

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Αλληλεπίδραση διατροφικής πρόσληψης βιταμίνης D και ασβεστίου με
γενετικούς παράγοντες σε οστικούς δείκτες μεταβολισμού»**



Κλεφτάκη Σταματία Αγγελική

A.M. 21017

ΑΘΗΝΑ ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2016

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Αλληλεπίδραση διατροφικής πρόσληψης ασβεστίου και βιταμίνης D με
γενετικούς παράγοντες σε οστικούς δείκτες μεταβολισμού»**



Κλεφτάκη Σταματία Αγγελική Α.Μ. 21017

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Δεδούσης Γεώργιος, Καθηγητής Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας του Ανθρώπου

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Δεδούσης Γεώργιος, Καθηγητής Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας του Ανθρώπου

Μανιός Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής Διατροφικής Αγωγής και Αξιολόγησης

Παπανικολάου Γεώργιος, Λέκτορας στη Βιολογία του Ανθρώπου – Μοριακή Γενετική

ΑΘΗΝΑ ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2016

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Γεώργιο Δεδούση, Καθηγητή Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ανάθεση του θέματος αυτού, καθώς και την υποστήριξη του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους που είχα κοντά μου όλο αυτό το διάστημα, που με στήριξαν, πίστεψαν στις δυνατότητες μου και αποτέλεσαν πηγή έμπνευσης.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	3
ABSTRACT.....	9
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	11
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
1. ΟΣΤΑ.....	12
1.1. ΟΣΤΙΤΗΣ ΙΣΤΟΣ	12
1.2. ΟΣΤΙΚΟΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ	17
1.3. ΟΣΤΙΚΗ ΑΝΑΚΑΤΑΣΚΕΥΗ	19
1.4. ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ	22
1.5. ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗ	25
2. ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑ	34
2.1. ΑΣΒΕΣΤΙΟ	34
2.2. ΒΙΤΑΜΙΝΗ D.....	40
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	41
1. ΜΕΛΕΤΗ	41
1.1. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	41
1.2. ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	42
1.3. ΣΥΛΛΟΓΗ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ.....	43
1.3.1. ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	43
1.3.2. ΙΑΤΡΙΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ	43
1.3.3. ΔΙΑΤΡΟΦΗ	43
1.3.4. ΦΥΣΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ.....	44
1.3.5. ΑΝΘΡΩΠΟΜΕΤΡΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	44
1.3.6. ΟΣΤΙΚΗ ΔΟΜΗ.....	45
1.3.7. ΑΙΜΟΛΗΨΙΑ	45
1.3.8. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA	45
1.3.9. ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ.....	46
1.4. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΥ	47
2. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	48
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	49
1. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	49
2. ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ	51

3. ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ	54
<u>Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</u>	<u>59</u>
<u>Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>	<u>62</u>

ΠΙΝΑΚΑΣ

Πίνακας 1. ΠΕΡΙΓΡΑΦΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.....	50
Πίνακας 2. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΠΡΟΣ ΕΞΕΤΑΣΗ	54
Πίνακας 3. ΠΟΣΟΣΤΑ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ	54
Πίνακας 4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΗ ΒΙΤΑΜΙΝΗ D (διόρθωση ως προς τους συγχειτικούς παράγοντες)	55
Πίνακας 5. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΟ ΑΣΒΕΣΤΙΟ (διόρθωση ως προς τους συγχειτικούς παράγοντες)	55
Πίνακας 6. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΟ STIFFNESS INDEX (διόρθωση ως προς τους συγχειτικούς παράγοντες)	56
Πίνακας 7. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΟ SOS (διόρθωση ως προς τους συγχειτικούς παράγοντες).....	57
Πίνακας 8. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΟ BUA (διόρθωση ως προς τους συγχειτικούς παράγοντες).....	57
Πίνακας 9: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΗΝ ΑΛΚΑΛΙΚΗ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ (διόρθωση ως προς τους συγχειτικούς παράγοντες)	58

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή:

Η οστεοπόρωση αποτελεί μια μεταβολική διαταραχή των οστών που πλήττει όλο και περισσότερο ανθρώπους, σε παγκόσμια κλίμακα. Ανάμεσα στους διάφορους παράγοντες κινδύνου, τροποποιήσιμους και μη, οι γενετικοί και οι διατροφικοί παράγοντες αποτελούν πολύ σημαντικό κομμάτι. Όλο και περισσότερες μελέτες εξετάζουν την αλληλεπίδραση των γενετικών με τους διατροφικούς παράγοντες, ώστε να υπάρξει μια σαφέστερη εικόνα για την οστική δομή.

Σκοπός:

Υπάρχουν αρκετοί πολυμορφισμοί, που δύναται να συσχετιστούν με διάφορους δείκτες οστικής δομής και να αλληλεπιδράσουν με διατροφικούς παράγοντες. Σκοπός της παρούσας εργασίας, που αποτελεί μέρος της μελέτης OSTEOS II, είναι η εξέταση ύπαρξης αλληλεπίδρασης της διατροφικής πρόσληψης ασβεστίου και βιταμίνης D με γενετικούς παράγοντες.

Μεθοδολογία:

Η εργασία, αποτελεί μέρος μιας επιδημιολογικής μελέτης 993 ατόμων, στους οποίους αξιολογήθηκαν ανθρωπομετρικά και δημογραφικά δεδομένα, καθώς και πραγματοποιήθηκε κλινική εξέταση και αιμοληψία. Πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA, την οποία ακολούθησε η γονοτύπηση. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις και επεξεργασία των δεδομένων, καθώς και στατιστική ανάλυση των γενετικών δεδομένων, λαμβάνοντας υπόψη μια σειρά από συγχρητικούς παράγοντες, όπως είναι το φύλο, η ηλικία, η διατροφική πρόσληψη ασβεστίου και βιταμίνης D και η φυσική δραστηριότητα.

Αποτελέσματα:

Μελετήθηκαν 8 πολυμορφισμοί. Κανένας πολυμορφισμός δε βρέθηκε να συσχετίζεται με τα επίπεδα της βιταμίνης D στον ορό. Βρέθηκε ένας πολυμορφισμός, ο rs11520772, ο οποίος φαίνεται να αλληλεπιδρά με τα επίπεδα του ασβεστίου στον ορό, έπειτα από προσαρμογή των αποτελεσμάτων και αυξάνει τα επίπεδα του ασβεστίου κατά 0,169mg/dL. Ο ίδιος πολυμορφισμός φαίνεται να επηρεάζει τα επίπεδα SOS ,μειώνοντας τα κατά 26,93, έπειτα από προσαρμογή των αποτελεσμάτων για την ηλικία, το φύλο, τη διατροφική πρόσληψη ασβεστίου, τη διατροφική πρόσληψη βιταμίνης D και τη Φυσική Δραστηριότητα.

Επιπλέον, βρέθηκε ο πολυμορφισμός rs597319 να επηρεάζει τα επίπεδα του stiffness index,εμφανίζοντας μείωση κατά 4,714, καθώς και τα επίπεδα αλκαλικής φωσφατάσης στον ορό μειώνοντας τα κατά 3,511U/L.

Τέλος, το SNP rs2982552, μετά από προσθήκη των συγχετιτικών παραγόντων, μειώνει τα επίπεδα του stiffness index κατά 2,688. Ακόμη, φαίνεται να μειώνει τα επίπεδα της αλκαλικής φωσφατάσης κατά 3,655U/L.

Συζήτηση:

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υποδεικνύουν την ύπαρξη αλληλεπίδρασης της διατροφικής πρόσληψης ασβεστίου και βιταμίνης d με συγκεκριμένους πολυμορφισμούς στην οστική δομή. Παρόλ ' αυτά, είναι απαραίτητη πολύ ακόμη έρευνα, καθώς δεν έχει διασαφηνιστεί πλήρως ο ρόλος των πολυμορφισμών και η συσχέτιση τους με διάφορους παράγοντες.

ABSTRACT

Background:

Osteoporosis is a metabolic bone disorder that affects more and more people worldwide. Among the various risk factors, the genetic and nutritional factors are very important. More and more studies examining the interaction of genetic with dietary factors, to provide a clearer picture of the bone structure.

Objectives:

There are several polymorphisms, which may be correlated with various indicators of bone structure and interact with nutritional factors. The purpose of this study, which is part of the study OSTEOS II, is to examine the existence of interaction of dietary intake of calcium and vitamin D in genetic factors.

Methodology:

The present work is part of an epidemiological study with a sample of 993 people, on whom anthropometric and demographic data were evaluated. Also, clinical examination was performed and blood samples were taken. The isolation of biological materials included DNA genetic material. In addition, data analysis and processing were performed, as well as statistical analysis of genetic data, taking into account various confounding factors, such as age, sex, dietary intake of calcium and vitamin D, physical activity.

Results:

Eight polymorphisms were studied. No polymorphism was found to correlate with the levels of vitamin D in serum. A polymorphism, the rs11520772, which appears to correlate with serum calcium levels, taking into account various confounding factors increases the level of calcium in 0,169mg / dL. The same polymorphism seems to influence the SOS levels, decreasing by 26.93.

Furthermore, the SNP rs597319 was found to affect the levels of stiffness index, with a decrease of 4,714, as well as the alkaline phosphatase levels in serum, with a decrease of 3,511U / L.

Finally, the SNP rs2982552 reduces levels of stiffness index by 2.688. It also appears to reduce the levels of alkaline phosphatase by 3,655U / L.

Discussion:

The results of this study indicate an interaction of dietary intake of calcium and vitamin d with specific polymorphisms on bone structure. Nevertheless, more and

more research is needed, in order to clarify the role of the polymorphisms and their relationship with several factors.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

BMD: Οστική Πυκνότητα

BUA: Εξασθένηση της ηχητικής δέσμης (Broadband Ultrasound Attenuation)

BSP: Σιαλοπρωτεΐνη των οστών

DNA: Δεοξυριβονουκλεικό οξύ

DXA: Απορροφησιομετρία διπλής ενέργειας ακτίνων Χ (Dual Energy X-ray Absorptiometry)

DPD: Δεσοξυπυριδινολίνη

GWAS: Μελέτη σάρωσης ανθρώπινου γονιδιώματος

IL-8: Ιντερλευκίνη 8

OPG: Οστεοπροτεγερίνη

PTHrP: Παραθυρεοειδής ορμόνη –συνδεδεμένη πρωτεΐνη

QUS: Ποσοτική Υπερηχομετρία (Quantitative Ultrasound)

PYD: Ελεύθερη πυριδονολίνη

RANKL: Ενεργοποιητής του υποδοχέα του πυρηνικού παράγοντα kappa-B συνδέτη (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand)

SNP: Πολυμορφισμός ενός μόνο νουκλεοτιδίου

SOS: Μεταβολή ταχύτητας κυμάτων (speed of sound)

TGF-β: αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού (transforming growth factor beta 1)

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΟΣΤΑ

1.1. ΟΣΤΙΤΗΣ ΙΣΤΟΣ

Τα οστά του σώματος αποτελούνται από έναν τύπο συνδετικού ιστού, ο οποίος ονομάζεται οστίτης ιστός. [1, 2] Ο οστίτης ιστός αποτελείται από κυτταρικά και μη συστατικά. Το 70% του οστίτη ιστού συνιστάται από μεταλλικά ιόντα που προσδίδουν ελαστικότητα στα οστά, το 5-8% νερό, το οποίο συμβάλλει στην αποθήκευση των θρεπτικών συστατικών και το 22% πρωτεΐνες.[3] Οι κύριες διακρίσεις των πρωτεϊνών είναι το κολλαγόνο, οι γλυκοπρωτεΐνες, καθώς και μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες, όπως είναι η οστεοκαλσίνη και η αλκαλική φωσφατάση. Αναφορικά με τα μικροστοιχεία, τα οστά περιέχουν το 99% του συνολικού ασβεστίου του σώματος, το 35% του νατρίου και το 60% του μαγνησίου.[1]

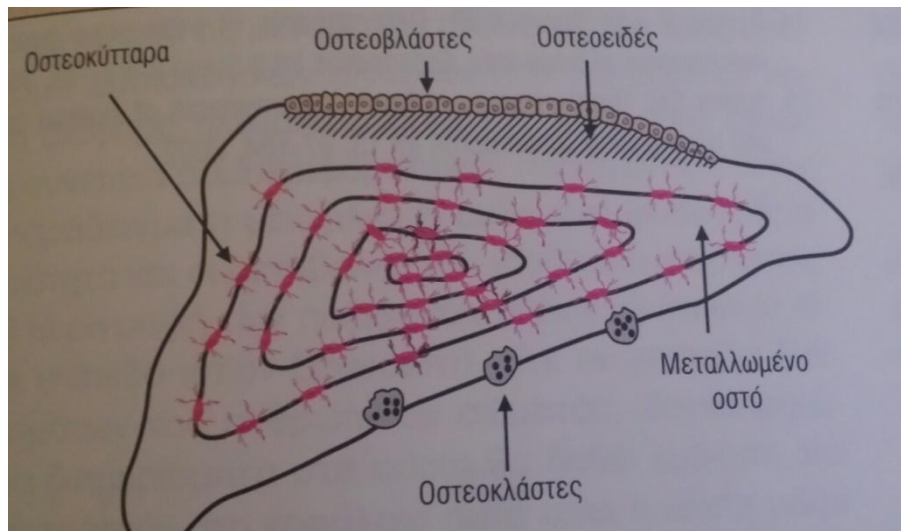
1.1.1. ΜΕΡΗ ΟΣΤΙΤΗ ΙΣΤΟΥ

Ο οστίτης ιστός αποτελείται από:

- ❖ *τρεις ομάδες κυττάρων*, τα οποία ανταποκρίνονται σε χημικά, μηχανικά, ηλεκτρικά και μαγνητικά ερεθίσματα. Στη μεμβράνη, αλλά και στο εσωτερικό των κυττάρων, υπάρχουν ειδικοί υποδοχείς ερεθισμάτων, οι οποίοι μεταφέρουν την πληροφορία στο εσωτερικό του κυττάρου. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται μέσω μιας σειράς αντιδράσεων που ενεργοποιούν τον οστικό μεταβολισμό. Στη συνέχεια, το αρχικό ερέθισμα μεταφέρεται σε τμήμα του γονιδίου μέσω ειδικών στεροειδών υποδοχέων, και εκεί μεταφράζεται.
- ❖ Οι **οστεοβλάστες** είναι οστεοπαραγωγικά κύτταρα τα οποία είναι υπεύθυνα για τον οστικό σχηματισμό. Προέρχονται από αρχέγονα οστικά κύτταρα από το μυελό των οστών ή από τον συνδετικό ιστό. Όταν επιδρούν οι κυττοκίνες, γίνεται διαφοροποίηση σε ώριμους οστεοβλάστες. Η βασική λειτουργία τους είναι η σύνθεση του

οστεοειδούς και η ασβεστοποίηση τους.[4] Παράγουν και εναποθέτουν κολλαγόνο τύπου 1, καθώς και μη κολλαγονικές πρωτεΐνες. Τέλος, διαδραματίζουν ενεργό ρόλο στην ομοιόσταση του ασβεστίου.[5]

- ❖ Τα **οστεοκύτταρα** είναι διαφοροποιημένοι οστεοβλάστες και περιέχονται στο ασβεστοποιημένο πλέγμα της θεμέλιας ουσίας. Περιέχουν κρυσταλλοποιημένο ασβέστιο. Ο ρόλος των οστεοκυττάρων δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, αλλά κάποιες έρευνες υποστηρίζουν ότι τα οστεοκύτταρα εκκρίνουν ειδικά αντιγόνα στην επιφάνεια του κυττάρου, καθώς και αλκαλική φωσφατάση, όταν το κύτταρο βρίσκεται στην οστεοβλαστική διαφοροποίηση. Όταν η διαφοροποίηση ολοκληρωθεί και δημιουργηθεί το οστεοκύτταρο, τότε σταματάει και η έκκριση.[4]
- ❖ Οι **οστεοκλάστες** είναι κύτταρα τα οποία συνεισφέρουν στην οστική απορρόφηση και έχουν αντίθετη δράση με τους οστεοβλάστες. Προέρχονται από αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα. Όταν επιδρούν ορμόνες, κυτταροκίνες και ο μεσολαβητής RANKL, γίνεται διαφοροποίηση σε ώριμους οστεοκλάστες. Είναι πολυπύρρηνα γιγαντοκύτταρα, που παρουσιάζουν κυτταρική πόλωση και διαμορφώνουν μια αρκετά κλειστή κοιλότητα. Μέσα σε αυτήν, εκκρίνονται πρωτεϊνολυτικά ένζυμα, οστεολυτικά οξέα, καθώς και ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και υδρογόνου. Έτσι, επιτυγχάνεται η πέψη των πρωτεϊνών, του κολλαγόνου και η διάλυση των κρυστάλλων υδροξυαπατίτη. Τέλος, έχουν τη δυνατότητα να απορροφούν οστό σε διάφορα σημεία και να μεταναστεύουν σε νέες θέσεις. [5]



[6 σελ 147]

- ❖ Η *θεμέλια ουσία* είναι ένα μη κυτταρικό συστατικό των οστών. Αποτελείται από 2 φάσεις, την οργανική και την ανόργανη. Η οργανική φάση των οστών παίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της δομής και στις μηχανικές και βιοχημικές διεργασίες του οστίτη ιστού. Το 98% της οργανικής φάσης αποτελείται από κολλαγόνο τύπου I και από αρκετές μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες. Η ανόργανη θεμέλια ουσία αποτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό του οστού, κοντά στα 2/3. Το 95% της ανόργανης φάσης σχηματίζεται από κρυστάλλους υδροξυαπατίτη και το 5% από δεσμευμένα σε αυτόν ιχνοστοιχεία. [5]

