



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**  
ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ  
ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

**ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**  
**ΤΗΣ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗΣ**  
**ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ**

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ Ε. ΜΑΡΚΑΤΣΕΛΗ  
ΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2010



«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».



**Ημερομηνία αίτησης της κ. Μαρκατσέλη Αναστασία: 2-11-2004**

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 551<sup>α</sup>/29-3-2005**

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Τσατσούλης Αγαθοκλής Καθηγητής Παθολογίας- Ενδοκρινολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Δρόσος Αλέξανδρος Καθηγητής Παθολογίας –Ρευματολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Φιλίππου Γεώργιος Επίκουρος Καθηγητής Ενδοκρινολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Ημερομηνία ορισμού θέματος: 16-6-2005**

*«Παθοφυσιολογική και γενετική μελέτη της οστεοπόρωσης σε Ελληνικό πληθυσμό»*

**Ημερομηνία Ανασυγκρότησης Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής 658<sup>α</sup>/7-4-2009**

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Τσατσούλης Αγαθοκλής Καθηγητής Παθολογίας- Ενδοκρινολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Δρόσος Αλέξανδρος Καθηγητής Παθολογίας –Ρευματολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Χάλλα Άννα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παιδιατρικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 695<sup>α</sup>/2-11-2010**

**Γεωργίου Ιωάννης**

Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Γεωργούλης Αναστάσιος**

Καθηγητής Ορθοπαιδικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Δρόσος Αλέξανδρος**

Καθηγητής Παθολογίας -Ρευματολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Τσατσούλης Αγαθοκλής**

Καθηγητής Παθολογίας -Ενδοκρινολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Χάλλα Άννα**

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παιδιατρικής Ιατρικής  
Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Βούλγαρη Παρασκευή**

Επίκουρη Καθηγήτρια Ρευματολογίας με έμφαση  
στην Ανοσολογία Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου  
Ιωαννίνων

**Τίγκας Στυλιανός**

Επίκουρος Καθηγητής Ενδοκρινολογίας Ιατρικής  
Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 15-11-2010

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ**

**Ιωάννης Γουδέβενος**

Καθηγητής Παθολογίας- Καρδιολογίας



**Η Γραμματέας της Σχολής**

**ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΒΕΝΤΖΟΥΡΗ -ΖΩΗ**

Στους γονείς μου

Στην αδελφή μου





## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

---

Η εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής με θέμα «Παθοφυσιολογική και γενετική μελέτη της οστεοπόρωσης σε Ελληνικό πληθυσμό» αποτέλεσε μία πολύτιμη και εξαιρετικά ενδιαφέρουσα εμπειρία. Με βοήθησε να εμβαθύνω στην παθοφυσιολογία της οστεοπόρωσης και να εντρυφήσω στο γενετικό υπόβαθρο της πολυπαραγοντικής αυτής νόσου.

Σκοπός της παρούσης μελέτης ήταν η διερεύνηση της επίδρασης των πολυμορφισμών A1330V και V667M του γονιδίου *LRP5*, το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη 5 που σχετίζεται με τον υποδοχέα των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών, στην οστική πυκνότητα (BMD) καθώς και στα επίπεδα ορού των διαλυτών μορίων της οστεοπροτεγερίνης (OPG), του συνδέτη του υποδοχέα του ενεργοποιητή του πυρηνικού παράγοντα-κΒ (RANKL) και δεικτών οστικού μεταβολισμού Ελληνίδων ευρισκόμενων περι- ή μετά την εμμηνόπαυση. Η εν λόγω μελέτη έλαβε χώρα στα Εξωτερικά ιατρεία της Ενδοκρινολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων κατά την χρονική περίοδο 2005-2010, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Παθολογίας/ Ενδοκρινολογίας κ. Αγαθοκλή Τσατσούλη.

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη μου στον Καθηγητή κ. Αγαθοκλή Τσατσούλη, ο οποίος συνέβαλε τα μέγιστα στην εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής και με καθοδήγησε ουσιαστικά με τις πολύτιμες συμβουλές του. Με αμέριστο ενδιαφέρον κατηύθυνε την όλη μου προσπάθεια σε όλη τη διάρκειά της. Επίσης, τον ευχαριστώ που μου ενέπνευσε την αγάπη για την Ενδοκρινολογία και την έρευνα και μου έδωσε από την πρώτη στιγμή όλες τις ευκαιρίες.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στον Καθηγητή Παθολογίας/ Ρευματολογίας κ. Αλέξανδρο Α. Δρόσο για τις πολύτιμες συμβουλές του και την ακούραστη συμμετοχή του στην εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παιδιατρικής κα Άννα Χάλλα για τις πολύτιμες συμβουλές της και την βοήθεια που μου προσέφερε όσον αφορά τις μετρήσεις των δεικτών οστικού μεταβολισμού.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στον Καθηγητή Ιατρικής Γενετικής κ. Ιωάννη Γεωργίου για το ενδιαφέρον που επέδειξε από την πρώτη στιγμή καθώς επίσης και

στην κα Ελισσάβητ Χατζή και στην κα Ιωάννα Μπούμπα για την βοήθειά τους στις μετρήσεις και τον έλεγχο των αποτελεσμάτων.

Ευχαριστίες οφείλω στην κα Αφροδίτη Παπαγιάννη, η οποία με υπέρμετρο ζήλο προέβη στις μετρήσεις των διαλυτών μορίων της OPG και του RANKL.

Εν κατακλείδι, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Ίδρυμα Ιωάννου Γιαννάτου για το βραβείο το οποίο μας απενεμήθη στο 37ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας & Μεταβολισμού για την καλύτερη εργασία στην κλινική Ενδοκρινολογία με θέμα «Ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός A1330V του γονιδίου *LRP5* σχετίζεται με χαμηλή οστική πυκνότητα σε περι- και μετεμμηνοπαυσιακές Ελληνίδες», η οποία αποτελεί μέρος της διδακτορικής μου διατριβής.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

---

---

### I. Γενικό Μέρος

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΟΣΤΙΤΗ ΙΣΤΟΥ .....	5
Οστίτης ιστός.....	5
Αντοχή των οστών.....	5
Κορυφαία οστική μάζα.....	6
Οστική ανακατασκευή.....	7
Ρυθμιστικοί μηχανισμοί της οστικής ανακατασκευής.....	10
ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΗΣ ΟΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΚΑΝΟΝΙΚΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ WNT.....	13
Το κανονικό μονοπάτι σηματοδότησης Wnt.....	13
1. Πρωτεΐνη LRP5.....	16
2. Πρωτεΐνη LRP6.....	17
3. Πρωτεΐνη β-κατενίνη.....	17
4. Μεταγραφικοί παράγοντες Lef/Tcf.....	18
Άλλα μόρια εμπλεκόμενα στο μονοπάτι σηματοδότησης Wnt.....	20
1. Πρωτεΐνες Wnt.....	20
2. Πρωτεΐνες Frizzled.....	21
3. Κινάσες GSK3α και GSK3β.....	22
Αναστολείς της κανονικής σηματοδότησης Wnt.....	22
1. Πρωτεΐνες Sfrps.....	23
2. Παράγοντας Wif-1.....	23
3. Πρωτεΐνες Dickkopfs.....	24
4. Πρωτεΐνη sclerostin.....	24
Ενδοκυττάριοι ή διαμεμβρανικοί ρυθμιστές.....	25
1. Πρωτεΐνες Kremen.....	25
2. Πρωτεΐνη Αξίνη 2.....	25
3. Υποδοχέας Ror 2.....	25
ΑΞΟΝΑΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ RANKL/ RANK/ OPG.....	27
Συνδέτης του υποδοχέα του ενεργοποιητή του πυρηνικού παράγοντα-κΒ (Receptor activator of nuclear factor κB ligand ή RANKL).....	28

Υποδοχέας του ενεργοποιητή του πυρηνικού παράγοντα-κΒ (Receptor activator of nuclear factor κB ή RANK) .....	29
Οστεοπροτεγερίνη (Osteoprotegerin ή OPG) .....	30
Τα μονοπάτια σηματοδότησης που εμπλέκονται στην οστεοκλαστογένεση .....	31
Συμβολή του άξονα σηματοδότησης RANKL/ RANK/ OPG στην παθογένεια της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης .....	34
Η σχέση του συστήματος RANKL/ RANK/ OPG με τις γενετικές διαταραχές.....	37
ΔΕΙΚΤΕΣ ΟΣΤΙΚΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ.....	39
Μεταβολισμός του κολλαγόνου τύπου I των οστών .....	40
Δείκτες οστικής παραγωγής.....	40
1. Ολική αλκαλική φωσφατάση (tALP) .....	41
2. Οστική αλκαλική φωσφατάση (bALP).....	41
3. Οστεοκαλσίνη .....	41
4. Προπεπτίδια του προκολλαγόνου τύπου I .....	42
Δείκτες οστικής απορρόφησης .....	43
1. Λόγος ασβεστίου προς κρεατινίνη ούρων .....	43
2. Λόγος υδροξυπρολίνης προς κρεατινίνη ούρων .....	43
3. Σκελετική όξινη φωσφατάση .....	44
4. Πυριδινολίνη και δεοξυπυριδινολίνη.....	44
5. Δεσμοί πυριδινολίνης του κολλαγόνου τύπου I των ούρων .....	45
6. Γαλακτοζυλιωμένη υδροξυλυσίνη.....	45
ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΗΣ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗΣ.....	47
Η κληρονομικότητα της οστικής μάζας.....	47
Περιοχές ποσοτικών χαρακτηριστικών για την οστεοπόρωση (QTLs).....	50
Πολυμορφισμοί γονιδίων που σχετίζονται με την οστεοπόρωση.....	51
1. Γονίδιο LRP5 .....	51
2. Γονίδιο LRP6 .....	55
3. Γονίδιο SOST.....	56
4. Γονίδιο TNFRSF11B .....	56
5. Γονίδιο TNFRSF11 .....	58
6. Γονίδιο TNFRSF11A.....	59
7. Γονίδιο υποδοχέα α των οιστρογόνων (Estrogen receptor 1 ή ESR1).....	60
8. Γονίδιο υποδοχέα β των οιστρογόνων (Estrogen receptor 2 ή ESR2).....	61
9. Γονίδια υποδοχέων α και γ που σχετίζονται με τα οιστρογόνα (ESRRA και ESRRG) .....	61
10. Γονίδιο CYP17A1 .....	62
11. Γονίδιο CYP19A1 .....	62
12. Γονίδιο υποδοχέα βιταμίνης D (VDR) .....	63
13. Γονίδιο της πρωτεΐνης σύνδεσης της βιταμίνης D (DBP) .....	65
14. Γονίδιο αλυσίδας α <sub>1</sub> του κολλαγόνου τύπου I (COL1A1).....	65

15. Γονίδιο παραθορμόνης (PTH) .....	66
16. Γονίδιο μεταγραφικού παράγοντα RUNX2 .....	67
17. Γονίδιο μεταμορφωτικού αυξητικού παράγοντα β1 (TGFB1) .....	67
18. Γονίδιο μορφογενετικής πρωτεΐνης των οστών 2 (BMP2) .....	67
19. Γονίδιο ιντερλευκίνης 6 (IL-6) .....	68
20. Άλλα υποψήφια γονίδια για την οστεοπόρωση .....	69

## II. Ειδικό μέρος

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ .....	71
ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	73
I. Πληθυσμός μελέτης .....	73
II. Μέθοδοι .....	73
1. Κλινική εκτίμηση .....	73
2. Εργαστηριακές μετρήσεις .....	74
3. Μέτρηση της οστικής πυκνότητας (BMD) .....	75
4. Εξαγωγή του DNA και καθορισμός των πολυμορφισμών A1330V και V667M του γονιδίου <i>LRP5</i> .....	76
III. Στατιστικές μέθοδοι .....	77
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	79
I. Χαρακτηριστικά του πληθυσμού υπό μελέτη .....	79
II. Κατανομή των γονοτύπων .....	80
III. Κατανομή των γονοτύπων βάσει της BMD .....	82
IV. Συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών του γονιδίου <i>LRP5</i> και της BMD στην οσφύ .....	83
V. Μοντέλα πρόβλεψης της BMD στην οσφύ .....	83
VI. Μελέτη αλληλεπίδρασης διαφόρων παραμέτρων για τον καθορισμό της BMD της οσφύς .....	84
VII. Ανάλυση απλοτύπων .....	84
VIII. Επίπεδα ορού της OPG, του RANKL και των δεικτών οστικού μεταβολισμού και η σχέση τους με τους πολυμορφισμούς A1330V και V667M .....	86
IX. Επίπεδα ορού της OPG, του RANKL και η σχέση τους με την ηλικία .....	87
X. Επίπεδα ορού της OPG, του RANKL και η σχέση τους με την BMD της οσφύς .....	87
ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	91
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	99
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	101

SUMMARY .....	107
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	109

## Συντμήσεις

---

ALP	Αλκαλική φωσφατάση (Alkaline phosphatase)
ANCOVA	Ανάλυση συμμεταβλητότητας (Analysis of covariance)
AP-1	Ενεργοποιητής της πρωτεΐνης-1 (Activator protein-1)
APC	Πρωτεΐνη APC (Adenomatous polyposis coli)
bALP	Οστική αλκαλική φωσφατάση (Bone alkaline phosphatase)
BMC	Περιεκτικότητα του οστού σε ανόργανα άλατα (Bone mineral content)
BMD	Οστική πυκνότητα (Bone mineral density)
BMI	Δείκτης μάζας σώματος (Body mass index)
BMP	Μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών (Bone morphogenetic protein)
BRU	Μονάδες οστικής ανακατασκευής (Bone remodeling units)
CGASs	Μελέτες συσχέτισης υποψήφιων γονιδίων (Candidate gene association studies)
CRD	Περιοχή πλούσια σε αμινοξύ κυστεΐνη (Cysteine-rich domain)
CRP	C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (C-reactive protein)
CTX-I	C-τελοπεπτίδιο του κολλαγόνου τύπου I (Type I collagen C-terminal telopeptide)
CV	Συντελεστής μεταβλητότητας (Coefficient variation)
DBP	Πρωτεΐνη σύνδεσης της βιταμίνης D (Vitamin D binding protein)
Dkks	Dickkopfs
DAP12	DNAX-ενεργοποιητική πρωτεΐνη 12 (DNAX-activating protein 12)
DXA	Μέθοδος της απορροφησιμετρίας ακτίνων X διπλής ενέργειας (Dual energy X-ray absorptiometry)
EGF	Επιθηλιακός αυξητικός παράγοντας (Epithelial growth factor)
ELISA	Δοκιμασία ενζυμοσύνδεσης ανοσοπροσρόφησης (Enzyme-linked immunosorbent assay)
ERR	Υποδοχείς που σχετίζονται με τα οιστρογόνα (Estrogen-related receptors)
ESR	Υποδοχέας των οιστρογόνων (Estrogen receptor)
FcRγ	Κοινή υπομονάδα γ του υποδοχέα Fc (Fc receptor common γ subunit)
FEVR	Οικογενής εξιδρωματική υαλοειδοαμφιβληστροειδοπάθεια (Familial exudative vitreoretinopathy)
FGF	Αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (Fibroblast growth factor)
Fzd	Frizzled
FSH	Θυλακιοτρόπος ορμόνη (Follicle stimulating hormone)
GM-CSF	Παράγοντας διέγερσης της αποικίας των κοκκιοκυττάρων και των μακροφάγων (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor)
GSK3β	Κινάση 3β της συνθετάσης του γλυκογόνου (Glycogen synthase kinase 3β)
GWAS	Γονιδιακή μελέτη συσχέτισης εφ' όλου του γενώματος (Genome-wide association study)
HBM	Σύνδρομο υψηλής οστικής μάζας (High bone mass syndrome)

HMG	Οικογένεια της ομάδας υψηλής κινητικότητας (High mobility group)
HSCs	Αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (Hematopoietic stem cells)
IGF	Ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας (Insulin growth factor)
IKK	Αναστολέας της κινάσης του πυρηνικού παράγοντα κB (Inhibitor of NF-κB kinase)
IL	Ιντερλευκίνη (Interleukin)
INF-γ	Ιντερφερόνη γ (Interferon γ)
ITAM	Ανοσοϋποδοχέας με μοτίβο ενεργοποίησης που βασίζεται στην τυροσίνη (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif)
JNK	c-Jun N-τελική κινάση (c-Jun N-terminal kinase)
JPD	Νεανική νόσος του Paget (Juvenile Paget's disease)
LD	Ανισορροπία σύνδεσης (Linkage disequilibrium)
LDLR	Υποδοχέας των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (Low-density lipoprotein receptor)
Lef/Tcf	Παράγοντες επαγωγής-σύνδεσης των λεμφοκυττάρων / παράγοντες του T κυττάρου (Lymphoid enhancer-binding factor/T cell factor)
LRP5	Πρωτεΐνη 5 που σχετίζεται με τον υποδοχέα των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (Low-density lipoprotein receptor-related protein 5)
LRP6	Πρωτεΐνη 6 που σχετίζεται με τον υποδοχέα των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (Low-density lipoprotein receptor-related protein 6)
M-CSF	Παράγοντας διέγερσης της αποικίας των μακροφάγων (Macrophage colony-stimulating factor)
NFATc1	Πυρηνικός παράγοντας των ενεργοποιημένων T κυττάρων (Nuclear factor of activated T cells)
NF-κB	Πυρηνικός παράγοντας κB (Nuclear factor κB)
NTX-I	N-τελοπεπτίδιο του κολλαγόνου τύπου I (Type I collagen N-terminal telopeptide)
ODF	Παράγοντας διαφοροποίησης των οστεοκλαστών (Osteoclast differentiation factor)
OPG	Οστεοπροτεγερίνη (Osteoprotegerin)
OPGL	Συνδέτης της οστεοπροτεγερίνης (Osteoprotegerin ligand)
OPPG	Σύνδρομο οστεοπόρωσης-ψευδογλοιώματος (Osteoporosis-pseudoglioma syndrome)
PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction)
PGF	Αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (Platelet growth factor)
PICP	Καρβοξυτελικό προπεπτίδιο του προκολλαγόνου τύπου I (Procollagen type I C-terminal propeptide)
PINP	Αμινοτελικό προπεπτίδιο του προκολλαγόνου τύπου I (Procollagen type I N-terminal propeptide)
PTH	Παραθορμόνη (Parathyroid hormone)
QTL	Περιοχή ιδιαίτερων ποσοτικών χαρακτηριστικών (Quantitative trait locus)
RANK	Υποδοχέας του ενεργοποιητή του πυρηνικού παράγοντα-κB (Receptor activator of nuclear factor κB)
RANKL	Συνδέτης του υποδοχέα του ενεργοποιητή του πυρηνικού παράγοντα-κB (Receptor activator of nuclear factor κB ligand)
RT-PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time polymerase chain reaction)
SD	Σταθερή απόκλιση (Standard deviation)
SEM	Σταθερό σφάλμα μέτρησης (Standard error measurement)



Sfrps	Διαλυτές πρωτεΐνες που σχετίζονται με τις πρωτεΐνες frizzled (Soluble frizzled-related proteins)
SNP	Μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (Single-nucleotide polymorphism)
sRANKL	Διαλυτός τύπος του RANKL (Soluble form of RANKL)
tALP	Ολική αλκαλική φωσφατάση (Total alkaline phosphatase)
TGF	Μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας (Transforming growth factor)
TNF	Παράγοντας νέκρωσης των όγκων (Tumor necrosis factor)
TRAFs	Παράγοντες που σχετίζονται με τον υποδοχέα του TNF (TNF receptor-associated factors)
TRAP	Όξινη φωσφατάση ανθεκτική στο τρυγικό οξύ (Tartrate-resistant acid phosphatase)
TSH	Θυρεοειδοτρόπος ορμόνη (Thyroid-stimulating hormone)
UTR	Αμετάφραστη περιοχή (Untranslated region)
VDR	Υποδοχέας της βιταμίνης D (Vitamin D receptor)
WHO	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization)
Wif-1	Ανασταλτικός παράγοντας 1 των Wnt (Wnt inhibitory factor 1)
YSM	Έτη σε εμμηνόπαυση (Years since menopause)



# Γενικό Μέρος



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

---

Η οστεοπόρωση είναι μία συστηματική σκελετική νόσος που χαρακτηρίζεται από μείωση της οστικής πυκνότητας (Bone mineral density ή BMD), διαταραχή της μικροαρχιτεκτονικής του οστίτη ιστού και αυξημένο κίνδυνο καταγμάτων (1). Υπολογίζεται ότι πάνω από 200 εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως νοσούν από οστεοπόρωση (2). Η οστεοπόρωση παρουσιάζει μεγαλύτερη επίπτωση στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες εξαιτίας του γεγονότος ότι μετά την εμμηνόπαυση αυξάνεται ο ρυθμός της οστικής απώλειας, ενώ η αντοχή των σπονδύλων είναι ήδη μειωμένη συγκριτικά με τους άνδρες λόγω μικρότερου μεγέθους (μικρότερης μάζας σε gr). Εκτιμάται ότι ποσοστό μεγαλύτερο του 40% των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών στις ΗΠΑ προσβάλλεται από τη νόσο (3). Αξίζει δε να σημειωθεί ότι η οστεοπόρωση εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στις ηλικιωμένες γυναίκες, οι οποίες έχουν καταγωγή από την Β. Ευρώπη (4).

Η οστεοπόρωση είναι ασυμπτωματική νόσος και εκδηλώνεται κλινικά όταν επισυμβεί οστεοπορωτικό κάταγμα. Τα οστεοπορωτικά κατάγματα παρατηρούνται κατά κύριο λόγο στο ισχίο, στη σπονδυλική στήλη, στο περιφερικό άκρο του αντιβραχίου, αλλά και σε άλλες σκελετικές θέσεις (5). Η μεταβολή στην BMD και η αυξημένη συχνότητα της οστικής ανακατασκευής (bone remodeling) συνιστούν δύο ανεξάρτητους παράγοντες κινδύνου των καταγμάτων (6). Η οστεοπόρωση και κυρίως τα οστεοπορωτικά κατάγματα αποτελούν μία σημαντική αιτία νοσηρότητας και θνητότητας. Στην εποχή μας έχει σημειωθεί μία δραματική αύξηση στην επίπτωση των οστεοπορωτικών καταγμάτων λόγω της αύξησης του προσδόκιμου επιβίωσης και των δύο φύλων. Η παρουσία τραύματος, συνήθως λόγω πτώσης ευνοεί την εμφάνιση των οστεοπορωτικών καταγμάτων. Υπολογίζεται ότι στις ΗΠΑ επισυμβαίνουν περίπου ενάμισι εκατομμύρια οστεοπορωτικά κατάγματα ετησίως, ενώ στην Ευρώπη 700 χιλιάδες (2,3). Επιπρόσθετα, επιδημιολογικές μελέτες καταδεικνύουν ότι το 30%

των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών έχουν κλινικά ευρήματα οστεοπόρωσης, δηλαδή κάταγμα (2). Επομένως, η οστεοπόρωση έχει τεράστιο κοινωνικό και οικονομικό αντίκτυπο (7).

Η οστεοπόρωση αποτελεί ένα μεταβολικό νόσημα που χαρακτηρίζεται από διαταραχή στην ποσότητα του οστίτη ιστού. Στην οστεοπόρωση, σε αντίθεση με άλλα μεταβολικά νοσήματα, όπως είναι ο ραχιτισμός και η οστεομαλακία, η αναλογία ανόργανης (κρύσταλλοι του υδροξυαπατίτη) και οργανικής ουσίας (θεμέλια ουσία και κολλαγόνο) διατηρείται σταθερή. Τα σπογγώδη τμήματα των οστών επηρεάζονται σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με τα φλοιώδη και αυτό έγκειται στο γεγονός ότι το 80% του μεταβολισμού των οστών λαμβάνει χώρα στο σπογγώδες οστό, ενώ το υπόλοιπο 20% στο φλοιώδες οστό (7). Σε νέους ενήλικες και στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, ο σχηματισμός και η απορρόφηση του οστού επισυμβαίνουν με τον ίδιο ρυθμό με αποτέλεσμα τη διατήρηση της οστικής μάζας στην πάροδο του χρόνου. Η απώλεια της οστικής μάζας είναι μία χρόνια διαδικασία η έναρξη της οποίας προσδιορίζεται περί το 40ό έτος της ηλικίας (4). Η μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση είναι ο πιο κοινός τύπος οστεοπόρωσης που σχετίζεται με ανεπάρκεια οιστρογόνων (8,9). Η ανεπάρκεια των οιστρογόνων και της προγεστερόνης που παρατηρείται στην εμμηνόπαυση προκαλεί αύξηση της συχνότητας της οστικής ανακατασκευής στην οποία η απορρόφηση του οστού υπερτερεί του σχηματισμού. Επομένως, επικρατεί ένα αρνητικό ισοζύγιο οστικής μάζας που οδηγεί σε οστεοπόρωση. Ιδιαίτερα, τα πρώτα 5-10 έτη μετά την εμμηνόπαυση παρατηρείται μία επίταση στην απώλεια της οστικής μάζας (8,10,11).

Πολλαπλοί γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες καθώς και οι μεταξύ των αλληλεπιδράσεις παίζουν ρόλο στον καθορισμό της οστικής μάζας (12). Αναλύσεις σύνδεσης σε οικογένειες καθώς και αναλύσεις συσχέτισης υποψήφιων γονιδίων στο γενικό πληθυσμό ή σε μελέτες δείκτου-ελέγχου δεικνύουν ότι οι γενετικοί παράγοντες ευθύνονται για το 60-85% της μεταβλητότητας στην BMD (13-17). Εντούτοις, αν και πολυάριθμες μελέτες έχουν διενεργηθεί πάνω στη γενετική προδιάθεση για την εμφάνιση της οστεοπόρωσης, λίγα γονίδια έχουν ταυτοποιηθεί (18-21).

Το κανονικό μονοπάτι σηματοδότησης Wnt είναι το κύριο μονοπάτι σηματοδότησης στους οστεοβλάστες, όπου διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της αύξησης των οστών, στην οστική ανακατασκευή και την επιδιόρθωση των καταγμάτων (22-24). Επιπρόσθετα, ενδέχεται να επεμβαίνει στη ρύθμιση της

οστεοκλαστογένεσης μέσω της μεταβολής της έκφρασης κι έκκρισης των μορίων της οστεοπροτεγερίνης (Osteoprotegerin ή OPG) και του συνδέτη του υποδοχέα του ενεργοποιητή του πυρηνικού παράγοντα-κΒ (Receptor activator of nuclear factor-κB ligand ή RANKL) από τους οστεοβλάστες.

Το γονίδιο *LRP5* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη 5 που σχετίζεται με τον υποδοχέα των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 ή LRP5). Η πρωτεΐνη LRP5 αποτελεί ένα διαμεμβρανικό συν-υποδοχέα για τις πρωτεΐνες Wnt στο κανονικό μονοπάτι σηματοδότησης Wnt (25). Το γονίδιο *LRP5* είναι μέλος της οικογένειας που σχετίζεται με τον υποδοχέα των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (Low-density lipoprotein receptor ή LDLR) και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 11q12-13, το οποίο έχει ταυτοποιηθεί ότι περιλαμβάνει μία περιοχή ιδιαίτερων ποσοτικών χαρακτηριστικών (Quantitative trait locus ή QTL) που αφορούν τη BMD και το ύψος στους Καυκάσιους (26,27). Οι παθογενετικές μεταλλάξεις και οι πολυμορφισμοί του γονιδίου *LRP5* έχουν συσχετιστεί με ένα ευρύ φάσμα σκελετικών διαταραχών. Ωστόσο, τα αποτελέσματα των μελετών είναι αντιφατικά κυρίως λόγω της ετερογένειας στην εθνικότητα ή στο σχεδιασμό της μελέτης.

Στην παρούσα μελέτη διερευνάται η επίδραση δύο κοινών μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (Single-nucleotide polymorphisms ή SNPs) του γονιδίου *LRP5* (A1330V και V667M) στην BMD της οσφύος Ελληνίδων ευρισκόμενων περι- ή μετά την εμμηνόπαυση. Επιπλέον, αναλύεται η σχέση μεταξύ των συγκεκριμένων πολυμορφισμών και των επιπέδων ορού των διαλυτών μορίων OPG και RANKL και δεικτών του οστικού μεταβολισμού.

Στο Γενικό Μέρος που ακολουθεί, μετά τη σύντομη αναφορά στην φυσιολογία του οστίτη ιστού, συζητώνται οι μοριακοί μηχανισμοί ρύθμισης της οστικής ανακατασκευής μέσω του κανονικού μονοπατιού σηματοδότησης Wnt. Ακολουθεί η περιγραφή του άξονα σηματοδότησης RANKL/ RANK/ OPG και των δεικτών του οστικού μεταβολισμού. Στο τελευταίο κεφάλαιο του Γενικού Μέρους, γίνεται λόγος για την κληρονομικότητα της οστικής μάζας κι ακολουθεί ανασκόπηση της βιβλιογραφίας περί του ρόλου των μελετημένων πολυμορφισμών στη πρόκληση της οστεοπόρωσης.





## ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΟΣΤΙΤΗ ΙΣΤΟΥ

---

---

### Οστίτης ιστός

Ο οστίτης ιστός επιτελεί σημαντικές λειτουργίες στα σπονδυλωτά, στις οποίες συγκαταλέγονται η προστασία των ζωτικών οργάνων και του αιμοποιητικού μυελού, η υποστήριξη των μυών, η αποθήκευση και η απελευθέρωση ζωτικών ιόντων, όπως για παράδειγμα του ασβεστίου. Ο οστίτης ιστός αποτελεί ένα είδος μεσεγγυματικού ιστού. Στον ανθρώπινο οργανισμό υπάρχουν δύο είδη οστίτη ιστού: ο φλοιώδης ή συμπαγής και ο δοκιδώδης ή σπογγώδης οστίτης ιστός. Ο φλοιώδης ιστός αποτελεί το 80% του σκελετού, ενώ ο δοκιδώδης το 20%. Ο φλοιώδης ιστός απαντάται κυρίως στα μακρά οστά. Ωστόσο, στο κεντρικό τμήμα των επιφύσεων των μακρών οστών ανευρίσκεται δοκιδώδης ιστός. Αντιθέτως, ο δοκιδώδης ιστός υπερτερεί στα πλατέα οστά της πύελου και στους σπονδύλους και επικαλύπτεται επιφανειακά από ένα στρώμα φλοιώδους ιστού. Οι κυριότεροι τύποι κυττάρων του οστίτη ιστού είναι οι οστεοβλάστες, οι οστεοκλάστες και τα οστεοκύτταρα. Στα οστά διακρίνουμε επίσης την οργανική και την ανόργανη φάση. Η οργανική φάση περιλαμβάνει το κολλαγόνο τύπου I σε ποσοστό 90%, τις πρωτεϊνογλυκάνες και τις μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες. Η οργανική φάση συνιστά το 1/3 του βάρους των οστών. Η ανόργανη φάση περιλαμβάνει τα άλατα ασβεστίου υπό τη μορφή κρυστάλλων υδροξυαπατίτη και συνιστά τα 2/3 του βάρους των οστών (28).

### Αντοχή των οστών

Τα οστά είναι όργανα του ερειστικού συστήματος και παίζουν καθοριστικό ρόλο στη στήριξη του σκελετού και στην κίνηση. Η εξάσκηση μηχανικών δυνάμεων στα οστά έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μικροπαραμορφώσεων (29,30). Τα

οστεοκύτταρα «αντιλαμβάνονται» τις μικροπαραμορφώσεις, είτε μέσω του πιεζοηλεκτρικού φαινομένου, είτε μέσω της εφαρμογής των ηλεκτρικών φορτίων. Με βάση το γεγονός αυτό πραγματοποιείται η προσαρμογή της μηχανικής αντοχής των οστών και η αποφυγή των καταγμάτων (31). Η κατασκευή των οστών (bone modeling) και η οστική ανακατασκευή είναι δύο λειτουργίες οι οποίες είναι άρρηκτα συνδεδεμένες και συμβάλλουν στην προσαρμογή της μηχανικής αντοχής των οστών. Το φαινόμενο της αρμονικής συνεργασίας μεταξύ των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών καλείται σύζευξη και έχει ως στόχο τη διατήρηση, την αύξηση ή τη μείωση της μηχανικής αντοχής των οστών ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν (1,32). Οι παράγοντες που καθορίζουν την μηχανική αντοχή των οστών διακρίνονται σε ποσοτικούς και ποιοτικούς. Οι ποσοτικοί παράγοντες περιλαμβάνουν το μέγεθος, τη μάζα και την πυκνότητα των οστών (28,33,34). Η μικρο- και η μακρο-αρχιτεκτονική των οστών, οι μικρορωγμές, η απόπτωση των κυττάρων, ο ρυθμός της οστικής ανακατασκευής και οι ιδιότητες του υλικού συγκαταλέγονται στους ποιοτικούς παράγοντες (29,35). Με τον όρο ιδιότητες του υλικού εννοούμε τη διασπορά της επιμετάλλωσης, το μέγεθος των κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη και την αναλογία των διασταυρούμενων δεσμών κολλαγόνου (30,36). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι κυτταροκίνες και οι ορμόνες ασκούν επίσης σημαντική επίδραση στην μηχανική αντοχή των οστών (37).

### **Κορυφαία οστική μάζα**

Η μέγιστη οστική μάζα που αποκτάται κατά τη διάρκεια της ζωής ονομάζεται κορυφαία οστική μάζα (peak bone mass). Η αύξηση στην οστική μάζα κατά το χρονικό διάστημα από τη γέννηση μέχρι την έναρξη της εφηβείας δεν παρουσιάζει διαφορές ανάμεσα στα δύο φύλα. Η αύξηση γίνεται με ταχύτερο ρυθμό κατά την εφηβεία, η οστική δε μάζα στη σπονδυλική στήλη τότε διπλασιάζεται. Η διαδικασία της αύξησης της οστικής μάζας συμβαίνει δύο έτη νωρίτερα στα κορίτσια σε σχέση με τα αγόρια. Ωστόσο, τα αγόρια επιτυγχάνουν τελικά μεγαλύτερη κορυφαία οστική μάζα στη σπονδυλική στήλη και το ισχίο (38,39). Η οστική μάζα αποκτά τη μέγιστη τιμή της κατά την τρίτη δεκαετία της ζωής (39). Διάφοροι παράγοντες συμβάλλουν στην επίτευξη και τη διατήρηση της κορυφαίας οστικής μάζας. Ανάμεσα σε αυτούς είναι γενετικοί, ορμονικοί (επίπεδα των οιστρογόνων και των ανδρογόνων),

διατροφικοί (πρόσληψη ασβεστίου από τις τροφές) και μηχανικοί παράγοντες (άσκηση), καθώς επίσης και η έκθεση σε διάφορους παράγοντες κινδύνου (40-46).

### **Οστική ανακατασκευή**

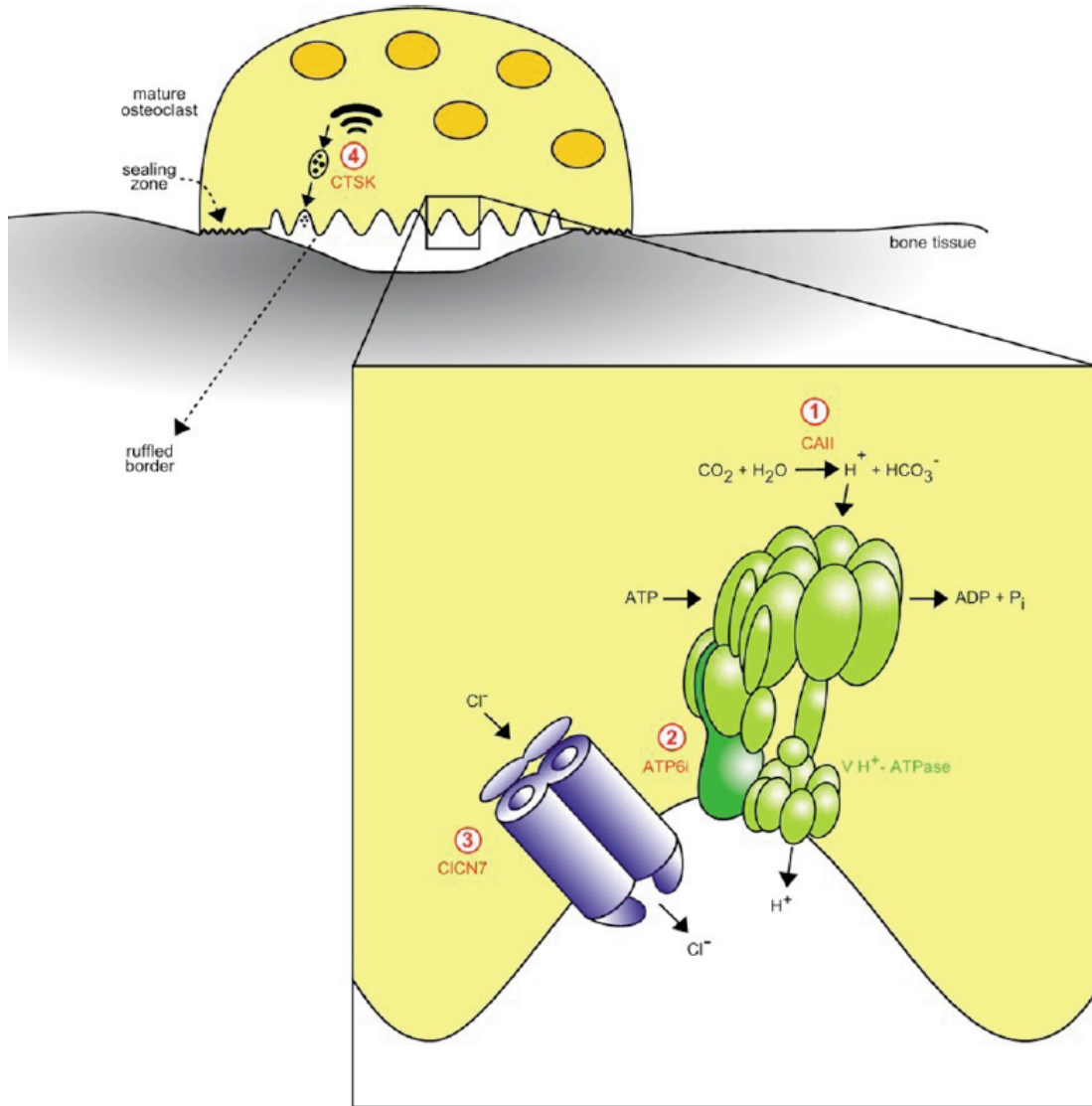
Σε αντίθεση με άλλες ανθεκτικές δομές, όπως είναι οι τένοντες, ο χόνδρος και τα δόντια, ο οστίτης ιστός ενώ φαίνεται ότι είναι ένα «σιωπηλό όργανο» που κάποτε παύει να αναπτύσσεται, στην πραγματικότητα είναι ένας δυναμικός ιστός που υποβάλλεται σε συνεχή ανακατασκευή σε απάντηση στις ορμονικές αλλαγές και στη μηχανική καταπόνηση (47). Η οστική ανακατασκευή λαμβάνει χώρα παράλληλα με την ανάπτυξη του σκελετού και συνιστά την κύρια δραστηριότητα του οστίτη ιστού στην ενήλικη ζωή. Επισυμβαίνει με εστιακό τρόπο και διαδραματίζει βασικό ρόλο στη διατήρηση της δομής και της ακεραιότητας του σκελετού καθώς επίσης και της μέγιστης δυνατής μηχανικής αντοχής. Επίσης, ρυθμίζει τα επίπεδα της συγκέντρωσης του ασβεστίου στον ορό (48).

Από πολλούς ερευνητές έχουν καταβληθεί προσπάθειες να διασαφηνιστούν οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην ομοιόσταση του οστίτη ιστού. Ωστόσο, οι μοριακοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν την έναρξη και τη λήξη της οστικής ανακατασκευής είναι πολύπλοκοι και μη πλήρως κατανοητοί (48). Η ακεραιότητα του οστίτη ιστού διατηρείται από μία λεπτή αλλά παράλληλα δυναμική ισορροπία μεταξύ οστικού σχηματισμού και οστικής απορρόφησης (1,32,48).

Ο οστικός σχηματισμός ρυθμίζεται κυρίως από τους οστεοβλάστες, οι οποίοι προέρχονται από τα αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα (stem cells) (49). Οι οστεοβλάστες είναι μικρά, κυβοειδή, μονοπύρρηνα κύτταρα. Τα αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα αρχικώς πολλαπλασιάζονται και στη συνέχεια διαφοροποιούνται στους πρόδρομους οστεοβλάστες (ή προ-οστεοβλάστες). Ακολούθως, οι προ-οστεοβλάστες ωριμάζουν σε ώριμους οστεοβλάστες, οι οποίοι παράγουν την οργανική ουσία του οστού (συνθέτουν τις πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας). Εν συνεχεία, οι οστεοβλάστες εκφράζουν τα απαραίτητα γονίδια για την ανοργανοποίηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, με αποτέλεσμα οι κρύσταλλοι του υδροξυαπατίτη να εναποτίθενται εντός της οργανικής ουσίας και να την επιμεταλλώνουν. Οι οστεοβλάστες αποσκοπούν στην παραγωγή του οστεοειδούς και στην εναπόθεση αυτού εντός μίας οστικής κοιλότητας, η οποία έχει δημιουργηθεί από τη δράση των οστεοκλαστών (49).

Οι οστεοκλάστες είναι πρωτίστως υπεύθυνοι για την απορρόφηση του οστού. Οι οστεοκλάστες είναι πολυπύρηννα γιγαντοκύτταρα που προέρχονται από τα πρόδρομα κύτταρα της σειράς των μονοκυττάρων-μακροφάγων (49,50). Μονοπύρηννα κύτταρα προσελκύονται στο σημείο της οστικής επιφάνειας που πρόκειται να απορροφηθεί, πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε προ-οστεοκλάστες. Ακολουθεί η σύντηξη των μονοπύρηννων προ-οστεοκλαστών, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία του πολυπύρηννου οστεοκλάστη. Καταρχήν, ο ώριμος αυτός οστεοκλάστης προσκολλάται σταθερά στο οστό με τη βοήθεια εξειδικευμένων ποδοσωματίων, τα οποία είναι πλούσια σε ακτίνη. Μεταξύ της έντονα πτυχωτής επιφάνειας του οστεοκλάστη και της επιφάνειας του οστού σχηματίζεται μία ερμητικά κλειστή κοιλότητα. Ο οστεοκλάστης εκκρίνει πρωτεολυτικά ένζυμα (καθεψίνη K) και υδροχλωρικό οξύ (ιόντα υδρογόνου) εντός της κοιλότητας (51). Τα πρωτεολυτικά ένζυμα συντελούν στον κατακερματισμό της οργανικής φάσης, ενώ τα ιόντα υδρογόνου λύουν την ανόργανη φάση. Αξίζει να τονιστεί ότι η καρβονική ανυδράση II είναι ένα ένζυμο το οποίο ανευρίσκεται εντός του κυτταροπλάσματος του οστεοκλάστη και συμβάλλει στην παραγωγή των ιόντων υδρογόνου (Εικόνα 1). Επομένως, η κύρια λειτουργία των οστεοκλαστών είναι η απορρόφηση της θεμέλιας ουσίας, η οποία επιτυγχάνεται μέσω της δημιουργίας των κοιλοτήτων απορρόφησης (κρύπτες του Howship) (50). Η διαδικασία της οστικής απορρόφησης ολοκληρώνεται με την απόπτωση του οστεοκλάστη. Σε όλη τη διάρκεια της απορρόφησης διενεργείται απελευθέρωση ουσιών από τους οστεοκλάστες, αλλά και τοπικών παραγόντων από το ίδιο το οστό με τελικό αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης των οστεοκλαστών και την επαγωγή της δράσης των οστεοβλαστών (μεταδίδονται σήματα στους οστεοβλάστες προκειμένου να εμφανιστούν στις κοιλότητες απορρόφησης) (52).

Κάθε δεδομένη χρονική στιγμή, περίπου το 20% του φλοιώδους οστού και το 80% του σπογγώδους υπόκειται στη διαδικασία της οστικής ανακατασκευής. Η οστική ανακατασκευή συμβαίνει εντός ξεχωριστών μονάδων σε όλον τον σκελετό που καλούνται μονάδες οστικής ανακατασκευής (Bone remodeling units ή BRU) (1,32). Υπάρχουν τουλάχιστον ένα εκατομμύριο τέτοιες μικροσκοπικές εστίες ανακατασκευής σε κάθε δεδομένη χρονική στιγμή στον σκελετό του ενήλικα (53). Ο



**Εικόνα 1.** Σχηματική απεικόνιση της απορρόφησης του οστού από τον οστεοκλάστη (σε μεγέθυνση δίδεται ο υποκείμενος μοριακός μηχανισμός). Η καρβονική ανυδράση II (CA II) καταλύει το σχηματισμό των πρωτονίων στο κυτταρόπλασμα του οστεοκλάστη. Η υποομάδα ATP6i της  $\text{H}^+$ -ATPάσης εξάγει τα πρωτόνια στον εξωκυττάριο χώρο. Η άθροιση των πρωτονίων ( $\text{H}^+$ ) στον εξωκυττάριο χώρο, σε συνδυασμό με τα ιόντα  $\text{Cl}^-$  τα οποία φέρονται εξωκυττάρως δια του καναλιού ClCN7, οδηγεί στην επίτευξη του κατάλληλου όξινου περιβάλλοντος, του απαραίτητου για τη διαδικασία αποδόμησης της ανόργανης φάσης του οστού. Παράλληλα, το ένζυμο κολλαγενάση CTSK είναι υπεύθυνο για την ενζυματική διάσπαση της οργανικής ουσίας του οστού (54).

μετασχηματισμός μίας αδρανούς οστικής επιφάνειας σε μία επιφάνεια ικανή να απορροφήσει οστό σηματοδοτεί την έναρξη του κύκλου της οστικής ανακατασκευής (1,32). Πιστεύεται ότι τα οστεοκύτταρα επικοινωνούν με τους οστεοβλάστες και τους οστεοκλάστες που βρίσκονται στην επιφάνεια του οστού μεταβιβάζοντας σε αυτούς τοπικά σήματα διαμέσου ενός σωληνοειδούς συστήματος. Επομένως, τα οστεοκύτταρα με τον τρόπο αυτό μεσολαβούν στην έναρξη της οστικής ανακατασκευής (55-59).

Κάθε κύκλος οστικής ανακατασκευής ουσιαστικά αποτελείται από 6 φάσεις:

- 1). Φάση ενεργοποίησης των οστεοκλαστών
- 2). Φάση απορρόφησης του οστού
- 3). Φάση αναστροφής – Ενεργοποίηση των οστεοβλαστών
- 4). Φάση σχηματισμού του οστού
- 5). Φάση επιμετάλλωσης του οστεοειδούς
- 6). Φάση ηρεμίας

Η φάση της ενεργοποίησης των πρόδρομων οστεοκλαστών σηματοδοτεί την έναρξη του κύκλου της οστικής ανακατασκευής. Στη φάση της απορρόφησης επισυμβαίνει η διαφοροποίηση των πρόδρομων οστεοκλαστών σε ώριμους οστεοκλάστες (49), ενώ στην φάση της αναστροφής οι οστεοκλάστες συμπληρώνουν την διαδικασία της απορρόφησης και παράγουν τα σήματα που προκαλούν την έναρξη του σχηματισμού του οστού. Στη φάση σχηματισμού τα μεσεγχυματικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες ικανούς να συνθέτουν θεμέλια ουσία (49). Στη φάση επιμετάλλωσης του οστεοειδούς οι οστεοβλάστες εξακολουθούν να παράγουν και να ασβεστοποιούν το οστεοειδές. Τέλος, στη φάση ηρεμίας παρατηρείται μετατροπή των οστεοβλαστών σε επενδυτικά κύτταρα ή διαφοροποίηση των οστεοβλαστών σε οστεοκύτταρα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η φάση της οστικής απορρόφησης διαρκεί περίπου 2-4 εβδομάδες, ενώ η φάση του οστικού σχηματισμού 4-6 μήνες. Συνεπώς, ο κύκλος της οστικής ανακατασκευής αποτελείται από μία ταχεία φάση οστικής απορρόφησης την οποία διαδέχεται μία βραδεία φάση οστικού σχηματισμού (49).

Ο ρυθμός του οστικού μεταβολισμού (bone turnover rate) καθορίζεται από τον αριθμό των BRU και την ταχύτητα με την οποία εκτελούνται οι λειτουργίες της απορρόφησης του οστού από τους οστεοκλάστες και του σχηματισμού από τους οστεοβλάστες.

### **Ρυθμιστικοί μηχανισμοί της οστικής ανακατασκευής**

Η σύνθετη διεργασία της οστικής ανακατασκευής ρυθμίζεται από την κληρονομικότητα, την ηλικία καθώς επίσης και από την συνδυασμένη δράση τοπικών και συστηματικών παραγόντων.

Όσον αφορά τους τοπικούς παράγοντες, μελέτες απέδειξαν ότι η οστεοπροτεγερίνη (Osteoprotegerin ή OPG), ο συνδέτης του υποδοχέα του

ενεργοποιητή του πυρηνικού παράγοντα-κΒ (Receptor activator of nuclear factor κB ligand ή RANKL) και ο υποδοχέας του ενεργοποιητή του πυρηνικού παράγοντα-κΒ (Receptor activator of nuclear factor κB ή RANK), τα οποία είναι μέλη της υπερικογένειας των συνδετών και των υποδοχέων του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (Tumor necrosis factor ή TNF), διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στη ρύθμιση της οστικής ανακατασκευής (60-62). Αξίζει να σημειωθεί ότι τόσο η OPG όσο και ο RANKL παράγονται από τους οστεοβλάστες. Ειδικότερα, ο RANKL επιδρά στη διαδικασία συγχώνευσης των πρόδρομων οστεοκλαστών με σκοπό τη δημιουργία ενός πολυπύρηνου ώριμου οστεοκλάστη. Ο μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνεται η διαφοροποίηση αυτή των οστεοκλαστών είναι η ενεργοποίηση της έκφρασης του c-Fos από τον RANKL (63). Αντιθέτως, η OPG αναστέλλει τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών (64). Επιπλέον, άλλες μελέτες ανέδειξαν το ρόλο του παράγοντα διέγερσης της αποικίας των μακροφάγων (Macrophage colony-stimulating factor ή M-CSF) στον πολλαπλασιασμό των πρόγονων οστεοκλαστών και στη διαφοροποίησή τους σε ώριμους οστεοκλάστες (65). Ο M-CSF εκφράζεται από τους οστεοβλάστες και συμβάλλει στη διατήρηση της επιβίωσης των πρόδρομων οστεοκλαστών, αλλά και στην καταστολή της απόπτωσης των ώριμων οστεοκλαστών (66,67). Συνεπώς, οι οστεοβλάστες παράγουν και ενεργοποιητές (RANKL, M-CSF) και αναστολείς της διαφοροποίησης των οστεοκλαστών (OPG).

