

ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ  
ΠΡΟ ΑΝΑΡΤΗΣΙΜΟ ΜΗΝ ΟΧΤΩΝ



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000200101



ΔΔ  
610

169





Αρ. ουτ.: 575 2005

A

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ  
ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ  
ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ  
Διευθυντής: Καθηγητής Επαμεινώνδας Τσιάνος  
ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΚΟ ΤΜΗΜΑ

## Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

**ΖΩΗ ΕΥΣΤΑΘΙΑΔΟΥ**  
ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2001



12/2002



«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



## **Συμβουλευτική Επιτροπή**

**Α. Τσατσούλης, Αναπλ. Καθηγητής Παθολογίας/Ενδοκρινολογίας, επιβλέπων**

**Ν. Βαμβακόπουλος, Καθηγητής Βιολογίας, μέλος**

**Ι. Γεωργίου, Επικ. Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, μέλος**



## **Εξεταστική Επιτροπή**

- A. Τσατσούλης, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας/Ενδοκρινολογίας**
- K. Σιαμόπουλος, Καθηγητής Παθολογίας/Νεφρολογίας**
- N. Βαμβακόπουλος, Καθηγητής Βιολογίας**
- A. Δρόσος, Καθηγητής Παθολογίας/Ρευματολογίας**
- M. Ελισάφ, Καθηγητής Παθολογίας**
- I. Ιωαννίδης, Αναπληρωτής Καθηγητής Υγιεινής και Επιδημιολογίας**
- I. Γεωργίου, Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας**



Στη Μητέρα μου

Στη Μνήμη του Πατέρα μου





# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	1
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	2
<b>I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	
Δομή των οστών και ανακατασκευή	4
Οστική κατασκευή	
Οστική ανακατασκευή	
Μέθοδοι εκτίμησης της οστικής πυκνότητας	5
Α) Μέθοδοι μέτρησης οστικής πυκνότητας	5
Β) Εκτίμηση της μικροαρχιτεκτονικής δομής των οστών	7
Οστεοπόρωση	7
Παράγοντες που επηρεάζουν τον οστικό μεταβολισμό	8
Α) <i>Παράγοντες που υπεισέρχονται στην απόκτηση κορυφαίας οστικής μάζας</i>	9
Β) <i>Παράγοντες που υπεισέρχονται στον οστικό μεταβολισμό και τη διατήρηση της οστικής μάζας μετά την εφηβεία</i>	11
<b>ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΟΣΤΑ</b>	12
Μελέτη γενετικής σύνδεσης	13
Μελέτη υποψηφίων γονιδίων	14
Πειραματικές διασταυρώσεις ζώων	14
Γενετική προσέγγιση της οστικής πυκνότητας	15
Μελέτες γενετικής σύνδεσης	15
Μελέτες υποψηφίων γονιδίων	15
1. Υποδοχέας βιταμίνης D	16
2. Υποδοχέας των οιστρογόνων τύπου α	21
3. Γονίδιο του κολλαγόνου τύπου Ια 1	23
4. Άλλα γονίδια που έχουν μελετηθεί σε σχέση με τη συμβολή τους στον οστικό μεταβολισμό-οστική πυκνότητα	27
5. Μελλοντικά υποψήφια γονίδια που προκύπτουν από μελέτες σε διαγονιδιακά και knock-out ποντίκια	27



Προτεινόμενοι μηχανισμοί επίδρασης των πολυμορφισμών στη φαινοτυπική έκφραση της οστικής πυκνότητας	30
1. Λειτουργίες γονιδίων	30
2. Έλεγχος σωματομετρικών χαρακτηριστικών	31
3. Αλληλεπίδραση με διατροφικές συνήθειες και περιβαλλοντικούς παράγοντες	32
4. Γονιδιακές αλληλεπιδράσεις	32
5. Αλληλεπίδραση με την ηλικία	33

## II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. Πολυμορφισμοί των υποψηφίων γονιδίων VDR, ESR και COLIA 1 σε σχέση με την οστική πυκνότητα και δείκτες οστικού μεταβολισμού.

A) Ομάδα μελέτης	35
B) Εργαστηριακός έλεγχος	37
Γ) Οστική πυκνομετρία οσφυϊκών σπονδύλων	38
Δ) Γενετικός έλεγχος	39
• Εξαγωγή DNA	39
• Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	39
• Πολυμορφισμοί περιορισμού μήκους θραύσματος	40
• Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης	41
• Γονοτυπικοί προσδιορισμοί για τους μελετηθέντες πολυμορφισμούς	42
i. Καθορισμός γονοτύπων για το γονίδιο VDR	
A). <i>Bsm I</i>	42
B). <i>Fok I</i>	43
ii. Καθορισμός γονοτύπων για το γονίδιο ESR	45
iii. Καθορισμός γονοτύπου για το γονίδιο COLIA 1	46
E) Στατιστική ανάλυση	53

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

• Χαρακτηριστικά συμμετεχόντων	55
• Κατανομή γονοτύπων	63
• Οστική πυκνότητα και γονότυποι	63
• Συνέργεια μεταξύ των πολυμορφισμών των γονιδίων VDR και ESR	70



**B. Καθορισμός της σχέσης του πολυμορφισμού Sp1 του γονιδίου του κολλαγόνου τύπου Ια1 με τον επιπολασμό καταγμάτων**

**Μέθοδοι**

- Εντοπισμός και επιλογή μελετών 73
- Κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη 74
- Εξαγωγή πληροφοριών 74
- Μέθοδοι μετα-ανάλυσης 74

**Αποτελέσματα 75**

- Χαρακτηριστικά των μελετών που συμπεριλήφθηκαν στη μετα-ανάλυση 75
- Αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης 76
- Ποσοστό καταγμάτων που αποδίδονται στον πολυμορφισμό Sp1 του γονιδίου COL1A 1 77

**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ 84**

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ 90**

**ABSTRACT 92**

**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 93**



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η οστεοπόρωση αποτελεί το πιο συχνό μεταβολικό νόσημα των οστών, πλήττοντας κατά κύριο λόγο το γυναικείο φύλο, κατά την εμμηνόπαυση και αργότερα κατά την έλευση του γήρατος. Τα κατάγματα αποτελούν την κύρια κλινική συνέπεια της οστεοπόρωσης και έχουν σοβαρό αντίκτυπο με κοινωνικές, ψυχολογικές και οικονομικές προεκτάσεις.

Γενετικοί παράγοντες ενέχονται σε μεγάλο ποσοστό στη διαμόρφωση τόσο της οστικής πυκνότητας, που αποτελεί μια από τις κύριες παραμέτρους που προσδιορίζουν την οστεοπόρωση, όσο και του οστικού μεταβολισμού. Ωστόσο, το γεγονός της πολυγονιδιακής φύσης του οστικού φαινοτύπου και της αλληλεπίδρασής της με περιβαλλοντικούς παράγοντες τον καθιστά ένα σύμπλοκο γενετικό χαρακτηριστικό.

Η ετερογένεια που διαπιστώνεται μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών που φέρουν διαφορετικό γονιδιακό υπόστρωμα και βρίσκονται υπό διαφορετικές περιβαλλοντικές επιδράσεις περιπλέκει ακόμη περισσότερο την απόπειρα ανίχνευσης γενετικών συσχετίσεων. Προκύπτει λοιπόν η ανάγκη να μελετηθούν περισσότερα υποψήφια γονίδια σε διαφορετικούς πληθυσμούς, ώστε για καθέναν ξεχωριστά να σχεδιαστεί το προφίλ των γενετικών παραγόντων που είναι προγνωστικοί οστεοπόρωσης.

Στο παρόν εγχείρημα, μελετάται η πιθανή επίδραση πέντε διαφορετικών πολυμορφισμών που εντοπίζονται σε τρία διαφορετικά υποψήφια γονίδια στην διαμόρφωση της οστικής πυκνότητας καθώς και σε βιοχημικούς δείκτες οστικού μεταβολισμού, σε σειρά περι- και μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών από τη βορειοδυτική Ελλάδα. Ο συνδυασμός των συγκεκριμένων πολυμορφισμών μελετάται για πρώτη φορά στον Ελληνικό πληθυσμό. Ακόμη, αυτή είναι διεθνώς η πρώτη απόπειρα αξιολόγησης της ανεξάρτητης ή συνεργικής δράσης του συγκεκριμένου συνδυασμού πολυμορφισμών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής κ. Α. Τσατσούλη, Αναπληρωτή Καθηγητή Παθολογίας/Ενδοκρινολογίας, κ. Ν. Βαμβακόπουλο, Καθηγητή Βιολογίας και κ. Ι. Γεωργίου, Βιολόγο, Επίκουρο Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας, για την ανάθεση του θέματος της διατριβής μου.

Ιδιαίτερα επιθυμώ να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου κύριο Α. Τσατσούλη για την ανεκτίμητη βοήθειά του σε όλα τα στάδια της μελέτης μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον καθηγητή κύριο Ι. Ιωαννίδη για τη δημιουργική και αποδοτική συνεργασία και την καθοριστική συμβολή του στην ολοκλήρωση αυτής της μελέτης, καθώς και το βιολόγο κύριο Β. Κρανά, ο οποίος μοιράστηκε μαζί μου τις γνώσεις και την εμπειρία του σε θέματα τεχνικών μοριακής βιολογίας, για την πολύτιμη καθοδήγησή του σε όλη τη διάρκεια της δοσλειάς μου στο εργαστήριο γενετικής.



## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

BMD	Bone Mineral Density
BMUs	Basic Multicellular Units (Βασικές Πολυκυτταρικές Ομάδες)
SPA/DPA	Single/Dual energy Photon Absorptiometry (Απορροφησιμετρία με δέσμη φωτονίων μονής/διπλής ενέργειας)
DEXA	Dual Energy X-Ray Absorptiometry (Απορροφησιμετρία διπλής ενέργειας με ακτίνες X)
KOM	Κορυφαία οστική μάζα
ΟΜΣΣ	Οσφυϊκή μοίρα σπονδυλικής στήλης
VDR	Vitamin D Receptor (Υποδοχέας βιταμίνης D)
ESRα	Estrogen Receptor α (Οιστρογονικός υποδοχέας τύπου α)
COLIA1	Collagen Type Ia 1 (Κολλαγόνο τύπου Ia 1)
OPG	Osteoprotegerin (Οστεοπροτεγερίνη)
RANK	Receptor Activator of Nuclear Factor κB (Υποδοχέας ενεργοποίησης του πυρηνικού παράγοντα κάππα Β)
RFLPs	Restriction Fragment Length Polymorphisms (Πολυμορφισμοί Περιορισμού Μήκους Θραύσματος)
SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms (Πολυμορφισμοί Ενός Νουκλεοτιδίου)
VNTR	Variable Number Tandem Repeat (Πολυμορφισμοί με Διαφορετικού Μεγέθους Επαναλαμβανόμενα Τμήματα)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης)
ΟΘΥ	Ορμονική Θεραπεία Υποκατάστασης
CASR	Calcium Sensing Receptor (Υποδοχέας ασβεστίου)
PPAR-γ	Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ
VDBP	Vitamin D Binding Protein (Δεσμευτική πρωτεΐνη της βιταμίνης D)
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1 (Ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας 1)
IL-6	Interleukin 6 (Ιντερλευκίνη 6)
IL-1RA	Interleukin 1 Receptor Antagonist (Ανταγωνιστής του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 1)
PTH	Parathyroid hormone (Παραθορμόνη)
TGF-β <sub>1</sub>	Transforming Growth Factor β <sub>1</sub> (Μεταμορφωτικός παράγοντας β <sub>1</sub> )
AR	Androgen Receptor (Υποδοχέας ανδρογόνων)
γ-gla proteins	Πρωτεΐνες με γ-καρβοξυγλουταμικό
QCT/pQCT	Quantitative Computed Tomography/peripheral QCT (Ποσοτική υπολογιστική τομογραφία/ περιφερική QCT)
GALNR3	Galanine Receptor 3 (Υποδοχέας γαλανίνης 3)
MTHFR	Methylenetetrahydrofolate Reductase (Αναγωγή του μεθυλενο-τετράδρο φολικού)
BMI	Body Mass Index (Δείκτης μάζας σώματος)
bp	base pairs (ζεύγη βάσεων)



- IQR** Interquartile Range (ενδοτεταρτημοριακό εύρος)
- SD** Standard Deviation (σταθερή απόκλιση)
- WHO** World Health Organization (Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας)
- TNF** Tumor Necrosis Factor (παράγοντας νέκρωσης των όγκων)



## I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

#### ΔΟΜΗ ΟΣΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΚΑΤΑΣΚΕΥΗ

Ο ανθρώπινος σκελετός αποτελεί ένα ζωτικό ιστό που επιτελεί πολλαπλές λειτουργίες: α) εξασφαλίζει προστασία σε ζωτικά όργανα μέσα σε άκαμπτες οστέινες κοιλότητες, β) συμβάλλει στην κίνηση, αφού παρέχει σταθερά σημεία πρόσφυσης των μυών και τέλος, γ) αποτελεί μια κινητοποιήσιμη αποθήκη ιόντων (ασβεστίου, φωσφόρου, μαγνησίου και νατρίου) που βρίσκεται σε διαρκή αλληλεπίδραση με το εξωκυττάριο περιβάλλον.

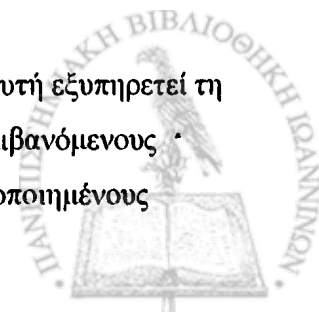
Τα 2/3 του βάρους των οστών αντιστοιχούν σε μεταλλικά στοιχεία που συνίστανται, κατά κύριο λόγο, σε κρυστάλλους υδροξυαπατίτη και σε μικρότερο ποσοστό σε άμορφο φωσφορικό ασβέστιο, το οποίο απαντάται κυρίως σε περιοχές ενεργού οστικής κατασκευής. Το υπόλοιπο 1/3 του βάρους αναλογεί κυρίως σε νερό και κολλαγόνο τύπου I και δευτερευόντως σε μη κολλαγονικές πρωτεΐνες. Στην ομάδα των τελευταίων ανήκουν: (α) οι πρωτεΐνες που συμβάλλουν στην προσκόλληση των οστεοβλαστών στη θεμέλια ουσία: οστεοποντίνη, θρομβοσπονδίνη, οστική σιαλοπρωτεΐνη και φμπρονεκτίνη, (β) οι πρωτεογλυκάνες, (γ) οι πρωτεΐνες που περιέχουν γ-καρβοξυγλουταμικό οξύ (γ-gla proteins) με κύριο εκπρόσωπο την οστεοκαλσίνη και τέλος, (δ) η οστεονεκτίνη που μαζί με την οστεοκαλσίνη συμβάλλουν στην επιμετάλλωση του οστεοειδούς. Στα οστά, τέλος, ανιχνεύονται και λιπίδια καθώς και η παρουσία μιας πληθώρας αυξητικών παραγόντων καθώς και παραγόντων που μοιάζουν με κυττοκίνες.

#### **Οστική κατασκευή (Bone modeling)**

Η αύξηση του σκελετού διαρκεί ως το πέρας της εφηβείας οπότε ο σκελετός αποκτά τη μέγιστη δυνατή οστική πυκνότητα κατά τη διάρκεια της ζωής, την κορυφαία οστική μάζα (ΚΟΜ). Κατά το χρονικό διάστημα μεταξύ 20 και 30 ετών ο σκελετός διανύει την περίοδο σταθεροποίησης της οστικής δομής με την απόκτηση και συντήρηση της ΚΟΜ, ενώ στη συνέχεια, μετά την ηλικία των 30, ξεκινά η φάση προοδευτικής οστικής απώλειας, η οποία συνεχίζεται μέχρι το τέλος της ζωής. Η οστική απώλεια αρχικά συμβαίνει σε πολύ βραδύ ρυθμό και αργότερα σε κυμαινόμενο ρυθμό, υπό την παράλληλη επιρροή τόσο ενδογενών, όσο και εξωγενών παραγόντων.

#### **Οστική ανακατασκευή (Bone remodeling)**

Τα οστά ανανεώνονται διαρκώς με τη διαδικασία της οστικής ανάπλασης. Αυτή εξυπηρετεί τη διατήρηση της αρχιτεκτονικής τους ακεραιότητας και πραγματοποιείται σε επαναλαμβανόμενους κύκλους. Κατά τη διάρκεια ενός κύκλου, προηγείται οστική απορρόφηση από ενεργοποιημένους



οστεοκλάστες, η οποία ακολουθείται από εναπόθεση οστεοειδούς από τους οστεοβλάστες και επιμετάλλωσή του προς σχηματισμό νέου οστού. Η οστική ανακατασκευή ξεκινά πάντα από την επιφάνεια του οστού και ακολουθεί διαφορετική κατεύθυνση σε καθένα από τους δύο τύπους οστού. Έτσι, ενώ στα φλοιώδη οστά το μέτωπο των οστεοκλαστών προχωρά σε βάθος σχηματίζοντας «τούνελ» το οποίο στη συνέχεια αποκαθίσταται από τους οστεοβλάστες, στα σπογγώδη οστά προχωρεί κατά μήκος της επιφάνειας σχηματίζοντας «χαντάκυ», το οποίο με την ίδια πορεία πληρώνουν οι οστεοβλάστες.

Τα οστά διέρχονται μέσω αυτού του κύκλου αποδόμησης και ανάπλασης κατά κυτταρικές ομάδες, τις «Βασικές Πολυκυτταρικές Ομάδες» (Basic Multicellular Units, BMUs), που ουσιαστικά περιλαμβάνουν το σύνολο των κυττάρων που συμμετέχουν στη διαδικασία. Η διάρκεια ζωής μιας BMU είναι περίπου 6-9 μήνες και οι κύκλοι διαρκούν το ίδιο τόσο στα φλοιώδη όσο και στα σπογγώδη οστά. Ωστόσο, επειδή στα σπογγώδη οστά ο λόγος επιφάνειας προς όγκο είναι αρκετά μεγαλύτερος από ότι στα φλοιώδη οστά, ο ρυθμός δημιουργίας BMUs και κατά συνέπεια των κύκλων αποδόμησης-ανάπλασης είναι μεγαλύτερος στα σπογγώδη οστά (28% ανά έτος) σε σχέση με τα φλοιώδη οστά (4% ανά έτος).<sup>1</sup>

Η σύζευξη (coupling) των δύο αυτών διεργασιών, της οστικής απορρόφησης και της οστικής επαναδόμησης, είναι σημαντική για τη διατήρηση σταθερής οστικής πυκνότητας. Κατά συνέπεια, εάν υπάρξει διαταραχή των μηχανισμών που εξασφαλίζουν την ομαλή λειτουργία των κύκλων οστικής ανακατασκευής, ή εάν υπάρξει αποσύζευξη (uncoupling) των λειτουργιών της οστικής απορρόφησης – οστικής επαναδόμησης, τότε θα διαταραχθεί η σύσταση και η δομική ακεραιότητα του οστού. Επίσης, λόγω του ταχύτερου ρυθμού μεταβολισμού τους, είναι φανερό ότι τα σπογγώδη οστά (πχ. οι σπόνδυλοι) είναι πιο ευάλωτα σε τέτοιες μεταβολές.

Κατά συνέπεια, βραχυπρόθεσμα η μελέτη των σπογγωδών οστών αποτελεί πιθανά καλύτερο και αμεσότερο δείκτη μελέτης του οστικού μεταβολισμού και των μεταβολών της οστικής πυκνότητας. Λογικά οποιοσδήποτε βλαπτικός ή ευεργετικός παράγοντας ή οποιαδήποτε απόκλιση από τη φυσιολογική διαδικασία θα προσέβαλε ταχύτερα τα σπογγώδη οστά, ενώ οι επιδράσεις στα φλοιώδη θα γίνονταν αντιληπτές αργότερα.

### Μέθοδοι εκτίμησης οστικής ποιότητας

Η ποιότητα των οστών, η οποία αντανακλά την ικανότητά τους να ανταποκρίνονται με επιτυχία στο έργο τους και την αντοχή τους στα κατάγματα, μπορεί να εκτιμηθεί με τις εξής παραμέτρους: την οστική πυκνότητα και την μικροαρχιτεκτονική δομή.

#### A) Μέθοδοι μέτρησης οστικής πυκνότητας

Η οστική πυκνότητα (Bone Mineral Density, BMD) προσδιορίζεται με απεικονιστικές μεθόδους που χρησιμοποιούν δέσμες φωτονίων, ακτίνες X ή υπερήχους.





Οι πρώτες μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η απορροφησιμετρία με μονής ή διπλής ενέργειας δέσμη φωτονίων από ραδιενεργό πηγή (Single/Dual energy Photon Absorptiometry, SPA/DPA). Αυτές οι δύο μέθοδοι έχουν σχεδόν εγκαταλειφθεί, λόγω των προβλημάτων που ανέκυπταν από τη χρήση ραδιενεργού πηγής, αλλά και από την έναρξη εφαρμογής πιο εξελιγμένων και πιο πρακτικών μεθόδων.

Η ποσοτική υπολογιστική τομογραφία [QCT (Quantitative Computed Tomography)] είναι η μέθοδος που παρέχει τη μεγαλύτερη ακρίβεια, αλλά δεν έχει ευρεία εφαρμογή λόγω της σημαντικής επιβάρυνσης του εξεταζόμενου με ακτινοβολία. Πιο πρακτική είναι η περιφερική QCT (peripheral QCT, pQCT) που εστιάζεται στα οστά του αντιβραχίου ή της κνήμης αντί για αυτά του αξονικού σκελετού.

Η χρησιμοποίηση των ακτινών X ως πηγή διπλής δέσμης φωτονίων (Dual Energy X-Ray Absorptiometry, DEXA) εισήγαγε μια μέθοδο πιο πρακτική, με ικανοποιητική ακρίβεια και επαναληψιμότητα καθώς και μικρή ακτινοβολία του εξεταζόμενου.

Τέλος, τα τελευταία χρόνια στην διαγνωστική της οστικής πυκνότητας έχει εισχωρήσει και η χρήση υπερήχων. Από μελέτες προκύπτει ότι οι υπερήχοι προβλέπουν ικανοποιητικά τον κίνδυνο κατάγματος. Ωστόσο, δεν υπάρχει απόλυτη αντιστοιχία με τα ευρήματα της DEXA, γεγονός που πιθανά σημαίνει ότι οι δύο μέθοδοι εκτιμούν

διαφορετικές οστικές ιδιότητες. Προς το παρόν, λόγω της κακής επαναληψιμότητας της εξέτασης με υπερήχους και της έλλειψης επαρκών στοιχείων για αξιολόγηση των περιεμμηνοπαυσιακών γυναικών, η χρήση τους σε μελέτες δεν έχει τύχει ευρείας εφαρμογής.

Η εξέταση η οποία κατεξοχήν χρησιμοποιείται σε μέθοδος αναφοράς στις μελέτες που αφορούν στο μεταβολισμό των οστών και την οστεοπόρωση είναι η DEXA.

Το αποτέλεσμα το οποίο προκύπτει από την DEXA είναι το περιεχόμενο του οστού σε άλατα εκφρασμένο ανά μονάδα επιφανείας ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ). Ουσιαστικά δηλαδή, πρόκειται για δισδιάστατη καταγραφή και όχι για την πραγματική τρισδιάστατη οστική πυκνότητα, η οποία θα εκφραζόταν σε βάρος ανά μονάδα όγκου ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ). Ωστόσο, φαίνεται ότι υπάρχει ικανοποιητική αντιστοιχία ανάμεσα στα δύο μέτρα. Από τη μέτρηση αυτή προκύπτουν και δύο άλλες παράμετροι, το T-score και το Z-score. Ως **T-score** ορίζεται ο αριθμός των σταθερών αποκλίσεων που απέχει η προσδιοριζόμενη BMD από το μέσο όρο ατόμων ίδιου φύλου αλλά νεαρής ηλικίας. Αντίστοιχα, **Z-score** είναι ο αριθμός των σταθερών αποκλίσεων που απέχει η προσδιοριζόμενη BMD από το μέσο όρο ατόμων της ίδιας ηλικίας και φύλου με τον εξεταζόμενο.

#### *Πλεονεκτήματα DEXA*

- Ικανοποιητική αναπαραγωγικότητα
- Χαμηλή δόση ακτινοβολίας στον εξεταζόμενο
- Γρήγορη εκτέλεση της εξέτασης
- Δυνατότητα απευθείας μετρήσεως σε οποιοδήποτε σημείο του σώματος
- Δυνατότητα μορφομετρίας των σπονδύλων.



## **B) Εκτίμηση της μικροαρχιτεκτονικής δόμης- Οστική ιστομορφομετρία**

Η βιοψία αποτελεί τη μόνη μέθοδο που μπορεί να μας δώσει άμεσες πληροφορίες πέρα από την ποσότητα και για την ποιότητα των οστών, ελέγχοντας ταυτόχρονα για πιθανή διαταραχή των φάσεων οστικής ανακατασκευής. Εκτός από τη στατική, υπάρχει και η δυναμική ιστομορφομετρία με την οποία εκτιμάται ο ρυθμός οστικού μεταβολισμού ανάμεσα σε δύο ζώνες χρονικά ιχνηθετιμένες με τετρακυκλίνη χορηγηθείσα προ της βιοψίας σε δύο χρόνους απέχοντες κατά 2 εβδομάδες.

## **ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗ**

Η οστεοπόρωση είναι μια συστηματική οστική νόσος που χαρακτηρίζεται από χαμηλή οστική μάζα και διαταραχή της μικρο-αρχιτεκτονικής δομής του οστίτη ιστού με αποτέλεσμα την αύξηση της οστικής ευθραυστότητας και, κατά συνέπεια, του κινδύνου καταγμάτων (Παγκόσμιο Συνέδριο Οστεοπόρωσης, Αμστερντάμ, Ολλανδία, 1996).

Ο προσδιορισμός της οστικής πυκνότητας αποτελεί σήμερα τη βάση για τη διάγνωση της οστεοπόρωσης, όπως αυτή ορίζεται σύμφωνα με τον WHO (Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας). Ωστόσο, η BMD διαφωτίζει μία μόνο όψη της κατάστασης, αφού η μικρο-αρχιτεκτονική των οστών μπορεί να εκτιμηθεί μόνο με βιοψία η οποία είναι μια παρεμβατική, επώδυνη και πιο περίπλοκη μέθοδος. Κατ' ουσία, η νόσος ορίζεται από ένα ενδιάμεσο μέγεθος (BMD) και όχι από την τελική κλινική έκβαση, τα οστικά κατάγματα, η οποία ενδιαφέρει περισσότερο ασθενείς και κλινικούς. Παρόλα αυτά, έχει αποδειχτεί ότι η μέτρηση της οστικής πυκνότητας αποτελεί έναν αναίμακτο, αλλά αξιόπιστο τρόπο έμμεσου προσδιορισμού της οστεοπόρωσης. Έχει μάλιστα υπολογιστεί ότι η οστική πυκνότητα μπορεί να εξηγήσει το 75-85% της διακύμανσης της οστικής ανοχής.<sup>2</sup>

Ο κεντρικός ρόλος της BMD στην οστική ανοχή αποδεικνύεται σε μελέτη όπου αναγνωρίστηκαν μεν και άλλοι παράγοντες κινδύνου για εμφάνιση οστεοπορωτικών καταγμάτων, μεταξύ των οποίων κεντρικό ρόλο κατείχε και το οικογενειακό ιστορικό, αλλά ανεξάρτητα από την παρουσία ή όχι και τον αριθμό των άλλων παραγόντων, ο σχετικός κίνδυνος για κατάγματα αυξανόταν σταθερά, όσο ελαττώνονταν τα επίπεδα οστικής πυκνότητας.<sup>3</sup>

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας, με βάση τη μέτρηση της οστικής πυκνότητας, έχει ορίσει τις εξής διαγνώσεις:

**Φυσιολογικά όρια:** Όταν η BMD απέχει όχι περισσότερο από μία σταθερά απόκλιση κάτω από το μέσο όρο ατόμων νεαρής ηλικίας (T-score  $\geq -1$ ).