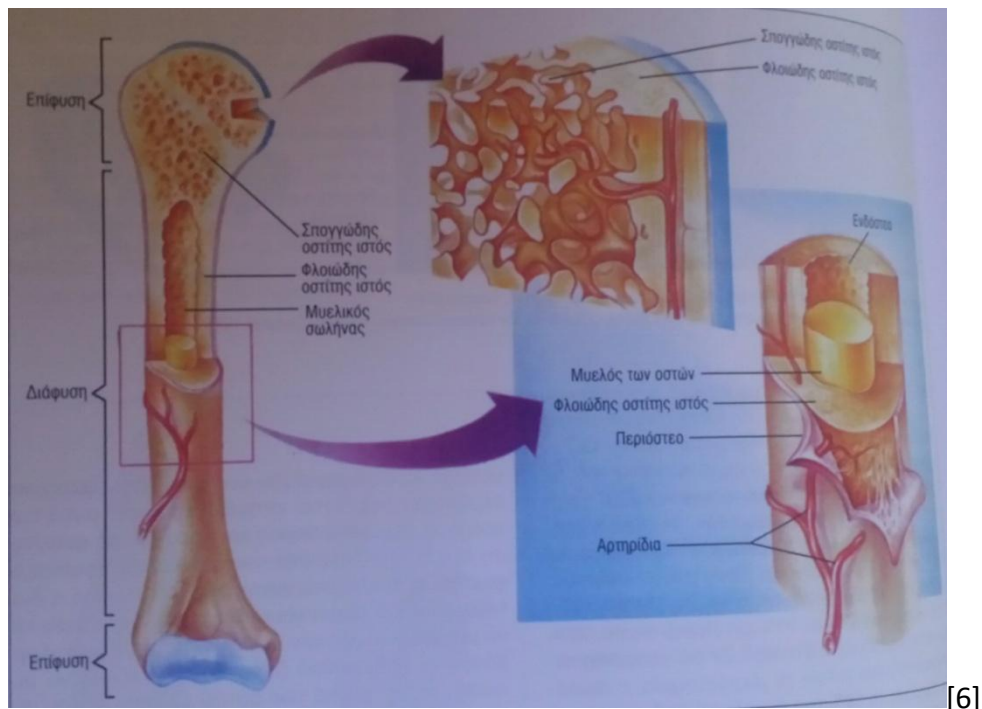
1.1.2. ΕΙΔΗ ΟΣΤΙΤΗ ΙΣΤΟΥ

Ο οστίτης ιστός διακρίνεται σε δύο τύπους, το φλοιώδες και το σπογγώδες οστίτη ιστό.

- ❖ Ο *φλοιώδης οστίτης ιστός* είναι ο τύπος ιστού, του οποίου η θεμέλια ουσία έχει πυκνή δομή με συμπαγές στρώμα με μικρά κενά. Επιπλέον, οι δοκίδες των οστεοκυττάρων βρίσκονται σε στενή επαφή μεταξύ τους. Ο φλοιώδης ιστός σχηματίζει το περίβλημα στα οστά, στηρίζοντας το σωματικό βάρος. Έχει τετραπλάσια μάζα σε σχέση με το σπογγώδη ιστό. Από τα 206 συνολικά οστά, από τα οποία αποτελείται ο ανθρώπινος σκελετός, τα 80 είναι φλοιώδους οστού

και καταλαμβάνουν τον κεντρικό άξονα του σκελετού, όπως είναι η σπονδυλική στήλη, η πύελος και άλλα πλατιά οστά.

- ❖ *Ο σπογγώδης οστίτης ιστός είναι ο τύπος ιστού, ο οποίος αποτελείται από μια πορώδη δομή με οστικές δοκίδες και ενδιάμεσα διάκενα, τα οποία καταλαμβάνονται από τον ερυθρό ή κίτρινο μυελό των οστών. Ο μεταβολικός ρυθμός του σπογγώδους ιστού είναι υψηλότερος. Από τα συνολικά οστά του ανθρώπινου σκελετού, τα 126 αποτελούνται από σπογγώδες οστό και περιλαμβάνουν όλα τα μακρά οστά, τα οποία είναι υπεύθυνα για την κίνηση του σώματος και καταστρέφονται ευκολότερα. Γι αυτό το λόγο, παθήσεις των οστών, όπως η οστεοπόρωση, προσβάλλουν πιο συχνά οστά πλούσια σε σπογγώδη ιστό, όπως η σπονδυλική στήλη, τα ισχία και οι καρποί. [4]*



1.1.3. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΟΣΤΙΤΗ ΙΣΤΟΥ

Ο οστίτης ιστός διαδραματίζει μια σειρά από βασικές λειτουργίες απαραίτητες, τόσο για την εύρυθμη λειτουργία του οργανισμού, όσο και για την ποιότητα ζωής.[1]

Οι κύριες λειτουργίες των οστών είναι οι ακόλουθες:

- ❖ Παρέχεται μηχανική υποστήριξη και επιτρέπεται η επίτευξη της όρθιας θέσης και η κινητικότητα.
- ❖ Επιτυγχάνεται η ομοιόσταση του ασβεστίου, του φωσφόρου και του μαγνησίου.
- ❖ Προστατεύονται δομές και όργανα, όπως το νευρικό κεντρικό σύστημα, η καρδιά και οι πνεύμονες.
- ❖ Ρυθμίζεται η οξεοβασική ισορροπία του οργανισμού.
- ❖ Αποτελεί μηχανική αποθήκη για τα μεταλλικά άλατα. [7]

1.2. ΟΣΤΙΚΟΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ

Ο οστίτης ιστός είναι ένας ζωντανός, μεταβολικά δραστήριος ιστός που βρίσκεται σε δυναμική ισορροπία μέσω του ρυθμού οστικής ανακατασκευής. Η οστική ανακατασκευή είναι μια διαδικασία ανανέωσης των μικρομονάδων των οστών, που στηρίζεται, τόσο στην οστική παραγωγή, μέσω της λειτουργίας των οστεοβλαστών, όσο και στην οστική απορρόφηση, μέσω της λειτουργίας των οστεοκλαστών.

Σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των οστών διαδραματίζουν οι ασβεστιορρυθμιστικές ορμόνες. Στις ορμόνες αυτές, συμπεριλαμβάνονται και οι ορμονικοί παράγοντες, όπως η βιταμίνη D και η παραθορμόνη που συμβάλλουν στην ομοιοστάση του ασβεστίου.

❖ Η βιταμίνη D απαντάται σε δύο μορφές, τη D₂, που ονομάζεται εργοκαλσιφερόλη και τη D₃, που ονομάζεται χοληκαλσιφερόλη. Η D₃ συντίθεται στο δέρμα από την πρόδρομη της 7- δευδροχοληκαλσιφερόλη, που μετατρέπεται σε προβιταμίνη D₃. Με τη δράση της υπεριώδους ακτινοβολίας του ήλιου μετατρέπεται σε βιταμίνη D₃. Από την άλλη, η βιταμίνη D₂ προέρχεται από την εργοστερόλη, η οποία είναι μια φυτική στερόλη και προσλαμβάνεται από τροφές φυτικής προέλευσης. Η D₂ εισέρχεται μέσω της τροφής στον οργανισμό και απορροφάται στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου μέσω χολικών αλάτων. Στη συνέχεια δεσμεύεται από ένα μεταφορέα και μεταφέρεται στην αιματική κυκλοφορία.

Η βιταμίνη D, σε οποιαδήποτε από τις 2 μορφές υδροξυλιώνεται, μέσα στον οργανισμό, σε 25-υδροξυ-βιταμίνη D, η οποία είναι ο κύριος μεταβολίτης της βιταμίνης. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται στο ήπαρ και στη συνέχεια στους νεφρούς με μια δεύτερη υδροξυλίωση, όπου και σχηματίζεται η 1,25(OH)₂D, η οποία διεγείρεται από την παραθορμόνη και αναστέλλεται από τα φωσφορικά ιόντα.

❖ Η παραθορμόνη είναι ο κυριότερος ρυθμιστής της ομοιοστασίας του ασβεστίου. Δρα στο έντερο, στα οστά και στους νεφρούς, μέχρι να υπάρξουν φυσιολογικά επίπεδα ασβεστίου στο αίμα. Η ρύθμιση της παραθορμόνης γίνεται τόσο σε επίπεδο γονιδιακής σύνθεσης, όσο και σε επίπεδο έκκρισης. Επιπλέον, η

έκκριση της ρυθμίζεται και από τα επίπεδα $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, του μαγνησίου και του φωσφόρου.[8]

1.3. ΟΣΤΙΚΗ ΑΝΑΚΑΤΑΣΚΕΥΗ

Η οστική ανακατασκευή αποτελεί μια διαδικασία ανανέωσης των μικρομονάδων των οστών με σκοπό τόσο την επιδιόρθωση των μικροφθορών, όσο και τη διατήρηση τιμών ιονισμένου ασβεστίου του εξωκυττάριου χώρου σε σταθερά επίπεδα. Η διαδικασία αυτή γίνεται με τη λειτουργία των οστεοκλαστών και των οστεοβλαστών. Η πλήρης ανακατασκευή του ανθρώπινου σκελετού διαρκεί 10 χρόνια. [9]

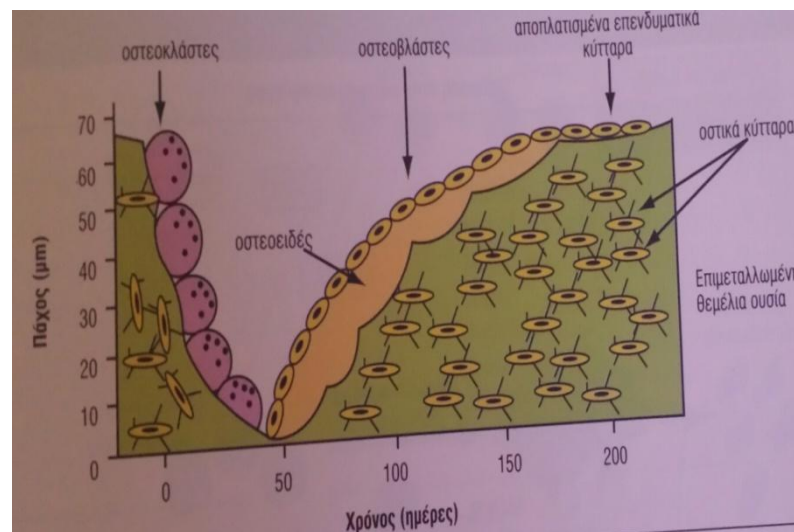
1.3.1 ΟΣΤΙΚΗ ΑΝΑΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ ΟΣΤΟ

Η ανακατασκευή των οστών ταξινομείται σε δύο πρότυπα, τα οποία είναι το πρότυπο ανακατασκευής σε χαβέρσιο σύστημα στο φλοιώδες οστό και το πρότυπο ανακατασκευής στην επιφάνεια του ενδοοστέου, στη σπογγώδη μοίρα του οστού. Τα δύο αυτά πρότυπα διαφέρουν μόνο μορφολογικά, καθώς η χαβέρσια επιφάνεια είναι μια επέκταση της επιφάνειας του ενδοοστέου. Η διαδικασία ανακατασκευής είναι ίδια. [10]

Η αρχή της οστικής αναδιαμόρφωσης στηρίζεται σε 5 φάσεις, τα οποία είναι τα ακόλουθα:

- ❖ *Η φάση της ηρεμίας.* Σε αυτό το στάδιο, τα κύτταρα που υπάρχουν στην ελεύθερη επιφάνεια του οστεώνα είναι ανενεργά.
- ❖ *Η φάση της ενεργοποίησης.* Η διαδικασία ξεκινάει με ένα ερέθισμα και έτσι εκκρίνεται ένας ειδικός τοπικός παράγοντας από τα οστεοκύτταρα και τα κύτταρα του μυελού. Με αυτή τη διαδικασία, ενεργοποιούνται πρόδρομες μορφές οστεοκλαστών. Έπειτα, οι μορφές αυτές των προ-οστεοκλαστών δημιουργούν τον πολυπύρρηνο οστεοκλάστη που πέπτει τη θεμέλια ουσία, με τη διαδικασία που ονομάζεται πρωτεόλυση.
- ❖ *Η φάση της απορρόφησης.* Σε αυτή τη φάση, οι οστεοκλάστες απορροφούν σιγά σιγά τη θεμέλια ουσία. Η διαδικασία αυτή κρατάει 3-4 εβδομάδες στο σπογγώδες οστό και 6-10 εβδομάδες στο φλοιώδες οστό.

- ❖ *Η φάση της αναστροφής.* Στη φάση αυτή, ο πολυπύρηνος οστεοκλάστης οδηγείται σε απόπτωση, ενώ τα μονοπύρηνια κύτταρα οριοθετούν την οστική απορρόφηση.
- ❖ *Η φάση της οστικής παραγωγής.* Κατά τη διαδικασία αυτή, παρατηρείται οστικός σχηματισμός από ενεργοποιημένους οστεοβλάστες, οι οποίοι δημιουργούν το οστεοειδές. Οι οστεοβλάστες κατευθύνουν τις ίνες κολλαγόνου σε παράλληλη διάταξη, ή και προς την αντίθετη φορά. Η επιμετάλλωση του οστού, δηλαδή η χρονική περίοδος ωρίμανσης του οστεοειδούς ολοκληρώνεται μέσα σε 70-100 μέρες, χρόνος ο οποίος διαφέρει σε φλοιώδες και σπογγώδες οστό. [11, 12]



[6 σελ.359]

1.3.2. ΟΣΤΙΚΗ ΑΝΑΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΣΕ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟ ΟΣΤΟ

Υπάρχουν περιπτώσεις κατά τις οποίες δεν υπάρχει ισορροπία ανάμεσα στην οστική απορρόφηση και στον οστικό σχηματισμό. Στις περιπτώσεις αυτές συγκαταλέγονται διάφορες παθήσεις των οστών που παρουσιάζουν δυσλειτουργία σε κάποιο στάδιο της οστικής ανακατασκευής, όπως είναι η οστεοπόρωση, η ραχίτιδα, η οστεομαλακία, διάφορες μορφές καρκίνου, η νόσος Paget και κάποιες παθήσεις του λεπτού εντέρου.[11]

Σε τέτοιες καταστάσεις, δημιουργείται ένας φαύλος κύκλος παθολογικών καταστάσεων, που περιγράφεται στη συνέχεια.

Τα μόρια RANK-RANKL-OPG βοηθούν στο σχηματισμό και στην επιβίωση των οστεοκλαστών, οι οποίοι μέσω της οστεόλυσης, συμμετέχουν στην εγκατάσταση των κακοηθών κύτταρων στον ανθρώπινο σκελετό, καθώς και επιπλοκών που συμβαίνουν στον οστικό μεταβολισμό. Οι όγκοι διαταράσσουν τη ρύθμιση της RANKL και της OPG με τη βοήθεια διάφορων παραγόντων, όπως είναι η PTHrP, η IL-8, ο TGF- β και η προσταγλαδίνη E2. Οι παράγοντες αυτοί αυξάνουν την έκφραση του RANKL, οδηγώντας σε αυξημένη διαφοροποίηση και έτσι επιταχύνεται η οστική απορρόφηση. Επιπλέον, όταν υπάρχει αύξηση της OPG, παρατηρείται ταυτόχρονη αύξηση των δεικτών απορρόφησης. Συνεπώς, οι παράγοντες αυτοί προάγουν την αύξηση του όγκου και τελικά δημιουργείται ένας φαύλος κύκλος. [13]

1.4. ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Ο οστίτης ιστός συνεχώς ανανεώνεται μέσω του ρυθμού οστικής ανακατασκευής, διαδικασία που στηρίζεται στην παράλληλη λειτουργία των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών. Η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός κυτταρικών και εξωκυτταρικών στοιχείων της σκελετικής θεμέλιας ουσίας οδήγησε στην ανάπτυξη βιοχημικών δεικτών, που αντανakλούν ειδικά είτε την οστική παραγωγή είτε την οστική απορρόφηση. Αυτοί οι βιοχημικοί δείκτες αποτελούν χρήσιμα εργαλεία στην κατανόηση της παθογένειας και στη θεραπευτική αντιμετώπιση των μεταβολικών νοσημάτων των οστών. Παρόλ' αυτά, υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί στην χρήση αυτών των δεικτών. Αρχικά, κάποιοι από αυτούς τους δείκτες, μπορούν να αντανakλούν ταυτόχρονα, τόσο την οστική παραγωγή, όσο και την οστική απορρόφηση. Επιπλέον, μερικοί από αυτούς βρίσκονται και σε άλλους ιστούς και επομένως τα επίπεδα τους μπορεί να μην αντανakλούν πλήρως τον οστικό μεταβολισμό. Τέλος, μεταβολές στα επίπεδα των δεικτών αυτών, μπορούν να αντανakλούν αλλαγές του οστικού μεταβολισμού, που να μη σχετίζονται με την υποκείμενη αίτια – νόσο που μελετάται.