Στους συστηματικούς παράγοντες που ρυθμίζουν την οστική ανακατασκευή περιλαμβάνονται κυτοκίνες, ορμόνες, αυξητικοί και μηχανικοί παράγοντες (68). Οι κυτοκίνες που παίζουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση της οστικής απορρόφησης είναι οι εξής: ιντερλευκίνες (Interleukins ή IL) IL-1, IL-3, IL-6, IL-10, IL-11, IL-13, οι παράγοντες TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , ο παράγοντας M-CSF και ο παράγοντας διέγερσης της αποικίας των κοκκιοκυττάρων και των μακροφάγων (Granulocyte macrophage-colony stimulating factor ή GM-CSF). Στις ορμόνες περιλαμβάνονται τα οιστρογόνα, τα ανδρογόνα, η ινσουλίνη, η θυροξίνη, η αυξητική ορμόνη και τα γλυκοκορτικοειδή. Η θυροξίνη και τα γλυκοκορτικοειδή αυξάνουν την οστική απορρόφηση, ενώ οι ορμόνες του φύλου την μειώνουν. Όσον αφορά τις ορμόνες που ρυθμίζουν το ασβέστιο, η παραθορμόνη (Parathyroid hormone ή PTH) καθώς επίσης και η 1,25-διυδροξύ-βιταμίνη D $_3$  σε αυξημένες συγκεντρώσεις προκαλούν αύξηση της οστικής απορρόφησης, ενώ αντιθέτως η καλσιτονίνη την ελαττώνει. Η ανακατασκευή του οστού ρυθμίζεται επίσης από ορισμένους αυξητικούς παράγοντες, όπως είναι οι μεταμορφωτικοί αυξητικοί παράγοντες (Transforming growth factor 1

και 2 ή TGFβ-1, TGFβ-2), ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (Fibroblast growth factor ή FGF), οι ινσουλινόμορφοι αυξητικοί παράγοντες (Insulin growth factor I και II ή IGF-I, IGF-II), ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (Platelet growth factor ή PGF), ο επιδερμοειδής αυξητικός παράγοντας και άλλοι. Αξίζει να σημειωθεί ότι η οικογένεια της μορφογενετικής πρωτεΐνης των οστών (Bone morphogenetic protein ή BMP), η οποία ανήκει στην υπεροικογένεια του TGFβ, ευοδώνει την έκτοπη παραγωγή οστού *in vitro* και ασκεί καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της οστικής μάζας *in vivo* (69-71). Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί ότι η οικογένεια του IGF προάγει τον πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών *in vitro* (72) και αυξάνει την έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί το κολλαγόνο τύπου I (73). Στους μηχανικούς παράγοντες που επηρεάζουν την οστική ανακατασκευή συγκαταλέγονται τα μηχανικά ερεθίσματα και τα μικροκατάγματα.

Το μονοπάτι σηματοδότησης Wnt, μέσω της πρωτεΐνης LRP5, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του σχηματισμού και της λειτουργίας των οστεοβλαστών κι έμμεσα στην οστική ανακατασκευή (22,23,74-76).



**ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΗΣ ΟΣΤΙΚΗΣ  
ΑΝΑΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΚΑΝΟΝΙΚΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ  
ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ WNT**

---

---

Οι πρωτεΐνες Wnt αποτελούν μία μεγάλη οικογένεια εξωκυττάρων γλυκοπρωτεϊνών, οι οποίες είναι πλούσιες σε αμινοξύ κυστεΐνη και διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στην αύξηση και τη διαφοροποίηση των κυττάρων, στην ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των ιστών, συμπεριλαμβανομένου του οστίτη, του μυϊκού και του νευρικού ιστού, καθώς και στον καθορισμό του κυτταρικού θανάτου (22,77-80). Οι πρωτεΐνες Wnt εμπλέκονται επίσης στην εμβρυογένεση (78,81,82), στη χονδρογένεση (83), στο σχηματισμό του οστού, στη λειτουργία των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών, στην οστική ανακατασκευή, στην επιδιόρθωση των καταγμάτων (23,24,74-76,84-86) και στην ογκογένεση (87,88).

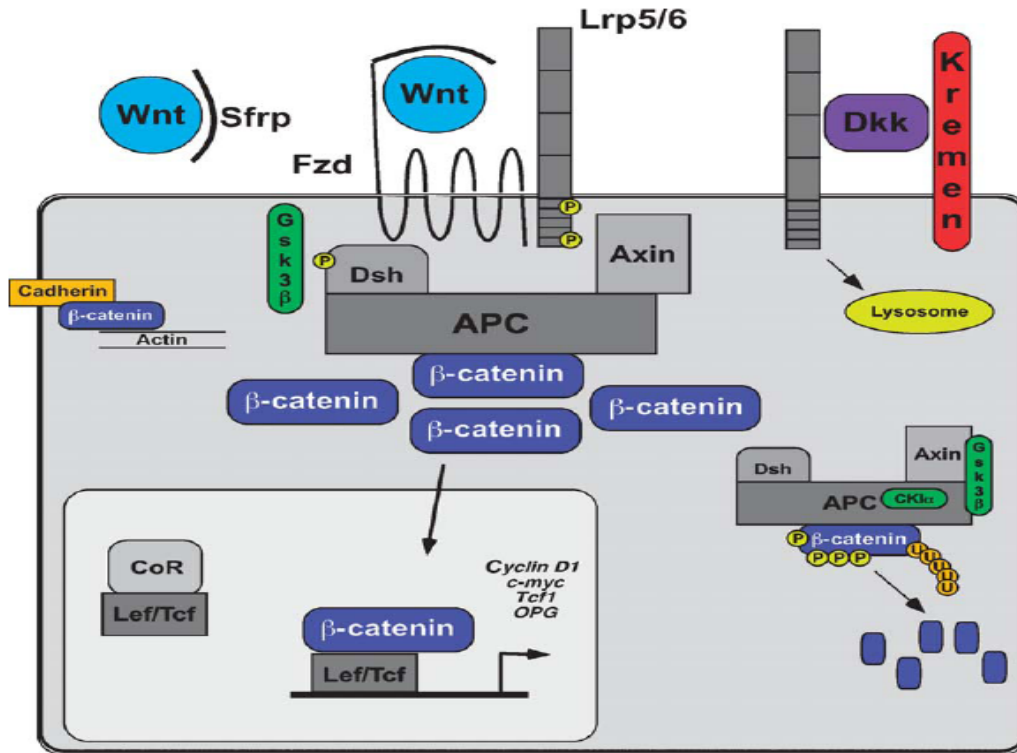
Οι πρωτεΐνες Wnt δύνανται να ενεργοποιήσουν τρία μονοπάτια σηματοδότησης ενδοκυτταρίως. Το μονοπάτι PCP (planar cell polarity pathway) παίζει κυρίαρχο ρόλο στην εμβρυογένεση και βασίζεται στην ενεργοποίηση των GTPασών Rac και Rho, καθώς επίσης και στην c-Jun N-τελική κινάση (c-Jun N-terminal kinase ή JNK) προκειμένου να επιτευχθεί η ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων (89,90). Το μονοπάτι Wnt/Ca<sup>2+</sup> συντελεί στην αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάρου ασβεστίου και παράλληλα συμβάλλει στην ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C με σκοπό τη ρύθμιση της μετανάστευσης των κυττάρων (91,92). Το κανονικό μονοπάτι σηματοδότησης Wnt εμπλέκεται στην ανάπτυξη και την διαφοροποίηση των οργάνων στα θηλαστικά (81,93).

**Το κανονικό μονοπάτι σηματοδότησης Wnt**

Στο κανονικό μονοπάτι σηματοδότησης Wnt, οι πρωτεΐνες Wnt συνδέονται με τους υποδοχείς Frizzled (Fzd) και τους συν-υποδοχείς της πρωτεΐνης LRP5 ή LRP6 στην επιφάνεια του κυττάρου. Η πρωτεΐνη LRP5 είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη, της οποίας το ενδοκυττάριο τμήμα υφίσταται φωσφορυλίωση από μία άγνωστη κινάση. Η πρωτεΐνη αξίνη, η οποία αποτελεί συνιστώσα του συμπλέγματος των πρωτεϊνών β-κατενίνη, Dishevelled (Dsh) και APC (Adenomatous polyposis coli), αλληλεπιδρά με την φωσφορυλιωμένη περιοχή της πρωτεΐνης LRP5 (25,94) (Εικόνα 2). Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα η κινάση  $\beta$  της συνθετάσης του γλυκογόνου (Glycogen synthase kinase  $\beta$  ή GSK3 $\beta$ ) να μην δύναται να συνδεθεί στο σύμπλεγμα. Συνεπώς, η β-κατενίνη δεν φωσφορυλιώνεται από την κινάση GSK3 $\beta$  και δεν υφίσταται ουμπικουιτινοποίηση και πρωτεοσωμική αποδόμηση (95,96). Εν συνεχεία, η β-κατενίνη συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα και ακολουθεί η μετατόπισή της στον πυρήνα του κυττάρου, όπου συνδέεται με μεταγραφικούς παράγοντες και συγκεκριμένα με τους παράγοντες επαγωγής-σύνδεσης των λεμφοκυττάρων / παράγοντες του T κυττάρου (Lymphoid enhancer-binding factor/T cell factor ή Lef/Tcf) (78,84,97-99). Η σύνδεση αυτή απαιτεί τη δημιουργία ετεροδιμερών μεταξύ της β-κατενίνης και των παραγόντων Lef/Tcf και έχει ως επακόλουθο την ενεργοποίηση της μεταγραφής και κατά συνέπεια την έκφραση γονιδίων-στόχων που είναι απαραίτητα για το σχηματισμό του οστού (100,101).

Επί απουσίας σήματος στο μονοπάτι Wnt, η β-κατενίνη συνδέεται στο σύμπλεγμα που απαρτίζεται από τις πρωτεΐνες αξίνη, APC, Dsh και GSK3 $\beta$  και ακολούθως φωσφορυλιώνεται από την κινάση GSK3 $\beta$ , με αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων της β-κατενίνης στο κυτταρόπλασμα. Η φωσφορυλιωμένη β-κατενίνη αποδομείται διαμέσου του μονοπατιού ουμπικουιτίνης/ πρωτεοσώματος από την πρωτεΐνη F-box και τις λιγκάσες E2 (102-106).

Οι ανταγωνιστές της κανονικής σηματοδότησης Wnt διακρίνονται σε ενδοκυττάριους και εξωκυττάριους. Στους ενδοκυττάριους περιλαμβάνονται η πρωτεΐνη APC3 και η κινάση GSK3 $\beta$ , ενώ στους εξωκυττάριους οι ανταγωνιστές Dickkopfs (Dkks) και οι διαλυτές πρωτεΐνες που σχετίζονται με τις πρωτεΐνες Fzd (Soluble frizzled-related proteins ή Sfrps). Οι ανταγωνιστές Dkks είναι εκκριτικές πρωτεΐνες, οι οποίες συνδέονται στους υποδοχείς LRP5 και LRP6 επί της κυτταρικής



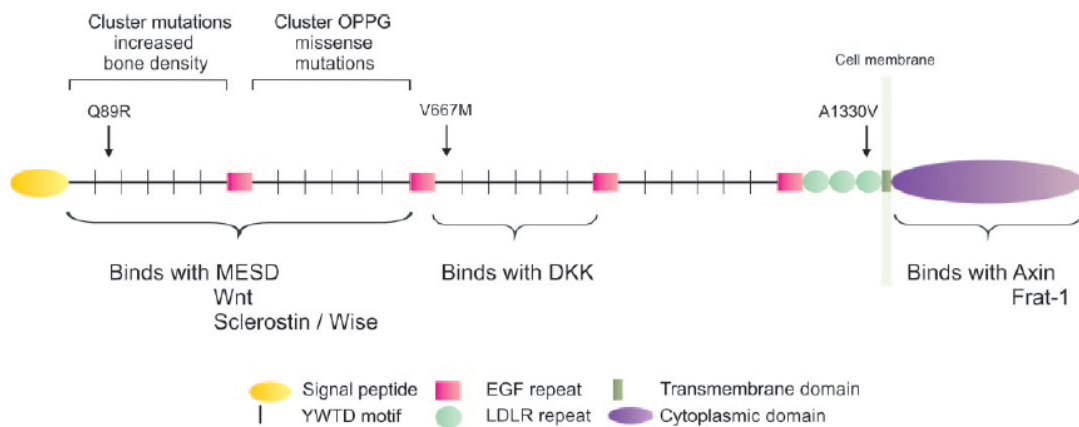
**Εικόνα 2.** Το μονοπάτι της κανονικής σηματοδότησης Wnt. Η κανονική σηματοδότηση Wnt αρχίζει όταν οι πρωτεΐνες Wnt σχηματίζουν ένα σύμπλεγμα με τους υποδοχείς Fzd και τους συν-υποδοχείς LRP5/6. Το εν λόγω σύμπλεγμα σχηματισμού οδηγεί στη φωσφορυλίωση του ενδοκυττάριου ουραίου τμήματος της LRP5/6 από μία κινάση που δεν έχει ταυτοποιηθεί. Η πρωτεΐνη αξίνη και ως εκ τούτου ολόκληρο το σύμπλεγμα πρωτεϊνών APC-Dsh-β-κατενίνη, αλληλεπιδρά με αυτές τις φωσφορυλιωμένες περιοχές. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές εμποδίζουν την GSK3 να συνοδεύσει το σύμπλεγμα. Έτσι, η β-κατενίνη διαφεύγει την φωσφορυλίωση και την επακόλουθη ουμικροϊτινοποίηση και την πρωτεοσωμική αποδόμηση. Η β-κατενίνη συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα και μετά μετατοπίζεται στον πυρήνα για να αλληλεπιδράσει με τους μεταγραφικούς παράγοντες Lef/Tcf. Η β-κατενίνη αντικαθιστά τους συν-καταστολείς και συνδέεται αντί αυτών στους Lef/Tcf. Αυτό οδηγεί στην ενεργοποίηση ενός αριθμού γνωστών γονιδίων στόχων. Ένας αριθμός διαφορετικών ανταγωνιστών αναστέλλουν την κανονική σηματοδότηση Wnt. Οι διαλυτές πρωτεΐνες που σχετίζονται με τις πρωτεΐνες Fzd (Soluble frizzled-related proteins ή Sfrps) συνδέονται στις ελεύθερες πρωτεΐνες Wnt και τις εμποδίζουν να σχηματίσουν το σύμπλεγμα Wnt-Fzd-LRP5/6. Οι Dickkopfs (Dkks) μειώνουν τον αριθμό των πρωτεϊνών LRP5/6 που βρίσκονται στην επιφάνεια του κυττάρου και είναι σε θέση να συμμετάσχουν στην κανονική σηματοδότηση Wnt. Συγκεκριμένα, οι Dkks συνδέονται στις LRP5 και τις φέρνουν σε στενή εγγύτητα με τις πρωτεΐνες Kremen. Το σύμπλεγμα LRP5-Dkk-Kremen υφίσταται ενδοκύττωση και μεταφέρεται στα λυσοσώματα για αποδόμηση των πρωτεϊνών ή ανακύκλωση (107).

μεμβράνης και τους φέρνουν σε επαφή με τις πρωτεΐνες Kremen. Συνεπώς, οι ανταγωνιστές Dkks εμποδίζουν την κανονική σηματοδότηση Wnt ελαττώνοντας τον αριθμό των υποδοχέων LRP5/6 που λαμβάνουν μέρος. Στη συνέχεια, το σύμπλεγμα LRP5/6-Dkk-Kremen υφίσταται ενδοκύττωση και μεταφέρεται στα λυσοσώματα για πρωτεϊνική αποδόμηση ή ανακύκλωση (108,109). Όσον αφορά τις πρωτεΐνες Sfrps, αυτές συνδέονται στις ελεύθερες πρωτεΐνες Wnt με σκοπό την παρεμπόδιση της σύνδεσής τους με τους υποδοχείς Fzd και τους συν-υποδοχείς LRP5/6 (109,110).

## 1. Πρωτεΐνη LRP5

Το γονίδιο *LRP5* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη LRP5. Το γονίδιο *LRP5* είναι μέλος της οικογένειας που σχετίζεται με τον υποδοχέα των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (Low-density lipoprotein receptor ή LDLR) και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 11q12-13, το οποίο έχει ταυτοποιηθεί ότι περιλαμβάνει μία περιοχή ιδιαίτερων ποσοτικών χαρακτηριστικών (Quantitative trait locus ή QTL) που αφορούν τη BMD και το ύψος στους Καυκάσιους (26,27).

Η πρωτεΐνη LRP5 αποτελεί ένα διαμεμβρανικό συν-υποδοχέα για τις πρωτεΐνες Wnt στο κανονικό μονοπάτι σηματοδότησης Wnt (25,111). Η πρωτεΐνη LRP5 ανιχνεύεται στους οστεοβλάστες και διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στην ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών μέσω της αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες Wnt και της επακόλουθης ενεργοποίησης της σηματοδότησης Wnt (25,76,81,112-114). Η πρωτεΐνη LRP5 είναι μέλος της οικογένειας του υποδοχέα LDLR και αποτελείται από μία μεγάλη εξωκυττάρια περιοχή, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και ένα ενδοκυττάριο ουραίο τμήμα (Εικόνα 3).



**Εικόνα 3.** Δομή της πρωτεΐνης LRP5: Η πρωτεΐνη LRP5 περιέχει μία μεγάλη εξωκυττάρια περιοχή, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και ένα ενδοκυττάριο ουραίο τμήμα. Η εξωκυττάρια περιοχή αποτελείται από ένα πεπτίδιο σήμανσης, 4 περιοχές β-έλικας και επαναλήψεις του υποδοχέα LDLR. Οι περιοχές β-έλικας περιέχουν τα μοτίβα YWTD τα οποία διαχωρίζονται από μία επανάληψη ομοιάζουσα με τον επιθηλιακό αυξητικό παράγοντα (Epithelial growth factor ή EGF). Στην εικόνα φαίνονται οι διάφορες πρωτεΐνες οι οποίες δύνανται να συνδεθούν στην εξωκυττάρια περιοχή και στο ενδοκυττάριο ουραίο τμήμα. Οι παθογενετικές σημειακές μεταλλάξεις, οι οποίες οδηγούν σε καταστάσεις που χαρακτηρίζονται από αυξημένη BMD και στο σύνδρομο οστεοπόρωσης-ψευδογλοιώματος (Osteoporosis-pseudoglioma syndrome ή OPPG), είναι ομαδοποιημένες και εντοπίζονται στις περιοχές β-έλικας 1 και 2 αντίστοιχα. Στην εικόνα δεικνύονται με βέλη οι θέσεις εντόπισης των κοινών πολυμορφισμών V667M και A1330V (115).

Το εξωκυττάρια τμήμα αποτελείται από το πεπτίδιο σήμανσης, 4 περιοχές β-έλικας και τις επαναλήψεις του υποδοχέα LDLR. Οι περιοχές β-έλικας περιέχουν τα μοτίβα

YWTD, τα οποία διαχωρίζονται από μία επανάληψη ομοιάζουσα με τον επιθηλιακό αυξητικό παράγοντα (Epithelial growth factor ή EGF) (116).

## **2. Πρωτεΐνη LRP6**

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη LRP6 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 12p13.3-p11.2. Η πρωτεΐνη LRP6 ανήκει στην οικογένεια του υποδοχέα LDLR (116). Έχει αναφερθεί ότι η πρωτεΐνη LRP6 συμβάλλει στην ενεργοποίηση της κανονικής σηματοδότησης Wnt (117). Πειράματα σε ποντίκια έχουν επιβεβαιώσει το ρόλο της πρωτεΐνης LRP6 στο σκελετικό σύστημα (118). Έχει αναφερθεί ότι η έκφραση της LRP6 προάγει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και την ογκογένεση (119). Δεν έχουν ταυτοποιηθεί μεταλλάξεις στο γονίδιο LRP6 ως αίτια σκελετικών διαταραχών στον άνθρωπο. Ωστόσο, οι μεταλλάξεις του γονιδίου LRP6 προκαλούν διαφορετικές φαινοτυπικές εκδηλώσεις συγκριτικά με αυτές του γονιδίου *LRP5* και το γεγονός αυτό πιστεύεται ότι οφείλεται σε διαφορές στην αποτελεσματικότητα σύνδεσης που παρουσιάζουν είτε για τις πρωτεΐνες Wnt, είτε για τους ανταγωνιστές της σηματοδότησης Wnt.

## **3. Πρωτεΐνη β-κατενίνη**

Το γονίδιο CTNNB1 κωδικοποιεί την πρωτεΐνη β-κατενίνη και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 3p22-p21.3. Η β-κατενίνη έχει μοριακό βάρος 88 kDa και εκφράζεται στους οστεοβλάστες. Με τη βοήθεια μεθόδων ανοσοϊστοχημείας δύναται να ανιχνευθεί στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων αυτών (120). Μία μελέτη ανέδειξε την ύπαρξη β-κατενίνης εντός των οστεοκλαστών (121). Η πρωτεΐνη αυτή σε συνδυασμό με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης και τις καδερίνες (Cadherins), εμπλέκεται στην αρχιτεκτονική, στο σχήμα και στη μετανάστευση των κυττάρων. Επίσης, η β-κατενίνη παίζει πρωταρχικό ρόλο στην εμβρυϊκή ανάπτυξη (122).

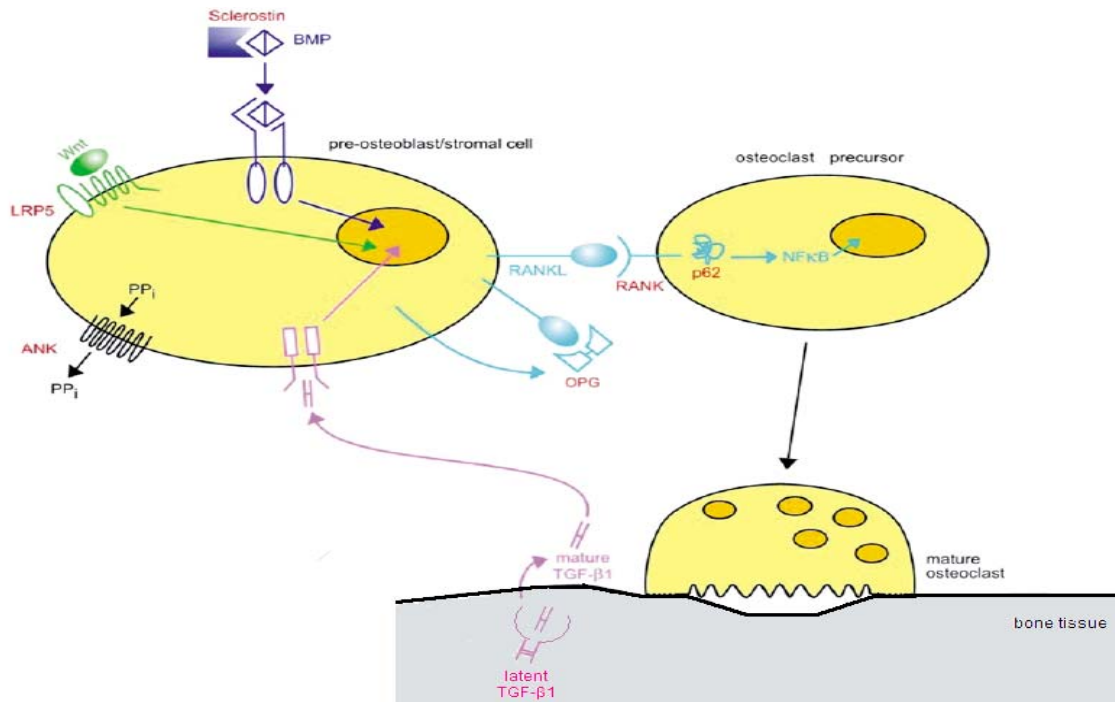
Μελέτες έχουν δείξει ότι η κανονική σηματοδότηση Wnt/ β-κατενίνη ρυθμίζει τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και των χονδροκυττάρων και παράλληλα εμποδίζει τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών σε χονδροκύτταρα (74,75). Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι η διαφοροποίηση και η επιβίωση των οστεοβλαστών δύναται να προαχθεί από την β-κατενίνη χωρίς τη συμμετοχή των πρωτεϊνών Wnt.

Επιπροσθέτως, πειράματα σε ποντίκια ανέδειξαν το ρόλο της β-κατενίνης στον καθορισμό της επιβίωσης και του θανάτου ορισμένων κυττάρων, πέραν των οστεοβλαστών (74,75,85,123,124). Αξίζει να σημειωθεί ότι η απώλεια της β-κατενίνης από τα μεσεγχυματικά πρόδρομα κύτταρα επάγει την ανάπτυξη των χονδροκυττάρων ακόμη και αν οι συνθήκες που επικρατούν ευνοούν την ανάπτυξη των οστεοβλαστών (74).

Ορισμένοι ερευνητές έχουν επιχειρήσει να διασαφηνίσουν το ρόλο της β-κατενίνης στους ώριμους, πλήρως διαφοροποιημένους οστεοβλάστες. Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια, κατέστη σαφές ότι η ενεργοποίηση της β-κατενίνης προκαλεί αύξηση στην έκφραση της OPG με αποτέλεσμα την αύξηση της οστικής μάζας (23). Είναι γνωστό ότι η OPG είναι αναστολέας της οστεοκλαστογένεσης και εμποδίζει την διαφοροποίηση των οστεοκλαστών και ως εκ τούτου την οστική απορρόφηση (64). Αντιθέτως, τα πειράματα αυτά κατέδειξαν ότι η επιλεκτική αναστολή της έκφρασης της β-κατενίνης από τους οστεοβλάστες συντελεί στην μείωση της έκφρασης της OPG με άμεσο επακόλουθο την αύξηση της οστικής απορρόφησης και την μείωση της οστικής μάζας. Τα επίπεδα του RANKL δεν επηρεάζονται από την απώλεια της β-κατενίνης (23). Εν κατακλείδι, η σηματοδότηση Wnt/ β-κατενίνη στους ώριμους οστεοβλάστες ρυθμίζει τη λειτουργία και την διαφοροποίηση των οστεοκλαστών διαμέσου του μονοπατιού σηματοδότησης OPG/RANKL (23,125) (Εικόνα 4).

#### ***4. Μεταγραφικοί παράγοντες Lef/Tcf***

Οι μεταγραφικοί παράγοντες Lef/Tcf συνδέονται με την β-κατενίνη στον πυρήνα του κυττάρου με σκοπό την ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό του οστού (78,84,97). Οι παράγοντες αυτοί διακρίνονται στους Tcf1 (Tcf7), Tcf3 (Tcf7L1), Tcf4 (Tcf4L2) και Lef1 (Tcf1α) και ανήκουν στην οικογένεια της ομάδας υψηλής κινητικότητας (High mobility group ή HMG) (126-128). Ο κάθε μεταγραφικός παράγοντας διαδραματίζει διαφορετικό ρόλο in vivo μετά τη γέννηση και κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Οι παράγοντες Tcf1 και Tcf4 εκφράζονται στους οστεοβλάστες (23,129), ενώ δεν ισχύει το ίδιο για τους Tcf3 και Lef1 (23).



**Εικόνα 4.** Ρόλος του κανονικού μονοπατιού σηματοδότησης Wnt/ β-κατενίνη των ώριμων οστεοβλαστών στη ρύθμιση της λειτουργίας και της διαφοροποίησης των οστεοκλαστών διαμέσου του μονοπατιού σηματοδότησης OPG/ RANKL (54).

Οι παράγοντες Lef/Tcf συνδέονται με τους μεταγραφικούς συν-καταστολείς επί απουσίας της σηματοδότησης Wnt. Στους καταστολείς αυτούς ανήκουν οι αποακετυλιάσες των ιστονών καθώς επίσης οι TLE/Groucho και CtBP (130-132). Αντιθέτως, η ενεργοποίηση της σηματοδότησης Wnt συντελεί στην αντικατάσταση των συν-καταστολέων από την β-κατενίνη και στη σύνδεση αυτής με τους παράγοντες Lef/Tcf. Σημειώτέον ότι ορισμένοι συν-ενεργοποιητές της β-κατενίνης (Pygopus BCL9 και p300) ευοδώνουν την έκφραση των γονιδίων-στόχων (97,133-139). Έχει αναφερθεί ότι η σηματοδότηση Wnt/ β-κατενίνη δύναται να καταστείλει την έκφραση των γονιδίων που επάγεται από τους Lef/Tcf. Ωστόσο, οι υποκείμενοι μηχανισμοί δεν έχουν εξακριβωθεί πλήρως (140-147). Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια δεικνύουν ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες Lef/Tcf βρίσκονται εντός των κυττάρων, τα οποία παρουσιάζουν ενεργή μίτωση, όπως αυτά των τριχοθυλακίων, του δέρματος και του εντέρου. Έχει παρατηρηθεί αυξημένη δραστηριότητα των παραγόντων αυτών εντός των οστεογενετικών κυττάρων που πολλαπλασιάζονται καθώς επίσης και σε περιοχές του σκελετού, οι οποίες υπόκεινται στη διαδικασία της οστικής ανακατασκευής (114,140,148-150). Αρκετοί ερευνητές απέδειξαν ότι η έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τους παράγοντες Lef/Tcf

υφίσταται σταδιακή μείωση καθώς ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων φθίνει και εξαφανίζεται όταν ολοκληρωθεί η μίτωση των κυττάρων (151-156).

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές για την ύπαρξη διαφόρων ισοτύπων των μεταγραφικών παραγόντων Lef/Tcf. Επίσης, ενδέχεται η περιοχή σύνδεσης στον συν-καταστολέα ή η περιοχή αλληλεπίδρασης με την β-κατενίνη να απουσιάζει από ορισμένους ισότυπους (157-159). Η εύρεση ενεργοποιητικών ισοτύπων του μεταγραφικού παράγοντα Tcf1 εντός των οστεοβλαστών σε πειράματα με κυτταρικές καλλιέργειες δεικνύει με σαφήνεια ότι η ενεργοποίηση των γονιδίων που εμπλέκονται στην κανονική σηματοδότηση Wnt επιτελείται στον πυρήνα των οστεοβλαστών (23).

Αξίζει να σημειωθεί ότι το γονίδιο Runx2, το οποίο εμπλέκεται στη λειτουργία και τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών, αλληλεπιδρά με τον παράγοντα Lef1 υπό φυσιολογικές συνθήκες (140,160-162). Αρκετοί ερευνητές έχουν εξετάσει την επίδραση της κανονικής σηματοδότησης Wnt στην έκφραση του γονιδίου Runx2, αλλά τα αποτελέσματα των μελετών είναι αντικρουόμενα. Επιπροσθέτως, μία μελέτη έδειξε ότι η κανονική σηματοδότηση Wnt προάγει την οστεογένεση μέσω της αύξησης της έκφρασης του γονιδίου Runx2. Επίσης, ενδέχεται οι παράγοντες Lef/Tcf να ρυθμίζουν την μεταγραφή και την έκφραση του γονιδίου Runx2 και κατά συνέπεια τη λειτουργία των οστεοβλαστών (112,114,163).

## **Άλλα μόρια εμπλεκόμενα στο μονοπάτι σηματοδότησης Wnt**

### ***1. Πρωτεΐνες Wnt***

Η εφαρμογή πειραμάτων σε κυτταρικές σειρές πρόδρομων οστεοβλαστών έχει οδηγήσει στην υπόθεση ότι η κανονική σηματοδότηση Wnt παίζει σπουδαίο ρόλο στους ήδη διαφοροποιημένους οστεοβλάστες καθώς επίσης και στους οστεοβλάστες που πρόκειται να διαφοροποιηθούν (85,112,164-168). Επίσης, πειράματα που διενεργήθηκαν σε ποντίκια έχουν επισημάνει τον ρόλο που ασκούν οι πρωτεΐνες Wnt στην οστεοβλαστογένεση (169).

Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες Wnt ταξινομούνται στις τάξεις Wnt1 και Wnt5a. Η τάξη Wnt1 περιλαμβάνει τα γονίδια Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt3a, Wnt8 και Wnt8b. Η αλληλεπίδραση των αντίστοιχων πρωτεϊνών με τις LRP5/6 και Fzd στην επιφάνεια του κυττάρου έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της



κανονικής σηματοδότησης Wnt. Στην τάξη Wnt5a ανήκουν τα γονίδια Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a και Wnt11 και οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν συνδέονται με τις πρωτεΐνες Fzd. Η σύνδεση αυτή έχει ως άμεσο επακόλουθο την ενεργοποίηση των πρωτεϊνών G και την αύξηση των επιπέδων του ενδοκυττάριου ασβεστίου ή τη μεταβολή του κυτταροσκελετού της ακτίνης (170). Έχει αναφερθεί η ύπαρξη 19 διαφορετικών γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες Wnt στον άνθρωπο (171). Η έκφραση των γονιδίων Wnt επιτελείται σε συγκεκριμένες θέσεις και στην κατάλληλη χρονική στιγμή. Η ανάπτυξη νεοπλασιών είναι το αποτέλεσμα της ανώμαλης έκφρασης των γονιδίων αυτών σε λάθος χώρο-χρόνο (172). Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες Wnt έχουν ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξη όγκων στον μαζικό αδένα και για την καρκινογένεση, επαγόμενη από ιό, στα ποντίκια (82).

Οι Wnt είναι εκκριτικές γλυκοπρωτεΐνες οι οποίες περιέχουν σε υψηλό ποσοστό το αμινοξύ κυστεΐνη. Η σύνδεση των αμινοξέων κυστεΐνης γίνεται με δισουλφιδικό δεσμό (77). Η δομή των πρωτεϊνών Wnt είναι αδιάλυτη (173). Δεδομένου ότι οι Wnt είναι εκκριτικές γλυκοπρωτεΐνες κι ανευρίσκονται στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, παραμένει άγνωστη η θέση παραγωγής τους. Ωστόσο, *in vitro* μελέτες δεικνύουν ότι ορισμένες Wnt όπως οι Wnt1, Wnt4 και Wnt14 μπορούν να παραχθούν από τους οστεοβλάστες (114,174). Πειράματα που βασίστηκαν σε κυτταρικές καλλιέργειες υποστηρίζουν τη διαφορετική συγγένεια των διαφόρων πρωτεϊνών Wnt για τους συν-υποδοχείς LRP5/6 και τους υποδοχείς Fzd. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται προκειμένου να διευκρινιστεί το θέμα αυτό (170).

## **2. Πρωτεΐνες *Frizzled***

Η οικογένεια των πρωτεϊνών Fzd απαρτίζεται από διάφορα μέλη εκ των οποίων 10 έχουν ανιχνευθεί στον άνθρωπο (175). Οι πρωτεΐνες Fzd αποτελούν τους υποδοχείς των πρωτεϊνών Wnt. Εντοπίζονται στην επιφάνεια του κυττάρου (176). Η αλληλεπίδραση μεταξύ των Wnt και Fzd πραγματοποιείται με τη βοήθεια μίας περιοχής, η οποία εντοπίζεται στο εξωκυττάριο τμήμα των πρωτεϊνών Fzd και είναι πλούσια σε αμινοξύ κυστεΐνη (Cysteine-rich domain ή CRD) (175). Οι υποδοχείς Fzd περιέχουν το μοτίβο KTxxxW, το οποίο επάγει την κανονική σηματοδότηση Wnt (177). Αντιθέτως, οι πρωτεΐνες Fzd1 και Fzd5 παρουσιάζουν έλλειψη του μοτίβου KTxxxW. Στο γεγονός αυτό οφείλεται η παρεμπόδιση της κανονικής σηματοδότησης Wnt στα μεσεγχοματικά κύτταρα από την πρωτεΐνη Fzd1 (178).

Οι πρωτεΐνες Fzd ρυθμίζουν τη σηματοδότηση Wnt στους οστεοβλάστες διαμέσου ενός μηχανισμού ανατροφοδότησης. Αρκετοί ερευνητές προτείνουν ότι η τελική διαφοροποίηση των οστεοβλαστών επιτυγχάνεται μέσω της μείωσης της έκφρασης μερικών Fzd, όπως για παράδειγμα των Fzd1 και Fzd8 (164), που ρυθμίζουν αρνητικά την κανονική σηματοδότηση Wnt (178,179). Η έκφραση των πρωτεϊνών Fzd από τους οστεοβλάστες επηρεάζεται από την 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>, τον EGF, την πρωτεΐνη BMP-2 και την PTH (178,180). Αξίζει να επισημάνουμε το γεγονός ότι ένας μικρός αριθμός των πρωτεϊνών Fzd δεν λαμβάνει μέρος στο κανονικό μονοπάτι σηματοδότησης Wnt, αλλά συμβάλλει στην αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου μέσω των ετεροτριμερών πρωτεϊνών G (175).

### **3. Κινάσες GSK3α και GSK3β**

Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις κινάσες GSK3α και GSK3β έχουν συσχετιστεί με διάφορα νοσήματα όπως είναι ο σακχαρώδης διαβήτης, οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές και ο καρκίνος. Οι κινάσες αυτές συμμετέχουν στις σηματοδοτήσεις Wnt, στο μονοπάτι του πυρηνικού παράγοντα κB (Nuclear factor κB ή NF-κB), ενώ εμπλέκονται και στα μονοπάτια που εξαρτώνται από την ινσουλίνη (181). Πειράματα που εφαρμόστηκαν σε κυτταρικές σειρές οστεοβλαστών δεικνύουν με σαφήνεια ότι η GSK3β μετέχει στη σηματοδότηση που διενεργείται στους οστεοβλάστες, είτε διαμεσολαβούν οι πρωτεΐνες Wnt, είτε όχι (182-184). Η φωσφορυλίωση της β-κατενίνης, της αξίνης, καθώς επίσης και της APC πραγματοποιείται μέσω της δράσης της GSK3β (185). Το τελικό αποτέλεσμα είναι η αποδόμηση της β-κατενίνης μέσω πρωτεοσώματος (106). Το σύμπλεγμα που σχηματίζει η β-κατενίνη με τις πρωτεΐνες αξίνη, APC και GSK3β διασπάται, αλλά οι υποκείμενοι μηχανισμοί δεν έχουν διασαφηνιστεί (186).

### **Αναστολείς της κανονικής σηματοδότησης Wnt**

Οι αναστολείς της κανονικής σηματοδότησης Wnt διακρίνονται σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τις Sfrps, τον ανασταλτικό παράγοντα 1 των Wnt (Wnt inhibitory factor 1 ή Wif-1) και τον Cerberus, οι οποίοι εμποδίζουν την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών Wnt με τις Fzd. Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τους Dkks, Sclerostin και Wise, οι οποίοι εμποδίζουν την σύνδεση

των LRP5/6 με τις Wnt και Fzd, μέσω της σύνδεσής τους στους υποδοχείς LRP5/6. Οι Cerberus και Wise έχουν μελετηθεί μόνο στο είδος *Xenopus* και για το λόγο αυτό θα αναλύσουμε τους υπόλοιπους αναστολείς (187) (Εικόνα 2).

### **1. Πρωτεΐνες Sfrps**

Οι πρωτεΐνες Sfrps αποτελούνται από μία περιοχή CRD, η οποία παρουσιάζει ομόλογες αλληλουχίες με την περιοχή CRD των Fzd σε ποσοστό 50% και από μία άλλη περιοχή, της οποίας η λειτουργία παραμένει άγνωστη. Ο ρόλος μερικών εκ των Sfrps είναι η αναστολή της σηματοδότησης Wnt, η οποία επιτυγχάνεται μέσω της σύνδεσής τους με τις ελεύθερες πρωτεΐνες Wnt και την παρεμπόδιση της δημιουργίας του συμπλέγματος Wnt-Fzd-LRP5/6 (109).

Η Sfrp1 εκφράζεται κυρίως κατά τη διάρκεια της μετάπτωσης των προ-οστεοβλαστών σε προ-οστεοκύτταρα (188). Η εφαρμογή πειραμάτων σε ποντίκια έδειξε ότι η Sfrp1 ρυθμίζει αρνητικά το σχηματισμό των οστών. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η Sfrp1 προκαλεί αύξηση του ρυθμού απόπτωσης των οστεοβλαστών και των οστεοκυττάρων και επιπλέον αναστέλλει την κανονική σηματοδότηση Wnt (188). Επίσης, η Sfrp1 αναστέλλει το σχηματισμό των οστεοκλαστών, λόγω του ότι συνδέεται στον RANKL (189).

Η Sfrp2 ανευρίσκεται στους οστεοβλάστες και ανταγωνίζεται το κανονικό μονοπάτι της σηματοδότησης Wnt (188). Είναι πιθανόν η έκκριση της Sfrp2 από τα κύτταρα του πολλαπλού μυελώματος να αποτελεί την αιτία της οστεοπόρωσης που παρατηρείται στους ασθενείς αυτούς (190).

Από τις μελέτες που έχουν διενεργηθεί έως σήμερα φαίνεται ότι η έκφραση της Sfrp3 επισυμβαίνει στη φάση της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών (164,191). Αξίζει να τονιστεί ότι η Sfrp4 εμποδίζει την ενεργοποίηση της κανονικής σηματοδότησης Wnt στα νεφρικά κύτταρα. Επίσης, η Sfrp4 προκαλεί αύξηση της απέκκρισης του φωσφόρου στα ούρα, μέσω της μείωσης της επαναρρόφησης αυτού από τα νεφρικά σωληνάκια. Τέλος, έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση της Sfrp4 στην οστεομαλακία καθώς επίσης και σε ορισμένους όγκους (192).

### **2. Παράγοντας Wif-1**

Ο παράγοντας Wif-1 είναι μία εκκριτική πρωτεΐνη, η οποία συνδεόμενη στις πρωτεΐνες Wnt, αναστέλλει την ενεργότητά τους (193). Πιστεύεται επίσης ότι ο Wif-1 μετέχει στη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών (194).

### **3. Πρωτεΐνες *Dickkopfs***

Οι πρωτεΐνες Dkks είναι μέλη μίας οικογένειας εκκριτικών πρωτεϊνών (108), η οποία περιλαμβάνει τους παράγοντες Dkk1, Dkk2, Dkk3 και Dkk4. Κοινό χαρακτηριστικό γνώρισμα των παραγόντων αυτών είναι ότι αποτελούνται από μία αλληλουχία οδηγού πεπτιδίου/ πεπτιδίου σήμανσης καθώς επίσης και από δύο περιοχές οι οποίες εμφανίζουν υψηλή περιεκτικότητα στο αμινοξύ κυστεΐνη (195). Οι παράγοντες Dkks εμπλέκονται στο σύνδρομο υψηλής οστικής μάζας (High bone mass syndrome ή HBM) και το πολλαπλό μυέλωμα (174,196,197). Οι Dkks διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο κανονικό μονοπάτι σηματοδότησης Wnt (198,199). Οι πρωτεΐνες Dkk1, Dkk2 και Dkk4 ευοδώνουν την αναστολή της σηματοδότησης Wnt με το να συνδέονται στις LRP5/6 και να τις φέρνουν σε στενή εγγύτητα με τις πρωτεΐνες Kremen 1 και Kremen 2 (195,200). Στη συνέχεια, το σύμπλεγμα LRP5/6-Dkk-Kremen υφίσταται ενδοκύττωση και μεταφέρεται στα λυσοσώματα για αποδόμηση ή ανακύκλωση (200). Μία ακόμη μελέτη ανέδειξε το ρόλο των πρωτεϊνών Kremen στη ρύθμιση του Dkk2 κατά τη διάρκεια της σηματοδότησης Wnt/ LRP6 (201). Αντίθετα, όσον αφορά τον παράγοντα Dkk3, έχει φανεί ότι δεν επηρεάζει την σηματοδότηση Wnt (202).

Η έκφραση του παράγοντα Dkk1 αυξάνεται από τη χορήγηση γλυκοκορτικοειδών και οδηγεί στην καταστολή της κανονικής σηματοδότησης Wnt με αποτέλεσμα την οστεοπόρωση (203). Πειράματα που διενεργήθηκαν σε ποντίκια οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι ο παράγοντας Dkk2 ρυθμίζει την τελική διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και βοηθάει στην επιμετάλλωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (204).

### **4. Πρωτεΐνη *sclerostin***

Η sclerostin είναι μία εκκριτική πρωτεΐνη, η οποία ανταγωνίζεται την κανονική σηματοδότηση Wnt μέσω της σύνδεσής της με τις LRP5/6 και της επακόλουθης παρεμπόδισης της αλληλεπίδρασης των LRP5/6 με τις Fzd (168,205).

Είναι πιθανόν η sclerostin να μην αναστέλλει άμεσα την σηματοδότηση Wnt, αλλά να εμποδίζει την μετέπειτα σηματοδότηση στην οποία μεσολαβούν οι BMPs (206). Μεταλλάξεις του γονιδίου SOST που κωδικοποιούν την sclerostin θεωρούνται υπεύθυνες για την εμφάνιση της σκληροστέωσης. Σημειωτέον, ότι η σκληροστέωση αποτελεί μία αυτοσωμική νόσο και χαρακτηρίζεται από αύξηση της BMD, η οποία οφείλεται στην ανεπάρκεια της πρωτεΐνης sclerostin (207).

## **Ενδοκυττάριοι ή διαμεμβρανικοί ρυθμιστές**

### **1. Πρωτεΐνες Kremen**

Οι Kremen είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Το εξωκυττάριο τμήμα των πρωτεϊνών αυτών περιέχει 3 διαφορετικά μοτίβα, τα οποία θεωρούνται υπεύθυνα για τη σύνδεσή τους με τους παράγοντες Dkks (200). Οι πρωτεΐνες Kremen καθιστούν τους Dkks αναστολείς της σηματοδότησης Wnt (201). Η ακριβής δράση των Kremen συνίσταται στην σύνδεσή τους με τον παράγοντα Dkk και την πρωτεΐνη LRP6 με σκοπό την παρεμπόδιση της ενεργοποίησης της κανονικής σηματοδότησης Wnt. Το σύμπλεγμα Kremen-Dkk-LRP5/6 υφίσταται ενδοκύτωση και εν συνεχεία μεταφέρεται από την επιφάνεια του κυττάρου στα λυσοσώματα για αποδόμηση ή ανακύκλωση (200). Έως σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί οι πρωτεΐνες Kremen 1 και Kremen 2. Οι πρωτεΐνες αυτές συνδέονται στους παράγοντες Dkk1, Dkk2 και Dkk4, αλλά όχι στον Dkk3 (200,201). Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη Kremen 2 ρυθμίζει τη δραστηριότητα του παράγοντα Dkk2 κατά τη διάρκεια της σηματοδότησης Wnt/LRP6 (201).

### **2. Πρωτεΐνη αξίνη 2**

Ο ρόλος της αξίνης 2 είναι η παρεμπόδιση της αύξησης των οστών. Η εφαρμογή πειραμάτων σε ποντίκια κατέδειξε ότι η απώλεια της αξίνης 2 προάγει το σχηματισμό των οστών (208).

### **3. Υποδοχέας Ror 2**

Ο Ror 2 είναι ένας υποδοχέας τυροσινικής κινάσης. Το εξωκυττάριο τμήμα του περιλαμβάνει δύο περιοχές, εκ των οποίων η μία προσομοιάζει με τις πρωτεΐνες Kremen και η άλλη με την CRD των πρωτεϊνών Fzd (209). Ο Ror 2 ρυθμίζει την κανονική σηματοδότηση Wnt στους οστεοβλάστες (210), εμπλέκεται όμως και στο μη κανονικό μονοπάτι σηματοδότησης Wnt5a/ JNK (211). Ο υποδοχέας Ror 2 είναι επίσης απαραίτητος για την ανάπτυξη του χόνδρου (212).

Αξίζει να σημειωθεί ότι η έκφραση του Ror 2 καταστέλλεται από την πρωτεΐνη Sfrp1 (210). Οι μεταλλάξεις του γονιδίου που κωδικοποιούν τον υποδοχέα Ror 2 προκαλούν την βραχυδακτυλία τύπου Β και το σύνδρομο Robinow (209).

## ΑΞΟΝΑΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ RANKL/ RANK/ OPG

---

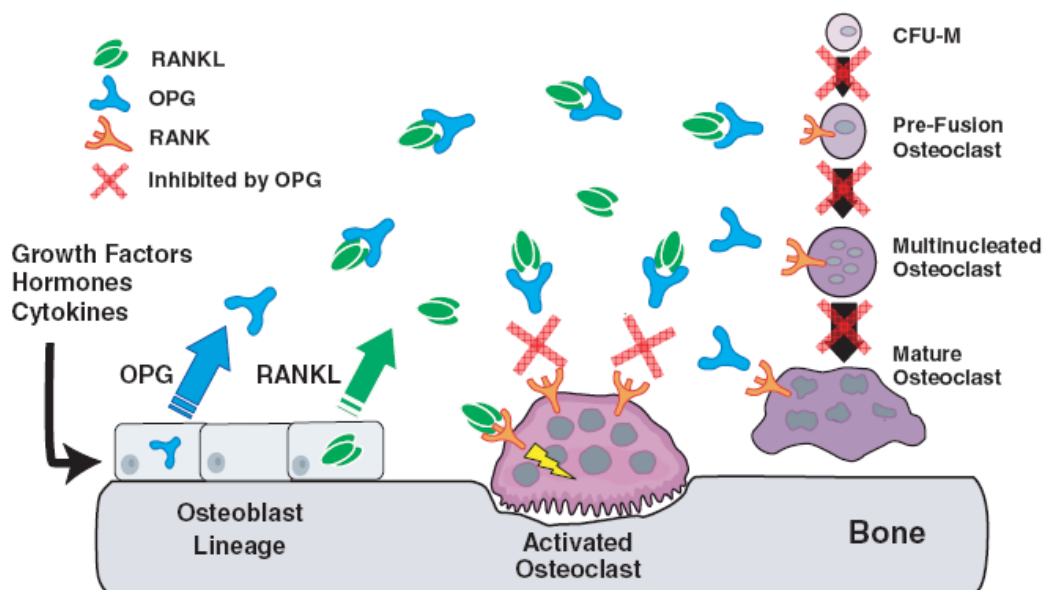
---

Το 1981, οι Rodan και Martin διατύπωσαν την υπόθεση ότι οι οστεοβλάστες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της οστικής απορρόφησης εκφράζοντας ορισμένους παράγοντες, οι οποίοι ανήκουν στην υπερικογένεια των συνδετών και των υποδοχέων του TNF (53). Έκτοτε, οι έρευνες κορυφώθηκαν προκειμένου να ταυτοποιηθεί ο παράγοντας ενεργοποίησης των οστεοκλαστών. Η ανακάλυψη του συστήματος RANKL/ RANK/ OPG στα μέσα με τέλη της δεκαετίας του 90' συνετέλεσε σε μεγάλο βαθμό στην κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στο σχηματισμό και την ενεργοποίηση των οστεοκλαστών.

Η σύνδεση του RANKL με τον υποδοχέα του RANK στην επιφάνεια του οστεοκλάστη έχει ως αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση του τελευταίου (213,214). Η σύνδεση αυτή ρυθμίζει επίσης την ενεργοποίηση και την επιβίωση των οστεοκλαστών κι επομένως την οστεοκλαστογένεση μέσω της ενεργοποίησης αρκετών μεταγραφικών παραγόντων (215,216).

Η OPG δρα ως ένας ψεύτικος υποδοχέας και συνδέεται με τον RANKL εμποδίζοντας την αλληλεπίδραση του RANKL με τον RANK (64,217). Συνεπώς, η OPG αναστέλλει την οστεοκλαστογένεση και ως εκ τούτου προστατεύει τον σκελετό λόγω του ότι εμποδίζει την υπερβολική οστική απορρόφηση.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η OPG και ο RANKL εκφράζονται από τους οστεοβλάστες, ενώ ο RANK εκφράζεται στους προ-οστεοκλάστες και σε άλλα κύτταρα της σειράς αυτής (218). Ο λόγος του RANKL προς την OPG αποτελεί έναν σημαντικό καθοριστικό παράγοντα της οστικής μάζας και της σκελετικής ακεραιότητας (219). Το σύστημα σηματοδότησης RANKL/ RANK/ OPG αποδίδεται σχηματικά στην Εικόνα 5.



**Εικόνα 5.** Μηχανισμοί δράσης των OPG, RANKL και RANK. Ο RANKL παράγεται από τους οστεοβλάστες, τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών και άλλα κύτταρα υπό τον έλεγχο διαφόρων αυξητικών παραγόντων, ορμονών και κυτοκινών. Οι οστεοβλάστες και τα στρωματικά κύτταρα παράγουν OPG, η οποία συνδέεται στον RANKL και τον απενεργοποιεί. Το κυρίαρχο σύμπλεγμα σύνδεσης πιθανώς είναι ένα ομοδιμερές OPG το οποίο αλληλεπιδρά με υψηλή συγγένεια με ένα ομοτριμερές RANKL. Επί απουσίας της OPG, ο RANKL ενεργοποιεί τον υποδοχέα του, ο οποίος ονομάζεται RANK και εντοπίζεται στους οστεοκλάστες και στους πρόδρομους οστεοκλάστες. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των RANK και RANKL οδηγούν σε στρατολόγηση των προ-οστεοκλαστών, συγχώνευση σε πολυπύρηνους οστεοκλάστες, ενεργοποίηση και επιβίωση των οστεοκλαστών. Η OPG είναι σε θέση να αναστείλει πλήρως όλες τις αποκρίσεις που επάγονται από τον RANK (220).

### Συνδέτης του υποδοχέα του ενεργοποιητή του πυρηνικού παράγοντα-κΒ (Receptor activator of nuclear factor κB ligand ή RANKL)

Ο RANKL είναι ο παράγοντας διαφοροποίησης των οστεοκλαστών (Osteoclast differentiation factor ή ODF) και ταυτόχρονα αποτελεί συνδέτη της OPG (Osteoprotegerin ligand ή OPGL) (60,62). Αποτελεί μέλος της οικογένειας των συνδετών του TNF και έχει αναφερθεί ότι επάγει τη λειτουργία και την επιβίωση των δενδριτικών κυττάρων (221). Ο RANKL είναι μία τύπου II ομοτριμερής διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία εκφράζεται στους οστεοβλάστες και στα ενεργοποιημένα T κύτταρα. Επίσης, ο RANKL εκκρίνεται από ορισμένα κύτταρα, όπως για παράδειγμα από τους οστεοβλάστες και τα ενεργοποιημένα T κύτταρα (220,222,223). Ο πνεύμονας, ο μαζικός αδένας, ο θύμος αδένας και οι λεμφαδένες παράγουν τον RANKL σε υψηλό ποσοστό. Ο RANKL εκφράζεται σε μικρό ποσοστό στο μυελό των οστών και τον σπλήνα (222). Μελέτες που διενεργήθηκαν σε ποντίκια δεικνύουν ότι ο RANKL εκφράζεται στο μαζικό αδένος κατά τη διάρκεια της κήσης και συντελεί στην υπερπλασία των επιθηλιακών κυττάρων των γαλακτοφόρων



εκκριτικών πόρων του μαζικού αδένος και την παραγωγή γάλακτος (224). Επί φλεγμονώδους αρθρίτιδας, τα κύτταρα του αρθρικού υμένα παράγουν RANKL. Επίσης, ο RANKL επάγοντας την ενεργοποίηση των οστεοκλαστών προάγει την απελευθέρωση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (Hematopoietic stem cells ή HSCs) στην κυκλοφορία του αίματος. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η ανακατασκευή του οστού σε συνδυασμό με την αιμοποίηση (225). Η σηματοδότηση RANKL/ RANK φαίνεται να παίζει βασικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων ορισμένων κακοήθων όγκων (226), καθώς επίσης στη μετανάστευση των κυττάρων αυτών και τις οστικές μεταστάσεις (227).

Οι παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση του RANKL φαίνονται στον Πίνακα 1. Η PTH, οι προσταγλανδίνες και η 1α,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> αυξάνουν την έκφραση του RANKL από τους οστεοβλάστες και τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών. Η ιντερφερόνη γ (Interferon γ ή INF-γ) επίσης έχει φανεί ότι αυξάνει την έκφραση του RANKL και κατ' επέκταση επάγει την παραγωγή των οστεοκλαστών σε καλλιέργειες περιφερικού αίματος από οστεοπορωτικούς ασθενείς (220).

**Πίνακας 1.** Παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση των OPG, RANKL και RANK (220)

	OPG	RANKL	RANK
1,25-διυδροξυ-βιταμίνη D <sub>3</sub>	↑ ↓	↑	↑
Ορμόνες			
οιστρογόνα	↑	↓ / —	
τεστοστερόνη	↑ ↓	—	
γλυκοκορτικοειδή	↓	↑	
παραθορμόνη	↓	↑	
Κυτοκίνες			
IL-1	↑ ↓	↑	↑
IL-4			↓ / —
IL-7		↑	
IL-13	↑	↓	—
IL-17	↓	↑	—
TNFα		↑	
Ιντερφερόνη γ	↑	↑	↑
Προσταγλανδίνη E <sub>2</sub>	↓	↑	
Αυξητικοί παράγοντες			
TGFβ	↑	↑ ↓	—
Μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών 2	↑		—

↑: αυξημένη έκφραση, ↓: μειωμένη έκφραση, — : καμία αλλαγή

**Υποδοχέας του ενεργοποιητή του πυρηνικού παράγοντα-κΒ (Receptor activator of nuclear factor κB ή RANK)**

Ο RANK αποτελεί μέλος της υπερικογένειας των υποδοχέων του TNF και παρουσιάζει μερική ομολογία με ένα τμήμα της εξωκυττάριας περιοχής του ανθρώπινου μορίου CD40 (221). Είναι μία τύπου I ομοτριμερής διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία εκφράζεται στους πρόδρομους και ώριμους οστεοκλάστες, στα δενδριτικά κύτταρα, στα πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα, στα ώριμα T κύτταρα, καθώς επίσης και στα κύτταρα του μαζικού αδένου (224). Από διάφορους μελετητές έχει αναφερθεί η έκφραση του RANK σε ορισμένους κακοήθεις όγκους, όπως για παράδειγμα του προστάτη και του μαστού (226,228).

Ο RANK έχει ενοχοποιηθεί ότι μεσολαβεί στην ενεργοποίηση των T κυττάρων στο ανοσολογικό σύστημα (221). Μελέτες σε ποντίκια καταδεικνύουν τη σημασία της πρωτεΐνης RANK στο σχηματισμό των οστεοκλαστών (229). Είναι αξιοσημείωτο ότι οι ασθενείς που πάσχουν από οικογενή νόσο του Paget φέρουν ενεργοποιητικές μεταλλάξεις στο εξόνιο 1 του γονιδίου που κωδικοποιεί τον RANK, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την οστεόλυση, λόγω της αύξησης του σχηματισμού αλλά και της ενεργότητας των οστεοκλαστών (230).

### **Οστεοπροτεγερίνη (Osteoprotegerin ή OPG)**

Το 1997, αρκετοί ερευνητές ανέφεραν την ανακάλυψη ενός διαλυτού παράγοντα, ο οποίος εμπόδιζε την ενεργοποίηση και την διαφοροποίηση των οστεοκλαστών *in vitro* και *in vivo* (64,231). Ο παράγοντας αυτός ονομάστηκε οστεοπροτεγερίνη και χαρακτηρίστηκε ως ο προστάτης των οστών. Η OPG ανήκει στην υπερικογένεια των υποδοχέων του TNF. Είναι μία εκκριτική γλυκοπρωτεΐνη η οποία έχει μοριακό βάρος περίπου ίσο με 60 KDa. Αποτελείται από 401 αμινοξέα με ένα βραχύ πεπτίδιο σήμανσης (21 αμινοξέα). Σχηματίζει ομοδιμερή συνδεδεμένα με δισουλφιδικό δεσμό κυστεΐνης – κυστεΐνης στη θέση 400 (64,232). Σε αντίθεση με τα άλλα μέλη της οικογένειας του υποδοχέα του TNF, η OPG δεν διαθέτει διαμεμβρανική περιοχή και αποτελεί μία εκκριτική πρωτεΐνη. Η OPG μπορεί να συνδέεται τόσο με τον διαλυτό τύπο του RANKL (Soluble form of RANKL ή sRANKL) όσο και με τους τύπους του RANKL που είναι συνδεδεμένοι με την κυτταρική μεμβράνη και έτσι να καταστέλλει τη σύνδεσή τους στον RANK.

Η OPG παράγεται στα οστά από τους οστεοβλάστες, στο μυελό των οστών, την καρδιά, το ήπαρ, το σπλήνα, τους νεφρούς, τον πνεύμονα, το στομάχι, το έντερο, το δέρμα και τον πλακούντα (64,222).

Η ρύθμιση της έκφρασης της OPG εξαρτάται από μία πλειάδα ορμονών, κυτταροκινών, αυξητικών παραγόντων (233), αλλά και από το μονοπάτι σηματοδότησης Wnt/ β-κατενίνη (23,234). Είναι σαφές ότι το μονοπάτι αυτό παίζει καθοριστικό ρόλο στο σχηματισμό των οστεοβλαστών (235) καθώς επίσης και στη δέσμευση των μεσεγχυματικών κυττάρων στη σειρά των οστεοβλαστών (75). Ο Πίνακας 1 δεικνύει τους σημαντικότερους παράγοντες που ρυθμίζουν την παραγωγή της OPG. Σε γενικές γραμμές, η έκφραση της OPG ρυθμίζεται σχεδόν από τους ίδιους παράγοντες που διεγείρουν την έκφραση του RANKL από τους οστεοβλάστες (219). Συνήθως, η αύξηση της έκφρασης του RANKL συνδυάζεται με μειωμένη έκφραση της OPG (220,233).

Επιπρόσθετα, από διάφορες μελέτες φαίνεται ότι η OPG ασκεί προστατευτικό ρόλο στο μέσο χιτώννα των μεγάλων αγγείων παρεμποδίζοντας την επασβέστωση των αθηροσκληρωτικών πλακών (236). Σε διαγονιδιακά ποντίκια με έλλειψη της απολιποπρωτεΐνης E, η απενεργοποίηση της OPG επιταχύνει την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης και την επασβέστωση (237). Ωστόσο, ο ρόλος της OPG στην καρδιαγγειακή νόσο δεν έχει διασαφηνιστεί πλήρως και τα αποτελέσματα των διαφόρων μελετών είναι αντιφατικά (238). Σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια, υπέρταση και χρόνια νεφρική ανεπάρκεια παρατηρείται αύξηση των επιπέδων της OPG στον ορό του αίματος (239), ενώ η καρδιαγγειακή νόσος εμφανίζεται με αυξημένη συχνότητα σε ασθενείς που πάσχουν από οστεοπόρωση (240). Σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια, η οποία συνοδεύεται από δευτεροπαθή υπερπαραθυρεοειδισμό, η OPG δεν προλαμβάνει την απορρόφηση του οστού. Ενδέχεται, ορισμένες πρωτεΐνες του πλάσματος να συνδέονται με την OPG και να την καθιστούν ανενεργή (241). Προκειμένου να διευκρινιστεί περαιτέρω το σημείο αυτό απαιτείται η διενέργεια και άλλων μελετών.

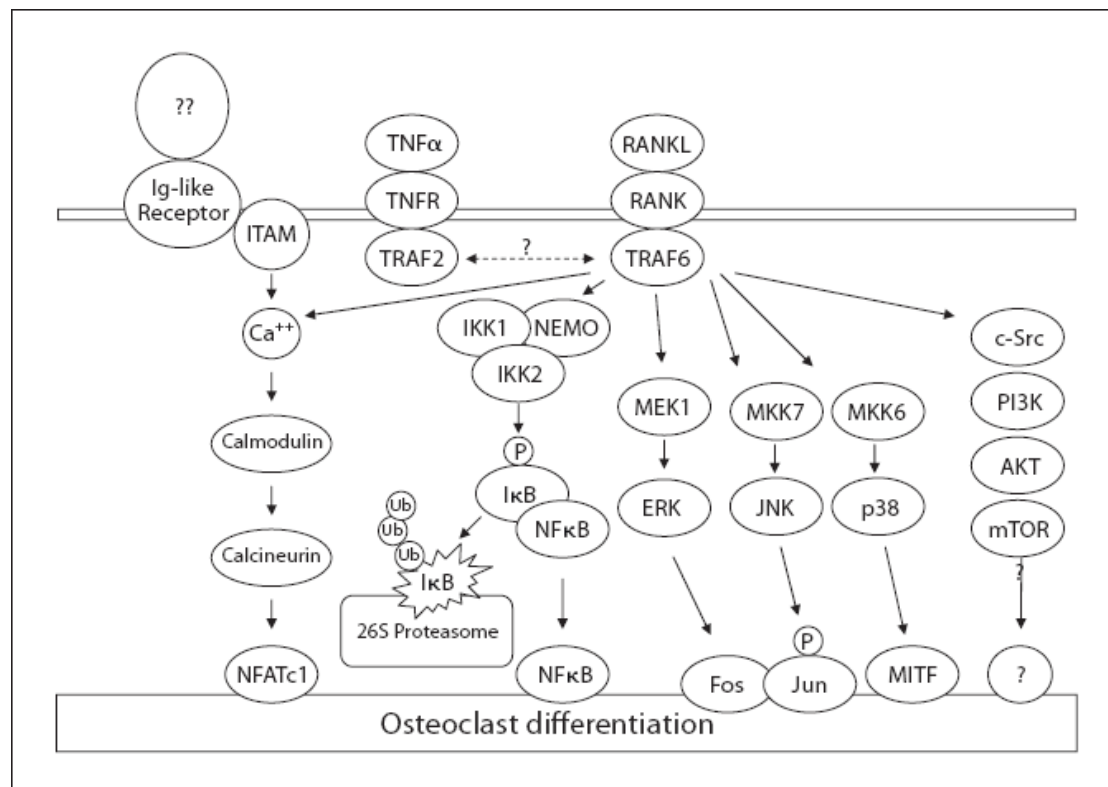
### **Τα μονοπάτια σηματοδότησης που εμπλέκονται στην οστεοκλαστογένεση**

Ο RANKL παράγεται από τους οστεοβλάστες και συνδέεται με τον υποδοχέα του RANK, ο οποίος εντοπίζεται στην επιφάνεια των πρόδρομων οστεοκλαστών. Αποτέλεσμα της σύνδεσης αυτής είναι ο RANK να υφίσταται τριμερισμό και εν συνεχεία να στρατολογεί ορισμένους παράγοντες που σχετίζονται με τον υποδοχέα του TNF (TNF receptor-associated factors ή TRAFs) σε ειδικές θέσεις εντός της κυτταροπλασματικής περιοχής του (242). Στους παράγοντες αυτούς ανήκουν οι

TRAF 2, 5 και 6. Ο πιο βασικός παράγοντας για τους πρόδρομους και ώριμους οστεοκλάστες φαίνεται ότι είναι ο TRAF 6 (68,243). Διάφορα μονοπάτια σηματοδότησης έχουν ταυτοποιηθεί τα οποία ενεργοποιούνται μετά τη σύνδεση του RANK με τον TRAF:

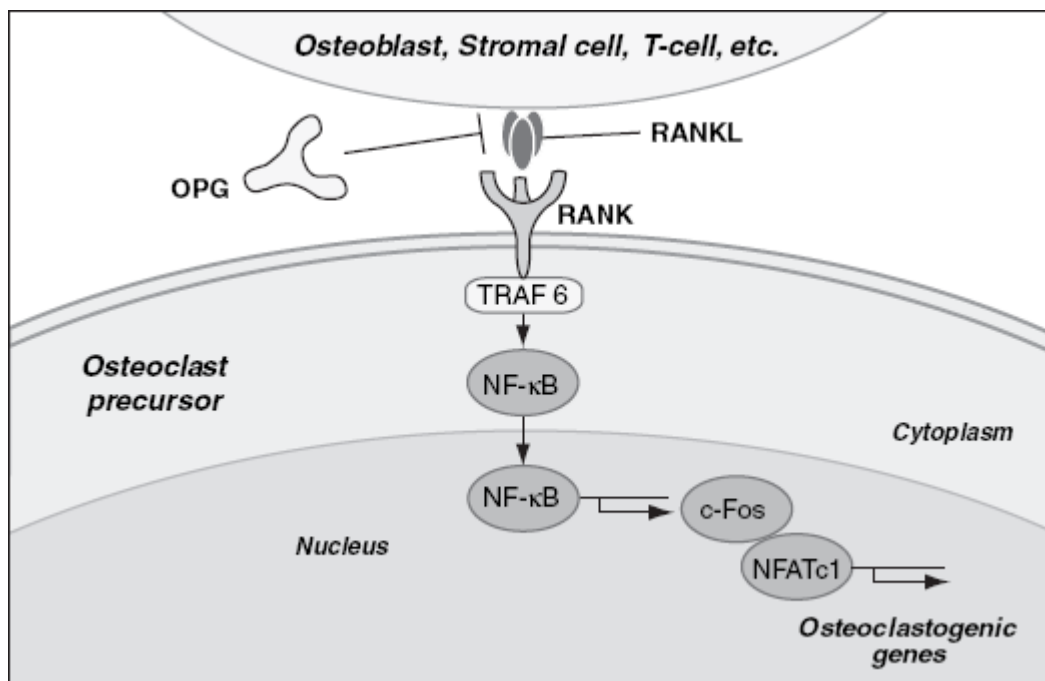
A) τέσσερα μονοπάτια που επάγουν το σχηματισμό των οστεοκλαστών α) ο αναστολέας της κινάσης του πυρηνικού παράγοντα κB (Inhibitor of NF-κB kinase (IKK)/ NF-κB), β) η καλσινευρίνη/ πυρηνικός παράγοντας των ενεργοποιημένων T κυττάρων (Nuclear factor of activated T cells ή NFATc1), γ) η c-Jun N-τελική κινάση (c-Jun N-terminal kinase ή JNK)/ ενεργοποιητής της πρωτεΐνης-1 (Activator protein-1 ή AP-1) και δ) το c-myc, και

B) τρία μονοπάτια που διαμεσολαβούν στην ενεργοποίηση [α) MKK6/p38/MITF και β) Src] και την επιβίωση των οστεοκλαστών [α) μονοπάτι της κινάσης που ρυθμίζεται από το εξωκυττάριο σήμα και β) μονοπάτι Src] (244). Η Εικόνα 6 συνοψίζει τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος μετά τον RANK.



**Εικόνα 6.** Μονοπάτια τα οποία ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών πιθανώς μέσω μεταγωγής σήματος ενδοκυτταρίως. Τα μονοπάτια α) του αναστολέα της κινάσης του πυρηνικού παράγοντα κB (Inhibitor of NF-κB kinase (IKK)/ NF-κB), β) της καλσινευρίνης/ πυρηνικού παράγοντα των ενεργοποιημένων T κυττάρων (Nuclear factor of activated T cells ή NFATc1), γ) της c-Jun N-τελικής κινάσης (c-Jun N-terminal kinase ή JNK)/ ενεργοποιητή της πρωτεΐνης-1 (Activator protein-1 ή AP-1) και δ) του c-myc επάγουν το σχηματισμό των οστεοκλαστών. Δύο μονοπάτια διαμεσολαβούν στην ενεργοποίηση [α) MKK6/p38/MITF και β) Src] και δύο στην επιβίωση των οστεοκλαστών [α) μονοπάτι της κινάσης που ρυθμίζεται από το εξωκυττάριο σήμα και β) μονοπάτι Src] (49).

Τα πιο σημαντικά μονοπάτια στην οστεοκλαστογένεση είναι τα α) IKK/ NF-κB και β) καλσινευρίνη/ NFATc1. Η σύνδεση του RANK στην πρωτεΐνη TRAF 6 έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του NF-κB και την μετατόπιση αυτού στον πυρήνα. Ο NF-κB προκαλεί αύξηση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα c-Fos. Οι NF-κB και c-Fos αλληλεπιδρούν με τον παράγοντα NFATc1 με απώτερο σκοπό τη μεταγραφή των γονιδίων που εμπλέκονται στο σχηματισμό και τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών. Ο NFATc1 παίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της φυσιολογικής διαδικασίας της οστεοκλαστογένεσης (245). Η διφωσφορυλίωση της καλσινευρίνης, η εξαρτώμενη από το ασβέστιο έχει επίσης ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του παράγοντα NFATc1. Ο c-Fos και η RNA πολυμεράση II συμβάλλουν στην αύξηση της ενεργοποίησης του NFATc1 (246) (Εικόνα 7).



**Εικόνα 7.** Τα βασικά μονοπάτια σηματοδότησης που ενεργοποιούνται από τις αλληλεπιδράσεις του RANKL με τον RANK. Ο RANKL ενεργοποιεί τον RANK στην επιφάνεια των οστεοκλαστών και των πρόδρομων οστεοκλαστών. Η ενεργοποίηση του RANK οδηγεί στη στρατολόγηση της πρωτεΐνης TRAF 6, η οποία οδηγεί στην ενεργοποίηση του πυρηνικού παράγοντα NF-κB και την μετατόπιση αυτού στον πυρήνα. Ο NF-κB προκαλεί αύξηση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα c-Fos και ο c-Fos αλληλεπιδρά με τον παράγοντα NFATc1 με απώτερο σκοπό τη μεταγραφή των γονιδίων που εμπλέκονται στο σχηματισμό και τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών. Η OPG αναστέλλει την έναρξη της διαδικασίας με το να συνδέεται στον RANKL (220).

Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι η κοινή υπομονάδα γ του υποδοχέα Fc (Fc receptor common γ subunit ή FcRγ) και η DNAX-ενεργοποιητική πρωτεΐνη 12 (DNAX-activating protein 12 ή DAP12), η οποία σχετίζεται με έναν ανοσοϋποδοχέα με μοτίβο ενεργοποίησης που βασίζεται στην τυροσίνη (Immunoreceptor tyrosine-

based activation motif ή ITAM), αποτελούν ένα σύστημα σηματοδότησης το οποίο εμπλέκεται στη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών. Το σύστημα αυτό συνεργάζεται με το μονοπάτι σηματοδότησης που επάγεται από τη σύνδεση του RANK με τον TRAF 6, διότι από μόνο του δεν δύναται να αυξήσει τη μεταγραφή του παράγοντα NFATc1 και να επάγει την οστεοκλαστογένεση (247). Η OPG συνδεόμενη στον RANKL αναστέλλει την ενεργότητά του, εμποδίζοντας την αλληλεπίδραση του RANKL με τον RANK και κατά συνέπεια την οστεοκλαστογένεση.

### **Συμβολή του άξονα σηματοδότησης RANKL/ RANK/ OPG στην παθογένεια της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης**

Ο άξονας σηματοδότησης RANKL/ RANK/ OPG συμβάλλει αποφασιστικά στη διατήρηση της ομοιόστασης του οστίτη ιστού. Οι μελέτες που διεξήχθησαν τόσο *in vitro* όσο και σε διάφορα μοντέλα ζώων επιβεβαίωσαν το ρόλο του συστήματος αυτού στην παθογένεια ορισμένων νοσημάτων. Στα νοσήματα αυτά περιλαμβάνονται η μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η οστεοπόρωση που επάγεται από τα γλυκοκορτικοειδή, οι επασβεστώσεις των αγγείων, το πολλαπλό μυέλωμα και η οστεόλυση που επάγεται από κακοήθεις όγκους.

Πειράματα που εκτελέστηκαν *in vitro* και συγκεκριμένα σε κυτταρικές σειρές των οστεοβλαστών του ανθρώπου απέδειξαν ότι η 17β-οιστραδιόλη προκαλεί αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της OPG με επακόλουθο την αυξημένη παραγωγή της πρωτεΐνης OPG από τους οστεοβλάστες (248-251). Το γεγονός αυτό πιστεύεται ότι μειώνει την οστεοκλαστογένεση *in vivo* και κατά συνέπεια την απορρόφηση του οστού. Σε μία άλλη μελέτη φάνηκε ότι η διαφοροποίηση των οστεοκλαστών που επάγεται από τον RANKL δύναται να κατασταλεί από τη δράση των οιστρογόνων (252). Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι η έκφραση του RANKL από τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών είναι μεγαλύτερη στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες που δεν έλαβαν θεραπεία υποκατάστασης με οιστρογόνα σε σχέση με τις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες καθώς επίσης και με τις μετεμμηνοπαυσιακές οι οποίες έλαβαν αγωγή (253). Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση του RANKL από τον οστίτη ιστό είναι αυξημένη σε αρουραίους που υπέστησαν ωοθηκεκτομία (254,255).

Αρκετές μελέτες έχουν διενεργηθεί σε διάφορους πληθυσμούς με σκοπό τη διερεύνηση της σχέσης μεταξύ των διαλυτών μορίων της OPG και του RANKL στον

ορό του αίματος και είτε της ηλικίας, είτε των δεικτών του οστικού μεταβολισμού, είτε της BMD (253,256-258). Ωστόσο, τα αποτελέσματα των μελετών αυτών είναι αντικρουόμενα.

Πιο αναλυτικά, αρκετοί ερευνητές έχουν καταγράψει μία θετική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα ορού της OPG και την ηλικία μόνο όμως στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (259-261). Ωστόσο, άλλοι ερευνητές έχουν καταγράψει μία αντίστοιχη συσχέτιση και στα δύο φύλα (262,263). Αντιθέτως, μία άλλη μελέτη, η οποία εκτελέστηκε σε έναν υγιή πληθυσμό ενηλίκων, έδειξε ότι η OPG δεν σχετίζεται με την ηλικία (264).

Όσον αφορά τη συσχέτιση της OPG με τους δείκτες οστικού μεταβολισμού, τα ευρήματα των μελετών ποικίλουν. Υπάρχουν αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία όπου η συγκέντρωση της OPG στον ορό έχει συσχετιστεί ασθενώς με τους δείκτες οστικού μεταβολισμού (258,259). Ωστόσο άλλες μελέτες ανέδειξαν μία θετική συσχέτιση της OPG με τους εν λόγω δείκτες (261), ενώ σε άλλες δεν παρατηρήθηκε καμία συσχέτιση (262). Σε μία άλλη μελέτη, καταγράφη μία αρνητική συσχέτιση μεταξύ της OPG και της οστεοκαλσίνης ορού στις ηλικιωμένες γυναίκες (260). Μία μελέτη διενεργηθείσα σε γυναίκες άμεσα μετά την εμμηνόπαυση έδειξε ότι ο RANKL συσχετίζεται αρνητικά με την 17β-οιστραδιόλη του ορού και θετικά με το N-τελοπεπτίδιο του κολλαγόνου τύπου I (Type I collagen N-terminal telopeptide ή NTX-I) των ούρων και το C-τελοπεπτίδιο του κολλαγόνου τύπου I (Type I collagen C-terminal telopeptide ή CTX-I) του ορού (253).

Στις διάφορες μελέτες που έχουν διαπραγματευτεί τη σχέση της OPG με την BMD έως σήμερα είναι εμφανής η αντιγνωμία μεταξύ των ως προς τα αποτελέσματα, καθότι η OPG έχει συσχετιστεί άλλοτε θετικά με την BMD (258,259), άλλοτε αρνητικά (261,263,265-268) ή δεν έχει καταδειχθεί καμία συσχέτιση (256,260,262). Με αφορμή τις μελέτες που ανέδειξαν μία αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στην OPG και την BMD στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες που ταυτόχρονα εμφάνιζαν οστεοπόρωση (261,265,266,268), πολλοί ερευνητές έχουν ισχυριστεί ότι η OPG αυξάνεται αντιρροπιστικά σε μία προσπάθεια του οργανισμού να εμποδίσει την επιταχυνόμενη οστική απώλεια που παρατηρείται μετά την εμμηνόπαυση (261). Ωστόσο, έχει αναφερθεί από άλλους ερευνητές ότι η έκφραση της OPG και του RANKL δεν επηρεάζεται από την παρουσία ή όχι εμμηνόπαυσης (269). Επίσης, μία άλλη μελέτη έδειξε ότι η συγκέντρωση του RANKL στον ορό δεν παρουσίασε διαφορές ανάμεσα στα δύο φύλα και δεν φάνηκε να εξαρτάται από την ηλικία ή την

εμμηνόπαυση, αλλά ότι οι μειωμένες τιμές των επιπέδων του RANKL στον ορό αποτελούν έναν ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη του μη τραυματικού κατάγματος (270). Τα ευρήματα που έχουν προκύψει από τη διερεύνηση της συσχέτισης των OPG και sRANKL με τα κατάγματα είναι διφορούμενα, δεδομένου ότι υπάρχουν αναφορές για αύξηση, αλλά και για μείωση του ποσοστού των καταγμάτων σε σχέση με την αύξηση του λόγου OPG/ sRANKL (259,270,271).

Οι αιτίες για την ασυμφωνία των αποτελεσμάτων μεταξύ των διαφόρων μελετών συνοψίζονται στις ακόλουθες. Η OPG και ο RANKL δεν είναι ειδικοί δείκτες του οστικού μεταβολισμού. Εκφράζονται σε πολλούς ιστούς πέραν του οστίτη (64,222). Επομένως, είναι πιθανόν τα επίπεδα της OPG και του RANKL στον ορό να μην αντικατοπτρίζουν τη δραστηριότητά τους στο μικροπεριβάλλον του οστού. Η σχετική αστάθεια του sRANKL στον ορό συντελεί στην περιορισμένη ικανότητα ανίχνευσης αυτού από τη δοκιμασία ενζυμοσύνδεσης ανοσοπροσρόφησης (Enzyme-linked immunosorbent assay ή ELISA) (272,273). Η OPG είναι μία γλυκοπρωτεΐνη και κυκλοφορεί είτε ως μονομερές, είτε ως ομοδιμερές ή μπορεί να είναι συνδεδεμένη στον RANKL (274). Ενδεχομένως, λοιπόν, τα αποτελέσματα των μελετών να διαφέρουν εξαιτίας του διαφορετικού μετρούμενου κλάσματος της OPG. Πλέον, η εργαστηριακή μέτρηση της OPG βασίζεται συνήθως σε μία μέθοδο ELISA, η οποία ανιχνεύει όλα τα κλάσματα αυτής (241). Ωστόσο, έχει αναπτυχθεί μία καινούρια τεχνική, που επιτελείται με τη βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase chain reaction ή PCR), η οποία ανιχνεύει αποκλειστικά τον ομοδιμερή τύπο της OPG (274). Αξίζει να τονιστεί ότι η OPG και ο sRANKL ενδέχεται να επηρεάζονται από την ηλικία, το γενετικό υπόβαθρο, την παρουσία ή όχι εμμηνόπαυσης και τη νεφρική λειτουργία. Πιο αναλυτικά, σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια έχει παρατηρηθεί αυξημένη συγκέντρωση της OPG στον ορό του αίματος (275). Επιπλέον, οι μεταβολές στα επίπεδα των ορμονών που επισυμβαίνουν στην εγκυμοσύνη και στην περίοδο της γαλουχίας προκαλούν μείωση στην τιμή της OPG ορού με αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού της οστικής ανακατασκευής (276,277). Επίσης, η ετερογένεια στην εθνικότητα και στο σχεδιασμό της μελέτης ευθύνονται για την αντιφατικότητα των αποτελεσμάτων. Με βάση τα δεδομένα αυτά, καθίσταται επιτακτική η ανάγκη για περαιτέρω μελέτες προκειμένου να καθιερωθεί η αξιοπιστία των μετρήσεων των διαλυτών μορίων OPG και RANKL στην κλινική πράξη.



## Η σχέση του συστήματος RANKL/ RANK/ OPG με τις γενετικές διαταραχές

Η μελέτη του συστήματος RANKL/ RANK/ OPG έχει οδηγήσει στην ταυτοποίηση ορισμένων μεταλλάξεων των γονιδίων της OPG και του RANK. Το γονίδιο της OPG (TNFRSF11B) εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 8q24.2, ενώ του RANK (TNFRSF11A) στο χρωμόσωμα 18q21-22.

Μία απενεργοποιητική μετάλλαξη στο γονίδιο της OPG, η οποία προκαλεί την ανώμαλη σύνδεση της OPG στον συνδέτη της, έχει ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση της νεανικής νόσου του Paget (Juvenile Paget disease ή JPD) (278). Η JPD αποτελεί μία σπάνια αυτοσωμική υπολειπόμενη διαταραχή και χαρακτηρίζεται από κατάγματα, δυσμορφίες των οστών, ακουστικά ελλείμματα και οδοντικές ανωμαλίες ποικίλης σοβαρότητας στα παιδιά (279). Οι σημειακές μεταλλάξεις στα υπολείμματα κυστεΐνης της OPG θεωρούνται η αιτία για την σοβαρή κλινική εικόνα της JPD (278). Επιπροσθέτως, οι σημειακές μεταλλάξεις σε άλλα υπολείμματα πλην της κυστεΐνης θεωρούνται υπεύθυνες για την εκδήλωση των ενδιάμεσων μορφών της νόσου.

Οι ενεργοποιητικές μεταλλάξεις στο γονίδιο του RANK επιφέρουν μία αύξηση της σηματοδότησης που επάγεται από τον RANK και σχετίζονται με την εμφάνιση τριών γενετικών διαταραχών (230). Η οικογενής εκτεταμένη οστεόλυση, η εκτεταμένη σκελετική υπερφωσφατασία και η νόσος Paget του οστού πρώιμης έναρξης κληρονομούνται με αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα. Η οικογενής εκτεταμένη οστεόλυση εκδηλώνεται με ακουστικό έλλειμμα στην πρώιμη παιδική ηλικία. Το κύριο χαρακτηριστικό της γνώρισμα είναι η οστεόλυση, την οποία διαδέχεται η αύξηση του οστού και η συσσώρευση λίπους (280). Η εκτεταμένη σκελετική υπερφωσφατασία προκαλεί πρώιμη κώφωση και πρόωρη απώλεια των οδόντων. Οι δυσμορφίες και το οίδημα κυρίως των δακτύλων, ο γενικευμένος σκελετικός πόνος και η επεισοδιακή υπερασβεστιαμία υποδηλώνουν τον ταχύ ρυθμό της οστικής ανακατασκευής (281). Η νόσος Paget του οστού πρώιμης έναρξης εκδηλώνεται με ακουστικά ελλείμματα, ατέλειες των οδόντων και δυσμορφίες των οστών, ιδιαίτερα της πυέλου και των κάτω άκρων, στο τέλος της εφηβείας. Επίσης, στη διαταραχή αυτή προσβάλλονται η άνω και η κάτω γνάθος (282).



## ΔΕΙΚΤΕΣ ΟΣΤΙΚΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ

---

---

Η μέτρηση των δεικτών του οστικού μεταβολισμού παρουσιάζει μεγάλη χρησιμότητα στην κλινική πράξη, καθότι συμβάλλει στην ανίχνευση των διαταραχών του μεταβολισμού των οστών και στην διάκριση των ασθενών με ταχεία οστική απώλεια (283-286). Επιπλέον, οι δείκτες του οστικού μεταβολισμού παρέχουν πληροφορίες που αφορούν στην ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία της οστεοπόρωσης. Ωστόσο, οι εν λόγω δείκτες δεν αναιρούν την αξία της μέτρησης της BMD για τη διάγνωση και παρακολούθηση της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης (287). Οι δείκτες του οστικού μεταβολισμού διακρίνονται στους δείκτες οστικής παραγωγής και αυτούς της οστικής απορρόφησης.

Στις μέρες μας, για τη μέτρηση των δεικτών του οστικού μεταβολισμού εφαρμόζονται αναλυτικές μέθοδοι χημειοφωταύγειας και ELISA στις οποίες ο συντελεστής μεταβλητότητας (Coefficient variation ή CV) κυμαίνεται σε επίπεδα 3-7% (288,289). Κατά την κλινική εκτίμηση των συγκεκριμένων δεικτών πρέπει να λαμβάνονται υπόψη η προαναλυτική και αναλυτική μεταβλητότητα των δεικτών αυτών. Η προαναλυτική μεταβλητότητα αποδίδεται σε ελεγχόμενους και μη παράγοντες. Στους ελεγχόμενους παράγοντες ανήκουν ο νυχθημερινός ρυθμός, οι εποχές του έτους, ο καταμήνιος κύκλος, η διαίτα, η φυσική άσκηση. Οι μη ελεγχόμενοι παράγοντες περιλαμβάνουν το φύλο, τη φυλή, την ηλικία, την κύηση, τη γαλουχία, τα διάφορα νοσήματα, τα φάρμακα, η παρουσία πρόσφατου κατάγματος. Θα πρέπει να καταβάλλονται προσπάθειες προκειμένου να μειωθούν οι ελεγχόμενοι παράγοντες μεταβλητότητας, όπως για παράδειγμα με τη λήψη αίματος 8-10π.μ. σε κατάσταση νηστείας, τη συλλογή δείγματος ούρων σε ορισμένη ώρα της ημέρας, τη λήψη δείγματος την ίδια εποχή του έτους κ.ά. (290).

## Μεταβολισμός του κολλαγόνου τύπου I των οστών

Το κολλαγόνο τύπου I των οστών σχηματίζεται από το συνδυασμό δύο  $\alpha_1$  και μίας  $\alpha_2$  πολυπεπτιδικών αλυσίδων, οι οποίες περιλαμβάνουν υδροξυλιωμένες ρίζες λυσίνης και προλίνης. Ο σχηματισμός αυτός είναι γνωστός ως προκολλαγόνο, το οποίο όταν παράγεται από τους οστεοβλάστες, οι καρβοξυτελικές και αμινοτελικές περιοχές του διασπώνται. Τα προπεπτίδια αυτά απελευθερώνονται στο εξωκυττάριο υγρό αν και ένα μέρος των αμινοτελικών προπεπτιδίων ενσωματώνονται στο οστό. Το κολλαγόνο τύπου I έχει ελικοειδή μορφή. Τα μη ελικόμορφα τμήματά του στα καρβοξυτελικά και αμινοτελικά άκρα του καλούνται CTX-I και NTX-I αντίστοιχα (291).

Οι πλάγιες αλυσίδες τριών ριζών υδροξυλυσίνης από τρία διαφορετικά μόρια κολλαγόνου τύπου I ενώνονται δημιουργώντας έναν δακτύλιο πυριδινίου. Επομένως, οι διασταυρούμενοι δεσμοί (cross-links) πυριδινίου δημιουργούνται από τρία διαφορετικά μόρια κολλαγόνου σταθεροποιώντας τη δομή του κολλαγόνου τύπου I. Οι δεσμοί δεοξυπυριδινολίνης είναι αποτέλεσμα σύνδεσης δύο πλαγίων αλυσίδων υδροξυλυσίνης με μία πλάγια αλυσίδα λυσίνης (λυσυλπυριδινολίνη). Οι δεσμοί πυριδινολίνης δημιουργούνται από τη σύνδεση τριών πλαγίων αλυσίδων υδροξυλυσίνης (υδροξυλυσυλπυριδινολίνη). Είναι αξιοσημείωτο ότι οι δεσμοί δεοξυπυριδινολίνης είναι περισσότερο ειδικοί των οστών, όμως απαντώνται και στους σκελετικούς μύες, την αορτή και την οδοντίνη. Οι δεσμοί πυριδινολίνης απαντώνται σε πολλούς τύπους κολλαγόνου εκτός των οστών. Οι δεσμοί πυριδινίου στην περιοχή NTX-I συνδέουν πολυπεπτίδια της  $\alpha_1$  αλυσίδας του κολλαγόνου τύπου I με πολυπεπτίδια της  $\alpha_2$  αλυσίδας. Σε άλλους ιστούς η σύνδεση γίνεται μεταξύ δύο  $\alpha_1$  αλυσίδων. Στο γεγονός αυτό αποδίδεται η ειδικότητα των NTX-I για τα οστά. Επιπρόσθετα, τα 2/3 των δεσμών δεοξυπυριδινολίνης στο κολλαγόνο τύπου I των οστών είναι δεσμοί NTX-I και μόνο το 1/3 είναι CTX-I (288,292).

## Δείκτες οστικής παραγωγής

Το κολλαγόνο τύπου I είναι το κύριο προϊόν των οστεοβλαστών και αποτελεί το 95% της εξωκυττάριας μη επιμεταλλωμένης θεμέλιας ουσίας. Επιπλέον, οι οστεοβλάστες εκκρίνουν οστεοκαλσίνη, οστεονεκτίνη και οστεοποντίνη, οι οποίες σχηματίζουν το οστεοειδές ή το οργανικό υπόστρωμα πάνω στο οποίο επιτελείται η

επιμετάλλωση. Οι οστεοβλάστες μπορούν να αναγνωριστούν με χρώση για το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση (Alkaline phosphatase ή ALP), που βρίσκεται στην κυτταρική τους μεμβράνη και είναι διαφορετική της ηπατικής, της εντερικής και του πλακούντα.

Στους δείκτες οστικής παραγωγής περιλαμβάνονται η ολική αλκαλική φωσφατάση ορού (Total alkaline phosphatase ή tALP), η οστική αλκαλική φωσφατάση (Bone alkaline phosphatase ή bALP), οι πρωτεΐνες οστεοκαλσίνη, οστεονεκτίνη και οστεοποντίνη, καθώς επίσης και τα προπεπτίδια του προκολλαγόνου (293).

### ***1. Ολική αλκαλική φωσφατάση (tALP)***

Η tALP είναι μία υδροξυλάση του ορθοφωσφορικού εστέρα, η οποία έχει προέλευση από τα οστά, το ήπαρ, το έντερο και τον πλακούντα (294,295). Μετράται σε διάφορες σκελετικές παθήσεις συμπεριλαμβανομένης της οστεοπόρωσης και βοηθά ιδιαίτερα στην ανίχνευση της ενεργού φάσης της οστικής ανακατασκευής. Μολονότι η μέτρηση της είναι απλή και παρουσιάζει χαμηλό κόστος, μειονεκτεί στο γεγονός ότι παρουσιάζει μειωμένη ειδικότητα, δεδομένου ότι τα επίπεδα tALP ορού αυξάνονται και σε άλλες μη σκελετικές παθήσεις όπως του ήπατος και του εντέρου (294,296).

### ***2. Οστική αλκαλική φωσφατάση (bALP)***

Η bALP, ως οστικό κλάσμα της tALP, αποτελεί ένζυμο με υψηλή ειδικότητα, δεδομένου ότι η συγκέντρωσή της στον ορό αντικατοπτρίζει την ενεργότητα των οστεοβλαστών. Η μέτρηση της bALP είναι χρήσιμη για την αξιολόγηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία των ασθενών που πάσχουν από οστεοπόρωση ή άλλες παθήσεις. Η μέτρησή της θα πρέπει να διενεργείται με τη μέθοδο, η οποία δεν προκαλεί διασταυρούμενη αντίδραση με τα άλλα κλάσματα της ALP. Η ακρίβεια της μεθόδου είναι μειωμένη στην περίπτωση παρουσίας διαταραχής της βιταμίνης D ή λήψης σκευασμάτων που περιέχουν βιταμίνη D (294,297,298).

### ***3. Οστεοκαλσίνη***

Η οστεοκαλσίνη είναι μία πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 5.8 kDa, η οποία παράγεται από τους οστεοβλάστες. Το μεγαλύτερο ποσοστό της πρωτεΐνης αυτής ενσωματώνεται στη θεμέλια ουσία του οστού, ενώ το υπόλοιπο ποσοστό αυτής απελευθερώνεται στην κυκλοφορία του αίματος και στη συνέχεια απεκκρίνεται από τους νεφρούς (289,299). Αυξημένα επίπεδα οστεοκαλσίνης ανευρίσκονται στην οστεοπόρωση, αλλά και σε ορισμένα νοσήματα τα οποία σχετίζονται με ταχύ ρυθμό οστικής ανακατασκευής, όπως είναι ο υπερθυρεοειδισμός και ο πρωτοπαθής υπερπαραθυρεοειδισμός. Στα νοσήματα αυτά, η αυξημένη δραστηριότητα των οστεοκλαστών συνοδεύεται από την αποδέσμευση της οστεοκαλσίνης από την θεμέλια ουσία με άμεσο επακόλουθο την αύξηση της συγκέντρωσής της στον ορό του αίματος. Συνεπώς, η οστεοκαλσίνη, εκτός από ειδικός δείκτης της οστικής παραγωγής, αποτελεί και δείκτη της απορρόφησης του οστού. Επιπλέον, στη νεφρική ανεπάρκεια παρατηρούνται υψηλά επίπεδα οστεοκαλσίνης. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στο γεγονός ότι για την άρτια μέτρηση των επιπέδων της οστεοκαλσίνης στον ορό θα πρέπει πάντα να προηγείται νηστεία (283,288).

#### ***4. Προπεπτίδια του προκολλαγόνου τύπου I***

Όπως προαναφέρθηκε, οι οστεοβλάστες συνθέτουν προκολλαγόνο, το οποίο αποτελεί τη βάση για το σχηματισμό του κολλαγόνου τύπου I. Παράλληλα, επισυμβαίνει η διάσπαση των αμινοτελικών και καρβοξυτελικών άκρων του προκολλαγόνου, η οποία έχει ως επακόλουθο την απελευθέρωση των προπεπτιδίων αυτών στην κυκλοφορία του αίματος. Σημειωτέον, ότι ένα μέρος των αμινοτελικών προπεπτιδίων του προκολλαγόνου τύπου I (Procollagen type I N-terminal propeptide ή PINP) είναι ενσωματωμένο στο οστό ως μη διαλυτή υδροξυπρολίνη. Επομένως, είναι πιθανόν ένα ποσό του μετρούμενου PINP στον ορό να αντανακλά την οστική απορρόφηση (300,301). Όσον αφορά το καρβοξυτελικό προπεπτίδιο του προκολλαγόνου τύπου I (Procollagen type I C-terminal propeptide ή PICP), ο προσδιορισμός του στον ορό δεικνύει την παραγωγή καινούριας ποσότητας κολλαγόνου που επιτελείται από τους οστεοβλάστες και τους ινοβλάστες. Όμως, το PICP έχει πολύ μικρή ευαισθησία με αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται η χρήση του στην κλινική πράξη (302). Αντιθέτως, το PINP συνιστά έναν ειδικό δείκτη της οστικής παραγωγής (303).

## **Δείκτες οστικής απορρόφησης**

Οι οστεοκλάστες προσκολλώνται στην επιφάνεια του οστού και εκκρίνουν υδρολυτικά και όξινα ένζυμα, τα οποία απορροφούν το οστό. Παράλληλα, οι οστεοκλάστες απελευθερώνουν μέταλλα και τμήματα του κολλαγόνου. Ο επίτοπος NTX-I απελευθερώνεται κυρίως από το κολλαγόνο τύπου I των οστών μετά από οστεοκλαστική υδρόλυση από την καθεψίνη K. Οι δεσμοί NTX-I μπορεί να διασπαστούν στο ήπαρ και τους νεφρούς κυρίως όπου δημιουργούνται ελεύθεροι δεσμοί δεοξυπυριδινολίνης. Ένα μέρος του κολλαγόνου διασπάται στις μικρότερες δομικές του μονάδες, τις ελεύθερες ρίζες δεοξυπυριδινολίνης και πυριδινολίνης, οι οποίες αποβάλλονται στα ούρα. Το μεγαλύτερο όμως μέρος του κολλαγόνου υφίσταται ατελή διάσπαση με αποτέλεσμα τη δημιουργία διασταυρούμενων δεσμών πυριδινίου με τμήματα των NTX-I  $\alpha_1$  και  $\alpha_2$  πολυπεπτιδίων. Οι διασταυρούμενοι με πεπτιδία δεσμοί αποβάλλονται επίσης με τα ούρα.