**Οστεοπενία:** Όταν η BMD βρίσκεται μεταξύ 1 έως και 2.5 σταθερών αποκλίσεων κάτω από το μέσο όρο ατόμων νεαρής ηλικίας (T-score  $< -1$  και  $\geq -2.5$ ).

**Οστεοπόρωση:** Όταν η BMD είναι χαμηλότερη από  $-2.5$  σταθερές αποκλίσεις από το μέσο όρο ατόμων νεαρής ηλικίας (T-score  $< -2.5$ ).



**Εγκατεστημένη οστεοπόρωση:** Άτομα με οστεοπόρωση που έχουν υποστεί ένα ή περισσότερα κατάγματα.

Ένα μέτρο αντιστοιχίας της οστικής πυκνότητας με τον κίνδυνο καταγμάτων μας δίνει η εξαιρετικά ενδιαφέρουσα παρατήρηση ότι για κάθε πτώση του BMD κατά μια σταθερή απόκλιση, αυξάνει κατά 2-3 φορές ο κίνδυνος εμφάνισης κατάγματος.<sup>4</sup>

Η οστεοπόρωση, και συγκεκριμένα η ιδιοπαθής και η μετεμμηνοπαυσιακή, αποτελεί την πιο συχνή μεταβολική διαταραχή των οστών. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, περίπου 30% των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών έχουν οστεοπόρωση, ενώ 54% παρουσιάζουν οστεοπενία.<sup>2</sup> Ακόμη, οι επιπτώσεις αυτής της νόσου που απορρέουν από την εμφάνιση καταγμάτων είναι εξαιρετικά σημαντικές για τους πάσχοντες, αφού τα κατάγματα προκαλούν πόνο, παραμόρφωση, δυσκολία στην κίνηση ή ακόμη και θάνατο (στα κατάγματα ισχίου η θνητότητα κατά το πρώτο εξάμηνο ανέρχεται σε 10-20%). Ο κίνδυνος εμφάνισης κατάγματος σε οποιοδήποτε σπονδυλικό σημείο, μέχρι το τέλος της ζωής, υπολογισμένος για την ηλικία των 50 ετών, ανέρχεται σε 40% για τις λευκές γυναίκες και 13% για τους λευκούς άνδρες. Η αντιμετώπιση των καταγμάτων πλήττει σοβαρά και την οικονομία των συστημάτων υγείας, αφού υπολογίζεται ότι υπέρογκα ποσά δαπανούνται για την περίθαλψη και αποκατάσταση των οστεοπορωτικών καταγμάτων. Παρόλον ότι αρκετά είναι γνωστά για την παθοφυσιολογία της ιδιοπαθούς και μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης και για τη λειτουργία των κυττάρων που λαμβάνουν μέρος στον οστικό μεταβολισμό, η σημαντική διακύμανση που παρατηρείται στην οστική πυκνότητα και στα κατάγματα, τόσο σε άτομα του ίδιου πληθυσμού, όσο και μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών αποτελεί αντικείμενο σύγχρονης εντατικής μελέτης. Η διερεύνηση της παθοφυσιολογίας της οστεοπόρωσης και των γενεσιουργών αιτιών της είναι κεφαλαιώδους σημασίας για την ανίχνευση προγνωστικών παραγόντων και την ανάπτυξη μεθόδων πρόληψης και διάγνωσης που θα εξαλείψουν το πρόβλημα.

### **Παράγοντες που επηρεάζουν τον οστικό μεταβολισμό**

Οι παράγοντες που επιδρώντας στον οστικό μεταβολισμό καθορίζουν την οστική πυκνότητα είναι πολλαπλοί και δρουν ανεξάρτητα ή σε αλληλεπίδραση μεταξύ τους (πίνακας 1). Μπορούν να διακριθούν σε τρεις κατηγορίες σε κληρονομικούς, περιβαλλοντικούς και ορμονικούς. Από μελέτες φαίνεται ότι και οι τρεις κατηγορίες παραγόντων είναι σημαντικές σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του ανθρωπίνου σκελετού.



## A). Παράγοντες που υπεισέρχονται στην απόκτηση της κορυφαίας οστικής μάζας

### 1) Φύλο

Προ της εφηβείας, η ανάπτυξη του σκελετού είναι ίδια στα κορίτσια και τα αγόρια. Κατά την έναρξη της εφηβείας, και με τις μεταβολές που συμβαίνουν στο ορμονικό περιβάλλον, αρχίζει να γίνεται εμφανής η διαφοροποίηση ανάμεσα στα δύο φύλα. Ο γυναικείος σκελετός αρχίζει να ωριμάζει κατά μέσο όρο 2 χρόνια νωρίτερα από τον άρρενα και ολοκληρώνει την ανάπτυξή του αντίστοιχα νωρίτερα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, ο ανδρικός σκελετός να τυγχάνει μεγαλύτερης διάρκειας ανάπτυξης, να αποκτά εξαιτίας αυτού μεγαλύτερο μέγεθος, και τελικά, λόγω διαστάσεων, να έχει αυξημένο περιεχόμενο αλάτων σε σχέση με τον γυναικείο και κατά αντιστοιχία και μεγαλύτερη οστική πυκνότητα, όταν αυτή εκφράζεται σε  $\text{gr}/\text{cm}^2$ . Αντίθετα, η αληθής τρισδιάστατη οστική πυκνότητα ( $\text{gr}/\text{cm}^3$ ) δεν διαφέρει ανάμεσα στα δύο φύλα κατά το πέρας της εφηβείας.<sup>5</sup>

Συμπερασματικά, η υψηλότερη οστική πυκνότητα που παρατηρείται στους άρρενες μπορεί σε μεγάλο βαθμό να αποδοθεί στη μεγαλύτερη σωματική τους μάζα σε σχέση με τις γυναίκες.

Επίσης θα πρέπει να τονιστεί ότι υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι τα οιστρογόνα, πέρα από τη συμβολή τους στην ανάπτυξη και ωρίμανση του θήλεος σκελετού, παίζουν καθοριστικό

### Πίνακας 1. Παράγοντες που επιδρούν στην οστική πυκνότητα

#### A. Παράγοντες που επηρεάζουν την απόκτηση της κορυφαίας οστικής μάζας

- ◆ Φύλο
- ◆ Φυλή
- ◆ Διατροφή και φυσική δραστηριότητα
- ◆ Γονίδια
- ◆ Ενδοκρινικές διαταραχές
- ◆ Συστηματικά νοσήματα κατά την ανάπτυξη

#### B. Παράγοντες που επηρεάζουν τη διατήρηση της οστικής πυκνότητας και τον οστικό μεταβολισμό

- ◆ Περιβάλλον
  1. Δίαιτα
  2. Άσκηση
  3. Αλκοόλ
  4. Καφεΐνη
  5. Κάπνισμα
- ◆ Ορμόνες
  1. Ανεπάρκεια στεροειδών του φύλου
  2. Γλυκοκορτικοειδή
  3. θυροξίνη
  4. Παραθορμόνη
- ◆ Γονίδια



ρόλο και στον ανδρικό σκελετό. Έτσι, σε περιγραφείσα περίπτωση δυσλειτουργίας του οιστρογονικού υποδοχέα σε άρρενα, παρατηρήθηκε μεγάλη καθυστέρηση σύγκλεισης των επιφύσεων και χαμηλή οστική πυκνότητα.

## 2) Φυλή

Έχει αποδειχτεί ότι υπάρχει φυλετική επίδραση στην απόκτηση της κορυφαίας οστικής μάζας. Η έγχρωμη φυλή έχει υψηλότερη τρισδιάστατη οστική πυκνότητα στην σπονδυλική στήλη σε σχέση με τη λευκή φυλή, ενώ το μέγεθος των σπονδύλων είναι ίδιο. Αντίθετα στα φλοιώδη οστά παρατηρείται ταυτόσημη οστική πυκνότητα και η υπεροχή των μαύρων ως προς την οστική αντοχή και την μικρότερη επίπτωση καταγμάτων στο ισχίο αποδίδεται σε διαφορετική οστική αρχιτεκτονική - όπως αυτή εντοπίστηκε στον αυχένα του μηριαίου.

## 3) Διατροφή και φυσική δραστηριότητα

Η ισορροπημένη διατροφή και η φυσική άσκηση είναι απαραίτητα στοιχεία για την ανάπτυξη του σκελετού. Έτσι μελέτες έχουν δείξει ότι η συμπληρωματική χορήγηση ασβεστίου κατά την εφηβεία οδηγεί σε αύξηση της οστικής μάζας. Το ίδιο επιτυγχάνεται και με την τακτική -όχι όμως και με την πολύ εντατική- άσκηση.

## 4) Κληρονομικότητα

Μελέτες σε διδύμους και σε οικογένειες παρέχουν ενδείξεις ότι γενετικοί παράγοντες διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην ρύθμιση της οστικής πυκνότητας για δεδομένο φύλο και φυλή. Η κληρονομικότητα στην οστική πυκνότητα υπολογίζεται από τις μελέτες σε διδύμους μεταξύ 50-85%.<sup>6</sup> Ισχυρή κληρονομικότητα προκύπτει και από μελέτες σε οικογένειες.<sup>7</sup> Η γενετική επίδραση είναι πιο εμφανής στους νεαρούς ενήλικες. Αυτή είναι η χρονική στιγμή στη ζωή του ατόμου κατά την οποία, μόλις έχει ολοκληρωθεί η απόκτηση της κορυφαίας οστικής μάζας, αλλά οι περιβαλλοντικές επιδράσεις δεν έχουν προλάβει να αμβλύνουν το γενετικό αποτέλεσμα. Η γενετική επίδραση παραμένει βέβαια αντιληπτή και σε μεγαλύτερες ηλικίες, οπότε με χρήση στατιστικών μοντέλων γίνεται προσαρμογή ως προς τους περιβαλλοντικούς παράγοντες.

## 5) Ενδοκρινικές διαταραχές

Ορμονικές διαταραχές κατά την περίοδο της ανάπτυξης όπως η ανεπάρκεια αυξητικής ορμόνης, διαταραχές της θυρεοειδικής λειτουργίας και ο αρρυθμιστος σακχαρώδης διαβήτης συνοδεύονται από ελαττωμένη κορυφαία οστική μάζα. Η σημαντικότερη όμως ενδοκρινική διαταραχή που συνδέεται με οστεοπενία είναι η ανεπάρκεια των ορμονών του φύλου.



### 6) Συστηματικές παθήσεις κατά την ανάπτυξη

Χρόνια νοσήματα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης είτε μέσω κλινοστατισμού, είτε λήψης φαρμακευτικής αγωγής όπως κορτικοστεροειδή, είτε δευτεροπαθών ενδοκρινικών διαταραχών είναι δυνατό να οδηγήσουν σε χαμηλότερη ΚΟΜ από την γενετικά προσδοκώμενη.

### B). Παράγοντες που υπεισέρχονται στον οστικό μεταβολισμό και διατήρηση της οστικής πυκνότητας μετά την εφηβεία

#### 1) Περιβάλλον

Η σωστή διατροφή και η φυσική άσκηση αποτελούν στοιχεία απαραίτητα όχι μόνο για την επίτευξη της μέγιστης δυνατής οστικής πυκνότητας, αλλά και για την διατήρησή της.

Η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ έχει επίσης θεωρηθεί αιτία χαμηλής οστικής πυκνότητας και αυξημένου κινδύνου καταγμάτων, κυρίως μέσω διατροφικών ενδειών ή ηπατοπάθειας.

Η κατανάλωση καφεΐνης και το κάπνισμα, έχουν συσχετιστεί με χαμηλή οστική πυκνότητα.

#### 2) Ορμόνες

Η ανεπάρκεια ορμονών του φύλου έχει απόλυτη συσχέτιση με την απώλεια οστικής μάζας. Ο υπογοναδισμός, σε οποιαδήποτε ηλικία και αν διαγνωστεί, οδηγεί σε οστεοπενία και τα δύο φύλα. Εν μέρει η παθογένεια της μετεμμηνόπαυσιακής οστεοπόρωσης έχει να κάνει με την ένδεια οιστρογόνων, ενώ η ορμονική θεραπεία υποκατάστασης αποτελεί σήμερα τον ακρογωνιαίο λίθο της αντιμετώπισής της.

#### 3) Γονίδια

Έχει υπολογιστεί από διάφορες μελέτες ότι περίπου το 60-80% των διακυμάνσεων της οστικής πυκνότητας σε ένα συγκεκριμένο πληθυσμό οφείλεται σε γενετικά αίτια. Ο καθορισμός της οστικής πυκνότητας έχει πολυγονιδιακή βάση, δηλαδή στην έκβαση του τελικού φαινοτύπου συμβάλλουν πολλαπλά γονίδια, συνεισφέροντας το καθένα κατά διαφορετικό ποσοστό. Εξάιρεση αποτελεί ένας μικρός αριθμός οστικών παθήσεων με μειωμένη ή αυξημένη οστική πυκνότητα, οι οποίες οφείλονται σε μετάλλαξη ενός μόνου γονιδίου. Παράδειγμα μονογονιδιακών παθήσεων με ελαττωμένη οστική πυκνότητα ή/και κακή οστική ποιότητα αποτελούν η ατελής οστεογένεση και η οστεοπόρωση λόγω απενεργοποιητικής μετάλλαξης στο γονίδιο της αρωματάσης ή του οιστρογονικού υποδοχέα τύπου α.



## ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΟΣΤΑ

Η οστική πυκνότητα αποτελεί ένα συνεχές «ποσοτικό» ή πολυγονιδιακό φαινοτυπικό χαρακτηριστικό. Αυτό σημαίνει ότι σε αντιδιαστολή με τα «ποιοτικά» ή μονογονιδιακά χαρακτηριστικά δεν κληρονομείται σύμφωνα με τον απλό Μεντέλαιο νόμο, όπου ένα μοναδικό γονίδιο είναι υπεύθυνο για τη μεταβίβαση του χαρακτηριστικού. Στην περίπτωση των ποσοτικών χαρακτηριστικών, στην εκδήλωση του φαινότυπου επιδρούν περισσότεροι παράγοντες, έτσι ώστε να αλληλοσυμπληρώνονται και να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους συνεισφέροντας ο καθένας σε μικρή κλίμακα στο φαινότυπο.

Τα χαρακτηριστικά των πολυγονιδιακών, ή αλλιώς «ποσοτικών», φαινοτύπων είναι τα εξής:

- Υπάρχει κατά κανόνα ταυτόχρονη συγκέντρωση πολλών παραγόντων που επηρεάζουν το γενετικό χαρακτηριστικό- πολλά γονίδια με ελάχισσα συνεισφορά.
- Υπάρχει συνεχής διακύμανση του φαινότυπου που οφείλεται σε μη γενετικές αιτίες (περιβάλλον – ορμόνες).

Έτσι, όσο περισσότερα γονίδια συνεισφέρουν τελικά στο φαινότυπο ασκώντας το καθένα μικρή επίδραση σε αυτόν, τόσο περισσότερες διαφορετικές τάξεις φαινοτύπων προκύπτουν με πολύ μικρές διαφορές μεταξύ τους, ώστε τελικά να μην είναι δυνατή η διάκριση ξεχωριστών φαινοτυπικών τάξεων. Τελικά, η κατανομή του φαινότυπου στους πληθυσμούς είναι συνεχής και παίρνει την μορφή της κωδωνοειδούς καμπύλης της κανονικής κατανομής. Σε αυτό βέβαια συνεισφέρουν και οι περιβαλλοντικές επιδράσεις οι οποίες επιτείνουν την φαινοτυπική διακύμανση.

Συμπερασματικά, η ειδοποιός διαφορά μεταξύ των μονογονιδιακών ή «ποιοτικών» και των πολυγονιδιακών ή «ποσοτικών» χαρακτηριστικών έγκειται στο μέγεθος των γενετικών επιδράσεων (ένα γονίδιο με καθοριστική επίδραση στα μονογονιδιακά χαρακτηριστικά, έναντι περισσότερων με περιορισμένη επίδραση στα πολυγονιδιακά) σε συνάρτηση πάντα με την επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων.

### Γνωρίσματα των πολυγονιδιακών χαρακτηριστικών

- Έχουν συνεχή κατανομή
- Ελέγχονται από πολλά γονίδια με μικρή επίδραση το καθένα
- Η έκφρασή τους εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από περιβαλλοντικούς παράγοντες
- Η κληρονομικότητα είναι πολύπλοκη

Σε ένα πληθυσμό που αναπαράγεται τυχαία, ο φαινότυπος θα έχει συνεχή διακύμανση ανάμεσα στα ακραία όρια του πληθυσμού. Η μετρούμενη φαινοτυπική παράμετρος θα έχει πάντα ένα γενετικό και ένα περιβαλλοντικό συστατικό και πιθανώς και την αλληλεπίδραση μεταξύ περιβάλλοντος και γονοτύπου.



Η επίδραση καθενός γονιδίου που συμβάλλει στο φαινότυπο εκδηλώνεται μέσω διαφορετικών τύπων γονιδιακής δράσης, όπως π.χ. επιπρόσθετο, επικρατούντα, με επίσταση και υπερεπικρατούντα.

Το κοινό σημείο των μεθόδων που χρησιμοποιούνται σήμερα για την ανεύρεση του γενετικού υποστρώματος μιας αποδεδειγμένα κληρονομούμενης αλλά κατά τα φαινόμενα πολυγονιδιακής κλινικής οντότητας, όπως είναι στη συγκεκριμένη περίπτωση η οστική πυκνότητα, είναι η αναζήτηση συσχετίσεων μεταξύ ενός φαινοτυπικού χαρακτηριστικού και μιας σειράς πολυμορφικών γενετικών δεικτών. Το φαινοτυπικό χαρακτηριστικό μπορεί να είναι είτε μια συνεχής μεταβλητή, όπως ακριβώς η BMD, είτε μια ποιοτική μεταβλητή, όπως το κάταγμα.

Οι γενικές κατευθύνσεις που χρησιμοποιούνται σήμερα για τη γενετική προσέγγιση κληρονομούμενων χαρακτηριστικών συνοψίζονται παρακάτω. Σε γενικές γραμμές, υπάρχουν τέσσερις κύριες κατηγορίες πληθυσμών μελέτης από όπου μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για τη σχέση ενός γονιδίου με ένα φαινότυπο: τα ζευγάρια διδύμων, τα μέλη οικογενειών, πληθυσμοί όπου το χαρακτηριστικό υπάρχει σε κάποια άτομα ενώ σε άλλα όχι, και τέλος τα πειραματόζωα.

#### ♦ *Μελέτη γενετικής σύνδεσης (Linkage analysis)*

##### *α) Μελέτη γενετικής σύνδεσης (linkage analysis) σε οικογενειακό δέντρο*

Σε αυτήν την περίπτωση απομονώνεται μια οικογένεια της οποίας κάποια μέλη φέρουν ένα συγκεκριμένο φαινότυπο. Γίνεται στη συνέχεια έλεγχος του γονιδιώματος για περιοχές με κοινή κληρονομικότητα στους πάσχοντες σε σχέση με τα υγιή μέλη της οικογένειας. Από την έρευνα αυτή προκύπτει κάποιο υποψήφιο γονίδιο -ή κάποια ευρύτερη χρωμοσωμική περιοχή- που είναι αποκλειστικά υπεύθυνο ή συμβάλλει στην έκφανση του συγκεκριμένου φαινοτύπου. Αυτή η μέθοδος είναι αποτελεσματικότερη για την απομόνωση σπανίων, συνήθως μονογονιδιακών, μεταλλάξεων που έχουν δραματική επίδραση στο φαινότυπο.

##### *β) Μελέτη ύπαρξης κοινών αλληλομόρφων σε ζευγάρια αδερφών (allele sharing in sib-pairs)*

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη διδύμων. Σε αυτές τις ομάδες μελέτης είναι σημαντικό το γεγονός ότι οι εξεταζόμενοι έχουν ίδια ηλικία, έχουν μοιραστεί το ίδιο ενδομήτριο περιβάλλον και πιθανά να μοιράζονται και τις ίδιες συνήθειες και περιβαλλοντικές επιδράσεις. Έτσι ελαχιστοποιείται η επίδραση εξωγενών παραγόντων που παρεμβάλλονται στη γενετική μελέτη. Με το σκεπτικό ότι οι μονοωγενείς δίδυμοι έχουν κοινό το 100% του γενετικού τους κώδικα ενώ οι διωγενείς μόνο το 50% εξετάζεται η πιθανή κληρονομικότητα ενός φαινοτύπου, με βάση την υπόθεση ότι οι μονοωγενείς δίδυμοι καθώς και οι διωγενείς που φέρουν ακριβώς τον ίδιο γονότυπο για το υποψήφιο γονίδιο που εξετάζεται θα μοιάζουν φαινοτυπικά μεταξύ τους πολύ περισσότερο από ότι οι διωγενείς δίδυμοι που έχουν διαφορετικό γονότυπο για το μελετούμενο γονίδιο.





◆ **Μελέτη υποψηφίων γονιδίων (candidate gene studies)**

Αποτελεί τον αντίποδα της ανάλυσης γενετικής σύνδεσης, αφού σύμφωνα με αυτή, η μελέτη επικεντρώνεται σε ένα γονίδιο, για το οποίο διατυπώνεται η υπόθεση ότι, λόγω της λειτουργίας του, πιθανά συμβάλλει σε συγκεκριμένο φαινότυπο. Αναζητείται, λοιπόν, η σχέση συγκεκριμένου πολυμορφισμού με το φαινότυπο σε δεδομένο πληθυσμό, είτε με σύγκριση της συχνότητας του μειονεκτικού αλληλομόρφου στα «προσβεβλημένα» άτομα σε σχέση με τα «υγιή», ή, όταν η μελέτη αφορά συνεχείς παραμέτρους και όχι ποιοτικά χαρακτηριστικά, με σύγκρισή τους στις ομάδες γονοτύπων που προκύπτουν από τη γενετική ανάλυση.

Είναι προφανές ότι οι δύο μέθοδοι ακολουθούν αντίστροφη πορεία. Κατά τη μελέτη γενετικής σύνδεσης ακολουθείται πορεία «από πάνω προς τα κάτω» -από φαινότυπο προς DNA- και με αφητηρία ένα κοινό φαινότυπο σε μέλη οικογενειών, γίνεται προσπάθεια να εντοπιστεί στο DNA περιορισμένο σημείο που να συνδέεται με τον αντίστοιχο φαινότυπο. Αντίθετα, στη μελέτη των υποψηφίων γονιδίων ακολουθείται ανάστροφη πορεία «από κάτω προς τα πάνω» -από γονίδιο προς φαινότυπο- και γίνεται απόπειρα συσχέτισης ενός πολύ συγκεκριμένου μελετούμενου γονιδίου με αντίστοιχο φαινότυπο σε πληθυσμιακές ομάδες. Με τον δεύτερο τρόπο προσεγγίζονται καλύτερα συχνές γονιδιακές μεταλλάξεις οι οποίες δεν έχουν καταλυτικές συνέπειες σε όποιον τις φέρει, αλλά αντιθέτως έχουν μικρή επίδραση και συνεργούν με άλλα γονίδια για την εμφάνιση πολυγονιδιακών νόσων.

◆ **Πειραματικές διασταυρώσεις ζώων (experimental crosses in animals)**

Σε αυτή την περίπτωση ξεκινά πειραματική διασταύρωση μεταξύ ζώων που φέρουν ένα φαινότυπο (πχ χαμηλή οστική πυκνότητα) με άλλα, διαφορετικά ως προς τον μελετούμενο φαινότυπο. Στις γενιές που ακολουθούν, εφαρμόζονται οι μέθοδοι προσέγγισης που περιγράφονται παραπάνω και εξάγονται αντίστοιχα συμπεράσματα. Στην πλειοψηφία των πειραμάτων που αφορούν την οστική πυκνότητα χρησιμοποιούνται ποντίκια.

Η προσέγγιση της γενετικής μελέτης ενός φαινοτύπου μπορεί να περιλαμβάνει είτε

- A) τη μελέτη ολόκληρου του γονιδιώματος, με τη χρησιμοποίηση ενός μεγάλου αριθμού γενετικών δεικτών διάσπαρτων στο γονιδίωμα (**genome search**), είτε
- B) τη μελέτη συγκεκριμένων περιοχών για τις οποίες υπάρχει ένδειξη ότι σχετίζονται με το φαινότυπο (**candidate loci**), ή τέλος
- Γ) συγκεκριμένα γονίδια που λόγω της λειτουργίας τους θα ήταν λογικό να ενέχονται στην διαμόρφωση του φαινοτύπου (**candidate genes**).

Η μελέτη των γενετικών δεικτών γίνεται με μοριακές τεχνικές σε πολυμορφικές περιοχές γενομικού DNA που εξάγεται από λευκά αιμοσφαίρια περιφερικού αίματος. Πριν μελετηθούν, οι



συγκεκριμένες περιοχές πολλαπλασιάζονται εκλεκτικά με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Οι γενετικοί δείκτες διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες: πολυμορφισμοί με διαφορετικού μεγέθους επαναλαμβανόμενα τμήματα (Variable Number Tandem Repeat Polymorphisms- VNTR) και πολυμορφισμοί ενός μόνου νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphisms- SNP).

### Γενετική προσέγγιση της οστικής πυκνότητας

Η οστική πυκνότητα, η διαμόρφωση της μικρο-αρχιτεκτονικής των οστών και η επέλευση οστεοπόρωσης έχουν πολυγονιδιακή γενετική βάση. Έτσι, αντί της υπάρξεως ενός μόνου γονιδίου που θα καθόριζε αποκλειστικά τον οστικό φαινότυπο, ένας αριθμός γονιδίων συμβάλλουν με διαφορετικό τρόπο και σε διαφορετικό βαθμό το καθένα για την εκδήλωση του συγκεκριμένου φαινοτύπου. Επιπλέον, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι υπάρχουν αλληλεπιδράσεις των διαφόρων γονιδίων τόσο μεταξύ τους, όσο και με το περιβάλλον. Καθίσταται λοιπόν σαφές ότι η γενετική μελέτη της οστικής πυκνότητας δεν αποτελεί εύκολη υπόθεση, αλλά σύνθετο και πολύπλευρο πρόβλημα.

Στον άνθρωπο η μελέτη της γενετικής βάσης της οστικής πυκνότητας πραγματοποιείται με 2 τρόπους προσέγγισης:

- ◆ Οι μελέτες γενετικής σύνδεσης οι οποίες υπέδειξαν κάποιες περιοχές χρωμοσωμάτων που πιθανά παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στη διαμόρφωση της οστικής πυκνότητας αφού άλλοτε συνδέονται με οστεοπόρωση και άλλοτε με υψηλή οστική πυκνότητα. Τέτοιες περιοχές είναι οι εξής:
  1. 11q12-13, η οποία συνδέθηκε με οστεοπέτρωση<sup>8-11</sup>
  2. 1p36, 2p23-24, 4q32-34<sup>12</sup>
  3. 1q21-23, 5q33-35, 6p11-12<sup>13</sup>
  4. 2p21, 13q24<sup>14</sup>
  5. Περιοχή κωδικοποίησης του υποδοχέα παραθορμόνης τύπου 1<sup>15</sup>
- ◆ Οι μελέτες υποψηφίων γονιδίων επικεντρώθηκαν σε γονίδια τα οποία λογικά, εξαιτίας της λειτουργίας τους, αποτελούν βασικούς ρυθμιστές του οστικού μεταβολισμού. Τέτοια είναι γονίδια τα οποία ελέγχουν τη διαχείριση ασβεστίου, την ωρίμανση του σκελετού και την απόκτηση της κορυφαίας οστικής πυκνότητας, την έκφραση δομικών πρωτεϊνών των οστών, και τέλος, την οστική απορρόφηση και επαναδόμηση (πίνακας 2).