1.4.1. ΟΣΤΙΚΟΥ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ Ή ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Κατά τη διαδικασία του οστικού σχηματισμού, η μεταβολική δραστηριότητα των οστικών κυττάρων απελευθερώνει μια σειρά από προϊόντα στο αίμα, τα οποία μπορούν να μετρηθούν. Με αυτό τον τρόπο εκτιμάται ο οστικός μεταβολισμός. Οι δείκτες οστικού σχηματισμού αποτελούν προϊόντα ενεργοποιημένων οστεοβλαστών, τα οποία παράγονται κατά τη διάρκεια ανάπτυξης και ωρίμανσης των οστεοβλαστών, αντικατοπτρίζοντας την οστική παραγωγή. Οι δείκτες με τη μεγαλύτερη κλινική σημασία είναι η αλκαλική φωσφατάση, η οστεοκαλσίνη, και τα N- και τα C- τελοπεπτίδια με διασταυρωμένους δεσμούς κολλαγόνου.

- ❖ Η ολική αλκαλική φωσφατάση είναι ένα ένζυμο που συσχετίζεται με το σχηματισμό και την επιμετάλλωση του οστεοειδούς. Η ολική αλκαλική φωσφατάση στον ορό του αίματος προέρχεται από διάφορους ιστούς, όπως το ήπαρ, το έντερο, ο σπλήνας, τα νεφρά, ο πλακούντας και τα οστά. Η

διαφοροποίηση μεταξύ της αλκαλικής φωσφατάσης προερχόμενης από το ήπαρ και εκείνης προερχόμενης από τα οστά, περιλαμβάνουν μεθόδους με ανοσοενζυμικές τεχνικές.

- ❖ *Η οστεοκαλσίνη είναι μια πρωτεΐνη μικρού μοριακού βάρους συνδεδεμένη με υδροξυαπατίτη, η οποία συντίθεται σε ώριμους οστεοβλάστες, οδοντοβλάστες και χονδροκύτταρα. Ο δείκτης αυτός είναι ειδικός για την οστεοβλαστική δραστηριότητα, καθώς τα επίπεδα στον ορό αίματος σχετίζονται με αυξημένο ρυθμό οστικού σχηματισμού. Τα επίπεδα της στον ορό δεν επηρεάζονται από τη λήψη τροφής πριν τη μέτρηση.*
- ❖ *Το αμινό- και καρβοξυ- τελικό προπεπτίδιο του προκαλαγόνου τύπου I εκφράζει την οστεοβλαστική δραστηριότητα και την αποδόμηση του κολλαγόνου. Τα δύο προπεπτίδια παράγονται στοιχειομετρικά και αποτελούν ποσοτική εκτίμηση του νεοσχηματιθέντος κολλαγόνου τύπου I. Το προκολλαγόνο τύπου I παράγεται από τους ινοβλάστες και τους οστεοβλάστες και μετατρέπεται σε κολλαγόνο με την απομάκρυνση των αμινο- και καρβοξυτελικών πεπτιδίων που βρίσκονται στα άκρα του. Παρ'όλα αυτά, οι μετρήσεις αυτές δεν εφαρμόζονται συχνά επειδή το κολλαγόνο τύπου I είναι συστατικό και άλλων ιστών και υπάρχει κίνδυνος σφάλματος. [4]*

1.4.2.ΟΣΤΙΚΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ

Οι δείκτες οστικής απορρόφησης είναι προϊόντα αποδόμησης του κολλαγόνου των οστών. Οι μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες των οστών χρησιμοποιούνται ως δείκτες οστικής απορρόφησης. Οι δοκιμασίες που εφαρμόζονται γίνονται με την χρήση της απλής εξέτασης των ούρων. Οι δείκτες που χρησιμοποιούνται στην οστική απορρόφηση είναι η αλκαλική φωσφατάση, η υδροξυπρολίνη, η σιαλοπρωτεΐνη των οστών (ΒΣΠ), οι διασταυρούμενοι δεσμοί υδροξυπυριδινίου του κολλαγόνου και τα αδιασταυρούμενα τελοπεπτίδια του κολλαγόνου τύπου I. [4]

- ❖ *Η υδροξυπρολίνη συνιστά το 12-14% των αμινοξέων του κολλαγόνου με μόλις το 10% αυτής να απελευθερώνεται στα ούρα κατά τη διαδικασία της οστικής απορρόφησης, ενώ συνήθως είναι δεσμευμένη με άλλες ουσίες. Η*

υδροξυπρολίνη ήταν από τους πρώτους δείκτες οστικής απορρόφησης. Παρ'όλα αυτά σήμερα, θεωρείται μη ειδικός δείκτης οστικής απορρόφησης και έχει αντικατασταθεί από άλλους πολύ πιο ειδικούς.

- ❖ *Η σιαλοπρωτεΐνη των οστών (ΒΣΠ- BSP) είναι το κύριο αναβολικό προϊόν της δράσης των ενεργοποιημένων οστεοβλαστών. Ακόμα, έχει φανεί ότι έχει σημαντικό ρόλο στην επιμετάλλωση του οστού και στη διαδικασία προσκόλλησης των οστικών κυττάρων στη θεμέλια ουσία, μέσω των ιντεγρινών. Η σιαλοπρωτεΐνη ελαττώνεται μετά από ενδοφλέβια χορήγηση διφωσφονικών φαρμάκων γι αυτό και έχει χρησιμοποιηθεί ως δείκτης.*
- ❖ *Οι διασταυρούμενοι δεσμοί υδροξυπυριδινίου του κολλαγόνου (Πυριδινολίνη PYD και Δεσοξυπυριδινολίνη DPD) δρουν ως σταθεροποιητές του κολλαγόνου του οστίτη ιστού, συνδέσμων και τενόντων. Οι διασταυρούμενοι δεσμοί της πυριδινολίνης απελευθερώνονται στην κυκλοφορία κατά τη διάρκεια της οστικής απορρόφησης και εκκρίνονται στα ούρα ως ελεύθερη πυριδονολίνη – ΠΥΔ ή δεσοξυπυριδινολίνη – ΔΠΔ. Στα οστά απαντώνται συνήθως η μορφή ΔΠΔ, γι αυτό και θεωρείται πιο ειδικός δείκτης του κολλαγόνου των οστών. Η πιο ευαίσθητη και ακριβής μεθοδολογία για τη μέτρηση αυτών των δεικτών θεωρείται η υψηλής τεχνολογίας υγρής χρωματογραφία. Τα διασταυρούμενα τελοπεπτίδια του κολλαγόνου τύπου I εκφράζουν την αποδόμηση του κολλαγόνου. Με την χρήση ανοσοχημικών μεθόδων ανιχνεύονται τα αμινοτελικά άκρα και τα καρβοξύ-τελικά άκρα του κολλαγόνου στο αίμα. [4]*

1.5. ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗ

Η οστεοπόρωση είναι μια νόσος που επηρεάζει σημαντικά την ορθή δομή των οστών και χαρακτηρίζεται είτε από αυξημένη αποδόμηση του οστού είτε από μειωμένη παραγωγή οστίτη ιστού. Η συχνότητα εμφάνισης της οστεοπόρωσης σήμερα πλήττει πάνω από 10 εκατομμύρια ανθρώπους στις Ηνωμένες Πολιτείες και αναμένεται να επηρεάσει περίπου 14 εκατομμύρια ενήλικες ηλικίας άνω των 50 μέχρι το έτος 2020.

Σε παγκόσμιο επίπεδο οι ασθενείς με οστεοπόρωση υπολογίζονται σε 200 εκατομμύρια με την πιθανότητα εμφάνισης να χαρακτηρίζεται μεγαλύτερη στη Βόρεια Αμερική και την Ευρώπη, και να αυξάνεται σημαντικά στις αναπτυσσόμενες χώρες, όπως η διάρκεια ζωής του πληθυσμού σε αυτές τις χώρες συνεχίζει να αυξάνεται.

Η νόσος της οστεοπόρωσης σήμερα επηρεάζει περισσότερα από 10 εκατομμύρια ανθρώπους στις Ηνωμένες Πολιτείες και πρόκειται να αφορά περίπου 14 εκατομμύρια ενήλικες άνω των 50 μέχρι το έτος 2020. Σύμφωνα με τα διεθνή δεδομένα άνω των 250 εκατομμυρίων γυναικών έχουν διαγνωσθεί με οστεοπόρωση. Η συγκριτική πιθανότητα εμφάνισης της κατάστασης της οστεοπόρωσης είναι επί του παρόντος μεγαλύτερη στη Βόρεια Αμερική και την Ευρώπη και μπορεί να αυξηθεί σημαντικά στις αναπτυσσόμενες χώρες, καθώς η διάρκεια ζωής του πληθυσμού λόγω των σύγχρονων συνθηκών ζωής συνεχίζει να αυξάνεται.[14, 15]

Από πλευράς εξέλιξης και προόδου της νόσου των οστών, η αλλοίωση της οστικής πυκνότητας είναι μια συστηματική σκελετική διαταραχή που μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική απώλεια στην ισορροπία του οργανισμού καθώς και στην ομοιόσταση και την μεταβολή της δομής των οστών. Το γεγονός αυτό επηρεάζει την αντοχή των οστών, με μικροαρχιτεκτονική αναδιαμόρφωση, την σκελετική ευαισθησία και την πιθανή εξέλιξη στην εμφάνιση κατάγματος. Η δύναμη και η αντοχή των οστικών δομών εξαρτάται από την παρουσία δύο πολύ σημαντικών παραγόντων τόσο της οστικής πυκνότητας όσο και της ποιοτικής σύστασης των οστών. Η ποιοτική σύσταση των οστών αναφέρεται σε ένα σύνθετο αριθμό παραγόντων που

καθορίζουν την αντίσταση στο οστικό κάταγμα, όπως είναι η δομή της μικρο-αρχιτεκτονικής του οστού.[16]

Η οστεοπόρωση είναι μια πάθηση που επηρεάζει τις μέρες μας όλο και περισσότερα άτομα καθώς έχει αυξηθεί το προσδόκιμο ζωής ειδικά στα άτομα της τρίτης ηλικίας που τους προκαλεί έντονο οικονομικό αντίκτυπο. Στο Ηνωμένο Βασίλειο, μια στις δύο γυναίκες και ένας στους πέντε άνδρες θα υποστούν κάταγμα μετά την ηλικία των 50 ετών, με το ετήσιο κόστος των υπηρεσιών υγείας να ανέρχονται στην τάξη των 2 εκατομμυρίων λιρών.[17]

Μια από τις σοβαρότερες εκδηλώσεις σε ασθενείς με οστεοπόρωση είναι η εμφάνιση του κατάγματος του ισχίου καθώς και άλλα σοβαρά κατάγματα που μπορεί να συμβαίνουν σε σπονδύλους και οστά και συνδυάζονται με μεγάλη πιθανότητα θνησιμότητας. Παράλληλα η έκπτωση της ποιότητας ζωής, μπορεί να φθάσει και σε ένα ποσοστό έως και 50% των ασθενών γεγονός που μπορεί να αφήσει και προβλήματα μειωμένης κινητικότητας.[18]

Επομένως καθίσταται ιδιαίτερα σημαντική η θεραπευτική προσέγγιση της οστεοπόρωσης καθώς αυτή τόσο την πρόληψη των καταγμάτων όσο και την αντιμετώπιση.

1.5.1. ΟΡΙΣΜΟΣ

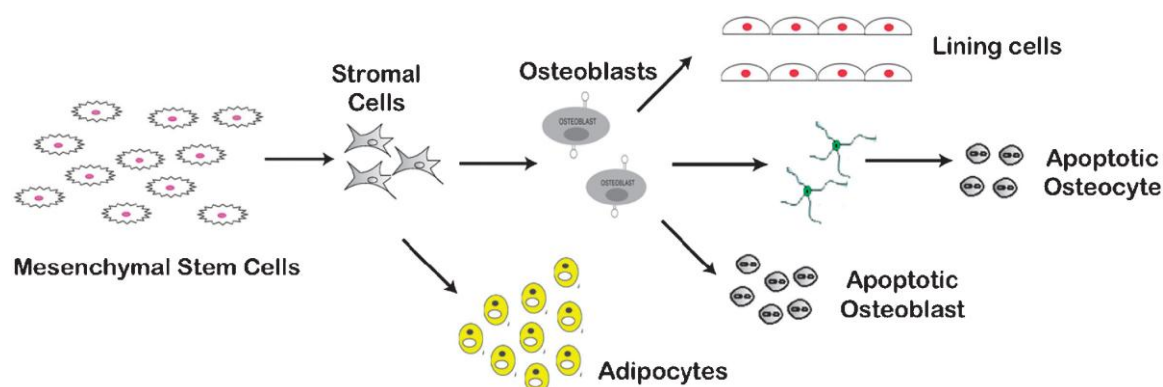
Οστεοπόρωση ορίζεται η σκελετική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από μειωμένη οστική αντοχή που προδιαθέτει ένα άτομο σε κατάγματα. Επομένως, δε διαταράσσονται μόνο ποσοτικά το οστά, αλλά και ποιοτικά. Στην κλινική πράξη, είναι εφικτή μόνο η μέτρηση της οστικής πυκνότητας με μη επεμβατικές τεχνικές, ενώ δεν είναι ακριβής η εκτίμηση των μηχανικών ιδιοτήτων του σκελετού.

Από το 2001, η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας, όρισε την οστεοπόρωση με βάση το στατιστικό δείκτη T-SCORE για τη μέτρηση της οστικής πυκνότητας. Πρόκειται για το στατιστικό δείκτη σύγκρισης με νέα άτομα, ίδιας εθνικότητας και φύλου. Η διαβάθμιση σήμερα είναι η ακόλουθη:

T-SCORE	
<-2,5	Οστεοπόρωση
-2,5 έως -1,0	Οστεοπενία
>-1,0	Φυσιολογικό

1.5.2. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Η οστεοπόρωση όπως έχουμε ήδη αναφέρει αποτελεί μια συστηματική μεταβολική διαταραχή των οστών που χαρακτηρίζεται από χαμηλή ποσότητα οστικής μάζας και σημαντικές αναδιαμορφώσεις στη δομή του οστίτη ιστού που μπορεί να οδηγήσει σε ρήξη των οστών και αύξηση του κινδύνου καταγμάτων. [19, 20] Η οστεοπόρωση λοιπόν που συνδέεται με τις μεταβολές στην ομοιόσταση του ασβεστίου και τη ρύθμιση του στους οργανισμούς αναγνωρίζεται ως σημαντικό πρόβλημα της δημόσιας υγείας λόγω των σημαντικών φυσικών, οικονομικών και ψυχοκοινωνικών επιπτώσεων που σχετίζονται με αυτήν καθώς και με την ποιότητα ζωής των ασθενών αυτή. Τα κατάγματα των σπονδύλων και των οστών είναι αρκετά συχνά σε ασθενείς με μεταβολές στην ομοιόσταση του ασβεστίου και μπορούν να συνδυάζονται με οσφυαλγία, λειτουργική έκπτωση και άκρως μειωμένη ποιότητα ζωής, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει και σε αυξημένη θνησιμότητα. Οι επιπτώσεις αυτές γίνονται περισσότερο αισθητές με την αύξηση στον αριθμό των σπονδυλικών καταγμάτων.[20, 21] Πολλαπλές επιστημονικές μελέτες έχουν περιγράψει πειστικά την επίδραση των μεταβολών στην ομοιόσταση του ασβεστίου, στην επίδραση στην οστική πυκνότητα (BMD), στην δομή των οστών, στην οστική απώλεια και στις επιδράσεις στις μηχανικές ιδιότητες τους των οστών.[22]



Κυτταρικές αλλαγές που παρατηρούνται στην οστεοπόρωση. Οι αλλαγές συντελούνται στην πυκνότητα των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων συνδυαζόμενη με την μείωση της οστεοβλαστογένεσης. [22]

Η οστεοπόρωση λοιπόν μπορεί να προκύψει μέσω δύο κύριων μηχανισμών δράσης, αρχικά μέσω της μη επίτευξης και διατήρησης της μέγιστης οστικής μάζας, καθώς επίσης και της εμφάνισης υπερβολικής οστικής απορρόφησης και / ή ειδικά σε διαδικασίες οστικής αναδιαμόρφωσης. Η εξέλιξη της μέγιστης οστικής μάζας και η τελική διαμόρφωση του οστού είναι πρωταρχικής σημασίας στην πρόληψη των μεταβολών στην ομοιόσταση του ασβεστίου, καθώς και την εμφάνιση των μεταβολών στην οστική πυκνότητα. Σε περιπτώσεις όπου ακολουθείται θεραπευτική αντιμετώπιση των μεταβολών των οστών, τα κατάγματα του ισχίου μπορούν να μειωθούν κατά 30%, με αύξηση της μέγιστης οστικής μάζας κατά 10%. Οι γενετικοί παράγοντες που θα αναλύσουμε παρακάτω αποτελούν σημαντικούς λόγους για την εξέλιξη της οστεοπόρωσης και των μεταβολών της ομοιόστασης του ασβεστίου συμμετέχοντας κατά περίπου 80% στη μέγιστη διακύμανση της οστικής μάζας.

1.5.3. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες κινδύνου, που συμβάλλουν στην αύξηση του κινδύνου των οστεοπορωτικών καταγμάτων, όπως είναι οι κλινικοί, φαρμακευτικοί, συμπεριφοριστικοί, διατροφικοί και γενετικοί παράγοντες. Μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τροποποιήσιμους και μη.

