Nutr Res 1997; 17: 1209 – 1228.
132. Chen Y. Modulatory aspects of polyunsaturated fatty acids on epiphyseal chondrocyte function. MS Thesis. Purdue University. West Lafayette 1997
133. Li Y., Watkins B.A. Conjugated linoleic acids alter bone fatty acid composition and reduce ex vivo prostaglandin E_2 biosynthesis in rats fed n-6 or n-3 fatty acids. Lipids 1998; 33: 417 – 425.
134. Leyton J., Lee ML., Locniskar M., Belury MA., Slaga TJ., et al. Effects of type of dietary fat on phorbol ester-elicited tumor promotion and other events in mouse skin. Cancer Res 1991; 51: 907.
135. Sakaguchi K., Morita I., Murota S. Relationship between the ability to support differentiation of osteoclast-like cells and adipogenesis in murine stromal cells derived from bone marrow. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2000; 62: 319 – 327.
136. Weiss LA., Barrett-Connor E., Von Mühlen D. Ratio of n - 6 to n - 3 fatty acids and bone mineral density in older adults: the Rancho Bernardo study. Am J Clin Nutr 2005; 81: 934 – 938.

137. Terano T. Effect of omega 3 polyunsaturated fatty acid ıngestion on bone metabolism and osteoporosis. World Rev Nutr Diet 2001; 88: 141 – 147.
138. Kruger MC., Coetzer H., De Winter R,, Gericke G., Van Papendorp. DH. Calcium, gamma-linolenic acid and eicosapentaenoic acid supplementation in senile osteoporosis. Aging Clin Exp Res 1998; 10: 385 – 394.
139. Bassey EJ., Littlewood JJ., Rothwell MC., Pye DW. Lack of effect of supplementation with essential fatty acids on bone mineral density in healthy pre - and postmenopausal women: two randomized controlled trials of Efacal versus calcium alone. Br J Nutr 2000; 83: 629 – 663
140. Van Papendorp DH Coetzer, H, Kruger, MC: Biochemical profile of osteoporotic patients on essential fatty acid supplementation. Nutr Res 1995, 15: 325 – 334.
141. Dodin S., Lemay A., Jacques H., Legare F., Forest JC., et al. The effects of flaxseed dietary supplement on lipid profile, bone mineral density, and symptoms in menopausal women: a randomized, double-blind, wheat germ placebo-controlled clinical trial. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90: 1390 – 1397.
142. Trebble TM., Stroud MA., Wootton SA., Calder PC., Fine DR., et al. High - dose fish oil and antioxidants in Crohn's disease and the response of bone turnover: a randomized controlled trial. Br J Nutr 2005; 94: 253 – 261.
143. Lorenzo JA., Sousa SL., Alander C., Raisz LG., Dinarello CA. Comparison of the bone- resorbing activity in the supernatants from phytohemagglutin – stimulated human peripheral blood mononuclear cells with that of cytokines thought the use of an antiserum to interleukin1. Endocrinology 1987; 121: 1164 – 1170.
144. Harrison JR., Lorenzo JA., Kawaguchi H., Raisz LG., Pilbeam CC. Stimulation of prostaglandin E_2 production by interleukin-1α and transforming growth factor α in osteoblastic MC3T3-E1 cells. J Bone Miner Res 1994; 9: 817 – 823.
145. Ikeda E., Kusaka M., Hakeda Y., Yokota K., Kumegawa M., et al. Effect of interleukin 1 beta on osteoblastic clone MC3T3-E1 cells. Biochem Biophys Res Commun 1988; 138: 618 – 624.
146. Sato K., Fujii Y., Kasono K., Saji M., Tsushima T., et al. Stimulation of prostaglandin E_2 and bone resorption by recombinant human interleukin 1 alpha feta mouse bones Biochem Biophys Res Commun 1986; 138: 618 – 624.