Ο λόγος ασβεστίου προς κρεατινίνη ούρων, ο λόγος υδροξυπρολίνης προς κρεατινίνη ούρων, η σκελετική όξινη φωσφατάση, η πυριδινολίνη, η δεοξυπυριδινολίνη, οι δεσμοί πυριδινολίνης του κολλαγόνου τύπου I των ούρων και η γαλακτοζυλιωμένη υδροξυλυσίνη συγκαταλέγονται στους δείκτες της απορρόφησης του οστού (293).

### ***1. Λόγος ασβεστίου προς κρεατινίνη ούρων***

Η μέτρηση του ασβεστίου των ούρων συνιστά μία χρήσιμη εξέταση, η οποία συμβάλλει κατά κύριο λόγο στην εκτίμηση του μεταβολισμού του ασβεστίου, παρά στον προσδιορισμό του βαθμού της οστικής απορρόφησης. Η ευαισθησία της μέτρησης αυτής είναι πρακτικά μηδενική στην οστεοπόρωση. Είναι σαφές ότι η απορρόφηση του οστού πρέπει να αυξηθεί σε μεγάλο βαθμό προκειμένου να γίνει αντιληπτή η μεταβολή στην τιμή του δείκτη αυτού. Η νεφρική απέκκριση του ασβεστίου καθορίζει την αποβολή του στα ούρα (285).

### ***2. Λόγος υδροξυπρολίνης προς κρεατινίνη ούρων***

Η υδροξυπρολίνη είναι προϊόν διάσπασης του κολλαγόνου και ο μεταβολισμός της επιτελείται στο ήπαρ. Ο λόγος της υδροξυπρολίνης προς την

κρεατινίνη των ούρων αποτελεί έναν δείκτη της αποδόμησης του κολλαγόνου όχι μόνο των οστών, αλλά και του χόνδρου και του δέρματος (304). Η διατροφή παίζει σημαντικό ρόλο στη μέτρηση των τιμών του λόγου αυτού. Η υδροξυπρολίνη των ούρων σε ποσοστό άνω του 90% ανιχνεύεται υπό τη μορφή μικρών πεπτιδίων υδροξυπρολίνης. Χαρακτηριστικό γνώρισμα των πεπτιδίων αυτών είναι ότι διαχέονται διαμέσου της ημιδιαπερατής μεμβράνης. Η ελεύθερη υδροξυπρολίνη και τα μη διαχεόμενα πολυπεπίδια υδροξυπρολίνης συνιστούν δύο ακόμη μορφές υδροξυπρολίνης των ούρων (285). Στον υπερπαραθυρεοειδισμό, στη νόσο του Paget καθώς επίσης και σε ορισμένα νοσήματα του δέρματος, όπως είναι η ψωρίαση, έχουν παρατηρηθεί αυξημένες τιμές της υδροξυπρολίνης των ούρων (305).

### **3. Σκελετική όξινη φωσφατάση**

Η σκελετική όξινη φωσφατάση αναγνωρίζεται από την αντοχή στην αναστολή της από το τρυγικό οξύ (όξινη φωσφατάση ανθεκτική στο τρυγικό οξύ) (Tartrate-resistant acid phosphatase ή TRAP). Η TRAP αποτελεί συστατικό των οστεοκλαστών και παράλληλα δείκτη της απορρόφησης του οστού. Η TRAP απαντάται επίσης σε κύτταρα του αίματος και στον προστάτη. Αυξημένες τιμές της TRAP στον ορό έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς με ταχύ ρυθμό της οστικής ανακατασκευής, εξαιτίας της απελευθέρωσής της από τους οστεοκλάστες (283,306).

### **4. Πυριδινολίνη και δεοξυπυριδινολίνη**

Η πυριδινολίνη και η δεοξυπυριδινολίνη αποτελούν προϊόντα διάσπασης του κολλαγόνου των οστών. Η πυριδινολίνη απαντάται όχι μόνο στο κολλαγόνο των οστών, αλλά και σε άλλους τύπους κολλαγόνου. Αντιθέτως, η δεοξυπυριδινολίνη είναι πιο ειδική για τα οστά. Ο λόγος της πυριδινολίνης προς την δεοξυπυριδινολίνη στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία είναι 2/3. Τα δύο παράγωγα απελευθερώνονται από την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία στα πλαίσια της απορρόφησης του οστού από τους οστεοκλάστες και εν συνεχεία απεκκρίνονται από τους νεφρούς χωρίς να υφίστανται επαναρρόφηση. Τα παράγωγα αυτά ανιχνεύονται στα ούρα είτε συνδεδεμένα με πεπτιδία (60%), είτε σε ελεύθερη μορφή (40%) (285,307). Αξίζει να σημειωθεί ότι ο προσδιορισμός της πυριδινολίνης σε συλλογές ούρων υπερτερεί της υδροξυπρολίνης ούρων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η πυριδινολίνη εμφανίζει μεγαλύτερη



ειδικότητα για τον οστίτη ιστό και ταυτόχρονα δεν μεταβολίζεται πριν την απέκκρισή της από τους νεφρούς και δεν επηρεάζεται από την διατροφή (304,305).

Οι τιμές της πυριδινολίνης και της δεοξυπυριδινολίνης ανευρίσκονται αυξημένες στην παιδική και εφηβική ηλικία, αλλά και σε ορισμένες παθήσεις, όπως στο αρχικό στάδιο της οστεοπόρωσης, στον υπερθυρεοειδισμό και στον υπερπαραθυρεοειδισμό (289,308,309). Η χορήγηση διφωσφονικών συμβάλλει στη μείωση των επιπέδων των δύο παραγώγων (289).

#### ***5. Δεσμοί πυριδινολίνης του κολλαγόνου τύπου I των ούρων***

Η αποβολή στα ούρα των δεσμών του υδροξυπυριδινίου του κολλαγόνου τύπου I είναι δείκτης της οστικής απορρόφησης και δεν επηρεάζεται από την πρόσληψη ασβεστίου και κολλαγόνου από τις τροφές. Αποτελεί λοιπόν ακριβέστερο δείκτη της οστικής απορρόφησης από το ασβέστιο και την υδροξυπρολίνη των ούρων. Επιπρόσθετα, επειδή το σύνολο των δεσμών δεοξυπυριδινολίνης και των NTX-I και CTX-I συνδεδεμένων με πεπτίδια διασταυρούμενων δεσμών πυριδινίου προέρχονται σχεδόν αποκλειστικά από το κολλαγόνο τύπου I των οστών, η μέτρησή τους αποτελεί ειδικό δείκτη της οστικής απορρόφησης (292,310,311).

#### ***6. Γαλακτοζυλιωμένη υδροξυλυσίνη***

Η γαλακτοζυλιωμένη υδροξυλυσίνη είναι ένα αμινοξύ του κολλαγόνου, το οποίο απελευθερώνεται κατά την αποδόμηση του κολλαγόνου και δεν επαναχρησιμοποιείται. Συνεπώς, η γαλακτοζυλιωμένη υδροξυλυσίνη είναι ένας δείκτης της οστικής απορρόφησης. (283,285,312).



## ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΗΣ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗΣ

---

---

### Η κληρονομικότητα της οστικής μάζας

Οι γενετικοί παράγοντες διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στον καθορισμό της BMD. Αναλύσεις σύνδεσης σε οικογένειες καθώς και αναλύσεις συσχέτισης υποψήφιων γονιδίων στο γενικό πληθυσμό ή σε μελέτες δείκτου-ελέγχου δεικνύουν ότι οι γενετικοί παράγοντες ευθύνονται για το 60-85% της μεταβλητότητας στην BMD (13-17). Εντούτοις, αν και πολυάριθμες μελέτες έχουν διενεργηθεί πάνω στη γενετική προδιάθεση για την εμφάνιση της οστεοπόρωσης, λίγα γονίδια έχουν ταυτοποιηθεί (18-21). Από την άλλη πλευρά, αξιοσημείωτη είναι η συμβολή των περιβαλλοντικών παραγόντων στον καθορισμό του κινδύνου για οστεοπόρωση. Στον όρο περιβαλλοντικοί παράγοντες περιλαμβάνονται η διατροφή και η φυσική άσκηση (εξωτερικό περιβάλλον), καθώς και τα στεροειδή των γονάδων (εσωτερικό περιβάλλον). Οι αλληλεπιδράσεις γονιδίου-περιβάλλοντος διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στην απόκριση του σκελετού στη διατροφή και την άσκηση κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και επηρεάζουν το βαθμό της επίδρασης των πολυμορφισμών στις φαινοτυπικές εκδηλώσεις της οστικής μάζας (313-315).

Από διάφορες μελέτες, όπου συγκρίθηκε η BMD ανάμεσα σε γονείς και απογόνους καθώς επίσης ανάμεσα σε μονοζυγωτικούς και διζυγωτικούς διδύμους (13,15,316), έχει διαπιστωθεί οικογενής ομοιότητα όσον αφορά την οστική μάζα και συγκεκριμένα ανάμεσα στις κόρες και τις μητέρες. Η ομοιότητα αυτή καθορίζεται γενετικά και μάλιστα εκφράζεται στις κόρες πολύ πριν το στάδιο της εφηβείας (317). Επίσης, μελέτες δεικνύουν ότι η μειωμένη BMD είναι σύνηθες εύρημα στους γιους των αντρών που πάσχουν από ιδιοπαθή οστεοπόρωση (318) και στις κόρες των γυναικών με οστεοπόρωση (319).

Πολυποίκιλοι λοιπόν παράγοντες επιδρούν με διαφορετικό τρόπο στην έκφραση των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την οστεοπόρωση, γεγονός που εξηγεί τις διαφορές που υπάρχουν μεταξύ ατόμων του ίδιου ή του αντίθετου φύλου όσον αφορά την κληρονομικότητα της BMD (320). Σε ορισμένες μελέτες δεν κατεγράφησαν σημαντικές διαφορές στην κληρονομικότητα της BMD ανάμεσα στα δύο φύλα (321,322), ενώ σε δύο άλλες μελέτες κατεγράφησαν διαφορές και συγκεκριμένα βρέθηκε ότι η BMD κληρονομήθηκε σε μεγαλύτερο ποσοστό στους άντρες από ό,τι στις γυναίκες (323,324).

Η κληρονομικότητα όσον αφορά τα κατάγματα κυμαίνεται μεταξύ 25-48% (325-327). Διάφοροι παράγοντες, τοπικοί ή μη, επηρεάζουν την πρόκληση των καταγμάτων, όπως η γεωμετρία του αυχένα του μηριαίου οστού, τα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά του οστού όπως αναδεικνύονται στον υπερηχοτομογραφικό έλεγχο, η ελάττωση της απορρόφησης της δόνησης από τους μαλακούς ιστούς, οι δείκτες της οστικής ανακατασκευής, καθώς επίσης καταστάσεις που προδιαθέτουν σε πτώσεις ιδίως σε ηλικιωμένους (διαταραχές όρασης, νευρομυϊκές διαταραχές, φάρμακα που επηρεάζουν την ισορροπία, περιβάλλον διαβίωσης (ιδρύματα) (328-330).

Η απόφαση για έλεγχο πιθανής οστεοπόρωσης με τη μέτρηση της BMD θα πρέπει να βασίζεται στη συνεκτίμηση όλων των κλινικών παραγόντων κινδύνου (330) (Πίνακας 2). Η BMD σε συνδυασμό με τους κλινικούς παράγοντες κινδύνου καθορίζουν τον κίνδυνο κατάγματος ενός ατόμου, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization ή WHO) και τις Ευρωπαϊκές οδηγίες για τη διάγνωση και τη θεραπεία της οστεοπόρωσης στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Αρκετές μελέτες δείχνουν ότι το οικογενειακό ιστορικό καταγμάτων αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα κινδύνου των καταγμάτων και μάλιστα ανεξάρτητο από την BMD (331,332). Πιο αναλυτικά, οι γυναίκες, των οποίων η μητέρα έχει ιστορικό κατάγματος ισχίου, παρουσιάζουν διπλάσια πιθανότητα για κάταγμα σε σύγκριση με τις γυναίκες οι οποίες δεν έχουν οικογενειακό ιστορικό κατάγματος (9). Η κληρονομικότητα της οστικής μάζας καθώς επίσης και της ποιότητας του οστού ευθύνεται για αυτό (333). Ο κίνδυνος των καταγμάτων του καρπού κληρονομείται στις γυναίκες και επηρεάζεται από γονίδια, τα οποία είναι ανεξάρτητα εκείνων που επηρεάζουν την BMD (334). Το εύρημα ότι οι πολυμορφισμοί που καθορίζουν την BMD δεν καθορίζουν απαραίτητα και την επιδεκτικότητα για οστεοπορωτικά κατάγματα (334,335), συνηγορεί υπέρ της άποψης

**Πίνακας 2.** Παράγοντες κινδύνου για οστεοπόρωση

<p>Δημογραφικά χαρακτηριστικά</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Λευκή φυλή</li> <li>▪ Ηλικία</li> <li>▪ Φύλο</li> </ul> <p>Έξεις της καθημερινότητας</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ↓ πρόσληψη ασβεστίου</li> <li>▪ ↓ πρόσληψη βιταμίνης D (δίαιτα, ↓ έκθεση στον ήλιο)</li> <li>▪ ↑κατανάλωση καφέ</li> <li>▪ Κάπνισμα</li> <li>▪ Αλκοόλ</li> <li>▪ ↓ άσκηση / κινητικότητα</li> <li>▪ Παρατεταμένη κατάκλιση</li> </ul> <p>Ατομικό αναμνηστικό</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ↓ ρυθμός ανάπτυξης στην παιδική ηλικία</li> <li>▪ ↓ οστική πυκνότητα</li> <li>▪ Προηγθέν αυτόματο κατάγμα</li> <li>▪ Νοσήματα <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Σακχαρώδης διαβήτης</li> <li>✓ Υπερθυρεοειδισμός</li> <li>✓ Υπερπαραθυρεοειδισμός</li> <li>✓ Άλλα ενδοκρινικά νοσήματα (π.χ. προλακτίνωμα)</li> <li>✓ Σύνδρομο δυσαπορρόφησης</li> <li>✓ Φλεγμονώδη νοσήματα γαστρεντερικού συστήματος</li> <li>✓ Φλεγμονώδη νοσήματα μυοσκελετικού συστήματος</li> <li>✓ Χρόνια νεφρική νόσος / νεφρική οστεοδυστροφία</li> <li>✓ Υπογοναδισμός</li> <li>✓ Νευρογενής ανορεξία</li> <li>✓ Κατάθλιψη</li> <li>✓ Νευρολογικά νοσήματα (λόγω ακινητοποίησης του ασθενούς)</li> <li>✓ κ.ά.</li> </ul> </li> <li>▪ Γενετικές ανωμαλίες</li> <li>▪ Καταστάσεις που προδιαθέτουν σε πτώσεις</li> </ul> <p>Γυναικολογικό ιστορικό</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ όψιμη εμμηναρχή</li> <li>▪ πρόωρη εμμηνόπαυση</li> <li>▪ παρατεταμένη γαλουχία</li> </ul> <p>Κληρονομικό αναμνηστικό</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Ιστορικό αυτόματου κατάγματος σε συγγενή α΄ βαθμού (μητέρα, αδελφή)</li> </ul> <p>Φάρμακα</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Γλυκοκορτικοειδή (χρόνια λήψη &gt; 5mg πρεδνιζόνης / ημέρα για &gt; 6 μήνες)</li> <li>▪ Αντιεπιληπτικά (επηρεάζουν ομοιοστασία βιταμίνης D)</li> <li>▪ Αντιόξινα (παρεμποδίζουν την απορρόφηση του ασβεστίου)</li> <li>▪ Φάρμακα που προκαλούν υπογοναδισμό (LHRH αγωνιστές, αναστολείς αρωματάσης)</li> <li>▪ Βενζοδιαζεπίνες</li> <li>▪ Θυροξίνη</li> <li>▪ κ.ά</li> </ul>
---

ότι η κληρονομικότητα του κατάγματος ως ένα βαθμό είναι ανεξάρτητη της BMD (330,336). Η κληρονομικότητα των φαινοτύπων που σχετίζονται με την οστεοπόρωση φαίνεται στον Πίνακα 3.

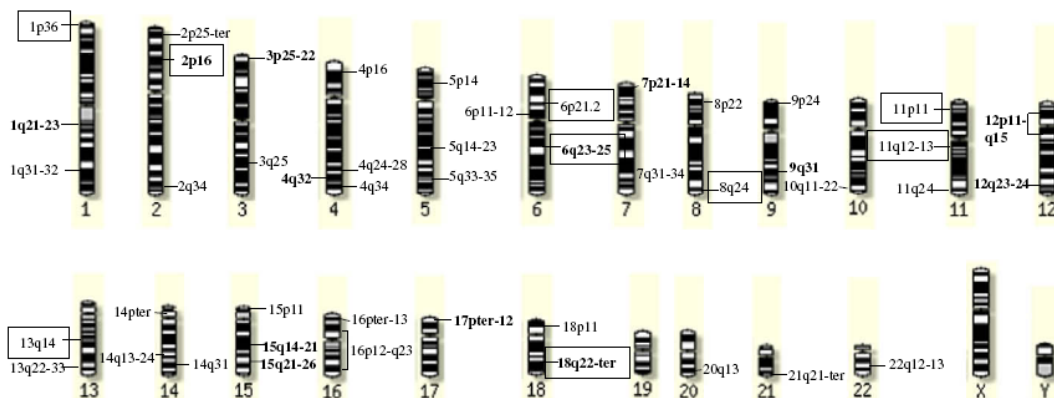
**Πίνακας 3.** Κληρονομικότητα των φαινοτύπων που σχετίζονται με την οστεοπόρωση (337).

Φαινότυπος	Κληρονομικότητα (%)
Οστική πυκνότητα	50-80%
Γεωμετρία του ισχίου	70-85%
Οστική ανακατασκευή (βιοχημικοί δείκτες)	40-70%
Μικροαρχιτεκτονική του οστού	50-60%
Κάταγμα	25-48%

### Περιοχές ποσοτικών χαρακτηριστικών για την οστεοπόρωση (QTLs)

Οι μεταλλάξεις των γονιδίων, οι οποίες αποτελούν την αιτία για τις μονογονιδιακές σκελετικές διαταραχές, δύνανται εύκολα να χαρτογραφηθούν με την βοήθεια των αναλύσεων σύνδεσης. Αντιθέτως, η ανίχνευση των γονιδίων που ευθύνονται για την οστεοπόρωση, η οποία είναι πολυπαραγοντική νόσος, αποτελεί δύσκολη διαδικασία.

Ορισμένες μελέτες που διενεργήθηκαν σε οικογένειες έχουν ταυτοποιήσει τις QTLs, οι οποίες συνδέονται με την BMD και εντοπίζονται σε διάφορα χρωμοσώματα (21). (Εικόνα 8).



**Εικόνα 8.** Περιοχές ιδιαίτερων ποσοτικών χαρακτηριστικών (QTLs) για τη BMD στους Καυκάσιους. Οι QTLs που επιβεβαιώθηκαν από μετα-ανάλυση σημειώνονται με έντονη γραφή, ενώ οι QTLs που ταυτοποιήθηκαν με γονιδιακή μελέτη συσχέτισης εφ' όλου του γενώματος (Genome-wide association study ή GWAS) περιβάλλονται από κουτάκια (337).

Έχουν ανιχνευθεί QTLs σε σύνδεση με την BMD, οι οποίες εμφανίζουν ειδικότητα για το φύλο (313). Όσον αφορά τις QTLs που συμβάλλουν στην φυσιολογική μεταβλητότητα της δομής του εγγύς μηριαίου οστού, έχουν σημειωθεί σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα δύο φύλα (338). Στο χρωμόσωμα 15q εντοπίζεται μία QTL σε σύνδεση με την BMD του αυχένα του μηριαίου οστού, η οποία παρουσιάζει μεγάλη ειδικότητα για τις νέες γυναίκες (339). Μία μετα-ανάλυση που αφορούσε τις QTLs

στις γυναίκες επιβεβαίωσε το αποτέλεσμα της προηγούμενης μελέτης (340). Επιπροσθέτως, η μελέτη FAMOS ανέδειξε μία QTL σε σύνδεση με την BMD, η οποία εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 10q21 και είναι ειδική για τους άντρες (323).

### **Πολυμορφισμοί γονιδίων που σχετίζονται με την οστεοπόρωση**

Οι πολυμορφισμοί των γονιδίων που σχετίζονται με την οστεοπόρωση έχουν ταυτοποιηθεί είτε με μελέτες συσχέτισης υποψήφιων γονιδίων (Candidate gene association studies ή CGASs), είτε με γονιδιακές μελέτες συσχέτισης εφ' όλου του γενώματος (Genome-wide association studies ή GWASs). Στις CGASs οι περισσότεροι πολυμορφισμοί γονιδίων έχουν διερευνηθεί κυρίως όσον αφορά τη σχέση τους με την BMD ή τον κίνδυνο κατάγματος (21,341). Οι πρόσφατες GWASs έχουν επαληθεύσει ορισμένα ευρήματα των CGASs. Σημειωτέον, ότι ολιγάριθμες μετα-αναλύσεις μελετών εστιασμένων σε συγκεκριμένους πολυμορφισμούς έχουν διενεργηθεί.

Ακολουθεί αναλυτική περιγραφή των γονιδίων που έχουν συσχετιστεί με την οστεοπόρωση.

#### **1. Γονίδιο *LRP5***

Το γονίδιο *LRP5* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη LRP5. Η πρωτεΐνη LRP5 αποτελεί ένα διαμεμβρανικό συν-υποδοχέα για τις πρωτεΐνες Wnt στο κανονικό μονοπάτι σηματοδότησης Wnt (25). Το γονίδιο *LRP5* είναι μέλος της οικογένειας που σχετίζεται με τον υποδοχέα LDLR και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 11q12-13, το οποίο έχει ταυτοποιηθεί ότι περιλαμβάνει μία QTL που αφορά τη BMD και το ύψος στους Καυκάσιους (26,27).

Το γονίδιο *LRP5* διαδραματίζει έναν ουσιαστικό ρόλο στη ρύθμιση της οστικής μάζας, ο οποίος ταυτοποιήθηκε αρχικά από τη μελέτη των σπάνιων μονογονιδιακών σκελετικών παθήσεων στον άνθρωπο. Οι παθογενετικές μεταλλάξεις του γονιδίου *LRP5* επηρεάζουν τους οστεοβλάστες με αποτέλεσμα την αύξηση ή τη μείωση της οστικής μάζας, ενώ η ενεργότητα των οστεοκλαστών διατηρείται αμετάβλητη (112,114,342,343).

Οι παθογενετικές μεταλλάξεις και οι πολυμορφισμοί του γονιδίου *LRP5* έχουν συσχετιστεί με ένα ευρύ φάσμα σκελετικών διαταραχών (Εικόνα 3). Οι

ενεργοποιητικές μεταλλάξεις του γονιδίου *LRP5* κληρονομούνται με αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα και προκαλούν το σύνδρομο HBM (113,196). Η μετάλλαξη G171V, η οποία προκαλεί το σύνδρομο HBM, εντοπίζεται στο εξόνιο 3 του γονιδίου *LRP5* και οφείλεται στην αντικατάσταση της γουανίνης (G) από θυμίνη (T) με αποτέλεσμα την αλλαγή του αμινοξέος γλυκίνη σε βαλίνη στη θέση 171 (113,196). Έχει αναφερθεί ότι η μετάλλαξη αυτή διαταράσσει το μοτίβο της πρώτης β-έλικας της εξωκυττάριας περιοχής της πρωτεΐνης *LRP5* και τροποποιεί την υδρόφοβη επιφάνειά της (344).

Οι απενεργοποιητικές μεταλλάξεις στο ίδιο γονίδιο κληρονομούνται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα και οδηγούν στην εμφάνιση του σπάνιου συνδρόμου οστεοπόρωσης-ψευδογλοιώματος (Osteoporosis-pseudoglioma syndrome ή OPPG) (112). Έχουν ταυτοποιηθεί 12 μεταλλάξεις του γονιδίου *LRP5* ως η αιτία του συνδρόμου OPPG. Στο σύνδρομο αυτό παρατηρούνται σκελετικές δυσμορφίες και κατάγματα στην παιδική ηλικία λόγω της οστεοπόρωσης. Επίσης, οι ασθενείς εμφανίζουν τύφλωση, η οποία οφείλεται στην παραμονή των αγγείων του υαλοειδούς κατά τη διάρκεια της αγγείωσης του οφθαλμού (112). Πειράματα που έχουν διενεργηθεί σε ποντίκια δεικνύουν ότι οι απενεργοποιητικές μεταλλάξεις του γονιδίου *LRP5* συνηγορούν υπέρ της ανάπτυξης οστεοπόρωσης (114,345,346).

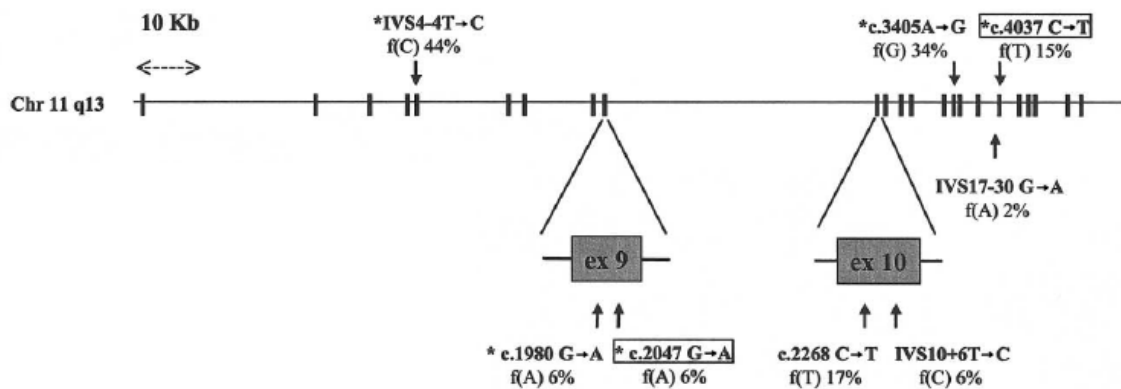
Επιπλέον, άλλες σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *LRP5* έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς με σκληρυντικές δυσπλασίες των οστών, όπως η αυτοσωμική επικρατής οστεοσκληρυνση, η ενδοοστική υπερόστωση, η νόσος van Buchem και η οστεοπέτρωση τύπου I (347,348). Σε ασθενείς με οικογενή εξιδρωματική υαλοειδοαμφιβληστροειδοπάθεια (Familial exudative vitreoretinopathy ή FEVR) και ανώμαλη αμφιβληστροειδική αγγειογένεση έχουν ταυτοποιηθεί πλαισιοτροποποιητικές μεταλλάξεις καθώς επίσης και σημειακές μεταλλάξεις. Οι ασθενείς με FEVR εμφανίζουν τύφλωση, οστεοπόρωση και κατάγματα (349).

Αξίζει να σημειωθεί ότι σε πειραματικό επίπεδο ποντίκια με έλλειψη της πρωτεΐνης *LRP5* ανέπτυξαν έναν φαινότυπο χαμηλής οστικής μάζας (114), ενώ διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία εξέφραζαν ένα μεταλλαγμένο γονίδιο *LRP5* είχαν αυξημένη BMD (350). Τα δεδομένα αυτά δεικνύουν ότι η σηματοδότηση Wnt διαμέσου της πρωτεΐνης *LRP5* παίζει σημαντικό ρόλο στην επίτευξη της κορυφαίας οστικής πυκνότητας.

Σε αρκετές δημοσιευμένες έως σήμερα μελέτες έχει αποδειχθεί ότι πέραν των προαναφερθέντων μεταλλάξεων και ορισμένοι πολυμορφισμοί του γονιδίου *LRP5*



σχετίζονται με την BMD (342,351-355) (Εικόνα 9). Ωστόσο, τα αποτελέσματα των μελετών αυτών είναι αντιφατικά κυρίως λόγω της ετερογένειας στην εθνικότητα ή στο σχεδιασμό της μελέτης. Σε ορισμένες μελέτες η συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών του γονιδίου *LRP5* και της BMD ήταν πιο ισχυρή στους άντρες (342,351). Το γεγονός αυτό πιθανώς υποδηλώνει ότι το γονίδιο *LRP5* ρυθμίζει την οστική μάζα με τρόπο που εξαρτάται από το φύλο. Επιπροσθέτως, δύο άλλες μελέτες αναφέρουν ότι ορισμένοι κοινοί πολυμορφισμοί του γονιδίου *LRP5* καθορίζουν τον κίνδυνο κατάγματος στις ηλικιωμένες γυναίκες (352,353).



**Εικόνα 9.** Σχηματικό διάγραμμα της εντόπισης των πολυμορφισμών στο γονίδιο *LRP5*. Οι κατακόρυφες γραμμές αναπαριστούν τα 23 εξόνια του γονιδίου *LRP5* και τα βέλη δεικνύουν τις θέσεις 8 πολυμορφισμών με ελάχιστη συχνότητα αλληλίου 2%. Οι πολυμορφισμοί που κωδικοποιούν σημειακές αντικαταστάσεις φαίνονται στα κουτάκια. Τα ποσοστά υποδηλώνουν τη συχνότητα του σπάνιου αλληλίου (351).

Από τους διάφορους πολυμορφισμούς του γονιδίου *LRP5* που έχουν μελετηθεί, το ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί σε δύο μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (Single-nucleotide polymorphisms ή SNPs) οι οποίοι αφορούν σε διαφορετικές περιοχές της πρωτεΐνης, τον V667M και τον A1330V.

Ο πολυμορφισμός V667M είναι μία σημειακή μετάλλαξη και συνίσταται στην αντικατάσταση της γουανίνης από αδενίνη στο εξόνιο 9, c.2047 G > A (rs4988321) με αποτέλεσμα την αντικατάσταση της βαλίνης από μεθειονίνη στη θέση 667 της πρωτεΐνης. Ο πολυμορφισμός V667M εντοπίζεται στην κορυφή της τρίτης β-έλικας στην εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα. Πιστεύεται ότι η περιοχή αυτή αλληλεπιδρά με τον Dkk1, ο οποίος είναι ένας αναστολέας του μονοπατιού της κανονικής σηματοδότησης Wnt. Επομένως, είναι πιθανόν ο εν λόγω πολυμορφισμός να παρουσιάζει αυξημένη συγγένεια σύνδεσης για τον Dkk1 (356).

Ο A1330V είναι ένας κοινός SNP, ο οποίος οφείλεται στην αντικατάσταση της κυτοσίνης από θυμίνη στο εξόνιο 18, c4037 C > T (rs3736228). Ο εν λόγω

πολυμορφισμός επιφέρει την αντικατάσταση της αλανίνης από βαλίνη στη θέση 1330 στην εξωκυττάρια περιοχή της πρωτεΐνης. Ο πολυμορφισμός A1330V εντοπίζεται εντός της τρίτης επανάληψης της ομοιάζουσας με τον υποδοχέα LDLR. Η λειτουργία της περιοχής αυτής δεν έχει διασαφηνιστεί πλήρως. Ωστόσο, φαίνεται ότι η συγκεκριμένη περιοχή διαμεσολαβεί στις αλληλεπιδράσεις του υποδοχέα με τους συνδέτες αυτού. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι παρόμοιες περιοχές στον υποδοχέα LDLR αλληλεπιδρούν με την περιοχή της έλικας οδηγώντας σε μία αλλαγή στη δομή της πρωτεΐνης. Επομένως, ο πολυμορφισμός A1330V ενδέχεται να τροποποιεί τη δομή και τη λειτουργία της πρωτεΐνης LRP5. Πράγματι, σε δύο πρόσφατες μελέτες αποδείχθηκε *in vitro* ότι ο πολυμορφισμός A1330V προκαλεί μείωση της σηματοδότησης Wnt (357,358). Εντούτοις, δεν έχει διασαφηνιστεί ακόμη ο μοριακός μηχανισμός με τον οποίο ο εν λόγω πολυμορφισμός επηρεάζει τη σηματοδότηση Wnt.

Στη μελέτη Rotterdam βρέθηκε ότι ο πολυμορφισμός A1330V του γονιδίου *LRP5* αλληλεπιδρά με έναν άλλο πολυμορφισμό (1062V) του γονιδίου *LRP6* (353). Η αλληλεπίδραση αυτή με τη σειρά της επηρεάζει τον κίνδυνο για κάταγμα. Επιπρόσθετα, στη μελέτη Rotterdam ο πολυμορφισμός A1330V συσχετίστηκε με σημαντική μείωση της BMD της οσφυϊκής μοίρας της σπονδυλικής στήλης και με αυξημένο κίνδυνο καταγμάτων ευθραυστότητας στη λεκάνη, το ισχίο και το εγγύς μηριαίο οστό στους ηλικιωμένους άντρες. Αντιθέτως, δεν παρατηρήθηκε καμία συσχέτιση στις γυναίκες (353).

Στη μελέτη Framingham που περιελάμβανε 1.797 άτομα βρέθηκε μία σημαντική αλληλεπίδραση ανάμεσα στον πολυμορφισμό A1330V και τη φυσική άσκηση όσον αφορά την BMD στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης στους άντρες. Πιο αναλυτικά, ο πολυμορφισμός A1330V φάνηκε να τροποποιεί την επίδραση της φυσικής άσκησης στην BMD στους άντρες. Οι παρατηρήσεις αυτές προτείνουν ότι το γονίδιο *LRP5* μπορεί να εμπλέκεται στην προσαρμογή του οστού στο μηχανικό φορτίο. Επιπλέον, η αλληλεπίδραση του πολυμορφισμού A1330V με την φυσική άσκηση θα μπορούσε να εξηγήσει μερικές διαφορές που παρατηρούνται στην οστική μάζα και σχετίζονται με το φύλο (359). Στην ίδια μελέτη ο πολυμορφισμός A1330V συσχετίστηκε με την BMD του ισχίου σε άντρες ηλικίας μικρότερης ή ίσης των 60 ετών, ενώ ο πολυμορφισμός V667M συσχετίστηκε στατιστικώς σημαντικά με την BMD στο τρίγωνο του Ward σε άντρες της ίδιας ηλικίας (357).

Σε μία πολυκεντρική μελέτη στην οποία συμμετείχαν 37.534 άτομα από 18 κέντρα από την Ευρώπη και την Βόρεια Αμερική, βρέθηκε ότι οι πολυμορφισμοί V667M και A1330V σχετίστηκαν στατιστικώς σημαντικά με χαμηλή BMD στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης και στον αυχένα του μηριαίου οστού, καθώς επίσης με τα σπονδυλικά κατάγματα και με κίνδυνο για κατάγματα κάθε είδους (356). Σε μία μελέτη στην οποία συμμετείχαν άντρες μέσης ηλικίας 50 ετών με ιδιοπαθή οστεοπόρωση και στους οποίους είχαν αποκλειστεί όλα τα δευτεροπαθή αίτια της οστεοπόρωσης, οι πολυμορφισμοί V667M και A1330V και οι απλότυποι αυτών συσχετίστηκαν με τριπλάσιο κίνδυνο για χαμηλή οστική μάζα (360). Επιπλέον, πρέπει να σημειωθεί ότι σε μία άλλη μελέτη οι δύο συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί σχετίστηκαν με τις αλλαγές που παρατηρούνται για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο του ενός έτους στο μέγεθος των σπονδύλων και στην BMD της οσφυϊκής μοίρας της σπονδυλικής στήλης σε αγόρια που διανύουν το στάδιο της προεφηβείας. Οι πολυμορφισμοί σχετίστηκαν επίσης με την οστική μάζα οσφύος και το μέγεθος των σπονδύλων στους ενήλικες άντρες, συσχέτιση η οποία δεν επαληθεύτηκε στις γυναίκες (351).

## **2. Γονίδιο LRP6**

Διάφορες μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί του γονιδίου LRP6 έχουν μελετηθεί όσον αφορά τη σχέση τους με την οστεοπόρωση. Ο πιο συχνά μελετημένος πολυμορφισμός του γονιδίου LRP6 είναι ο Ile1062Val. Ο εν λόγω πολυμορφισμός έχει σχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο καταγμάτων σε ηλικιωμένους άντρες (353). Ωστόσο, σε μία πρόσφατη μετα-ανάλυση ο εν λόγω πολυμορφισμός δεν συσχετίστηκε με την BMD και τον κίνδυνο καταγμάτων (356). Επίσης, σε μία άλλη μελέτη βρέθηκε ότι δύο πολυμορφισμοί του γονιδίου LRP6, οι οποίοι είναι σε ανισορροπία σύνδεσης (Linkage disequilibrium ή LD) με τον Ile1062Val, συσχετίζονται με την BMD (361).

Σε μία οικογένεια που έπασχε από οστεοπόρωση και στεφανιαία νόσο ταυτοποιήθηκε μία σημειακή απενεργοποιητική μετάλλαξη του γονιδίου LRP6 (362). Μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ποντίκια έδειξε ότι μία άλλη σημειακή μετάλλαξη του γονιδίου LRP6 προκαλεί ανώμαλη μορφολογία του νευρικού σωλήνα, του αξονικού σκελετού και των δακτύλων (363). Επίσης, η αλληλεπίδραση μεταξύ

των πρωτεϊνών LRP5 και LRP6 παίζει σπουδαίο ρόλο στην ανάπτυξη των άκρων στα ποντίκια (345).

### **3. Γονίδιο *SOST***

Το γονίδιο *SOST* κωδικοποιεί την sclerostin, η οποία είναι μία πρωτεΐνη που εκφράζεται μόνο στα οστεοκύτταρα στον άνθρωπο (364). Η sclerostin συνδέεται στις πρωτεΐνες LRP5 και LRP6 και με τον τρόπο αυτό αναστέλλει την κανονική σηματοδότηση Wnt (205). Το γονίδιο *SOST* ρυθμίζει αρνητικά την οστική μάζα.

Οι απενεργοποιητικές μεταλλάξεις του γονιδίου *SOST* οδηγούν στην εμφάνιση της αυτοσωμικής υπολειπόμενης σκληροστέωσης (365,366). Ποντίκια με γενετική έλλειψη της πρωτεΐνης sclerostin είχαν αυξημένη οστική μάζα (367), ενώ διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία υπερεξέφραζαν το γονίδιο *SOST* ανέπτυξαν έναν φαινότυπο χαμηλής οστικής μάζας (368). Αντίστροφα, σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *LRP5* οι οποίες παρεμποδίζουν τη σύνδεση της sclerostin με τις πρωτεΐνες LRP5 και LRP6, συνδέονται με παθήσεις αυξημένης οστικής μάζας (369).

Αρκετές μελέτες με πρώτη τη μελέτη Rotterdam διερεύνησαν και εν συνεχεία τεκμηρίωσαν την παρουσία συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών που εντοπίζονται στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου *SOST* καθώς επίσης και σε μία άλλη περιοχή, η οποία βρίσκεται 32-kb πιο κάτω από το γονίδιο *SOST*, με την BMD (370-373). Σημειωτέον, ότι μία ομόζυγη διαγραφή 52-kb στην περιοχή που εντοπίζεται 32-kb πιο κάτω από το γονίδιο *SOST* είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση της νόσου van Buchem (374).

### **4. Γονίδιο *TNFRSF11B***

Η OPG δρα ως ένας διαλυτός ψεύτικος υποδοχέας για τον RANKL και με τον τρόπο αυτό ασκεί καθοριστικό ρόλο στην αναστολή της διαφοροποίησης και της λειτουργίας των οστεοκλαστών (60,214). Το γονίδιο που κωδικοποιεί την OPG (*TNFRSF11B*) έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 8q24.2 (278). Πολλοί ερευνητές έχουν εξετάσει τη σχέση διαφόρων πολυμορφισμών του γονιδίου της OPG με την BMD κυρίως σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (375-388).

Ο πιο συχνά μελετημένος πολυμορφισμός του γονιδίου της OPG είναι ο G1181C, ο οποίος εντοπίζεται στο εξόνιο 1 και περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1998

(389). Οφείλεται σε αντικατάσταση της γουανίνης (G) από κυτοσίνη (C) και επιφέρει την αντικατάσταση του αμινοξέος λυσίνη (Lys) από το αμινοξύ ασπαραγίνη (Asn) στη θέση 3 του πεπτιδίου σήμανσης της OPG (Lys3Asn). Ο πολυμορφισμός G1181C έχει συσχετιστεί με αύξηση της BMD της ΟΜΣΣ στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Συγκεκριμένα, οι γυναίκες που έφεραν το γονότυπο CC είχαν στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερη BMD στην οσφύ σε σχέση με εκείνες που έφεραν τους γονότυπους GG ή GC (375,377,379,380-382). Η επίδραση του γονότυπου στη BMD ήταν είτε δοσοεξαρτώμενη (380-382), είτε όχι (375,377). Ωστόσο, υπάρχουν αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία όπου ο πολυμορφισμός G1181C δεν συσχετίστηκε με την BMD στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (383-385). Σε μία πρόσφατη μετα-ανάλυση ο πολυμορφισμός G1181C συσχετίστηκε στους μεν Ευρωπαίους με την BMD της οσφύς, του ολικού ισχίου και του αυχένα του μηριαίου, στους δε Ασιάτες μόνο με την BMD της οσφύς (390). Τα αποτελέσματα των διαφόρων μελετών είναι αντιφατικά εξαιτίας της ύπαρξης εθνικών διαφορών. Ο μηχανισμός με τον οποίο ο εν λόγω πολυμορφισμός επηρεάζει την BMD παραμένει άγνωστος. Είναι πιθανόν ότι ο πολυμορφισμός τροποποιεί τη διακίνηση της πρωτεΐνης ενδοκυτταρίως ή την έκκρισή της. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η τελική επίδραση του πολυμορφισμού G1181C στην BMD είναι το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασής του με τους πολυμορφισμούς των γονιδίων που κωδικοποιούν για τα μέλη της υπερικογένειας του TNF ή με πολυμορφισμούς του γονιδίου του υποδοχέα της βιταμίνης D (Vitamin D receptor ή VDR) (391). Προκειμένου να διευκρινιστεί αν ο πολυμορφισμός αυτός είναι λειτουργικός, απαιτείται η διενέργεια λειτουργικών μελετών.

Στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της OPG έχουν ταυτοποιηθεί οι πολυμορφισμοί A163G, T245G, T950C και G209A. Για το αλληλίο G του πολυμορφισμού A163G έχει αναφερθεί ότι εμφανίζεται με αυξημένη συχνότητα στους ασθενείς με σπονδυλικά κατάγματα (377). Ωστόσο, σε άλλες μελέτες δεν έχει καταγραφεί συσχέτιση του πολυμορφισμού A163G με την BMD της οσφύς, του αυχένα του μηριαίου οστού ή του ολικού ισχίου σε περι- ή μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (379,381). Ο πολυμορφισμός T245G έχει συσχετιστεί με μειωμένη BMD στην ΟΜΣΣ, στον αυχένα του μηριαίου οστού και στην κερκίδα σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες από την Ιαπωνία (378). Επιπροσθέτως, ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός συσχετίστηκε με μειωμένη BMD στην ΟΜΣΣ σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες από την Σλοβενία (376). Στη μελέτη των Langdahl και συν. φάνηκε ότι η συχνότητα του αλληλίου G του πολυμορφισμού T245G είναι

αυξημένη σε ασθενείς με οστεοπόρωση συγκριτικά με υγιείς μάρτυρες, χωρίς ωστόσο να μπορεί να τεκμηριωθεί συσχέτιση του πολυμορφισμού με την BMD. Στην ίδια μελέτη, το αλληλίο G συσχετίστηκε με τα σπονδυλικά κατάγματα και στα δύο φύλα (377). Σημειωτέον, ότι αυξημένη συχνότητα του αλληλίου G σε οστεοπορωτικούς ασθενείς έχει παρατηρηθεί και σε άλλη μελέτη (392). Αντιθέτως, άλλοι ερευνητές δεν κατέγραψαν στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού T245G και της BMD της οσφύος ή του ολικού ισχίου στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (375,381,386). Όσον αφορά τον πολυμορφισμό T950C, στις περισσότερες μελέτες δεν συσχετίστηκε με την BMD στην ΟΜΣΣ ή στον αυχένα του μηριαίου οστού (376,387,388,393). Αντιθέτως, μία μελέτη ανέδειξε ότι ο πολυμορφισμός T950C συμβάλλει στον καθορισμό της οστικής μάζας και συγκεκριμένα ότι ο γονότυπος CC σχετίζεται με αυξημένη BMD (392). Σε μία πρόσφατη μελέτη, ο απλότυπος GATG του SNP G209A με τον SNP T245G συσχετίστηκε με μειωμένη BMD της οσφύος σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με οστεοπόρωση (376). Αντιθέτως, ο πολυμορφισμός αυτός δεν συσχετίστηκε με την BMD της οσφύος ή του αυχένα του μηριαίου οστού σε μία άλλη μελέτη που επίσης διενεργήθηκε σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (381). Οι πολυμορφισμοί που εντοπίζονται στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της OPG ενδέχεται να μεταβάλλουν τη σύνδεση των διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η μεταγραφή και ως εκ τούτου η έκφραση της OPG (394,395).

Μία πρόσφατη GWAS απέδειξε ότι ο πολυμορφισμός rs4355801 του γονιδίου της OPG συσχετίστηκε με την BMD της οσφύος και του αυχένα του μηριαίου οστού (396). Επιπροσθέτως, σε μία άλλη GWAS οι πολυμορφισμοί rs6993813 και rs64469804 συσχετίστηκαν με την BMD της οσφύος και του ισχίου. Στο σημείο αυτό αξίζει να τονιστεί ότι οι δύο αυτοί πολυμορφισμοί είναι σε LD με τους G1181C και A163G (397). Μία πρόσφατη μετα-ανάλυση 5 GWASs επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα των δύο προαναφερθέντων GWAS (398).

### **5. Γονίδιο TNFRSF11**

Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου TNFRSF11 που κωδικοποιεί τον RANKL έχουν συσχετιστεί με την BMD στο ισχίο (399).

Ο πολυμορφισμός rs9594782 έχει συσχετιστεί με μειωμένη BMD στο ισχίο καθώς επίσης και με μειωμένη ολοσωματική BMD σε άντρες Κινεζικής καταγωγής (400).

Μία μελέτη η οποία διενεργήθηκε σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες που εμφάνιζαν οστεοπόρωση κατέδειξε ότι ο πολυμορφισμός -290C>T του γονιδίου που κωδικοποιεί τον RANKL συσχετίστηκε στατιστικώς σημαντικά με την BMD της οσφύς (391).

Στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου εντοπίζονται οι πολυμορφισμοί rs12585014 και rs7988338, ενώ ο rs2148073 βρίσκεται στο ιντρόνιο 2. Οι τρεις αυτοί πολυμορφισμοί, οι οποίοι είναι σχεδόν σε πλήρη LD, σχετίστηκαν με τον δείκτη συμπίεστικής ισχύος του αυχένα του μηριαίου οστού (femoral neck compression strength index) σε μία μελέτη (401).

Μία πρόσφατη GWAS απέδειξε ότι ο rs9594759 συσχετίστηκε με την BMD στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης (397). Την εν λόγω συσχέτιση επιβεβαίωσε μία πρόσφατη μετα-ανάλυση 5 GWASs (398).

## **6. Γονίδιο TNFRSF11A**

Το γονίδιο TNFRSF11A κωδικοποιεί τον RANK. Ολιγάριθμες μελέτες έχουν διαπραγματευτεί τη σχέση μεταξύ πολυμορφισμών του συγκεκριμένου γονιδίου με την BMD.

Σε μία μελέτη στην οποία αναλύθηκαν 18 πολυμορφισμοί του γονιδίου TNFRSF11A φάνηκε ότι ορισμένοι συσχετίστηκαν με την BMD σε διάφορες σκελετικές θέσεις (399). Αντιθέτως, μία μελέτη που διενεργήθηκε σε Καυκάσιους δεν έδειξε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα σε πολυμορφισμούς του συγκεκριμένου γονιδίου και στην BMD (401).

Ο πολυμορφισμός 575C>T δεν συσχετίστηκε με την BMD σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες από την Κορέα (380,402). Αντιθέτως, μία άλλη μελέτη αναφέρει συσχέτιση του εν λόγω πολυμορφισμού με την BMD στους άντρες (400).

Ορισμένοι ερευνητές κατέγραψαν συσχέτιση μεταξύ δύο πολυμορφισμών του γονιδίου του RANK, οι οποίοι εντοπίζονται σε ιντρόνια, και της BMD στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης (402).

Μία πρόσφατη GWAS έδειξε ότι ο πολυμορφισμός rs3018362 του γονιδίου TNFRSF11A σχετίζεται στατιστικώς σημαντικά με την BMD του ισχίου (373).

Αξίζει να τονιστεί το γεγονός ότι η εν λόγω συσχέτιση επαληθεύτηκε από μία μετα-ανάλυση η οποία περιελάμβανε 5 GWASs (398).

### **7. Γονίδιο υποδοχέα α των οιστρογόνων (*Estrogen receptor 1* ή *ESR1*)**

Η οιστραδιόλη παίζει σημαντικό ρόλο στην απόκτηση και τη διατήρηση της μέγιστης οστικής μάζας και στα δύο φύλα. Η έλλειψη των οιστρογόνων ενοχοποιείται στην παθογένεια της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης και στην οστεοπόρωση που παρατηρείται σε ηλικιωμένους άντρες (10,403-405). Το γονίδιο ESR1 κωδικοποιεί τον υποδοχέα α των οιστρογόνων, ο οποίος αποτελεί ένα βασικό λειτουργικό στοιχείο για τη ρύθμιση της οστικής μάζας. Οι περισσότεροι ερευνητές έχουν αναλύσει εκτενώς δύο πολυμορφισμούς του γονιδίου ESR1 που εντοπίζονται εντός του ιντρονίου 1 και οι οποίοι αναγνωρίζονται από τα περιοριστικά ένζυμα XbaI και PvuII. Τα αποτελέσματα μίας μελέτης υποδηλώνουν ότι οι πολυμορφισμοί αυτοί ρυθμίζουν τη μεταγραφή του γονιδίου ESR1 και για το λόγο αυτό μπορεί να είναι λειτουργικά σημαντικοί (406).