1.5.3.1. Μη τροποποιήσιμοι Παράγοντες Κινδύνου

Οι μη τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου είναι οι ακόλουθοι:

- ❖ **Φύλο:** Οι ορμόνες του φύλου έχουν αρκετή σημασία στην απόκτηση και διατήρηση της οστικής μάζας. Οι γυναίκες παρουσιάζουν μεγαλύτερη προδιάθεση να αναπτύξουν οστεοπόρωση. Η μείωση των οιστρογόνων που παρατηρείται στις γυναίκες, κατά τη διάρκεια της εμμηνόπαυσης συμβάλλει σε υψηλότερο ποσοστό εμφάνισης οστεοπόρωσης στις γυναίκες. Σε αυτό βέβαια

επηρεάζει και το μικρότερο σώμα και η μικρότερη οστική μάζα που έχει το γυναικείο φύλο. Με τη διαδικασία αυτή, προκαλείται μεγαλύτερη απώλεια δοκιδώδους οστού σε σχέση με το φλοιώδες οστό, το οποίο οδηγεί σε αυξημένη απορρόφηση του οστού.[4]

- ❖ *Ηλικία:* Με την αύξηση της ηλικίας, παρατηρείται μια σταδιακή απώλεια οστικής μάζας, ιδιαίτερα κατά την εμμηνόπαυση και επιτυγχάνεται μετά την εμμηνόπαυση. Οι γυναίκες μπορούν να χάσουν έως και 20% της συνολικής οστικής τους μάζας. Σε μια γενικότητα, ο ρυθμός απώλειας του οστού στους άνδρες είναι περίπου 0,5%-1% τον χρόνο, ενώ στις γυναίκες, κατά την προεμμηνοπαυσιακή περίοδο είναι 1%-6%. [4]
- ❖ *Φυλή:* Η οστεοπόρωση εμφανίζεται περισσότερο στις καυκάσιες και ασιατικές φυλές, σύμφωνα με έρευνας. Η λευκή φυλή παρουσιάζει μικρότερη οστική μάζα από την έγχρωμη, καθώς μπορεί να παίζει ρόλο κάποιο γονίδιο στενά συνδεδεμένο με το γονίδιο παραγωγής του υποδοχέα της βιταμίνης D.[23]
- ❖ *Κληρονομικότητα – Γονίδια:* Υπάρχουν έρευνες που υποστηρίζουν η εμφάνιση της οστεοπόρωσης μπορεί να σχετίζεται με τον πολυμορφισμό των γονιδίων που αφορά τους υποδοχείς της βιταμίνης d(VDR) και τον τύπο I του κολλαγόνου(COLLIA 1,2). [4] Υπολογίζεται ότι τουλάχιστον 60 γονίδια μπορεί να σχετίζονται με την εμφάνιση της οστεοπόρωσης.

1.5.3.2. Τροποποιήσιμοι Παράγοντες Κινδύνου

- ❖ *Κάταγμα:* Η εμφάνιση κατάγματος μπορεί να προδιαθέσει την εμφάνιση κατάγματος στο μέλλον κατά 2,5 έως 2,7 φορές, σε σχέση με ένα άτομο που δεν έχει υποστεί κανένα κάταγμα. [24]
- ❖ *Σωματικό βάρος:* Τα άτομα με αυξημένο σωματικό βάρος εμφανίζουν μικρότερα ποσοστά εμφάνισης οστεοπόρωσης. Μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες που παρουσιάζουν αύξηση βάρους >50% από την ηλικία των 25 ετών, φαίνεται να παρουσιάζουν χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης κατάγματος του ισχίου. [4]
- ❖ *Φυσική δραστηριότητα:* Φαίνεται ότι η καθιστική ζωή μπορεί να προκαλέσει μείωση έως και 40% στην οστική μάζα. Η άσκηση που παρατηρείται κατά την

παιδική και εφηβική ηλικία μπορεί να έχει ευεγερτικά αποτελέσματα στη μέγιστη οστική πυκνότητα.[25]

- ❖ *Κάπνισμα*: Το κάπνισμα φαίνεται να μειώνει τα επίπεδα οιστρογόνων και αυτό οδηγεί σε πρόωρη οστεοπόρωση και στα 2 φύλα. [26]
- ❖ *Αλκοόλ*: Η κατανάλωση μεγάλης ποσότητας αλκοόλ επηρεάζει αρνητικά στην εμφάνιση κατάγματος και στα 2 φύλα, σχετιζόμενη με την χαμηλή οστική μάζα. Το αλκοόλ επιδρά στο μεταβολισμό της βιταμίνης D επιπλέον. [4]
- ❖ *Διατροφή*: Η πρόσληψη ασβεστίου έχει σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη της οστικής μάζας, κατά την παιδική και προεφηβική ηλικία. Η βιταμίνη D από την άλλη πλευρά παίζει σημαντικό ρόλο στην απορρόφηση του ασβεστίου και σχετίζεται με τη διαδικασία ανάπτυξης του σκελετού. Επιπλέον η επαρκής πρόσληψη ασβεστίου, καθώς και βιταμίνης D μπορεί να βελτιώσει την απώλεια των οστών στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. [27]
- ❖ *Έκθεση στον ήλιο*: Η μειωμένη έκθεση στον ήλιο σχετίζεται με μειωμένη παραγωγή της βιταμίνης D, η οποία επηρεάζει τη λειτουργία των οστών. [28]

1.5.5. ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΟΣΤΕΟΠΩΡΩΣΗΣ

Υπάρχουν 2 μέθοδοι διάγνωσης της οστεοπόρωσης:

- ❖ *Απορροφησιμετρία διπλής ενέργειας ακτινών Χ (DXA).* Κατά το παρελθόν, ο μοναδικός τρόπος διάγνωσης της οστεοπόρωσης ήταν η εμφάνιση ενός κατάγματος στην ακτινογραφία, κάτι που σημαίνει ότι ο σκελετός έπρεπε να χάσει τουλάχιστον το 30% της οστικής του μάζας για να αναγνωριστεί η παρουσία της νόσου. Σήμερα, η διάγνωση της οστεοπόρωσης, γίνεται κυρίως με τη βοήθεια της μεθόδου απορροφησιμετρίας διπλής ενέργειας ακτινών Χ.



Με αυτή τη μέθοδο, μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια η οστική μάζα και η οστική πυκνότητα σε όλο το σώμα ή σε ορισμένες οστικές περιοχές, που είναι περισσότερο ευάλωτες σε κατάγματα, όπως στο ισχίο, στον αυχένα της κεφαλής του μηριαίου οστού, στον αντιβράχιο και στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης. Προκύπτουν αποτελέσματα που προκύπτουν από τη σύγκριση της οστικής πυκνότητας με αντίστοιχες πληθυσμού αναφοράς που επιλέγεται ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του εξεταζόμενου ατόμου.

Τα αποτελέσματα της μέτρησης της οστικής πυκνότητας εκτιμώνται με τα T-scores, με τις τιμές που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Παρ' αυτά, η μέτρηση οστικής πυκνότητας περιλαμβάνει και μια άλλη παράμετρο, το Z-score, η οποία δείχνει την οστική πυκνότητα συγκρινόμενη με την οστική

πυκνότητα που έχει ο μέσος άνθρωπος, με την ίδια ηλικία – σωματότυπο, Ένα Z-score μεγαλύτερο του -2,0 εκλαμβάνεται ως φυσιολογικό σύμφωνα με το International Society for Clinical Densitometry (ISCD).

- ❖ *Μετρήσεις Υπερήχων.* Για τις μετρήσεις αυτές, χρησιμοποιούνται τα ηχητικά σήματα με συχνότητες της τάξης των 200-600KHz. Οι δύο παράμετροι που συνήθως προσδιορίζονται με τη συγκεκριμένη μέθοδο είναι η εξασθένιση του υπερήχου ευρέος φάσματος και η ταχύτητα του υπερήχου. Οι μετρήσεις λαμβάνονται συνήθως από οστά του περιφερικού σκελετού με πιο συχνά αυτά της κνήμης και της πτέρνας.

Η εκτίμηση της οστικής μάζας με τη μέθοδο της ποσοτικής υπερηχομετρίας θεωρείται σήμερα σαν μια παλιά υποσχόμενη μέθοδος διάγνωσης της οστεοπόρωσης. Τα κυριότερα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι το χαμηλό κόστος και η μη εκπομπή της ακτινοβολίας όπως με τη μέθοδο DXA. Επίσης είναι μια πρακτική μέθοδος καθώς οι συσκευές είναι φορητές.

Η μέθοδος QUS είναι μη ιονίζουσα τεχνική που χρησιμοποιεί ηχητικά κύματα με σκοπό τον προσδιορισμό της οστικής πυκνότητας. Η μέθοδος αυτή μετράει την εξασθένιση της ηχητικής δέσμης (broadband ultrasound attenuation, BUA, μονάδα μέτρησης dB/MHz), τη μεταβολή της ταχύτητας των κυμάτων (speed of sound, SOS, μονάδα μέτρησης m/s) και τον δείκτη δυσκαμψίας (stiffness index) , ο οποίος είναι ένας συνδυασμός κανονικοποιημένης SOS και BUA και θεωρείται ότι βελτιώνει τον συντελεστή της ποικιλομορφίας των SOS και BUA.

$$(SI=0.67 * BUA + 0.28 * SOS - 240)$$

Η εξασθένιση του ηχητικού κύματος οφείλεται στην απορρόφηση και στη διασπορά του μέσα στα οστά και στους μαλακούς ιστούς. Επηρεάζεται τόσο από τη πυκνότητα του οστού όσο και από τις δομικές του παραμέτρους. Η ταχύτητα των κυμάτων (SOS) επηρεάζεται από την οστική πυκνότητα και από την ελαστικότητα των ιστών. Συνεπώς, η μέθοδος εκτιμά τη μέση τιμή οστικής πυκνότητας (BMD) και την οστική αρχιτεκτονική. Οι μετρήσεις αυτές συσχετίζονται με την οστική πυκνότητα (όπως μετράται με τη μέθοδο DXA) και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη κατηγοριοποίηση των ατόμων σε οστεοπορωτικούς και υγιείς, ενώ φαίνεται ότι η τεχνική QUS μπορεί να προβλέψει και τον καταγματικό κίνδυνο κυρίως σε ηλικιωμένες γυναίκες. Η

μέθοδος επιλέγεται επειδή δίνει πληροφορίες για την πυκνότητα αλλά και για την ποιότητα και αρχιτεκτονική του οστίτη ιστού. Επιπλέον, η μέθοδος είναι οικονομική και γρήγορη, ενώ η συσκευή μέτρησης είναι φορητή και δεν υποβάλει τους εξεταζόμενους σε ιονίζουσα ακτινοβολία.

2. ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑ

Όλο και περισσότερα γονίδια, και ειδικότερα συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί, φαίνεται να έχουν σχέση με την οστική δομή, όταν αλληλεπιδρούν με τους διατροφικούς παράγοντες. Παρακάτω, αναφέρονται αλληλεπιδράσεις γονιδίων και οστικής πυκνότητας, τόσο με το ασβέστιο, όσο και με τη βιταμίνη D.

2.1. ΑΣΒΕΣΤΙΟ

Το ασβέστιο είναι ένα από τα σημαντικότερα μικροθρεπτικά συστατικά και αποτελεί ένα σημαντικό δομικό και λειτουργικό ρόλο στη σκελετική υγεία του ανθρώπου. Το 99% της συνολικής ποσότητας του ασβεστίου βρίσκεται στα οστά και τα δόντια, ενώ το υπόλοιπο 1% βρίσκεται στο πλάσμα του αίματος και σε μαλακούς ιστούς.

Οι κύριες πηγές ασβεστίου από τη διατροφή είναι τα γαλακτοκομικά, με κύριο το γάλα γιατί η βιοδιαθεσιμότητα του είναι η μέγιστη, τα λαχανικά (κυρίως πράσινα φυλλώδη), τα ψάρια (σαρδέλες), τα θαλασσινά και οι ξηροί καρποί. [11]

Η αποβολή του ασβεστίου γίνεται κυρίως μέσω των νεφρών, αλλά και μέσω των κοπράνων και του δέρματος – εφίδρωσης.

Η απορρόφηση του ασβεστίου γίνεται με 2 μηχανισμούς:

- ❖ *Ενεργητική μεταφορά:* Συμμετέχει η 1,25 διυδροξυβιταμίνη D. Μετακινείται το ασβέστιο από τον εντερικό αυλό στο εντεροκύτταρο.
- ❖ *Παθητική διάχυση.* Μετακινείται το ασβέστιο ανάμεσα στα εντεροκύτταρα.

2.1.1. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΝΔΕΣΗ ΤΟΥ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ

Αρκετές μελέτες του γονιδιώματος έχουν δείξει άμεση σύνδεση μεταξύ των γενετικών τόπων και της ρύθμισης της οστικής πυκνότητας. Μερικά από τα δεδομένα από τις σαρώσεις του ανθρώπινου γονιδιώματος φαίνεται ότι πληρούν τα κριτήρια για την αξιολόγηση ενός γονιδίου και την συμμετοχή του στην ρύθμιση της ευαισθησίας για την ανάπτυξη οστεοπόρωσης.

Αρχικά υπάρχει γενετική σύνδεση του ασβεστίου με το γονίδιο BMP2, το οποίο κωδικοποιεί την μορφογενετική πρωτεΐνη 2 του οστού, ένα σημαντικό ρυθμιστή της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών. [29] Φαίνεται ότι τα γονίδια που ρυθμίζουν την BMD έχουν σχέση σε μια συγκεκριμένη γενετική θέση και με το φύλο[30, 31], από την άλλη όμως τα γονίδια που ρυθμίζουν την μέγιστη οστική μάζα διαφέρουν από εκείνα που ρυθμίζουν την BMD σε ηλικιωμένα άτομα. [31-33]

Σε μια μεγάλη συλλογική μελέτη για την αξιολόγηση της επίδρασης των κοινών γενετικών παραλλαγών (πολυμορφισμών) που σχετίζονται με υποψήφια γονίδια για BMD, βρέθηκε ότι οι περισσότεροι SNPs σε γονίδια που έχουν αναγνωρισθεί προηγουμένως ότι σχετίζονται με την οστεοπόρωση, τελικά δεν σχετίζονται με την ασθένεια. Επιβεβαίωσαν ότι οι παραλλαγές σε 9 γονίδια (ESR1, LRP4, ITGA1, LRP5, SOST, SPP1, TNFRSF11A, TNFRSF11B, και TNFSF11) έχουν σημαντική επιρροή στην εξέλιξη της BMD ενώ οι παραλλαγές σε 4 γονίδια (SPP1, SOST, LRP5 και TNFRSF11A) αυξάνουν επίσης τον κίνδυνο εμφάνισης οστεοπορωτικού κατάγματος. Τρία από αυτά τα γονίδια (TNFRSF11A, TNFRSF11B, και TNFSF11) συμμετέχουν στο ίδιο κυτταρικό μονοπάτι της RANKL οδού, η οποία επηρεάζει την οστική απορρόφηση.

Η οδός συνδέτη RANK / RANKL / οστεοπροτεγερίνης αποτελείται από τα γονίδια TNFRSF11B (ονομάζεται επίσης οστεοπροτεγερίνη), TN-FRSF11 (ονομάζεται επίσης RANKL) και το TNFRSF11A (RANK). Εν συντομία, αυτή η οδός είναι κεντρικής σημασίας για τη φυσιολογία των οστών, διότι ο RANKL είναι ένας παράγοντας που αλληλεπιδρά με τον RANK υποδοχέα και τις πρόδρομες ουσίες των οστεοκλαστών, που οδηγεί στην ενεργοποίηση, διαφοροποίηση και την σύντηξη των κυττάρων των οστεοκλαστών, τα οποία προάγουν την οστική επανααπορρόφηση. Η οστεοπροτεγερίνη ενεργεί ως προσδέτης σε αυτή την οδό και συνδέεται με τον RANKL, αποτρέποντας έτσι την σύνδεσή της με φυσικό υποδοχέα τον παράγοντα RANK. Κατά συνέπεια, η οστεοπροτεγερίνη δρα για την πρόληψη της οστικής επαναρρόφησης.[34] Προηγούμενες μελέτες συσχέτισης αυτών των γονιδίων ήταν ως επί το πλείστον μικρής ισχύος, λαμβάνοντας υπόψη ότι πρόσφατες μελέτες συσχέτισης του γονιδιώματος με ένα βιοσυνδετικό μονοπάτι προσδιορίζουν σημαντικούς παράγοντες επίδρασης της BMD στο γονιδίωμα.[34] Τέλος, η εκμετάλλευση αυτού του μονοπατιού οδήγησε στο σχεδιασμό ενός φαρμάκου (του

denosumab) που μιμείται τη δράση του TNFRSF11B και μειώνει τον κίνδυνο οστεοπορωτικών καταγμάτων. Τα αποτελέσματά των βιβλιογραφικών δεδομένων μας υπογραμμίζουν περισσότερες γενετικές θέσεις συνδεδεμένες με BMD (συμπεριλαμβανομένων των ESR1, TNFSF11, TNFRSF11A, TNFRSF11B, LRP4, LRP5, και SOST). [34, 35] Αξίζει να σημειωθεί ότι το ESR1 ταυτοποιήθηκε ως γονίδιο συνδεδεμένο με BMD[36], αλλά μια πρόσφατη μελέτη έδειξε συσχέτιση με την εμφάνιση κατάγματος χωρίς να επιδρά στην BMD.[37]

Μέχρι σήμερα έχουν προσδιοριστεί περισσότερα από 20 γονίδια που επηρεάζουν τον μεταβολισμό του ασβεστίου και έχουν σημαντική προδιάθεση στην εμφάνιση οστεοπόρωσης με το καθένα με μόνο μια μικρή ποσότητα της γενετικής διακύμανσης στην ευαισθησία εμφάνισης της ασθένειας.