147. Yamaguchi M., Hashizume M. Effect of parathyroid hormone and interleukin – 1 alpha in osteoblastic MC3T3 - E1 cells: interaction with beta – alanyl – L - histidinato zinc. Peptides 1994; 15: 633 – 636.
148. Evans DB., Bunning RAD., Russell RGG. The effect of recombinant human interleukine-1β on cellular proliferation and the production of prostaglandin E_2, plasminogen activator, ostecalcin and alkaline phosphatase by osteoblast - like cells derived from human bone.Biochem Biophys Res Commun 1990; 166: 208 – 216.
149. Evans DB., Thavarajah M., Kanis JA. Involvement of prostaglandin E_2 in the inhibition of osteocalcin synthesis by human osteoblast - like cells in response to cytokines and systemic hormones Biochem Biophys Res Commun 1990; 167: 194 -202.
150. Igarashi K., Hirafuji M., Adachi H., Shinoda H., Mitani H. Effects of bisphosphonates on alkaline phosphatase activity, mineralization, and prostaglandin E_2 synthesis in the clonal osteoblast-like cell line MC3T3-E1. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 1997; 56: 121 – 125.
151. Igarashi K., Hirafuji M., Adachi H., Shinoda H., Mitani H. Role of endogenous PGE_2 in osteoblastic functions of a clonal osteoblast-like cell, MC3T3-El. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 1994; 50: 169 – 172.
152. Kajii T., Suzuki K., Yoshikawa M., Imai T., Matsumoto A., et al. Long - term effects of prostaglandin E2 on the mineralization of a clonal osteoblastic cell line (MC3T3 - E1). Arch Oral Biol 1999; 44: 233 – 241.
153. Hakeda HZ., Li XJ., Jee WS. Partial loss of anabolic effect of prostaglandin E2 on bone after its withdrawal in rats. Bone 1991; 12: 173 - 183.
154. Watkins BA., Seifert MF. McDonald RE., editor. Food lipids and health. New York: Marcel Dekker, 1996, Σελίδες 71-116.
155. Watkins BA. Regulatory effects of polyunsaturates on bone modeling and cartilage function. World Rev Nutr Dietetics 1998; 83: 38–51.
156. Singh J., Hamid R., Reddy BS. Dietary fat and colon cancer modulation of cyclooxygenase-2 by types and amount of dietary fat during the postinitiation stage of colon carcinogenesis. Cancer Res 1997; 57: 3465 – 3470.
157. Curtis CL., Hughes CE., Flannery CR., Little CB., Harwood JL., et al. N-3 fatty acids specifically modulate catabolic factors involved in articular cartilage degradation. J Biol Chem 2000 Jan; 275: 721 – 724.

158. Bichell DP., Rotwein P., McCarthy TL. Prostaglandin E_2 rapidly stimulates insulin- like growth factor-L gene expression in primary rat osteoblast cultures. Evidence for transcriptional control. Endocrinology 1993; 133: 1020 – 1028.
159. Cunnane SC., Griffin BA. Nutrition and metabolism of lipids. In: Gibney MJ, Vorster HH, Kok FJ, editors. Introduction to human nutrition. Oxford: Blackwell Science 2002; p. 81–115.
160. Barham JB., Edens MB., Fonteh AN., Johnson MM., Easter L., et al. Addition of eicosapentaenoic acid to c - linolenic acid-supplemented diets prevents serum arachidonic acid accumulation in humans. J Nutr 2000; 130: 1925 – 1931.
161. Tian XY., Zhang Q., Setterberg RB., Zeng QQ., Iturria SJ., et al. Continuous PGE_2 leads to net bone loss while intermittent PGE_2 leads to net bone gain in lumbar vertebral bodies of adult female rats. Bone 2008; 42: 914 – 920.
162. Tsujisawa T., Inoue H., Nishihara T. SC-19220, antagonist of prostaglandin E2 receptor EP1, inhibits osteoclastogenesis by RANKL. J Bone Miner Res 2005; 20: 15 – 22.
163. Li X., Okada Y., Pilbeam CC., Lorenzo JA., Kennedy CRJ., et al. Knockout of the murine prostaglandin EP_2 receptor impairs osteoclastogenesis in vitro. Endocrinology 2000; 141: 2054 – 2061.
164. Tsutsumi R., Xie C., Wei X., Zhang M., Zhang X., et al. PGE_2 signaling through the EP_4 receptor on fibroblasts upregulates RANKL and stimulates osteolysis. J Bone Miner Res 2009; 24: 1753 – 1762.
165. Poulsen RC., Wolber F., Moughan PJ., Kruger MC. Long chain polyunsaturated fatty acids alter membrane bound RANK-L expression and osteoprotegerin secretion by MC3T3-E1 osteoblast-like cells. Prostaglandin Lipid Mediat 2008; 85: 42 - 48.
166. Coetzee M., Haag M., Joubert AM., Kruger MC. Effects of arachidonic acid, docosahexaenoic acid and prostaglandin E_2 on cell proliferation and morphology of MG-63 and MC3T3-E1 osteoblast-like cells. Prostaglandin Leukot Essent Fatty Acid 2007; 76: 35 – 45.
167. Bhattacharya A., Rahman M., Banu J., Lawrence RA., McGuff HS., et al. Inhibition of osteoporosis in autoimmune disease prone MRL / Mpj - Faslpr mice by n - 3 fatty acids. J Am Coll Nutr 2005; 24: 200 – 209.