Στην αρχή τα αποτελέσματα των μελετών που προσπαθούσαν να διερευνήσουν τη συσχέτιση των πολυμορφισμών με την BMD, τα κατάγματα, τους δείκτες οστικής εναλλαγής και την οστική απώλεια στις γυναίκες ήταν αντικρουόμενα. Όμως, μία μετα-ανάλυση που περιελάμβανε πάνω από 5000 γυναίκες από 22 δημοσιευμένες μελέτες (11 σε Καυκάσιους και 11 σε Ασιάτες), διενεργηθείσες έως το 2001, ανέδειξε την παρουσία συσχέτισης μεταξύ του πολυμορφισμού XbaI (rs9340799), της BMD και των καταγμάτων. Συγκεκριμένα, οι ομοζυγώτες XX εμφάνιζαν σημαντικά υψηλότερη τιμή BMD (+1-2%) στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης ή στο ισχίο και μειωμένο κίνδυνο καταγμάτων σε σύγκριση με τους ομοζυγώτες για το αλληλίο κινδύνου (xx) (20). Μία άλλη μετα-ανάλυση δεδομένων 18.917 ατόμων από 8 ευρωπαϊκά κέντρα επιβεβαίωσε την παρουσία συσχέτισης μεταξύ του πολυμορφισμού XbaI με αυξημένο κίνδυνο κατάγματος, αλλά όχι με την BMD (407). Αυτό υποδεικνύει ότι ο εν λόγω πολυμορφισμός του γονιδίου ESR1 θα μπορούσε να επηρεάσει τον κίνδυνο κατάγματος με μηχανισμούς που δεν εξαρτώνται από την BMD, όπως για παράδειγμα επιδρώντας στη δομή και την ποιότητα του οστού ή στην οστική ανακατασκευή. Επιπλέον, τα αλληλίου του ESR1 συσχετίστηκαν με τις υπερηχογραφικές ιδιότητες του



οστού και το ρυθμό της οστικής απώλειας που παρατηρείται στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες σε μία άλλη μελέτη (408).

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό PvuII (rs2234693), μία άλλη μετα-ανάλυση κατέγραψε ασθενή συσχέτιση αυτού με την BMD στον αυχένα του μηριαίου οστού (409). Οι πολυμορφισμοί rs3020314 και rs1884051 του γονιδίου ESR1 έχουν σχετιστεί με τα κατάγματα του ισχίου (410). Μία πρόσφατη GWAS ταυτοποίησε την παρουσία συσχέτισης του πολυμορφισμού rs1999805 του γονιδίου ESR1 με την BMD (397), η οποία εν συνεχεία επαληθεύτηκε από μία μετα-ανάλυση 5 GWASs (398).

Αξίζει να σημειωθεί ότι η συσχέτιση των πολυμορφισμών με την οστική μάζα είναι πιο ευδιάκριτη όταν υπάρχει μία σταθερή τιμή οιστραδιόλης, όπως συμβαίνει ως επί το πλείστον στις γυναίκες μεταξύ εμμηναρχής και εμμηνόπαυσης.

#### **8. Γονίδιο υποδοχέα β των οιστρογόνων (*Estrogen receptor 2 ή ESR2*)**

Το γονίδιο ESR2 κωδικοποιεί τον υποδοχέα β των οιστρογόνων. Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου ESR2 έχουν μελετηθεί σε μικρότερο βαθμό σε σύγκριση με αυτούς του γονιδίου ESR1 όσον αφορά τη σχέση τους με την BMD και τον κίνδυνο κατάγματος. Περισσότερο ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί στον αριθμό των επαναλήψεων CA, ο οποίος έχει εξεταστεί κυρίως σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, Καυκάσιες (411,412) και Ασιάτισσες (413,414). Μία στατιστικώς σημαντική συσχέτιση του αριθμού των επαναλήψεων CA με την BMD του αυχένα του μηριαίου οστού παρατηρήθηκε στους απογόνους της μελέτης Framingham (412).

Αξίζει ιδιαίτερα να σημειωθεί ότι έχει παρατηρηθεί μία αλληλεπίδραση των γονιδίων ESR2 και ESR1 με άλλα γονίδια (IGF1, NR1P1) όσον αφορά την BMD στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (415,416).

#### **9. Γονίδια υποδοχέων α και γ που σχετίζονται με τα οιστρογόνα (*ESRRA και ESRRG*)**

Οι υποδοχείς που σχετίζονται με τα οιστρογόνα (Estrogen-related receptors ή ERR) ERR-α (ESRRA), ERR-β (ESRRB), και ERR-γ (ESRRG) είναι μία υποοικογένεια πυρηνικών υποδοχέων που σχετίζονται με την οικογένεια των υποδοχέων των οιστρογόνων. Οι συγκεκριμένοι υποδοχείς έχουν κοινά γονίδια-

στόχους καθώς επίσης και ίδιες περιοχές στις οποίες αναπτύσσουν τη δράση τους με τους υποδοχείς των οιστρογόνων (417). Η συσχέτιση ενός λειτουργικού πολυμορφισμού του γονιδίου ESRRΑ με την BMD έχει μελετηθεί στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με αντικρουόμενα αποτελέσματα (355,418).

Σε μία πολύ πρόσφατη μελέτη ταυτοποιήθηκε μία στατιστικώς σημαντική συσχέτιση ανάμεσα σε πολυμορφισμούς του γονιδίου ESRRG και στην BMD στις γυναίκες (419).

### **10. Γονίδιο CYP17A1**

Το γονίδιο CYP17A1 διαδραματίζει έναν σημαντικό ρόλο στη σύνθεση των οιστρογόνων και των ανδρογόνων. Οι απενεργοποιητικές μεταλλάξεις του γονιδίου CYP17A1 οδηγούν στην εμφάνιση οστεοπόρωσης και σε μειωμένη ανάπτυξη του σκελετού (420).

Ο πολυμορφισμός rs743572 του εν λόγω γονιδίου εντοπίζεται 34 βάσεις πιο πάνω από την θέση έναρξης της μετάφρασης (421). Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός έχει μελετηθεί για τη σχέση του με την BMD από διάφορους ερευνητές. Όμως, υπάρχει διαφωνία όσον αφορά τα αποτελέσματα των μελετών αυτών (422-428). Πιο αναλυτικά, ο εν λόγω πολυμορφισμός συσχετίστηκε με σημαντική μείωση της BMD σε άντρες ηλικίας 40-79 ετών, η οποία ωστόσο εκτιμήθηκε με τη μέθοδο της υπερηχοτομογραφίας (422). Μία μελέτη στην οποία συμμετείχαν προ- και μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες από την Ιαπωνία κατέδειξε ότι ο πολυμορφισμός rs743572 σχετίστηκε με αύξηση της BMD του αυχένα του μηριαίου οστού (425). Αντιθέτως, σε μία άλλη μελέτη ο πολυμορφισμός συσχετίστηκε με μειωμένη BMD της οσφύς και του αυχένα του μηριαίου οστού σε λεπτόσωμες περιεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, αλλά όχι σε υπέρβαρες (428).

### **11. Γονίδιο CYP19A1**

Το γονίδιο CYP19A1 κωδικοποιεί την αρωματάση, η οποία είναι ένα ένζυμο του κυτοχρώματος P450 που αρωματοποιεί τα ανδρογόνα σε οιστρογόνα (429,430). Απενεργοποιητικές μεταλλάξεις του γονιδίου CYP19A1 έχουν ταυτοποιηθεί σε ασθενείς με οστεοπόρωση (431,432).

Πολυάριθμες μελέτες έχουν διερευνήσει τη σχέση μεταξύ πολυμορφισμών του γονιδίου CYP19A1 με την BMD και τα κατάγματα (399,427,433-440). Μία πολύ πρόσφατη μελέτη η οποία διενεργήθηκε σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες κατέγραψε μία σημαντική συσχέτιση μεταξύ πολυμορφισμών του γονιδίου CYP19A1 και της BMD. Ωστόσο, αξίζει να τονιστεί ο σημαντικός ρόλος της ηλικίας στη συγκεκριμένη μελέτη δεδομένου ότι στατιστική σημαντικότητα κατεγράφη σε μία υποομάδα ατόμων ηλικίας ίσης ή μεγαλύτερης των 67 ετών, ενώ δεν παρατηρήθηκε το ίδιο και στα άτομα νεαρότερης ηλικίας (441). Επιπροσθέτως, δύο προηγούμενες μελέτες δεν τεκμηρίωσαν συσχέτιση μεταξύ πολυμορφισμών του γονιδίου CYP19A1 και της BMD στις πρώιμα μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (416,442).

## **12. Γονίδιο υποδοχέα βιταμίνης D (VDR)**

Το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον υποδοχέα VDR ήταν το πρώτο γονίδιο που μελετήθηκε για τη σχέση του με τη BMD. Η συσχέτιση του γονιδίου VDR με την BMD είναι σε μεγάλο βαθμό αμφιλεγόμενη, καθώς υπάρχουν μελέτες που παρουσιάζουν θετική συσχέτιση ορισμένων πολυμορφισμών του γονιδίου VDR με την BMD (19,443) και άλλες αρνητική (444).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι πολυμορφισμοί που εντοπίζονται στην περιοχή 3' του γονιδίου VDR και αναγνωρίζονται από τα περιοριστικά ένζυμα BsmI, ApaI και TaqI.

Η μελέτη Rotterdam αποτελεί την πιο περιεκτική μελέτη όσον αφορά τη σχέση των αλληλίων πολυμορφισμών του γονιδίου VDR με την οστεοπόρωση. Οι γονότυποι και οι απλότυποι ορισμένων πολυμορφισμών του γονιδίου VDR αναλύθηκαν σε 6.418 άτομα (443). Τα αλληλία που ταυτοποιήθηκαν εντοπίστηκαν στην 3' αμετάφραστη περιοχή (Untranslated region ή UTR) και στην περιοχή του υποκινητή. Τα αλληλία αυτά συσχετίστηκαν με αυξημένο κίνδυνο κατάγματος. Σε μία υποομάδα ατόμων που ήταν φορείς των δύο αλληλίων κινδύνου και από τις δύο περιοχές βρέθηκε επίσης αυξημένος κίνδυνος κατάγματος σε σύγκριση με τα υγιή άτομα. Μερικά από τα αλληλία αυτά, μόνα τους ή σε συνδυασμό (απλότυποι), θα μπορούσαν να τροποποιήσουν τη σταθερότητα και το επίπεδο έκφρασης του mRNA (443). Αυτό έγινε εμφανές σε λειτουργικές μελέτες στις οποίες διαπιστώθηκε ότι ο απλότυπος κινδύνου, ο ευρισκόμενος στην 3' UTR περιοχή, σχετίζεται με αυξημένη διάσπαση του VDR mRNA και ο απλότυπος του υποκινητή σχετίζεται με μειωμένη

έκφραση του γονιδίου VDR. Ο συνδυασμός των δύο αυτών απλοτύπων κινδύνου έχει ως αποτέλεσμα την ύπαρξη ενός χαμηλότερου επιπέδου VDR mRNA εξαιτίας της αυξημένης διάσπασης του VDR mRNA και της μειωμένης έκφρασης του γονιδίου VDR. Ιδιαίτερη έμφαση πρέπει να δοθεί στο γεγονός ότι τα δύο αυτά αλληλία ενώ συσχετίστηκαν με αυξημένο κίνδυνο κατάγματος, δεν συσχετίστηκαν με διαφορές στην BMD. Επομένως, παραμένει άγνωστος ο μηχανισμός με τον οποίο οι δύο αυτοί πολυμορφισμοί προδιαθέτουν σε αυξημένο κίνδυνο κατάγματος. Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι η συσχέτιση δεν θα ήταν στατιστικά σημαντική αν είχε εφαρμοστεί διόρθωση για όλους τους συνδυασμούς των απλοτύπων των πολυμορφισμών του γονιδίου VDR σε σχέση με το κάταγμα. Μία πιο πρόσφατη μετα-ανάλυση (444) δεν επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα της προαναφερθείσας μετα-ανάλυσης (19) και της μελέτης Rotterdam από την Ολλανδία (443).

Στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου VDR και συγκεκριμένα στη θέση σύνδεσης του μεταγραφικού παράγοντα Cdx-2, έχει ταυτοποιηθεί ένας πολυμορφισμός, ο οποίος έχει συσχετιστεί με την BMD στους Γιαπωνέζους. Ο πολυμορφισμός αυτός κατά πάσα πιθανότητα είναι λειτουργικός (445). Σε άλλους πληθυσμούς έχει συσχετιστεί με τα κατάγματα αλλά όχι με την BMD (446).

Στο εξόνιο 2 του γονιδίου VDR έχει ταυτοποιηθεί ένας πολυμορφισμός, ο οποίος δημιουργεί μία εναλλακτική θέση έναρξης της μετάφρασης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή δύο ισοτύπων της πρωτεΐνης VDR οι οποίοι διαφέρουν σε μήκος κατά τρία αμινοξέα (447). Σε μερικές μελέτες, ο πολυμορφισμός αυτός έχει συσχετιστεί με την BMD. Αντιθέτως, τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις λειτουργικές μελέτες είναι αντιφατικά (448).

Μία μετα-ανάλυση δημοσιευμένων μελετών απέδειξε την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ του BsmI πολυμορφισμού και της BMD στη σπονδυλική στήλη (19).

Μερικές μελέτες υποδηλώνουν πως υπάρχει μία αλληλεπίδραση ανάμεσα στην πρόσληψη του ασβεστίου και τους πολυμορφισμούς του γονιδίου VDR όσον αφορά την τελική τιμή της BMD. Είναι πιθανό ότι η αλληλεπίδραση αυτή επηρεάζει τη συσχέτιση των πολυμορφισμών του γονιδίου VDR με την BMD, μόνο όταν η πρόσληψη ασβεστίου είναι υψηλή ή χαμηλή (315).

Σε μία GWAS ο πολυμορφισμός rs2189480 του γονιδίου VDR φάνηκε ότι συσχετίζεται με την BMD της οσφύος και του αυχένα του μηριαίου, ωστόσο η συσχέτιση δεν άγγιξε τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας για τις GWASs (449).

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι πολυμορφισμοί του εν λόγω γονιδίου και περίξ αυτού συσχετίστηκαν με την οστεοπόρωση σε μία πρόσφατη GWAS (397).

### ***13. Γονίδιο της πρωτεΐνης σύνδεσης της βιταμίνης D (DBP)***

Η πρωτεΐνη σύνδεσης της βιταμίνης D (Vitamin D binding protein ή DBP) συνδέεται στη βιταμίνη D και την μεταφέρει στους ιστούς-στόχους. Με τον τρόπο αυτό συμβάλλει στη διατήρηση της ομοιοστασίας του ασβεστίου. Επιπλέον, η DBP μετατρέπεται στον DBP-παράγοντα ενεργοποίησης των μακροφάγων, ο οποίος διεγείρει τους οστεοκλάστες με τελικό αποτέλεσμα την απορρόφηση του οστού (450). Αρκετοί ερευνητές απέδειξαν ότι ορισμένοι πολυμορφισμοί του γονιδίου της DBP συσχετίστηκαν με την BMD ή τα κατάγματα (399,451-453).

### ***14. Γονίδιο αλυσίδας α<sub>1</sub> του κολλαγόνου τύπου I (COL1A1)***

Το κολλαγόνο τύπου I είναι η κυριότερη πρωτεΐνη της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας του οστού. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την αλυσίδα α<sub>1</sub> του κολλαγόνου τύπου I είναι ένα σημαντικό λειτουργικό υποψήφιο γονίδιο που ενδέχεται να παίζει ρόλο στην παθογένεια της οστεοπόρωσης. Το γονίδιο αυτό φέρει έναν πολυμορφισμό, ο οποίος βρίσκεται εντός του πρώτου ιντρονίου στη θέση σύνδεσης του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 (454,455). Ο εν λόγω πολυμορφισμός και συγκεκριμένα το αλληλίο κινδύνου T που περιέχει θυμιδίνη έχει συσχετιστεί με μειωμένη BMD (455,456) καθώς επίσης και με άλλους φαινοτύπους που σχετίζονται με την οστεοπόρωση όπως είναι η ποιότητα του οστού (454), η γεωμετρία του οστού (457), η μεταλλοποίηση του οστού (458) και η μετεμμηνοπαυσιακή οστική απώλεια (459,460). Η λειτουργική ανάλυση έχει δείξει ότι το αλληλίο T του πολυμορφισμού αυτού, το οποίο σχετίζεται με την οστεοπόρωση, σχετίζεται με αυξημένη σύνδεση του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 στο DNA, αυξημένη μεταγραφή του γονιδίου και ανώμαλα αυξημένη παραγωγή του mRNA της αλυσίδας α<sub>1</sub> του κολλαγόνου τύπου I και της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Πιστεύεται ότι η αλλαγή που προκύπτει στην ισορροπία ανάμεσα στις α<sub>1</sub> και α<sub>2</sub> αλυσίδες (φυσιολογικά 2:1) στην τριπλή έλικα (454) μπορεί να συμβάλλει στην εξασθένιση της μηχανικής αντοχής του οστού και στη μείωση της οστικής μάζας στους φορείς του αλληλίου κινδύνου σε σύγκριση με τους μη φέροντες αυτό (458). Μία μελέτη (456) και τρεις μετα-αναλύσεις δημοσιευμένων μελετών (18,454,461)

κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η φορεία του αλληλίου T συσχετίζεται με μείωση της BMD στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης και στον αυχένα του μηριαίου οστού καθώς επίσης και με σπονδυλικά κατάγματα. Στις μελέτες αυτές, ο εν λόγω πολυμορφισμός συσχετίστηκε περισσότερο με τον κίνδυνο του κατάγματος αυτόν καθ' εαυτόν παρά με την BMD, γεγονός που αποτελεί συνέπεια της επίδρασης του στην ποιότητα του οστού (458). Αντίθετα, η μετα-ανάλυση GENOMOS επιβεβαίωσε τις παρατηρήσεις αυτές ως επί το πλείστον στις γυναίκες, ενώ στους άντρες ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός δεν συσχετίστηκε με τα κατάγματα (462). Η έλλειψη συνέπειας ανάμεσα στις μελέτες μπορεί να εξηγηθεί από την ετερογένεια που υπάρχει στον προσδιορισμό και στην εξακρίβωση των περιφερικών καταγμάτων.

Ο πολυμορφισμός -1663IndelT (rs2412298), ο οποίος εντοπίζεται στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου COL1A1, είναι σε LD με τον πολυμορφισμό Sp1 (463). Ωστόσο, αντικείμενο μελέτης έχει αποτελέσει ο πολυμορφισμός -1997G/T (rs1107946) ο οποίος εντοπίζεται επίσης στον υποκινητή του εν λόγω γονιδίου. Αρκετοί ερευνητές έχουν αναφέρει συσχέτιση του -1997G/T με την BMD (463-467). Μία μελέτη που διενεργήθηκε σε 6.280 άτομα από την Ολλανδία δεν ταυτοποίησε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού -1997G/T και της BMD (468). Αξίζει στο σημείο αυτό να αναφέρουμε τα ευρήματα μίας άλλης μελέτης στην οποία οι πολυμορφισμοί Sp1, -1663IndelT και -1997G/T, καθώς επίσης και οι απλότυποι που συντάχθηκαν και από τους τρεις πολυμορφισμούς συσχετίστηκαν με την BMD (469).

### **15. Γονίδιο παραθορμόνης (PTH)**

Η PTH παίζει ουσιαστικό ρόλο στην οστική ανακατασκευή και τη ρύθμιση της ομοιοστασίας του ασβεστίου. Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου που κωδικοποιεί την PTH έχουν εξεταστεί όσον αφορά τη σχέση τους με την BMD από διάφορους ερευνητές με αντικρουόμενα αποτελέσματα (470-472). Μία GWAS που διενεργήθηκε πρόσφατα κατέγραψε συσχέτιση των πολυμορφισμών του συγκεκριμένου γονιδίου με την BMD στον αυχένα του μηριαίου οστού (473). Μία μελέτη αναφέρει συσχέτιση των πολυμορφισμών του γονιδίου που κωδικοποιεί την PTH με τον κίνδυνο καταγμάτων (474).

Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα τύπου I της PTH επίσης έχει σχετιστεί με την οστεοπόρωση (475).

### **16. Γονίδιο μεταγραφικού παράγοντα RUNX2**

Ο RUNX2 αποτελεί έναν μεταγραφικό παράγοντα των οστεοβλαστών. Πειράματα που εφαρμόστηκαν σε ποντίκια έδειξαν ότι η απουσία του συγκεκριμένου παράγοντα σχετίζεται με πλήρη απλασία του σκελετού (161). Οι πιο συχνά μελετημένοι πολυμορφισμοί του γονιδίου που κωδικοποιεί τον RUNX2 είναι οι: -1025T/C και G>A+198. Όσον αφορά τον πολυμορφισμό -1025T/C, μία μελέτη ανέδειξε τη συσχέτιση αυτού με χαμηλή BMD στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης και στον αυχένα του μηριαίου οστού (476), ενώ σε μία άλλη μελέτη σχετίστηκε με αύξηση της BMD στον αυχένα του μηριαίου (477). Όσον αφορά τον πολυμορφισμό G>A+198, τρεις μελέτες τεκμηρίωσαν τη σχέση του με αύξηση της BMD (478-480).

### **17. Γονίδιο μεταμορφωτικού αυξητικού παράγοντα β1 (TGFB1)**

Το γονίδιο TGFB1 κωδικοποιεί τον παράγοντα TGFβ-1. Έχουν ταυτοποιηθεί αρκετοί πολυμορφισμοί του γονιδίου TGFB1 και μάλιστα ορισμένοι από αυτούς έχουν συσχετιστεί με την BMD ή τα οστεοπορωτικά κατάγματα (481,482). Ο πολυμορφισμός C/T είναι λειτουργικός και συνίσταται στην αντικατάσταση του αμινοξέος προλίνη από το αμινοξύ λευκίνη στη θέση 10 του πεπτιδίου σήμανσης του TGFβ-1. Ο πολυμορφισμός αυτός έχει συσχετιστεί με τα κυκλοφορούντα επίπεδα του παράγοντα TGFβ-1, αν και οι υποκείμενοι μηχανισμοί δεν έχουν διερευνηθεί σε μοριακό επίπεδο. Σημειωτέον, ότι ο εν λόγω πολυμορφισμός είναι σε LD με κάποιους άλλους πολυμορφισμούς που εντοπίζονται στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου TGFB1 και είναι πιθανόν να επηρεάζεται η μεταγραφή του (483). Οι περισσότερες μελέτες που έχουν διενεργηθεί είναι περιορισμένου αριθμού δείγματος. Ωστόσο, μία πρόσφατη μετα-ανάλυση, η οποία περιελάμβανε 28.924 άτομα δεν επιβεβαίωσε καμία συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών του γονιδίου TGFB1 και της οστεοπόρωσης (484). Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και από μία άλλη μελέτη που διενεργήθηκε σε 2.975 γυναίκες από την Αγγλία (485).

### **18. Γονίδιο μορφογενετικής πρωτεΐνης των οστών 2 (BMP2)**

Το γονίδιο BMP2, το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη BMP-2, διαδραματίζει βασικό ρόλο στον σχηματισμό του οστού (486). Οι πολυμορφισμοί του συγκεκριμένου γονιδίου έχουν διερευνηθεί για τη σχέση τους με την BMD. Ωστόσο, δεν υπάρχει συμφωνία μεταξύ των ευρημάτων των μελετών (399,487-490). Όσον αφορά τον πολυμορφισμό Ser37Ala του γονιδίου BMP2, τα αποτελέσματα των διαφόρων μελετών είναι επίσης διφορούμενα. Ορισμένοι ερευνητές αναφέρουν συσχέτιση του εν λόγω πολυμορφισμού με την BMD (491,492), ενώ άλλοι όχι (493).

### **19. Γονίδιο ιντερλευκίνης 6 (IL-6)**

Η ιντερλευκίνη 6 (IL-6) είναι μία προφλεγμονώδης κυτταροκίνη. Η παραγωγή της IL-6 αυξάνεται σημαντικά μετά την εμμηνόπαυση εξαιτίας της μείωσης που παρατηρείται στα επίπεδα των οιστρογόνων. Τα επίπεδα της IL-6 στον ορό του αίματος έχουν συσχετιστεί με το βαθμό της οστικής απώλειας που επισυμβαίνει στις γυναίκες ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια της πρώτης δεκαετίας μετά την εμμηνόπαυση και μάλιστα αποτελούν και τον κυριότερο προγνωστικό παράγοντα της οστικής απώλειας (494).

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την IL-6 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7p21. Διάφοροι πολυμορφισμοί του γονιδίου αυτού έχουν συνδεθεί με την BMD σε οικογένειες ατόμων με κληρονομικό ιστορικό οστεοπόρωσης (475,495), καθώς και σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (496,497), γεγονός το οποίο δεν επαληθεύτηκε σε μία μελέτη που περιελάμβανε ζεύγη νεαρών αδελφών θήλεος φύλου (498).

Στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου που κωδικοποιεί την IL-6 έχουν ταυτοποιηθεί δύο λειτουργικοί πολυμορφισμοί : ο -174GC (rs1800795) και ο -572GC (rs1800796). Στις ηλικιωμένες γυναίκες οι πολυμορφισμοί αυτοί έχουν συσχετιστεί με μειωμένη BMD του ισχίου (499), με θετικό ιστορικό κατάγματος στον καρπό (κάταγμα Colles') και με εύθραυστη ποιότητα του οστού εκτιμώμενη με τη βοήθεια της υπερηχοτομογραφίας στο οστό της πτέρνας (500). Στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες οι εν λόγω πολυμορφισμοί έχουν συσχετιστεί με τα επίπεδα των δεικτών της οστικής απορρόφησης και της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (C-reactive protein ή CRP) (501,502). Στη μελέτη Framingham βρέθηκε ότι οι γυναίκες που έφεραν το γονότυπο -174GG είχαν στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερη BMD σε σχέση με τις γυναίκες που έφεραν το γονότυπο CC. Η συσχέτιση αυτή παρατηρήθηκε σε γυναίκες στις οποίες είχαν μεσολαβήσει τουλάχιστον 15 έτη από την εμμηνόπαυση ή είχαν



μειωμένη πρόσληψη ασβεστίου (<940 mg/day) ή είχαν ανεπάρκεια οιστρογόνων και όχι σε γυναίκες ευρισκόμενες στην περιεμμηνόπαυση ή στους άντρες (503).

Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές οι ερευνητές υπέθεσαν ότι οι πολυμορφισμοί του γονιδίου της IL-6, οι οποίοι εντοπίζονται στην περιοχή του υποκινητή, ρυθμίζουν την απόκριση του σκελετού σε καταστάσεις αυξημένης οστικής ανακατασκευής και ανεπάρκειας οιστρογόνων όπως συμβαίνει στην οστεοπόρωση. Την υπόθεση αυτή υποστηρίζει το γεγονός ότι ο πολυμορφισμός -174GC εντοπίζεται στη θέση σύνδεσης του NF-IL-6, ο οποίος είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα των οιστρογόνων. Η αλληλεπίδραση αυτή έχει ως σκοπό την καταστολή της μεταγραφής του γονιδίου που κωδικοποιεί την IL-6. Μία μελέτη που διενεργήθηκε στην Ιαπωνία κατέδειξε ότι ένας άλλος SNP του γονιδίου της IL-6 συσχετίστηκε στατιστικώς σημαντικά με την BMD της οσφύς και της ολοσώματικής BMD σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες αλλά όχι σε άντρες (504).

## ***20. Άλλα υποψήφια γονίδια για την οστεοπόρωση***

Άλλα γονίδια τα οποία έχουν συσχετιστεί με την BMD είναι το γονίδιο WNT3A (361), το γονίδιο WNT10B (505), το γονίδιο FZD1 που κωδικοποιεί τον υποδοχέα Fzd1 (506), το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη APC (371), το γονίδιο SFRP1 που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Sfrp1 (361), το γονίδιο DKK2 που κωδικοποιεί τον παράγοντα Dkk2 (361), το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα των ανδρογόνων (507), το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα της λεπτίνης (508), το γονίδιο BMP4 που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη BMP-4 (509) και το γονίδιο BMP7 που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη BMP-7 (487).



# Ειδικό Μέρος



## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

---

---

Ο πρωταρχικός σκοπός της παρούσης μελέτης ήταν να διερευνηθεί η επίδραση των πολυμορφισμών A1330V και V667M του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη 5 που σχετίζεται με τον υποδοχέα των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 ή LRP5) στην οστική πυκνότητα (Bone mineral density ή BMD) της οσφύος Ελληνίδων ευρισκόμενων περι- ή μετά την εμμηνόπαυση. Επιπλέον, στόχος ήταν η ανάλυση της σχέσης μεταξύ των δύο πολυμορφισμών και των επιπέδων ορού των διαλυτών μορίων της οστεοπροτεγερίνης (Osteoprotegerin ή OPG), του συνδέτη του υποδοχέα του ενεργοποιητή του πυρηνικού παράγοντα-κΒ (Receptor activator of nuclear factor-κΒ ligand ή RANKL) και δεικτών του οστικού μεταβολισμού.



## ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

---

---

### I. Πληθυσμός μελέτης

Στη μελέτη συμπεριελήφθησαν 221 διαδοχικές γυναίκες ευρισκόμενες περι- ή μετά την εμμηνόπαυση, οι οποίες απευθύνθηκαν στα εξωτερικά ιατρεία της Ενδοκρινολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων για έλεγχο πιθανής οστεοπόρωσης απότοκου της εμμηνόπαυσης. Ως κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη ορίστηκαν τα ακόλουθα:

- (1) ηλικία μικρότερη των 40 ετών ή μεγαλύτερη των 63 ετών,
- (2) παρουσία νοσήματος που επηρεάζει το μεταβολισμό των οστών, όπως διαταραχή του ενδοκρινικού συστήματος (συμπεριλαμβανομένης της θυρεοειδικής νόσου, είτε της υποκλινικής είτε της κλινικά έκδηλης, του υπερπαραθυρεοειδισμού, του συνδρόμου Cushing, κ.ά.), ανεπάρκεια της βιταμίνης D, σύνδρομο δυσαπορρόφησης ή αυτοάνοσο νόσημα. Αξίζει να σημειωθεί ότι γυναίκες που παρουσίαζαν στον παρακλινικό έλεγχο υπερασβεστιαμία ή αυξημένα επίπεδα αλκαλικής φωσφατάσης (Alkaline phosphatase ή ALP) αποκλείστηκαν από την μελέτη.
- (3) προηγθείσα ή τρέχουσα θεραπεία με οιστρογόνα, διφωσφονικά, καλσιτονίνη, παραθορμόνη (Parathyroid hormone ή PTH) ή γλυκοκορτικοειδή. Η χρήση συμπληρωμάτων ασβεστίου και βιταμίνης D ήταν επιτρεπτή.

### II. Μέθοδοι

#### 1. Κλινική εκτίμηση

Σε όλες τις γυναίκες που συμμετείχαν στη μελέτη ελήφθη λεπτομερές ιατρικό ιστορικό και διενεργήθηκε πλήρης φυσική εξέταση. Κατεγράφησαν οι ακόλουθες παράμετροι: έτη σε εμμηνόπαυση (Years since menopause ή YSM), ιστορικό καταγμάτων χαμηλής ενέργειας, λήψη φαρμάκων, διαιτητική πρόσληψη ασβεστίου, έξεις της καθημερινότητας (φυσική άσκηση, κάπνισμα, κατανάλωση αλκοόλ), ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά.

Η πρόσληψη ασβεστίου υπολογίστηκε με βάση την προμήθεια από τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Κατεγράφη δια ερωτηματολογίου η μέση ημερήσια κατανάλωση γάλακτος, ξινόγαλου, γιαουρτιού ή τυριού. Η πρόσληψη ασβεστίου από τα γαλακτοκομικά προϊόντα υπολογίστηκε ως το άθροισμα του ασβεστίου που προέρχεται από τα πόσιμα προϊόντα γάλακτος (120 mg/dl) και το τυρί (100 mg/φέτα). Στην ελληνική διατροφή, το 80% της ημερήσιας πρόσληψης ασβεστίου προέρχεται από τα γαλακτοκομικά προϊόντα.

Η φυσική άσκηση εκτιμήθηκε ως ο χρόνος (λεπτά/ εβδομάδα) που οι γυναίκες δαπανούσαν σε γυμναστική, καθώς επίσης σε δραστηριότητες στο σπίτι και στον χώρο εργασίας. Όσον αφορά την κατανάλωση αλκοόλ, 9 γυναίκες κατανάλωναν πάνω από 30 μονάδες αλκοόλ εβδομαδιαίως και για το λόγο αυτό θεωρήθηκε ότι παρουσιάζουν σημαντική πρόσληψη αλκοόλ. Οι γυναίκες αυτές είχαν φυσιολογικές τιμές τρανσαμινασών και σε αυτές αποκλείστηκε η παρουσία αλκοολικής ηπατίτιδας. Σημειωτέον, ότι ο αποκλεισμός των συγκεκριμένων γυναικών από την στατιστική ανάλυση δεν μετέβαλε τα κύρια ευρήματα της παρούσης μελέτης.

Ο δείκτης μάζας σώματος (Body mass index ή BMI) υπολογίστηκε από τη διαίρεση του σωματικού βάρους δια του τετραγώνου του ύψους.

Η μελέτη διενεργήθηκε με τη σύμφωνη γνώμη των συμμετεχόντων (γραπτή συγκατάθεση).

## **2. Εργαστηριακές μετρήσεις**

Διενεργήθηκαν αιματολογικές και βιοχημικές εξετάσεις ρουτίνας στο εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Επιπροσθέτως, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης (Thyroid-stimulating hormone ή TSH), της PTH και της βιταμίνης D προκειμένου να αποκλειστούν από τη μελέτη γυναίκες που παρουσίαζαν θυρεοειδική νόσο, υπερπαραθυρεοειδισμό και ανεπάρκεια της βιταμίνης D αντίστοιχα. Έγινε προσδιορισμός των επιπέδων ορού



δεικτών οστικού μεταβολισμού και συγκεκριμένα της ολικής αλκαλικής φωσφατάσης (Total alkaline phosphatase ή tALP) (δείκτης οστικού σχηματισμού), καθώς και του ασβεστίου και του φωσφόρου (δείκτες οστικής απορρόφησης). Μετρήθηκαν επίσης το ασβέστιο και η κρεατινίνη σε ούρα 24ώρου και υπολογίστηκε ο λόγος του ασβεστίου ούρων προς την κρεατινίνη ούρων ως ένας πρόσθετος δείκτης οστικής απορρόφησης.

Τα επίπεδα των διαλυτών μορίων της OPG και του RANKL στον ορό προσδιορίστηκαν με τη δοκιμασία ενζυμοσύνδεσης ανοσοπροσρόφησης (Enzyme-linked immunosorbent assay ή ELISA) (Biomedica Gruppe, Vienna, Austria). Το ελάχιστο όριο ανίχνευσης της OPG ήταν 0.14 pmol/l. Οι συντελεστές μεταβλητότητας κατ' επανάληψη μετρήσεων δεδομένων επιπέδων της OPG στον ίδιο προσδιορισμό ή μετρήσεων δεδομένων επιπέδων της OPG σε διαφορετικούς προσδιορισμούς ήταν 10% και 4% αντίστοιχα. Το ελάχιστο όριο ανίχνευσης του διαλυτού τύπου του RANKL (Soluble form of RANKL ή sRANKL) ήταν 0.02 pmol/l. Οι αντίστοιχοι συντελεστές μεταβλητότητας για τον sRANKL ήταν 8% και 6% αντίστοιχα. Η συγκέντρωση του sRANKL στον ορό υγιών ατόμων είναι συνήθως σχετικά χαμηλή. Για το λόγο αυτό, στη συγκεκριμένη ELISA έγινε χρήση ενός συστήματος που ενισχύει την ανίχνευση του RANKL. Ωστόσο, στις μισές σχεδόν γυναίκες της μελέτης μας (n=105, 47.5%) τα επίπεδα RANKL στον ορό παρέμειναν μη ανιχνεύσιμα. Για τις γυναίκες αυτές έγινε χρήση του ελάχιστου ορίου ανίχνευσης του RANKL στη στατιστική ανάλυση. Ο λόγος RANKL/ OPG υπολογίστηκε για όλες τις γυναίκες που συμμετείχαν στην μελέτη.

### **3. Μέτρηση της οστικής πυκνότητας (BMD)**

Η BMD της οσφυϊκής μοίρας της σπονδυλικής στήλης (L2-L4) μετρήθηκε με τη μέθοδο της απορροφησιμετρίας ακτίνων X διπλής ενέργειας (Dual energy X-ray absorptiometry ή DXA), (Hologic Discovery W, Bedford, Mass, USA). Η BMD ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) υπολογίστηκε με βάση την περιεκτικότητα του οστού σε ανόργανα άλατα (Bone mineral content ή BMC) (g) και την προβαλλόμενη οστική επιφάνεια ( $\text{cm}^2$ ). Ο συντελεστής μεταβλητότητας της DXA ήταν 1% για την οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης. Η οστεοπόρωση και η οστεοπενία ορίστηκαν σύμφωνα με τα κριτήρια του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization ή WHO)

(510). Τα T-scores για την οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης υπολογίστηκαν με βάση τα αρχεία νεαρών, υγιών Ελληνίδων (511).

#### **4. Εξαγωγή του DNA και καθορισμός των πολυμορφισμών A1330V και V667M του γονιδίου LRP5**

Το γενωμικό DNA εξήχθη από τα λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος χρησιμοποιώντας το Nucleospin Blood QuickPure kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Duren, Germany). Οι γονότυποι των πολυμορφισμών A1330V (rs3736228) και V667M (rs4988321) του γονιδίου *LRP5* καθορίστηκαν με ένα σύστημα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time polymerase chain reaction ή RT-PCR) (Rotor-Gene 3000, Corbett Research, Mortlake, Australia).

Η RT-PCR είναι η ικανότητα παρακολούθησης της διαδικασίας PCR κατά τη διάρκεια που αυτή επισυμβαίνει (δηλαδή σε πραγματικό χρόνο). Τα δεδομένα συλλέγονται σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας PCR και όχι στο τέλος της PCR. Το γεγονός αυτό προκαλεί επανάσταση στον τρόπο με τον οποίο κανείς προσεγγίζει την ποσοτικοποίηση του DNA που βασίζεται στην PCR. Στην RT-PCR, οι αντιδράσεις χαρακτηρίζονται από τη χρονική στιγμή κατά τη διάρκεια των κύκλων όταν η αποδιάταξη του DNA ενός στόχου ανιχνεύεται για πρώτη φορά και όχι από την ποσότητα του στόχου που συσσωρεύεται μετά από ένα σταθερό αριθμό κύκλων. Η έναρξη της αντιγραφής του νουκλεϊκού οξέος του στόχου συνοδεύεται από αύξηση του φθορισμού.

Τα συστήματα πραγματικού χρόνου για την PCR βελτιώθηκαν από τους φθορίζοντες ιχνηθέτες οι οποίοι χρησιμοποιούν την ενεργότητα της 5' νουκλεάσης της Taq DNA πολυμεράσης. Η διαθεσιμότητα των συγκεκριμένων ιχνηθετών κατέστησε ικανή την ανάπτυξη μίας μεθόδου πραγματικού χρόνου η οποία ανιχνεύει μόνο ειδικά προϊόντα αποδιάταξης του DNA. Επίσης, η ανάπτυξη των ιχνηθετών αυτών συνέβαλε στην εξάλειψη της διαδικασίας που ακολουθούνταν μετά την PCR για την ανάλυση της αποδόμησης του ιχνηθέτη. Η χημεία TaqMan χρησιμοποιεί έναν φθορίζοντα ιχνηθέτη, ο οποίος καθιστά ικανή την ανίχνευση ενός ειδικού PCR προϊόντος καθώς αυτό συσσωρεύεται κατά τη διάρκεια των κύκλων της PCR. Το μίγμα Taqman Genotyping Master Mix είναι ένα μίγμα συγκεντρωμένο 2 φορές και χρησιμοποιείται για τις γονοτυπικές αντιδράσεις που βασίζονται στον ιχνηθέτη TaqMan. Αποτελείται από την AmpliTaq Gold DNA πολυμεράση, η οποία παραμένει

ανενεργή σε θερμοκρασία δωματίου και ενεργοποιείται κατά τη διάρκεια της θερμοποίησης. Άλλες συνιστώσες του μίγματος Taqman Genotyping Master Mix είναι το ρυθμιστικό διάλυμα και το μίγμα που περιέχει τα 4 νουκλεοτίδια (αδενίνη, θυμίνη, γουανίνη και κυτοσίνη).

Για τον πολυμορφισμό A1330V χρησιμοποιήθηκε η προσχεδιασμένη μέθοδος TaqMan Genotyping (C\_25752205\_10) και το μίγμα Taqman Genotyping Master Mix (Applied Biosystems, California, USA). Αντιθέτως, η γονοτυπική ανάλυση του πολυμορφισμού V667M πραγματοποιήθηκε κατόπιν παραγγελίας της μεθόδου TaqMan Genotyping (Applied Biosystems, California, USA). Οι ιχνηθέτες προστέθηκαν σε ένα μίγμα PCR, το οποίο αποτελούνταν από 10ng γενωμικού DNA, 12.5μl μίγματος Taqman Genotyping Master Mix, 0.625μl του μίγματος, το οποίο ήταν συγκεντρωμένο 40 φορές και νερό απαλλαγμένο από DNάσες και RNάσες με αποτέλεσμα ο τελικός όγκος να είναι 25μl. Το πρωτόκολλο ενίσχυσης των αντιγράφων περιελάμβανε αποδιάταξη του DNA στους 95 °C για 10 min, η οποία ακολουθούνταν από 40 κύκλους αποδιάταξης του DNA στους 95 °C για 15 sec και υβριδοποίηση του ιχνηθέτη/ επιμήκυνση του DNA στους 60 °C για 1 min. Σε όλα τα δείγματα ο καθορισμός του γονοτύπου διενεργήθηκε δύο φορές και για τους δύο πολυμορφισμούς, με αποτέλεσμα η αναπαραγωγικότητα του καθορισμού του γονοτύπου να είναι 100%.

### **III. Στατιστικές μέθοδοι**

Η συμφωνία της παρατηρούμενης συχνότητας των γονοτύπων με την ισορροπία Hardy-Weinberg ελέγχθηκε με  $\chi^2$  τεστ ενός βαθμού ελευθερίας. Για την ανάδειξη διαφορών μεταξύ των γονοτυπικών ομάδων εφαρμόστηκε  $\chi^2$  τεστ για τις κατηγορικές μεταβλητές. Όσον αφορά τη σύγκριση των ομάδων ως προς τις συνεχείς μεταβλητές, έγινε χρήση του t-test για τις μεταβλητές που ακολουθούσαν κανονική κατανομή ή του Mann-Whitney U τεστ για εκείνες με μη κανονική κατανομή. Για την ανάλυση της συσχέτισης μεταξύ συνεχών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε το Pearson product-moment correlation τεστ και εναλλακτικά το μη παραμετρικό Spearman's rank order correlation τεστ. Με σκοπό την ανίχνευση συσχέτισης μεταξύ της παρουσίας του κάθε SNP και των προτυπωμένων (ως προς την ηλικία, τα YSM και το δείκτη BMI) τιμών της BMD, των δεικτών οστικού μεταβολισμού, της OPG και του RANKL εφαρμόστηκε ανάλυση συμμεταβλητότητας (Analysis of covariance ή

ANCOVA). Επιπροσθέτως, διενεργήθηκε ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης για τον έλεγχο της ικανότητας πρόβλεψης της BMD στην οσφύ από ένα σετ παραμέτρων. Οι ανεξάρτητες μεταβλητές, οι οποίες επιλέχθηκαν προκειμένου να συμπεριληφθούν στο μοντέλο (ηλικία, YSM, BMI, SNP) ήταν εκείνες που έδειχναν τουλάχιστον κάποια συσχέτιση με την εξαρτημένη μεταβλητή (BMD) ( $r > 0.3$ ), αλλά όχι τόσο υψηλή συσχέτιση μεταξύ τους ( $r < 0.7$ ). Η φυσική άσκηση και η πρόσληψη ασβεστίου δεν συσχετιζόνταν με την BMD και για το λόγο αυτό δεν συμπεριελήφθησαν στο μοντέλο. Διενεργήθηκε ανάλυση παλινδρόμησης προκειμένου να ελεγχθεί η αλληλεπίδραση μεταξύ των πολυμορφισμών A1330V και V667M ως προς τη BMD. Σε πρόσθετες αναλύσεις διερευνήθηκαν δυνητικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του κάθε πολυμορφισμού και της ηλικίας, του δείκτη BMI, της φυσικής άσκησης ή της πρόσληψης ασβεστίου ως προς τη BMD. Επιπλέον, συντάχθηκαν οι απλότυποι των δύο πολυμορφισμών του γονιδίου *LRP5* και ελέγχθηκε η παρουσία συσχέτισης μεταξύ των αλληλίων (LD) (<http://www.mrc-epid.cam.ac.uk/~jinghua/software.htm>).

Όλα τα τεστ ήταν διπλής κατεύθυνσης και το στατιστικά σημαντικό επίπεδο ορίστηκε στο 0.05. Στα αποτελέσματα που ακολουθούν, οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται είτε ως μέση τιμή  $\pm$  σταθερή απόκλιση (Standard deviation ή SD), είτε ως προτυπωμένη μέση τιμή  $\pm$  σταθερό σφάλμα μέτρησης (Standard error measurement ή SEM) (για τις τιμές μετά από προτύπωση). Η στατιστική δύναμη της μελέτης ήταν επαρκής ( $> 80\%$ ) ώστε να ανιχνεύει μία διαφορά της τάξης του 10% ( $0.08 \text{ g/cm}^2$ ) στην BMD για τον κάθε πολυμορφισμό (85% για τον πολυμορφισμό A1330V και 83% για τον πολυμορφισμό V667M). Ωστόσο, η δύναμη της μελέτης ήταν μέτρια (52%) όσον αφορά την επίδραση του κάθε πολυμορφισμού στα επίπεδα ορού της OPG, του RANKL και δεικτών του οστικού μεταβολισμού.

Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS (έκδοση 17.0).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### I. Χαρακτηριστικά του πληθυσμού υπό μελέτη

Στη μελέτη συμπεριελήφθησαν συνολικά 221 γυναίκες. Από αυτές 209 ήταν μετεμμηνοπαυσιακές και 12 ήταν σε περιεμμηνόπαυση. Με τον όρο περιεμμηνόπαυση ορίζεται η απουσία εμμήνου ρύσεως επί χρονικής διάρκειας μικρότερης από δώδεκα διαδοχικούς μήνες με επίπεδα θυλακιοτρόπου ορμόνης (Follicle stimulating hormone ή FSH) > 40mIU/liter. Τα χαρακτηριστικά των 221 γυναικών παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

**Πίνακας 4.** Χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης (n=221)

Ηλικία (έτη)	56.8 ± 4.9
Ηλικία κατά την εμμηνόπαυση (έτη)	48.1 ± 4.7
Έτη σε εμμηνόπαυση	8.7 ± 6.1
Βάρος (kg)	70.0 ± 11.1
Ύψος (cm)	159 ± 6
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27.7 ± 4.2
Διαιτητική πρόσληψη ασβεστίου από τα γαλακτοκομικά προϊόντα (mg/dl)	807 ± 33
Λήψη συμπληρωμάτων ασβεστίου (%)	87 (39.4)
Κάπνισμα (%)	28 (12.7)
Σημαντική κατανάλωση αλκοόλ (%)	9 (4.1)
Φυσική άσκηση (λεπτά/ εβδομάδα)	205.14 ± 225.36
Ιστορικό αναίτιων καταγμάτων σε οποιαδήποτε θέση (%)	59 (27.2)

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± SD για τις συνεχείς μεταβλητές και ως αριθμοί (% ποσοστά) για τις κατηγορικές μεταβλητές.

Η μέση ηλικία  $\pm$  SD του πληθυσμού υπό μελέτη ήταν  $56.8 \pm 4.8$  έτη (εύρος ηλικίας 40-63 έτη). Η μέση χρονική διάρκεια σε εμμηνόπαυση ήταν  $8.7 \pm 6.1$  έτη, ενώ η μέση τιμή του δείκτη BMI ήταν  $27.7 \pm 4.2$  Kg/m<sup>2</sup>.

Σύμφωνα με τα κριτήρια WHO (510), 109 (49.3%) γυναίκες εμφάνιζαν οστεοπόρωση, 59 (26.7%) οστεοπενία και 53 (24%) φυσιολογική BMD στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης. Η μέση τιμή  $\pm$  SD της BMD στην οσφύ ήταν  $0.820 \pm 0.120$  g/cm<sup>2</sup>, ενώ του T-score ήταν  $-1.99 \pm 1.02$ .

Η μέση συγκέντρωση στον ορό της OPG, του RANKL και δεικτών του οστικού μεταβολισμού φαίνονται στον Πίνακα 5.

**Πίνακας 5.** BMD και συγκεντρώσεις ορού δεικτών οστικού μεταβολισμού, της OPG, του RANKL και του λόγου RANKL/ OPG στον πληθυσμό μελέτης

BMD οσφυϊκής μοίρας (g/cm <sup>2</sup> )	0.820 $\pm$ 0.120
Ασβέστιο (mg/dl)	9.81 $\pm$ 0.48
Φώσφορος (mg/dl)	3.44 $\pm$ 0.53
Αλκαλική φωσφατάση (IU/liter)	77.15 $\pm$ 31.92
Λόγος ασβεστίου προς κρεατινίνη ούρων (mmol/ mmol)	0.460 $\pm$ 0.264
OPG (pmol/liter)	1.105 $\pm$ 0.806
RANKL (pmol/liter)	0.145 $\pm$ 0.249
Λόγος RANKL/ OPG	0.196 $\pm$ 0.460

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέση τιμή  $\pm$  SD. Φυσιολογικές τιμές ασβεστίου: 8.2-10.6 md/dl, φωσφόρου: 2.5-5.0 mg/dl, αλκαλικής φωσφατάσης: 30-125 IU/liter και λόγου ασβεστίου προς κρεατινίνη ούρων: < 0.5 mmol/ mmol.