Ο μηχανισμός ελέγχου της οστικής μάζας ρυθμίζεται από την δράση συγκεκριμένων γονιδίων και εκδηλώνεται τόσο κατά την διάρκεια της ενδομήτριας ζωής, ενώ φαίνεται να δέχεται την επίδραση τόσο της μητρικής διατροφής όσο και του καπνίσματος και της άσκησης. Η διαδικασία ελέγχου και εξέλιξη της οστικής διαμόρφωσης απευθύνεται σε συντονισμένες δράσεις των οστεοκλαστών και των οστεοβλαστών, τα οποία αποτελούν τις βασικές οστικές πολυδύναμες δομές.

Ο OPG / RANK και ο συνδέτης του (RANKL) είναι ένας από τους πιο σημαντικούς μεσολαβητές της δραστηριότητας των οστεοκλαστών, ενώ ο LRP5 είναι ένας από τους πιο σημαντικούς μεσολαβητές της οστεοβλαστικής δραστηριότητας.[38]

Εκτός όμως από τους οστεοβλάστες και οστεκλάστες υπάρχουν και άλλα κύτταρα που συμβάλλουν σημαντικά στην διατήρηση της οστικής πυκνότητας όπως τα οστεοκύτταρα και τα επιθηλιακά αγγειακά κύτταρα που αποτελούν σημαντικά στοιχεία της οστικής ανακατασκευής.

Από πλευρά μοριακής γενετικής και σχετικά με την παρουσία του ενδοκυτταρικού μονοπατιού ενεργοποίησης, η διαδικασία της οστικής απορρόφησης πραγματοποιείται μέσω της δράσης του παράγοντα RANKL και της ενεργοποίησης των σχετικών γονιδίων στα κύτταρα της οστεοβλαστικής σειράς. Ο παράγοντας RANKL έχει την ικανότητα να προσδένεται στον αντίστοιχο υποδοχέα RANK, γεγονός

που οδηγεί στην ενεργοποίηση σημαντικών δαιδαλωδών και πολύπλοκων ενδοκυτταρικών μονοπατιών, μεταξύ των οποίων και του NF- κ B, δράση που οδηγεί στην επαγωγή των οστεοκλαστικών γονιδίων.

Ο παράγοντας OPG μπορεί να δρα ως ανταγωνιστής του υποδοχέα, παρεμποδίζοντας τον παράγοντα RANKL να δεσμευτεί στον αντίστοιχο υποδοχέα. Από την άλλη άλλες πρωτεΐνες όπως αυτές που ονομάζονται Wnt είναι ενεργοποιημένα παράγωγά του σηματοδοτικού μονοπατιού LRP5, το οποίο ενεργοποιεί την ποσοτική αναγέννηση και παρεμποδίζει την οστική απορρόφηση.

Σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο έχει εντοπιστεί ένας μεγάλος αριθμός και εύρος παρεμποδιστών που ρυθμίζουν την ενδοκυτταρική λειτουργία του μονοπατιού LRP5 με τα κυριότερα να συμπεριλαμβάνουν τον παράγοντα SOST, που εντοπίζεται και ενεργοποιείται στα οστεοκύτταρα και μπορεί να δρά ως μόριο που συνδέει και ρυθμίζει την διαδικασία του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Η σχετική αναλογία των παραγόντων OPG / RANKL αποτελεί βασικό παράγοντα για την ρύθμιση του σωστού φυσιολογικό κυτταρικού κύκλου σχετικά με την πορεία της ρύθμισης της οστικής μάζας και του μεταβολισμού του ασβεστίου. Όπως γνωρίζουμε και από βιβλιογραφικά δεδομένα, η σχέση μεταξύ των παραγόντων που αναφέρθηκε επηρεάζεται από μεγάλο αριθμό ορμονών, αυξητικών παραγόντων (TGF- β , IGF-1, BMP2), κυτταροκινών (IL-1, IL-6, TNF- α , προσταγλανδίνες E2) και θεραπευτικών ουσιών που επηρεάζουν την έκφραση της σχέσεως OPG / RANKL και ως εκ τούτου την ομοιόσταση των οστών και την ρύθμιση του ασβεστίου. Όπως λοιπόν αναφέρθηκε και προηγουμένως η παρουσία και τα αυξημένα επίπεδα ορμονών και ειδικά στην μέση ηλικία των γυναικών επηρεάζουν σημαντικά την οστική αναδιαμόρφωση.[39, 40]

2.1.2. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ – ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Αρκετές μελέτες που έχουν διεξαχθεί έχουν αναζητήσει την σχέση αλληλεπίδρασης μεταξύ των περιβαλλοντικών παραγόντων και πολυμορφικών παραλλαγών σε υποψήφια γονίδια που σχετίζονται με την ομοιόσταση του ασβεστίου. Στο

μεγαλύτερο μέρος τους αυτές οι μελέτες έχουν μικρή ισχύ και αντικρουόμενα αποτελέσματα.

Η πιο ευρέως μελετημένη αλληλεπίδραση γονιδίων και περιβάλλοντος είναι μεταξύ των αλληλομόρφων VDR και του Ca ή της πρόσληψης της βιταμίνης D, η οποία κωδικοποιεί ένα πυρηνικό υποδοχέα της οικογένειας υποδοχέα στεροειδούς ορμόνης.[41] Μια πρώιμη μελέτη έχει δείξει ταχύτερους ρυθμούς απώλειας της οστικής πυκνότητας σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με γονοτυπικές αλλοιώσεις του VDR σε σχέση με τις γυναίκες χωρίς γονοτυπικές μεταβολές.[42]

Μια άλλη μελέτη έχει δείξει ότι η αλλαγή στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης σε σχέση με την ομαλή οστική πυκνότητα συνδέεται με την πρόσληψη Ca σε ηλικιωμένα άτομα που έχουν γονότυπο VDR «BB», αλλά όχι σε άλλους γονότυπους. [41]

Η μεγαλύτερη μελέτη που αφορά τα αλληλόμορφα VDR και την σχέση με την οστική μάζα, την απώλεια οστού και την πρόσληψη Ca είναι εκείνη των MacDonald et al. (2006) οι οποίοι βρήκαν λίγα στοιχεία για την αλληλεπίδραση μεταξύ της πρόσληψης Ca, των παραλλαγών στα γονίδια VDR, στην οστική μάζα ή στην απώλεια της. Ένας λειτουργικός πολυμορφισμός στη θέση 677 (C677T) στην τετραϋδροφυλλική αναγωγάσης έχει συσχετιστεί με BMD και κατάγματα σε διάφορες μελέτες.[43-46] Το αλληλόμορφο T έχει συνδεθεί με την οστεοπόρωση σε ορισμένες περιπτώσεις, ενώ σε άλλες το αλληλόμορφο C έχει συσχετισθεί με την οστεοπόρωση. [44]

Σε μια πρόσφατη ελληνική έκθεση, από την αλληλεπίδραση με το αλληλόμορφο VDR, έχει φανεί ότι οι Καυκάσιες γυναίκες, μετά την εμμηνόπαυση, με το έλασσον αλληλόμορφο A είχαν χαμηλότερη οστική πυκνότητα, όταν και η πρόσληψη του ασβεστίου ήταν χαμηλότερη (<680mg/dL). [47]

Εκτός από VDR, άλλα γονίδια έχουν επίσης δείξει ότι αλληλεπιδρούν με την πρόσληψη ασβεστίου για την οστική πυκνότητα. Ο πολυμορφισμός rs4988321 φάνηκε να συνδέεται με χαμηλότερη οστική μάζα, όταν και η πρόσληψη του

ασβεστίου είναι κάτω από 680mg/dL, ενώ στα άτομα με μεγαλύτερη διατροφική πρόσληψη δεν υπήρχαν διαφορές στην οστική πυκνότητα.[47]

Τέλος, το γονίδιο της ιντερλευκίνης έχει εμπλακεί σε αλληλεπιδράσεις με την πρόσληψη ασβεστίου και την οστική πυκνότητα. Όταν υπάρχει συγκεκριμένος πολυμορφισμός, εμφανίζεται χαμηλότερη οστική μάζα με χαμηλότερη πρόσληψη ασβεστίου. [48]

Μέχρι πρόσφατα, οι περισσότερες από τις μελέτες στον τομέα της οστεοπόρωσης είχαν μικρή ισχύ, γεγονός που οδηγεί σε αποτελέσματα που σπάνια μπορούν να αναπαραχθούν. Γι αυτό το λόγο, οι μελέτες μεγάλης κλίμακας θα πρέπει να αξιολογήσουν τον πραγματικό ρόλο των γενετικών πολυμορφισμών στην οστεοπόρωση και άλλες πολύπλοκες ασθένειες.

2.2. BITAMINH D

Η βιταμίνη D διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πρόσληψη του ασβεστίου από το σαρκοπλασματικό δίκτυο στους μύες και στη λειτουργία των β-κυττάρων για την έκκριση της ινσουλίνης. Το ενδοκρινικό σύστημα χαρακτηρίζεται από άμεση επίδραση με τον φωτισμό και την ηλιακή ακτινοβολία ειδικά στο επίπεδο της δράσης της βιταμίνης D. Η βιταμίνη D είναι κρίσιμη για τη διατήρηση της ομοιόστασης του ασβεστίου, καθώς για την διατήρηση ενός σταθερού υπο-μικρογραμμομοριακού επιπέδου ελεύθερου ενδοκυτταρικού ασβεστίου (ICa^{2+}). Το ασβέστιο με τη σειρά του παρουσιάζει μια αμοιβαία επίδραση στην παραγωγή της καλσιτριόλης, που είναι η βιολογικά δραστική μορφή της βιταμίνης D. Η βιταμίνη D διευθύνει την σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα της βιταμίνης D (VDR) και συμβάλλει στον να διευκολυνθεί η ρύθμιση του ασβεστίου, η αποθήκευση του ασβεστίου και η σηματοδότηση ασβεστίου εντός νευρωνικών και μυϊκών ιστών. Έχει προταθεί ότι μια τέτοια ρύθμιση είναι κρίσιμης σημασίας για την εξελικτική διαδικασία. Η ρύθμιση της βιταμίνης D μπορεί πράγματι να έχει μια σημαντική σύνδεση στη ρύθμιση του ασβεστίου και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον παράγοντα VDR που σχετίζεται με νιτρογενετικές ενώσεις. [49]

Η πρόσληψη της βιταμίνης D από τη διατροφή είναι περιορισμένη, γι αυτό και είναι δύσκολο να μελετηθεί, χωρίς να γίνει χορήγηση συμπληρωμάτων στο εξεταζόμενο δείγμα. Έχει πραγματοποιηθεί μια μελέτη, στην οποία χρησιμοποιήθηκαν συμπληρώματα διατροφής για τουλάχιστον 2 χρόνια σε ένα μικρό δείγμα ηλικιωμένων γυναικών. Από αυτή τη μελέτη, φάνηκε ότι ο γονότυπος ββ του πολυμορφισμού BsmI του VDR, ανταποκρινόταν λιγότερο ευνοικά από το B αλληλόμορφο στη θεραπεία. [50]

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΜΕΛΕΤΗ

1.1. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η οστεοπόρωση όπως προαναφέρθηκε αποτελεί μια νόσο που πλήττει όλο και περισσότερο ανθρώπους και κυρίως γυναίκες σε παγκόσμιο επίπεδο. Ανάμεσα στους ποικίλους παράγοντες κινδύνου, οι γενετικοί και διατροφικοί παράγοντες (διατροφική πρόσληψη βιταμίνης d – Ca) παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της νόσου. Οι πιο πρόσφατες έρευνες έχουν εστιάσει το ενδιαφέρον τους στην ανάδειξη γονιδίων και συγκεκριμένων πολυμορφισμών που επηρεάζουν την οστική δομή, καθώς και την αλληλεπίδραση τους με τη διατροφή.

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη αποτελεί μέρος της μελέτης OSTEOS II. Σκοπός της είναι η μελέτη της συσχέτισης που έχουν τα υποψήφια γονίδια στα χαρακτηριστικά της οστικής δομής, καθώς επίσης και η αλληλεπίδραση της βιταμίνης D και του ασβεστίου με τους πολυμορφισμούς που φαίνεται να επηρεάζουν τη διαμόρφωση της σκελετικής υγείας.

1.2. ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στη παρούσα επιδημιολογική μελέτη χρησιμοποιήθηκε δείγμα ατόμων μεγάλου ηλικιακού εύρους, Ελληνικής καταγωγής και χωρίς συγγένεια εξ' αίματος, ώστε ο πληθυσμός να είναι φυλετικά ομοιογενής. Το συνολικό δείγμα αποτελείται από ενήλικες, ηλικίας άνω των 18 ετών. Το εύρος του δείγματος επιλέχθηκε καθ' ότι η οστική πυκνότητα αλλά και οι παράγοντες κινδύνου που την επηρεάζουν μεταβάλλονται με την ηλικία. Με αυτό το τρόπο η συσχέτιση μεταξύ οστικής πυκνότητας και παραγόντων κινδύνου είναι ολοκληρωμένη.

Στις μελέτες παρατήρησης απαιτείται μεγάλος αριθμός ατόμων ώστε να επιτευχθεί υψηλή στατιστική δύναμη. Ο πληθυσμός της παρούσας μελέτης αποτελείται σχεδόν από 1000 άτομα.

Ο πληθυσμός στρατολογήθηκε σε διάφορους δήμους και κοινότητες της Ελλάδας με σκοπό την εκπροσώπηση περιοχών σε εθνικό επίπεδο. Ο Σύλλογος Υποστήριξης Ασθενών με Οστεοπόρωση οργάνωσε εκδηλώσεις ενημέρωσης και ευαισθητοποίησης του κοινού σχετικά με το πρόβλημα της οστεοπόρωσης στο νομό Αττικής και σε διάφορους νομούς της χώρας. Οι εκδηλώσεις αυτές έγιναν σε συνεργασία με τους αντίστοιχους Δήμους και Κοινότητες, η διάρκειά τους ήταν 2 ημέρες και η συμμετοχή ήταν ελεύθερη και δωρεάν. Ο πληθυσμός αυτός ενημερωνόταν για τους σκοπούς της μελέτης από τους αρμόδιους φορείς τοπικής αυτοδιοίκησης και οι ενδιαφερόμενοι δήλωναν την εθελοντική τους συμμετοχή.

1.3. ΣΥΛΛΟΓΗ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ

Η συλλογή των δεδομένων πραγματοποιήθηκε κατά τη διάρκεια των συνεντεύξεων από ειδικά εκπαιδευμένο προσωπικό και αφορούσαν τα ακόλουθα:

1.3.1. ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

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

1.3.2. ΙΑΤΡΙΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ

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

1.3.3. ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Για την αξιολόγηση της διατροφικής πρόσληψης και των διατροφικών συνηθειών χρησιμοποιήθηκαν ανακλήσεις 24ώρου και έγκυρα ερωτηματολόγια συχνότητας

κατανάλωσης τροφίμων (ΕΣΚΤ – ffq

). Οι μέθοδοι της ανάκλησης 24ώρου και του ΕΣΚΤ είναι οι πιο έγκυρες μέθοδοι αξιολόγησης της διατροφικής πρόσληψης και των διατροφικών συνηθειών για ομάδες πληθυσμού. Με την μέθοδο της ανάκλησης 24ώρου καταγράφηκαν πληροφορίες σχετικά με οποιοδήποτε τρόφιμο ή ποτό καταναλώθηκε τις προηγούμενες 24 ώρες. Η καταγραφή ήταν αναλυτική και περιελάμβανε το είδος του τροφίμου ή ποτού, τη ποσότητα, τον τρόπο μαγειρέματος και το εμπορικό όνομα αν επρόκειτο για συσκευασμένο προϊόν. Τα ΕΣΚΤ περιελάμβαναν μεγάλο αριθμό τροφίμων. Ο καθορισμός των μερίδων γινόταν είτε με φωτογραφίες 3 μερίδων είτε με τη χρήση εργαλείων εκτίμησης όπως πχ. 1 φλιτζάνι τσαγιού (250ml). Η συχνότητα κατανάλωσης κατηγοριοποιήθηκε σε ποτέ, σπάνια, 1-3 φορές το μήνα, 1-2 φορές την εβδομάδα, 3-4 φορές την εβδομάδα, 5-6 φορές την εβδομάδα, καθημερινά/φορές την ημέρα. Καταγράφηκε η συχνότητα κατανάλωσης πρωινού, μεσημεριανού γεύματος, δείπνου, παραδοσιακών φαγητών, φρέσκων ή μη φαγητών (1-2/εβδομ. ή 3-4/εβδομ. ή 5-6/εβδομ. ή καθημερινά) και snacks (0-6/ημέρα).

1.3.4. ΦΥΣΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

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

1.3.5. ΑΝΘΡΩΠΟΜΕΤΡΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

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

Το *ύψος* μετρήθηκε στο πλησιέστερο 0.5cm με σταθερό κατακόρυφο αναστημόμετρο. Μετρήθηκε από την κορυφή του κρανιακού θόλου μέχρι το επίπεδο των πελμάτων. Ο εξεταζόμενος τοποθετήθηκε στο αναστημόμετρο όρθιος, χωρίς παπούτσια και κάλτσες, με τις πτέρνες ενωμένες, τα γόνατα ίσια, τους ώμους χαλαρούς και τις παλάμες να ακουμπούν στους μηρούς. Οι πτέρνες, οι γλουτοί, το

θωρακικό κύρτωμα της σπονδυλικής στήλης και η οπίσθια επιφάνεια του κρανίου εφαπτόταν στον κατακόρυφο άξονα του οργάνου. Ζητήθηκε από τον εξεταζόμενο να τοποθετεί το κεφάλι του στη θέση Frankfort horizontal plane, δηλαδή σε θέση στην οποία η ευθεία γραμμή μεταξύ του χαμηλότερου σημείου του οφθαλμικού κόγχου και της χόνδρινης προβολής μπροστά από το εξωτερικό άνοιγμα του πτερυγίου του αυτιού να είναι οριζόντια. Σε αυτή τη θέση, ο εξεταζόμενο εισέπνευσε βαθιά ώστε να εκταθεί η σπονδυλική στήλη και λήφθηκε η μέτρηση.