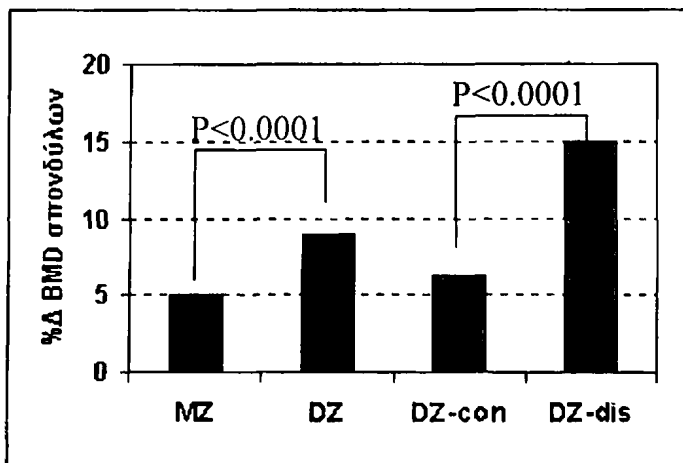


## 1. Υποδοχέας βιταμίνης D (Vitamin D Receptor, VDR)

Ο υποδοχέας της βιταμίνης D είναι ενδοκυττάριο πολυπεπίδιο 50-60 kD που συνδέει ειδικά την  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  και δρα στους πυρήνες των κυττάρων στόχων, ώστε να προαχθεί μια σειρά βιολογικών δράσεων. Ανήκει στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων, μέλη της οποίας είναι και οι υποδοχείς των κορτικοστεροειδών, των στεροειδών του φύλου (οιστρογόνων και ανδρογόνων), του ρετινοϊκού οξέος και των θυρεοειδικών ορμονών. Με τους τελευταίους δε, φαίνεται ότι έχει μεγαλύτερη συγγένεια. Το γονίδιο του υποδοχέα της βιταμίνης D είναι το πρώτο στο οποίο επικεντρώθηκε η έρευνα της γενετικής βάσης του οστικού μεταβολισμού.

Το 1992 περιγράφηκε συσχέτιση ενός πολυμορφισμού στο ιντρόνιο 8 του γονιδίου VDR (πολυμορφισμός *Bsm I*) με τα επίπεδα οστεοκαλσίνης ορού –και κατ' επέκταση το ρυθμό οστικού

**Εικόνα 1.** BMD οσφυϊκών σπονδύλων σε ζευγάρια διδύμων σε σχέση με τη μονο- (MZ) και δι-ζυγωτία (DZ) και την συμφωνία προς τα VDR αλληλόμορφα (Morrison et al. Nature 1994; 367:284-7).  
DZ-con/ DZ-dis =διζυγώτες με συμφωνία/ ασυμφωνία ως προς τον VDR γονότυπο

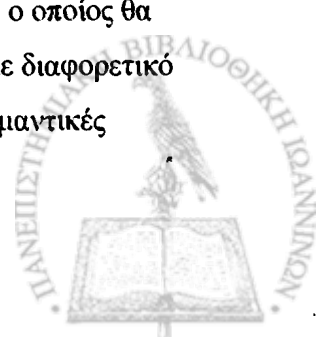


μεταβολισμού,<sup>16</sup> ενώ δύο χρόνια αργότερα ο ίδιος πολυμορφισμός συσχετίστηκε άμεσα με την οστική πυκνότητα.<sup>17</sup> Σε αυτή την μελέτη, εφαρμόστηκε η τεχνική των υποψηφίων γονιδίων σε ζευγάρια διδύμων.

Οι μελέτες διδύμων παρέχουν μια χρήσιμη μέθοδο για ανάλυση της φαινοτυπικής διακύμανσης στα γενετικά και περιβαλλοντικά συστατικά της. Το μοντέλο διδύμων υποθέτει ότι η διακύμανση ενός φαινοτύπου μεταξύ των διωογενών διδύμων αποδίδεται τόσο σε περιβαλλοντικούς όσο και σε γενετικούς παράγοντες (αφού έχουν κοινό μόνο το 50% του γενετικού τους υλικού), ενώ οι φαινοτυπικές διαφορές στα ζευγάρια των

μονοωογενών διδύμων αντανακλούν αποκλειστικά περιβαλλοντικές επιδράσεις, αφού αυτά τα άτομα είναι γενετικώς όμοια (έχουν κοινό το 100% του γενετικού τους υλικού). Η διαπίστωση ότι οι διαφορές που υπάρχουν σε ένα φαινότυπο μεταξύ διωογενών ζευγαριών είναι σημαντικά μεγαλύτερες από αυτές των μονοωογενών, παρέχει απόδειξη ότι υπάρχει γενετική επίδραση στην έκφραση του μελετούμενου φαινοτύπου.

Κατ' επέκταση, κατά τη μελέτη της συμβολής ενός συγκεκριμένου υποψηφίου γονιδίου σε συγκεκριμένο φαινότυπο, λογικά αναμένεται η ομάδα των διωογενών διδύμων με τον ίδιο γονότυπο για το μελετούμενο γονίδιο να έχει μικρές διαφορές στην έκφραση του φαινοτύπου, ο οποίος θα πλησιάζει αυτόν των μονοωογενών διδύμων, ενώ αντιθέτως οι διωογενείς δίδυμοι με διαφορετικό γονότυπο για το μελετούμενο γονίδιο να έχουν μεταξύ τους μεγαλύτερες και πιο σημαντικές φαινοτυπικές διαφορές.



Οι πρώτες μελέτες σε ζευγάρια διδύμων, που είχαν αντικείμενο την επίδραση του γονιδίου VDR στον οστικό μεταβολισμό και την οστική πυκνότητα, έγιναν σε ιθαγενείς της Αυστραλίας και επιβεβαίωσαν την υπόθεση: η ομάδα των διωγενών διδύμων με τον ίδιο γονότυπο για τον πολυμορφισμό *Bsm I* του γονιδίου VDR είχε μικρές διαφορές στη BMD που ήταν ανάλογες αυτών που παρατηρούνταν στους μονοωγενείς. Αντίθετα, οι διωγενείς δίδυμοι με διαφορετικό VDR γονότυπο είχαν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικές διαφορές, με τον bb γονότυπο να συνδέεται με υψηλότερη BMD από ότι ο BB (εικόνα 1).

Πέρα από τον πολυμορφισμό *Bsm I* στο ιντρόνιο 8, που είναι πολυμορφισμός περιορισμού μήκους θραύσματος (RFLP), στην ίδια περιοχή του γονιδίου –ιντρόνιο 8/εξόνιο 9- και σε μικρή απόσταση από το *Bsm I*, υπάρχουν και άλλα δύο πολυμορφικά σημεία RFLPs που ανιχνεύονται με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *Apa I* και *Taq I*. Οι τρεις αυτοί πολυμορφισμοί βρίσκονται σε στενή γειτνίαση μεταξύ τους και κατά συνέπεια όπως αποδείχτηκε στους μελετούμενους πληθυσμούς βρίσκονται σε ανισοκατανομή σύνδεσης, με συχνότερους απλοτύπους baT και BaT. Έτσι, ουσιαστικά η μελέτη ενός από τους τρεις, με σχετική ασφάλεια συνεπάγεται γνώση για την επίδραση και των άλλων δύο.

Με βάση τις έντονες ενδείξεις για την επίδραση συγκεκριμένων γενετικών παραγόντων στον καθορισμό της οστικής πυκνότητας, η έρευνα στράφηκε στη ανίχνευση διαφορών νωρίς στη ζωή των ατόμων όταν η πιθανότητα επίδρασης περιβαλλοντικών παραγόντων ή παρεμβαλλόμενων καταστάσεων όπως η εμμηνόπαυση ήταν μικρή.

Μια μελέτη στις Ηνωμένες Πολιτείες, που συμπεριελάμβανε 100 κορίτσια προεφηβικής ηλικίας, μεξικανικής καταγωγής, έδειξε ότι ο πολυμορφισμός *Bsm I* αποτελεί προγνωστικό παράγοντα της οστικής πυκνότητας σπονδύλων και ισχίου, τουλάχιστον στη συγκεκριμένη πληθυσμιακή ομάδα.<sup>18</sup> Σε μικτό πληθυσμό 83 λευκών και 72 εγχρώμων γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας υπήρχε επίσης φανερή επίδραση του VDR πολυμορφισμού τόσο στην σπονδυλική στήλη όσο και στα ισχία.<sup>19</sup> Ωστόσο, μελέτες άλλων πληθυσμών προεμμηνόπαυσιακών γυναικών στην Γαλλία<sup>20</sup> και στην Κίνα<sup>21</sup> δεν επιβεβαίωσαν τις παραπάνω συσχετίσεις. Ακόμη, μελέτη που διεξήχθη στην Αμερική, σε 125 ζευγάρια διδύμων, ένας σημαντικός αριθμός των οποίων ήταν σε αναπαραγωγική ηλικία ( 63 ζεύγη προεμμηνόπαυσιακά και 43 ζεύγη μετεμμηνόπαυσιακά) είχε επίσης αρνητικά αποτελέσματα.<sup>22</sup>

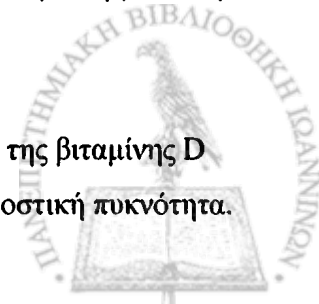
Από την άλλη πλευρά υπάρχει μια πληθώρα μελετών που αναφέρονται σε πληθυσμούς μετεμμηνόπαυσιακών γυναικών ή γυναικών με ήδη εγκατεστημένη οστεοπόρωση και κλινική εκδήλωση καταγμάτων. Έτσι, στο Ηνωμένο Βασίλειο διεξήχθη μελέτη που περιελάμβανε 182 ζευγάρια διδύμων (95 διζυγωτικά και 87 μονοζυγωτικά) σε εμμηνόπαυση, στην οποία ο σχεδιασμός και τα συμπεράσματα ήταν παρόμοια με την αρχική μελέτη των Morrison και συν.<sup>17</sup> από την Αυστραλία.<sup>23</sup> Επίσης, σε 192 οστεοπορωτικούς ασθενείς και 207 υγιείς μάρτυρες που μελετήθηκαν στη Δανία, ο γονότυπος bb συνδέθηκε με υψηλότερη οστική πυκνότητα στο ισχίο, ενώ ο BB παρουσιαζόταν με οριακά αυξημένη συχνότητα στους ασθενείς με οστεοπορωτικά κατάγματα.<sup>24</sup>

Ωστόσο, ήταν αρκετά μεγάλος και ο αριθμός των μελετών που δεν επιβεβαίωσαν τις αρχικές παρατηρήσεις στη συγκεκριμένη ηλικιακή ομάδα καθώς και σε σειρές ατόμων με οστεοπόρωση. Έτσι στο σύνολο 807 ηλικιωμένων γυναικών από το Βέλγιο, δεν βρέθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού *Bsm I* με την οστική πυκνότητα τόσο του ισχίου, όσο και της σπονδυλικής στήλης.<sup>25</sup> Ενδιαφέρον, στην ίδια μελέτη, παρουσίασε η ύπαρξη αλληλεπίδρασης μεταξύ του πολυμορφισμού και του σωματικού βάρους στην έκφραση της οστικής πυκνότητας του ισχίου, ώστε ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός να έχει σημαντική επίδραση μόνο στις παχύσαρκες ασθενείς και όχι στις λεπτώσμες. Αδυναμία ανεύρεσης γονοτυπικής επίδρασης χαρακτήρισε επίσης μελέτες από την Κορέα,<sup>26</sup> την Καλιφόρνια,<sup>27</sup> τη Δανία,<sup>28</sup> τη Φιλανδία,<sup>29</sup> και τέλος μια μελέτη που συμπεριέλαβε τρεις διαφορετικές πληθυσμιακές ομάδες προερχόμενες από την νότια, ανατολική και δυτική Ευρώπη.<sup>30</sup>

Ένας άλλος χρήσιμος δείκτης όσον αφορά στον οστικό μεταβολισμό και στην πιθανότητα ανάπτυξης οστεοπόρωσης είναι ο ρυθμός οστικής απώλειας. Υπάρχουν μελέτες οι οποίες επιχείρησαν να συσχετίσουν το ρυθμό οστικής απώλειας με τους VDR πολυμορφισμούς. Έτσι, ο μειονεκτικός γονότυπος BB συνδέεται με αυξημένο ρυθμό οστικής απώλειας τόσο στο ισχίο, όσο και στη σπονδυλική στήλη, σε 229 μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες λευκής φυλής στις Ηνωμένες Πολιτείες, που παρακολούθηθηκαν επί 2 έτη.<sup>31</sup> Στην ίδια διαπίστωση, αποκλειστικά για την σπονδυλική στήλη, κατέληξε μελέτη 72 ηλικιωμένων ατόμων στην Ελβετία.<sup>32</sup> Ωστόσο, μεγαλύτερη βρετανική μελέτη που αφορούσε 296 γυναίκες που μελετήθηκαν σύντομα μετά την εμμηνόπαυση –όταν οι ρυθμοί της οστικής απώλειας λόγω της οιστρογονικής ανεπάρκειας είναι μεγαλύτεροι και οι διαφορές ανάμεσα στους γονοτύπους πιο εύκολα αναγνωρίσιμες- δεν επιβεβαίωσε τα προηγούμενα ευρήματα.<sup>33</sup> Ακόμη, συσχέτιση δεν βρέθηκε ούτε σε ομάδα 200 γυναικών από τη Δανία, στις οποίες η παρακολούθηση ξεκίνησε άμεσα μετά την εμμηνόπαυση και διήρκεσε για 2 έτη.<sup>34</sup>

Σε δύο μελέτες που διεξήχθησαν στην Ολλανδία και τη Σκωτία για τον *Bsm I* πολυμορφισμό του γονιδίου VDR, προέκυψαν συσχετισμοί με ακριβώς αντίθετα συμπεράσματα από την αρχική διαπίστωση: δηλαδή ο ευνοϊκός γονότυπος bb φάνηκε να σχετίζεται με σημαντικά χαμηλότερη οστική πυκνότητα από τον BB που στις υπόλοιπες μελέτες, συμπεριλαμβανομένης και της αρχικής των Morrison και συν., θεωρούνταν μειονεκτικός.<sup>35-36</sup> Αυτά τα αποτελέσματα παρείχαν μια ένδειξη υπέρ της θεωρίας ότι ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός δεν είναι ο πραγματικά υπεύθυνος για τον έλεγχο της οστικής πυκνότητας, αλλά τα πολυμορφικά σημεία του εξονίου 8/ιντρονίου 9 βρίσκονται σε ανισοκατανομή σύνδεσης με κάποιο άλλο σημείο του γονιδίου, πραγματικά υπεύθυνο για τη γενετική επίδραση, αλλά προς το παρόν άγνωστο.

Οι μελέτες που συνδέουν τους πολυμορφισμούς του γονιδίου του υποδοχέα της βιταμίνης D με τα οστικά κατάγματα είναι πολύ λιγότερες από αυτές που επικεντρώνονται στην οστική πυκνότητα.



Θετική συσχέτιση μεταξύ του BB γονοτύπου και της επίπτωσης των καταγμάτων ισχίου βρέθηκε σε σειρά γυναικών, που προερχόταν από την μεγάλη επιδημιολογική μελέτη Nurses' Health Study.<sup>37</sup> Σε 1004 μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες από την Ολλανδία, όπου μελετήθηκαν και οι τρεις πολυμορφισμοί του VDR που βρίσκονται στην περιοχή μεταξύ ιντρονίου 8 και εξονίου 9, ο απλότυπος "baT" υπήρχε σε αυξημένη συχνότητα στις περιπτώσεις επιπολαζόντων και νέων καταγμάτων.<sup>38</sup> Ας σημειωθεί βέβαια ότι στο συγκεκριμένο πληθυσμό, όπως συνέβει και με τη μελέτη της οστικής πυκνότητας,<sup>35</sup> μειονεκτικός αποδείχτηκε ο baT γονότυπος, ο οποίος στην πλειοψηφία των μελετούμενων πληθυσμών ήταν ο πλεονεκτικός.

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν δύο ακόμη μελέτες, οι οποίες επιχείρησαν να συσχετίσουν τη συχνότητα του μειονεκτικού γονοτύπου του πολυμορφισμού *Bsm I* με την συχνότητα οστεοπόρωσης/οστεοπορωτικών καταγμάτων σε διαφορετικούς πληθυσμούς.<sup>39-40</sup> Στην πρώτη μελέτη διαπιστώθηκε ότι ο γονότυπος bb, που συνοδεύεται από υψηλότερη οστική πυκνότητα από τον BB σε προηγούμενες μελέτες, ήταν σημαντικά συχνότερος στην Κίνα και στην Γκάμπια όπου και τα οστεοπορωτικά κατάγματα είναι σπάνια, σε σχέση με την Αγγλία, όπου ο επιπολασμός των οστεοπορωτικών καταγμάτων ήταν μεγαλύτερος. Στη δεύτερη μελέτη, βρέθηκε ότι υπάρχει σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ της συχνότητας του πλεονεκτούντος VDR γονοτύπου και της επίπτωσης καταγμάτων ισχίου, σε διάφορους πληθυσμούς όπως Ηνωμένες Πολιτείες/ Ηνωμένο Βασίλειο/ Αυστραλία, Σκανδιναβία, Ασία και Αφρική.

Ωστόσο, εκτεταμένη μελέτη που διεξήχθη σε πληθυσμό 9704 γυναικών μεγάλης ηλικίας (>65 έτη), προερχόμενο από τέσσερις περιοχές των Ηνωμένων Πολιτειών, δεν ανέδειξε καμμία συσχέτιση της επίπτωσης καταγμάτων με τους πολυμορφισμούς *Apa I* και *Taq I* του γονιδίου VDR.<sup>41</sup> Έλλειψη συσχέτισης των VDR γονοτύπων με τα κατάγματα χαρακτήρισε και άλλες δύο μελέτες από τη Σκωτία<sup>36</sup> και τη Νορβηγία.<sup>42</sup>

Πέρα από την έρευνα στο ιντρόνιο 8, η προσοχή επικεντρώθηκε λίγο αργότερα και στο εξόνιο 2 του γονιδίου του υποδοχέα της βιταμίνης D, όπου ένας πολυμορφισμός (*Fok I*), που συνίσταται σε αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου C→T, εισήγαγε ένα πρωιμότερο κωδικό έναρξης μετάφρασης ATG, δίνοντας τελικά μία πρωτεΐνη μακρύτερη κατά τρία αμινοξέα. Αυτός ο πολυμορφισμός με τη σειρά του φάνηκε να συμβάλλει στον καθορισμό της οστικής πυκνότητας σε ορισμένους πληθυσμούς. Μεταξύ 100 μετεμμηνοπαυσιακών Αμερικανίδων μεξικάνικης καταγωγής, αυτές που έφεραν το γονότυπο που προκαλεί επιμήκυνση της πρωτεΐνης του υποδοχέα (ff) είχαν σημαντικά χαμηλότερη σπονδυλική οστική πυκνότητα από τις υπόλοιπες (ομόζυγες χωρίς το πρώτο κωδικό έναρξης, FF και ετερόζυγες, Ff), ενώ κατά τη διάρκεια τρίχρονης παρακολούθησης διαπιστώθηκε ότι οι ίδιες γυναίκες είχαν αυξημένο ρυθμό οστικής απώλειας στο ισχίο, χωρίς όμως να παρουσιάζονται διαφορές στους δείκτες οστικού μεταβολισμού.<sup>43</sup> Μελέτη σε ιταλικό πληθυσμό που αποτελούσαν από 400 μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες ο πολυμορφισμός *Fok I* σχετιζόταν με την οστική πυκνότητα της οσφυϊκής μοίρας της σπονδυλικής στήλης στην υποομάδα των γυναικών που βρίσκονταν σε περίοδο

άμεσα μετά την εμμηνόπαυση (<5 έτη) καθώς και σε μικρότερης ηλικίας γυναίκες (<60 έτη), ενώ αυτή η σχέση εξαλειφόταν σε μεγαλύτερες ηλικίες.<sup>44</sup> Στην ίδια μελέτη υπήρξε αυξημένη συχνότητα του μειονεκτικού γονοτύπου ff, στην υποομάδα ασθενών με σπονδυλικά κατάγματα.

Στην Ιαπωνία μελετήθηκαν 110 υγιείς γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας και ο ίδιος γονότυπος (ff) φάνηκε να σχετίζεται με σημαντικά χαμηλότερη σπονδυλική οστική πυκνότητα.<sup>45</sup>

Ο πολυμορφισμός στο εξόνιο 2 μπορούσε να γίνει πιο εύκολα αποδεκτός ως αιτιολογικός παράγοντας, γιατί προσέφερε μια ευκατανόητη παθοφυσιολογική εξήγηση: η μακρύτερη πρωτεΐνη του υποδοχέα που προέκυπτε από τη μετάλλαξη, μέσω διαφορετικής διαμόρφωσης της πρωτεΐνης στο χώρο, θα επηρέαζε τη σύνδεση στον υποδοχέα των συνδετών του.<sup>18,43,46</sup>

Υπήρξαν, ωστόσο, και πάλι πληθυσμιακές μελέτες στις οποίες ο πολυμορφισμός *Fok I* δεν φάνηκε να σχετίζεται με την οστική πυκνότητα και με δείκτες οστικού μεταβολισμού. Έτσι, σε 174 γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας γαλλικής καταγωγής δεν υπήρξε συσχέτιση του *Fok I* με την οστική πυκνότητα τόσο της σπονδυλικής στήλης όσο και του ισχίου.<sup>47</sup> Η ίδια διαπίστωση έγινε και σε 101 προεμμηνόπαυσιακές γυναίκες από την Ταϊβάν.<sup>48</sup> Απουσία συσχέτισης της οστικής πυκνότητας σπονδύλων και ισχίου με τον *Fok I* χαρακτήρισε και τρίτη μελέτη, που διεξήχθη στην Ελβετία, και στην οποία συμμετείχαν 177 γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας και 155 προεφηβικά κορίτσια.<sup>49</sup>

Η μελέτη των παραπάνω περιγραφέντων πολυμορφισμών ενός μόνου νουκλεοτιδίου (SNPs) σε διαφορετικούς πληθυσμούς, έδωσε αντιφατικά αποτελέσματα, όσον αφορά τη επίδρασή τους στην οστική πυκνότητα, στην εμφάνιση οστεοπόρωσης και στο ρυθμό οστικής απώλειας. Μια μελέτη που έγινε σε υποομάδα πληθυσμού προερχόμενου από την αρχική σειρά της μελέτης Framingham βασίστηκε στη μέθοδο της γενετικής σύνδεσης και επιχείρησε να εξετάσει το γονίδιο VDR στο σύνολό του, επικεντρώνοντας στην περιοχή του χρωμοσώματος 12 που το περιλαμβάνει ολόκληρο. Σε αυτή συμμετείχαν 1062 άτομα προερχόμενα από 332 οικογένειες. Η μελέτη αυτή δεν εντόπισε καμιά απολύτως συσχέτιση της συγκεκριμένης χρωμοσωμικής περιοχής με την οστική πυκνότητα.<sup>50</sup>

### **Μετα-αναλύσεις για τη διερεύνηση της επίδρασης των πολυμορφισμών του γονιδίου VDR στην οστική πυκνότητα**

Η πληθώρα των μελετών που δημοσιεύτηκαν για την επίδραση των πολυμορφισμών του VDR στον οστικό μεταβολισμό, καθώς και τα αντικρουόμενα ευρήματα που προέκυπταν σε διαφορετικούς πληθυσμούς μελέτης και διαφορετικές εθνικότητες, οδήγησε στη διεξαγωγή δύο μετα-αναλύσεων σε μια απόπειρα να ξεκαθαριστεί ο ρόλος των μελετηθέντων πολυμορφισμών του γονιδίου VDR στη διαμόρφωση της οστικής πυκνότητας. Έτσι, συγκεντρώνοντας και ομαδοποιώντας όλα τα ευρήματα, επιχειρήθηκε να διαμορφωθεί μια συνολική άποψη για την επίδραση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού. Στην πρώτη μετα-ανάλυση,<sup>51</sup> η οποία συμπεριέλαβε 16 μελέτες, οι συσχετίσεις που

βρέθηκαν ήταν πολύ ασθενείς και έπαυαν να είναι σημαντικές με τον αποκλεισμό της πρώτης και πιο εντυπωσιακής μελέτης των Morrison και συν., η οποία, όπως αργότερα αποδείχτηκε, είχε προβλήματα στον καθορισμό των γονοτύπων.

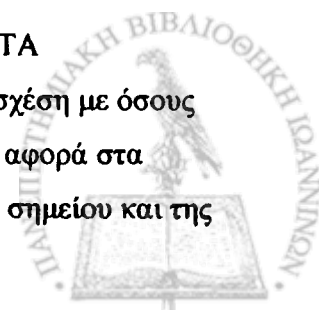
Η δεύτερη μετα-ανάλυση<sup>52</sup> συμπεριέλαβε 75 εργασίες στις οποίες μελετήθηκε οποιοσδήποτε από τους 4 περιγραφηθέντες πολυμορφισμούς του γονιδίου VDR τόσο στο εξόνιο 2 (*Fok I*), όσο και στην 3' περιοχή του γονιδίου μεταξύ ιντρονίου 8 και εξονίου 9 (*Bsm I, Taq I, Apa I*). Συμπεριλήφθησαν δε μελέτες που συνέδεαν τον γονότυπο με οποιαδήποτε από τις εξής παραμέτρους που αφορούν τον οστικό μεταβολισμό: α) την οστική πυκνότητα ισχίου ή σπονδυλικής στήλης, β) το οστικό περιεχόμενο σε μέταλλα, γ) την περιοχή φλοιώδους οστού, δ) την εντερική απορρόφηση ασβεστίου, ε) την απόκριση στη θεραπεία με βιταμίνη D, στ) το ρυθμό οστικού μεταβολισμού, ζ) την οστική απώλεια και τέλος, η) τη συχνότητα καταγμάτων.

Υπολογίστηκε λοιπόν, κατά αυτό τον τρόπο, ότι το 34.3% των μελετών που επικεντρώθηκαν στη σπονδυλική στήλη και 43.1% αυτών που μελέτησαν το ισχίο, έδωσαν θετικά αποτελέσματα σε επίπεδο σημαντικότητας  $p < 0.05$ . Αυτά τα ποσοστά ήταν κατά πολύ μεγαλύτερα από την αναμενόμενη συχνότητα 5% ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων σύμφωνα με τη μηδενική υπόθεση. Ακόμη, διαπιστώθηκε ότι η θετική επίδραση του γονιδίου VDR ήταν περισσότερο εμφανής σε συγκεκριμένες ομάδες μελέτης, όπως στις νεότερες ηλικίες, σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας έναντι των μετεμμηνοπαυσιακών και σε μελέτες όπου δεν συμπεριλαμβάνονταν οστεοπορωτικά άτομα.

## 2. Υποδοχέας των οιστρογόνων τύπου α (Estrogen Receptor α, ESRα)

Τα οιστρογόνα έχουν αποδεδειγμένη δράση στο μεταβολισμό των οστών αποτελώντας ρυθμιστές τόσο της οστεοβλαστικής και της οστεοκλαστικής δραστηριότητας, όσο και της εντερικής απορρόφησης ασβεστίου. Επίσης φαίνεται ότι τα οιστρογόνα συμβάλλουν στην απόκτηση της κορυφιαίας οστικής μάζας, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, και κατ' επέκταση στην μετρούμενη οστική πυκνότητα.