## II. Κατανομή των γονοτύπων

Οι συχνότητες των γονοτύπων του πολυμορφισμού A1330V στο σύνολο των γυναικών που μελετήθηκαν ήταν CC 76%, CT 22.6% και TT 1.4%, ενώ του πολυμορφισμού V667M ήταν GG (85%), GA (14.5%) και AA (0.5%). Η κατανομή των γονοτύπων των πολυμορφισμών A1330V και V667M του γονιδίου *LRP5* ήταν σε συμφωνία με την ισορροπία Hardy-Weinberg ( $\chi^2 = 0.1079$ ,  $P > 0.05$  και  $\chi^2 = 0.53$ ,  $P > 0.05$  αντίστοιχα).

Λόγω της χαμηλής συχνότητας των ατόμων με γονότυπο TT, ο πληθυσμός της μελέτης ταξινομήθηκε όσον αφορά τον πολυμορφισμό A1330V σε δύο ομάδες: CC και CT/TT. Ο γονότυπος CC παρατηρήθηκε σε 168 (76%) γυναίκες, ενώ οι γονότυποι

**Πίνακας 6.** Δημογραφικά χαρακτηριστικά και BMD των δύο ομάδων γονοτύπων του κάθε πολυμορφισμού

	Πολυμορφισμός A1330V			Πολυμορφισμός V667M		
	CC (n=168)	CT/TT (n=53)	Τιμή P	GG (n=188)	GA/AA (n=33)	Τιμή P
Ηλικία (έτη)	56.9 ± 4.8	56.8 ± 5.0	0.903	56.9 ± 4.8	56.4 ± 5.2	0.540
Ηλικία κατά την εμμηνόπαυση (έτη)	48.3 ± 4.7	47.6 ± 4.9	0.405	48.1 ± 4.6	47.9 ± 5.4	0.821
Έτη σε εμμηνόπαυση	8.6 ± 5.9	9.2 ± 6.7	0.584	8.8 ± 6.0	8.4 ± 6.5	0.753
Βάρος (kg)	69.8 ± 10.4	71.4 ± 12.7	0.734	69.8 ± 10.6	71.6 ± 13.3	0.388
Ύψος (cm)	159 ± 6	159 ± 5	0.961	159 ± 6	159 ± 5	0.728
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27.6 ± 4.0	28.2 ± 4.8	0.363	27.6 ± 4.1	28.4 ± 4.9	0.331
Διαιτητική πρόσληψη ασβεστίου από τα γαλακτοκομικά προϊόντα (mg/dl)	808 ± 42	762 ± 39	0.428	821 ± 35	801 ± 41	0.928
Λήψη συμπληρωμάτων ασβεστίου (%)	65 (38.7)	22 (42.3)	0.761	73 (38.8)	14 (42.4)	0.844
Κάπνισμα (%)	23 (13.7)	5 (9.6)	0.594	26 (13.8)	2 (6.1)	0.340
Σημαντική κατανάλωση αλκοόλ (%)	9 (5.4)	0 (0)	0.188	9 (4.8)	0 (0)	0.415
Φυσική άσκηση (λεπτά/ εβδομάδα)	203.21 ± 228.47	202.21 ± 228.57	0.978	224.72 ± 253.11	198.81 ± 223.19	0.548
Ιστορικό αναίτιων καταγμάτων σε οποιαδήποτε θέση (%)	43 (25.6)	16 (30.8)	0.505	49 (26.1)	10 (30.3)	0.823
BMD οσφυϊκής μοίρας (g/cm <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	0.840 ± 0.008	0.765 ± 0.015	<0.0001	0.831 ± 0.008	0.758 ± 0.019	0.001

<sup>a</sup>BMD μετά προτύπωση για την ηλικία, τα έτη εμμηνόπαυσης και το δείκτη BMI. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως αριθμοί (% ποσοστά) για τις κατηγορικές μεταβλητές, ως μέση τιμή ± SD για τις συνεχείς μεταβλητές και ως μέση τιμή ± SEM για την BMD της οσφυϊκής μοίρας μετά προτύπωση. Οι συγκρίσεις μεταξύ των δύο ομάδων γονοτύπων του κάθε πολυμορφισμού εκτελέστηκαν με το Student's t-τεστ και το χ<sup>2</sup> τεστ για τα δημογραφικά χαρακτηριστικά και με την ανάλυση συμμεταβλητότητας για την BMD μετά προτύπωση για την ηλικία, τα έτη εμμηνόπαυσης και το δείκτη BMI. Οι συγκρίσεις μεταξύ των δύο ομάδων γονοτύπων δεν ανέδειξαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές με μοναδική εξαίρεση τη BMD.

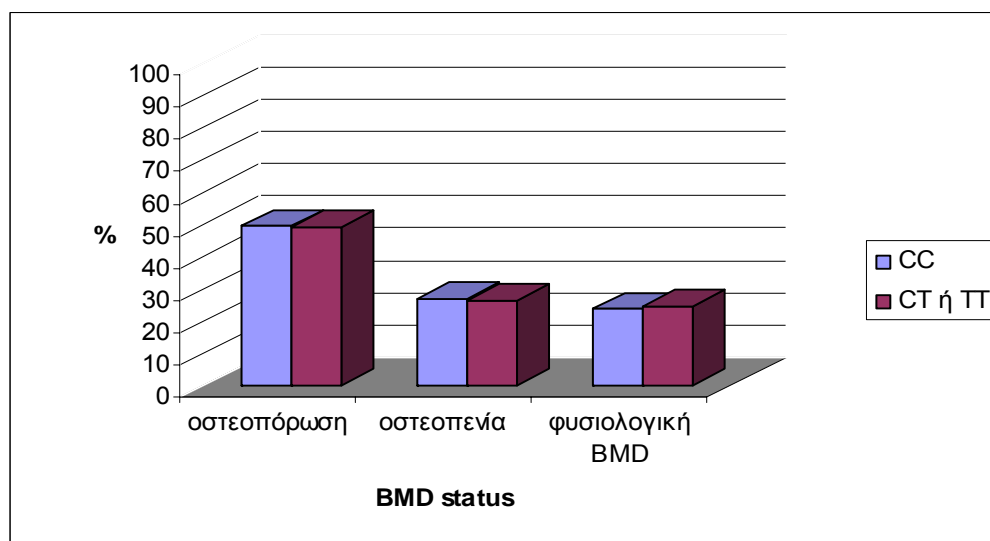
CT/TT σε 53 (24%). Παρομοίως, όσον αφορά τον πολυμορφισμό V667M, το μικρό ποσοστό των γυναικών που έφεραν το γονότυπο AA συνετέλεσε στο σχηματισμό δύο ομάδων: GG και GA/AA. Ο γονότυπος GG ανιχνεύθηκε σε 188 (85%) γυναίκες και οι γονότυποι GA/AA σε 33 (15%). Στον Πίνακα 6 συνοψίζονται τα δημογραφικά χαρακτηριστικά και η BMD των δύο γονοτυπικών ομάδων του κάθε πολυμορφισμού. Δεν υπήρχαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στην ηλικία, στην ηλικία κατά την εμμηνόπαυση, τα YSM, το βάρος, το ύψος ή το δείκτη BMI μεταξύ των δύο ομάδων του κάθε πολυμορφισμού. Επιπλέον, οι δύο ομάδες του κάθε πολυμορφισμού δεν διέφεραν στην πρόσληψη ασβεστίου, το ιστορικό κατάγματος χαμηλής ενέργειας σε οποιαδήποτε θέση, τη φυσική άσκηση και τις έξεις της καθημερινότητας.

### III. Κατανομή των γονοτύπων βάσει της BMD

Η κατανομή των γονοτύπων κάθε πολυμορφισμού βάσει τιμής BMD παρουσιάζεται στον Πίνακα 7 και αποδίδεται σχηματικά στις Εικόνες 10 και 11.

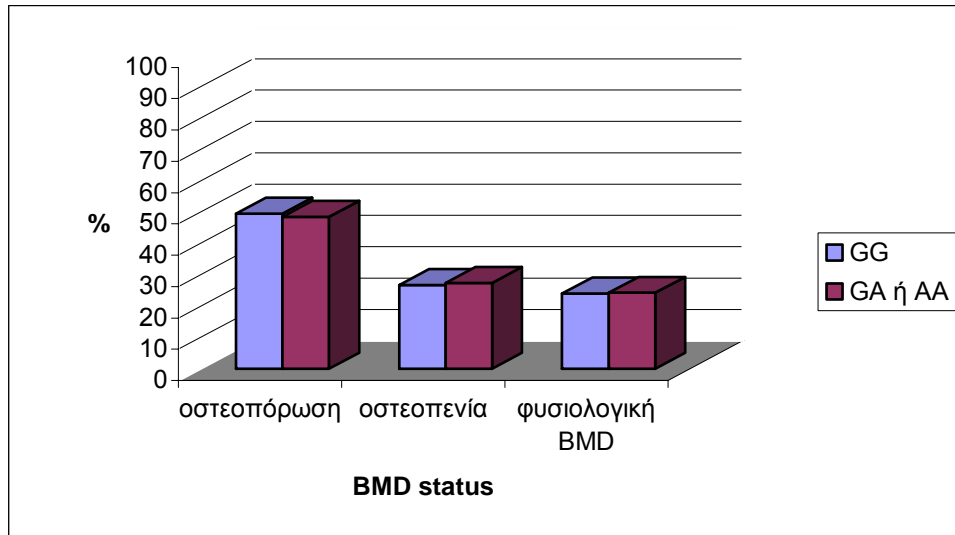
**Πίνακας 7.** Κατανομή των γονοτύπων κάθε SNP βάσει της BMD

	οστεοπόρωση	οστεοπενία	φυσιολογική BMD	σύνολο
CC	83 (49.4%)	45 (26.8%)	40 (23.8%)	168 (100%)
CT ή TT	26 (49.1%)	14 (26.4%)	13 (24.5%)	53 (100%)
	οστεοπόρωση	οστεοπενία	φυσιολογική BMD	σύνολο
GG	93 (49.5%)	50 (26.6%)	45 (23.9%)	188 (100%)
GA ή AA	16 (48.5%)	9 (27.3%)	8 (24.2%)	33 (100%)



**Εικόνα 10.** Σχηματική παράσταση της κατανομής των γονοτύπων του SNP A1330V βάσει της BMD





Εικόνα 11. Σχηματική παράσταση της κατανομής των γονοτύπων του SNP V667M βάσει της BMD

#### IV. Συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών του γονιδίου *LRP5* και της BMD στην οσφύ

Στην παρούσα μελέτη κατεγράφη μία στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού A1330V του γονιδίου *LRP5* και της BMD στην οσφύ. Η BMD στην οσφύ ήταν σημαντικά μικρότερη στις γυναίκες με γονότυπο CT ή TT από ό,τι στις γυναίκες με γονότυπο CC (CT/TT  $0.768 \pm 0.086$  g/cm<sup>2</sup> έναντι CC  $0.839 \pm 0.123$  g/cm<sup>2</sup>,  $P < 0.0001$ ). Επίσης, ο πολυμορφισμός V667M συσχετίστηκε στατιστικώς σημαντικά με την BMD στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης. Πιο αναλυτικά, οι γυναίκες που έφεραν τους γονότυπους GA ή AA εμφάνιζαν σημαντικά χαμηλότερη BMD στην οσφύ σε σχέση με τις γυναίκες που έφεραν το γονότυπο GG (GA/AA  $0.766 \pm 0.079$  g/cm<sup>2</sup> έναντι GG  $0.829 \pm 0.123$  g/cm<sup>2</sup>,  $P < 0.0001$ ). Οι προαναφερθείσες διαφορές μεταξύ των δύο γονοτυπικών ομάδων του κάθε πολυμορφισμού παρέμειναν μετά προτύπωση για πιθανούς συγχυτικούς παράγοντες, όπως η ηλικία, τα YSM και ο δείκτης BMI (Πίνακας 6).

#### V. Μοντέλα πρόβλεψης της BMD στην οσφύ

Επιπρόσθετα, διενεργήθηκε ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης με σκοπό να διερευνηθεί η ικανότητα πρόβλεψης της BMD στην οσφύ από μία ομάδα ανεξάρτητων μεταβλητών. Για το σκοπό αυτό κατασκευάστηκαν δύο μοντέλα

(Πίνακας 8). Οι μεταβλητές που συμπεριελήφθησαν στο πρώτο μοντέλο της ανάλυσης ήταν η ηλικία, ο δείκτης BMI, τα YSM και ο πολυμορφισμός A1330V. Το μοντέλο μπορούσε να εξηγήσει το 20.3% της μεταβλητότητας στην BMD της οσφύος ( $P < 0.0005$ ). Από τις 4 παραμέτρους, εκείνη που εμφάνιζε τη μεγαλύτερη ξεχωριστή συμβολή στη πρόβλεψη της BMD ήταν η ηλικία ( $\text{beta} = -0.312$ ,  $P < 0.0001$ ), ωστόσο τόσο ο πολυμορφισμός A1330V ( $\text{beta} = 0.304$ ,  $P < 0.0001$ ) όσο και ο δείκτης BMI ( $\text{beta} = 0.236$ ,  $P < 0.0001$ ) συνεισέφεραν στο μοντέλο στατιστικώς σημαντικά. Στο δεύτερο μοντέλο συμπεριελήφθησαν οι ακόλουθες μεταβλητές: η ηλικία, ο δείκτης BMI, τα YSM και ο πολυμορφισμός V667M. Το μοντέλο αυτό μπορούσε να εξηγήσει το 15.9% της μεταβλητότητας στην BMD της οσφυϊκής μοίρας της σπονδυλικής στήλης ( $P < 0.0005$ ). Από τις 4 μεταβλητές, η ηλικία συνέβαλε στο μεγαλύτερο βαθμό στη πρόβλεψη της BMD ( $\text{beta} = -0.307$ ,  $P < 0.0001$ ). Ο δείκτης BMI ( $\text{beta} = 0.236$ ,  $P < 0.0001$ ) και ο πολυμορφισμός V667M ( $\text{beta} = 0.218$ ,  $P < 0.001$ ) συνέβαλαν επίσης στατιστικώς σημαντικά στην πρόβλεψη της BMD, αλλά σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με την ηλικία.

## **VI. Μελέτη αλληλεπίδρασης διαφόρων παραμέτρων για τον καθορισμό της BMD της οσφύος**

Αξίζει να σημειωθεί ότι σε έτερη ανάλυση παλινδρόμησης αποκαλύφθηκε μία στατιστικώς σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των πολυμορφισμών A1330V και V667M πάνω στην BMD της οσφύος ( $P = 0.015$ ).

Στην παρούσα μελέτη, δεν ανεδείχθη σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ της ηλικίας, του δείκτη BMI, της φυσικής άσκησης ή της πρόσληψης ασβεστίου και του πολυμορφισμού A1330V ως προς τη BMD της οσφύος. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και για τον πολυμορφισμό V667M (μη εμφανή δεδομένα).

## **VII. Ανάλυση απλοτύπων**

Με τη βοήθεια της ανάλυσης των απλοτύπων ταυτοποιήθηκαν 4 απλότυποι: 3 απλότυποι κινδύνου (CA, GT, TA) και ένας απλότυπος αναφοράς (CG). Ο Πίνακας 9 δεικνύει τις παρατηρηθείσες και τις αναμενόμενες συχνότητες των απλοτύπων αυτών.

**Πίνακας 8.** Μοντέλα ανάλυσης πολλαπλής παλινδρόμησης για τη διερεύνηση της ικανότητας πρόβλεψης της BMD στην οσφύ από μία ομάδα ανεξάρτητων μεταβλητών

Μοντέλο 1	Ανεξάρτητες μεταβλητές								R <sup>2</sup>	Τιμή <i>P</i>
	Ηλικία		Έτη σε εμμηνόπαυση		BMI		SNP A1330V			
	Beta	Τιμή <i>P</i>	Beta	Τιμή <i>P</i>	Beta	Τιμή <i>P</i>	Beta	Τιμή <i>P</i>		
	-0.312	< 0.0001	0.056	0.487	0.236	< 0.0001	0.304	< 0.0001	0.203	< 0.0005
Μοντέλο 2	Ανεξάρτητες μεταβλητές								R <sup>2</sup>	Τιμή <i>P</i>
	Ηλικία		Έτη σε εμμηνόπαυση		BMI		SNP V667M			
	Beta	Τιμή <i>P</i>	Beta	Τιμή <i>P</i>	Beta	Τιμή <i>P</i>	Beta	Τιμή <i>P</i>		
	-0.307	< 0.0001	0.037	0.653	0.236	< 0.0001	0.218	0.001	0.159	< 0.0005

**Πίνακας 9.** Οι συχνότητες των απλοτύπων των πολυμορφισμών A1330V και V667M στον πληθυσμό μελέτης

Απλότυπος	Αναμενόμενη συχνότητα	Παρατηρηθείσα συχνότητα
CG	0.806	0.848
CA	0.067	0.025
TG	0.117	0.075
TA	0.010	0.052

Οι πολυμορφισμοί A1330V και V667M είναι σε ισχυρή ανισορροπία σύνδεσης ( $P < 0.001$ ).

Η μελέτη των συχνοτήτων των απλοτύπων για τους δύο πολυμορφισμούς έδειξε ότι οι πολυμορφισμοί A1330V και V667M είναι σε ανισορροπία σύνδεσης (Linkage disequilibrium ή LD) (συντελεστής συσχέτισης 0.716,  $P < 0.001$ ). Όταν πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις της BMD μεταξύ των γυναικών που έφεραν τον απλότυπο TA και αυτών που έφεραν τους απλότυπους GT ή CA, βρέθηκε ότι ο απλότυπος που περιείχε και τα δύο αλληλία κινδύνου των πολυμορφισμών A1330V και V667M προσέδιδε μεγαλύτερο κίνδυνο για μειωμένη BMD οσφύος από ό,τι οι άλλοι απλότυποι (TA  $0.741 \pm 0.015$  g/cm<sup>2</sup> έναντι GT  $0.770 \pm 0.013$  g/cm<sup>2</sup>,  $P = 0.046$ ) (TA  $0.741 \pm 0.015$  g/cm<sup>2</sup> έναντι CA  $0.814 \pm 0.022$  g/cm<sup>2</sup>,  $P = 0.045$ ). Τα αποτελέσματα αυτά επίσης δεικνύουν ότι τα δύο αλληλία κινδύνου αλληλεπιδρούν όσον αφορά τη ρύθμιση της BMD.

### VIII. Επίπεδα ορού της OPG, του RANKL και δεικτών οστικού μεταβολισμού και η σχέση τους με τους πολυμορφισμούς A1330V και V667M

Τα κυκλοφορούντα επίπεδα της OPG και του RANKL καθώς και ο λόγος RANKL/ OPG δεν σχετίζονταν στατιστικώς σημαντικά με κανέναν από τους δύο πολυμορφισμούς ακόμα και μετά προσαρμογή για την ηλικία, τα YSM και το δείκτη BMI. Επιπλέον, δεν κατεγράφησαν σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις δεικτών οστικού μεταβολισμού μεταξύ φορέων και μη φορέων του αλληλίου κινδύνου του κάθε πολυμορφισμού. Αξίζει να σημειωθεί το γεγονός ότι διενεργήθηκε ανάλυση και διερεύνηση των εν λόγω συσχετίσεων μετά τον αποκλεισμό των γυναικών που παρουσίαζαν μη ανιχνεύσιμα επίπεδα του RANKL, η οποία επέφερε τα ίδια αποτελέσματα (Πίνακες 10 και 11). Επίσης, όταν εφαρμόστηκαν οι ίδιες αναλύσεις σε επίπεδο απλοτύπων δεν ανιχνεύθηκαν σημαντικές διαφορές (μη εμφανή δεδομένα).

### **IX. Επίπεδα ορού της OPG, του RANKL και η σχέση τους με την ηλικία**

Η παρούσα μελέτη ανέδειξε μία τάση για θετική συσχέτιση της OPG με την ηλικία ( $r = 0.009$ ,  $P = 0.06$ ) και στατιστικώς σημαντική θετική συσχέτιση του RANKL με την ηλικία ( $r = 0.089$ ,  $P = 0.034$ ). Πιο αναλυτικά, η αύξηση της ηλικίας συσχετίστηκε με μία τάση για αύξηση των επιπέδων της OPG, αλλά με σημαντική αύξηση των επιπέδων του RANKL.

### **X. Επίπεδα ορού της OPG, του RANKL και η σχέση τους με την BMD της οσφύος**

Στην παρούσα μελέτη, τα κυκλοφορούντα επίπεδα της OPG στον ορό δεν συσχετίστηκαν στατιστικώς σημαντικά με την BMD της οσφυϊκής μοίρας της σπονδυλικής στήλης ( $r = 0.022$ ,  $P = 0.75$ ). Αντιθέτως, κατεγράφη μία σημαντική αρνητική συσχέτιση του RANKL και του λόγου RANKL/ OPG με την BMD της οσφύος. Οι οστεοπορωτικές γυναίκες παρουσίαζαν σημαντικά μεγαλύτερη τιμή των επιπέδων του RANKL ( $P = 0.021$ ) και του λόγου RANKL/ OPG ( $P = 0.029$ ) σε σχέση με τις μη οστεοπορωτικές μετά προτύπωση για πιθανούς συγχυτικούς παράγοντες, όπως η ηλικία, τα YSM και ο δείκτης BMI.

**Πίνακας 10.** Συγκεντρώσεις ορού δεικτών οστικού μεταβολισμού, της OPG και του RANKL στις δύο ομάδες γονοτύπων του πολυμορφισμού A1330V πριν και μετά τον αποκλεισμό των γυναικών με μη ανιχνεύσιμα επίπεδα RANKL

	<i>221 γυναίκες (στην περίπτωση των μη ανιχνεύσιμων επιπέδων RANKL έγινε χρήση του ελάχιστου ορίου ανίχνευσης για την ανάλυση)</i>			<i>116 γυναίκες με ανιχνεύσιμα επίπεδα RANKL</i>		
	<b>CC (n=168)</b>	<b>CT/TT (n=53)</b>	<b>Τιμή P</b>	<b>CC (n=86)</b>	<b>CT/TT (n=30)</b>	<b>Τιμή P</b>
Ασβέστιο (mg/dl)	9.84 ± 0.04	9.70 ± 0.07	0.059	9.80 ± 0.04	9.67 ± 0.08	0.313
Φώσφορος (mg/dl)	3.45 ± 0.04	3.39 ± 0.07	0.496	3.85 ± 0.28	3.47 ± 0.47	0.487
Αλκαλική φωσφατάση (IU/liter)	78.19 ± 2.44	74.28 ± 4.40	0.749	83.12 ± 3.62	71.73 ± 6.16	0.115
Λόγος ασβεστίου προς κρεατινίνη ούρων (mmol/ mmol)	0.462 ± 0.022	0.452 ± 0.042	0.972	0.498 ± 0.032	0.453 ± 0.059	0.499
OPG (pmol/liter)	1.105 ± 0.063	1.110 ± 0.113	0.895	1.106 ± 0.078	1.129 ± 0.133	0.682
RANKL (pmol/liter)	0.137 ± 0.019	0.172 ± 0.035	0.388	0.248 ± 0.033	0.285 ± 0.056	0.579
Λόγος RANKL/OPG	0.176 ± 0.036	0.262 ± 0.064	0.244	0.318 ± 0.065	0.438 ± 0.111	0.354

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± SEM. Οι συγκρίσεις μεταξύ των δύο ομάδων πραγματοποιήθηκαν με την εφαρμογή της ανάλυσης συμμεταβλητότητας. Οι τιμές είναι μετά προτύπωση για την ηλικία, τα έτη εμμηνόπαυσης και το δείκτη BMI.

**Πίνακας 11.** Συγκεντρώσεις ορού δεικτών οστικού μεταβολισμού, της OPG και του RANKL στις δύο ομάδες γονοτύπων του πολυμορφισμού V667M πριν και μετά τον αποκλεισμό των γυναικών με μη ανιχνεύσιμα επίπεδα RANKL

	<i>221 γυναίκες (στην περίπτωση των μη ανιχνεύσιμων επιπέδων RANKL έγινε χρήση του ελάχιστου ορίου ανίχνευσης για την ανάλυση)</i>			<i>116 γυναίκες με ανιχνεύσιμα επίπεδα RANKL</i>		
	<b>GG (n=188)</b>	<b>GA/AA (n=33)</b>	<b>Τιμή P</b>	<b>GG (n=99)</b>	<b>GA/AA (n=17)</b>	<b>Τιμή P</b>
Ασβέστιο (mg/dl)	9.82 ± 0.04	9.74 ± 0.09	0.352	9.75 ± 0.04	9.67 ± 0.10	0.481
Φώσφορος (mg/dl)	3.60 ± 0.14	3.35 ± 0.33	0.499	3.84 ± 0.26	3.25 ± 0.63	0.391
Αλκαλική φωσφατάση (IU/liter)	77.68 ± 2.31	74.10 ± 5.52	0.550	81.60 ± 3.40	70.80 ± 8.31	0.233
Λόγος ασβεστίου προς κρεατινίνη ούρων (mmol/ mmol)	0.461 ± 0.021	0.450 ± 0.041	0.832	0.492 ± 0.030	0.461 ± 0.073	0.695
OPG (pmol/liter)	1.125 ± 0.059	0.989 ± 0.049	0.375	1.191 ± 0.081	0.908 ± 0.197	0.189
RANKL (pmol/liter)	0.140 ± 0.018	0.174 ± 0.043	0.461	0.244 ± 0.031	0.335 ± 0.075	0.266
Λόγος RANKL/OPG	0.173 ± 0.033	0.194 ± 0.080	0.094	0.302 ± 0.060	0.423 ± 0.146	0.076

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± SEM. Οι συγκρίσεις μεταξύ των δύο ομάδων πραγματοποιήθηκαν με την εφαρμογή της ανάλυσης συμμεταβλητότητας. Οι τιμές είναι μετά προτύπωση για την ηλικία, τα έτη εμμηνόπαυσης και το δείκτη BMI.





## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

---

---

Πολυάριθμα υποψήφια γονίδια έχουν μελετηθεί για τη σχέση τους με τη BMD με αντικρουόμενα αποτελέσματα (512). Μερικά γονίδια εμπλέκονται στην οστική απώλεια, ενώ άλλα συμβάλλουν στην επίτευξη της κορυφαίας οστικής μάζας. Το γονίδιο *LRP5* έχειδειχθεί ότι επηρεάζει την οστική μάζα διαμέσου της ρύθμισης του μονοπατιού σηματοδότησης Wnt (22). Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου *LRP5* ενδέχεται να επηρεάζουν την απόκτηση της κορυφαίας οστικής μάζας (342,351,513,514), μειώνοντας κατά κύριο λόγο τη σηματοδότηση Wnt διαμέσου του κανονικού μονοπατιού Wnt. Χρησιμοποιώντας μία *in vitro* μέθοδο, οι Urano και συν. ανέφεραν πρόσφατα ότι ο πολυμορφισμός A1330V του γονιδίου *LRP5* συσχετίστηκε με μείωση της σηματοδότησης Wnt (358). Επίσης, μία άλλη μελέτη κατέληξε στο ίδιο συμπέρασμα (357). Ωστόσο, ο υποκείμενος μοριακός μηχανισμός, ο οποίος προκαλεί μείωση της οστικής μάζας παραμένει αβέβαιος. Αξίζει να τονιστεί ότι οι van Meurs και συν. παρατήρησαν μία στατιστικώς σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του πολυμορφισμού A1330V και της παρουσίας ή όχι εμμηνόπαυσης όσον αφορά την BMD του αυχένα του μηριαίου οστού. Συγκεκριμένα, σημειώθηκαν μεγαλύτερες διαφορές όσον αφορά την BMD του αυχένα του μηριαίου οστού μεταξύ των ομάδων γονοτύπων του πολυμορφισμού A1330V στις προεμμηνοπαυσιακές σε σχέση με τις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Η μελέτη αυτή προτείνει ότι ο πολυμορφισμός A1330V μπορεί να συμβάλλει στον καθορισμό της κορυφαίας οστικής μάζας (356).

Επομένως, οι πολυμορφισμοί του γονιδίου *LRP5* παραβιάζουν την οστεοβλαστογένεση και ακολούθως μπορεί να συμβάλλουν σε αποτυχία επίτευξης της κορυφαίας οστικής μάζας πριν την ωρίμανση καθώς επίσης και σε συνεχή ανισορροπία της οστικής ανακατασκευής. Σε αυτό το γενετικό υπόβαθρο, η μετεμμηνοπαυσιακή οστική απώλεια εξαιτίας της ανεπάρκειας οιστρογόνων μπορεί να αυξηθεί σημαντικά.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε ο ρόλος των πολυμορφισμών A1330V και V667M του γονιδίου *LRP5* στον καθορισμό της BMD στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης. Αξίζει να σημειωθεί ότι η επίδραση των πολυμορφισμών A1330V και V667M στην BMD της οσφύος μελετάται για πρώτη φορά σε Ελληνίδες περι- και μετά την εμμηνόπαυση.

Στην παρούσα μελέτη οι συχνότητες των αλληλίων C και T του πολυμορφισμού A1330V ήταν 87% και 13% αντίστοιχα. Η παρατηρούμενη συχνότητα του αλληλίου T ήταν παρόμοια με αυτή που αναφέρεται για τους Καυκάσιους (13.1%) (357) και μικρότερη από ό,τι σε Κινέζες (17.2%), Γιαπωνέζους (18%) και Κορεάτες (15%) (514-516). Όσον αφορά τον πολυμορφισμό V667M, οι συχνότητες των αλληλίων G και A ήταν 92% και 8% αντίστοιχα. Δύο μελέτες, οι οποίες διενεργήθηκαν σε Καυκάσιους, έδειξαν ότι η συχνότητα του αλληλίου A ήταν 5.5% και 6% αντίστοιχα (351,357).

Στη μελέτη μας κατεγράφησαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των πολυμορφισμών A1330V και V667M του γονιδίου *LRP5* και της BMD στην οσφύ. Οι γυναίκες με γονότυπο CT ή TT είχαν σημαντικά μικρότερη BMD στην οσφύ συγκριτικά με τις γυναίκες που έφεραν το γονότυπο CC. Παρομοίως, η BMD της οσφύς ήταν σημαντικά χαμηλότερη στις γυναίκες που έφεραν τους γονότυπους GA ή AA σε σχέση με τις γυναίκες που έφεραν το γονότυπο GG. Οι εν λόγω συσχετίσεις παρέμειναν μετά προτύπωση για συγχυτικούς παράγοντες, όπως η ηλικία, τα YSM και ο δείκτης BMI.

Αρκετές μελέτες έχουν διενεργηθεί με σκοπό τη διερεύνηση πιθανής συσχέτισης του πολυμορφισμού A1330V και της BMD (353,356,396,515,517,518). Μία Μπεϋζιανή μετα-ανάλυση (Bayesian meta-analysis), η οποία περιελάμβανε 10 μελέτες συσχέτισης που βασίστηκαν στο γενικό πληθυσμό, πρότεινε ότι η επίδραση του πολυμορφισμού A1330V στη BMD ήταν μέτρια (517). Σε μία πρόσφατη γονιδιακή μελέτη συσχέτισης εφ' όλου του γενώματος (Genome-wide association study ή GWAS), στην οποία συμμετείχαν 8.557 άτομα λευκής Ευρωπαϊκής καταγωγής, βρέθηκε ότι ο πολυμορφισμός A1330V συσχετιζόταν με μείωση της BMD στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης και στον αυχένα του μηριαίου οστού (396). Μία άλλη GWAS, η οποία περιελάμβανε 37.534 άτομα από 18 ομάδες που συμμετείχαν από την Ευρώπη και την Β. Αμερική, απέδειξε ότι οι πολυμορφισμοί A1330V και V667M συσχετίστηκαν με μείωση της BMD της οσφύς

και του αυχένα του μηριαίου οστού (356). Τα ευρήματά μας συμφωνούν με τα αποτελέσματα των δύο GWAS (356,396).

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό A1330V, τρεις μελέτες επιβεβαιώνουν περαιτέρω τη συσχέτιση του εν λόγω πολυμορφισμού με χαμηλή BMD στην οσφύ (513,518,519). Ωστόσο, αρκετοί ερευνητές έχουν αναφέρει συσχέτιση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού με την BMD σε άλλες σκελετικές θέσεις, όπως στην κερκίδα (518) και στον αυχένα του μηριαίου οστού (356,396,513) ή με την ολική BMD (358). Επιπροσθέτως, στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές για συσχέτιση του εν λόγω πολυμορφισμού με την BMD στους άνδρες (353,357,360). Συγκεκριμένα, η μελέτη Rotterdam κατέγραψε την παρουσία συσχέτισης του πολυμορφισμού A1330V με τη BMD της οσφυϊκής μοίρας της σπονδυλικής στήλης σε ηλικιωμένους άνδρες (353), ενώ σε άλλη εργασία αναφέρεται συσχέτιση του πολυμορφισμού με τη BMD στο ισχίο σε άντρες ηλικίας  $\leq 60$  ετών (357). Αντιθέτως, άλλες μελέτες δεν έχουν αναδείξει την παρουσία συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμού A1330V και BMD στην οσφύ (357,515).

Αρκετοί ερευνητές έχουν μελετήσει την επίδραση του πολυμορφισμού V667M στην BMD (355,356,513,520). Όπως προαναφέρθηκε, τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης είναι σε συμφωνία με αυτά που προέκυψαν από μία πρόσφατη GWAS (356). Σημειωτέον ότι, εμείς μελετήσαμε μία ομάδα γυναικών ευρισκόμενων περι- ή μετά την εμμηνόπαυση. Από την άλλη πλευρά, τα αποτελέσματα άλλων μελετών, που εξέτασαν τη σχέση του πολυμορφισμού V667M με την BMD σε άλλους πληθυσμούς, δεν είναι συγκρίσιμα. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην ύπαρξη διαφορών στο σχεδιασμό των διαφόρων μελετών. Σε μία προηγούμενη μελέτη δεν βρέθηκε συσχέτιση του εν λόγω πολυμορφισμού με την BMD στην οσφύ ή στον αυχένα του μηριαίου οστού σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (513). Αντιθέτως, ο πολυμορφισμός V667M συσχετίστηκε με μειωμένη BMD οσφύς σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες σύμφωνα με άλλους ερευνητές (355), καθώς επίσης και με την BMD σε άλλες σκελετικές θέσεις στους άντρες (356,357,360,520).

Στη συγχρονική μελέτη των Ferrari και συν., ο πολυμορφισμός V667M συσχετίστηκε με σημαντική μείωση στις παραμέτρους της οσφυϊκής μοίρας της σπονδυλικής στήλης (περιοχική BMD, BMC και οστική επιφάνεια) στους ενήλικες. Εντούτοις, στην ίδια μελέτη βρέθηκε ότι ο πολυμορφισμός A1330V δεν σχετιζόταν με τη BMD, αλλά βρίσκεται σε LD με τον πολυμορφισμό V667M. Οι απλότυποι του πολυμορφισμού A1330V με τον V667M σχετιζόνταν σημαντικά με μείωση της BMD

της οσφύος, της BMC και της προβαλλόμενης οστικής επιφάνειας στους ενήλικες άνδρες. Η μελέτη αυτή προτείνει επίσης ότι οι εν λόγω πολυμορφισμοί παρεμβαίνουν στον καθορισμό της οστικής μάζας και του μεγέθους της οσφυϊκής μοίρας της σπονδυλικής στήλης στους άντρες, επηρεάζοντας την αύξηση των οσφυϊκών σπονδύλων κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας (351).

Διάφοροι παράγοντες μπορεί να ευθύνονται για την ασυμφωνία των ευρημάτων των μελετών, όπως διαφορές ως προς το γενετικό υπόβαθρο, την εθνικότητα, τη φυλή, το φύλο ή τις αλληλεπιδράσεις γονιδίου-περιβάλλοντος. Άλλες παράμετροι που ενδέχεται να υπεισέρχονται στην αντιγνωμία μεταξύ των μελετών είναι η ηλικιακή κατανομή του πληθυσμού που επιλέγεται να μελετηθεί, η παρουσία ή όχι εμμηνόπαυσης, η πρόσληψη ασβεστίου, η σκελετική θέση μέτρησης της BMD και ο τύπος της στατιστικής προσέγγισης.

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε ότι οι πολυμορφισμοί A1330V και V667M του γονιδίου *LRP5* ήταν σε ισχυρή LD. Το εύρημα αυτό είναι σε συμφωνία με άλλες μελέτες (351,356,357,513). Αξίζει να τονισθεί ότι στη μελέτη μας, ο απλότυπος, ο οποίος καθορίστηκε από τα αλληλία κινδύνου των πολυμορφισμών A1330V και V667M (TA), συσχετίστηκε με χαμηλότερη BMD από ό,τι οι απλότυποι που περιέχουν μόνο το ένα από τα δύο αλληλία κινδύνου (CA, TG). Το εν λόγω εύρημα δεικνύει ότι υπάρχει μία σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των πολυμορφισμών A1330V και V667M όσον αφορά τη BMD της οσφύος. Πράγματι, η ανάλυση παλινδρόμησης που διενεργήθηκε αποκάλυψε την αλληλεπίδραση αυτή ( $P = 0.015$ ). Τα αποτελέσματά μας είναι σε συμφωνία με εκείνα των van Meurs και συν. Επιπροσθέτως, στην προαναφερθείσα μελέτη, δεν βρέθηκε καμία αλληλεπίδραση μεταξύ είτε του πολυμορφισμού A1330V, είτε του V667M και της ηλικίας όσον αφορά τη BMD της οσφύος (356), που συμφωνεί και με τα ευρήματα της παρούσης μελέτης. Επιπλέον, η μελέτη μας δεν κατέδειξε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ είτε του πολυμορφισμού A1330V, είτε του V667M και της φυσικής άσκησης όσον αφορά τη BMD της οσφύος στις γυναίκες, όπως και σε μία άλλη μελέτη των Kiel και συν. (357). Αντιθέτως, στους άντρες στην ίδια μελέτη ανεδείχθη μία αλληλεπίδραση μεταξύ φυσικής άσκησης και πολυμορφισμού A1330V στον καθορισμό της BMD της οσφύος που ήταν αξιοσημείωτη.

Μετά την κατηγοριοποίηση των γυναικών της μελέτης μας με κριτήριο τον πολυμορφισμό A1330V, δεν ανιχνεύτηκαν αξιολογες διαφορές στα κυκλοφορούντα επίπεδα της OPG, του RANKL ή δεικτών οστικού μεταβολισμού μεταξύ των δύο

ομάδων γονοτύπων. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και για τον πολυμορφισμό V667M. Από όσο γνωρίζουμε, τη σχέση μεταξύ των συγκεκριμένων πολυμορφισμών και των μορίων αυτών δεν έχει διαπραγματευτεί άλλη μελέτη δημοσιευμένη ως σήμερα. Αξίζει στο σημείο αυτό να τονιστεί ότι η πρωτεΐνη LRP5 διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών μέσω της αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες Wnt και της επακόλουθης ενεργοποίησης της κανονικής σηματοδότησης Wnt. Επιπλέον, η ρύθμιση της έκφρασης της OPG εξαρτάται από μία πλειάδα ορμονών, κυτταροκινών, αυξητικών παραγόντων (52), αλλά και από το μονοπάτι σηματοδότησης Wnt/β-κατενίνη (23). Θεωρητικά, θα ανέμενε κανείς οι πολυμορφισμοί A1330V και V667M του γονιδίου *LRP5* να επηρεάζουν τους οστεοβλάστες και κατά συνέπεια την έκφραση της OPG και του RANKL. Ωστόσο, η OPG και ο RANKL δεν είναι ειδικοί δείκτες του οστίτη ιστού, αλλά εκφράζονται και σε πολλούς άλλους ιστούς (222). Επομένως, είναι πιθανόν τα επίπεδα της OPG και του RANKL στον ορό να μην αντικατοπτρίζουν τη δραστηριότητα τους στο μικροπεριβάλλον του οστού. Το γεγονός λοιπόν της μη ανίχνευσης συσχέτισης μεταξύ των δύο πολυμορφισμών και των μορίων OPG και RANKL στη μελέτη μας θα μπορούσε να αποδοθεί στην αδυναμία μέτρησης των επιπέδων των μορίων αυτών άμεσα στο μικροπεριβάλλον του οστού. Μία εναλλακτική ερμηνεία είναι η περιορισμένη ικανότητα ανίχνευσης του sRANKL στον ορό από τη συγκεκριμένη μέθοδο ELISA, παρά τη χρήση πρόσθετου συστήματος που ενισχύει την ανίχνευση αυτού. Πράγματι, σχεδόν στο ήμισυ των γυναικών τα επίπεδα του RANKL στον ορό ήταν μη ανιχνεύσιμα. Ο εν λόγω περιορισμός της μεθόδου αποδίδεται στη σχετική αστάθεια του RANKL στον ορό (273). Επίσης, δεν έχει καταστεί σαφές αν τα επίπεδα της OPG στον ορό παρεμβαίνουν στην ανίχνευση του RANKL (521). Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι ο αποκλεισμός των γυναικών με μη ανιχνεύσιμα επίπεδα του RANKL στον ορό από την στατιστική ανάλυση επέφερε τα ίδια αποτελέσματα. Περαιτέρω έρευνα απαιτείται για τη διασαφήνιση του θέματος αυτού.

Στην παρούσα μελέτη κατεγράφη μία τάση για θετική συσχέτιση της OPG με την ηλικία. Η αύξηση των επιπέδων της OPG στον ορό με την πάροδο της ηλικίας και την αύξηση της οστικής ανακατασκευής (262,268,522), ειδικά στις οστεοπορωτικές γυναίκες (523), πιθανώς αποτελεί έναν αντιρροπιστικό μηχανισμό του σκελετού σε μία προσπάθεια να ανταγωνιστεί την αυξημένη οστική απορρόφηση και την επιταχυνόμενη οστική απώλεια που επισυμβαίνει μετά την εμμηνόπαυση. Το εύρημα

αυτό είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα αρκετών μελετών που διενεργήθηκαν τόσο στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (259-261,524), όσο και σε υγιείς ενήλικες (262,263). Αντιθέτως, μία μελέτη που περιελάμβανε υγιή άτομα δεν ανέδειξε καμία συσχέτιση της OPG με την ηλικία (264). Σημειωτέον, ότι στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε μία θετική συσχέτιση του RANKL με την ηλικία. Αξίζει να τονιστεί ότι μία μελέτη που περιελάμβανε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες από την Ιαπωνία κατέγραψε επίσης θετική συσχέτιση του RANKL με την ηλικία (524). Αντιθέτως, άλλοι ερευνητές έχουν παρατηρήσει αρνητική (256) ή καμία συσχέτιση του RANKL με την ηλικία (525).

Στην παρούσα μελέτη δεν ανιχνεύθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της OPG και της BMD στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν προκύψει από διάφορες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε γυναίκες (256,260,262). Ωστόσο, μερικές μελέτες που διενεργήθηκαν επίσης σε γυναίκες κατέγραψαν θετική συσχέτιση της OPG με την BMD (258,259), ενώ άλλες αρνητική (261,265). Από την άλλη πλευρά, στην παρούσα μελέτη ανεδείχθη μία σημαντική αρνητική συσχέτιση του RANKL με την BMD. Το εύρημα αυτό είναι σε συμφωνία με μία μελέτη (524). Αντιθέτως, σε μία άλλη μελέτη δεν σημειώθηκε συσχέτιση του RANKL ή του λόγου RANKL/ OPG με την BMD στην οσφύ (256).

Ένας περιορισμός της παρούσης μελέτης είναι ότι δεν βασίστηκε στο γενικό πληθυσμό, αλλά περιελάμβανε αποκλειστικά περι- και μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες που απευθύνθηκαν στο Ενδοκρινολογικό Τμήμα για κλινική εξέταση και διενέργεια οστικής πυκνομετρίας. Αξίζει να σημειωθεί ότι πολλές από τις γυναίκες της μελέτης μας επισκέφθηκαν το Ενδοκρινολογικό Τμήμα για μία δεύτερη γνώμη αφού πρώτα είχε τεθεί σε αυτές η διάγνωση της οστεοπόρωσης. Το γεγονός αυτό εξηγεί το σημαντικό ποσοστό οστεοπόρωσης που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη και τις σημαντικά μειωμένες τιμές της BMD. Ωστόσο, η κατανομή της οστεοπόρωσης, της οστεοπενίας και της φυσιολογικής BMD στη συγκεκριμένη ομάδα γυναικών δεν φαίνεται να διαφέρει σημαντικά από την αναμενόμενη για τον Ελληνικό πληθυσμό. Εκτιμάται ότι ποσοστό περίπου ίσο με 44% των μετεμμηνοπαυσιακών Ελληνίδων προσβάλλεται από την οστεοπόρωση (511,526). Ένας άλλος περιορισμός της μελέτης ήταν ότι, όπως όλες οι μελέτες επιπολασμού (συγχρονικές, cross-sectional), αδυνατεί να εξάγει συμπεράσματα σε βάθος χρόνου (π.χ. για την επίδραση του γονότυπου στο ρυθμό της οστικής απώλειας). Η μέτρηση της BMD διενεργήθηκε στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης και όχι σε άλλες σκελετικές θέσεις, όπως στον αυχένα

του μηριαίου οστού. Το γεγονός δε ότι δεν μετρήθηκαν κι άλλοι δείκτες οστικού μεταβολισμού μπορεί να συνετέλεσε στο να μην αποτυπωθεί η επιρροή των πολυμορφισμών A1330V και V667M στον οστικό μεταβολισμό. Ωστόσο, η επιρροή αυτή κατεδείχθη με την τεκμηρίωση ισχυρής συσχέτισης μεταξύ των δύο πολυμορφισμών και της BMD στην οσφύ.

Στα πλεονεκτήματα της μελέτης συγκαταλέγεται η εστίαση σε γυναικείο ελληνικό πληθυσμό, ο οποίος θεωρείται ιδιαίτερα ομοιογενής, χωρίς εθνικές προσμίξεις. Η γενίκευση όμως των αποτελεσμάτων σε άλλες φυλετικές ομάδες θα πρέπει να αποφεύγεται. Παρά το μικρό ποσοστό των ομοζυγωτών (TT 1.4% και AA 0.5%), το ποσοστό των ετεροζυγωτών ήταν αρκετά υψηλό (CT 22.6% και GA 14.5%), γεγονός που ενδυναμώνει τη μελέτη μας και αυξάνει τη στατιστική της δύναμη για ανίχνευση υπαρκτών συσχετίσεων. Η ανάλυση των απλοτύπων που εκτελέστηκε αποτελεί επίσης ένα πλεονέκτημα της παρούσης μελέτης. Η στατιστική δε προτύπωση για συγχυτικούς παράγοντες (ηλικία, YSM, BMI) διασφαλίζει την ορθότητα των αποτελεσμάτων.

Συμπερασματικά, οι πολυμορφισμοί A1330V και V667M του γονιδίου *LRP5* συμβάλλουν στον καθορισμό της BMD της οσφύος Ελληνίδων ευρισκόμενων περι- και μετά την εμμηνόπαυση. Ωστόσο, περαιτέρω έρευνα απαιτείται για την εξακρίβωση του ρόλου των λειτουργικών πολυμορφισμών των γονιδίων που εμπλέκονται στο μονοπάτι σηματοδότησης Wnt.





## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

---

---

1. Όσον αφορά τον πολυμορφισμό A1330V του γονιδίου *LRP5*, η παρατηρούμενη συχνότητα του αλληλίου κινδύνου T σε ελληνικό γυναικείο πληθυσμό είναι παρόμοια με αυτή που αναφέρεται για τους Καυκάσιους.

2. Η συχνότητα του αλληλίου κινδύνου A του πολυμορφισμού V667M του γονιδίου *LRP5* σε ελληνικό γυναικείο πληθυσμό είναι ελαφρώς υψηλότερη από εκείνη που παρατηρείται στους Καυκάσιους.

3. Η κατανομή των γονοτύπων των πολυμορφισμών A1330V και V667M του γονιδίου *LRP5* είναι σε συμφωνία με την ισορροπία Hardy-Weinberg.

4. Η παρουσία του πολυμορφισμού A1330V του γονιδίου *LRP5* συσχετίζεται στατιστικώς σημαντικά με χαμηλή BMD της οσφύς σε Ελληνίδες ευρισκόμενες περι- ή μετά την εμμηνόπαυση. Πιο αναλυτικά, οι γυναίκες που φέρουν τους γονότυπους CT ή TT εμφανίζουν σημαντικά χαμηλότερη BMD στην οσφύ σε σχέση με τις γυναίκες που φέρουν το γονότυπο CC ( $P < 0.0001$ ).

5. Ο πολυμορφισμός V667M επίσης συσχετίζεται στατιστικώς σημαντικά με την BMD στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης. Η BMD στην οσφύ είναι σημαντικά μικρότερη στις γυναίκες που φέρουν τους γονότυπους GA ή AA από ό,τι στις γυναίκες με γονότυπο GG ( $P < 0.0001$ ).

7. Οι προαναφερθείσες συσχετίσεις των πολυμορφισμών και της BMD επαληθεύονται και μετά προτύπωση για συγχυτικούς παράγοντες, όπως η ηλικία, τα YSM και ο δείκτης BMI.

8. Οι πολυμορφισμοί A1330V και V667M του γονιδίου *LRP5* είναι σε ισχυρή ανισορροπία σύνδεσης.

9. Οι πολυμορφισμοί A1330V και V667M αλληλεπιδρούν μεταξύ τους για τον καθορισμό της BMD της οσφύς.