168. World medical association declaration of helsinki: Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects. JAMA, 1997. 277: p. 925-926.
169. Bountziouka, V., et al., Development, repeatability and validity regarding energy and macronutrient intake of a semi-quantitative food frequency questionnaire: Methodological considerations. Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD, 2012. 22: p. 659-667.
170. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 22. 2009, U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service.
171. Trichopoulou, A., Composition tables of simple and composite foods. 1992, Athens, Greece.
172. Panagiotakos, D.B., et al., Adherence to the Mediterranean food pattern predicts the prevalence of hypertension, hypercholesterolemia, diabetes and obesity, among healthy adults; the accuracy of the MedDietScore. Prev Med, 2007. 44: p. 335-40.
173. Kollia, M., et al. Development, validity and reliability of the Harokopio Physical Activity Questionnaire in Greek adults. in 8th Panhellenic Congress on Nutrition and Dietetics. 2006: Proceedings of the 8th Panhellenic Congress on Nutrition and Dietetics. Abstract book, pp. 130-131.
174. Alexander Faje, Anne Klibanski. Body Composition and Skeletal Health: Too Heavy? Too Thin? Curr Osteoporos Rep (2012) 10: 208–216.
175. Hogstrom M., Nordstrom P., Nordstrom A. N-3 fatty acids are positively associated with peak bone mineral density and bone accrual in healthy men: the NO_2 study. Am J Clin Nutr 2007; 85: 803 – 807.
176. Griel AE., Kris - Etherton PM., Hilpert KF., Zhao G. Z., West SG., et al. An increase in dietary n-3 fatty acids decreases a marker of bone resorption in humans. Nutr J 2007; 6: 1 – 8.
177. Cornish J., Macgibbon A., Lin J., Callon KE., Tong PC., et al. Modulation of osteoclastogenesis by fatty acids. Endocrinology 2008; 149: 5688 – 5695.
178. Borland VG., Jackson CM. Effects of a fat-free diet on the structure of the kidney in rats. Arch Pathol 1931; 11: 687 – 708.
179. Kettler DB. Can manipulation of the ratios of essential fatty acids slow the rapid rate of postmenopausal bone loss? Altern Med Rev. 2001 Feb;6: 61 – 77.

180. Martinez-Ramirez MJ., Palma S., Martinez-Gonzalez MA., Delgado-Martine AD., De la Fuente C., et al. Dietary fat intake and the risk of osteoporotic fractures in the elderly. Eur J Clin Nutr 2007; 61: 1114 – 1120.
181. Trichopoulos A., Georgio E., Bassiakos Y., Lipworth L., Lagiou P., et al. Energy intake and monounsaturated fat in relation to bone mineral density among women and men in Greece. Prev Med 1997; 26: 395 – 400.
182. MacDonald HM., New SA., Golden MH., Campbell MK., Reid DM. Nutritional associations with bone loss during the menopausal transition: evidence of a beneficial effect of calcium, alcohol and fruit and vegetable nutrients and of a detrimental effect of fatty acids. Am J Clin Nutr 2004; 79: 155 – 165.
183. Kruger MC., Schollum LM. Is docosahexaenoic acid more effective than eicosapentaenoic acid for increasing calcium bioavailability. Prostaglandin Leukot Essent Fatty Acid 2005; 73: 327 – 334
184. Lucia VD., Fitzpatrick-Wong SC., Weiler HA. Dietary arachidonic acid suppresses bone turnover in contrast to low dosage exogenous prostaglandin E_2 that elevates bone formation in the piglet. Prostaglandin Leukot. Essent Fatty Acid 2003; 68: 407 –413.
185. Weinreb M., Shamir D., Machwate M., Rodan GA., Harada S., et al. Prostaglandin E_2 (PGE_2) increases the number of rat bone marrow osteogenic stromal cells (BMSC) via binding the EP_4 receptor, activating sphingosine kinase and inhibiting caspase activity. Prostaglandin Leukot Essent Fatty Acid 2006; 75: 81 – 90.
186. Schmid C., Schläpfer I., Waldvogel M., Zapf J., Froesch ER. Prostaglandin E_2 stimulates synthesis of insulin-like growth factor binding protein-3 in rat bone cells in vitro. J Bone Miner Res 1992; 7: 1157 – 1163.
187. Delany AM., Pash JM., Canalis E. Cellular and clinical perspectives on skeletal insulin-like growth factor I. J Cell Biochem 1994; 55: 328 – 333.
188. McCarthy TL., Casinghino S., Centrella M., Canalis E. Complex pattern of insulin like growth factor binding protein expression in primary rat osteoblast enriched cultures: regulation by prostaglandin E_2, growth hormone, and the insulin-like growth factors. J Cell Physiol 1994;160: 163 – 175.
189. DiBattista JA., Dore S., Morin N., Abribat T. Prostaglandin E_2 up-regulates insulin-like growth factor binding protein-3 expression and synthesis in human

articular chondrocytes by a c-AMP-independent pathway: role of calcium and protein kinase A and C. J Cell Biochem 1996; 63: 320 – 333.