Για τους παραπάνω λόγους, το γονίδιο του οιστρογονικού υποδοχέα α συμπεριλήφθηκε στα υποψήφια του γενετικού ελέγχου της οστεοπόρωσης. Αρχικά, μελετήθηκε περιοχή του χρωμοσώματος που εντοπίζεται πριν από το γονίδιο που κωδικοποιεί τον ESRα και αποτελείται από επαλαμβανόμενα δινουκλεοτίδια θυμίνης-αδενίνης (TA). Επρόκειτο, λοιπόν, για μικροδορυφορικό πολυμορφισμό με διαφορετικού μεγέθους επαλαμβανόμενα δινουκλεοτίδια, VNTR. Σε 144 μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες διαπιστώθηκε η ύπαρξη 17 διαφορετικών γονοτύπων, που αφορούσαν διαφορετικό αριθμό TA επαναλήψεων. Ο γονότυπος που έφερε 12 επαναλήψεις TA σχετιζόταν με τη χαμηλότερη οστική πυκνότητα.<sup>53</sup> Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξε και μελέτη σε 610 μετεμμηνοπαυσιακές Ιταλίδες όπου τα άτομα που έφεραν γονότυπο με μικρό αριθμό TA επαναλήψεων (<15) είχαν σημαντικά χαμηλότερη σπονδυλική οστική πυκνότητα σε σχέση με όσους είχαν περισσότερες επαναλήψεις.<sup>54</sup> Η μελέτη κατέληξε στην ίδια συσχέτιση και όσον αφορά στα σπονδυλικά κατάγματα. Θετική συσχέτιση μεταξύ του συγκεκριμένου πολυμορφικού σημείου και της





οστικής πυκνότητας, καθώς και της μεταβολής της μετά από τρίχρονη παρακολούθηση, διαπιστώθηκε και από μελέτη στις Ηνωμένες Πολιτείες.<sup>55</sup>

Ακολούθησαν μελέτες που διερεύνησαν τη σχέση δύο πολυμορφισμών RFLPs του γονιδίου του υποδοχέα τύπου α των οιστρογόνων με την οστική πυκνότητα των σπονδύλων. Αυτοί οι πολυμορφισμοί που χαρακτηρίζονται ως *Pvu II* και *Xba I* βρίσκονται σε πολύ μικρή απόσταση μεταξύ τους στο εξόνιο 1 του γονιδίου ESRα και σε ανισοκατανομή σύνδεσης μεταξύ τους. Επιπλέον, από τη μελέτη των Becherini και συν. στον ιταλικό πληθυσμό,<sup>54</sup> προέκυψε ότι οι δύο πολυμορφισμοί του εξονίου 1 είναι σε ανισοκατανομή σύνδεσης και με το μικροδορυφορικό πολυμορφισμό των επαλαμβανόμενων διουκλεοτιδίων TA.

Σε μια Ιαπωνική μελέτη που συμπεριέλαβε μετρήσεις από 238 μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, προέκυψε ότι ο γονότυπος PRxx που προέρχεται από το συνδυασμό των δύο πολυμορφισμών, και πιο συγκεκριμένα ο απλότυπος Px, συνδεόταν με χαμηλότερη οστική πυκνότητα στο ισχίο σε σχέση με τους άλλους πολυμορφισμούς.<sup>56</sup>

Άλλες μελέτες έδειξαν ότι το θεωρούμενο μειονεκτικό αλληλίο P μπορεί να είναι ευνοϊκό σε διαφορετικούς πληθυσμούς μελέτης. Έτσι, οι Qi και συν. στην Αυστραλία συνέδεσαν τον pp γονότυπο με χαμηλή οστική πυκνότητα σπονδύλων σε γυναίκες και ισχίου στους άνδρες.<sup>57</sup> Η ίδια σχέση διαπιστώθηκε σε 1067 λευκές γυναίκες.<sup>58</sup>

Εξάλλου, η επίδραση των συγκεκριμένων πολυμορφισμών δεν επιβεβαιώθηκε σε όλους τους μελετηθέντες πληθυσμούς. Έτσι σε 285 μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες κορεατικής καταγωγής δεν φάνηκε συσχέτιση κανενός από τους δύο πολυμορφισμούς –χωριστά ή σε συνδυασμό μεταξύ τους– ούτε με την οστική πυκνότητα, ούτε με δείκτες οστικού μεταβολισμού, ούτε τέλος με την ανταπόκριση στη χορήγηση οιστρογονικής θεραπείας υποκατάστασης επί ένα έτος.<sup>59</sup> Ακόμη σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 499 Δανίδες μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες δεν ανιχνεύθηκε επίδραση κανενός εκ των δύο πολυμορφισμών στην οστική πυκνότητα, αλλά ούτε και στο ρυθμό οστικής απώλειας σε 101 από τις γυναίκες αυτές που παρακολούθηθηκαν επί 18 έτη.<sup>60</sup> Έλλειψη συσχέτισης των δύο πολυμορφισμών με την οστική πυκνότητα της σπονδυλικής στήλης και του ισχίου χαρακτήρισε και Ιταλική μελέτη 426 μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών.<sup>61</sup> Ακόμη, βελγική μελέτη στην οποία συμμετείχαν 313 μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες ηλικίας άνω των 70 ετών, από τις οποίες 142 είχαν ιστορικό οστεοπορωτικού κατάγματος απέκλεισε τη συσχέτιση των δύο μελετούμενων πολυμορφισμών του γονιδίου ESRα, τόσο με την οστική πυκνότητα όσο και με το ιστορικό καταγμάτων.<sup>62</sup>

Μια Ιαπωνική μελέτη έδειξε ότι οι πολυμορφισμοί αυτοί έχουν επίδραση στον καθορισμό της οστικής πυκνότητας μόνο κατά την αναπαραγωγική περίοδο στις γυναίκες, ενώ με την επέλευση της



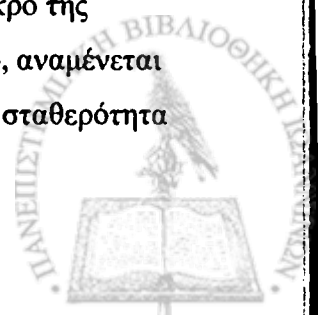
εμμηνόπαυσης, αυτή η επίδραση αμβλύνεται και δεν γίνεται πλέον αντιληπτή.<sup>63</sup> Σε αμερικανική μελέτη 253 γυναικών αναπαραγωγικής ή περι-εμμηνοπαυσιακής ηλικίας επιβεβαιώθηκε η επίδραση των δύο πολυμορφισμών του οιστρογονικού υποδοχέα α στη σπονδυλική και στην ολική οστική πυκνότητα: οι φέρουσες τον γονότυπο pp είχαν σημαντικά χαμηλότερη οστική πυκνότητα από αυτές με γονότυπο PP.<sup>64</sup>

### 3. Γονίδιο του κολλαγόνου τύπου Ia1 (Collagen type Ia1, COL1A1)

Εφόσον το κολλαγόνο τύπου I αποτελεί τη βασική πρωτεΐνη της οστικής θεμέλιας, ουσίας ήταν λογικό να διερευνηθεί η πιθανή συμμετοχή του στον καθορισμό της οστικής πυκνότητας. Το κολλαγόνο τύπου I, είναι ένα ετεροτριμερές που αποτελείται από δύο αλυσίδες α1 και από μια αλυσίδα α2. Οι δύο διαφορετικοί τύποι αλυσίδων κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια (γονίδια COL1A1 και COL1A2). Μεταλλάξεις σε ένα από τα δύο γονίδια του κολλαγόνου τύπου I προκαλούν την ατελή οστεογένεση που είναι μια κατάσταση με πολύ έκδηλη οστική ευθραυστότητα και ένα ευρύ φάσμα κλινικών εκδηλώσεων. Με βάση αυτή την παρατήρηση έγινε προσπάθεια συσχέτισης πολυμορφισμών των 2 γονιδίων με την ιδιοπαθή οστεοπόρωση, δηλαδή σε καταστάσεις όπου υπάρχει βαρεία οστεοπενία και πολλαπλά κατάγματα οι οποίες όμως δεν πληρούν τα κριτήρια διάγνωσης ατελούς οστεογένεσης ή άλλης οστικής μεταβολικής νόσου.

Αρχικά ανακοινώθηκαν σε μεμονωμένα περιστατικά μεταλλάξεις σε μεταφραζόμενες περιοχές των δύο γονιδίων. Πρώτοι οι Spotila και συν. το 1991 ανακοίνωσαν μια μετάλλαξη στο γονίδιο που κωδικοποιεί την αλυσίδα α2 και η οποία οδηγεί σε αντικατάσταση αμινοξέος Gly→Ser στη θέση α<sub>2</sub>(I)-661.<sup>65</sup> Συμφωνα με τους ίδιους ερευνητές, αυτή η αντικατάσταση οδηγεί σε τροποποιημένη επεξεργασία της πρωτεΐνης μετά τη μετάφρασή της και κατ'επέκταση σε διαφορετική συμπεριφορά κατά το σχηματισμό της τριπλής έλικας. Αυτό, ωστόσο, δε φάνηκε να επηρεάζει τη θερμική σταθερότητα του κολλαγόνου τύπου I.

Σε δεύτερη δημοσίευση της ίδιας ομάδας,<sup>66</sup> περιγράφηκαν μια νέα μετάλλαξη στο γονίδιο που κωδικοποιεί την αλυσίδα α1 στη θέση α<sub>1</sub>(I)-27 με αντικατάσταση αμινοξέος Pro→Ala, και ένας ακόμη πολυμορφισμός στην θέση α<sub>2</sub>(I)-661 της α2 αλυσίδας με αντικατάσταση Ala→Pro. Ο τελευταίος πολυμορφισμός βρέθηκε με την ίδια συχνότητα σε ασθενείς και ομάδα ελέγχου και κατά συνέπεια εξαιρέθηκε από τη λίστα των υποψηφίων μεταλλάξεων για την πρόκληση οστεοπόρωσης. Όσον αφορά τη μετάλλαξη στην α<sub>1</sub> αλυσίδα, η αντικατάσταση της προλίνης από αλανίνη θα μπορούσε να οδηγήσει σε διαταραχή του σχηματισμού της τριπλής έλικας του κολλαγόνου τύπου I, αφού η μετατροπή της προλίνης σε υδροξυπρολίνη, κατά την επεξεργασία της αλύσου, πιθανά δημιουργεί σημείο δεσμού. Η εντόπιση όμως αυτής της μετάλλαξης στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης, δεδομένου ότι η αναδίπλωση του κολλαγόνου ξεκινά από το καρβοξυτελικό, αναμένεται να προκαλέσει μικρή διαταραχή, όπως άλλωστε φάνηκε από την ανεπηρέαστη θερμική σταθερότητα του μεταλλαγμένου κολλαγόνου.



Δεδομένου του μικρού αριθμού περιπτώσεων όπου διαπιστώθηκαν οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις, καθώς και η αδυναμία διαπίστωσης σαφούς δυσλειτουργίας του κολλαγόνου τύπου I, κατέστη φανερή η ανάγκη να πραγματοποιηθούν εκτενέστερες μελέτες προς αυτή την κατεύθυνση, όπως επίσης και προς τον εντοπισμό συμπαραγόντων που επιδρούν στην εκδήλωση του οστεοπορωτικού φαινοτύπου.

Στο μεταξύ, ομάδα από τη Σκωτία περιέγραψε για πρώτη φορά πολυμορφισμό σε μη μεταγραφόμενη περιοχή του γονιδίου του κολλαγόνου τύπου α1(I). Ο πολυμορφισμός αυτός συνίσταται σε αντικατάσταση ενός νουκεοτιδίου γουανίνης από μια θυμίνη (G→T) σε ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου, όπου συνδέεται ο μεταγραφικός παράγοντας Sp1. Αυτός ο πολυμορφισμός αποδείχτηκε ότι σχετίζεται με την οστική πυκνότητα της ΟΜΣΣ σε μια σειρά 205 καυκάσιων γυναικών εκ των οποίων ένα μεγάλο ποσοστό (47%) ήταν οστεοπορωτικές με βάση τα κριτήρια του Παγκοσμίου Οργανισμού Υγείας.<sup>67</sup> Ενδιαφέρουσα ήταν επίσης η παρατήρηση ότι ο γονότυπος που συνδεόταν με χαμηλότερη οστική πυκνότητα (ss ομοζυγωτία με την G→T αντικατάσταση), ήταν συχνότερος στην ομάδα των ασθενών που είχαν υποστεί συμπιεστικά σπονδυλικά κατάγματα. Η δεύτερη παρατήρηση ήρθε να ενισχύσει την άποψη πως το μελετούμενο γονίδιο συμβάλλει στον οστικό μεταβολισμό τόσο μέσω της διαμόρφωσης της οστικής πυκνότητας- που αποτελεί ένα μέτρο αξιολόγησης της ποιότητας των οστών-, όσο και μέσω της οστικής ευθραυστότητας- που μερικές φορές είναι ανεξάρτητη από την οστική πυκνότητα.

Ακολούθησαν μελέτες του συγκεκριμένου πολυμορφισμού σε διαφορετικούς πληθυσμούς και οι συσχετίσεις με την οστική πυκνότητα και τον επιπολασμό ή την επίπτωση οστικών καταγμάτων άλλοτε επιβεβαιώθηκαν και άλλοτε όχι.

Στην Ολλανδία η σχέση αυτή μελετήθηκε σε 1778 γυναίκες ηλικίας 55-80 ετών, οι οποίες συμμετείχαν σε πληθυσμιακή μελέτη και για τις οποίες υπήρχαν διαθέσιμες μετρήσεις οστικής πυκνότητας καθώς και γονοτυπικός καθορισμός για τον πολυμορφισμό Sp1.<sup>68</sup> Σε αυτή τη μελέτη αποδείχτηκε ότι οι τρεις γονοτυπικές ομάδες διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους ως προς την οστική πυκνότητα της σπονδυλικής στήλης και του μηριαίου, ακόμη και μετά από προσαρμογή για παράγοντες όπως η ηλικία και το σωματικό βάρος. Αξιοσημείωτη ήταν επίσης η παρατήρηση ότι η επίδραση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού στην οστική πυκνότητα ενισχύνονταν στις μεγαλύτερες ηλικιακές ομάδες (>70 ετών) σε σχέση με τα νεότερα άτομα (<70 ετών), όπου δεν ήταν σημαντική. Η επίδραση του Sp1 ήταν επίσης σημαντική στην επίπτωση καταγμάτων, όπου καθαρά φάνηκε η επίδραση της δόσης του αλληλομόρφου στο λόγο πιθανοτήτων (odds ratio).

Σε γαλλική μελέτη 110 οστεοπορωτικών μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών (ηλικίας 45-90 ετών) και 107 υγιών μαρτύρων, διαπιστώθηκε αυξημένη συχνότητα του μειονεκτικού αλληλομόρφου στην ομάδα ασθενών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Ο σχετικός κίνδυνος εμφάνισης οστεοπόρωσης για κάθε μειονεκτικό αλληλόμορφο υπολογίστηκε 1.92.<sup>69</sup>

Στη Δανία διεξήχθη άλλη μελέτη που συμπεριλάμβανε άνδρες και γυναίκες με εγκατεστημένη οστεοπόρωση (παρουσία τουλάχιστον ενός μη τραυματικού οστικού κατάγματος της σπονδυλικής



στήλης) σε σύγκριση με ομάδα ελέγχου.<sup>70</sup> Η οστεοπορωτική ομάδα αποτελούταν από 154 γυναίκες και 26 άρρενες, ενώ η ομάδα ελέγχου από 128 γυναίκες και 67 άνδρες. Το ηλικιακό εύρος ήταν μεγάλο: 28-80 έτη. Στο σύνολο των μελετηθέντων οι τρεις γονότυποι διέφεραν σημαντικά ως προς την οστική πυκνότητα τόσο της σπονδυλικής στήλης όσο και του μηριαίου. Πιο εντυπωσιακή ήταν η διαπίστωση ότι στην οστεοπορωτική ομάδα, ο μειονεκτικός γονότυπος εμφανιζόταν με πολύ μεγαλύτερη συχνότητα από ότι στην ομάδα ελέγχου (14.3% έναντι 1.4%), ενώ ο υπολογιζόμενος λόγος κινδύνου ήταν 11.83 (95% διάστημα εμπιστοσύνης 2.64-52.97). Αυτά τα αποτελέσματα ωστόσο, θα πρέπει να εκτιμηθούν με κάθε επιφύλαξη δεδομένου του μεγάλου εύρους του διαστήματος εμπιστοσύνης.

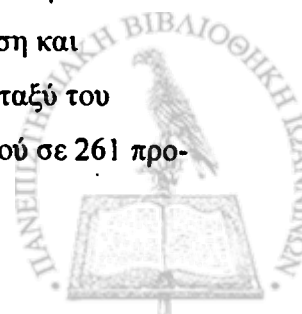
Σε μια άλλη μελέτη που περιελάμβανε 185 γυναίκες (55 γυναίκες με κατάγματα και 130 μάρτυρες), οι φέρουσες τουλάχιστον ένα μειονεκτικό αλληλόμορφο είχαν σημαντικά χαμηλότερη οστική πυκνότητα και αυξημένα επίπεδα πυριδινολίνης -ενδεικτικά αυξημένου οστικού μεταβολισμού- σε σχέση με τις ομόζυγες για τον ευνοϊκό πολυμορφισμό.<sup>71</sup>

Η μελέτη 220 προεμμηνοπαυσιακών γυναικών έδειξε ότι η οστική πυκνότητα επηρεάζεται από τον γονότυπο Sp 1, αλλά αυτή η σχέση εξαλείφεται εάν γίνει προσαρμογή για άλλους παρεμβαλλόμενους παράγοντες και συγκεκριμένα το ύψος. Η τελευταία παρατήρηση δίνει έναυσμα για διατύπωση της υπόθεσης πως ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός πιθανά να δρα έμμεσα, μέσω καθορισμού των σωματομετρικών χαρακτηριστικών.<sup>72</sup>

Σε μια μικρότερη μελέτη από την Ισπανία που περιελάμβανε 20 προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με οστεοπόρωση και 24 υγιείς μάρτυρες το μειονεκτικό αλληλόμορφο βρισκόταν σε σημαντικά μεγαλύτερη συχνότητα στην οστεοπορωτική ομάδα.<sup>73</sup>

Η επίδραση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού στην οστική πυκνότητα της σπονδυλικής στήλης είναι έκδηλη από την παιδική ηλικία όπως φάνηκε σε μελέτη 109 προεφηβικών κοριτσιών μεξικανικής καταγωγής.<sup>74</sup>

Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν μελέτες που δεν επιβεβαιώνουν την παραπάνω περιγραφείσα σχέση του πολυμορφισμού Sp 1 του γονιδίου COL1A1. Τέτοια είναι η μελέτη που διεξήχθη στη Σουηδία<sup>75</sup> σε 64 μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με οστεοπόρωση και 72 υγιείς μάρτυρες. Τα αρνητικά αποτελέσματα αφορούσαν τόσο την οστική πυκνότητα όσο και τα επιπολάζοντα κατάγματα. Μια ερευνητική ομάδα στις Ηνωμένες Πολιτείες,<sup>76</sup> μελέτησε την επίδραση του πολυμορφισμού σε ζευγάρια προεμμηνοπαυσιακών διδύμων (38 ζευγάρια μονοζυγωτών και 40 ζευγάρια διζυγωτών), αλλά δε βρέθηκαν διαφορές μεταξύ των διζυγωτών με τον ίδιο Sp1 γονότυπο και των διζυγωτών με ασυμφωνία στον Sp1 γονότυπο. Επίσης στην ίδια μελέτη δε βρέθηκε διαφορά στη συχνότητα του μειονεκτικού αλληλομόρφου μεταξύ μιας ομάδας 56 ασθενών με ιδιοπαθή οστεοπόρωση και κατάγματα και του πληθυσμού των διδύμων. Ακόμη, καμιά συσχέτιση δε βρέθηκε μεταξύ του πολυμορφισμού Sp1 και της οστικής πυκνότητας και δεικτών του οστικού μεταβολισμού σε 261 προ- και περι-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες από τις Ηνωμένες Πολιτείες.<sup>55</sup>



Επιπλέον, άλλη μελέτη από τη Δανία<sup>77</sup> όπου συμμετείχαν 133 μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες που προέρχονταν από το γενικό πληθυσμό και παρακολούθηθηκαν επί 18 έτη, δεν έδειξε καμιά σχέση του πολυμορφισμού ούτε με την οστική πυκνότητα σπονδυλικής στήλης και μηριαίου, ούτε με το ρυθμό οστικής απώλειας κατά την παρακολούθηση, αλλά ούτε με βιοχημικούς δείκτες οστικού μεταβολισμού (προϊόντα αποδόμησης του κολλαγόνου και οστεοκαλσίνη). Στη Φιλανδία, επίσης, δε βρέθηκε επίδραση του πολυμορφισμού με την οστική πυκνότητα, τον οστικό μεταβολισμό και τα επιπολάζοντα κατάγματα σε γυναίκες αμέσως μετά την εμμηνόπαυση αλλά και σε πιο ηλικιωμένα άτομα.<sup>78</sup>

Οι πληθυσμιακές ιδιαιτερότητες ως προς την επίδραση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού στον οστικό μεταβολισμό και στην οστική πυκνότητα αποδεικνύονται περίτρανα από το γεγονός ότι αυτός δεν ανιχνεύτηκε καθόλου σε δύο ασιατικούς πληθυσμούς –όπου και η συχνότητα οστεοπορωτικών καταγμάτων είναι σημαντικά χαμηλότερη από λευκούς πληθυσμούς-, στην Κορέα<sup>79</sup> και Ιαπωνία.<sup>80</sup>

Σε μια άλλη μελέτη διαπιστώνεται ότι υπάρχουν πληθυσμιακές διαφορές ως προς τη συχνότητα του μειονεκτικού Sp 1 γονοτύπου οι οποίες συμβαδίζουν με την επίπτωση των καταγμάτων του ισχίου. Έτσι σε Αφρική, Κίνα και Κορέα, όπου ο πολυμορφισμός είναι σπάνιος υπάρχει μικρή επίπτωση καταγμάτων σε αντίθεση με ευρωπαϊκές χώρες (Γαλλία, Ηνωμένο Βασίλειο, Ολλανδία και Δανία), όπου τόσο η συχνότητα του μειονεκτικού αλληλομόρφου, όσο και των καταγμάτων ισχίου είναι υψηλές.<sup>81</sup>

Υπάρχουν αρκετές ενδείξεις ότι ο καθορισμός του γονοτύπου για τον Sp 1 πολυμορφισμό, μπορεί να αποτελέσει σημαντικό προγνωστικό παράγοντα για την εμφάνιση καταγμάτων. Έτσι, σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Τσεχία,<sup>82</sup> συμμετείχαν 252 μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με χαμηλή οστική πυκνότητα από τις οποίες οι μισές είχαν τουλάχιστον ένα κάταγμα καρπού, ενώ οι υπόλοιπες όχι. Σε αυτή τη μελέτη η χρήση πολυπαραγοντικού μοντέλου ανάλυσης έδειξε ότι ο γονοτυπικός προσδιορισμός αποτελούσε προγνωστικό παράγοντα για την εμφάνιση καταγμάτων μαζί με την οστική πυκνότητα και το σωματικό βάρος.

Το ίδιο συμπέρασμα προέκυψε από προοπτική μελέτη στη Σκωτία<sup>83</sup> όπου συμμετείχαν 156 άνδρες και 185 γυναίκες. Ωστόσο, σε αυτήν την ομάδα μελέτης δεν διαπιστώθηκε σημαντική διαφορά της οστικής πυκνότητας ανάμεσα στις τρεις γονοτυπικές ομάδες και η γονοτυπική επίδραση ασκούσαν μόνο μέσω αύξησης της οστικής ευθραυστότητας. Από την άλλη μεριά, παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση μεταξύ του πολυμορφισμού και της οστικής πυκνότητας, ώστε άτομα με το μειονεκτικό γονότυπο και χαμηλή οστική πυκνότητα είχαν πολύ μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης καταγμάτων.<sup>83</sup>



Κάποιες μελέτες προσπάθησαν να συσχετίσουν τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό με το ρυθμό οστικής απώλειας. Σε 243 άτομα ηλικίας >65 ετών που παρακολούθηθηκαν επί 5 έτη φάνηκε ότι ο ρυθμός απώλειας οστικής πυκνότητας σε όλο το σώμα ήταν μεγαλύτερος στους φέροντες το μειονεκτικό γονότυπο.<sup>84</sup> Η μελέτη όμως αυτή δεν απέδειξε το ίδιο στα συγκεκριμένα σκελετικά σημεία μεγαλύτερου κλινικού ενδιαφέροντος, τη σπονδυλική στήλη και το ισχίο.

#### **4. Άλλα γονίδια που έχουν μελετηθεί σε σχέση με τη συμβολή τους στον οστικό μεταβολισμό-οστική πυκνότητα**

Δεδομένης της πολυγονιδιακής φύσης του οστικού φαινοτύπου είναι προφανές ότι ένας μεγάλος αριθμός άλλων γονιδίων πιθανά να συμβάλλει στην έκφρασή του. Μια σειρά, λοιπόν, άλλων υποψηφίων γονιδίων, που δρουν ως ρυθμιστές της λειτουργίας των οστικών κυττάρων ή της ομοιοστασίας του ασβεστίου, έχουν κατά καιρούς συσχετιστεί με την οστική πυκνότητα. Ο πίνακας 2 απαριθμεί τα γονίδια που έχουν μελετηθεί, όπως και τη λειτουργία τους που φέρεται να αποτελεί συνδετικό κρίκο με την οστική πυκνότητα.

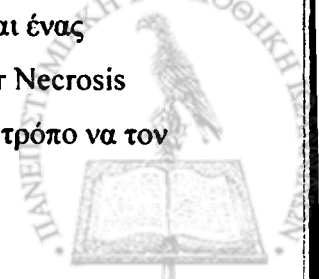
#### **5. Μελλοντικά υποψήφια γονίδια που προκύπτουν από μελέτες σε διαγονιδιακά και knock-out ποντίκια**

Η ανάπτυξη και διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών, που αποτελούν τους δύο βασικούς συντελεστές του οστικού μεταβολισμού, ελέγχονται από αυξητικούς παράγοντες, κυττοκίνες και μόρια συγκόλλησης, που παράγονται στο μικρο-περιβάλλον του μυελού των οστών. Επίσης, κυκλοφορούσες ορμόνες ασκούν τη δική τους δράση στην ανάπτυξη και λειτουργία των δύο αυτών τύπων οστικών κυττάρων. Γίνεται λοιπόν αντιληπτό ότι υπάρχει εξαιρετικά ευρύ πεδίο για έρευνα, έως ότου αποσαφηνιστούν πλήρως οι μηχανισμοί που ενέχονται στον μεταβολισμό των οστών και ότι υπάρχει επίσης σημαντικός αριθμός υποψηφίων γονιδίων προς μελέτη στα πλαίσια ανίχνευσης γενετικών επιδράσεων.

Πειράματα σε διαγονιδιακά ποντίκια (transgenic mice) όπου υπερεκφράζεται ένα γονίδιο ή σε ποντίκια στα οποία έχει καταργηθεί πλήρως η έκφραση κάποιου γονιδίου (knock-out mice) μας δίνουν πληροφορίες για την ακριβή δράση του συγκεκριμένου γονιδίου.

Από το σύνολο των κυττοκινών που έχουν μελετηθεί ως προς τη συμβολή τους στο μεταβολισμό των οστών, μέχρι στιγμής δεν έχει βρεθεί ούτε μία που να είναι απολύτως απαραίτητη ή που από μόνη της να μπορεί να κινητοποιήσει το μηχανισμό διαφοροποίησης οστεοκλαστών.