10. Η διαταραχή της οστεοβλαστογένεσης διαμέσου της μείωσης της κανονικής σηματοδότησης Wnt από τους πολυμορφισμούς A1330V και V667M του γονιδίου *LRP5* φαίνεται ότι δεν επηρεάζει τα διαλυτά μόρια OPG και RANKL. Στη μελέτη μας, τα κυκλοφορούντα επίπεδα της OPG και του RANKL δεν παρουσίαζαν αξιόλογες διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων γονοτύπων του κάθε πολυμορφισμού ακόμα και μετά προσαρμογή για την ηλικία, τα YSM και το δείκτη BMI. Η μη ανίχνευση συσχέτισης μεταξύ των δύο πολυμορφισμών και των OPG και RANKL αποδίδεται στο ότι τα επίπεδα της OPG και του RANKL στον ορό πιθανώς δεν αντικατοπτρίζουν τη δραστηριότητά τους στο μικροπεριβάλλον του οστού. Περαιτέρω έρευνα απαιτείται για τη διασαφήνιση του θέματος αυτού.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

---

---

Η οστεοπόρωση είναι μία συστηματική σκελετική νόσος με ισχυρό γενετικό υπόβαθρο, η οποία χαρακτηρίζεται από μείωση της οστικής πυκνότητας (Bone mineral density ή BMD), διαταραχή της μικροαρχιτεκτονικής του οστίτη ιστού και αυξημένο κίνδυνο καταγμάτων. Η μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση είναι ο πιο κοινός τύπος οστεοπόρωσης που σχετίζεται με ανεπάρκεια οιστρογόνων. Πολλαπλοί γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες καθώς και οι μεταξύ των αλληλεπιδράσεις παίζουν ρόλο στον καθορισμό της οστικής μάζας. Το κανονικό μονοπάτι σηματοδότησης Wnt, μέσω της πρωτεΐνης 5 της σχετιζόμενης με τον υποδοχέα των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LRP5), διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της οστικής μάζας. Οι παθογενετικές μεταλλάξεις και οι πολυμορφισμοί του γονιδίου *LRP5* έχουν συσχετιστεί με ένα ευρύ φάσμα σκελετικών διαταραχών. Πολυμορφισμοί του γονιδίου *LRP5* πιθανώς εμπλέκονται στην παθογένεια της οστεοπόρωσης.

Ο πρωταρχικός σκοπός της παρούσης μελέτης ήταν να διερευνηθεί η επίδραση των πολυμορφισμών A1330V και V667M του γονιδίου *LRP5* στην BMD της οσφύς Ελληνίδων ευρισκόμενων περι- ή μετά την εμμηνόπαυση. Επιπλέον, στόχος ήταν η ανάλυση της σχέσης μεταξύ των εν λόγω πολυμορφισμών και των επιπέδων ορού των διαλυτών μορίων της οστεοπροτεγερίνης (Osteoprotegerin ή OPG), του συνδέτη του υποδοχέα του ενεργοποιητή του πυρηνικού παράγοντα-κΒ (Receptor activator of nuclear factor-κB ligand ή RANKL) και δεικτών του οστικού μεταβολισμού.

Στη μελέτη συμπεριελήφθησαν 221 διαδοχικές γυναίκες ευρισκόμενες περι- ή μετά την εμμηνόπαυση, οι οποίες απευθύνθηκαν στα εξωτερικά ιατρεία της Ενδοκρινολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων για έλεγχο πιθανής οστεοπόρωσης. Ως κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη ορίστηκαν

τα ακόλουθα: (1) ηλικία μικρότερη των 40 ετών ή μεγαλύτερη των 63 ετών, (2) ασθένειες που επηρεάζουν το μεταβολισμό των οστών, όπως διαταραχές του ενδοκρινικού συστήματος (συμπεριλαμβανομένου του υπερθυρεοειδισμού, του υπερπαραθυρεοειδισμού, του συνδρόμου Cushing, κ.ά.), ανεπάρκεια της βιταμίνης D, σύνδρομα δυσαπορρόφησης ή αυτοάνοσα νοσήματα, (3) προηγηθείσα ή τρέχουσα θεραπεία με οιστρογόνα, διφωσφονικά, καλσιτονίνη, παραθορμόνη ή γλυκοκορτικοειδή. Η χρήση συμπληρωμάτων ασβεστίου και βιταμίνης D ήταν επιτρεπτή.

Η BMD εκτιμήθηκε στην οσφύ με τη μέθοδο της απορροφησιομετρίας ακτίνων X διπλής ενέργειας (Dual energy X-ray absorptiometry ή DXA). Η γενετική ανάλυση των πολυμορφισμών A1330V και V667M του γονιδίου *LRP5* διενεργήθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time polymerase chain reaction ή RT-PCR). Επιπρόσθετα, έγινε μέτρηση των διαλυτών μορίων της OPG, του RANKL και δεικτών του οστικού μεταβολισμού στον ορό.

Η κατανομή των γονοτύπων του πολυμορφισμού A1330V ήταν CC 76%, CT 22.6% και TT 1.4%, ενώ του πολυμορφισμού V667M ήταν GG 85%, GA 14.5% και AA 0.5%. Η κατανομή των γονοτύπων των πολυμορφισμών A1330V και V667M του γονιδίου *LRP5* ήταν σε συμφωνία με την ισορροπία Hardy-Weinberg ( $\chi^2 = 0.1079$ ,  $P > 0.05$  και  $\chi^2 = 0.53$ ,  $P > 0.05$  αντίστοιχα). Εξαιτίας της χαμηλής συχνότητας των ατόμων με γονότυπο TT, ο πληθυσμός της μελέτης κατηγοριοποιήθηκε σε δύο ομάδες όσον αφορά τον πολυμορφισμό A1330V: CC και CT/TT. Παρομοίως, ο πληθυσμός της μελέτης ταξινομήθηκε σε δύο ομάδες όσον αφορά τον πολυμορφισμό V667M: GG και GA/AA, λόγω του μικρού αριθμού των γυναικών που έφεραν το γονότυπο AA.

Κατεγράφησαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των πολυμορφισμών A1330V και V667M και της BMD οσφύς. Πιο αναλυτικά, οι γυναίκες της ομάδας CT/TT είχαν σημαντικά χαμηλότερη BMD στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης σε σχέση με τις γυναίκες που έφεραν το γονότυπο CC (CT/TT  $0.768 \pm 0.086$  g/cm<sup>2</sup> έναντι CC  $0.839 \pm 0.123$  g/cm<sup>2</sup>,  $P < 0.0001$ ). Επίσης, η BMD της οσφύς ήταν μικρότερη στις γυναίκες της ομάδας GA/AA από ότι στις γυναίκες που έφεραν το γονότυπο GG (GA/AA  $0.766 \pm 0.079$  g/cm<sup>2</sup> έναντι GG  $0.829 \pm 0.123$  g/cm<sup>2</sup>,  $P < 0.0001$ ). Οι συσχετίσεις παρέμειναν στατιστικώς σημαντικές και μετά προτύπωση για πιθανούς συγχυτικούς παράγοντες όπως η ηλικία, τα έτη σε εμμηνόπαυση (Years since menopause ή YSM) και ο δείκτης BMI.

Οι πολυμορφισμοί A1330V και V667M του γονιδίου *LRP5* ήταν σε ισχυρή ανισορροπία σύνδεσης. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μία σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των πολυμορφισμών A1330V και V667M για τον καθορισμό της BMD στην οσφύ.

Τα επίπεδα ορού της OPG, του RANKL και δεικτών οστικού μεταβολισμού δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες γονοτύπων του κάθε πολυμορφισμού, ακόμη και μετά προσαρμογή για τους προαναφερθέντες συγχυτικούς παράγοντες.

Συμπερασματικά, οι πολυμορφισμοί A1330V και V667M του γονιδίου *LRP5* συμβάλλουν στον καθορισμό της BMD της οσφύος Ελληνίδων ευρισκόμενων περι- ή μετά την εμμηνόπαυση. Ωστόσο, περαιτέρω έρευνα απαιτείται για την εξακρίβωση του ρόλου των λειτουργικών πολυμορφισμών των γονιδίων που εμπλέκονται στο μονοπάτι σηματοδότησης Wnt.



**UNIVERSITY OF IOANNINA, MEDICAL SCHOOL  
DEPARTMENT OF MEDICINE  
DIVISION OF ENDOCRINOLOGY**

**PATHOPHYSIOLOGICAL AND GENETIC STUDY OF  
OSTEOPOROSIS IN A GREEK POPULATION**

**ANASTASIA E. MARKATSELI, MD**

**IOANNINA 2010**





## SUMMARY

---

---

Osteoporosis is a systemic skeletal disease with a strong genetic component. Osteoporosis is characterized by low bone mineral density (BMD), deterioration of the bone microarchitecture and increased risk of fragility fractures. Postmenopausal osteoporosis is the most common type of osteoporosis associated with estrogen deficiency. Multiple genetic and environmental factors as well as their interactions determine the risk of osteoporosis. Wnt signaling through low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) is an important determinant of bone mass regulation. Pathogenic mutations and polymorphisms in the *LRP5* gene are associated with a spectrum of skeletal disorders. Polymorphisms in *LRP5* gene have been associated with either osteoporotic phenotypes or normal bone mineral density (BMD) variation.

The main aim of the present study was to examine the influence of the A1330V and V667M polymorphisms on lumbar spine BMD in a well-characterized cohort of peri- and postmenopausal Greek women. In addition, we sought to determine whether serum levels of osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL), as well as bone metabolic markers correlate with the A1330V and V667M polymorphisms.

The study included 221 consecutive peri- and postmenopausal Greek women aged 40-63 yrs, who attended the osteoporosis outpatient clinic at the University Hospital of Ioannina for screening for osteoporosis because of menopause. Subjects with any of the following criteria were not eligible to participate in the study: (1) age less than 40 yrs and higher than 63 yrs, (2) diseases capable of affecting bone metabolism, such as disorders of the endocrine system (including thyroid disease, hyperparathyroidism and hypercortisolism), vitamin D deficiency, malabsorption syndromes or autoimmune diseases, (3) previous or current treatment with estrogens,

bisphosphonates, calcitonin, parathyroid hormone or glucocorticoids. Calcium supplements and vitamin D preparations were permitted.

All participants underwent spinal BMD evaluation. Genotyping of A1330V and V667M polymorphisms was performed by real-time polymerase chain reaction. Levels of OPG, RANKL and bone metabolic markers were measured.

The genotype frequencies of the A1330V polymorphism were CC (76%), CT (22.6%) and TT (1.4%) and of the V667M polymorphism GG (85%), GA (14.5%) and AA (0.5%). The distribution of A1330V and V667M genotypes was compatible with that of Hardy-Weinberg equilibrium ( $\chi^2 = 0.1079$ ,  $P > 0.05$  and  $\chi^2 = 0.53$ ,  $P > 0.05$ , respectively). Because of the low frequency of the TT genotype, the cohort was divided into two genotype groups regarding A1330V polymorphism: CC and CT/TT. Similarly, the study population was divided into two genotype groups according to the presence of V667M polymorphism: GG and GA/AA, due to the small number of women carrying genotype AA.

Significant associations between the investigated SNPs and spinal BMD were detected. Women carrying CT/TT genotypes had lower spinal BMD than women with CC (CT/TT  $0.768 \pm 0.086$  g/cm<sup>2</sup> vs. CC  $0.839 \pm 0.123$  g/cm<sup>2</sup>;  $P < 0.0001$ ). Moreover, spinal BMD was lower in women with GA/AA genotypes than in women with GG (GA/AA  $0.766 \pm 0.079$  g/cm<sup>2</sup> vs. GG  $0.829 \pm 0.123$  g/cm<sup>2</sup>;  $P < 0.0001$ ). The associations remained significant after adjustment for age, years since menopause (YSM) and body mass index (BMI).

The A1330V and V667M polymorphisms in the *LRP5* gene were in strong linkage disequilibrium (LD). A significant interaction between the A1330V and V667M SNP on spinal BMD was also revealed.

No differences were observed in circulating OPG, RANKL levels and bone metabolic markers between the two groups of each polymorphism even after adjustment for age, YSM and BMI.

In conclusion, the A1330V and V667M polymorphisms of the *LRP5* gene contribute to the determination of BMD at the lumbar spine in peri- and postmenopausal Greek women. To gain further insight into the genetic background underlying postmenopausal osteoporosis in Greece, studies in Wnt pathway candidate genes are warranted.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

---

1. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000;21:115-37.
2. Raisz LG. Clinical practice. Screening for osteoporosis. *N Engl J Med* 2005;14;353(2):164-71.
3. Johnson J and Wang MY. Genome search reveals gene variants associated with low bone mineral density and fractures in osteoporosis. *Neurosurgery* 2008;63(4):N12.
4. Kanis JA, Melton LJ III, Christiansen C et al. The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1994;9:1137-41.
5. Cummings SR and Melton LJ. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet* 2002;359:1761-7.
6. Heaney RP: Is the paradigm shifting? *Bone* 2003;33:457-65.
7. National Institutes of Health: Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. NIH Consensus Statement 2000;17:1-45.
8. Kalu DN, Liu CC, Hardin RR et al. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. *Endocrinology* 1989;124:7-16.
9. Kanis JA, Burlet N, Cooper C et al. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2008;19(4):399-428.
10. Riggs BL, Khosla S and Melton LJ III. A unitary model for involutional osteoporosis: Estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J Bone Miner Res* 1998;13:763-73.
11. Recker R, Lappe J, Davies KM et al. Bone remodeling increases substantially in the years after menopause and remains increased in older osteoporosis patients. *J Bone Miner Res* 2004;19:1628-33.
12. Ferrari S. Osteoporosis: a complex disorder of aging with multiple genetic and environmental determinants. In Simopoulos A, ed. *Nutrition and fitness: mental health, aging, and the implementation of a healthy diet and physical activity lifestyle*. Basel: Karger, 2005, pp. 35-51.
13. Deng HW, Livshits G, Yakovenko K et al. Evidence for a major gene for bone mineral density/content in human pedigrees identified via probands with extreme bone mineral density. *Ann Hum Genetics* 2002;66:61-74.
14. Pocock NA, Eisman JA, Hopper JL et al. Genetic determinants of bone mass in adults: a twin study. *J Clin Invest* 1987;80(3):706-10.

15. Peacock M, Turner C, Econs M et al. Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev* 2002;23:303–26.
16. Gueguen R, Jouanny P, Guillemin F et al. Segregation analysis and variance components analysis of bone mineral density in healthy families. *J Bone Miner Res* 1995;12:2017–22.
17. Krall EA and Dawson-Hughes B. Heritable and life-style determinants of bone mineral density. *J Bone Miner Res* 1993;8:1–9.
18. Efstathiadou Z, Tsatsoulis A and Ioannidis JP. Association of collagen I alpha 1 Sp1 polymorphism with the risk of prevalent fractures: a meta-analysis. *J Bone Miner Res* 2001;16:1586–92.
19. Thakkinstian A, D’Este C, Eisman J et al. Meta-analysis of molecular association studies: vitamin D receptor gene polymorphisms and BMD as a case study. *J Bone Miner Res* 2004;19(3):419–28.
20. Ioannidis JP, Stavrou I, Trikalinos TA et al. Association of polymorphisms of the estrogen receptor alpha gene with bone mineral density and fracture risk in women: a meta-analysis. *J Bone Miner Res* 2002;17(11):2048–60.
21. Liu YJ, Shen H, Xiao P et al. Molecular genetic studies of gene identification for osteoporosis: a 2004 update. *J Bone Miner Res* 2006;21(10):1511–35.
22. Krishnan V, Bryant HU and Macdougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest* 2006;116:1202–9.
23. Glass DA, Bialek P, Ahn JD et al. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell* 2005;8:751–64.
24. Gregory CA, Gunn WG, Reyes E et al. How Wnt signaling affects bone repair by mesenchymal stem cells from the bone marrow. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1049:97–106.
25. Mao J, Wang J, Liu B et al. Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Cell* 2001;7:801–9.
26. Koller DL, Rodriguez LA, Christian JC et al. Linkage of a QTL contributing to normal variation in bone mineral density to chromosome 11q12–13. *J Bone Miner Res* 1998;13:1903–8.
27. Hirschhorn JN, Lindgren CM, Daly MJ et al. Genomewide linkage analysis of stature in multiple populations reveals several regions with evidence of linkage to adult height. *Am J Hum Genet* 2001;69:106–16.
28. Compston J. Connectivity of cancellous bone. *Bone* 1994;15:463–6.
29. Norman T and Wang Z. Microdamage of human cortical bone. *Bone* 1997;20:375–9.
30. Myers E and Wilson S. Biomechanics of osteoporosis and vertebral fractures. *Spine* 1997;22:25S–31S.
31. Burr D, Forwood M, Fyhrie D et al. Bone microdamage and skeletal fragility in osteoporotic and stress fractures. *J Bone Miner Res* 1997;12:6–15.
32. Manolagas SC. Cell number versus cell vigor: what really matters to a regenerating skeleton? *Endocrinology* 1999;140:4377–81.
33. Rice JC, Cowi SC and Bowman JA. On the dependence of the elasticity and strength of cancellous bone on apparent density. *J Biomech* 1988;21:155–68.

34. Seeman E. From density to structure: growing up and growing old on the surfaces of bone. *J Bone Miner Res* 1997;12:509-21.
35. Goldstein S, Goulet R and McCubbrey D. Measurement and significance of three-dimensional architecture to the mechanical integrity of trabecular bone. *Calcif Tissue Int* 1993;53(suppl.1):S127-S133.
36. Einhorn TA. Biomechanical properties of bone. In: *Triangle*, vol 27, No1/2, 1988.
37. Manolagas SC, Kousteni S and Jilka RL. Sex steroids and bone. *Recent Prog Horm Res* 2002;57:385.
38. Ruff CB and Hayes WC. Sex differences in age-related remodeling of the femur and tibia. *J Orthop Res* 1988;6:886-96.
39. Lu PW, Cowell CT, Lloyd-Jones SA et al. Volumetric bone mineral density in normal subjects, aged 5-27 years. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:1586-90.
40. Orwoll ES, Belknap JK and Klein RF. Gender specificity in the genetic determinants of peak bone mass. *J Bone Miner Res* 2001;16(11):1962-71.
41. Belknap JJ, Dubay C, Crabbe JC et al. Mapping quantitative trait loci for behavioral traits in the mouse. In: Blum K, Noble EP, eds. *Handbook of Psychiatric Genetics*. New York, USA: CRC Press, 1997:435-53.
42. Gunness M and Orwoll ES. Early induction of alterations in cancellous and cortical bone histology after orchietomy in mature rats. *J Bone Miner Res* 1995;10:1735-44.
43. Zhang XZ, Kalu DN, Erbas B et al. The effect of gonadectomy on bone size, mass and volumetric density in growing rats may be gender-, site-, and growth hormone-dependent. *J Bone Miner Res* 1999;14:802-9.
44. Aloia JF, Vaswani A, Yeh JK et al. Calcium supplementation with and without hormone replacement therapy to prevent postmenopausal bone loss. *Ann Intern Med* 1994;120:97-103.
45. Bassey EJ, Rothwell MC, Littlewood JJ et al. Pre- and post-menopausal women have different bone mineral density responses to the same high impact exercise. *J Bone Miner Res* 1998;13:1805-13.
46. Welten DC, Kemper HC, Post GB et al. Weight-bearing activity during youth is a more important factor for peak bone mass than calcium intake. *J Bone Miner Res* 1994;9:1089-96.
47. ASBMR. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral and metabolism*, 6th ed. Washington, DC: American Society for Bone and Mineral Research, 2006.
48. Riggs BL and Parfitt AM. Drugs used to treat osteoporosis: the critical need for a uniform nomenclature based on their action on bone remodeling. *J Bone Miner Res* 2005;20:177-84.
49. Tanaka S. Signaling axis in osteoclast biology and therapeutic targeting in the RANKL/RANK/OPG system. *Am J Nephrol* 2007;27:466-78.
50. Suda T, Takahashi N and Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev* 1992;13:66-80.
51. Teitelbaum SL and Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 2003;4:638-49.

52. Vega D, Maalouf NM and Sakhaee K. The role of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B (RANK)/ RANK ligand/ osteoprotegerin: clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:4514–21.
53. Boyce BF and Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther* 2007;9(Suppl.1):S1
54. Janssens K and van Hul W. Molecular genetics of too much bone. *Hum Mol Genet* 2002;11(20):2385–93.
55. Qiu S, Rao DS, Palnitkar S. Differences in osteocyte and lacunar density between Black and White American women. *Bone* 2006;38:130–5.
56. Manolagas SC. Choreography from the tomb: an emerging role of dying osteocytes in the purposeful, and perhaps not so purposeful, targeting of bone remodeling. *Bonekey Osteovision* 2006;3:5–14.
57. Turner CH, Robling AG, Duncan RL et al. Do bone cells behave like a neuronal network? *Calcif Tissue Int* 2002;70:435–42.
58. Burger EH, Klein-Nulend J and Smit TH. Strain-derived canalicular fluid flow regulates osteoclast activity in a remodelling osteon: a proposal. *J Biomech* 2003;36:1453–9.
59. Huiskes R, Ruimerman R, van Lenthe GH et al. Effects of mechanical forces on maintenance and adaptation of form in trabecular bone. *Nature* 2000;405:704–6.
60. Lacey DL, Timms E, Tan HL et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93:165–76.
61. Wong BR, Josien R and Choi Y. TRANCE is a TNF family member that regulates dendritic cell and osteoclast function. *J Leukoc Biol* 1999;65:715–24.
62. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3597–602.
63. Karsenty G and Wagner EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell* 2002;2:389–406.
64. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89:309–19.
65. Tanaka S, Takahashi N, Udagawa N et al. Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *J Clin Invest* 1993;91:257–63.
66. Lagasse E and Weissman IL. Enforced expression of bcl-2 in monocytes rescues macrophages and partially reverses osteopetrosis in op/op mice. *Cell* 1997;89:1021–31.
67. Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T et al. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 1990;16:391–6.
68. Tanaka S, Nakamura I, Inoue J et al. Signal transduction pathways regulating osteoclast differentiation and function. *J Bone Miner Metab* 2003;21:123–33.
69. Reddi AH. Bone morphogenetic proteins: An unconventional approach to isolation of first mammalian morphogens. *Cytokines Growth Factor Rev* 1997;8:11–20.

70. Yoshida Y, Tanaka S, Umemori H et al. Negative regulation of BMP/Smad signaling by Tob in osteoblasts. *Cell* 2000;103:1085–97.
71. Mundy GR, Garrett R, Harris S et al. Stimulation of bones formation in vitro and in rodents by statins. *Science* 1999;286:1946–9.
72. Canalis E. Insulin like growth factors and the local regulation of bone formation. *Bone* 1993;14:273–6.
73. Schmid C, Guler HP, Rowe D et al. Insulin-like growth factor I regulates type I procollagen messenger ribonucleic acid steady state levels in bone of rats. *Endocrinology* 1989;125:1575–80.
74. Day TF, Guo X, Garrett-Beal L et al. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell* 2005;8:739–50.
75. Hill TP, Spater D, Taketo MM et al. Canonical Wnt/betacatenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell* 2005;8:727–38.
76. Westendorf JJ, Kahler RA and Schroeder TM. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene* 2004;341:19–39.
77. Moon RT, Bowerman B, Boutros M et al. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science* 2002;296:1644–6.
78. Nusse R. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res* 2005;15:28–32.
79. Glass DA 2nd and Karsenty G. In vivo analysis of Wnt signaling in bone. *Endocrinology* 2007;148:2630–4.
80. Baron R and Rawadi G. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway to regulate bone formation in the adult skeleton. *Endocrinology* 2007;148:2635–43.
81. Logan CY and Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:781–810.
82. Nusse R and Varmus HE. Wnt genes. *Cell* 1992;69:1073–87.
83. Tuan RS. Cellular signaling in developmental chondrogenesis: N-cadherin, Wnts, and BMP-2. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85(Suppl.2):137–41.
84. Baron R, Rawadi G and Roman-Roman S. Wnt signaling: a key regulator of bone mass. *Curr Top Dev Biol* 2006;76:103–27.
85. Hu H, Hilton MJ, Tu X et al. (2005) Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development* 2005;132:49–60.
86. Rodda SJ and McMahon AP. Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors. *Development* 2006;133:3231–44.
87. Peifer M and Polakis P. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis—a look outside the nucleus. *Science* 2000;287:1606–9.
88. Bienz M, Clevers H: Linking colorectal cancer to Wnt signalling. *Cell* 2000;103:311-20.
89. Shulman JM, Perrimon N and Axelrod JD. Frizzled signaling and the developmental control of cell polarity. *Trends Genet* 1998;14:452–8.

90. Habas R, Dawid IB and He X. Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. *Genes Dev* 2003;17:295–309.
91. Slusarski DC, Yang-Snyder J, Busa WB et al. Modulation of embryonic intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling by Wnt-5A. *Dev Biol* 1997;182:114–20.
92. Kuhl M, Sheldahl LC, Malbon CC et al. Ca<sup>(2+)</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*. *J Biol Chem* 2000;275:12701–11.
93. Wodarz A and Nusse R. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998;14:59–88.
94. Tamai K, Zeng X, Liu C et al. A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Mol Cell* 2004;13:149–56.
95. Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H et al. Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin. *EMBO J* 1998;17:1371–84.
96. Orford K, Crockett C, Jensen JP et al. Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin. *J Biol Chem* 1997;272:24735–8.
97. Behrens J, von Kries JP, Kuhl M et al. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 1996;382:638–42.
98. Molenaar M, van de Wetering M, Oosterwegel M et al. XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 1996;86:391–9.
99. van de Wetering M, Cavallo R, Dooijes D et al. Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF. *Cell* 1997;88:789–99.
100. He TC, Sparks AB, Rago C et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998;281:1509–12.
101. Tetsu O and McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999;398:422–6.
102. Behrens J, Jerchow BA, Wurtele M et al. Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science* 1998;280:596–9.
103. Noordermeer J, Klingensmith J, Perrimon N et al. Dishevelled and armadillo act in the wingless signalling pathway in *Drosophila*. *Nature* 1994;367:80–3.
104. Siegfried E, Chou TB and Perrimon, N. Wingless signaling acts through zeste-white 3, the *Drosophila* homolog of glycogen synthase kinase-3, to regulate engrailed and establish cell fate. *Cell* 1992;71:1167–79.
105. Aberle H, Bauer A, Stappert J et al. Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 1997;16:3797–804.
106. Jiang J and Struhl G. Regulation of the Hedgehog and Wingless signalling pathways by the F-box/WD40-repeat protein Slimb. *Nature* 1998;391:493–6.
107. Glass DA II and Karsenty G. Molecular bases of the regulation of bone remodeling by the canonical Wnt signaling pathway. *Curr Topics Dev Biol* 2006;73:43-84.



108. Glinka A, Wu W, Delius H et al. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 1998;391:357–62.
109. Kawano Y and Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 2003;116:2627–34.
110. Ladher RK, Church VL, Allen S et al. Cloning and expression of the Wnt antagonists Sfrp-2 and Frzb during chick development. *Dev Biol* 2000;218:183–98.
111. Tamai K, Semenov M, Kato Y et al. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 2000;407:530–5.
112. Gong Y, Slee RB, Fukai N et al. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 2001;107:513–23.
113. Little RD, Carulli JP, Del Mastro RG 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;70:11–9.
114. Kato M, Patel MS, Levasseur R et al. Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol* 2002;157:303–14.
115. Balemans W and van Hul W. Minireview: the genetics of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 in bone: a story of extremes. *Endocrinology* 2007;148(6):2622–9.
116. Hey PJ, Twells RCJ, Phillips MS et al. Cloning of a novel member of the low-density lipoprotein receptor family. *Gene* 1998;216:103–11.
117. Mi K and Johnson GV. Role of the intracellular domains of LRP5 and LRP6 in activating the Wnt canonical pathway. *J Cell Biochem* 2005;95:328–38.
118. Pinson KI, Brennan J, Monkley S et al. An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* 2000;407:535–8.
119. Li Y, Lu W, He X et al. LRP6 expression promotes cancer cell proliferation and tumorigenesis by altering beta-catenin subcellular distribution. *Oncogene* 2004;23:9129–35.
120. Cheng SL, Lecanda F, Davidson MK et al. Human osteoblasts express a repertoire of cadherins, which are critical for BMP-2-induced osteogenic differentiation. *J Bone Miner Res* 1998;13:633–44.
121. Monaghan H, Bubb VJ, Sirimujalin R et al. Adenomatous polyposis coli (APC), beta-catenin, and cadherin are expressed in human bone and cartilage. *Histopathology* 2001;39:611–9.
122. Haegel H, Larue L, Ohsugi M et al. Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation. *Development* 1995;121:3529–37.
123. Cattelino A, Liebner S, Gallini R et al. The conditional inactivation of the beta-catenin gene in endothelial cells causes a defective vascular pattern and increased vascular fragility. *J Cell Biol* 2003;162:1111–22.
124. Brault V, Moore R, Kutsch S et al. Inactivation of the beta-catenin gene by Wnt1-Cre-mediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial development. *Development* 2001;128:1253–64.
125. Holmen SL, Zylstra CR, Mukherjee A et al. Essential role of beta-catenin in postnatal bone acquisition. *J Biol Chem* 2005;280:21162–8.

126. Giese K and Grosschedl R. LEF-1 contains an activation domain that stimulates transcription only in a specific context of factor-binding sites. *EMBO J* 1993;12:4667–76.
127. Giese K, Amsterdam A and Grosschedl R. DNA-binding properties of the HMG domain of the lymphoid-specific transcriptional regulator LEF-1. *Genes Dev* 1991;5:2567–78.
128. Love JJ, Li X, Case DA et al. Structural basis for DNA bending by the architectural transcription factor LEF-1. *Nature* 1995;376:791–5.
129. Oosterwegel M, van de Wetering M, Timmerman J et al. Differential expression of the HMG box factors TCF-1 and LEF-1 during murine embryogenesis. *Development* 1993;118:439–48.
130. Billin AN, Thirlwell H and Ayer DE. Beta-catenin-histone deacetylase interactions regulate the transition of LEF1 from a transcriptional repressor to an activator. *Mol Cell Biol* 2000;20:6882–90.
131. Brannon M, Brown JD, Bates R et al. XCtBP is a XTcf-3 corepressor with roles throughout *Xenopus* development. *Development* 1999;126:3159–70.
132. Brantjes H, Roose J, van De Wetering M et al. All Tcf HMG box transcription factors interact with Groucho-related co-repressors. *Nucleic Acids Res* 2001;29:1410–9.
133. Kramps T, Peter O, Brunner E et al. Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear beta-catenin-TCF complex. *Cell* 2002;109:47–60.
134. Sun Y, Kolligs FT, Hottiger MO et al. Regulation of beta-catenin transformation by the p300 transcriptional coactivator. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:12613–8.
135. Miyagishi M, Fujii R, Hatta M et al. Regulation of Lef-mediated transcription and p53-dependent pathway by associating beta-catenin with CBP/p300. *J Biol Chem* 2000;275:35170–5.
136. Hecht A, Vleminckx K, Stemmler MP et al. The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of beta-catenin in vertebrates. *EMBO J* 2000;19:1839–50.
137. Hsu SC, Galceran J and Grosschedl R. Modulation of transcriptional regulation by LEF-1 in response to Wnt-1 signaling and association with beta-catenin. *Mol Cell Biol* 1998;18:4807–18.
138. Huber O, Korn R, McLaughlin J et al. Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev* 1996;59:3–10.
139. Tutter AV, Fryer CJ and Jones KA. Chromatin-specific regulation of LEF-1- beta-catenin transcription activation and inhibition in vitro. *Genes Dev* 2001;15:3342–54.
140. Kahler RA and Westendorf JJ. Lymphoid enhancer factor-1 and beta-catenin inhibit Runx2-dependent transcriptional activation of the osteocalcin promoter. *J Biol Chem* 2003;278:11937–44.
141. Baker JC, Beddington RS and Harland RM. Wnt signaling in *Xenopus* embryos inhibits bmp4 expression and activates neural development. *Genes Dev* 1999;13:3149–59.
142. Cadigan KM, Fish MP, Rulifson EJ et al. Wingless repression of *Drosophila* frizzled 2 expression shapes the Wingless morphogen gradient in the wing. *Cell* 1998;93:767–77.

143. Cadigan KM, Jou AD and Nusse R. Wingless blocks bristle formation and morphogenetic furrow progression in the eye through repression of Daughterless. *Development* 2002;129:3393–402.
144. Jamora C, DasGupta R, Kocieniewski P et al. Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development. *Nature* 2003;422:317–22.
145. Payre F, Vincent A and Carreno S. Ovo/svb integrates Wingless and DER pathways to control epidermis differentiation. *Nature* 1999;400:271–5.
146. Piepenburg O, Vorbruggen G and Jackle H. Drosophila segment borders result from unilateral repression of hedgehog activity by wingless signaling. *Mol Cell* 2000;6:203–9.
147. Yang X, van Beest M, Clevers H et al. Decapentaplegic is a direct target of dTcf repression in the Drosophila visceral mesoderm. *Development* 2000;127:3695–702.
148. Qi H, Aguiar DJ, Williams SM et al. Identification of genes responsible for osteoblast differentiation from human mesodermal progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:3305–10.
149. de Jong DS, van Zoelen EJ, Bauerschmidt S et al. Microarray analysis of bone morphogenetic protein, transforming growth factor beta, and activin early response genes during osteoblastic cell differentiation. *J Bone Miner Res* 2002;17:2119–29.
150. Hadjiargyrou M, Lombardo F, Zhao S et al. Transcriptional profiling of bone regeneration: Insight into the molecular complexity of wound repair. *J Biol Chem* 2002;277:30177–82.
151. Travis A, Amsterdam A, Belanger C et al. LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor alpha enhancer function. *Genes Dev* 1991;5:880–94.
152. Oosterwegel M, van de Wetering M and Clevers H. HMG box proteins in early T-cell differentiation. *Thymus* 1993;22:67–81.
153. Kratochwil K, Dull M, Farinas I et al. Lef1 expression is activated by BMP-4 and regulates inductive tissue interactions in tooth and hair development. *Genes Dev* 1996;10:1382–94.
154. Zhou P, Byrne C, Jacobs J et al. Lymphoid enhancer factor 1 directs hair follicle patterning and epithelial cell fate. *Genes Dev* 1995;9:700–13.
155. Mariadason JM, Bordonaro M, Aslam F et al. Down-regulation of beta-catenin TCF signaling is linked to colonic epithelial cell differentiation. *Cancer Res* 2001;61:3465–71.
156. Shibamoto S, Winer J, Williams M et al. A blockade in Wnt signaling is activated following the differentiation of F9 teratocarcinoma cells. *Exp Cell Res* 2004;292:11–20.
157. Van de Wetering M, Castrop J, Korinek V et al. Extensive alternative splicing and dual promoter usage generate Tcf-1 protein isoforms with differential transcription control properties. *Mol Cell Biol* 1996;16:745–52.
158. Hovanes K, Li TW and Waterman ML. The human LEF-1 gene contains a promoter preferentially active in lymphocytes and encodes multiple isoforms derived from alternative splicing. *Nucleic Acids Res* 2000;28:1994–2003.
159. Hovanes K, Li TW, Munguia JE et al. Beta-catenin-sensitive isoforms of lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer. *Nat Genet* 2001;28:53–7.

160. Komori T, Yagi H, Nomura S et al. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 1997;89:755–64.
161. Otto F, Thornell AP, Crompton T et al. *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 1997;89:765–71.
162. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V et al. *Osf2/Cbfa1*: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997;89:747–54.
163. Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H et al. Canonical Wnt signaling promotes osteogenesis by directly stimulating *RUNX2* gene expression. *J Biol Chem* 2005;280:33132–40.
164. Kalajzic I, Staal A, Yang WP et al. Expression profile of osteoblast lineage at defined stages of differentiation. *J Biol Chem* 2005;280:24618–26.
165. Rawadi G, Vayssiere B, Dunn F et al. BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J Bone Miner Res* 2003;18:1842–53.
166. Derfoul A, Carlberg AL, Tuan RS et al. Differential regulation of osteogenic marker gene expression by Wnt-3a in embryonic mesenchymal multipotential progenitor cells. *Differentiation* 2004;72:209–23.
167. Bradbury JM, Niemeyer CC, Dale TC et al. Alterations of the growth characteristics of the fibroblast cell line C3H 10T1/2 by members of the Wnt gene family. *Oncogene* 1994;9:2597–603.
168. Li X, Zhang Y, Kang H et al. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem* 2005;280:19883–7.
169. Bennett CN, Longo KA, Wright WS et al. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:3324–9.
170. Jackson A, Vayssiere B, Garcia T et al. Gene array analysis of Wnt-regulated genes in C3H10T1/2 cells. *Bone* 2005;36:585–98.
171. Miller JR. The Wnts. *Genome Biol* 2001;3:1–15.
172. Behrens J and Lustig B. The Wnt connection to tumorigenesis. *Int J Dev Biol* 2004;48:477–87.
173. Willert K, Brown JD, Danenberg E et al. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 2003;423:448–52.
174. Zhang Y, Wang Y, Li X et al. The LRP5 high-bone-mass G171V mutation disrupts LRP5 interaction with *Mesd*. *Mol Cell Biol* 2004;24:4677–84.
175. Veeman MT, Axelrod JD and Moon RT. A second canon: Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell* 2003;5:367–77.
176. Bhanot P, Brink M, Samos CH et al. A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* 1996;382:225–30.
177. Umbhauer M, Djiane A, Goisset C et al. The C-terminal cytoplasmic Lys-thr-X-X-X-Trp motif in frizzled receptors mediates Wnt/beta-catenin signalling. *EMBO J* 2000 ;19:4944–54.
178. Roman-Roman S, Shi DL, Stiot V et al. Murine Frizzled-1 behaves as an antagonist of the canonical Wnt/betacatenin signaling. *J Biol Chem* 2004;279:5725–33.

179. Golan T, Yaniv A, Bafico A et al. The human Frizzled 6 (HFz6) acts as a negative regulator of the canonical Wnt. Beta-catenin signaling cascade. *J Biol Chem* 2004;279:14879–88.
180. Kulkarni NH, Halladay DL, Miles RR et al. Effects of parathyroid hormone on Wnt signaling pathway in bone. *J Cell Biochem* 2005;95:1178–90.
181. Ali A, Hoeflich KP and Woodgett JR. Glycogen synthase kinase-3: Properties, functions, and regulation. *Chem Rev* 2001;101:2527–40.
182. Frame S, Cohen P and Biondi RM. A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation. *Mol Cell* 2001;7:1321–7.
183. Bain G, Muller T, Wang X et al. Activated beta-catenin induces osteoblast differentiation of C3H10T1/2 cells and participates in BMP2 mediated signal transduction. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;301:84–91.
184. Smith E and Frenkel B. Glucocorticoids inhibit the transcriptional activity of LEF/TCF in differentiating osteoblasts in a glycogen synthase kinase-3beta-dependent and -independent manner. *J Biol Chem* 2005;280:2388–94.
185. Liu C, Li Y, Semenov M et al. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 2002;108:837–47.
186. Farr GH 3rd, Ferkey DM, Yost C et al. Interaction among GSK-3, GBP, axin, and APC in *Xenopus* axis specification. *J Cell Biol* 2000;148:691–702.
187. Itasaki N, Jones CM, Mercurio S et al. Wise, a context-dependent activator and inhibitor of Wnt signalling. *Development* 2003;130:4295–305.
188. Bodine PV, Billiard J, Moran RA et al. The Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 controls osteoblast and osteocyte apoptosis. *J Cell Biochem* 2005;96:1212–30.
189. Hausler KD, Horwood NJ, Chuman Y et al. Secreted frizzled-related protein-1 inhibits RANKL-dependent osteoclast formation. *J Bone Miner Res* 2004;19:1873–81.
190. Oshima T, Abe M, Asano J et al. Myeloma cells suppress bone formation by secreting a soluble Wnt inhibitor, sFRP-2. *Blood* 2005;106:3160–5.
191. Chung YS, Baylink DJ, Srivastava AK et al. Effects of secreted frizzled-related protein 3 on osteoblasts in vitro. *J Bone Miner Res* 2004;19:1395–402.
192. Berndt T, Craig TA, Bowe AE et al. Secreted frizzled-related protein 4 is a potent tumor-derived phosphaturic agent. *J Clin Invest* 2003;112:785–94.
193. Hsieh JC, Kodjabachian L, Rebbert ML et al. A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature* 1999;398:431–6.
194. Vaes BL, Dechering KJ, van Someren EP et al. Microarray analysis reveals expression regulation of Wnt antagonists in differentiating osteoblasts. *Bone* 2005;36:803–11.
195. Bafico A, Liu G, Yaniv A, et al. Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat Cell Biol* 2001;7:683–6.
196. Boyden LM, Mao J, Belsky J et al. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med* 2002;346:1513–21.

197. Tian E, Zhan F, Walker R et al. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J Med* 2003;349:2483–94.
198. Hartmann C and Tabin CJ. Dual roles of Wnt signaling during chondrogenesis in the chicken limb. *Development* 2000;127:3141–59.
199. Gregory CA, Singh H, Perry AS et al. The Wnt signaling inhibitor dickkopf-1 is required for reentry into the cell cycle of human adult stem cells from bone marrow. *J Biol Chem* 2003;278:28067–78.
200. Mao B, Wu W, Davidson G et al. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* 2002;417:664–7.
201. Mao B and Niehrs C. Kremen 2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/LRP6 signaling. *Gene* 2003;302:179–83.
202. Krupnik VE, Sharp JD, Jiang C et al. Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family. *Gene* 1999;238:301–13.
203. Ohnaka K, Tanabe M, Kawate H et al. Glucocorticoid suppresses the canonical Wnt signal in cultured human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;329:177–81.
204. Li X, Liu P, Liu W et al. Dkk2 has a role in terminal osteoblast differentiation and mineralized matrix formation. *Nat Genet* 2005;37:945–52.
205. Semenov M, Tamai K and He X. SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *J Biol Chem* 2005;280:26770–5.
206. Winkler DG, Sutherland MS, Ojala E et al. Sclerostin inhibition of Wnt-3a-induced C3H10T1/2 cell differentiation is indirect and mediated by bone morphogenetic proteins. *J Biol Chem* 2005;280:2498–502.
207. Hamersma H, Gardner J and Beighton P. The natural history of sclerosteosis. *Clin Genet* 2003;63:192–7.
208. Yu HM, Jerchow B, Sheu TJ et al. The role of Axin2 in calvarial morphogenesis and craniosynostosis. *Development* 2005;132:1995–2005.
209. Afzal AR, Rajab A, Fenske CD et al. Recessive Robinow syndrome, allelic to dominant brachydactyly type B, is caused by mutation of ROR2. *Nat Genet* 2000;25:419–22.
210. Billiard J, Way DS, Seestaller-Wehr LM et al. The orphan receptor tyrosine kinase Ror2 modulates canonical Wnt signaling in osteoblastic cells. *Mol Endocrinol* 2005;19:90–101.
211. Oishi I, Suzuki H, Onishi N et al. The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. *Genes Cells* 2003;8:645–54.
212. DeChiara TM, Kimble RB, Poueymirou WT et al. Ror2, encoding a receptor-like tyrosine kinase, is required for cartilage and growth plate development. *Nat Genet* 2000;24:271–4.
213. Matsuzaki K, Udagawa N, Takahashi N et al. Osteoclast differentiation factor (ODF) induces osteoclast-like cell formation in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;246:199–204.
214. Burgess TL, Qian Y, Kaufman S et al. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol* 1999;145:527–38.

215. Blair JM, Zheng Y and Dunstan CR. RANK ligand. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:1077–81.
216. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:3540–5.
217. Bolon B, Carter C, Daris M et al. Adenoviral delivery of osteoprotegerin ameliorates bone resorption in a mouse ovariectomy model of osteoporosis. *Mol Ther* 2001;3:197–205.
218. Fuller K, Wong B, Fox S et al. TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med* 1998;188:997–1001.
219. Hofbauer LC and Schoppet M. Clinical implications of the osteoprotegerin/ RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA* 2004;292:490-5.
220. Kearns AE, Khosla S and Kostenuik PJ. Receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev* 2008;29(2):155–92.
221. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997;390:175-9.
222. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N et al. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med* 2006;12:17-25.
223. Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* 2007;7:292–304.
224. Fata JE, Kong YY, Li J et al. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell* 2000, 103:41-50.
225. Kollet O, Dar A, Shivtiel S et al. Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Nat Med* 2006;12:657-64.
226. Kim NS, Kim HJ, Koo BK et al. Receptor activator of NF-kappaB ligand regulates the proliferation of mammary epithelial cells via Id2. *Mol Cell Biol* 2006;26:1002-13.
227. Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH et al. Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature* 2006;440:692–6.
228. Chen G, Sircar K, Aprikian A et al. Expression of RANKL/RANK/OPG in primary and metastatic human prostate cancer as markers of disease stage and functional regulation. *Cancer* 2006;107:289-98.
229. Kapur RP, Yao Z, Iida MH et al. Malignant autosomal recessive osteopetrosis caused by spontaneous mutation of murine Rank. *J Bone Miner Res* 2004;19:1689-97.
230. Hughes AE, Ralston SH, Marken J et al. Mutations in TNFRSF11A, affecting the signal peptide of RANK, cause familial expansile osteolysis. *Nat Genet* 2000;24:45-8.
231. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N et al. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 1998;139:1329-37.
232. Yamaguchi K, Kinoshita M, Goto M et al. Characterization of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor. *J Biol Chem* 1998;273:5117–23.

- 233.Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK et al. The molecular triad OPG/ RANK/ RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15:457–75.
- 234.Kieslinger M, Folberth S, Dobreva G et al. EBF2 regulates osteoblast-dependent differentiation of osteoclasts. *Dev Cell* 2005;9(6):757-67.
- 235.Boyce BF, Xing L et al. Osteoprotegerin, the bone protector, is a surprising target for beta-catenin signaling. *Cell Metab* 2005;2:344-5.
- 236.Morony S, Tintut Y, Zhang Z et al. Osteoprotegerin inhibits vascular calcification without affecting atherosclerosis in *ldlr(-/-)* mice. *Circulation* 2008;117:411–20.
- 237.Bennett BJ, Scatena M, Kirk EA et al. Osteoprotegerin inactivation accelerates advanced atherosclerotic lesion progression and calcification in older *ApoE-/-* mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:2117-24.
- 238.Collin-Osdoby P. Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin. *Circ Res* 2004;95:1046-57.
- 239.Ueland T, Yndestad A, Oie E et al. Dysregulated osteoprotegerin/RANK ligand/RANK axis in clinical and experimental heart failure. *Circulation* 2005;111:2461–8.
- 240.Sammartino A, Cirillo D, Mandato VD et al. Osteoporosis and cardiovascular disease: benefit-risk of hormone replacement therapy. *J Endocrinol Invest* 2005;28:80–4.
- 241.Rogers A and Eastell R. Circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor kappaB ligand: clinical utility in metabolic bone disease assessment. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:6323-31.
- 242.Wong BR, Rho J, Arron J et al. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J Biol Chem* 1997;272:25190–4.
- 243.Lomaga MA, Yeh WC, Sarosi I et al. TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev* 1999;13:1015-24.
- 244.Boyle WJ, Simonet WS and Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation *Nature* 2003;423:337–42.
- 245.Takayanagi H, Kim S, Koga T et al. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell* 2002;3:889-901.
- 246.Fretz JA, Shevde NK, Singh S et al. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand-induced nuclear factor of activated T cells (C1) autoregulates its own expression in osteoclasts and mediates the up-regulation of tartrate-resistant acid phosphatase. *Mol Endocrinol* 2008;22(3):737-50.
- 247.Asagiri M and Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone* 2007;40:251–64.
- 248.Pacifici R. Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1996;11:1043–51.



249. Jilka RL. Cytokines, bone remodeling, and estrogen deficiency: a 1998 update. *Bone* 1998;23:75–81.
250. Manolagas SC and Jilka RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med* 1995;332:305–11.
251. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR et al. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 1999;140:4367–70.
252. Shevde NK, Bendixen AC, Dienger KM et al. Estrogens suppress rank ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-jun repression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:7829–34.
253. Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal A et al. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J Clin Invest* 2003;111:1221–30.
254. Xu J, Tan JW, Huang L et al. Cloning, sequencing, and functional characterization of the rat homologue of receptor activator of  $\text{nf}\kappa\text{-b}$  ligand. *J Bone Miner Res* 2000;15:2178–86.
255. Ikeda T, Utsuyama M and Hirokawa K. Expression profiles of receptor activator of nuclear factor  $\kappa\text{-b}$  ligand, receptor activator of nuclear factor  $\kappa\text{-b}$ , and osteoprotegerin messenger RNA in aged and ovariectomized rat bones. *J Bone Miner Res* 2001;16:1416–25.
256. Liu JM, Zhao HY, Ning G et al. Relationships between the changes of serum levels of OPG and RANKL with age, menopause, bone biochemical markers and bone mineral density in Chinese women aged 20–75. *Calcif Tissue Int* 2005;76:1–6.
257. Han KO, Choi JT, Choi HA et al. The changes in circulating osteoprotegerin after hormone therapy in postmenopausal women and their relationship with oestrogen responsiveness on bone. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005;62:349–53.
258. Rogers A, Saleh G, Hannon RA et al. Circulating estradiol and osteoprotegerin as determinants of bone turnover and bone density in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4470–5.
259. Mezquita-Raya P, de la Higuera M, García DF et al. The contribution of serum osteoprotegerin to bone mass and vertebral fractures in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2005;16:1368–74.
260. Browner WS, Lui LY, Cummings SR. Associations of serum osteoprotegerin levels with diabetes, stroke, bone density, fractures, and mortality in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:631–7.
261. Yano K, Tsuda E, Washida N et al. Immunological characterization of circulating osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor: increased serum concentrations in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1999;14:518–27.
262. Khosla S, Arrighi HM, Melton III LJ et al. Correlates of osteoprotegerin levels in women and men. *Osteoporos Int* 2002;13:394–9.
263. Kudlacek S, Schneider B, Woloszczuk W et al. Serum levels of osteoprotegerin increase with age in a healthy adult population. *Bone* 2004;32:681–6.
264. Junk K, Lein M and Hosslin K. Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor- $\kappa\text{B}$  ligand (RANKL) in the serum of healthy adults. *Int J Biol Markers* 2002;17:177–81.