Ο δείκτης μάζας σώματος υπολογίστηκε με τον τύπο:

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

1.3.6. ΟΣΤΙΚΗ ΔΟΜΗ

Η μέτρηση έγινε με τη μέθοδο ποσοτικής υπερηχοτομογραφίας (Quantitative Ultrasound, QUS) στο οπίσθιο τμήμα της πτέρνας. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε με τη τοποθέτηση του γυμνού δεξιού άκρου ποδός στην υποδοχή του μηχανήματος. Ο εξεταζόμενος ενημερώθηκε για τα αποτελέσματα της οστικής πυκνότητας και των υπόλοιπων οστικών παραμέτρων.

1.3.7. ΑΙΜΟΛΗΨΙΑ

Για να πραγματοποιηθεί αιμοληψία απαιτήθηκε 12ώρη νηστεία. Έγινε χωρίς εφαρμογή περίδεσης και από κάθε εξεταζόμενο ελήφθηκαν συνολικά 15mL φλεβικού αίματος, σε 2 φιαλίδια. Το πρώτο δείγμα περιείχε 5mL σε φιαλίδιο με αντιπηκτικό EDTA (Ethylene diamine tetra-acetic acid) και το δεύτερο 10mL σε φιαλίδιο χωρίς αντιπηκτικό. Το πρώτο δείγμα χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση DNA και αποθηκεύτηκε στους 4°C, έως ότου χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση DNA και το δεύτερο δείγμα χρησιμοποιήθηκε για άμεση απομόνωση ορού. Η απομόνωση ορού έγινε με φυγοκέντρηση του δείγματος στις 3000rpm για 10 λεπτά και ο ορός παραλήφθηκε με πιπέτα και αποθηκεύτηκε σε φιαλίδια στους -80°C.

1.3.8. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Για την απομόνωση DNA χρησιμοποιήθηκε συμπυκνωμένο παρασκεύασμα λευκοκυττάρων (buffy coat) το οποίο απομονώθηκε με την εξής διαδικασία: το δείγμα αίματος στα φιαλίδια με το αντιπηκτικό φυγοκεντρήθηκε στις 3000rpm για

10 λεπτά. Μετά την φυγοκέντρωση τα ερυθροκύτταρα καταβυθίστηκαν στον πυθμένα του φιαλιδίου ενώ το πλάσμα μεταφέρθηκε στο επάνω μέρος. Ενδιάμεσα από τα ερυθροκύτταρα και το πλάσμα υπήρχε μια λεπτή στοιβάδα η οποία περιείχε τα συμπυκνωμένα λευκά και τα αιμοπετάλια. Αυτή η στοιβάδα αποτελεί το buffy coat. Χρησιμοποιώντας αποστειρωμένη πιπέτα απομακρύνθηκε το πλάσμα έως και 1-2 χιλιοστά πάνω από την στοιβάδα του buffy coat και στη συνέχεια παραλήφθηκε το buffy coat μαζί με το υπόλοιπο πλάσμα και μία μικρή ποσότητα από τα ερυθροκύτταρα (1-2 χιλιοστά) και αποθηκεύτηκε σε φιαλίδιο στους -80°C έως ότου να χρησιμοποιηθεί για απομόνωση DNA.

1.3.9. ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

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

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

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

1.4. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΥ

Στην παρούσα μελέτη αποκλείονται οι ακόλουθες ομάδες:

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

2. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η ανάλυση και η επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 23. Οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση (Standard Deviation – SD), ενώ οι κατηγορικές μεταβλητές ως απόλυτες τιμές και ποσοστά. Ο έλεγχος των συσχετίσεων πραγματοποιήθηκε με μοντέλα απλής γραμμικής παλινδρόμησης, από τα οποία προέκυψαν τα Beta, SD, p-value για κάθε εξεταζόμενη μεταβλητή. Όλοι οι έλεγχοι πραγματοποιήθηκαν σε επίπεδο σημαντικότητας 95% και στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι τιμές με $p < 0,05$.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Το δείγμα της μελέτης αποτελούσαν 993 άτομα, από το οποίο το 87,67% αποτελούταν από το γυναικείο πληθυσμό. Το σύνολο των γυναικών ήταν 761. Μετά από την ικανοποίηση όλως των συνθηκών αποκλεισμού (μη λήψη οποιασδήποτε φαρμακευτικής αγωγής για οστεοπόρωση, έλλειψη βιταμίνης D ή ασβεστίου) στον πίνακα 1 παρουσιάζονται τα περιγραφικά χαρακτηριστικά του δείγματος.

Από το σύνολο του δείγματος, ο μέσος όρος ηλικίας ήταν 49.78 ± 13.26 έτη. Ο μέσος ΔΜΣ κυμαινόταν στα πλαίσια του υπέρβαρου με τιμή 27.55 ± 5.49 kg/m² και το επίπεδο φυσικής δραστηριότητας ήταν κατά μέσο όρο 1.39 ± 0.25 . Ο μέσος όρος της Ενεργειακής πρόσληψης του δείγματος ήταν 1811.68 ± 607.61 θερμίδες.

Σχετικά με τη διατροφική πρόσληψη του ασβεστίου, ο μέσος όρος που φαίνεται ότι προσλαμβάνει το δείγμα, με βάση το ffq (στο οποίο απάντησαν οι συμμετέχοντες) είναι 872.05 ± 353.66 mg την ημέρα, ενώ ο μέσος όρος στα επίπεδα στον ορό είναι $9,37 \pm 0,74$ mg/ημέρα. Για τη βιταμίνη D, ο μέσος όρος της διατροφικής πρόσληψης ήταν 6.98 ± 3.81 mg/ημέρα, ενώ στον ορό, ο μέσος όρος ήταν 19.97 ± 7.96 mg/ημέρα.

Αναφορικά με την εμμηνόπαυση στις γυναίκες, το 40,78% ήταν σε εμμηνόπαυση. Σχετικά με τον αριθμό των καταγμάτων τα οποία έχουν υποστεί οι συμμετέχοντες, μόλις το 17,8% του δείγματος απάντησε ότι είχε υποστεί κάποιο κάταγμα.

Το σύνολο των συμμετεχόντων εξετάστηκαν και ρωτήθηκαν σε διαφορετικούς μήνες και εποχές του χρόνου. Εξαιτίας της συσχέτισης που έχει βρεθεί ανάμεσα στην παραγωγή βιταμίνης D από τον οργανισμό και των εποχών του χρόνου, κυρίως λόγω της καλοκαιρινής αύξησης της πρόσληψης των ηλιακών ακτινών και κατ' επέκταση μεγαλύτερης παραγωγής βιταμίνης D, διερευνήθηκε σε ποιά περίοδο, πριν ή μετά το καλοκαίρι, εξετάστηκαν οι συμμετέχοντες. Έτσι, το 62,56% βρέθηκε ότι εξετάστηκε μετά το καλοκαίρι. Επιπλέον, βρέθηκε ότι ο μέσος όρος έκθεσης των συμμετεχόντων στον ήλιο κατά την χειμερινή περίοδο ήταν $4,972 \pm 5,32$ ώρες την

εβδομάδα, ενώ κατά την καλοκαιρινή περίοδο η έκθεση στον ήλιο έφτανε στις 12,3721±10,87 ώρες την εβδομάδα.

Πίνακας 1. ΠΕΡΙΓΡΑΦΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	ΔΕΙΓΜΑ ΜΕΛΕΤΗΣ	ΜΕΓΕΘΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ
ΗΛΙΚΙΑ(mean±SD, γ)	49.78 ± 13.26	845
ΦΥΛΟ(mean±SD, γυναίκες)	761 (87.67%)	856
ΔΜΣ(mean±SD,kg/m ²)	27.55 ± 5.49	788
Φυσική Δραστηριότητα (mean±SD)	1.39 ± 0.25	808
Ενεργειακή Πρόσληψη (mean±SD, kcal/day)	1811.68 ± 607.61	756
Πρόσληψη Ασβεστίου (mean±SD , mg/day)	872.05 ± 353.66	758
Πρόσληψη βιταμίνης D (mean±SD, mg/day)	6.98 ± 3.81	755
Πρόσληψη βιταμίνης D (mean±SD,IU /day)	200,5570±3,71	752
Ορός βιταμίνης D (mean±SD, ng/mL)	19.97 ± 7.96	848
Ορός ασβεστίου (mean±SD, mg/dL)	9.37 ± 0.74	831
Αλκαλική φωσφατάση (mean±SD, U/L)	61,1875±0,66952	628
Εποχικότητα (καλοκαίρι,%)	543 (62.56%)	868
Εμμηνόπαυση (ναι,%)	354 (40.78%)	730
Παρουσία κατάγματος (ναι,%)	150 (17.28%)	868
Έκθεση ήλιο χειμώνα (mean±SD, h/week)	4,972±5,3189	844
Έκθεση ήλιο καλοκαίρι(mean±SD, h/week)	12,3721±10,87197	789

2. ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ

Οι συσχετίσεις, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν αφορούσαν τόσο τη βιταμίνη D, όσο και το ασβέστιο.

❖ Βιταμίνη D

Αρχικά, ελέγχθηκε η συσχέτιση της διατροφικής πρόσληψης της βιταμίνης D με τις αντίστοιχες τιμές του ορού. Τα αποτελέσματα τα οποία προέκυψαν είναι τα ακόλουθα. Όπως φαίνεται, τα επίπεδα της βιταμίνης D ορού δεν έχουν καμία συσχέτιση με τις αντίστοιχες τιμές της διατροφικής πρόσληψης της βιταμίνης D. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι η κύρια πρόσληψη της βιταμίνης D είναι από την ηλιακή ακτινοβολία και όχι από τη διατροφική πρόσληψη και έτσι η τιμή του ορού να μην μπορεί να εξηγηθεί από την τιμή που υπάρχει από την πρόσληψη της διατροφής. Για κάθε μονάδα αύξησης της διατροφικής πρόσληψης της βιταμίνης D, η βιταμίνη στον ορό αυξάνεται κατά 0,03ng/mL, χωρίς όμως η τιμή αυτή να είναι στατιστικά σημαντικό ($p>0,05$).

Βιταμίνη D ορού		Rsquare=0
	B	P-value
Διατροφική πρόσληψη βιταμίνης D	0,030	0,680

Στη συνέχεια, ελέγχθηκε η συσχέτιση της βιταμίνης D του ορού παρουσία της εμμηνόπαυσης, το οποίο έδειξε ότι δεν υπάρχει συσχέτιση. Τα επίπεδα του ορού των συμμετεχόντων γυναικών δε φαίνεται να επηρεάστηκαν πριν και μετά την εμμηνόπαυση.

Βιταμίνη D ορού		Rsquare=0,001
	B	P-value
Εμμηνόπαυση	19,544	0,000
	0,372	0,521

Επιπλέον, συσχετίστηκε η βιταμίνη D, ανάλογα με την εποχικότητα (οι συμμετέχοντες που έκαναν βιοχημικές εξετάσεις πριν το καλοκαίρι και αυτοί που έκαναν μετά). Από αυτή τη συσχέτιση φάνηκε μια μικρή συσχέτιση (1%) η οποία είναι στατιστικά σημαντική ($p<0,05$). Μετά την καλοκαιρινή περίοδο, φαίνεται μια αύξηση 1,627ng/dL στη βιταμίνη D.

Βιταμίνη D ορού		Rsquare=0,010
	B	P-value
Εποχικότητα	17,312	0,000
	1,627	0,004

Ακόμη, συσχετίστηκε η βιταμίνη D του ορού με τις ώρες έκθεσης στον ήλιο κατά τη χειμερινή και την καλοκαιρινή περίοδο. Φάνηκε ότι υπάρχει μια μικρή συσχέτιση (1,6%), η οποία δείχνει ότι 1 ώρα έκθεσης στον ήλιο την εβδομάδα την καλοκαιρινή περίοδο αυξάνει τα επίπεδα της βιταμίνης D στον ορό κατά 0,091ng/mL ($p=0,000$). Κάτι αντίστοιχο δε βρέθηκε για την έκθεση στον ήλιο κατά τους χειμερινούς μήνες.

Βιταμίνη D ορού		Rsquare=0,001
	B	P-value
Έκθεση ήλιο χειμώνα	19,634	0,000
	0,050	0,331

Βιταμίνη D ορού		Rsquare=0,016
	B	P-value
Έκθεση ήλιο καλοκαίρι	18,861	0,000
	0,091	0,000

Ακόμη, ελέγχθηκε η συσχέτιση της βιταμίνης D ορού με τη βιταμίνη από τη διατροφική πρόσληψη, παρουσία τόσο της εμμηνόπαυσης, όσο και της εποχικότητας, αλλά δεν εμφανίστηκε καμία στατιστικά σημαντική σχέση.

Τέλος, ελέγχθηκε η συσχέτιση της βιταμίνης με την αλκαλική φωσφατάση. Υπάρχει μια μικρή συσχέτιση (1,2%), η οποία δείχνει ότι η αύξηση της αλκαλικής φωσφατάσης κατά 1U/L, μειώνει τα επίπεδα της βιταμίνης στον ορό κατά 0,049ng/mL ($p>0,05$).

Βιταμίνη D ορού		Rsquare=0,012
	B	P-value
Αλκαλική φωσφατάση	23,445	0,000
	-0,049	0,007

❖ **Ασβέστιο**

Αρχικά, ελέγχθηκε η συσχέτιση της διατροφικής πρόσληψης του ασβεστίου με τις αντίστοιχες τιμές του ορού, για την οποία δε βρέθηκε καμία απολύτως συσχέτιση.

Ασβέστιο ορού		Rsquare=0,000
	B	P-value
Διατροφική πρόσληψη ασβεστίου		0,757

Στη συνέχεια, ελέγχθηκε η συσχέτιση του ασβεστίου του ορού παρουσία της εμμηνόπαυσης, το οποίο έδειξε ότι δεν υπάρχει συσχέτιση. Τα επίπεδα του ορού

των συμμετεχόντων γυναικών δε φαίνεται να επηρεάστηκαν πριν και μετά την εμμηνόπαυση.

Ασβέστιο ορού		Rsquare=0,001
	B	P-value
	19,544	0,000
Εμμηνόπαυση	-0,036	0,538

Ακόμη, ελέγχθηκε η συσχέτιση του ασβεστίου ορού με το ασβέστιο από τη διατροφική πρόσληψη, παρουσία της εμμηνόπαυσης, αλλά δεν παρουσιάστηκε κάποια στατιστικά σημαντική σχέση.

Τέλος, συσχετίστηκε η αλκαλική φωσφατάση με τα επίπεδα του ασβεστίου στον ορό. Φάνηκε ότι υπάρχει μια μικρή συσχέτιση (2,4%), η οποία δείχνει ότι όταν αυξάνεται η αλκαλική φωσφατάση κατά 1U/L, αυξάνεται και το ασβέστιο του ορού κατά 0,005mg/dL.

Ασβέστιο ορού		Rsquare=0,024
	B	P-value
	8,888	0,000
Αλκαλική φωσφατάση	0,005	0,000

3. ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Από τη διαθέσιμη βιβλιογραφία έχουν βρεθεί μια σειρά από πολυμορφισμοί γονιδίων που φαίνεται να επηρεάζουν τα οστά. Γι αυτούς τους πολυμορφισμούς, παρατίθενται τα γονίδια στους οποίους ανήκουν, καθώς και οι λειτουργίες αυτών. Σκοπός είναι η μελέτη της ύπαρξης ή μη αλληλεπίδρασης των πολυμορφισμών αυτών με τη διατροφική πρόσληψη βιταμίνης D και ασβεστίου στην οστική δομή.

Πίνακας 2. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΠΡΟΣ ΕΞΕΤΑΣΗ

SNP	ΓΟΝΙΔΙΟ	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΓΟΝΙΔΙΟΥ
rs11520772	TAX1BP1	Κωδικοποίηση πρωτεΐνης.
rs2908007	WNT16	Κωδικοποίηση πρωτεΐνης. Σχετίζεται με οστεοπορωτικά κατάγματα.
rs2982552	ESR1	Κωδικοποιεί έναν υποδοχέα οιστρογόνου. Ρυθμίζει οστεοκλαστογένεση.
rs3000634	USPL1	Κωδικοποίηση πρωτεΐνης.
rs3020331	ESR1	Κωδικοποιεί έναν υποδοχέα οιστρογόνου. Ρυθμίζει οστεοκλαστογένεση.
rs597319	TMEM135	Κωδικοποίηση πρωτεΐνης.
rs7741021	RSPO3	Κωδικοποίηση πρωτεΐνης. Συσχετίζεται με την οστική πυκνότητα και τον κίνδυνο εμφάνισης κατάγματος.
rs9292469	NPR3	Κωδικοποίηση πρωτεΐνης. [51]

Αναφορικά με τα γονίδια που εξετάστηκαν και τα αλληλόμορφα κινδύνου που βρέθηκαν, στον πίνακα εμφανίζονται τα ακόλουθα ποσοστά. Να σημειωθεί ότι από όλες τις ομάδες των γονιδίων που εξετάστηκαν για αλληλόμορφα κινδύνου υπήρχαν χαμένες τιμές (missing values).