Καθοριστικότερο ρόλο φαίνεται να παίζουν πρόσφατα ανακαλυφθείσες πρωτεΐνες: η οστεοπροτεγερίνη (OPG), ο συνδέτης της οστεοπροτεγερίνης (Osteoprotegerin Ligand, OPGL) και ο υποδοχέας RANK (Receptor Activator of Nuclear factor- κB). Η οστεοπροτεγερίνη είναι ένας διαλυτός εκκρινόμενος υποδοχέας που ανήκει στην οικογένεια υποδοχέων TNF (Tumor Necrosis Factor). Ρόλος της είναι να συνδέει το συνδέτη της οστεοπροτεγερίνης και με αυτό τον τρόπο να τον



απενεργοποιεί. Αν δε γίνει αυτή η σύνδεση, τότε ο OPGL -ο οποίος καθαυτός είναι μια κυττοκίνη της οικογένειας του TNF- ενεργοποιεί τον υποδοχέα RANK με αποτέλεσμα να ξεκινά από τη μια πλευρά, η διαφοροποίηση των οστεοκλαστών από πρόδρομα κύτταρα του αιμοποιητικού, και από την άλλη, η οστική απορρόφηση από τους ώριμους οστεοκλάστες.

Ποντίκια που στερούνται έκφρασης OPG παρουσιάζουν βαρεία οστεοπόρωση, ενώ διαγονιδιακά ποντίκια που την υπερεκφράζουν έχουν οστεοπέτρωση.

Έχουν αναπτυχθεί και άλλα μοντέλα ποντικών με πλήρη έλλειψη έκφρασης πρωτεϊνών (knock-outs) με οστικό φαινότυπο. Κάποια από αυτά τα μοντέλα συνδέονται με χαμηλή οστική πυκνότητα, όπως αυτά που δεν εκφράζουν διγλυκάνη (εξωκυττάρια πρωτεογλυκάνη της θεμέλιας ουσίας), c-Abl (τυροσινική κινάση των οστεοβλαστών), klotho (μεμβρανική πρωτεΐνη άγνωστης λειτουργίας, η έλλειψη της οποίας προκαλεί σύνδρομο προγηρίας), υποδοχέα προλακτίνης (η άμεση δράση της προλακτίνης στα οστά παραμένει άγνωστη).

Ωστόσο, παρά τον αδιαμφισβήτητο ρόλο των παραγόντων αυτών, όπως αυτός προκύπτει από τη βασική έρευνα, λείπουν ακόμη οι μελέτες της επίδρασής τους σε ανθρώπους.



**Πίνακας 2. Υποψήφια γονίδια τα οποία έχουν μελετηθεί στην οστεοπόρωση**

<b>Υποδοχέα βιτ. D (VDR)</b>	Απορρόφηση ασβεστίου, δράση οστεοκλαστών-οστεοβλαστών
<b>Υποδοχέα οιστρογόνων (ER)</b>	Δράση οστεοκλαστών-οστεοβλαστών
<b>Κολλαγόνου τύπου Ια1 (COL1A1)</b>	Συστατικό της θεμέλιας ουσίας
<b>Υποδοχέα ανδρογόνων (AR)<sup>85</sup></b>	Επίδραση στη δράση των οστεοβλαστών
<b>Μεταμορφωτικού αυξητικού παράγοντας β<sub>1</sub> (TGF-β<sub>1</sub>)<sup>85</sup></b>	Ρύθμιση δράσης οστεοκλαστών και οστεοβλαστών
<b>Παραθορμόνης (PTH)<sup>86</sup></b>	Ομοιόσταση Ca <sup>2+</sup> , ρύθμιση δράσης οστεοκλαστών και οστεοβλαστών
<b>Οστεοκαλσίνης<sup>87</sup></b>	Συστατικό της θεμέλιας ουσίας
<b>Απολιποπρωτεΐνης E (Apo E)<sup>88</sup></b>	Μεταφορά βιταμίνης K που ενέχεται στην υδροξυλίωση οστεοκαλσίνης
<b>Γλυκοπρωτεΐνης α2-HS<sup>89</sup></b>	Συστατικό της θεμέλιας ουσίας
<b>Ιντερλευκίνης-6 (IL-6)<sup>90</sup></b>	Δράση οστεοκλαστών
<b>Ανταγωνιστή του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 1 (IL-1RA)<sup>91</sup></b>	Ρύθμιση δράσης οστεοκλαστών και οστεοβλαστών
<b>Υποδοχέα καλσιτονίνης<sup>92</sup></b>	Δράση οστεοκλαστών
<b>Υποδοχέα Ca<sup>2+</sup> (CaSR)<sup>93</sup></b>	Αισθητήρας εξωκυτταρίου Ca <sup>2+</sup>
<b>IGF-1<sup>94</sup></b>	Διεγείρει τη σκελετική αύξηση, ρυθμίζει τον κυτταρικό πολ/σμό και διαφοροποίηση
<b>PPAR-γ<sup>95</sup></b>	Συμβάλλει στη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων και έχει κοινή μεσεγχυματική προέλευση με τους οστεοβλάστες
<b>Αναγωγάσης του μεθυλενο-τετράδρο φολικού (MTHFR)</b>	Συμβάλλει στην εμφάνιση ομοκυστινουρίας, η κλινική εικόνα της οποίας περιλαμβάνει και οστεοπόρωση
<b>Δεσμευτικής πρωτεΐνης της βιτ. D (VDBP)</b>	Κύριος μεταφορέας των μεταβολιτών της βιτ. D
<b>Κολλαγενάσης</b>	Ένζυμο που ενέχεται στον καταβολισμό των οστών
<b>Υποδοχέα της γαλανίνης 3 (GALNR 3)</b>	Τροποποιεί την έκκριση της υπόφυσης





## Προτεινόμενοι μηχανισμοί επίδρασης των πολυμορφισμών στην φαινοτυπική έκφραση της οστικής πυκνότητας

### 1. Λειτουργίες των γονιδίων

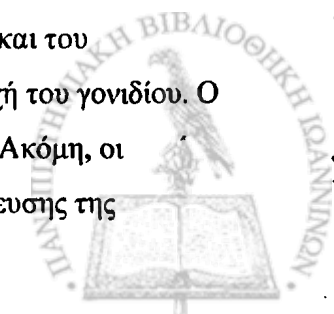
Στις περισσότερες περιπτώσεις, ο μηχανισμός με τον οποίο οι γενετικοί παράγοντες επιδρούν στην φαινοτυπική έκφραση του οστικού μεταβολισμού δεν έχει αποσαφηνιστεί.

Ο υποδοχέας της βιταμίνης D (VDR), που είναι και ο πιο μακροχρόνια μελετημένος, φαίνεται να υπεισέρχεται σε πολλαπλές φυσιολογικές λειτουργίες και να εμπλέκεται σε κλινικές καταστάσεις όπως αιματολογικές διαταραχές, καρκίνο μαστού και προστάτη, οστεοαρθρίτιδα. Ο κύριος ρόλος των μεταβολιτών της βιταμίνης D, μέσω της δράσης τους στους VDR, είναι η διατήρηση των επιπέδων ασβεστίου και φωσφόρου του ορού, μέσω άμεσης εντερικής απορρόφησης και των δύο στοιχείων και μέσω ενεργοποίησης της οστικής απορρόφησης. Εξάλλου, με την ιδιότητα του μεταγραφικού παράγοντα, ο VDR συμβάλλει στην έκφραση του γονιδίου της οστεοκαλσίνης, καθώς και στη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου COLIA1.<sup>38</sup>

Σε μια μελέτη, φαίνεται ότι οι πολυμορφισμοί της 3' περιοχής του γονιδίου VDR (ιντρόνιο 8/εξόνιο 9) σχετίζονται με την εντερική απορρόφηση ασβεστίου.<sup>96</sup> Ωστόσο, δεν φάνηκε να υπάρχει διαφορά της γονιδιακής έκφρασης του υποδοχέα στους τρεις γονότυπους του πολυμορφισμού *Bsm I*,<sup>97-98</sup> αλλά ούτε και της δυνατότητας σύνδεσης του συνδέτη με τον υποδοχέα.<sup>99</sup> Από την άλλη πλευρά, ο πολυμορφισμός *Fok I* που βρίσκεται στο εξόνιο 2 του γονιδίου οδηγεί στην εμφάνιση μακρύτερης ισομορφής πρωτεΐνης υποδοχέα, η οποία έχει πιθανά διαφορετικές βιολογικές δραστηριότητες.<sup>45</sup> Και σε αυτή την περίπτωση όμως υπάρχουν μελέτες που δεν επιβεβαιώνουν την υπόθεση.<sup>100</sup>

Μια μελέτη, στην οποία εξετάστηκαν διάφορες βιοχημικές παράμετροι του οστικού μεταβολισμού καθώς και οι μεταβολές τους κατά την εξωγενή χορήγηση βιταμίνης D (1,25 (OH)<sub>2</sub> vit.D), παρείχε ενδείξεις ότι ο *Bsm I* πολυμορφισμός με κάποιο τρόπο ενέχεται στη λειτουργία του ενδοκρινικού συστήματος της βιταμίνης D και μέσω αυτού ασκεί επίδραση στην οστική πυκνότητα.<sup>101</sup> Έτσι, διαπιστώθηκε διαφοροποιημένη απάντηση στη χορήγηση βιταμίνης D μεταξύ των δύο ακραίων γονοτύπων όσον αφορά τα επίπεδα δεικτών οστικού σχηματισμού (οστεοκαλσίνης ορού και καρβοξυτελικού προπεπτιδίου του κολλαγόνου τύπου I) και οστικής απορρόφησης (λόγος υδροξυπρολίνης/κρεατινίνη ούρων).

Δεν υπάρχουν ακόμη σαφείς ενδείξεις για τον τρόπο με τον οποίο ο υποδοχέας των οιστρογόνων τύπου α (ESRa) συμμετέχει στη διαμόρφωση της οστικής πυκνότητας. Οι πολυμορφισμοί Pvu II και Xba I βρίσκονται σε περιοχή του γονιδίου που θεωρείται κατά πάσα πιθανότητα ανενεργής. Ωστόσο, υπάρχει ανισοκατανομή σύνδεσης μεταξύ αυτών και του μικροδορυφορικού πολυμορφισμού VNTR που εντοπίζεται στη ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου. Ο τελευταίος πιθανώς να ενέχεται στη μεταγραφή και τελική έκφραση του γονιδίου. Ακόμη, οι πολυμορφισμοί του γονιδίου ESRa συμβάλλουν στον καθορισμό της ηλικίας επέλευσης της



εμμηνόπαυσης,<sup>102</sup> ή ακόμη και στην συχνότητα διενέργειας ωθηκεκτομής ή ολικής υστερεκτομής<sup>55</sup> και πιθανά αυτή τους η ιδιότητα να ευθύνεται εν μέρει για την επίδρασή τους στην μετεμμηνοπαυσιακή οστική απώλεια.

Τελευταία, έχει προταθεί ένα ακόμη ενδεχόμενο της πολύπτυχης δράσης των οιστρογόνων στο μεταβολισμό των οστών: έτσι φαίνεται ότι τα οιστρογόνα (μέσω των υποδοχέων τους) ενεργοποιούν τη γονιδιακή έκφραση της οστεοπροτεγερίνης στους οστεοβλάστες. Η οστεοπροτεγερίνη αναστέλλει την οστική απορρόφηση, μέσω αναστολής της διαφοροποίησης και δράσης των οστεοκλαστών.<sup>103</sup>

Το κολλαγόνο τύπου I αποτελεί βασικό δομικό συστατικό των οστών, άρα είναι ευνόητος ο λόγος για τον οποίο το γονίδιο της αλυσίδας α1 του κολλαγόνου τύπου I μελετήθηκε σε σχέση με τον οστικό φαινότυπο. Έχει βρεθεί ότι ο μειονεκτικός γονότυπος *SS* του πολυμορφισμού *Sr I* οδηγεί σε αυξημένη συγγένεια του μεταγραφικού παράγοντα *Sr I* με την περιοχή σύνδεσής του, στο πρώτο ιντρόνιο του γονιδίου *COL1A1*, με αποτέλεσμα την υπερέκφραση του γονιδίου.<sup>104</sup> Αυτό έχει ως συνέπεια την αύξηση της αναλογίας παραγωγής α1(I) αλυσίδων έναντι των α2(I). Αυτή η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των δύο τύπων αλυσίδων που συνθέτουν το κολλαγόνο τύπου I πιθανολογείται ότι οδηγεί σε σχηματισμό ομοτριμερών [α1(I)<sub>3</sub>], έναντι των φυσιολογικών ετεροτριμερών α1(I)<sub>2</sub>α2(I)<sub>1</sub> και έτσι επηρεάζει την οστική ανοχή.

## 2. Έλεγχος των σωματομετρικών χαρακτηριστικών

Υπάρχουν μελέτες που προτείνουν ότι η συσχέτιση της οστικής πυκνότητας με τον πολυμορφισμό *Sr I* του γονιδίου *COL1A1* οφείλεται, ως ένα σημείο, σε διαφορές στα σωματομετρικά στοιχεία και συγκεκριμένα το βάρος<sup>68</sup> και το ύψος,<sup>72</sup> οι οποίες καθορίζονται εν μέρει από αυτό το γονίδιο. Σε αυτές τις μελέτες οι μη προσαρμοσμένες τιμές BMD διέφεραν σημαντικά στους διαφορετικούς γονότυπους για τον *Sr I* πολυμορφισμό, αλλά οι διαφορές αμβλύνονταν σημαντικά όταν στο πολυπαραγοντικό μοντέλο γινόταν προσαρμογή για το ύψος και το βάρος.

Παρόμοιες συσχετίσεις έχουν γίνει για τους υποδοχείς VDR και ESRα. Έχει περιγραφεί ότι η οστική περιεκτικότητα σε μέταλλο σχετίζεται με τον *Bsm I* πολυμορφισμό του υποδοχέα της βιταμίνης D, διαμέσου της επίδρασής του στο σωματικό βάρος.<sup>97</sup> Ακόμη, άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι πολυμορφισμοί του γονιδίου VDR τόσο ο πολυμορφισμός *Fok I* στην περιοχή του εξονίου 2,<sup>105</sup> όσο και οι πολυμορφισμοί *Bsm I* και *Taq I* στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου<sup>106</sup> συμβάλλουν στον καθορισμό του τελικού ύψους.

Επίσης, είναι γνωστή η ευνοϊκή επίδραση των οιστρογόνων στην ανάπτυξη και ωρίμανση του σκελετού τόσο στις γυναίκες όσο και στους άνδρες και έχει βρεθεί θετική συσχέτιση μεταξύ ύψους και πολυμορφισμών του οιστρογονικού υποδοχέα.<sup>107</sup>

Εξάλλου, οι πολυμορφισμοί του υποδοχέα της βιταμίνης D σε αλληλεπίδραση με πολυμορφισμούς του οιστρογονικού υποδοχέα έχουν συνδεθεί και με την σωματική ανάπτυξη από την νεογνική ηλικία.<sup>108</sup>



Εφόσον η προδιοριζόμενη οστική πυκνότητα επηρεάζεται από το μέγεθος του σκελετού, θα ήταν λογικό να διατυπωθεί η υπόθεση ότι οι μελετούμενοι πολυμορφισμοί επηρεάζουν την οστική πυκνότητα και έμμεσα, μέσω επίδρασής τους στα σωματομετρικά χαρακτηριστικά.

### 3. Αλληλεπίδραση με διατροφικές συνήθειες και περιβαλλοντικούς παράγοντες

Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι αλληλεπιδράσεις μεταξύ περιβαλλοντικών παραγόντων, διατροφικών συνηθειών και φυσικής άσκησης όπως επίσης και μεταξύ γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση της οστικής πυκνότητας. Η χορήγηση βιταμίνης D και ασβεστίου περιορίζει την οστική απώλεια στους ηλικιωμένους. Ωστόσο, υπάρχει αρκετή ανομοιογένεια στην απάντηση του σκελετού στη χορήγηση βιταμίνης D και ασβεστίου, η οποία ενδεχομένως να μπορούσε να αποδοθεί σε γενετικούς παράγοντες. Ενδείξεις για την πιθανή αλληλεπίδραση των πολυμορφισμών VDR με την ημερήσια πρόσληψη ασβεστίου παρέχονται τόσο σε μελέτες νέων ατόμων όσο και ηλικιωμένων. Έτσι, βρέθηκε ότι η χορήγηση συμπληρώματος ασβεστίου σε προεφηβικά κορίτσια είχε σημαντικό αποτέλεσμα μόνο στους ετεροζυγώτες και πιθανά τους BB ομοζυγώτες για τον *Bsm I* πολυμορφισμό, όχι όμως και για τον ευνοϊκό γονότυπο bb.<sup>109</sup>

Ακόμη, μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες φέρουσες τον γονότυπο BB για τον πολυμορφισμό *Bsm I* του γονιδίου του υποδοχέα της βιταμίνης D ανταποκρίθηκαν καλύτερα στη χορήγηση ασβεστίου από τις υπόλοιπες.<sup>31</sup> Επίσης, σε ομάδα ηλικιωμένων γυναικών, η χορήγηση βιταμίνης D είχε μεγαλύτερη θετική επίδραση στην οστική πυκνότητα σε συγκεκριμένους γονότυπους του ίδιου πολυμορφισμού.<sup>110</sup>

### 4. Γονιδιακές αλληλεπιδράσεις

Η πολυπλοκότητα της γενετικής επίδρασης στην εκδήλωση μιας πολυπαραγοντικής νόσου συνίσταται εν μέρει στο γεγονός ότι οι επιδράσεις συγκεκριμένων γονιδίων δεν είναι πάντα ανεξάρτητες, αλλά μπορεί να βρίσκονται σε άμεση αλληλεπίδραση με άλλα γονίδια. Το ενδεχόμενο συνέργειας μεταξύ των πολυμορφισμών των γονιδίων του υποδοχέα της βιταμίνης D και του οιστρογονικού υποδοχέα έχει εξεταστεί σε τέσσερις μελέτες.<sup>61-62,64,111</sup> Από αυτές, οι τρεις πρότειναν ότι υπάρχει πράγματι κάποιου τύπου συνέργεια, ενώ η τελευταία όχι. Στην πρώτη μελέτη,<sup>61</sup> που πραγματοποιήθηκε σε Ιταλικό πληθυσμό, μελετήθηκαν 3 διαφορετικοί πολυμορφισμοί RFLPs για το γονίδιο VDR - *Bsm I*, *Apa I* και *Taq I*- οι οποίοι αποδείχτηκαν προγνωστικοί για την οστική πυκνότητα της ΟΜΣΣ, και 2 πολυμορφισμοί RFLPs για το γονίδιο ER των οποίων ο ρόλος στην οστική πυκνότητα δεν ήταν σημαντικός. Όταν οι πολυμορφισμοί των 2 διαφορετικών γονιδίων εξετάστηκαν μαζί, διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην οστική πυκνότητα μεταξύ των δύο ακραίων γονοτύπων που προέκυψαν από το συνδυασμό του συνόλου των πολυμορφισμών των δύο γονιδίων.



Στη δεύτερη μελέτη,<sup>64</sup> που πραγματοποιήθηκε στην Αμερική, μελετήθηκαν οι 2 RFLPs του ER γονιδίου -Pvu II και Xba I- και 1 RFLP του VDR γονιδίου -Bsm I. Σε αυτή την περίπτωση, όταν τα δύο γονίδια εξετάστηκαν ξεχωριστά για την επίδρασή τους στην οστική πυκνότητα, προέκυψαν αποτελέσματα αντίθετα από αυτά των Gennari και συν., δηλαδή μόνο το ER γονίδιο φάνηκε να σχετίζεται με την οστική πυκνότητα ενώ το γονίδιο του υποδοχέα της βιταμίνης D δεν είχε καμιά επίδραση. Κατά τη μελέτη της συνέργειας των δύο γονιδίων αναδείχτηκε η ύπαρξη αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο γονιδίων η οποία ενισχύει τη δράση του ER. Η τρίτη μελέτη πρότεινε ότι υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των πολυμορφισμών των δύο γονιδίων και του ρυθμού οστικής απώλειας σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες ανεξάρτητα από τη λήψη ή όχι ορμονικής θεραπείας υποκατάστασης.<sup>111</sup> Τέλος, τα αποτελέσματα της τέταρτης μελέτης ήταν αρνητικά για την ύπαρξη αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο γονιδίων.<sup>62</sup>

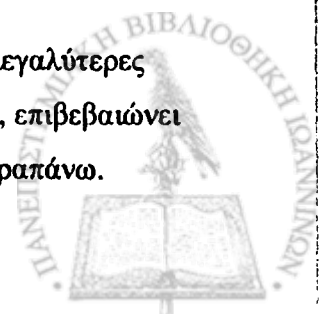
Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη της αλληλεπίδρασης υποψηφίων γονιδίων στην επίπτωση καταγμάτων. Πρόσφατα δημοσιεύτηκε μελέτη που διερεύνησε την αλληλεπίδραση μεταξύ των 3 γνωστών πολυμορφισμών της 3' περιοχής του γονιδίου VDR (*Bsm I*, *Apa I* και *Taq I*) και του Sp 1 πολυμορφισμού του γονιδίου COLIA1 στον επιπολασμό και την επίπτωση καταγμάτων.<sup>38</sup> Σε 1004 μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες ολλανδικής καταγωγής, οι οποίες παρακολουθήθηκαν για 3.8 έτη, διαπιστώθηκε ότι υπήρχε σημαντική συσχέτιση των καταγμάτων με καθένα από τα δύο υποψήφια γονίδια, κατά τη μελέτη καθενός γονιδίου ξεχωριστά. Επιπλέον όμως, υπήρχε και σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο γονιδίων έτσι ώστε, οι πολυμορφισμοί του γονιδίου VDR να παίζουν καθοριστικό ρόλο στα άτομα με τον μειονεκτικό ss γονότυπο για το γονίδιο του κολλαγόνου και όχι σε αυτά που ήταν ομόζυγα SS.

#### 4. Αλληλεπίδραση με την ηλικία

Σε όρισμένες μελέτες παρατηρήθηκε ότι οι γονιδιακές επιδράσεις είναι πιο έντονες στην αρχική φάση της ζωής του ατόμου, ενώ αργότερα, όταν υπεισέρχονται και άλλες παράμετροι όπως διατροφικές συνήθειες, περιβαλλοντικές επιδράσεις και εμμηνόπαυση με την αλλαγή του ορμονικού milieu που επιφέρει, αυτές αμβλύνονται σε σημείο να μην είναι πια αντιληπτές.

Έτσι, σε μελέτη 197 κοριτσιών και 172 προεμμηνοπαυσιακών γυναικών, βρέθηκε ότι υπήρχε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού *Bsm I* και της σπονδυλικής οστικής πυκνότητας στα κορίτσια, η οποία δεν υπήρχε στις ενήλικες γυναίκες.<sup>109</sup> Στη μελέτη των Riggs και συν.,<sup>112</sup> επίσης φάνηκε ότι η ηλικία τροποποιεί την γονιδιακή επίδραση του VDR στην οστική πυκνότητα του ισχίου, έτσι ώστε αυτή να είναι έντονη στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και να μην γίνεται πια αντιληπτή σε ηλικίες άνω των 70 ετών.

Ίδια συμπεράσματα, ως προς την αμβλυνόμενη γενετική επίδραση στο φαινότυπο σε μεγαλύτερες ηλικίες και όσο απομακρύνεται το πληθυσμιακό δείγμα από την ηλικία εμμηνόπαυσης, επιβεβαιώνει και η μελέτη των Gennari και συν.<sup>44</sup> για τον πολυμορφισμό *Fok I* που περιγράφηκε παραπάνω.



Επισφράγιση των παραπάνω παρατηρήσεων αποτελεί η δεύτερη μετα-ανάλυση για τους πολυμορφισμούς του VDR από τους Gong και συν.,<sup>52</sup> όπου οι μελέτες σε μικρότερες ηλικιακά ομάδες είχαν σε μεγαλύτερη συχνότητα θετικά αποτελέσματα.

Αντίστοιχα συμπεράσματα εξάγονται από τη μελέτη των Mizunuma και συν.<sup>63</sup> και για τους πολυμορφισμούς του γονιδίου ESRα.

Ωστόσο, δύο μελέτες που αφορούσαν τον πολυμορφισμό Sp1 του κολλαγόνου τύπου 1α1, παρείχαν ενδείξεις για αντίστροφη επίδραση της ηλικίας: δηλαδή η επίδραση του πολυμορφισμού ήταν πιο έντονη σε μεγαλύτερες ηλικίες.<sup>68,113</sup>



## II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κατά την αναζήτηση γενετικών επιδράσεων στον οστικό μεταβολισμό στο παρόν εγχείρημα ακολουθήθηκαν δύο άξονες:

Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση πέντε πολυμορφισμών τριών διαφορετικών υποψηφίων γονιδίων, των VDR, ESRa και COLIA1, στην οστική πυκνότητα και σε δείκτες του οστικού μεταβολισμού, σε μια σειρά μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών με καταγωγή από τη βορειοδυτική Ελλάδα. Πέρα από την ανεξάρτητη σχέση κάθε πολυμορφισμού με την οστική πυκνότητα, μελετήθηκε και η πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ τους, όπως επίσης και η ανεξάρτητη επίδραση καθενός από αυτούς μετά από προσαρμογή για τους υπόλοιπους.

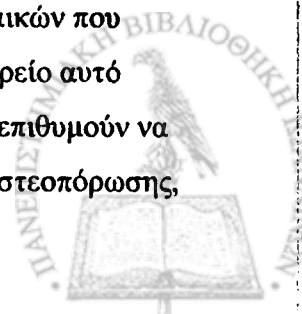
Η ελαττωμένη οστική πυκνότητα, όπως διατυπώθηκε στην εισαγωγή, αποτελεί βασικό προδιαθεσικό και προγνωστικό παράγοντα για εμφάνιση καταγμάτων. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι το μέγεθος της οστικής πυκνότητας δεν συσχετίζεται πάντα ικανοποιητικά με την επίπτωση καταγμάτων. Κατά συνέπεια, εφόσον τα κατάγματα αποτελούν το κλινικό συμβάν με τον σοβαρότερο αντίκτυπο, είναι κεφαλαιώδους σημασίας να κατευθυνθεί η μελέτη και άμεσα στον κίνδυνο καταγμάτων.

Έτσι, στη συνέχεια, με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη του συγκεκριμένου πληθυσμού, επιχειρήθηκε η επέκταση των θετικών συσχετίσεων που διαπιστώθηκαν μεταξύ του Sp1 πολυμορφισμού του γονιδίου COLIA1 και της οστικής πυκνότητας, στα οστικά κατάγματα. Η σημασία αυτού του εγχειρήματος έγκειται στο γεγονός ότι από τη μελέτη ενός κατά βάση «εργαστηριακού» φαινοτύπου, όπως η οστική πυκνότητα, γίνεται μετάβαση σε ένα φαινότυπο ουσιαστικότερης κλινικής αξίας, τα κατάγματα. Η μελέτη της επίπτωσης ή/και του επιπολασμού καταγμάτων σε ένα πληθυσμό σε σχέση με ένα γονότυπο θα απαιτούσε ένα αρκετά μεγάλο δείγμα. Το εμπόδιο αυτό υπερκεράστηκε με τη μέθοδο της μετα-ανάλυσης, όπου συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν τα ευρήματα όλων των σχετικών δημοσιευμένων μελετών μέχρι δεδομένη χρονική στιγμή, ώστε το προκύπτον δείγμα να έχει ικανή δύναμη για τις συσχετίσεις με γενετικούς δείκτες.