190. Rahman MD., Bhattacharya A., Fernandes G. Docosahexaenoic acid is more potent inhibitor of osteoclast differentiation in RAW 264.7 cells that eicosapentaenoic acid. J Cell Physiol 2008; 214: 201 – 209.
191. Horowitz MC. Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects. Science 1993; 260: 626–627
192. Caughey GE., Mantizioris E., Gibson RA., Cleland LG., Jameset MJ. The effect on human TNF alpha and IL-1 Beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. Am J Clin Nutr 1996; 63:116 – 122.
193. Claassen N., Potgieter HC., Seppa M., Vermaak WJH., Coetzer H., et al. Supplemented gamma - linolenic acid and eicosapentaenoic acid influence bone status in young male rats: effects on free urinary collagen cross links, total urinary hydroxyproline, and bone calcium content. Bone 1995; 16: 385 – 392.
194. Votta BJ., Bertolis DR. Cytokine suppressive anti-inflammatory compounds inhibit bone resorption in vitro. Bone 1994; 15: 533 – 538.
195. Priante G., Bordin L., Musacchio E., Clari G., Baggio B. Fatty acids and cytokine mRNA expression in human osteoblastic cells: a specific effect of arachidonic acid. Clin Sci 2002; 102: 403 – 409.
196. Sapi E. "The role of CSF-1 in normal physiology of mammary gland and breast cancer: an update". Exp. Biol. Med. (Maywood) 2004; 229 : 1–11.
197. Miggiano GA., Gagliardi L. Diet, nutrition and bone health. Clin Ther 2005; 156: 47 –56.
198. Bannenberg G., Chiang N., Ariel A., Arita M., Tjonahen E., et al. Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. J Immunol 2005; 174: 4345 – 4355.
199. Bannenberg G., Moussignac RL., Gronert K., Devchand PR., Schmidt BA., et al. Lipoxins and novel 15-epi-lipoxin analogs display potent anti-inflammatory actions after oral administration. Br J Pharmacol 2004; 143: 43 – 52.
200. Clarke SD. The multidimensional regulation of gene expression by fatty acids: polyunsaturated fatty acids as nutrient sensors. Curr Opin Lipidol 2004; 15: 13 – 18.

201. Sampath H., Ntambi JM. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. Nutr Rev 2004; 62: 333 – 339.
202. Lecka-Czernik B, Ackert-Bicknell CL, Adamo ML, Marmolejos V, Churchill GA, Shockley K, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-c (PPARc) by rosiglitazone suppresses components of the IGF regulatory system in vitro and in vivo. Endocrinology 2007;148:903–11.
203. Diascro DD., Vogel RL., Johnson TE., Witherup KM., Pitzenberger SM., et al High fatty acid content in rabbit serum is responsible for the differentiation of osteoblasts into adipocyte-like cells. J Bone Miner Res 1998; 13: 96 – 106.
204. Nuttal ME., Patton AJ., Olivera DL., Nadeau DP., Gowen M. Human trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype: implications for osteopenic disorders. J Bone Miner Res 1998; 13: 381.
205. Takada I., Kato S. A new PPAR - c function in bone. IBMS Bone KEy 2008; 5: 258 –261.
206. Kliewer SA., Sundseth SS., Jones SA., Brown PJ., Wisely GB., et al. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors a and c. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 4318 –4323.
207. Berger R., Moller D. The mechanisms of action of PPARc. Annu Rev Med 2002; 53: 409 – 435.
208. Gómez Candela C., Bermejo López L.M., Loria Kohen V. Importance of a balanced omega 6/omega 3 ratio for the maintenance of health. Nutritional recommendations. Nutr Hosp. 2011; 26: 323 – 329.
209. Nanji AA., Zakim D., Rahemtulla A., Daly T., Miao L., et al. Dietary saturated fatty acids down-regulate cyclooxygenase-2 and tumor necrosis factor alfa and reverse fibrosis in alcohol-induced liver disease in the rat. Hepatology 1997; 26: 1538 – 1545.