Πίνακας 3. ΠΟΣΟΣΤΑ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ

ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ (αλληλόμορφο 1, αλληλόμορφο 2)	ΑΡΙΘΜΟΣ (ΠΟΣΟΣΤΟ)	ΣΥΝΟΛΟ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ
rs11520772 (1, 2)	184 (21.2%), 53 (6.11%)	579
rs2908007 (1, 2)	227 (26.15%), 87 (10.02%)	465
rs2982552 (1, 2)	200 (23.04%), 89 (10.25%)	464
rs3000634 (1, 2)	114 (13.13%), 10 (1.15%)	462
rs3020331 (1, 2)	218 (25.12%), 83 (9.56%)	462
rs597319 (1, 2)	209 (24.08%), 60 (6.91%)	460
rs7741021 (1, 2)	211 (24.31%), 80 (9.22%)	452
rs9292469 (1, 2)	197 (22.7%), 60 (6.91%)	408

Αρχικά, ελέγχθηκε η επίδραση κάθε πολυμορφισμού στα επίπεδα της βιταμίνης D, τα αποτελέσματα των οποίων εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα. Κανένας πολυμορφισμός δε βρέθηκε να έχει στατιστικά σημαντική επίδραση στα επίπεδα βιταμίνης D ορού.

Πίνακας 4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΗ ΒΙΤΑΜΙΝΗ D (διόρθωση ως προς τους συγχρητικούς παράγοντες)

	Διόρθωση ως προς:								
	Ηλικία, φύλο			Ηλικία, φύλο, Διατρ. πρόσληψη βιτ. D, Διατρ. Πρόσληψη ασβεστίου			Ηλικία, φύλο, Διατρ. πρόσληψη βιτ. D, Διατρ. Πρόσληψη ασβεστίου, ΦΔ		
	Beta	S.E.	pvalue	Beta	S.E.	pvalue	Beta	S.E.	pvalue
rs11520772	-0,628	0,560	0,262	-0,613	0,561	0,275	-0,612	0,562	0,277
rs2908007	-0,455	0,583	0,435	-0,375	0,585	0,522	-0,375	0,586	0,523
rs2982552	-0,203	0,563	0,719	-0,187	0,565	0,741	-0,192	0,567	0,735
rs3000634	-0,247	0,816	0,763	-0,275	-0,819	0,737	-0,278	0,820	0,735
rs3020331	-0,006	0,581	0,992	-0,036	0,584	0,951	-0,030	0,587	0,960
rs597319	-0,161	0,602	0,789	-0,164	0,603	0,786	-0,155	0,607	0,799
rs7741021	0,305	0,579	0,598	0,352	0,583	0,546	0,355	0,584	0,544
rs9292469	0,113	0,655	0,863	0,144	0,658	0,827	0,140	0,660	0,832

Στη συνέχεια, ελέγχθηκε η επίδραση κάθε πολυμορφισμού στα επίπεδα του ασβεστίου στον ορό. Από τους 8 πολυμορφισμούς, κανένας δε βρέθηκε να έχει στατιστικά σημαντική επίδραση, εκτός από το rs11520772, ο οποίος φάνηκε να έχει μια τάση να επηρεάζει τα επίπεδα του ασβεστίου στον ορό, έπειτα από προσαρμογή των αποτελεσμάτων για την ηλικία, το φύλο, τη διατροφική πρόσληψη ασβεστίου, τη διατροφική πρόσληψη βιταμίνης D και τη Φυσική Δραστηριότητα. Παρουσία του πολυμορφισμού, φάνηκε να υπάρχει μια αύξηση στα επίπεδα του ορού κατά 0,175mg/dL(p=0,005). Προσθέτοντας τη διατροφική πρόσληψη ασβεστίου και βιταμίνης D στους συγχρητικούς παράγοντες, υπάρχει αύξηση στα επίπεδα του ορού κατά 0.171mg/dL(p=0,005). Τέλος, όταν προστεθεί και η φυσική δραστηριότητα στους συγχρητικούς παράγοντες, υπάρχει ακόμη στατιστική σημαντικότητα(p=0,006).

Πίνακας 5. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΟ ΑΣΒΕΣΤΙΟ (διόρθωση ως προς τους συγχρητικούς παράγοντες)

	Διόρθωση ως προς:								
	Ηλικία, φύλο			Ηλικία, φύλο, Διατρ. πρόσληψη βιτ. D, Διατρ. Πρόσληψη ασβεστίου			Ηλικία, φύλο, Διατρ. πρόσληψη βιτ. D, Διατρ. Πρόσληψη ασβεστίου, ΦΔ		
	Beta	S.E.	pvalue	Beta	S.E.	pvalue	Beta	S.E.	pvalue
rs11520772	0,175	0,061	0,005	0,171	0,061	0,005	0,169	0,061	0,006
rs2908007	0,002	0,067	0,980	-0,002	0,067	0,980	-0,001	0,067	0,990
rs2982552	-0,015	0,065	0,820	-0,015	0,064	0,816	-0,018	0,64	0,779
rs3000634	0,074	0,094	0,433	0,089	0,094	0,344	0,087	0,094	0,355
rs3020331	-0,084	0,067	0,214	-0,080	0,067	0,234	-0,076	0,067	0,260
rs597319	0,074	0,070	0,287	0,075	0,069	0,281	0,081	0,070	0,244
rs7741021	0,038	0,067	0,567	0,014	0,067	0,835	0,016	0,067	0,816
rs9292469	-0,071	0,076	0,349	-0,085	0,076	0,265	-0,079	0,076	0,99

Τέλος, ελέγχθηκε η επίδραση κάθε πολυμορφισμού στα επίπεδα stiffness index. Από τους 8 πολυμορφισμούς, ο rs597319, φάνηκε να έχει μια τάση να επηρεάζει τα επίπεδα του stiffness index, έπειτα από προσαρμογή των αποτελεσμάτων για την ηλικία, το φύλο, τη διατροφική πρόσληψη ασβεστίου, τη διατροφική πρόσληψη βιταμίνης D και τη Φυσική Δραστηριότητα. Παρουσία του πολυμορφισμού, φάνηκε να υπάρχει μια μείωση του stiffness index κατά 4,690($p=0,001$). Προσθέτοντας τη διατροφική πρόσληψη ασβεστίου και βιταμίνης D στους συγχητικούς παράγοντες, υπάρχει μείωση 4,660($p=0,001$). Τέλος, όταν προστεθεί και η φυσική δραστηριότητα στους συγχητικούς παράγοντες, φαίνεται να μειώνεται κατά 4,714 ο stiffness index($p=0,001$).

Επιλέον, ο rs2982552 φαίνεται να επηρεάζει τα επίπεδα του stiffness index. Παρουσιάζεται μια μείωση 2,500, η οποία όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική($p=0,065$). Όταν προστίθεται η διατροφική πρόσληψη ασβεστίου και βιταμίνης D στους συγχητικούς παράγοντες, υπάρχει μείωση 2,682, η οποία είναι στατιστικά σημαντική($p=0,047$). Τέλος, όταν προστεθεί και η φυσική δραστηριότητα στους συγχητικούς παράγοντες, φαίνεται να μειώνεται κατά 2,668 ο stiffness index($p=0,049$).

Πίνακας 6. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΟ STIFFNESS INDEX (διόρθωση ως προς τους συγχητικούς παράγοντες)

	Διόρθωση ως προς:								
	Ηλικία, φύλο			Ηλικία, φύλο, Διατρ.πρόσληψη βιτ.D, Διατρ. Πρόσληψη ασβεστίου			Ηλικία, φύλο, Διατρ.πρόσληψη βιτ.D, Διατρ. Πρόσληψη ασβεστίου, ΦΔ		
	Beta	S.E.	pvalue	Beta	S.E.	pvalue	Beta	S.E.	pvalue
rs11520772	-2,034	1,359	0,135	-2,049	1,354	0,131	-2,046	1,359	0,133
rs2908007	1,471	1,427	0,303	1,515	1,424	0,288	1,502	1,427	0,294
rs2982552	-2,500	1,348	0,065	-2,682	1,344	0,047	-2,668	1,349	0,049
rs3000634	1,177	1,938	0,544	1,559	1,937	0,422	1,556	1,940	0,423
rs3020331	0,302	1,363	0,824	0,476	1,360	0,727	0,456	1,364	0,738
rs597319	-4,690	1,367	0,001	-4,660	1,363	0,001	-4,714	1,369	0,001
rs7741021	1,129	1,356	0,406	0,949	1,358	0,485	0,967	1,363	0,479
rs9292469	0,969	1,500	0,519	0,735	1,487	0,621	0,791	1,494	0,597

Για το πολυμορφισμό rs11520772, που βρέθηκε να έχει μια τάση να επηρεάζει τα επίπεδα του ασβεστίου στον ορό, ελέγχθηκε αν υπάρχει συσχέτιση και με τα επίπεδα SOS, BUA. Βρέθηκε, λοιπόν, ότι ο πολυμορφισμός rs11520772 έχει μια τάση να επηρεάζει τα επίπεδα του SOS, έπειτα από προσαρμογή των αποτελεσμάτων για την ηλικία, το φύλο, τη διατροφική πρόσληψη ασβεστίου, τη

διατροφική πρόσληψη βιταμίνης D και τη Φυσική Δραστηριότητα. Παρουσία του πολυμορφισμού, φάνηκε να υπάρχει μια μείωση του SOS κατά 26,59m/s ($p=0,007$). Προσθέτοντας τη διατροφική πρόσληψη ασβεστίου και βιταμίνης D στους συγχητικούς παράγοντες, υπάρχει μείωση 26,93m/s ($p=0,006$). Τέλος, όταν προστεθεί και η φυσική δραστηριότητα στους συγχητικούς παράγοντες, μειώνεται λίγο η στατιστική σημαντικότητα ($p=0,01$).

Για τους πολυμορφισμούς rs2982552 και rs597319 ελέγχθηκε η συσχέτιση με τα επίπεδα SOS, BUA και δε βρέθηκε κάποια στατιστικά σημαντική σχέση ($p>0,05$).

Πίνακας 7. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΟ SOS (διόρθωση ως προς τους συγχητικούς παράγοντες)

Διόρθωση ως προς:

	Ηλικία, φύλο			Ηλικία, φύλο, Διατρ.πρόσληψη βιτ.D, Διατρ. Πρόσληψη ασβεστίου			Ηλικία, φύλο, Διατρ.πρόσληψη βιτ.D, Διατρ. Πρόσληψη ασβεστίου, ΦΔ		
	Beta	S.E.	pvalue	Beta	S.E.	pvalue	Beta	S.E.	pvalue
rs11520772	-26,59	9,765	0,007	-26,93	9,804	0,006	-25,31	9,772	0,010
rs2982552	-20,51	11,691	0,081	-21,00	11,759	0,075	-20,52	11,639	0,079
rs597319	-9,716	12,471	0,437	-9,446	12,531	0,452	-10,777	12,410	0,386

Πίνακας 8. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΟ BUA (διόρθωση ως προς τους συγχητικούς παράγοντες)

Διόρθωση ως προς:

	Ηλικία, φύλο			Ηλικία, φύλο, Διατρ.πρόσληψη βιτ.D, Διατρ. Πρόσληψη ασβεστίου			Ηλικία, φύλο, Διατρ.πρόσληψη βιτ.D, Διατρ. Πρόσληψη ασβεστίου, ΦΔ		
	Beta	S.E.	pvalue	Beta	S.E.	pvalue	Beta	S.E.	pvalue
rs11520772	-1,508	1,271	0,236	-1,593	1,273	0,212	-1,529	1,281	0,234
rs2982552	-2,233	-1,381	0,107	-2,385	1,383	0,086	-2,363	1,383	0,089
rs597319	-2,605	1,440	0,072	-2,504	1,440	0,083	-2,564	1,442	0,077

Τέλος, ελέγχθηκε η επίδραση των πολυμορφισμών, που φαίνονται να επηρεάζουν τα οστά με την αλκαλική φωσφατάση, που αποτελεί ένα δείκτη οστικού σχηματισμού των οστών. Ο πολυμορφισμός rs11520772 δεν φαίνεται να επηρεάζει τα επίπεδα της αλκαλικής φωσφατάσης.

Όμως, ο πολυμορφισμός rs2982552 έχει μια τάση να επηρεάζει τα επίπεδα της αλκαλικής φωσφατάσης, έπειτα από προσαρμογή των αποτελεσμάτων για την ηλικία, το φύλο, τη διατροφική πρόσληψη ασβεστίου, τη διατροφική πρόσληψη βιταμίνης D και τη Φυσική Δραστηριότητα. Παρουσία του πολυμορφισμού, φάνηκε να υπάρχει μια μείωση της αλκαλικής φωσφατάσης κατά 3,372U/L. ($p=0,020$). Προσθέτοντας τη διατροφική πρόσληψη ασβεστίου και βιταμίνης D στους συγχητικούς παράγοντες, υπάρχει μείωση 3,655U/L ($p=0,013$). Τέλος, όταν

προστεθεί και η φυσική δραστηριότητα στους συγχετιτικούς παράγοντες δεν επηρεάζεται η αλκαλική φωσφατάση.

Για τον πολυμορφισμό rs597319, υπάρχει επίσης συσχέτιση με την αλκαλική φωσφατάση. Παρουσία του πολυμορφισμού, φάνηκε να υπάρχει μια μείωση της αλκαλικής φωσφατάσης κατά 3,682 U/L. ($p=0,023$). Προσθέτοντας τη διατροφική πρόσληψη ασβεστίου και βιταμίνης D στους συγχετιτικούς παράγοντες, υπάρχει μείωση 3,671U/L ($p=0,024$). Τέλος, όταν προστεθεί και η φυσική δραστηριότητα στους συγχετιτικούς παράγοντες η μείωση είναι 3,551U/L ($p=0,031$).

Πίνακας 9: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΗΝ ΑΛΚΑΛΙΚΗ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ (διόρθωση ως προς τους συγχετιτικούς παράγοντες)

Διόρθωση ως προς:

	Ηλικία, φύλο			Ηλικία, φύλο, Διατρ.πρόσληψη βιτ.D, Διατρ. Πρόσληψη ασβεστίου			Ηλικία, φύλο, Διατρ.πρόσληψη βιτ.D, Διατρ. Πρόσληψη ασβεστίου, ΦΔ		
	Beta	S.E.	pvalue	Beta	S.E.	pvalue	Beta	S.E.	Pvalue
rs11520772	-0,913	1,360	0,503	-0,921	1,363	0,500	-0,903	1,367	0,510
rs2982552	-3,372	1,442	0,020	-3,655	1,452	0,013	-3,655	1,451	0,013
rs597319	-3,682	1,609	0,023	-3,671	1,611	0,024	-3,511	1,620	0,031

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στις μέρες μας, έχει αποδειχθεί ότι οι γενετικοί και οι διατροφικοί παράγοντες αποτελούν σημαντικούς παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση οστεοπόρωσης. Όλο και περισσότερες μελέτες αναδεικνύουν γονίδια και συγκεκριμένους πολυμορφισμούς που επηρεάζουν την οστική δομή ή συσχετίζονται με διατροφικούς παράγοντες, όπως είναι το ασβέστιο και η βιταμίνη D.

Η παρούσα εργασία είχε σκοπό να μελετηθούν οι πολυμορφισμοί γονιδίων που έχουν φανεί ότι επηρεάζουν την οστική δομή και να φανούν ποιοι συγκεκριμένα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στους διατροφικούς παράγοντες που μελετήσαμε, καθώς και στους δείκτες οστικής πυκνότητας.

Το δείγμα της μελέτης αποτελούσαν 993 άτομα, από τα οποία τα 761 ήταν γυναίκες. Για τη βιταμίνη D, η ημερήσια διατροφική πρόσληψη θεωρείται ανεπαρκής, αφού με βάση τις πληροφορίες από το ffq, η πρόσληψη είναι κατά μέσο 200IU/day, ενώ οι συστάσεις αναφέρουν για υγιή πληθυσμό το λιγότερο 600-800IU/day. Κάτι αντίστοιχο φαίνεται και από τις τιμές στον ορό, που ο μέσος όρος είναι κοντά στα 20ng/mL, το οποίο θεωρείται αρκετά χαμηλό.[28] Βάση του πληθυσμού που μελετήθηκε, μόλις το 11,9% είχε επίπεδα στον ορό άνω του 30ng/mL, ενώ το 44,8% του πληθυσμού είχε επίπεδα μεταξύ 10,01-19,9ng/mL, το οποίο είναι και αυτό χαμηλό. Φαίνεται, δηλαδή, μια ανεπάρκεια βιταμίνης D στον πληθυσμό που μελετήθηκε.