**A. Πολυμορφισμοί των υποψηφίων γονιδίων VDR, ESR και COLIA1 σε σχέση με την οστική πυκνότητα και δείκτες οστικού μεταβολισμού.**

### A) Ομάδα μελέτης

Στην μελέτη έλαβαν μέρος 154 γυναίκες που βρίσκονταν στο κλιμακτήριο, είτε στην εμμηνόπαυση. Η επιλογή των συμμετεχόντων στη μελέτη έγινε από μια σειρά 184 γυναικών που εξετάστηκαν διαδοχικά στο ενδοκρινολογικό εξωτερικό ιατρείο οστεοπόρωσης. Στο ιατρείο αυτό προσέρχονται: (i) γυναίκες που είναι ενήμερες για το πρόβλημα της οστεοπόρωσης και επιθυμούν να υποβληθούν σε προσδιορισμό οστικής πυκνότητας, ώστε να εκτιμηθεί η ύπαρξη ή όχι οστεοπόρωσης,



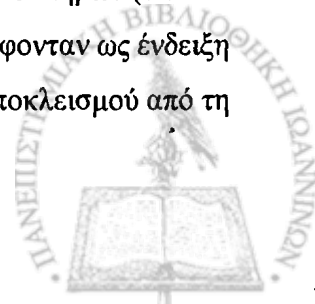
(ii) γυναίκες που παραπέμπονται από την πρωτοβάθμια περίθαλψη λόγω διαπίστωσης χαμηλής οστικής πυκνότητας και τέλος, (iii) γυναίκες που εξετάστηκαν για άλλο λόγο στο ενδοκρινολογικό εξωτερικό ιατρείο και παροτρύνθηκαν εξαιτίας της ηλικίας τους, της έλευσης της εμμηνόπαυσης και πιθανού κληρονομικού ιστορικού να υποβληθούν σε προσδιορισμό της οστικής πυκνότητας. Όλες οι γυναίκες που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη ήταν υγιείς, χωρίς ιστορικό χρονίων νοσημάτων, ενώ ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στον αποκλεισμό από τη μελέτη γυναικών που:

- Έπασχαν από νόσο που επηρεάζει τον οστικό μεταβολισμό και την οστική πυκνότητα όπως: υπερθυρεοειδισμός ( $n=11$ ), υπερπαραθυρεοειδισμός ( $n=2$ ), ανεπάρκεια βιταμίνης D ( $n=0$ ), σύνδρομο Cushing ( $n=1$ ).
- Βρίσκονταν τα τελευταία χρόνια υπό αγωγή με φάρμακα που επηρεάζουν τον οστικό μεταβολισμό όπως: κορτικοστεροειδή σε συστηματική λήψη ( $n=1$ ), διφωσφονικά ή καλσιτονίνη.
- Είχαν πολύ πρόωρη εμμηνόπαυση σε ηλικία μικρότερη των 35 ετών ( $n=2$ ).

Με βάση τα παραπάνω κριτήρια αποκλείστηκαν από τη μελέτη 17 άτομα ενώ από τα υπόλοιπα 167 που πληρούσαν τα κριτήρια για είσοδο στο πρωτόκολλο μελέτης τελικά συγκατατέθηκαν και μελετήθηκαν πλήρως τα 154.

Ως εμμηνόπαυση χαρακτηρίστηκε, για όσες γυναίκες είχαν ανέπαφη μήτρα, η απουσία εμμήνου ρύσεως για τουλάχιστον ένα έτος, ή για τουλάχιστον έξι μήνες και επίπεδα ωθηλακιοτρόπου ορμόνης σε μετεμμηνοπαυσιακά επίπεδα ( $FSH > 40$  IU/L) και συγχρόνως χαμηλά επίπεδα οιστραδιόλης, και για όσες γυναίκες είχαν υποβληθεί σε υστερεκτομή η αποδεδειγμένη σύγχρονη αμφοτερόπλευρη ωθηκεκτομή, ή σε αγνώστου τύπου επέμβαση τα μετεμμηνοπαυσιακά επίπεδα γοναδοτροπινών ( $FSH > 40$  IU/L και  $LH > 40$  IU/L) με σύγχρονα χαμηλά επίπεδα οιστραδιόλης. Σε κάθε γυναίκα καταγράφηκε επίσης το χρονικό διάστημα που είχε μεσολαβήσει από την επέλευση της εμμηνόπαυσης.

Το οικογενειακό ιστορικό, το ατομικό ιστορικό καταγμάτων, οι διατροφικές συνήθειες, το κάπνισμα και η λήψη αλκοόλ σημειώθηκαν για κάθε συμμετέχουσα στη μελέτη. Όλες οι γυναίκες συμπλήρωσαν ένα ερωτηματολόγιο για τη συχνότητα λήψης τροφών πλούσιων σε ασβέστιο. Επίσης καταγράφηκε η τυχόν λήψη ορμονικής θεραπείας υποκατάστασης (ΟΘΥ). Όλες οι εξεταζόμενες υποβλήθηκαν σε λεπτομερή λήψη ιατρικού ιστορικού και φυσική εξέταση που σε συνδυασμό με τον εργαστηριακό έλεγχο είχαν στόχο τον αποκλεισμό λανθάνουσων κλινικών καταστάσεων δευτεροπαθούς οστεοπόρωσης καθώς και νεοπλασιών όπως το πολλαπλούν μυέλωμα που μπορεί να έχουν ως πρώτη κλινική εκδήλωση την ελαττωμένη οστική πυκνότητα. Έτσι, αναζητήθηκαν στίγματα των παραπάνω παρατιθέμενων νόσων, όπως επίσης και της συστηματικής μαστοκύττωσης. Η υπερεκτασιμότητα των αρθρώσεων καθώς και η παρουσία μπλε σκληρών (απόντα σε όλες τις εξετασθείσες), εάν ήταν παρόντα κατά την κλινική εξέταση θα καταγράφονταν ως ένδειξη παρουσίας εγγενούς διαταραχής του μεταβολισμού του κολλαγόνου και ανάγκης αποκλεισμού από τη μελέτη.



Σε κάθε γυναίκα, έγινε καταγραφή σωματομετρικών στοιχείων -ύψους και βάρους- και υπολογίστηκε ο δείκτης μάζας σώματος (Body mass index, BMI).

## **B) Εργαστηριακός έλεγχος**

Ο εργαστηριακός έλεγχος περιελάμβανε έλεγχο νεφρικής και ηπατικής λειτουργίας, αφού παθήσεις των αντίστοιχων οργάνων επηρεάζουν τον οστικό μεταβολισμό, καθώς και αιματολογικό έλεγχο που περιελάμβανε γενική αίματος και προσδιορισμό ταχύτητας καθίζησης ερυθρών για αποκλεισμό αιματολογικών παθήσεων. Επίσης πραγματοποιήθηκε μέτρηση της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης για αποκλεισμό πρωτοπαθούς θυρεοειδικής νόσου.

Το pH των ούρων χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης απουσίας σωληναριακής οξέωσης που επίσης οδηγεί σε χαμηλή οστική πυκνότητα.

Για την εκτίμηση του οστικού μεταβολισμού εκτιμήθηκαν οι εξής παράμετροι:

**Στον ορό:** συγκέντρωση ολικού ασβεστίου διορθωμένη για τη συγκέντρωση λευκωματίνης, συγκέντρωση φωσφόρου, αλκαλική φωσφατάση, 25 υδροξυ-βιταμίνη D, οστεοκαλσίνη.

**Στα ούρα:** η συγκέντρωση ασβεστίου και νατρίου ούρων 24ώρου, ο λόγος ασβεστίου προς κρεατινίνη καθώς και ο λόγος υδροξυπρολίνης προς κρεατινίνη.

Οι βιοχημικές μετρήσεις έγιναν μετά από ολονύκτια νηστεία.

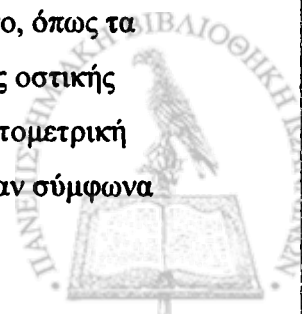
Ο αποκλεισμός πρωτοπαθούς υπερπαραθυρεοειδισμού έγινε με τη βοήθεια των επιπέδων ασβεστίου και φωσφόρου στον ορό, καθώς και των επιπέδων ασβεστίου ούρων 24ώρου, ενώ τα επίπεδα 25-υδροξυ-βιταμίνης D απέκλεισαν το ενδεχόμενο λανθάνουσας υποβιταμίνωσης D.

### **Μέθοδοι μετρήσεων:**

Οι συγκεντρώσεις 25 υδροξυ-βιταμίνης D και οστεοκαλσίνης προσδιορίστηκαν με ραδιοανοσομετρήσεις (RIA) χρησιμοποιώντας εμπορικά πακέτα (Inctar Co, Stillwater, Minnesota). Για την 25 υδροξυ-βιταμίνη D το εύρος μετρήσεων είναι 5-100 ng/ml. Η ευαισθησία της μεθόδου 3.0 ng/ml, ενώ η διακύμανση μεταξύ και διαμέσου μετρήσεων (intra- and inter-assay variation) είναι 5.19% και 7.61%, αντίστοιχα.

Για την οστεοκαλσίνη, η ευαισθησία της μεθόδου είναι 0.2 ng/ml, ενώ οι intra-assay και inter-assay διακυμάνσεις είναι 4.8% και 9.8%, αντίστοιχα.

Το κολλαγόνο περιέχει μεγάλες ποσότητες υδροξυπρολίνης (περίπου το 13% του περιεχομένου του σε αμινοξέα). Μεγάλες ποσότητες ελεύθερης υδροξυπρολίνης και πεπτιδίων που περιέχουν υδροξυπρολίνη εκκρίνονται στα ούρα, όταν κολλαγόνο ή ιστοί που περιέχουν κολλαγόνο, όπως τα οστά, αποδομούνται. Για αυτό το λόγο η υδροξυπρολίνη έχει χρησιμοποιηθεί ως δείκτης οστικής απορρόφησης. Η μέτρηση της υδροξυπρολίνης ούρων εικοσιτετραώρου έγινε με χρωματομετρική μέθοδο και, για να αποφευχθεί το ενδεχόμενο ανεπαρκούς συλλογής ούρων, διορθωνόταν σύμφωνα





με την απέκκριση κρεατινίνης. Τελικά εκφραζόταν ως λόγος υδροξυπρολίνης προς κρεατινίνη ούρων εικοσιτετραώρου (mg/mg κρεατινίνης). Παρομοίως, η εικοσιτετράωρη απέκκριση ασβεστίου εκφραζόταν ως λόγος ασβεστίου προς κρεατινίνη.

Οι υπόλοιπες μετρήσεις έγιναν με αυτοματοποιημένες μεθόδους στο εργαστήριο βιολογικής χημείας.

### Γ) Οστική πυκνομετρία οσφυϊκών σπονδύλων

Οι σπόνδυλοι αποτελούνται κυρίως από σπογγώδες οστόν το οποίο ανακατασκευάζεται σε πολύ ταχύτερο ρυθμό από το φλοιώδες, όπως επί παραδείγματι το ισχίο. Αυτό βέβαια το καθιστά πιο ευαίσθητο σε ταχείες μεταβολές του οστικού μεταβολισμού.

Στην παρούσα μελέτη, η επιλογή των οσφυϊκών σπονδύλων ως σημείο μέτρησης της οστικής πυκνότητας οφείλεται στο γεγονός ότι αυτή είναι η τοποθεσία που κατά κανόνα επηρεάζεται κατά τα πρώτα χρόνια μετά την εμμηνόπαυση και κατά συνέπεια σε ένα δείγμα γυναικών που διανύουν αυτή τη φάση της ζωής τους, αποτελεί ίσως το σημείο επιλογής, γιατί σε αυτή τη θέση του σκελετού γίνονται αισθητές μικρές διαφορές που μπορεί να οφείλονται σε ασθενείς επιδράσεις.

Σε όλες τις γυναίκες έγινε μέτρηση της οστικής πυκνότητας στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης (O<sub>2</sub>-O<sub>4</sub>) με απορροφησιμετρία διπλής ενέργειας ακτινών X σε 2 μηχανήματα διαφορετικού τύπου: Norland XR26 Mark II (Norland medical systems, Inc Fort Atkinson, WI) και Lunar DPX-L (Lunar Co., Madison, WI). Τα διάφορων τύπων μηχανήματα έχουν διαφορετική σχεδίαση, βαθμονόμηση και, κατά συνέπεια, διαφορετικές φυσιολογικές τιμές. Για να είναι συγκρίσιμες οι τιμές οστικής πυκνότητας των δύο μηχανημάτων μεταξύ τους, χρησιμοποιήθηκε ο παρατιθέμενος αλγόριθμος μετατροπής στις τιμές που μετρήθηκαν με το μηχάνημα DPX-L:<sup>114</sup>

$$\text{BMD}_{\text{NORLAND}} = (0,983 \times \text{BMD}_{\text{LUNAR}}) - 0,112$$



## Δ) Γενετικός έλεγχος

Ο καθορισμός των γονοτύπων έγινε με ανάλυση του γενετικού υλικού που εξήχθη από κάθε ασθενή. Η ανάλυση έγινε σε συγκεκριμένα τμήματα του DNA τα οποία εκλεκτικά πολλαπλασιάστηκαν και απομονώθηκαν με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Τα προϊόντα της PCR αποτελούν τμήματα των μελετούμενων υποψηφίων γονιδίων τα οποία περιέχουν το πολυμορφικό σημείο. Όλοι οι μελετηθέντες πολυμορφισμοί ήταν SNPs, δηλαδή πολυμορφισμοί ενός μόνου νουκλεοτιδίου και μελετήθηκαν με τη μέθοδο των πολυμορφισμών περιορισμού μήκους θραύσματος (Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLPs), με τη χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών, όπως θα περιγραφεί στη συνέχεια.

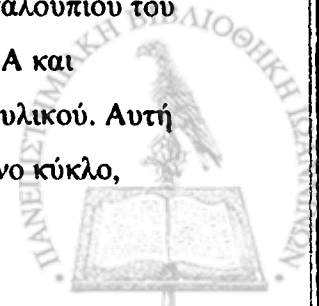
### Εξαγωγή DNA

Το DNA εξήχθη από λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος. Σε 1ml περιφερικού αίματος προστίθενται 1ml διαλύματος TKM και 25 μl NP-40. Μετά από ανάδευση το μίγμα φυγοκεντρείται για 10' στις 3000 στροφές/sec. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα πλένεται με 0.5ml TKM και μετά από καλή ανάδευση, ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10' στις 3000 στροφές/sec. Αυτή η διαδικασία του «πλυσίματος των λευκών αιμοσφαιρίων» επαναλαμβάνεται για τρεις έως τέσσερις φορές, μέχρι να εξαλειφθεί πλήρως το σκούρο ίζημα των ερυθροκυττάρων. Στη συνέχεια στο καθαρό ίζημα των λευκών αιμοσφαιρίων, προστίθενται 200 μl TKM και 15 μl SDS 10%. Το μίγμα επωάζεται για 5' σε υδατόλουτρο 55° C και στη συνέχεια προστίθενται 75μl διαλύματος NaCl 6M και γίνεται φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές/sec, για 5'. Μετά τη φυγοκέντρηση, μεταφέρεται προσεκτικά το υπερκείμενο -το οποίο περιέχει διαλυμένο το DNA- και προστίθενται 750 ml απόλυτης αιθανόλης που φυλάσσεται στους -20° C. Μετά από προσεκτική ελαφρά ανάδευση, η αιθανόλη απομακρύνει τα μόρια νερού από το διαλυμένο DNA το οποίο αποκτά μορφή επιπλέοντος βλεννώδους υλικού, το οποίο απομονώνεται με το ρύγχος μιας πιπέτας και διαλύεται σε 50 μl διαλύματος TE. Με αυτή τη μορφή, φυλάσσεται για όσο διάστημα χρειαστεί στους 4° C.

Η σύσταση των διαφόρων διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή DNA, όπως και για τις αντιδράσεις που ακολούθησαν παρατίθεται στο παράρτημα, στο τέλος του κεφαλαίου (σελίδα 51).

### Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Ο ειδικός πολλαπλασιασμός του DNA έγινε με PCR. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιεί πολλαπλούς κύκλους που συνίστανται σε αποδιάταξη (denaturing) του «καλουπιού του DNA», σύνδεση των εκκινητών στα αντίστοιχα σημεία των ανοικτών αλύσεων του DNA και επέκτασή τους (annealing) με σκοπό τον πολλαπλασιασμό αλληλουχιών του γενετικού υλικού. Αυτή η διαδικασία είναι εκθετική, αφού τα πολλαπλασιασμένα προϊόντα από τον προηγούμενο κύκλο,



χρησιμοποιούνται ως νέα «καλούπια» για τον επόμενο κύκλο πολλαπλασιασμού. Σύμφωνα με τις παραπάνω αρχές, η PCR αποτελεί μια εξαιρετικά ευαίσθητη τεχνική για την μελέτη των νουκλεϊκών οξέων. Κατά κανόνα, 20-30 κύκλοι δημιουργούν αρκετό προϊόν, ώστε να μπορεί να απεικονιστεί σε πήκτωμα κεχρωσμένο με βρωμιούχο αιθίδιο.

Το μηχάνημα που χρησιμοποιήθηκε για τις αντιδράσεις PCR ήταν τύπου DNA thermocycler PTC-100 (Peltier-Effect Cycling. MJ Research, Inc. USA). Συγκεκριμένα, διάλυμα που περιέχει 1μl DNA (από το διαλυμένο εξαχθέν DNA, διαλυμένο σε TE), 1 μονάδα ανασυνδυασμένης DNA πολυμεράσης, νουκλεοτίδια, τους εκκινητές για το συγκεκριμένο τμήμα του υπό μελέτη γονιδίου, ιόντα μαγνησίου και ρυθμιστικό διάλυμα υπόκειται σε διαδοχικούς κύκλους ραγδαίας μεταβολής θερμοκρασίας που αντιστοιχούν στα διαφορετικά στάδια πολλαπλασιασμού του συγκεκριμένου τμήματος του DNA: την αποδιάταξη (denaturing) που συνίσταται σε άνοιγμα της διπλής έλικας του DNA, ώστε να πάρει θέση η πολυμεράση και να ελευθερωθεί το «καλούπι» όπου θα σχηματιστεί νέα έλικα, την επανασύνδεση (annealing), δηλαδή τη συγκρότηση νουκλεοτιδίων στην ανοικτή έλικα με αποτέλεσμα από μια διπλή έλικα να προκύψουν δύο νέες και τέλος, την επέκταση (extension), οπότε επιτυγχάνεται σταθεροποίηση των παραπάνω διεργασιών πριν τον επόμενο κύκλο πολλαπλασιασμού.

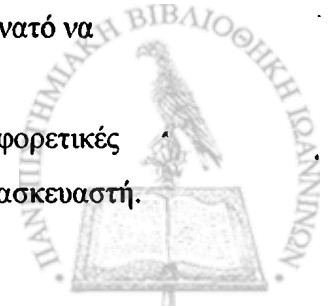
Μετά την PCR γινόταν δοκιμαστική ηλεκτροφόρηση 5μl του προϊόντος σε πήκτωμα αγαρόζης εμπλουτισμένο με βρωμιούχο αιθίδιο, για να διαπιστωθεί εάν η αντίδραση ήταν επιτυχής. Αυτό επιβεβαιωνόταν με την παρουσία ζωνών του αναμενόμενου, ανάλογα με το πολλαπλασιαζόμενο τμήμα, μοριακού βάρους.

### **Πολυμορφισμοί περιορισμού μήκους θραύσματος (Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLPs)**

Για την εφαρμογή αυτής της τεχνικής διερεύνησης του γενετικού υλικού χρησιμοποιούνται ειδικά ένζυμα, οι ενδονουκλεάσες περιορισμού (restriction endonucleases). Αυτές, όταν αναγνωρίσουν συγκεκριμένες αλληλουχίες τεσσάρων ή περισσότερων νουκλεοτιδίων στο DNA, κατατέμνουν καθεμιά από τις δύο συμπληρωματικές έλικες σε αυστηρά καθορισμένο σημείο, παράγοντας θραύσματα των οποίων το μέγεθος είναι ακριβώς υπολογίσιμο. Τα θραύσματα αυτά διαχωρίζονται με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης, αφού τα μικρότερα τμήματα ταξιδεύουν μακρύτερα στο πήκτωμα σε σχέση με τα μεγαλύτερα.

Πέρα από τις άλλες εφαρμογές της, αυτή η τεχνική χρησιμοποιείται και για την ανίχνευση SNPs. Κατά την διερεύνηση συγκεκριμένου πολυμορφισμού, το περιοριστικό ένζυμο επιλέγεται κατά τέτοιο τρόπο ώστε η ύπαρξη ή όχι του πολυμορφικού σημείου να σηματοδοτείται από την ύπαρξη ή όχι σημείου περιορισμού. Έτσι, ανάλογα με τον ηλεκτροφορητικό σχηματισμό είναι δυνατό να αναγνωριστούν οι γονότυποι ενός συγκεκριμένου πολυμορφισμού.

Τα προϊόντα της PCR επώαστηκαν με ειδικές περιοριστικές ενδονουκλεάσες σε διαφορετικές θερμοκρασίες και διαφορετικά χρονικά διαστήματα ανάλογα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.



### Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης

Τα προϊόντα της ενζυμικής πέψης για κάθε πολυμορφισμό ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο σε πυκνότητα 0.5μg/ml, για την ακόλουθη ανάγνωση και φωτογράφιση των ηλεκτροφορητικών ζωνών σε υπεριώδες φως. Ανάλογα με το μέγεθος των μελετούμενων ζωνών και την προβλεπόμενη μεταξύ τους απόσταση, χρησιμοποιήθηκαν μίγματα τριών τύπων αγαρόζης σε διαφορετικές αναλογίες (πίνακας 3). Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται τροποποίηση της ευαισθησίας και της διακριτικής ικανότητας του πηκτώματος. Το μέσο διάλυσης των διαφόρων τύπων αγαρόζης ήταν πάντα το TBE. Επίσης, η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιούνταν σε λουτρό διαλύματος TBE.

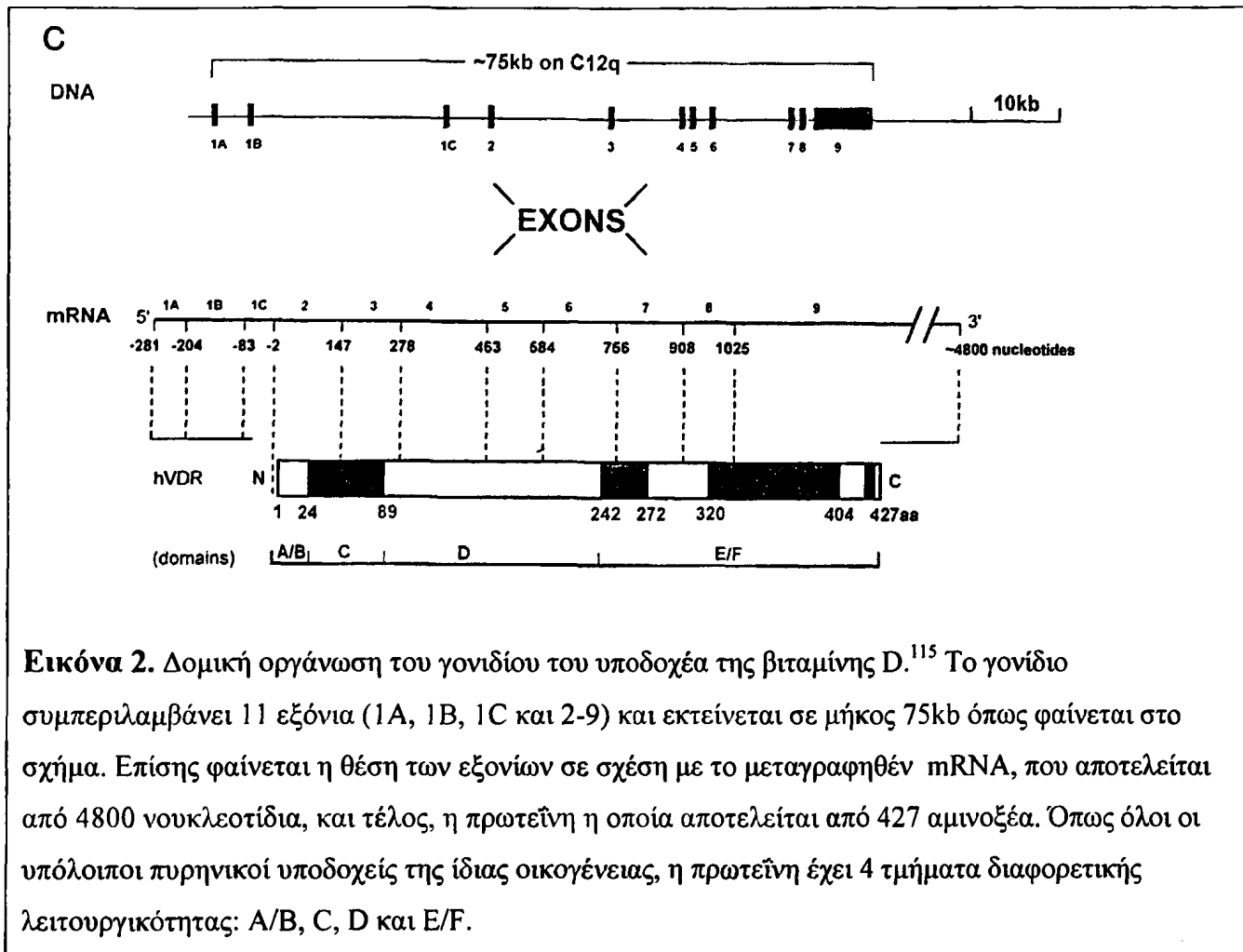
Ως πρότυπο μοριακών βαρών χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης ΦΧ 174/Hae III (Promega).



## Γονοτυπικοί προσδιορισμοί για τους μελετηθέντες πολυμορφισμούς

### ι. Καθορισμός γονοτύπων για το γονίδιο *VDR*

Το γονίδιο του υποδοχέα της βιταμίνης D εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 12 και συγκεκριμένα στην περιοχή *ch12q12-q14*. Περιλαμβάνει 11 εξόνια και το μήκος του είναι περίπου 75kb (εικόνα 2). Η 5' περιοχή περιλαμβάνει τρία εξόνια τα οποία όμως δεν μεταφράζονται τα 1A, 1B και 1C. Τα υπόλοιπα εξόνια που χαρακτηρίζονται με τους αριθμούς 2 έως 9 είναι αυτά που μεταφράζονται στην πρωτεΐνη (εικόνα 2).



**Εικόνα 2.** Δομική οργάνωση του γονιδίου του υποδοχέα της βιταμίνης D.<sup>115</sup> Το γονίδιο συμπεριλαμβάνει 11 εξόνια (1A, 1B, 1C και 2-9) και εκτείνεται σε μήκος 75kb όπως φαίνεται στο σχήμα. Επίσης φαίνεται η θέση των εξονίων σε σχέση με το μεταγραφθέν mRNA, που αποτελείται από 4800 νουκλεοτίδια, και τέλος, η πρωτεΐνη η οποία αποτελείται από 427 αμινοξέα. Όπως όλοι οι υπόλοιποι πυρηνικοί υποδοχείς της ίδιας οικογένειας, η πρωτεΐνη έχει 4 τμήματα διαφορετικής λειτουργικότητας: A/B, C, D και E/F.

Μελετήθηκαν δύο σημεία περιορισμού για αυτό το γονίδιο το *Bsm I* και το *Fok I*.

#### A) *Bsm I*:

Για τη μελέτη αυτού του σημείου περιορισμού έγινε απομόνωση και ειδικός πολλαπλασιασμός μιας ακολουθίας του γονιδίου της βιταμίνης D που εκτείνεται από το εξόνιο 7 έως το ιντρόνιο 8. Το ένζυμο *Bsm I*

Σημείο κοπής της καθεμίας από τις συμπληρωματικές έλικες του DNA από το *Bsm I*

GAATG CN↓N  
CTTAC↑GN N

αναγνωρίζει την αλληλουχία GAATGC και κόβει στο σημείο 1 την μία έλικα και στο σημείο -1 την συμπληρωματική έλικα.