265. Dai Y and Shen L. Relationships between serum osteoprotegerin, matrix metalloproteinase-2 levels and bone metabolism in postmenopausal women *Chin Med J* 2007;120(22):2017-21.
266. Grigorie D, Neacsu E, Marinescu M et al. Circulating osteoprotegerin and leptin levels in postmenopausal women with and without osteoporosis. *Rom J Intern Med* 2003;41:409-15.
267. Riggs BL, Khosla S, Atkinson EJ et al. Evidence that type I osteoporosis results from enhanced responsiveness of bone to estrogen deficiency. *Osteoporos Int* 2003; 14:728-33.
268. Yano K, Shibata O, Mizuno A et al. Immunological study on circulating murine osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor (OPG/OCIF): possible role of OPG/OCIF in the prevention of osteoporosis in pregnancy. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:217-24.
269. Seck T, Diel I, Bismar H et al. Serum parathyroid hormone, but not menopausal status, is associated with the expression of osteoprotegerin and RANKL mRNA in human bone samples. *Eur J Endocrinol* 2001;145:199-205.
270. Schett G, Kiechl S, Redlich K et al. Soluble RANKL and risk of nontraumatic fracture. *JAMA* 2004;291:1108-13.
271. Jorgensen HL, Kusk P, Madsen B et al. Serum osteoprotegerin (OPG) and the A163G polymorphism in the OPG promoter region are related to peripheral measures of bone mass and fracture odds ratios. *J Bone Miner Metab* 2004;22:132-8.
272. Hannon R and Eastell R. Preanalytical variability of biochemical markers of bone turnover. *Osteoporos Int* 2000;11(Suppl.6):S30-S44.
273. Hawa G, Brinskelle-Schmal N, Glatz K et al. Immunoassay for soluble RANKL (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand) in serum. *Clin Lab* 2003;49:461-3.
274. Furuya D, Kaneko R, Yagihashi A et al. Immuno-PCR assay for homodimeric osteoprotegerin. *Clin Chem* 2001;47:1475-7.
275. Kazama JJ, Shigematsu T, Yano K et al. Increased circulating levels of osteoclastogenesis inhibitory factor (osteoprotegerin) in patients with chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* 2002;39:525-32.
276. Uemura H, Yasui T, Kiyokawa M et al. Serum osteoprotegerin/ osteoclastogenesis-inhibitory factor during pregnancy and lactation and the relationship with calcium-regulating hormones and bone turnover markers. *J Endocrinol* 2002;174:353-9.
277. Naylor KE, Rogers A, Fraser RB et al. Serum osteoprotegerin as a determinant of bone metabolism in a longitudinal study of human pregnancy and lactation. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5361-5.
278. McKusick VA. Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11B; TNFRSF11B. In: *Online Mendelian inheritance in man*. Baltimore: Johns Hopkins University, 2007.
279. Whyte MP, Obrecht SE, Finnegan PM et al. Osteoprotegerin deficiency and juvenile Paget's disease. *N Engl J Med* 2002;347:175-84.
280. Whyte MP, Reinus WR, Podgornik MN et al. Familial expansile osteolysis (excessive RANK effect) in a 5-generation American kindred. *Medicine (Baltimore)* 2002;81:101-21.

281. Whyte MP, Mills BG, Reinus WR et al. Expansile skeletal hyperphosphatasia: a new familial metabolic bone disease. *J Bone Miner Res* 2000;15:2330–44.
282. Nakatsuka K, Nishizawa Y and Ralston SH. Phenotypic characterization of early onset Paget's disease of bone caused by a 27-bp duplication in the TNFRSF11A gene. *J Bone Miner Res* 2003;18:1381–5.
283. Garnero P. Biomarkers for osteoporosis management: utility in diagnosis, fracture risk prediction and therapy monitoring. *Mol Diagn Ther* 2008;12(3):157-70.
284. Vasikaran S, Glendenning P and Morris H. The role of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis management in clinical practice. *Clin Biochem Rev* 2006;27:119-21.
285. Pagani F, Francucci CM and Moro L. Markers of bone turnover: biochemical and clinical perspectives. *J Endocrinol Invest* 2005;28(Suppl.10):8-13.
286. Yilmaz N, Bayram M, Erbåğci AB et al. Diagnostic value of biochemical markers of bone turnover and postmenopausal osteoporosis. *Clin Chem Lab Med* 1999;37(2):137-43.
287. Looker AC, Bauer DC, Chesnut CH III et al. Clinical use of biochemical markers of bone remodelling: current status and future directions. *Osteoporosis Int* 2000;11:467–80.
288. Garnero P, Vergnaud P and Hoyle N. Evaluation of a fully automated serum assay for total N-terminal propeptide of type I collagen in postmenopausal osteoporosis. *Clin Chem* 2008;54:188-96.
289. Leeming DJ, Alexandersen P, Karsdal MA et al. An update on biomarkers of bone turnover and their utility in biomedical research and clinical practice. *Eur J Clin Pharmacol* 2006;62:781-92.
290. Seibel M. Biochemical markers of bone turnover part I: Biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev* 2005;26:97-122.
291. NIH White Paper: Biomarkers, the Osteoarthritis Initiative. Bethesda: National Institutes of Health; 2000.
292. Hassager C, Risteli J, Risteli L et al. Effect of the menopause and hormone replacement therapy on the carboxy-terminal pyridinoline cross-linked telopeptide of type I collagen. *Osteoporosis Int* 1994;4:349–52.
293. Hannon RA and Eastell R. Biochemical markers of bone turnover and fracture prediction. *J Br Menopause Soc* 2003;9:10-5.
294. Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch* 2010;77:4-12.
295. Millán JL. In mammalian alkaline phosphatases: from biology to applications in medicine and biotechnology. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2006.
296. Miao D and Scutt A. Histochemical localization of alkaline phosphatase activity in decalcified bone and cartilage. *J Histochem Cytochem* 2002;50:333-40.
297. Ross PD, Kress BC, Parson RE et al. Serum bone alkaline phosphatase and calcaneus bone density predict fractures: A prospective study. *Osteoporosis Int* 2000;11:76-82.

298. Garnero P, Sornay-Rendu E, Claustrat B et al. Biochemical markers of bone turnover, endogenous hormones and the risk of fractures in postmenopausal women: The OFELY Study. *J Bone Miner Res* 2000;15:1526-36.
299. Lian JB and Gundberg CM. Osteocalcin. Biochemical considerations and clinical applications. *Clin Orthop Relat Res* 1988;(226):267-91.
300. Reginster JY, Sarkar S, Zegels B et al. Reduction in PINP, a marker of bone metabolism, with raloxifene treatment and its relationship with vertebral fracture risk. *Bone* 2004;34:344-51.
301. Garnero P, Sornay-Rendu E, Duboeuf F et al. Markers of bone turnover predict postmenopausal forearm bone loss over 4 years: the OFELY study. *J Bone Miner Res* 1999;14:1614-21.
302. Dobnig H, Sipos A, Jiang Y et al. Early changes in biochemical markers of bone formation correlate with improvements in bone structure during teriparatide therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:3970-7.
303. Melkko J, Kauppila S, Niemi S et al. Immunoassay for intact amino-terminal propeptide of human type I procollagen. *Clin Chem* 1996;42:947-54.
304. Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover for the clinical assessment of metabolic bone disease. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1990;19(1):1-18.
305. Uebelhart D, Gineyts E, Chapuy MC et al. Urinary excretion of pyridinium crosslinks: a new marker of bone resorption in metabolic bone disease. *Bone Miner* 1990;8(1):87-96.
306. Hannon RA, Clowes JA, Eagleton AC et al. Clinical performance of immunoreactive tartrate resistant acid phosphatase isoform 5b as a marker of bone resorption. *Bone* 2004;34:187-94.
307. Ebeling PR, Atley LM, Guthrie JR et al. Bone turnover markers and bone density across the menopausal transition. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:3366-71.
308. Estrada RO and Wyatt CJ. Relationship of deoxypyridinole excretion with bone density, serum estradiol and years of postmenopause in Mexican postmenopausal women. *Arch Latinoam Nutr* 2004;54(4):408-12.
309. Eastell R, Robins SP, Colwell T et al. Evaluation of bone turnover in type I osteoporosis using biochemical markers specific for both bone formation and bone resorption. *Osteoporos Int* 1993;3:255-60.
310. Gorai I, Taguchi Y, Chaki O et al. Specific changes of urinary excretion of cross-linked N-telopeptides of type I collagen in pre- and postmenopausal women: correlation with other markers of bone turnover. *Calcif Tissue Int* 1997;60:317-22.
311. Schneider DL and Barrett-Connor EL. Urinary N-telopeptide levels discriminate normal, osteopenic, and osteoporotic bone mineral density. *Arch Intern Med* 1997;157:1241-5.
312. Moro L, Modricky C, Rovis L et al. Determination of galactosyl hydroxylysine in urine as a means for the identification of osteoporotic women. *Bone Miner* 1988;3(3):271-6.
313. Karasik D and Ferrari S. Contribution of gender-specific genetic factors to osteoporosis risk. *Ann Hum Genet* 2008;72:1469-809.
314. Bonjour JP, Chevalley T, Rizzoli R et al. Gene-environment interactions in the skeletal response to nutrition and exercise during growth. *Med Sport Sci* 2007;51:64-80.

315. Ferrari S. Genetics, nutrition and bone health. In Holick M & Dawson-Hughes E, eds. Nutrition and bone health. Totowa, NJ: The Humana press Inc., 2004:19–41.
316. Slemenda CW, Christian JC, Williams CJ et al. Genetic determinants of bone mass in adult women: a reevaluation of the twin model and the potential importance of gene interaction on heritability estimates. *J Bone Miner Res* 1991;6(6):561–7.
317. Ferrari S, Rizzoli R, Slosman D et al. Familial resemblance for bone mineral mass is expressed before puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(2):358–61.
318. Van Pottelbergh I, Goemaere S, Zmierzczak H et al. Deficient acquisition of bone during maturation underlies idiopathic osteoporosis in men: evidence from a three-generation family study. *J Bone Miner Res* 2003;18(2):303–11.
319. Seeman E, Hopper JL, Bach LA et al. Reduced bone mass in daughters of women with osteoporosis. *N Engl J Med* 1989;320(9):554–8.
320. Naganathan V, MacGregor A, Snieder H et al. Gender differences in the genetic factors responsible for variation in bone density and ultrasound. *J Bone Miner Res* 2002;17(4):725–33.
321. Brown LB, Streeten EA, Shuldiner AR et al. Assessment of sex-specific genetic and environmental effects on bone mineral density. *Genet Epidemiol* 2004;27(2):153–61.
322. Kammerer C, Schneider J, Cole S 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):2245–52.
323. Ralston SH, Galwey N, MacKay I 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):943–51.
324. Karasik D, Cupples LA, Hannan MT et al. Age, gender, and body mass effects on quantitative trait loci for bone mineral density: the Framingham study. *Bone* 2003;33(3): 308–16.
325. Michaelsson K, Melhus H, Ferm H et al. Genetic liability to fractures in the elderly. *Arch Intern Med* 2005;165(16):1825–30.
326. Deng HW, Chen WM, Recker S et al. Genetic determination of Colles' fracture and differential bone mass in women with and without Colles' fracture. *J Bone Miner Res* 2000;15(7):1243–52.
327. Kannus P, Palvanen M, Kaprio J et al. Genetic factors and osteoporotic fractures in elderly people: prospective 25 year follow up of a nationwide cohort of elderly finnish twins. *BMJ* 1999;319(7221): 1334–7.
328. Arden NK, Baker J, Hogg C et al. The heritability of bone mineral density, ultrasound of the calcaneus and hip axis length: a study of postmenopausal twins. *J Bone Miner Res* 1996;11:530–4.
329. Garnero P, Arden NK, Griffiths G et al. Genetic influence on bone turnover in postmenopausal twins. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:140–6.

330. Kanis JA, Oden A, Johnell O et al. The use of clinical risk factors enhances the performance of BMD in the prediction of hip and osteoporotic fractures in men and women. *Osteoporos Int* 2007;18(8):1033–46.
331. Torgerson DJ, Campbell MK, Thomas RE et al. Prediction of perimenopausal fractures by bone mineral density and other risk factors. *J Bone Miner Res* 1996;11:293–7.
332. Cummings SR, Nevitt MC, Browner WS et al. Risk factors for hip fracture in white women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *N Engl J Med* 1995;332:767–73.
333. NIH Consensus Development Panel on osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy, March 7–29, 2000: highlights of the conference. *The Southern Medical Journal* 2001;94(6):569–73.
334. Andrew T, Antoniadou L, Scurrah KJ 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):67–74.
335. van Meurs JB, Schuit SC, Weel AE et al. Association of 5' estrogen receptor alpha gene polymorphisms with bone mineral density, vertebral bone area and fracture risk. *Hum Mol Genet* 2003;12(14): 1745–54.
336. Deng HW, Mahaney MC, Williams JT et al. Relevance of the genes for bone mass variation to susceptibility to osteoporotic fractures and its implications to gene search for complex human diseases. *Genet Epidemiol* 2002;22(1):12–25.
337. Ferrari S. Human genetics of osteoporosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008;22(5):723–35.
338. Peacock M, Koller DL, Lai D et al. Sex-specific quantitative trait loci contribute to normal variation in bone structure at the proximal femur in men. *Bone* 2005;37(4):467–73.
339. Peacock M, Koller DL, Hui S et al. Peak bone mineral density at the hip is linked to chromosomes 14q and 15q. *Osteoporos Int* 2004;15(6):489–96.
340. Ioannidis JP, Ng MY, Sham PC et al. Meta-analysis of genome-wide scans provides evidence for sex and site-specific regulation of bone mass. *J Bone Miner Res* 2007;22(2):173–83.
341. Ralston SH and de Crombrughe B. Genetic regulation of bone mass and susceptibility to osteoporosis. *Genes Dev* 2006;20(18):2492–506.
342. Koay MA, Woon PY, Zhang Y et al. Influence of LRP5 polymorphisms on normal variation in BMD. *J Bone Miner Res* 2004;19(10):1619–27.
343. Gong Y, Vikkula M, Boon L et al. Osteoporosis-pseudoglioma syndrome, a disorder affecting skeletal strength and vision, is assigned to chromosome region 11q12–13. *Am J Hum Genet* 1996;59:146–51.
344. Jeon H, Meng W, Takagi J et al. Implications for familial hypercholesterolemia from the structure of the LDL receptor YWTD-EGF domain pair. *Nat Struct Biol* 2001;8:499–504.
345. Holmen SL, Giambardi TA, Zylstra CR et al. Decreased BMD and limb deformities in mice carrying mutations in both *Lrp5* and *Lrp6*. *J Bone Miner Res* 2004;19:2033–40.

346. Fujino T, Asaba H, Kang MJ et al. Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) is essential for normal cholesterol metabolism and glucose-induced insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:229–34.
347. Van Wesenbeeck L, Cleiren E, Gram J et al. Six novel missense mutations in the LDL receptor-related protein 5 (LRP5) gene in different conditions with an increased bone density. *Am J Hum Genet* 2003;72:763–71.
348. Kwee ML, Balemans W, Cleiren E et al. An autosomal dominant high bone mass phenotype in association with craniosynostosis in an extended family is caused by an LRP5 missense mutation. *J Bone Miner Res* 2005;20:1254–60.
349. Toomes C, Bottomley HM, Jackson RM et al. Mutations in LRP5 or FZD4 underlie the common familial exudative vitreoretinopathy locus on chromosome 11q. *Am J Hum Genet* 2004;74:721–30.
350. Babij P, Zhao W, Small C et al. High bone mass in mice expressing a mutant LRP5 gene. *J Bone Miner Res* 2003;18:960–74.
351. Ferrari SL, Deutsch S, Choudhury U et al. Polymorphisms in the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) gene are associated with variation in vertebral bone mass, vertebral bone size, and stature in whites. *Am J Hum Genet* 2004;74(5):866–75.
352. Bollerslev J, Wilson SG, Dick IM et al. LRP5 gene polymorphisms predict bone mass and incident fractures in elderly Australian women. *Bone*. 2005;36(4):599-606.
353. van Meurs JB, Rivadeneira F, Jhamai M et al. Common genetic variation of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 and 6 genes determines fracture risk in elderly white men. *J Bone Miner Res* 2006;21(1):141–50.
354. Agueda L, Bustamante M, Jurado S et al. A haplotype-based analysis of the LRP5 gene in relation to osteoporosis phenotypes in Spanish postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2008;23:1954–63.
355. Giroux S, Elfassihi L, Cole DE et al. Replication of associations between LRP5 and ESRR1 variants and bone density in premenopausal women. *Osteoporos Int* 2008;19:1769–75.
356. van Meurs JBJ, Trikalinos TA, Ralston SH et al. Large-scale analysis of association between LRP5 and LRP6 variants and osteoporosis. *JAMA* 2008;299(11):1277-90.
357. Kiel DP, Ferrari SL, Cupples LA et al. Genetic variation at the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) locus modulates Wnt signaling and the relationship of physical activity with bone mineral density in men. *Bone* 2007;40(3):587–96.
358. Urano T, Shiraki M, Usui T et al. A1330 V variant of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) gene decreases Wnt signaling and affects the total body bone mineral density in Japanese women. *Endocr J* 2009;56:625–31.
359. Seeman E. During aging, men lose less bone than women because they gain more periosteal bone, not because they resorb less endosteal bone. *Calcif Tissue Int* 2001;69(4):205–8.
360. Ferrari SL, Deutsch S, Baudoin C et al. LRP5 gene polymorphisms and idiopathic osteoporosis in men. *Bone* 2005;37(6):770–5.

361. Sims AM, Shephard N, Carter K et al. Genetic analyses in a sample of individuals with high or low BMD shows association with multiple Wnt pathway genes. *J Bone Miner Res* 2008;23:499–506.
362. Mani A, Radhakrishnan J, Wang H et al. LRP6 mutation in a family with early coronary disease and metabolic risk factors. *Science* 2007;315:1278–82.
363. Kokubu C, Heinzmann U, Kokubu T et al. Skeletal defects in ringelschwanz mutant mice reveal that Lrp6 is required for proper somitogenesis and osteogenesis. *Development* 2004;131:5469–80.
364. van Bezooijen RL, Roelen BA, Visser A et al. Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med* 2004;199:805–14.
365. Brunkow ME, Gardner JC, Van Ness J et al. Bone dysplasia sclerosteosis results from loss of the SOST gene product, a novel cystine knot-containing protein. *Am J Hum Genet* 2001;68:577–89.
366. Balemans W, Ebeling M, Patel N et al. Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). *Hum Mol Genet* 2001;10:537–43.
367. Li X, Ominsky MS, Niu QT et al. Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength. *J Bone Miner Res* 2008;23:860–9.
368. Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC et al. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J* 2003;22:6267–76.
369. Semenov MV and He X. LRP5 mutations linked to high bone mass diseases cause reduced LRP5 binding and inhibition by SOST. *J Biol Chem* 2006;281:38276–84.
370. Uitterlinden AG, Arp PP, Paeper BW et al. Polymorphisms in the sclerosteosis/van Buchem disease gene (SOST) region are associated with bone-mineral density in elderly whites. *Am J Hum Genet* 2004;75:1032–45.
371. Yerges LM, Klei L, Cauley JA et al. A high-density association study of 383 candidate genes for volumetric bone density at the femoral neck and lumbar spine among older men. *J Bone Miner Res* 2009;24(12):2039–49.
372. Huang QY, Li GH and Kung AW. The -9247 T/C polymorphism in the SOST upstream regulatory region that potentially affects C/EBPalpha and FOXA1 binding is associated with osteoporosis. *Bone* 2009;45:289–94.
373. Styrkarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S et al. New sequence variants associated with bone mineral density. *Nat Genet* 2009;41:15–7.
374. Balemans W, Patel N, Ebeling M et al. Identification of a 52 kb deletion downstream of the SOST gene in patients with van Buchem disease. *J Med Genet* 2002b;39:91–7.
375. Arko B, Prezelj J, Kocijancic A et al. Association of the osteoprotegerin gene polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal women. *Maturitas* 2005;51:270–9.
376. Arko B, Prezelj J, Komel R et al. Sequence variations in the osteoprotegerin gene promoter in patients with postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4080–4.
377. Langdahl BL, Carstens M, Stenkjaer L et al. Polymorphisms in the osteoprotegerin gene are associated with osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res* 2002;17:1245–55.



378. Yamada Y, Ando F, Niino N et al. Association of polymorphisms of the osteoprotegerin gene with bone mineral density in Japanese women but not men. *Mol Genet Metab* 2003;80:344-9.
379. García-Unzueta MT, Riancho JA, Zarrabeitia MT et al. Association of the 163A/G and 1181G/C osteoprotegerin polymorphism with bone mineral density. *Horm Metab Res* 2008;40(3):219-24.
380. Choi JY, Shin A, Park SK et al. Genetic polymorphisms of OPG, RANK, and ESR1 and bone mineral density in Korean postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 2005;77:152-9.
381. Kim JG, Kim JH, Kim JY et al. Association between osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B (RANK), and RANK ligand (RANKL) gene polymorphisms and circulating OPG, soluble RANKL levels, and bone mineral density in Korean postmenopausal women. *Menopause* 2007;14(5):913-8.
382. Zhao HY, Liu JM, Ning G, et al. The influence of Lys3Asn polymorphism in the osteoprotegerin gene on bone mineral density in Chinese postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2005;16:1519-24.
383. Vidal C, Brincat M and Anastasi X. TNFRSF11B gene variants and bone mineral density in postmenopausal women in Malta. *Maturitas* 2006;53:386-95.
384. Wynne F, Drummond F, O'Sullivan K et al. Investigation of the genetic influence of the OPG, VDR (Fok1), and COL1A1 Sp1 polymorphisms on BMD in the Irish population. *Calcif Tissue Int* 2002;71:26-35.
385. Ohmori H, Makita Y, Funamizu M et al. Linkage and association analyses of the osteoprotegerin gene locus with human osteoporosis. *J Hum Genet* 2002;47:400-6.
386. Brandstrom H, Gerdhem P, Stiger F et al. Single nucleotide polymorphisms in the human gene for osteoprotegerin are not related to bone mineral density or fracture in elderly women. *Calcif Tissue Int* 2003;74:18-24.
387. Chung H, Hwang C, Kang Y et al. Osteoprotegerin polymorphism contributes to urine calcium excretion in Korean postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2000;15(Suppl.1):SU130.
388. Brändström H, Gerdhem P, Stiger F et al. Polymorphisms in the genes for vitamin D receptor and osteoprotegerin, relation to bone mineral density in Swedish women aged 75. *J Bone Miner Res* 2000;15(Suppl.1):SA160.
389. Morinaga T, Nakagawa N, Yasuda H et al. Cloning and characterization of the gene encoding human osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor. *Eur J Biochem* 1998;254:685-91.
390. Lee YH, Woo JH, Choi SJ et al. Associations between osteoprotegerin polymorphisms and bone mineral density: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 2010;37(1):227-34.
391. Mencej-Bedrac S, Prezelj J, Kocjan T et al. The combinations of polymorphisms in vitamin D receptor, osteoprotegerin and tumour necrosis factor superfamily member 11 genes are associated with bone mineral density. *J Mol Endocrinol* 2009;42:239-47.
392. Langdahl BL, Carstens M, Stenkjær L et al. Polymorphisms in the osteoprotegerin gene and osteoporotic fractures and bone mass. *J Bone Miner Res* 2000;15(Suppl.1):F159.

393. Rogers A, Hannon RA, Greenfield DM et al. Polymorphisms of the vitamin D receptor (BsmI, FokI) and osteoprotegerin gene (HincII) and the risk of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2000;15(Suppl.1):SA158.
394. Wan M, Shi X, Feng X et al. Transcriptional mechanism of bone morphogenetic protein-induced osteoprotegerin gene expression. *J Biol Chem* 2001;276:10119–25.
395. Thirunavukkarasu K, Miles RR, Halladay DL et al. Stimulation of osteoprotegerin (OPG) gene expression by transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). *J Biol Chem* 2001;276: 36241–50.
396. Richards JB, Rivadeneira F, Inouye M et al. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study. *Lancet* 2008;371:1505–12.
397. Styrkarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S et al. Multiple genetic loci for bone mineral density and fractures. *N Engl J Med* 2008;358:2355–65.
398. Rivadeneira F, Styrkarsdottir U, Estrada K et al. Twenty bone-mineral-density loci identified by large-scale meta-analysis of genome-wide association studies. *Nat Genet* 2009;41:1199–206.
399. Xiong DH, Shen H, Zhao LJ et al. Robust and comprehensive analysis of 20 osteoporosis candidate genes by very high-density single-nucleotide polymorphism screen among 405 white nuclear families identified significant association and gene-gene interaction. *J Bone Miner Res* 2006;21:1678–95.
400. Hsu YH, Niu T, Terwedow HA et al. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men. *Hum Genet* 2006;118:568–77.
401. Dong SS, Liu XG, Chen Y et al. Association analyses of RANKL/RANK/OPG gene polymorphisms with femoral neck compression strength index variation in Caucasians. *Calcif Tissue Int* 2009;85:104–12.
402. Koh JM, Park BL, Kim DJ et al. Identification of novel RANK polymorphisms and their putative association with low BMD among postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2007;18:323–31.
403. Amin S, Zhang Y, Sawin CT et al. Association of hypogonadism and estradiol levels with bone mineral density in elderly men from the Framingham study. *Ann Intern Med* 2000;133(12):951–63.
404. Cummings SR, Browner WS, Bauer D et al. Endogenous hormones and the risk of hip and vertebral fractures among older women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *N Engl J Med* 1998;339(11):733–8.
405. Rizzoli R and Bonjour JP. Hormones and bones. *Lancet* 1997;349(Suppl.1): sI20–sI23.
406. Herrington DM, Howard TD, Brosnihan KB et al. Common estrogen receptor polymorphism augments effects of hormone replacement therapy on E-selectin but not C-reactive protein. *Circulation* 2002;105:1879–82.
407. Ioannidis JP, Ralston SH, Bennett ST et al. Differential genetic effects of ES1 gene polymorphisms on osteoporosis outcomes. *JAMA* 2004;292(17):2105–14.

408. Albagha OM, Pettersson U, Stewart A et al. Association of oestrogen receptor alpha gene polymorphisms with postmenopausal bone loss, bone mass, and quantitative ultrasound properties of bone. *J Med Genet* 2005;42:240-6.
409. Wang CL, Tang XY, Chen WQ et al. Association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms with bone mineral density in Chinese women: a meta-analysis. *Osteoporos Int* 2007;18:295-305.
410. Wang JT, Guo Y, Yang TL et al. Polymorphisms in the estrogen receptor genes are associated with hip fractures in Chinese. *Bone* 2008;43:910-4.
411. Scariano JK, Simplicio SG, Montoya GD et al. Estrogen receptor beta dinucleotide (CA) repeat polymorphism is significantly associated with bone mineral density in postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 2004;74(6):501-8.
412. Shearman AM, Karasik D, Gruenthal KM et al. Estrogen receptor beta polymorphisms are associated with bone mass in women and men: the Framingham study. *J Bone Miner Res* 2004;19(5):773-81.
413. Lau HH, Ho AY, Luk KD et al. Estrogen receptor beta gene polymorphisms are associated with higher bone mineral density in premenopausal, but not postmenopausal southern Chinese women. *Bone* 2002;31(2):276-81.
414. Ogawa S, Hosoi T, Shiraki M et al. Association of estrogen receptor beta gene polymorphism with bone mineral density. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;269(2):537-41.
415. Rivadeneira F, van Meurs JB, Kant J et al. Estrogen receptor beta (ESR2) polymorphisms in interaction with estrogen receptor alpha (ESR1) and insulin-like growth factor I (IGF1) variants influence the risk of fracture in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2006;21(9):1443-56.
416. Moron FJ, Mendoza N, Vazquez F et al. Multilocus analysis of estrogen-related genes in Spanish postmenopausal women suggests an interactive role of ESR1, ESR2 and NRIP1 genes in the pathogenesis of osteoporosis. *Bone* 2006;39(1):213-21.
417. Giguere V. To ERR in the estrogen pathway. *Trends Endocrinol Metab* 2002;13:220-5.
418. Laflamme N, Giroux S, Loredo-Osti JC et al. A frequent regulatory variant of the estrogen-related receptor alpha gene associated with BMD in French-Canadian premenopausal women. *J Bone Miner Res* 2005;20:938-44.
419. Elfassihi L, Giroux S, Bureau A et al. Association with replication between estrogen-related receptor gamma (ESRRG) polymorphisms and bone phenotypes in women of European ancestry. *J Bone Miner Res* 2010;25(4):901-11.
420. Yanase T, Simpson ER and Waterman MR. 17 alpha-hydroxylase/17, 20-lyase deficiency: from clinical investigation to molecular definition. *Endocr Rev* 1991;12:91-108.
421. Carey AH, Waterworth D, Patel K et al. Polycystic ovaries and premature male pattern baldness are associated with one allele of the steroid metabolism gene CYP17. *Hum Mol Genet* 1994;3:1873-6.

422. Limer KL, Pye SR, Thomson W et al. Genetic variation in sex hormone genes influences heel ultrasound parameters in middle-aged and elderly men: results from the European Male Aging Study (EMAS). *J Bone Miner Res* 2009;24:314–23.
423. Zarrabeitia MT, Hernandez JL, Valero C et al. Adiposity, estradiol, and genetic variants of steroid-metabolizing enzymes as determinants of bone mineral density. *Eur J Endocrinol* 2007;156:117–122.
424. Valero C, Zarrabeitia MT, Hernandez JL et al. Bone mass in young adults: relationship with gender, weight and genetic factors. *J Intern Med* 2005;258:554–62.
425. Yamada Y, Ando F and Shimokata H. Association of polymorphisms in CYP17A1, MTP, and VLDLR with bone mineral density in community-dwelling Japanese women and men. *Genomics* 2005;86:76–85.
426. Chen HY, Chen WC, Hsu CM et al. Tumor necrosis factor alpha, CYP 17, urokinase, and interleukin 10 gene polymorphisms in postmenopausal women: correlation to bone mineral density and susceptibility to osteoporosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005;122:73–8.
427. Somner J, McLellan S, Cheung J et al. Polymorphisms in the P450 c17 (17-hydroxylase/17, 20-Lyase) and P450 c19 (aromatase) genes: association with serum sex steroid concentrations and bone mineral density in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:344–51.
428. Tofteng CL, Abrahamsen B, Jensen JE et al. Two single nucleotide polymorphisms in the CYP17 and COMT Genes—relation to bone mass and longitudinal bone changes in postmenopausal women with or without hormone replacement therapy. The Danish Osteoporosis Prevention Study. *Calcif Tissue Int* 2004;75:123–32.
429. Herrmann BL, Saller B, Janssen OE et al. Impact of estrogen replacement therapy in a male with congenital aromatase deficiency caused by a novel mutation in the CYP19 gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:5476–84.
430. Bilezikian JP, Morishima A, Bell J et al. Increased bone mass as a result of estrogen therapy in a man with aromatase deficiency. *N Engl J Med* 1998;339:599–603.
431. Morishima A, Grumbach MM, Simpson ER et al. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:3689–98.
432. Carani C, Qin K, Simoni M et al. Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. *N Engl J Med* 1997;337:91–5.
433. Valero C, Perez-Castrillon JL, Zarrabeitia MT et al. Association of aromatase and estrogen receptor gene polymorphisms with hip fractures. *Osteoporos Int* 2008;19:787–92.
434. Riancho JA, Valero C, Naranjo A et al. Identification of an aromatase haplotype that is associated with gene expression and postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:660–5.
435. Enjuanes A, Garcia-Giralt N, Supervia A et al. A new SNP in a negative regulatory region of the CYP19A1 gene is associated with lumbar spine BMD in postmenopausal women. *Bone* 2006;38:738–43.

- 436.Riancho JA, Zarrabeitia MT, Valero C et al. A gene-to-gene interaction between aromatase and estrogen receptors influences bone mineral density. *Eur J Endocrinol* 2006;155:53–9.
- 437.Riancho JA, Zarrabeitia MT, Valero C et al. Aromatase gene and osteoporosis: relationship of ten polymorphic loci with bone mineral density. *Bone* 2005;36:917–25.
- 438.Mendoza N, Moron FJ, Vazquez F et al. Weighting the effect of CYP19A gene in bone mineral density of postmenopausal women. *Bone* 2006;38:951–3.
- 439.Dick IM, Devine A and Prince RL. Association of an aromatase TTTA repeat polymorphism with circulating estrogen, bone structure, and biochemistry in older women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;288:E989–E995.
- 440.Zarrabeitia MT, Hernandez JL, Valero C et al. A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the aromatase gene influences bone mass and fracture risk. *Eur J Endocrinol* 2004;150:699–704.
- 441.Riancho JA, Sanudo C, Valero C et al. Association of the aromatase gene alleles with BMD: epidemiological and functional evidence. *J Bone Miner Res* 2009;24:1709–18.
- 442.Salmen T, Heikkinen AM, Mahonen A et al. Relation of aromatase gene polymorphism and hormone replacement therapy to serum estradiol levels, bone mineral density, and fracture risk in early postmenopausal women. *Ann Med* 2003;35:282–8.
- 443.Fang Y, van Meurs JB, d'Alesio A et al. Promoter and 3'-untranslated-region haplotypes in the vitamin d receptor gene predispose to osteoporotic fracture: the rotterdam study. *Am J Hum Genet* 2005;77(5):807–23.
- 444.Uitterlinden AG, Ralston SH, Brandi ML et al. The association between common vitamin D receptor gene variations and osteoporosis: a participant-level meta-analysis. *Ann Intern Med* 2006;145(4):255–64.
- 445.Arai H, Miyamoto KI, Yoshida M et al. The polymorphism in the caudal-related homeodomain protein Cdx-2 binding element in the human vitamin D receptor gene. *J Bone Miner Res* 2001;16:1256–64.
- 446.Fang Y, van Meurs JB, Bergink AP et al. Cdx-2 polymorphism in the promoter region of the human vitamin D receptor gene determines susceptibility to fracture in the elderly. *J Bone Miner Res* 2003;18:1632–41.
- 447.Gross C, Eccleshall TR, Malloy PJ et al. The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. *J Bone Miner Res* 1997;12:1850–6.
- 448.Gross C, Krishnan AV, Malloy PJ et al. The vitamin D receptor gene start codon polymorphism: a functional analysis of FokI variants. *J Bone Miner Res* 1998;13:1691–9.
- 449.Kiel DP, Demissie S, Dupuis J et al. Genome-wide association with bone mass and geometry in the Framingham Heart Study. *BMC Med Genet* 2007;8(Suppl.1):S14.
- 450.Fang Y, van Meurs JB, Arp P et al. Vitamin D binding protein genotype and osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 2009;85:85–93.
- 451.Al-oanzi ZH, Tuck SP, Mastana SS et al. Vitamin D-binding protein gene microsatellite polymorphism influences BMD and risk of fractures in men. *Osteoporos Int* 2008;19:951–60.

452. Taes YE, Goemaere S, Huang G et al. Vitamin D binding protein, bone status and body composition in community-dwelling elderly men. *Bone* 2006;38:701–7.
453. Lauridsen AL, Vestergaard P, Hermann AP et al. Female premenopausal fracture risk is associated with gc phenotype. *J Bone Miner Res* 2004;19:875–81.
454. Mann V, Hobson EE, Li B et al. A COL1A1 Sp1 binding site polymorphism predisposes to osteoporotic fracture by affecting bone density and quality. *J Clin Invest* 2001;107(7):899–907.
455. Grant SFA, Reid DM, Blake G et al. Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 site in the collagen type I alpha 1 gene. *Nat Genet* 1996;14:203–5.
456. Uitterlinden AG, Burger H, Huang Q et al. Relation of alleles of the collagen type I alpha 1 gene to bone density and the risk of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1998;338(15):1016–21.
457. Qureshi AM, McGuigan FEA, Seymour DG et al. Association between COL1A1 Sp1 alleles and femoral neck geometry. *Calcif Tissue Int* 2001;69:67–72.
458. Stewart TL, Roschger P, Misof BM et al. Association of COL1A1 Sp1 alleles with defective bone nodule formation in vitro and abnormal bone mineralisation in vivo. *Calcif Tissue Int* 2005;77:113–8.
459. Harris SS, Patel MS, Cole DE et al. Associations of the collagen type I alpha 1 Sp1 polymorphism with five-year rates of bone loss in older adults. *Calcif Tissue Int* 2000;66:268–71.
460. MacDonald HM, McGuigan FEA, New SA et al. COL1A1 Sp1 polymorphism predicts perimenopausal and early postmenopausal spinal bone loss. *J Bone Miner Res* 2001;16:1634–41.
461. Mann V and Ralston SH. Meta-analysis of COL1A1 Sp1 polymorphism in relation to bone mineral density and osteoporotic fracture. *Bone* 2003;32:711–7.
462. Ralston SH, Uitterlinden AG, Brandi ML et al. Large-scale evidence for the effect of the COL1A1 Sp1 polymorphism on osteoporosis outcomes: the GENOMOS study. *PLoS Medicine* 2006;3(4):e90.
463. Garcia-Giralt N, Nogues X, Enjuanes A et al. Two new single-nucleotide polymorphisms in the COL1A1 upstream regulatory region and their relationship to bone mineral density. *J Bone Miner Res* 2002;17:384–93.
464. Zhang YY, Lei SF, Mo XY et al. The -1997 G/T polymorphism in the COL1A1 upstream regulatory region is associated with hip bone mineral density (BMD) in Chinese nuclear families. *Calcif Tissue Int* 2005;76:107–112.
465. Yamada Y, Ando F, Niino N et al. Association of a -1997G→T polymorphism of the collagen I alpha 1 gene with bone mineral density in postmenopausal Japanese women. *Hum Biol* 2005;77:27–36.
466. Bustamante M, Nogues X, Enjuanes A et al. COL1A1, ESR1, VDR and TGFB1 polymorphisms and haplotypes in relation to BMD in Spanish postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2007;18:235–43.

467. Liu PY, Lu Y, Long JR et al. Common variants at the PCOL2 and Sp1 binding sites of the COL1A1 gene and their interactive effect influence bone mineral density in Caucasians. *J Med Genet* 2004;41:752–7.
468. Yazdanpanah N, Rivadeneira F, van Meurs JB et al. The -1997 G/T and Sp1 polymorphisms in the collagen type I alpha1 (COL1A1) gene in relation to changes in femoral neck bone mineral density and the risk of fracture in the elderly: the Rotterdam study. *Calcif Tissue Int* 2007;81:18–25.
469. Stewart TL, Jin H, McGuigan FE et al. Haplotypes defined by promoter and intron 1 polymorphisms of the COL1A1 gene regulate bone mineral density in women. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3575–83.
470. Katsumata K, Nishizawa K, Unno A et al. Association of gene polymorphisms and bone density in Japanese girls. *Bone Miner Metab* 2002;20:164–9.
471. Deng HW, Shen H, Xu FH et al. Tests of linkage and/or association of genes for vitamin D receptor, osteocalcin, and parathyroid hormone with bone mineral density. *J Bone Miner Res* 2002;17:678–86.
472. Gong G, Johnson ML, Barger-Lux MJ et al. Association of bone dimensions with a parathyroid hormone gene polymorphism in women. *Osteoporos Int* 1999;9:307–11.
473. Guo Y, Zhang LS, Yang TL et al. PTH and IL21R may underlie variation of femoral neck bone mineral density as revealed by a genome-wide association study. *J Bone Miner Res* 2010;25(5):1042–8.
474. Tenne M, McGuigan F, Jansson L et al. Genetic variation in the PTH pathway and bone phenotypes in elderly women: evaluation of PTH, PTHLH, PTHR1 and PTHR2 genes. *Bone* 2008;42:719–27.
475. Duncan EL, Brown MA, Sinsheimer J et al. Suggestive linkage of the parathyroid receptor type 1 to osteoporosis *J Bone Miner Res* 1999;14(12):1993–9.
476. Lee HJ, Koh JM, Hwang JY et al. Association of a RUNX2 promoter polymorphism with bone mineral density in postmenopausal Korean women. *Calcif Tissue Int* 2009;84:439–45.
477. Bustamante M, Nogues X, Agueda L et al. Promoter 2–1025 T/C polymorphism in the RUNX2 gene is associated with femoral neck bmd in Spanish postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 2007;81:327–32.
478. Doecke JD, Day CJ, Stephens AS et al. Association of functionally different RUNX2 P2 promoter alleles with BMD. *J Bone Miner Res* 2006;21:265–73.
479. Vaughan T, Reid DM, Morrison NA et al. RUNX2 alleles associated with BMD in Scottish women; interaction of RUNX2 alleles with menopausal status and body mass index. *Bone* 2004;34:1029–36.
480. Vaughan T, Pasco JA, Kotowicz MA et al. Alleles of RUNX2/CBFA1 gene are associated with differences in bone mineral density and risk of fracture. *J Bone Miner Res* 2002;17:1527–34.
481. Yamada Y, Miyauchi A, Takagi Y et al. Association of the C-509T polymorphism, alone or in combination with the T869→C polymorphism, of the transforming growth factor-beta1 gene

- with bone mineral density and genetic susceptibility to osteoporosis in Japanese women. *J Mol Med* 2001;79:149–56.
- 482.Langdahl BL, Knudsen JY, Jensen HK et al. A sequence variation: 713–8 e1C in the transforming growth factor-beta 1 gene has higher prevalence in osteoporotic women than in normal women and is associated with very low bone mass in osteoporotic women and increased bone turnover in both osteoporotic and normal women. *Bone* 1997;20:289–94.
- 483.Shah R, Rahaman B, Hurley CK et al. Allelic diversity in the TGFB1 regulatory region: characterization of novel functional single nucleotide polymorphisms. *Hum Genet* 2005;119:1–14.
- 484.Langdahl BL, Uitterlinden AG, Ralston SH et al. Large-scale analysis of association between polymorphisms in the transforming growth factor beta 1 gene (TGFB1) and osteoporosis: the GENOMOS study. *Bone* 2008;42:969-81.
- 485.McGuigan FE, Macdonald HM, Bassiti A et al. Large-scale population-based study shows no association between common polymorphisms of the TGFB1 gene and BMD in women. *J Bone Miner Res* 2007;22:195–202.
- 486.Fujii M, Takeda K, Imamura T et al. Roles of bone morphogenetic protein type I receptors and Smad proteins in osteoblast and chondroblast differentiation. *Mol Biol Cell* 1999;10:3801–13.
- 487.Freedman BI, Bowden DW, Ziegler JT et al. Bone morphogenetic protein 7 (BMP7) gene polymorphisms are associated with inverse relationships between vascular calcification and BMD: the Diabetes Heart Study. *J Bone Miner Res* 2009;24:1719–27.
- 488.Tranah GJ, Taylor BC, Lui LY et al. Genetic variation in candidate osteoporosis genes, bone mineral density, and fracture risk: the study of osteoporotic fractures. *Calcif Tissue Int* 2008;83:155–66.
- 489.McGuigan FE, Larzenius E, Callreus M et al. Variation in the BMP2 gene: bone mineral density and ultrasound in young adult and elderly women. *Calcif Tissue Int* 2007;81:254–62.
- 490.Choi JY, Shin CS, Hong YC et al. Single-nucleotide polymorphisms and haplotypes of bone morphogenetic protein genes and peripheral bone mineral density in young Korean men and women. *Calcif Tissue Int* 2006;78:203–11.
- 491.Styrkarsdottir U, Cazier JB, Kong A et al. Linkage of osteoporosis to chromosome 20p12 and association to BMP2. *PLoS Biol* 2003;1:E69.
- 492.Reneland RH, Mah S, Kammerer S et al. Association between a variation in the phosphodiesterase 4D gene and bone mineral density. *BMC Med Genet* 2005;6:9.
- 493.Medici M, van Meurs JB, Rivadeneira F et al. BMP-2 gene polymorphisms and osteoporosis: the Rotterdam Study. *J Bone Miner Res* 2006;21:845–54.
- 494.Scheidt-Nave C, Bismar H, Leidig-Bruckner G et al. Serum interleukin 6 is a major predictor of bone loss in women specific to the first decade past menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(5):2032–42.
- 495.Hamanaka Y, Yamamoto I, Takada M et al. Comparison of bone mineral density at various skeletal sites with quantitative ultrasound parameters of the calcaneus for assessment of vertebral fractures. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;17(3):195–200.



496. Tsukamoto K, Yoshida H, Watanabe S et al. Association of radial bone mineral density with CA repeat polymorphism at the interleukin 6 locus in postmenopausal Japanese women. *J Hum Genet* 1999;44(3):148–51.
497. Murray RE, McGuigan F, Grant SF et al. Polymorphisms of the interleukin-6 gene are associated with bone mineral density. *Bone* 1997;21(1):89–92.
498. Takacs I, Koller DL, Peacock M et al. Sib pair linkage and association studies between bone mineral density and the interleukin-6 gene locus. *Bone* 2000;27(1):169–73.
499. Moffett SP, Zmuda JM, Cauley JA et al. Association of the G-174C variant in the interleukin-6 promoter region with bone loss and fracture risk in older women. *J Bone Miner Res* 2004;19(10):1612–18.
500. Nordstrom A, Gerdhem P, Brandstrom H et al. Interleukin-6 promoter polymorphism is associated with bone quality assessed by calcaneus ultrasound and previous fractures in a cohort of 75-year-old women. *Osteoporos Int* 2004;15(10): 820–6.
501. Ferrari SL, Garnero P, Emond S et al. A functional polymorphic variant in the interleukin-6 gene promoter associated with low bone resorption in postmenopausal women. *Arthritis Rheum* 2001;44(1):196–201.
502. Ferrari SL, Ahn-Luong L, Garnero P et al. Two promoter polymorphisms regulating interleukin-6 gene expression are associated with circulating levels of C-reactive protein and markers of bone resorption in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(1):255–9.
503. Ferrari SL, Karasik D, Liu J 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):552–9.
504. Yamada Y, Ando F, Niino N et al. Association of polymorphisms of interleukin-6, osteocalcin, and vitamin D receptor genes, alone or in combination, with bone mineral density in community-dwelling Japanese women and men. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(7):3372–8.
505. Zmuda JM, Yerges LM, Kammerer CM et al. Association analysis of WNT10B with bone mass and structure among individuals of African ancestry. *J Bone Miner Res* 2009;24:437–47.
506. Yerges LM, Zhang Y, Cauley JA et al. Functional characterization of genetic variation in the Frizzled 1 (FZD1) promoter and association with bone phenotypes: more to the LRP5 story? *J Bone Miner Res* 2009;24:87–96.
507. Langdahl BL, Stenkjaer L, Carstens M et al. A CAG repeat polymorphism in the androgen receptor gene is associated with reduced bone mass and increased risk of osteoporotic fractures. *Calcif Tissue Int* 2003;73(3):237–43.
508. Richert L, Chevalley T, Manen D et al. Bone mass in prepubertal boys is associated with a Gln223Arg amino acid substitution in the leptin receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92(11):4380–6.
509. Ramesh Babu L, Wilson SG, Dick IM et al. Bone mass effects of a BMP4 gene polymorphism in postmenopausal women. *Bone* 2005;36:555–61.

510. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: report of a WHO study group. WHO Technical Report Series 843, WHO, Geneva 1994.
511. Molyvda-Athanasopoulou E, Sioundas A and Hatzioannou K. Dual energy X-ray absorptiometry reference data for Greek population. The impact on diagnosis of using various normal ranges for comparison. *Eur J Radiol* 2000;36:36–40.
512. Albagha OME and Ralston SH. Genetics and osteoporosis. *Rheum Dis Clin North Am* 2006;32:659-80.
513. Koller DL, Ichikawa S, Johnson ML et al. Contribution of the LRP5 gene to normal variation in peak BMD in women. *J Bone Miner Res* 2005;20(1):75–80.
514. Koh JM, Jung MH, Hong JS et al. Association between bone mineral density and LDL receptor-related protein 5 gene polymorphism in young Korean men. *J Korean Med Sci* 2004;19:407–12.
515. Zhang ZL, Qin YJ, He JW et al. Association of polymorphisms in low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene with bone mineral density in postmenopausal Chinese women. *Acta Pharmacol Sin* 2005;26(9):1111-6.
516. Okubo M, Horinishi A, Kim DH et al. Seven novel sequence variants in the human low density lipoprotein receptor related protein 5 (LRP5) gene. *Hum Mutat* 2002;19:186.
517. Tran BN, Nguyen ND, Eisman JA et al. Association between LRP5 polymorphism and bone mineral density: a Bayesian meta-analysis. *BMC Med Genet* 2008;9:55.
518. Ezura Y, Nakajima T, Urano T et al. Association of a single-nucleotide variation (A1330V) in the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene (LRP5) with bone mineral density in adult Japanese women. *Bone* 2007;40:997–1005.
519. Zhang YP, Deng FY, Chen Y et al. Replication study of candidate genes/loci associated with osteoporosis based on genome-wide screening. *Osteoporos Int* 2010;21:785-95.
520. Grundberg E, Lau EM, Lorentzon M et al. Large-scale association study between two coding LRP5 gene polymorphisms and bone phenotypes and fractures in men. *Osteoporos Int* 2008;19:829–37.
521. Nakashima T, Kobayashi Y and Yamasaki S. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;275:768–75.
522. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinol* 2001;142:5050–5.
523. Fahrleitner-Pammer A, Dobnig H and Piswanger-Soelkner C. Osteoprotegerin serum levels in women: correlation with age, bone mass, bone turnover and fracture status. *Wien Klin Wochenschr* 2003;115:291–7.
524. Uemura H, Yasui T, Miyatani Y et al. Circulating profiles of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in post-menopausal women. *J Endocrinol Invest* 2008;31(2):163-8.
525. Ziolkowska M, Kurowska M and Radzikowska A. High levels of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in serum of rheumatoid arthritis patients and

their normalization after anti-tumor necrosis factor  $\alpha$  treatment. *Arthritis Rheum* 2002;46:1744–53.

526. Efstathiadou Z, Koukoulis G, Stakias N et al. Correlation of estrogen receptor beta gene polymorphisms with spinal bone mineral density in peri- and post-menopausal Greek women. *Maturitas* 2006;53:380–5.