Αναφορικά με την αλκαλική φωσφατάση, που αποτελεί ένα δείκτη οστικού σχηματισμού, ο μέσος όρος τιμής του ορού των συμμετεχόντων είναι $61,1875 \pm 0,66952$ U/L, τιμή η οποία είναι σε φυσιολογικά πλαίσια. Αυξημένη τιμή >100 U/L παρουσιάζει μόλις το 3% των συμμετεχόντων, τιμή η οποία παρατηρείται σε παθήσεις των οστών.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα επίπεδα της βιταμίνης D ορού δεν έχουν καμία συσχέτιση με τις αντίστοιχες τιμές της διατροφική πρόσληψης της βιταμίνης D. Αυτό, όπως προαναφέρθηκε, εξηγείται από το γεγονός ότι η κύρια πρόσληψη της βιταμίνης D είναι από την ηλιακή ακτινοβολία και όχι από τη διατροφή.[28]

Επιπλέον, φάνηκε ότι η παρουσία της εμμηνόπαυσης δεν συσχετίζεται με τα επίπεδα της βιταμίνης D. Ο μέσος όρος των ωρών έκθεσης στον ηλιό κατά τη χειμερινή περίοδο ήταν 4,972 ώρες την εβδομάδα και το καλοκαίρι, ο μέσος όρος έφτανε στις 12,372 ώρες την εβδομάδα, οι οποίες φαίνονται ικανοποιητικές, ώστε να μην εμφανίζεται ανεπάρκεια της βιταμίνης παρουσία της εμμηνόπαυσης. Παρ'όλα αυτά, μπορεί να έχει γίνει κάποια υποκαταγραφή από τους συμμετέχοντες, καθώς

τα επίπεδα της βιταμίνης D στον ορό είναι αρκετά χαμηλά για τόσο μεγάλη έκθεση στον ήλιο κατά τους καλοκαιρινούς μήνες.

Ακόμη, συσχετίστηκε η βιταμίνη D, ανάλογα με την εποχικότητα, δηλαδή τους συμμετέχοντες που έκαναν τις βιοχημικές εξετάσεις πριν το καλοκαίρι, καθώς και αυτούς που έκαναν τις εξετάσεις μετά. Βρέθηκε μια στατιστικά σημαντική σχέση, η οποία είναι λογική καθώς τους καλοκαιρινούς μήνες, υπάρχει μεγαλύτερη έκθεση στον ήλιο, άρα και η βιταμίνη D είναι πιο αυξημένη. Παρόλ' αυτά, ίσως να περιμέναμε να υπήρχε μια ακόμη πιο ισχυρή συσχέτιση, η οποία δε βρέθηκε.

Τέλος, για τη βιταμίνη D ορού βρέθηκε συσχέτιση με τις ώρες έκθεσης στον ήλιο κατά την καλοκαιρινή περίοδο, η οποία όπως έχει ξανααναφερθεί οφείλεται στη σχέση βιταμίνης D με την ηλιακή ακτινοβολία. Όμως, δε βρέθηκε κάποια σχέση με τις ώρες έκθεσης στον ήλιο κατά τη χειμερινή περίοδο.

Αναφορικά με το ασβέστιο, βρέθηκε ότι ο μέσος όρος διατροφικής πρόσληψης ασβεστίου των συμμετεχόντων είναι κάτω από το φυσιολογικό (1000mg/day για ενήλικες και 1500mg/day για μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες). [52] Παρόλ' αυτά τα επίπεδα στον ορό είναι σε φυσιολογικά πλαίσια, το οποίο μπορεί να εξηγείται από τη μη ακριβή συμπλήρωση του ερωτηματολογίου ffq.

Μελετώντας τώρα το κομμάτι της αλληλεπίδρασης των πολυμορφισμών με τους διατροφικούς παράγοντες, βρέθηκε αρχικά ότι κανένας πολυμορφισμός δε φαίνεται να σχετίζεται στατιστικά σημαντικά με τα επίπεδα της βιταμίνης D του ορού.

Τάση για συσχέτιση με τα επίπεδα του ασβεστίου στον ορό φάνηκε να έχει το SNP rs11520772, του γενετικού τόπου TAX1BP1, έπειτα από προσαρμογή των αποτελεσμάτων για την ηλικία, το φύλο, τη διατροφική πρόσληψη ασβεστίου, τη διατροφική πρόσληψη βιταμίνης D και τη Φυσική Δραστηριότητα. Παρουσία του πολυμορφισμού, υπάρχει μια αύξηση στα επίπεδα του ασβεστίου κατά 0,169mg/dL. Για το ίδιο SNP, δεν έχει βρεθεί κάποια άλλη συσχέτιση βάση βιβλιογραφίας με τα δεδομένα που μελετάμε.

Ο ίδιος πολυμορφισμός φάνηκε να επηρεάζει τα επίπεδα SOS , έπειτα από προσαρμογή των αποτελεσμάτων για την ηλικία, το φύλο, τη διατροφική πρόσληψη ασβεστίου, τη διατροφική πρόσληψη βιταμίνης D και τη Φυσική Δραστηριότητα. Παρουσία του πολυμορφισμού, φάνηκε να υπάρχει μια μείωση του SOS κατά 26,93, ενώ όταν γίνεται προσθήκη της φυσικής δραστηριότητας στους συγχρητικούς παράγοντες, μειώνεται αισθητά η στατιστική σημαντικότητα. Ενώ εδώ βλέπουμε μια αλληλεπίδραση, σε μια μεταανάλυση συσχέτισης του πολυμορφισμού με τα επίπεδα BUA,VOS, DXA BMD, δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική σχέση, γι αυτό και

πρέπει να διερευνηθεί ακόμη περισσότερο αυτός ο πολυμορφισμός, με τη σχέση που έχει με την οστική δομή. [53]

Επιπλέον, βρέθηκε ο πολυμορφισμός rs597319 του γενετικού τόπου TMEM135 να επηρεάζει τα επίπεδα του stiffness index, έπειτα από προσαρμογή των αποτελεσμάτων για την ηλικία, το φύλο, τη διατροφική πρόσληψη ασβεστίου, τη διατροφική πρόσληψη βιταμίνης D και τη Φυσική Δραστηριότητα. Παρουσία του πολυμορφισμού, εμφανίζεται μείωση του stiffness index κατά 4,714. Για τον ίδιο πολυμορφισμό, δε βρέθηκε συσχέτιση με τα επίπεδα BUA, SOS. Όμως, βρέθηκε συσχέτιση με τα επίπεδα αλκαλικής φωσφατάσης στον ορό, η οποία είναι στατιστικά σημαντική και δείχνει ότι η αλληλεπίδραση του πολυμορφισμού αυτού με τους διατροφικούς παράγοντες επηρεάζει ένα δείκτη οστικού σχηματισμού. Στην ίδια μεταανάλυση συσχέτισης, που αναφέρθηκε προηγουμένως, ο πολυμορφισμός αυτός έχει στατιστικά σημαντική σχέση με τα επίπεδα BUA, VOS, DXA BMD και αναφέρεται η σχέση του με τις ιδιότητες των οστών. [53]

Τέλος, το SNP rs2982552 του γενετικού τόπου ESR1 φαίνεται να επηρεάζει τα επίπεδα του stiffness index. Μετά από προσθήκη των συγχρητικών παραγόντων, ο πολυμορφισμός μειώνει τα επίπεδα του stiffness index κατά 2,688. Για τον ίδιο πολυμορφισμό, δε βρέθηκε συσχέτιση με τα επίπεδα BUA, SOS. Βρέθηκε συσχέτιση με τα επίπεδα αλκαλικής φωσφατάσης. Παρουσία του πολυμορφισμού, παρουσιάζεται μείωση της αλκαλικής φωσφατάσης κατά 3,655U/L. Το γονίδιο ESR1 έχει μελετηθεί αρκετά σε έρευνες και φαίνεται να σχετίζεται με την οστική δομή.

Από τα παραπάνω, βρέθηκε ότι τα γονίδια και συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί αλληλεπιδρούν με διατροφικούς παράγοντες και επηρεάζουν την οστική δομή. Βέβαια, πρόκειται για ευρήματα, τα οποία πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω για να υπάρχει μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα.

Αναφορικά με την παρούσα εργασία, θα μπορούσαμε να έχουμε πιο καλά αποτελέσματα αν το δείγμα ήταν ακόμη μεγαλύτερο και περιελάμβανε πληθυσμό και από άλλες χώρες, για να μπορέσουν να βγουν αποτελέσματα που να αφορούν μεγαλύτερο εύρος ατόμων/πληθυσμού. Επιπλέον, οι μετρήσεις για την οστική πυκνότητα θα ήταν πιο αξιόπιστες αν περιελάμβαναν τη μέθοδο DXA, καθώς θα βγάζαμε αποτελέσματα για εμφάνιση ή μη οστεοπόρωσης στους συμμετέχοντες της μελέτης.

E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Green, J. and C.R. Kleeman, *The role of bone in the regulation of systemic acid-base balance*. Contrib Nephrol, 1991. **91**: p. 61-76.
2. Arnett, T., *Regulation of bone cell function by acid-base balance*. Proc Nutr Soc, 2003. **62**(2): p. 511-20.
3. Bab, I.A. and T.A. Einhorn, *Polypeptide factors regulating osteogenesis and bone marrow repair*. J Cell Biochem, 1994. **55**(3): p. 358-65.
4. LJ., D., *Κλινικά Στοιχεία Φυσιολογίας και Διαταραχών του Μεταβολισμού του Ασβεστίου και των Οστών*, ed. E. Πασχαλίδης. 2001.
5. ΓΠ, Λ., *Μεταβολικά Νοσήματα των Οστών*. 2007.
6. Γιάννης, Μ., *Διατροφική Αξιολόγηση: Διατροφολογικό & Ιατρικό Ιστορικό, Σωματομετρικοί, Κλινικοί & Βιοχημικοί Δείκτες*, ed. Ι.Ε.Π.Χ. Πασχαλίδης. 2006.
7. Κοντογιάννη Μ., Τ.Α., *Διατροφή και Σκελετική Υγεία*. 2009, Αθήνα.
8. Medeiros, M., et al., *Vitamin D and its relation with ionic calcium, parathyroid hormone, maternal and neonatal characteristics in pregnancy after roux-en-Y gastric bypass*. Arch Gynecol Obstet, 2015.
9. Γιάννης, Μ., *Διατροφική αγωγή*. 2007: Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης.
10. Harris, W.H. and R.P. Heaney, *Skeletal renewal and metabolic bone disease*. N Engl J Med, 1969. **280**(6): p. 303-11 concl.
11. Shils M, S.M., Olson J, Ross AC, *Modern Nutrition in Health and Disease*. Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
12. Baron, R., *Anatomy and Ultrastructure of Bone - Histogenesis, Growth and Remodeling*, in *Endotext*, L.J. De Groot, et al., Editors. 2000: South Dartmouth (MA).
13. Coleman, R.E., *Metastatic bone disease: clinical features, pathophysiology and treatment strategies*. Cancer Treat Rev, 2001. **27**(3): p. 165-76.
14. Kanis, J.A., et al., *A reference standard for the description of osteoporosis*. Bone, 2008. **42**(3): p. 467-75.
15. Cummings, S.R. and L.J. Melton, *Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures*. Lancet, 2002. **359**(9319): p. 1761-7.
16. Miller, P.D., *Management of osteoporosis*. Dis Mon, 1999. **45**(2): p. 21-54.
17. Johnell, O., et al., *Mortality after osteoporotic fractures*. Osteoporos Int, 2004. **15**(1): p. 38-42.
18. Miyakoshi, N., et al., *Impact of postural deformities and spinal mobility on quality of life in postmenopausal osteoporosis*. Osteoporos Int, 2003. **14**(12): p. 1007-12.
19. Mannion, A.F., et al., *Muscle fibre size and type distribution in thoracic and lumbar regions of erector spinae in healthy subjects without low back pain: normal values and sex differences*. J Anat, 1997. **190** (Pt 4): p. 505-13.
20. Melton, L.J., 3rd, et al., *Cost-equivalence of different osteoporotic fractures*. Osteoporos Int, 2003. **14**(5): p. 383-8.
21. Yeh, O.C. and T.M. Keaveny, *Relative roles of microdamage and microfracture in the mechanical behavior of trabecular bone*. J Orthop Res, 2001. **19**(6): p. 1001-7.

22. Oleksik, A., et al., *Health-related quality of life in postmenopausal women with low BMD with or without prevalent vertebral fractures*. J Bone Miner Res, 2000. **15**(7): p. 1384-92.
23. Woodson, G.C., *Risk factors for osteoporosis in postmenopausal African-American women*. Curr Med Res Opin, 2004. **20**(10): p. 1681-7.
24. Albrand, G., et al., *Independent predictors of all osteoporosis-related fractures in healthy postmenopausal women: the OFELY study*. Bone, 2003. **32**(1): p. 78-85.
25. Borer, K.T., *Physical activity in the prevention and amelioration of osteoporosis in women : interaction of mechanical, hormonal and dietary factors*. Sports Med, 2005. **35**(9): p. 779-830.
26. Law, M.R. and A.K. Hackshaw, *A meta-analysis of cigarette smoking, bone mineral density and risk of hip fracture: recognition of a major effect*. BMJ, 1997. **315**(7112): p. 841-6.
27. Manios, Y., et al., *Changes in biochemical indexes of bone metabolism and bone mineral density after a 12-mo dietary intervention program: the Postmenopausal Health Study*. Am J Clin Nutr, 2007. **86**(3): p. 781-9.
28. Kennel, K.A., M.T. Drake, and D.L. Hurley, *Vitamin D deficiency in adults: when to test and how to treat*. Mayo Clin Proc, 2010. **85**(8): p. 752-7; quiz 757-8.
29. Styrkarsdottir, U., et al., *Linkage of osteoporosis to chromosome 20p12 and association to BMP2*. PLoS Biol, 2003. **1**(3): p. E69.
30. Peacock, M., et al., *Sex-specific and non-sex-specific quantitative trait loci contribute to normal variation in bone mineral density in men*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(5): p. 3060-6.
31. Ralston, S.H., et al., *Loci for regulation of bone mineral density in men and women identified by genome wide linkage scan: the FAMOS study*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(7): p. 943-51.
32. Karasik, D., et al., *Age, gender, and body mass effects on quantitative trait loci for bone mineral density: the Framingham Study*. Bone, 2003. **33**(3): p. 308-16.
33. Kammerer, C.M., et al., *Quantitative trait loci on chromosomes 2p, 4p, and 13q influence bone mineral density of the forearm and hip in Mexican Americans*. J Bone Miner Res, 2003. **18**(12): p. 2245-52.
34. Cummings, S.R., et al., *Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis*. N Engl J Med, 2009. **361**(8): p. 756-65.
35. Styrkarsdottir, U., et al., *New sequence variants associated with bone mineral density*. Nat Genet, 2009. **41**(1): p. 15-7.
36. Richards, J.B., et al., *Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study*. Lancet, 2008. **371**(9623): p. 1505-12.
37. Ioannidis, J.P., et al., *Differential genetic effects of ESR1 gene polymorphisms on osteoporosis outcomes*. JAMA, 2004. **292**(17): p. 2105-14.
38. Little, R.D., et al., *A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait*. Am J Hum Genet, 2002. **70**(1): p. 11-9.
39. Kobayashi, T., et al., *Vitamin D receptor genotype is associated with cortical bone loss in Japanese patients with primary hyperparathyroidism*. Endocr J, 1998. **45**(1): p. 123-5.

40. Sambrook, P. and C. Cooper, *Osteoporosis*. Lancet, 2006. **367**(9527): p. 2010-8.
41. Ferrari, S., et al., *Vitamin-D-receptor-gene polymorphisms and change in lumbar-spine bone mineral density*. Lancet, 1995. **345**(8947): p. 423-4.
42. Krall, E.A. and B. Dawson-Hughes, *Heritable and life-style determinants of bone mineral density*. J Bone Miner Res, 1993. **8**(1): p. 1-9.
43. Miyao, M., et al., *Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism with bone mineral density in postmenopausal Japanese women*. Calcif Tissue Int, 2000. **66**(3): p. 190-4.
44. Jorgensen, H.L., et al., *Association of a common allelic polymorphism (C677T) in the methylene tetrahydrofolate reductase gene with a reduced risk of osteoporotic fractures. A case control study in Danish postmenopausal women*. Calcif Tissue Int, 2002. **71**(5): p. 386-92.
45. Abrahamsen, B., et al., *A common methylenetetrahydrofolate reductase (C677T) polymorphism is associated with low bone mineral density and increased fracture incidence after menopause: longitudinal data from the Danish osteoporosis prevention study*. J Bone Miner Res, 2003. **18**(4): p. 723-9.
46. Bathum, L., et al., *Evidence for an association of methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism C677T and an increased risk of fractures: results from a population-based Danish twin study*. Osteoporos Int, 2004. **15**(8): p. 659-64.
47. Stathopoulou, M.G., et al., *The role of vitamin D receptor gene polymorphisms in the bone mineral density of Greek postmenopausal women with low calcium intake*. J Nutr Biochem, 2011. **22**(8): p. 752-7.
48. Ferrari, S.L., et al., *Interactions of interleukin-6 promoter polymorphisms with dietary and lifestyle factors and their association with bone mass in men and women from the Framingham Osteoporosis Study*. J Bone Miner Res, 2004. **19**(4): p. 552-9.
49. Andrew, T., et al., *Risk of wrist fracture in women is heritable and is influenced by genes that are largely independent of those influencing BMD*. J Bone Miner Res, 2005. **20**(1): p. 67-74.
50. Graafmans, W.C., et al., *The effect of vitamin D supplementation on the bone mineral density of the femoral neck is associated with vitamin D receptor genotype*. J Bone Miner Res, 1997. **12**(8): p. 1241-5.
51. Gene Cards, Human Gene Database. *NPR3 Gene (Protein Coding) Natriuretic Peptide Receptor 3* ; Available from: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NPR3>.
52. *Calcium blood test*. 2013; Available from: <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/003477.htm>.
53. Moayyeri, A., et al., *Genetic determinants of heel bone properties: genome-wide association meta-analysis and replication in the GEFOS/GENOMOS consortium*. Hum Mol Genet, 2014. **23**(11): p. 3054-68.