Ο μελετούμενος πολυμορφισμός βρίσκεται στο ιντρόνιο 8. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό του τμήματος ήταν οι εξής: εμπρός (forward): 5'-AAC CAG CGG GAA GAG GTC AAG GG-3' και ανάστροφα (reverse): 5'-CAA CCA AGA CTA CAA GTA CCG CGT CAG TGA-3'. Το τμήμα που πολλαπλασιάστηκε είχε μέγεθος 825 bp. Το σημείο περιορισμού χωρίζει την περιοχή αυτή σε δύο θραύσματα μεγέθους 650 και 175 bp αντίστοιχα.

Η αντίδραση PCR έγινε σε συνολικό όγκο 20μl που περιείχε:

Buffer	2 μl
Mg <sup>2+</sup>	0.75 μl
dNTPs	2 μl
Primer 1	1 μl (συγκέντρωση 10pmol/μl)
Primer 2	1 μl (συγκέντρωση 10pmol/μl)
Taq DNA polymerase	0.3 μl
Gel	0.25 μl
H <sub>2</sub> O	11.7 μl
DNA	1 μl

Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

94° 3', 62° 1', 72° 2'.

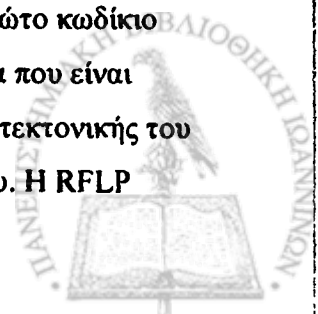
94° 20'', 62° 30'', 72° 1' x 5 κύκλους

94° 15'', 62° 15'', 72° 30'' x 24 κύκλους

Εν συνεχεία, η πέψη των προϊόντων της PCR έγινε με 2.5 μονάδες ενζύμου *Bsm I* (Gibco, BRL) για 2 ώρες στους 65° Κελσίου (πίνακας 3). Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός έγινε σε γέλη αγαρόζης NuSieve 3:1 σε πυκνότητα 1.5% (Ultra-Pure 0.5%, NuSieve 3:1 1%). Το ηλεκτροφορητικό πρότυπο που προκύπτει παρατίθεται στην εικόνα 5.

### B) *Fok I*:

Το γονίδιο του υποδοχέα της βιταμίνης D περιέχει 2 πιθανά σημεία έναρξης της πρωτεϊνικής μετάφρασης τα οποία αντιστοιχούν στο κωδικίο ATG. Ένας πολυμορφισμός T/C (αντικατάσταση δηλαδή του ATG από ACG) είναι πιθανό να υπάρχει στο πρώτο σημείο έναρξης ATG. Τα άτομα με τον T πολυμορφισμό έχουν 2 σημεία έναρξης και ξεκινούν νωρίτερα τη μετάφραση, δηλαδή από το πρώτο κωδικίο ATG. Όσα άτομα έχουν τον C πολυμορφισμό θα ξεκινήσουν τη μετάφραση αναγκαστικά από το δεύτερο κωδικίο έναρξης ATG. Η έναρξη της μετάφρασης στο πρώτο κωδικίο έναρξης -σε όσους φέρουν τον πολυμορφισμό T- θα οδηγήσει σε δημιουργία υποδοχέα που είναι μακρύτερος κατά 3 αμινοξέα. Η επιμήκυνση αυτή οδηγεί πιθανά σε μεταβολή της αρχιτεκτονικής του υποδοχέα και κατά συνέπεια θα μπορούσε να τροποποιήσει και τη λειτουργικότητά του. Η RFLP



μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε, αναπτύχθηκε με σκοπό να εντοπίζει τον T/C πολυμορφισμό στο πρώτο εναρκτήριο κωδικό ATG. Η παρουσία του σημείου περιορισμού *Fok I* που χαρακτηρίζεται με f, δείχνει ότι υπάρχει το πρώτο ATG, ενώ η απουσία του που χαρακτηρίζεται με κεφαλαίο F, ότι αυτό απουσιάζει.

Η περιοριστική ενδονουκλεάση *Fok I* αναγνωρίζει την αλληλουχία GGATG και κατατέμνει την αλυσίδα που περιέχει την συγκεκριμένη αλληλουχία 9 θέσεις πιο κάτω και την συμπληρωματική αλυσίδα 13 θέσεις πιο κάτω.

Το σημείο περιορισμού *Fok I* βρίσκεται στο εξόνιο 2 του γονιδίου VDR, και κατά συνέπεια χρειάστηκε να πολλαπλασιαστεί με PCR διαφορετικό τμήμα του γονιδίου από

Σημείο κοπής της καθεμίας από τις συμπληρωματικές έλικες του DNA από το *Fok I*

GGATGNNNNNNNNNN↓NNNNN  
CCTACNNNNNNNNNNNNNN↑N

αυτό που περιέχει τον πολυμορφισμό *Bsm I*, χρησιμοποιώντας τελείως διαφορετικό ζεύγος εκκινητών: forward: 5'-AGC TGG CCC TGG CAC TGA CTC TGC TCT-3' και reverse: 5'-ATG GAA ACA CCT TGC TTC TTC TCC CTC-3'. Το πολλαπλασιαζόμενο τμήμα είχε μήκος 265 bp, ενώ το σημείο περιορισμού το χώριζε σε 2 τμήματα μήκους 196 bp και 69 bp, αντίστοιχα.

Η αντίδραση PCR έγινε σε συνολικό όγκο 50μl που περιείχε:

Buffer	5 μl
Mg <sup>2+</sup>	1.5 μl
dNTPs	5 μl
Primer 1	1 μl (συγκέντρωση 10pmol/μl)
Primer 2	1 μl (συγκέντρωση 10pmol/μl)
Taq DNA polymerase	0.2 μl
Gel	0.3 μl
H <sub>2</sub> O	35 μl
DNA	1μl

Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

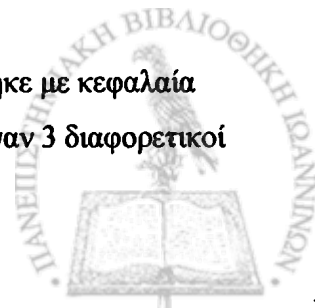
94° 4'

94° 45'', 60° 45'', 72° 45'' x33 κύκλους

72° 5'

Η επώαση των προϊόντων PCR με 2 μονάδες ενζύμου *Fok I* (Biolabs, Inc. New England) (πίνακας 3) πραγματοποιήθηκε στους 37°C για 2 ώρες, ενώ για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε γέλη αγαρόζης 2.4% (NuSieve 1.2%, Metaphor 0.6% και Ultra Pure 0.6%). Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης φαίνεται στην εικόνα 6.

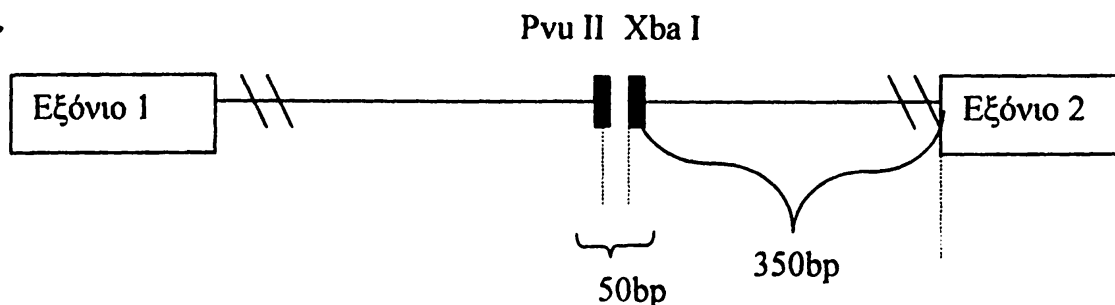
Η απουσία του σημείου περιορισμού για κάθε αλληλόμορφο χαρακτηρίστηκε με κεφαλαία γράμματα και η παρουσία του με μικρά. Συνεπώς για κάθε πολυμορφισμό προέκυψαν 3 διαφορετικοί γονότυποι: BB/Bb/bb για τον *Bsm I* και FF/Ff/ff για τον *Fok I*.



## ii. Καθορισμός γονοτύπων για το γονίδιο ER

Το γονίδιο του οιστρογονικού υποδοχέα α βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6 και συγκεκριμένα στην περιοχή 6q25.1. Το μήκος του είναι περίπου 140kb και περιλαμβάνει 8 εξόνια.

Για το γονίδιο του υποδοχέα των οιστρογόνων μελετήθηκαν επίσης δύο σημεία περιορισμού: το *Xba I* και το *Pvu II*. Και τα δύο αυτά σημεία βρίσκονται στο ιντρόνιο 1 του γονιδίου. Κατά την αντίδραση PCR πολλαπλασιάστηκε περιοχή του γονιδίου που περιελάμβανε μέρος του ιντρονίου 1 και του εξόνιου 2. Λόγω της πολύ στενής γειτνίασης των δύο σημείων περιορισμού –απόσταση μόλις περίπου 50 bp μεταξύ τους (εικόνα 3)- για τον καθορισμό των δύο πολυμορφισμών έγινε μόνο μια αντίδραση PCR και χρησιμοποίηση ενός μόνου ζευγαριού εκκινητών: forward: 5'-CTG CCA CCC TAT CTG TAT CTT TTC CTA TTC TCC-3', που αντιστοιχεί σε περιοχή του ιντρονίου 1 περίπου 1300 kb από το εξόνιο 2 και reverse: 5' -TCT TTC TCT GCC ACC CTG GCG TCG ATT ATC TGA-3' που αντιστοιχεί στα νουκλεοτίδια 692-797 στο εξόνιο 2 σε απόσταση 8 νουκλεοτιδίων από το ιντρόνιο 1.



Εικόνα 3. Τμήμα του ER γονιδίου που περιέχει τα δύο σημεία περιορισμού για τα ένζυμα *Pvu II* και *Xba I*. Το *Xba I* βρίσκεται σε απόσταση περίπου 50bp από το *Pvu II*. Και τα δύο βρίσκονται στο ιντρόνιο 1, περίπου 350bp πριν το εξόνιο 2.<sup>59</sup>

Το τμήμα του γονιδίου που πολλαπλασιάστηκε είχε μέγεθος περίπου 1.3 kb. Η πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *Pvu II* έδωσε –σε περίπτωση ύπαρξης του σημείου περιορισμού- 2 θραύσματα μεγέθους 0.85 και 0.45 kb αντίστοιχα.

Παρομοίως η πέψη με το *Xba I* έδωσε –επί

Σημείο κοπής της καθεμίας από τις συμπληρωματικές έλικες του DNA από το *Pvu II*

CAG↓CTG  
GTC↑GAC

και το *Xba I*

T↓CTAG A  
A GATC↑T





υπάρξεως του σημείου περιορισμού- 2 θραύσματα μεγέθους 0.9 και 0.4kb.

Η αντίδραση PCR έγινε σε συνολικό όγκο 50μl που περιείχε:

Buffer	5μl
Mg <sup>2+</sup>	4μl
DNTPs	5μl
Primer 1	3μl (συγκέντρωση 10pmol/μl)
Primer 2	3μl (συγκέντρωση 10pmol/μl)
Taq DNA polymerase	0.3μl
Gel	0.3μl
H <sub>2</sub> O	28.4μl
DNA	1μl

Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

94° 2'

94° 1', 62° 1', 72° 1'30'' x33 κύκλους

72° 10'

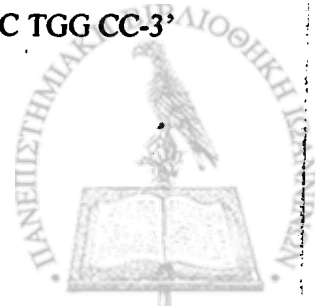
Τα προϊόντα PCR επωάστηκαν στους 37° C με 10 μονάδες ενζύμου *Xba* I (Gibco, BRL) για 12 ώρες και με 5 μονάδες *Pvu* II (Biolabs, Inc. New England) για 2 ώρες (πίνακας 3). Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των προϊόντων πραγματοποιήθηκε σε αгарόζη metaPhor και πυκνότητα 3% (Ultra-Pure 0.8%, MetaPhor 2.2%). Τα ηλεκτροφορητικά πρότυπα που προκύπτουν απεικονίζονται στις εικόνες 7 και 8. Οι γονότυποι που προκύπτουν από την παραπάνω διαδικασία είναι PP/Pp/pp και XX/Xx/xx για το *Pvu* II και το *Xba* I αντίστοιχα, με τα κεφαλαία γράμματα να αντιστοιχούν στην απουσία του σημείου περιορισμού.

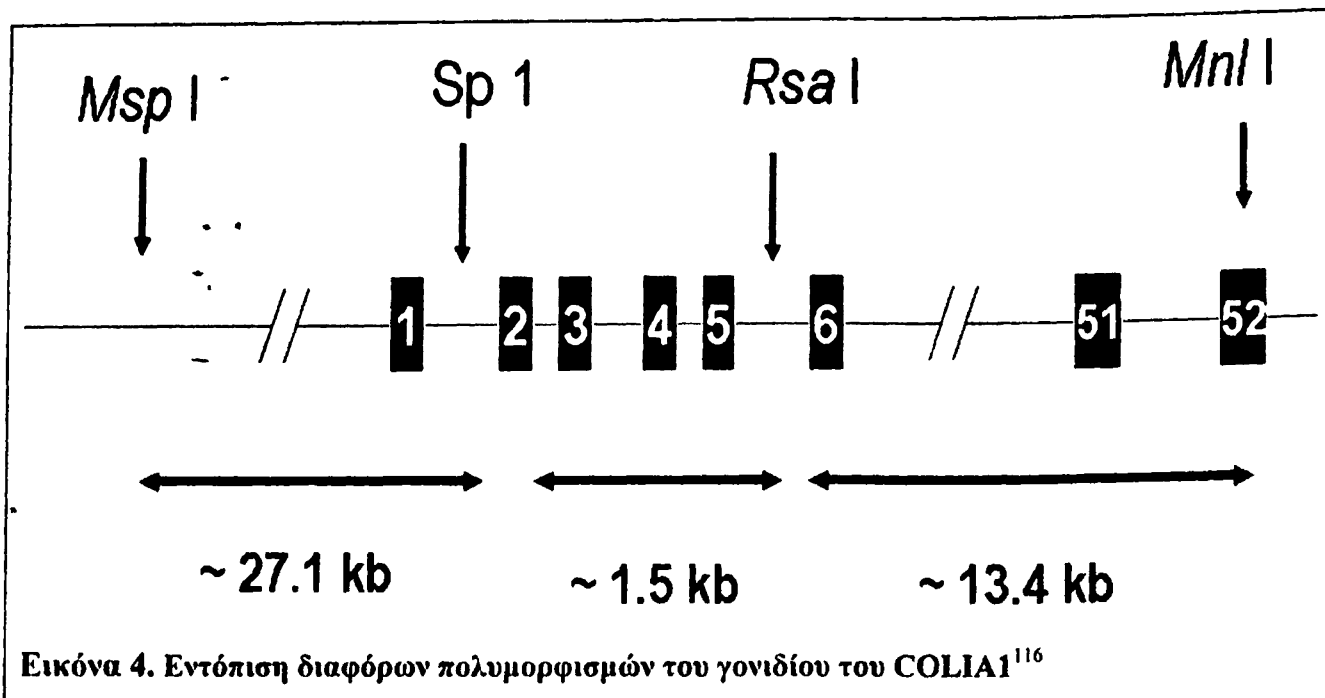
### iii. Καθορισμός γονοτύπου για το γονίδιο *COL1A1*

Το γονίδιο που κωδικοποιεί το κολλαγόνο τύπου Ia 1 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17 στη θέση 17q21.31-q22.

Μελετήθηκε πολυμορφισμός που εντοπίζεται στην περιοχή σύνδεσης του μεταγραφικού παράγοντα Sp 1, σε ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου (εικόνα 4). Ο πολυμορφισμός συνίσταται σε αντικατάσταση μιας βάσης γουανίνης από μια βάση θυμίνης (G→T) στο πρώτο νουκλεοτίδιο της περιοχής σύνδεσης του Sp1 που βρίσκεται στο πρώτο ιντρόνιο του γονιδίου του κολλαγόνου τύπου Ia1.

Η περιοχή που περιέχει τον επαγωγέα και το πρώτο ιντρόνιο του γονιδίου του κολλαγόνου τύπου Ia 1 πολλαπλασιάστηκε με PCR χρησιμοποιώντας ένα ζευγάρι εκκινητών: forward: 5'-TAA CTT CTG<sup>-</sup> GAC TAT TTG CGG ACT TTT TGG-3' και reverse: 5'-GTC CAG CCC TCA TCC TGG CC-3'





Η αντίδραση PCR έγινε σε συνολικό όγκο 50μl που περιείχε:

Buffer	2.5μl
Mg <sup>2+</sup>	1.5μl
dNTPs	2.5μl
Primer 1	1μl (συγκέντρωση 10pmol/μl)
Primer 2	1μl (συγκέντρωση 10pmol/μl)
Taq DNA polymerase	0.2μl
Gel	0.3μl
H <sub>2</sub> O	15μl
DNA	1μl

Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

94° 3'

94° 30'', 62° 60'', 72° 90'' x40 κύκλους

72° 5'

Μέσα στην περιοχή η οποία πολλαπλασιάστηκε και είχε μέγεθος 264 bp, βρίσκεται η περιοχή σύνδεσης του μεταγραφικού παράγοντα Sp1. Η περιοριστική ενδονουκλεάση *Msc I* αναγνωρίζει την αλληλουχία TGGCCA. Έτσι, τέμνει το πολλαπλασιασμένο τμήμα του γονιδίου μόνο επί παρουσίας της αντικατάστασης της γουανίνης από θυμίνη και δίνει δύο θραύσματα μεγέθους 246 bp και 18 bp, αντίστοιχα.

Σημείο κοπής της καθεμίας από τις συμπληρωματικές έλικες του DNA από το *Msc I*

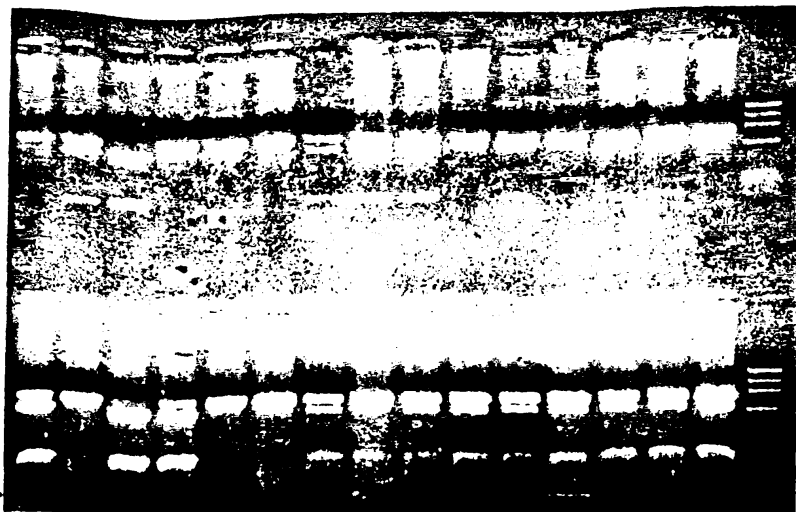
5'-TGG↓CCA-3'  
3'-ACC↑GGT-5'



Τα προϊόντα PCR επώαστηκαν με 5 μονάδες ενζύμου *Msc* I (Biolabs, Inc. New England) στους 37°C για 2 ώρες και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης NuSieve 3:1 πυκνότητας 3% (Ultra-Pure 0.8%, NuSieve 3:1 2.2%). Οι ηλεκτροφορητικές ζώνες που προκύπτουν από την πέψη του συγκεκριμένου τμήματος φαίνονται στην εικόνα 9.

Οι προκύπτοντες γονότυποι χαρακτηρίστηκαν ως SS/Ss/ss, όπου τα κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν την απουσία της αντικατάστασης G→T και κατά συνέπεια του σημείου περιορισμού για το ένζυμο *Msc* I.

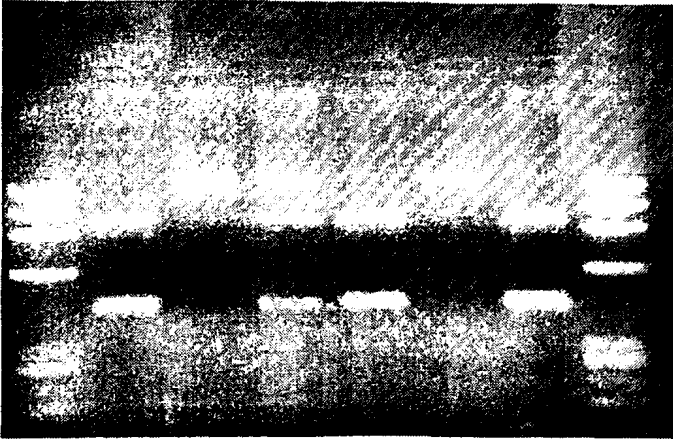




Εικόνα 5. Ζώνες που προκύπτουν κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης κατά τη διερεύνηση του πολυμορφισμού *Bsm I* του γονιδίου VDR.



Εικόνα 6. Ζώνες που προκύπτουν κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης κατά τη διερεύνηση του πολυμορφισμού *Fok I* του γονιδίου VDR.



Εικόνα 7. Ζώνες που προκύπτουν κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης κατά τη διερεύνηση του πολυμορφισμού *Pvu II* του γονιδίου VDR.



Εικόνα 8. Ζώνες που προκύπτουν κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης κατά τη διερεύνηση του πολυμορφισμού *Xba I* του γονιδίου VDR.



Εικόνα 9. Ζώνες που προκύπτουν κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης κατά τη διερεύνηση του πολυμορφισμού *Sr 1* του γονιδίου COLIA1 με την περιοριστική ενδονουκλεάση *Msc I*.



**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**

Περιγραφή αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν κατά τον γονοτυπικό προσδιορισμό των μελετούμενων γυναικών

**ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ****A) Εξαγωγή DNA**

**TKM:** 10mM Tris-HCl, pH=7.6; 10mM KCl; 2mM EDTA; 4mM MgCl<sub>2</sub>

**TE:** 10mM Tris-HCl, pH=7.8; 1mM EDTA, pH=8

**NP-40:** Nonylphenoxy Polyethoxy Ethanol (Sigma)

**SDS:** Sodium dodecyl sulphate (Sigma)

**B) Παρασκευή πηκτώματος αгарόζης**

**TBE:** 89mM Tris-HCl; 89mM Boric Acid; 2.5mM EDTA

**Γ) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης**

**Buffer:** 50mM KCl; 20mM Tris-HCl, pH=8.4; 2mg/ml BSA

**d-NTPs:** 2mM (ισομοριακό μίγμα dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Promega)

**Ιόντα Mg (MgCl<sub>2</sub>):** 1.5 mM

**Ταq DNA πολυμεράση:** 1 μονάδα (Gibco, BRL)

**Γενομικό DNA:** 300-500μg



**Πίνακας 3.** Συνθήκες πέψης με τα περιοριστικά ένζυμα καθώς και πυκνότητες και σύνθεση των πηκτωμάτων αγαρόζης που χρησιμοποιήθηκαν για την ηλεκτροφόρηση, για καθένα από τους μελετηθέντες πολυμορφισμούς.

	<b>Bsm I</b>	<b>Fok I</b>	<b>Pvu II</b>	<b>Xba I</b>	<b>Msc I</b>
<b>Buffer (μl)</b>	2	2	2	2	2
<b>Ένζυμο (μl)</b>	0.5	1	0,5	1	1
<b>Προϊόν PCR (μl)</b>	10	10	10	10	10
<b>H<sub>2</sub>O (μl)</b>	7.5	7	7,5	7	7
<b>Θερμοκρασία (°C)</b>	65	37	37	37	37
<b>Χρόνος επώασης</b>	2 ώρες	2 ώρες	2 ώρες	18 ώρες	2 ώρες
<b>Πήκτωμα αγαρόζης %</b>	<b>1.5</b>	<b>2.4</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
Ultra Pure	0.5	0.6	0.8	0.8	0.8
NuSieve 3:1	1	1.2	0	0	2.2
Metaphore	0	0.6	2.2	2.2	0



## Ε) Στατιστική ανάλυση

Για να εξεταστεί κατά πόσο οι αναλογίες που παρατηρήθηκαν στον πληθυσμό μας είναι αυτές που αναμένονται σε ένα τυχαία αναπαραγόμενο πληθυσμό και κατά συνέπεια κατά πόσο η επιλογή του μελετηθέντος δείγματος έγινε αμερόληπτα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος  $\chi^2$  κάτω από τον νόμο ισορροπίας των Hardy-Weinberg για κάθε πολυμορφισμό. Η θεωρία των Hardy-Weinberg προβλέπει την συμπεριφορά των αλληλομόρφων και τις γονοτυπικές συχνότητες σε πληθυσμούς. Συγκεκριμένα, η θεωρία αυτή υποθέτει ότι απουσία ειδικών παραγόντων όπως μεταλλάξεων, μετανάστευσης, φυσικής επιλογής και φυλοσύνδετων αλληλομόρφων, ένας πληθυσμός μπορεί να αποκτήσει και να διατηρήσει μια ισορροπία των γονοτυπικών αναλογιών μετά από μια γενιά τυχαίου ζευγαρώματος. Έτσι, η απόκλιση ενός πληθυσμού από την ισορροπία Hardy-Weinberg σημαίνει ότι πιθανά ισχύει κάποια από τις παραπάνω περιπτώσεις ή η επιλογή του δείγματος δεν έγινε αμερόληπτα και τα συμπεράσματα που θα εξαχθούν από τη μελέτη αυτού του πληθυσμού είναι λανθασμένα.

Κατά την αρχική εκτίμηση των δεδομένων, οι διαφορές των συνεχών μεταβλητών μεταξύ διαφορετικών γονοτύπων εξετάστηκαν με unpaired t-tests (για δύο ομάδες) και με one-way ANOVA (για τρεις ομάδες). Συγκεκριμένα, για τις συγκρίσεις της οστικής πυκνότητας ανάμεσα στις τρεις ομάδες γονοτύπων, έγινε προσαρμογή των τιμών ως προς την ηλικία σε γενικευμένα γραμμικά μοντέλα. Η χρήση μη παραμετρικών μεθόδων (Mann-Whitney U test και Kruskal-Wallis analysis of variance αντίστοιχα) έδωσε παρόμοια αποτελέσματα.

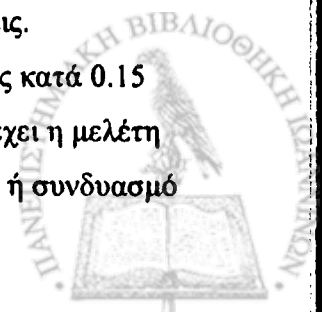
Στη συνέχεια, για να εξεταστεί το ενδεχόμενο της ανεξάρτητης επίδρασης των μελετηθέντων γονοτύπων στη BMD, χρησιμοποιήθηκαν πολυπαραγοντικές γραμμικές εξαρτήσεις. Έτσι, για να εξαλειφθεί το ενδεχόμενο πιθανής παρεμβολής από παράγοντες που επίσης επηρεάζουν την οστική πυκνότητα, και συγκεκριμένα από την ηλικία, το βάρος, το ύψος και τη χρήση ορμονικής θεραπείας υποκατάστασης, έγινε προσαρμογή της BMD ως προς αυτούς τους παράγοντες.

Παράλληλα, εκτιμήθηκαν και πιθανές αλληλεπιδράσεις (interaction terms) μεταξύ διαφορετικών πολυμορφισμών για να εντοπιστεί πιθανή συνέργεια μεταξύ τους.

Τα μοντέλα στηρίζονται στη μέθοδο των μη σταθμισμένων ελαχίστων τετραγώνων (unweighted least squares).

Τέλος, χρησιμοποιήθηκε μοντέλο οπισθοδρομικής εξάλειψης μεταβλητών (backward elimination model), για να διαπιστωθεί ποιος είναι ο ισχυρότερος προγνωστικός παράγοντας από τους συμπεριλαμβανόμενους στο μοντέλο. Η μέθοδος στηρίχτηκε σε τιμές  $p > 0.10$  για απομάκρυνση μιας μεταβλητής από το μοντέλο και  $p < 0.05$  για επανείσοδο.

Η ισχύς της μελέτης ήταν επαρκής για να ανιχνεύσει τις περισσότερες επιδράσεις. Συγκεκριμένα, δεδομένης της αναμενόμενης τυπικής απόκλισης της οστικής πυκνότητας κατά  $0.15 \text{ g/cm}^2$  στον πληθυσμό, θα χρειαζόταν αριθμός τουλάχιστον 150 συμμετεχόντων για να έχει η μελέτη πλήρη ισχύ (>80%) για να μελετήσει διαφορές της τάξης των  $0.08 \text{ g/cm}^2$  σε γονότυπους ή συνδυασμό





γονοτύπων που εμφανίζονται σε ποσοστό τουλάχιστον 25% των συμμετεχόντων στη μελέτη για επίπεδο  $\alpha=0.05$ . Τις προϋποθέσεις αυτές πληρούσαν οι πολυμορφισμοί *Bsm I*, *Pvu II* και *Xba I*, ενώ για τους πολυμορφισμούς *Sr 1* και *Fok I* τα παραπάνω ίσχυαν κατά τη συγχώνευση των ετεροζυγωτών με τους υπολειπόμενους ομοζυγώτες (*Ss* μαζί με *ss* και *Ff* με *ff*). Η μελέτη είχε ισχύ 63% για να ανιχνεύσει διαφορά της τάξεως των  $0.10 \text{ g/cm}^2$  κατά την εξέταση του *ss* γονοτύπου μεμονωμένα, με βάση την συχνότητά του που ήταν 8.4%. Η μόνη πραγματική αδυναμία της μελέτης ήταν η μελέτη μεμονωμένα του *ff* γονοτύπου ο οποίος είχε μικρότερη συχνότητα στον πληθυσμό και κατά συνέπεια θα χρειαζόταν πολύ μεγαλύτερος αριθμός ασθενών για να ανιχνεύσει διαφορές της τάξεως του  $0.10 \text{ g/cm}^2$  με  $\alpha=0.05$ .



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Χαρακτηριστικά συμμετεχόντων

Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των γυναικών που συμμετείχαν στη μελέτη φαίνονται στον πίνακα 4. Η ηλικία των συμμετεχόντων κυμαινόταν από 35 έως 76 (ενδοτεταρτημοριακό εύρος, 49 με 59).

Το βάρος, το ύψος και ο δείκτης μάζας σώματος είναι αντιπροσωπευτικά του γυναικείου πληθυσμού της περιοχής.

Δώδεκα γυναίκες ήταν περιεμμηνοπαυσιακές (επέλευση χρόνου λιγότερο από 1 έτος από το χρόνο εμμηνόπαυσης). Τριάντα γυναίκες είχαν υποστεί χειρουργική εμμηνόπαυση. Μόνο 11 γυναίκες έκαναν χρήση ορμονικής θεραπείας υποκατάστασης (7%).

Η πλειοψηφία, είχε διαιτολόγιο ενδεικτικό επαρκούς ημερήσιας πρόσληψης ασβεστίου. Μόνο τρεις γυναίκες δήλωσαν ότι κατανάλωναν συστηματικά αλκοόλ, αλλά σε καμμία περίπτωση η κατανάλωση δεν ξεπερνούσε τις 30 μονάδες αλκοόλ ανά εβδομάδα. Εξάλλου, καμμία από τις τρεις γυναίκες δεν είχε αυξημένες τρανσαμινάσες ή άλλη ένδειξη ηπατικής δυσλειτουργίας. Σε καμμία γυναίκα δεν παρατηρήθηκαν σημεία υποθρεψίας ή ενδείξεις συνδρόμου δυσασπορρόφησης.

Δεκαεπτά γυναίκες ανέφεραν τουλάχιστον ένα κάταγμα ανεξαρτήτως σκελετικού σημείου.

Οι βιοχημικές παράμετροι του μελετούμενου πληθυσμού στο σύνολό του καθώς και η οστική πυκνότητα παρατίθενται στον πίνακα 5. Σε γενικές γραμμές η ομάδα ήταν οστεοπενική με διάμεσο t-score ίσο με  $-2.23$  (ενδοτεταρτημοριακό εύρος,  $-1.26$  έως  $-3.2$ ). Αναλυτικότερα, σύμφωνα με τα κριτήρια του WHO, από τις 154 γυναίκες 30 (19.5%) ήταν φυσιολογικές, 57 (37%) είχαν οστεοπενία και 67 (43.5%) είχαν οστεοπόρωση.

Η συχνότητα των τριών γονοτύπων για κάθε πολυμορφισμό χωριστά φαίνεται στον πίνακα 6.

Στον πίνακα 7 φαίνονται αναλυτικά οι τιμές σωματομετρικών και εργαστηριακών παραμέτρων κατά γονότυπο για κάθε πολυμορφισμό ξεχωριστά. Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα σωματομετρικά χαρακτηριστικά ανάμεσα στους γονοτύπους για κανένα πολυμορφισμό όπως φάνηκε κατά την εφαρμογή της μεθόδου ANOVA (πίνακας 8). Εξαίρεση αποτέλεσαν οι ομόζυγες ff γυναίκες που ήταν οριακά βαρύτερες από τις FF και Ff (78.4 kg οι ff, έναντι 69.5 kg και 68.5 kg οι FF και Ff αντίστοιχα), με αποτέλεσμα να έχουν στατιστικά σημαντικά υψηλότερο BMI συγκριτικά με τους δύο άλλους Fok I γονοτύπους (31.6 kg/m<sup>2</sup> οι ff, έναντι 28.6 kg/m<sup>2</sup> και 27.5 kg/m<sup>2</sup> οι FF και Ff αντίστοιχα) (πίνακας 7). Επίσης, η ηλικία επέλευσης εμμηνόπαυσης ήταν περίπου ίδια, για όλους τους γονοτύπους. Τέλος, οι ομάδες των γονοτύπων για κάθε πολυμορφισμό δεν διέφεραν μεταξύ τους σε καμμία από τις βιοχημικές παραμέτρους που μετρήθηκαν, ούτε στους δείκτες του οστικού μεταβολισμού (πίνακας 8).



**Πίνακας 4. Δημογραφικά χαρακτηριστικά γυναικών**

Παράμετρος	Τιμή
Ηλικία (έτη)	54.2±7.7
Βάρος (Kg)	69.6±11.1
Ύψος (cm)	155.9±5.7
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	28.4±4
Ηλικία εμμηνόπαυσης (έτη)	45.3±5.3
HRT (%)	7
Κάπνισμα (%)	13
Σημαντική κατανάλωση αλκοόλ (%)	2
Δίαιτα πλούσια σε ασβέστιο (%)	60

Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± SD ή εκατοστιαίο ποσοστό.

**Πίνακας 5. Βιοχημικές παράμετροι και οστική πυκνότητα**

Παράμετρος	Τιμή
Οστεοκαλσίνη (ng/ml) *	3.2 (1.6-4.9)
1,25(OH) <sub>2</sub> vit D (pg/ml) *	17.7 (9.8-28.2)
25 OH vit D (ng/ml) *	25.7 (14.5-31.1)
Ασβέστιο (mg/dl)	9.5±0.5
Φωσφορικά (mg/dl)	3.5±0.5
Αλκαλική φωσφατάση (mU/L)	168±52
Ασβέστιο/κρεατινίνη ούρων (mg/mg) *	0.13 (0.09-0.2)
OH-Προλίνη / κρεατινίνη ούρων (mg/mg) *	0.005 (0.002-0.009)
BMD ΟΜΣΣ (g/cm <sup>2</sup> )	0.838±0.165

Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή ± SD, εκτός από αυτές των παραμέτρων που φέρουν αστερίσκο (\*) οι οποίες εκφράζονται ως διάμεση τιμή και ενδοτεταρτημοριακό εύρος (IQR)



**Πίνακας 6. Συχνότητα των τριών γονοτύπων για κάθε ένα από τους 5 μελετούμενους πολυμορφισμούς**

		Αριθμός	Αναλογία %
<b>Υποδοχέας βιταμίνης D</b>			
<i>Fok I</i>	FF	94	61
	Ff	52	33.8
	ff	8	5.2
<i>Bsm I</i>	BB	38	25.2
	Bb	76	50.3
	bb	37	24.5
<b>Οιστρογονικός υποδοχέας α</b>			
<i>Xba I</i>	XX	25	16.4
	Xx	83	54.6
	xx	44	28.9
<i>Pvu II</i>	PP	42	27.6
	Pp	68	44.7
	pp	42	27.6
<b>Κολλαγόνο τύπου Ia 1</b>			
<i>Spl</i>	SS	98	63.6
	Ss	43	27.9
	ss	13	8.4

Δεν κατέστη δυνατό να προσδιοριστεί ο γονότυπος δύο γυναικών ως προς τους πολυμορφισμούς του γονιδίου *ESRa* και τριών γυναικών ως προς τον πολυμορφισμό *BsmI* του γονιδίου *VDR*.



**Πίνακας 7. Δημογραφικά και εργαστηριακά ευρήματα του μελετούμενου πληθυσμού ανά γονότυπο για καθένα από τους 5 μελετούμενους πολυμορφισμούς.**

**A. Πολυμορφισμός γονιδίου COL1A**

Παράμετροι	Πολυμορφισμός Sp 1		
	SS	Ss	ss
Ηλικία	54.5 ±7.7	54.2 ±7.9	51.1 ±6.9
Βάρος	69.5 ±10.5	70.2 ±13.2	70.4 ±7.3
Υψος	156 ±5.7	155.6 ±6.1	155 ±3.4
BMI	28.3 ±3.7	28.5 ±4.9	29.3 ±3.8
Ηλικία εμμηναρχής	14.3 ±4.7	13.4 ±1.9	13.6 ±1.7
Ηλικία εμμηνόπαυσης	45.8 ±5	45.8 ±5.8	43.5 ±5.9
Οστεοκαλσίνη *	3.1 (1.4-4.9)	3.5 (2.15-4.78)	2.8 (2.1-5.4)
25(OH) vit D *	21.5 (13.2-29)	27.7 (15.8-41.5)	26.8 (23.6-36.2)
Ασβέστιο	9.5 ±0.5	9.5 ±0,5	9.6 ±0.5
Φωσφορικά	3.4 ±0.5	3.4 ±0.6	3.6 ±0.3
Αλκαλική φωσφατάση	167.9 ±52.8	164.8± 47.1	205.7 ± 57.3
OH-προλίνη/κρεατινίνη ούρων *	0.006 (0.002-0.009)	0.005 (0.003-0.01)	0.007 (0.002-0.008)
Ασβέστιο/κρεατινίνη ούρων *	0.14 (0.09-0.2)	0.12 (0.07-0.2)	0,1 (0.08-0.16)
BMD (L2-L4)	0.842 ±0.169	0.855 ±0.158	0.762 ±0.139
Z-score	-0.8 ±1.5	-1 ±1.4	-1.7 ±1
T-score	-2.2 ±1.5	-2 ±1.4	-2.9 ±1.3

Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή ± SD, εκτός από αυτές των παραμέτρων που φέρουν αστερίσκο

(\* ) οι οποίες εκφράζονται ως διάμεση τιμή και IQR



## Β. Πολυμορφισμοί γονιδίου VDR

	Πολυμορφισμός Bsm I			Πολυμορφισμός Fok I		
	BB	Bb	bb	FF	Ff	ff
Ηλικία	52.8 ±7.8	54.8 ±7.2	54.1 ±8.7	54.6 ±7.7	54 ±7.5	50.4 ±8.6
Βάρος	69.2 ±11.2	70.2 ±11.8	68 ±9.3	69.5 ±10.6	68.5 ±11.6	78.4 ±10.7
Υψος	155.6 ±6.2	155.9 ±5.1	156 ±6.5	155.5 ±6	156.3 ±5.3	157.5 ±5
BMI	28.3 ±4	28.6 ±4.4	27.6 ±3	28.6 ±3.9	27.5 ±3.9	31.6 ±4.2
Ηλικία εμμηναρχής	15.2 ±7.7	13.7 ±1.7	13.5 ±1.9	13.8 ±1.7	14.6 ±6.2	13.4 ±3.2
Ηλικία εμμηνόπαυσης	45.4 ±5.1	45.1 ±5.5	45.3 ±5.2	45.7 ±5.2	44.6 ±5.4	46.7 ±4.4
Οστεοκαλσίνη *	2.5 (1.4-4.5)	3.2 (1.5-5.1)	3.1 (2.6-5)	2.8 (1.5-5)	3.4 (2.2-4.9)	2.7 (1.7-2.9)
25(OH) vit D *	26.3 (17.3-29)	26.1 (13.1-31.4)	22.6 (15.2-36.8)	21.7 (14.5-29)	26.4 (15.7-31.7)	29.2 (17-33.6)
Ασβέστιο	9.6 ±0.4	9.5 ±0.5	9.5 ±0.5	9.6 ±0.5	9.6 ±0.4	9.2 ±0.4
Φωσφορικά	3.5 ±0.5	3.5 ±0.5	3.5 ±0.5	3.5 ±0.5	3.5 ±0.5	3.6 ±0.5
Αλκαλική φωσφατάση	169.6 ±59.3	177.9 ±49.8	153.5 ±44.4	172.9 ±49.8	167.2 ±59.3	147.5 ±18.4
Υδροξυπρολίνη/ κρεατινίνη ούρων *	0.006 (0.002-0.009)	0.006 (0.003-0.01)	0.004 (0.003-0.01)	0.004 (0.002-0.008)	0.006 (0.002-0.011)	0.006 (0.004-0.01)
Ασβέστιο/ κρεατινίνη ούρων *	0.15 (0.07-0.21)	0.13 (0.09-0.2)	0.11 (0.09-0.22)	0.12 (0.09-0.2)	0.15 (0.09-0.2)	0.9 (0.07-0.15)
BMD (L2-L4)	0.853 ±0.157	0.828 ±0.167	0.839 ±0.169	0.842 ±0.166	0.821 ±0.154	0.901 ±0.216
Z-score	-0.9 ±1.5	-1 ±1.3	-0.9 ±1.6	-0.9 ±1.4	-1.1 ±1.4	-0.7 ±1.6
T-score	-2 ±1.4	-2.3 ±1.4	-2.1 ±1.5	-2.2 ±1.5	-2.3 ±1.4	-1.6 ±1.9

Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή ± SD, εκτός από αυτές των παραμέτρων που φέρουν αστερίσκο (\*) οι οποίες εκφράζονται ως διάμεση τιμή και IQR

## Γ. Πολυμορφισμοί γονιδίου ESRa

	Πολυμορφισμός Pvu II			Πολυμορφισμός Xba I		
	PP	Pp	pp	XX	Xx	xx
Ηλικία	54 ±7.7	54.5 ±8.3	53.8 ±7	56.2 ±7.8	54 ±8.3	53.3 ±6.6
Βάρος	69.4 ±11.6	69.9 ±10.4	68.8 ±11.7	70.3 ± 10.8	68.8 ±11.3	70.7 ±11.4
Ύψος	155.5 ±5.8	156.4 ±5.9	155.3 ±5.4	155.9 ±5.9	155.4 ±5.4	157 ±6.2
BMI	28.5 ±4	28.3 ±4	28.2 ±4.1	28.7 ±4.4	28.3 ±3.9	28.3 ±4.2
Ηλικία εμμηναρχής	14.2 ±2	13.6 ±1.5	14.7 ±7.4	14.2 ±1.6	13.6 ±1.7	14.8 ±7
Ηλικία εμμηνοπαυσής	46.4 ±4.5	44.8 ±6	45 ±4.8	47.5 ±4.1	45.2 ±5.8	44.6 ±4.7
Οστεοκαλσίνη *	3.1 (1.4-4.2)	3.2 (2.4-9)	3.6 (1.6-5.1)	3.1 (1.6-4.5)	3.1 (1.5-4.9)	3.2 (1.6-4.9)
25(OH) vit D *	26.1 (13.2-31.1)	26 (13.4-31.7)	20.7 (15.7-27.7)	28.2 (21.5-34.1)	24.5 (9.1-29.1)	21 (15.8-31.7)
Ασβέστιο	9.6 ±0.4	9.5 ±0.5	9.5 ±0.5	9.6 ±0.4	9.5 ±0.5	9.5 ±0.5
Φωσφορικά	3.4 ±0.6	3.5 ±0.5	3.5 ±0.5	3.4 ±0.6	3.5 ±0.5	3.5 ±0.5
Αλκαλική φωσφατάση	161.3 ±48	177.7 ±56.9	166.3 ±46.3	164.3 ±52.5	170.5 ±52.1	171 ±52.9
Υδροξυπρολίνη/ κρεατινίνη ούρων *	0.005 (0.002-.009)	0.005 (0.002-0.009)	0.006 (0.002-0.009)	0.004 (0.002-0.01)	0.005 (0.002-0.008)	0.007 (0.004-0.01)
Ασβέστιο/ κρεατινίνη ούρων *	0.13 (0.08-0.2)	0.13 (0.08-0.2)	0.13 (0.09-0.2)	0.16 (0.09-0.3)	0.13 (0.07-0.2)	0.1 (0.09-0.16)
BMD (L2-L4)	0.846 ±0.173	0.835 ±0.158	0.825 ±0.165±	0.825 ±0.181	0.836 ±0.157	0.853 ±0.173
Z-score	-0.8 ±1.6	-1 ±1.3	-1 ±1.6	-0.8 ±1.7	-1 ±1.4	-1 ±1.5
T-score	-2.1 ±1.6	-2.1 ±1.4	-2.4 ±1.5	-2.3 ±1.6	-2.2 ±1.4	-2.2 ±1.5

Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή ± SD, εκτός από αυτές των παραμέτρων που φέρουν αστερίσκο (\*) οι οποίες εκφράζονται ως διάμεση τιμή και IQR



**Πίνακας 8.** Τιμές *p* για τις συγκρίσεις των βασικών χαρακτηριστικών και των δεικτών οστικού μεταβολισμού των συμμετεχόντων, σε καθένα από τους τρεις γονότυπους που προκύπτουν για κάθε πολυμορφισμό (one way ANOVA)

	<i>Fok I</i>	<i>Bsm I</i>	<i>Sp I</i>	<i>Pvu II</i>	<i>Xba I</i>
Ηλικία	0.33	0.42	0.31	0.89	0.31
Βάρος	0.08	0.66	0.91	0.89	0.67
Ύψος	0.59	0.94	0.83	0.62	0.39
BMI	0.03	0.58	0.79	0.96	0.89
Ηλικία εμμηνόπαυσης	0.4	0.94	0.29	0.38	0.12
25-OH vit D*	0.38	0.82	0.35	0.82	0.56
Οστεοκαλσίνη*	0.04	0.94	0.9	0.8	0.96
Ασβέστιο/κρεατ. ούρων *	0.56	0.4	0.66	0.99	0.3
OH-προλίνη/κρεατ. ούρων *	0.45	0.63	0.48	0.64	0.33

\* Οι συγκρίσεις για τις παραμέτρους που φέρουν αστερίσκο έγιναν με μη παραμετρικές μεθόδους λόγω της μη κανονικής τους κατανομής.





**Πίνακας 9. Πολυπαραγοντικό γραμμικό μοντέλο και μοντέλο οπισθοδρομικής εξάλειψης**

	Συντελεστές (τιμή ρ)	
	Όλες οι παράμετροι	Μοντέλο οπισθοδρομικής εξάλειψης
Σταθερή	0.145 (0.73)	0.141 (0.72)
Sp1: ss έναντι SS ή Ss	0.105 (0.013)	-0.106 (0.010)
Pvu II: pp έναντι PP ή Pp	-0.011 (0.76)	ME
Xba I: xx έναντι XX ή Xx	0.000 (0.99)	ME
Fok I: ff έναντι FF ή Ff	-0.004 (0.94)	ME
Bsm I: bb έναντι BB ή bb	0.003 (0.90)	ME
Βάρος (ανά 10 γλγ.)	0.052 (<0.001)	0.052 (<0.001)
Ύψος (ανά 10 εκ.)	0.044 (0.090)	0.045 (0.076)
Ηλικία (ανά 10 έτη)	-0.064 (<0.001)	-0.064 (<0.001)
Χρήση ΟΘΥ	0.016 (0.75)	ME

ΟΘΥ: ορμονική θεραπεία υποκατάστασης, ME: μη επιλεγμένη μεταβλητή στο τελικό μοντέλο με οπισθοδρομική εξάλειψη.

Η προσαρμογή για την ημερήσια πρόσληψη ασβεστίου και το λόγο ασβεστίου/κρεατινίνη ούρων έδωσε παρόμοια αποτελέσματα.



### Κατανομή γονοτύπων (πίνακας 6)

Η κατανομή των γονοτυπικών συχνοτήτων για τους δύο πολυμορφισμούς του γονιδίου *ESRα* και τον *Bsm I* του γονιδίου *VDR*, ήταν σε γενικές γραμμές παρόμοια με αυτή που έχει περιγραφεί σε άλλους πληθυσμούς σε Ευρώπη και Αμερική. Μικρές διαφοροποιήσεις παρατηρήθηκαν σε σχέση με τους πολυμορφισμούς *Fok I* και *Sr 1*. Αναλυτικότερα, η παρούσα ομάδα μελέτης παρουσίαζε χαμηλότερη συχνότητα του ff γονότυπου του *Fok I* πολυμορφισμού: 5.2% έναντι του κατά προσέγγιση 15% που είχε περιγραφεί σε Κορεάτες, Αμερικανούς μεξικανικής καταγωγής, Γάλλους και Ιταλούς. Αντίθετα, ο ss γονότυπος του γονιδίου *COLIA1* παρατηρήθηκε σε υψηλότερη συχνότητα σε σχέση με άλλους πληθυσμούς (8.4% έναντι 3-4% σε Αμερικανούς, Βρετανούς, Ολλανδούς, Γάλλους και Σουηδούς).

Η κατανομή των γονοτύπων πληρούσε την ισορροπία των Hardy-Weinberg και στους πέντε πολυμορφισμούς ( $p > 0.05$  για καθένα από τους 5). Διαπιστώθηκε ισχυρή ανισοκατανομή σύνδεσης μεταξύ των πολυμορφισμών *Xba I* και *Pvu II* του γονιδίου *ER*. Έτσι η σχέση μεταξύ των γονοτύπων xx και rr ήταν ισχυρά σημαντική (συντελεστής συσχέτισης 0.64,  $p < 0.001$ ).

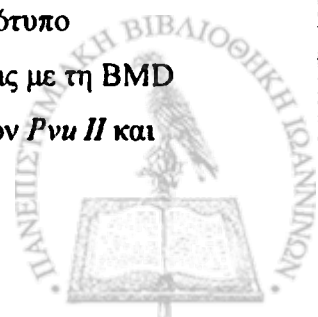
### Οστικοί μεταβολικοί δείκτες και γονότυποι

Οι προσδιοριζόμενοι στην παρούσα μελέτη βιοχημικοί δείκτες του οστικού μεταβολισμού και συγκεκριμένα η οστεοκαλσίνη (γράφημα 2), ο λόγος υδροξυπρολίνης/κρεατινίνη ούρων (γράφημα 3) και ο λόγος ασβεστίου/κρεατινίνη ούρων δεν παρουσίαζαν καμμία σημαντική διακύμανση μεταξύ των γονοτύπων.

### Οστική πυκνότητα και γονότυποι

Στην ανάλυση όπου έγινε προσαρμογή για την ηλικία και σύγκριση και των τριών γονοτύπων κάθε πολυμορφισμού (γράφημα 1), διαπιστώθηκε ότι από τους 5 διαφορετικούς πολυμορφισμούς που μελετήθηκαν στα 3 διαφορετικά γονίδια, μόνο για τον *Sr1* πολυμορφισμό του γονιδίου του κολλαγόνου υπήρχε ένδειξη συσχέτισης με την οστική πυκνότητα της σπονδυλικής στήλης ( $p = 0.056$ ). Για τους άλλους τέσσερις πολυμορφισμούς οι τιμές  $p$  κατά τη σύγκριση των τριών διαφορετικών γονοτύπων ήταν 0.53 για τον *Fok I*, 0.93 για τον *Bsm I*, 0.8 για τον *Pvu II* και 0.9 για τον *Xba I*. Στον πίνακα 7 παρατίθενται οι τιμές οστικής πυκνότητας κατά γονότυπο, για κάθε πολυμορφισμό ξεχωριστά.

Στις συγκρίσεις που έγιναν μεταξύ των ζευγών των ακραίων γονοτύπων (ομόζυγων SS, χωρίς την G→T αντικατάσταση, και ομόζυγων ss, φερόντων την αντικατάσταση) κατέστη σαφές ότι ο *Sr1* ss γονότυπος σχετιζόταν με χαμηλότερη οστική πυκνότητα σε σύγκριση με τον SS γονότυπο ( $p = 0.018$ ). Καμμία άλλη σύγκριση ζευγών γονοτύπων δεν έδειξε σημαντικές συσχετίσεις με τη BMD ( $p = 0.67$  για τους γονοτύπους του πολυμορφισμού *Fok I*, 0.83 για τον *Bsm I*, 0.52 για τον *Pvu II* και 0.9 για τον *Xba I*).



Επειδή οι γονότυποι *Xba I* και *Pvu II* συνδέονται άμεσα, μελετήθηκαν συγχρόνως ως προς την επίδρασή τους στη BMD, αλλά και πάλι δεν βρέθηκε σημαντικό αποτέλεσμα. Η μέση BMD ήταν  $0.811 \text{ g/cm}^2$  στις 31 γυναίκες με *xhrr* και  $0.818 \text{ g/cm}^2$  στις 22 γυναίκες με *XXPP* γονότυπο.

Στην ομάδα μελέτης συμπεριλαμβάνονταν 47 γυναίκες, οι οποίες είχαν μπει στην εμμηνόπαυση σε ηλικία κάτω των 45 ετών. Για να αποκλειστεί το ενδεχόμενο η σχετικά πρόωμη εμμηνόπαυση σε αυτές τις γυναίκες να επηρεάζει τα συνολικά αποτελέσματα, πραγματοποιήθηκε συμπληρωματική ανάλυση ευαισθησίας, με εξαίρεση αυτών των ατόμων και επανάληψη των υπολογισμών, η οποία παρείχε παρόμοια αποτελέσματα. Έτσι, η μέση τιμή BMD ήταν  $0.841 \text{ g/cm}^2$  σε 68 ομόζυγα *SS* άτομα,  $0.861 \text{ g/cm}^2$  σε 32 ετερόζυγα *Ss* και  $0.770 \text{ g/cm}^2$  σε 7 ομόζυγα *ss* άτομα. Για τους υπόλοιπους τέσσερις πολυμορφισμούς, ούτε σε αυτή την ανάλυση έγινε εμφανής κάποια τάση γενετικών συσχετίσεων. Τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια κατά τη διενέργεια δεύτερης ανάλυσης ευαισθησίας με αποκλεισμό, αυτή τη φορά, όσων γυναικών βρίσκονταν υπό ΟΘΥ.

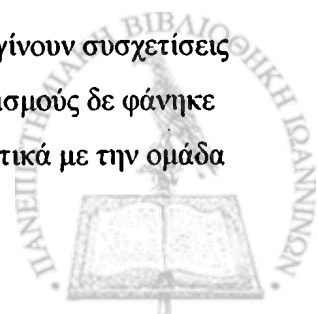
Στη συνέχεια εφαρμόστηκαν πολυπαραγοντικές γραμμικές εξαρτήσεις για να γίνει προσαρμογή της οστικής πυκνότητας ανάλογα με την ηλικία, το βάρος, το ύψος και τη χρήση ορμονικής θεραπείας υποκατάστασης. Σε αυτήν την ανάλυση, οι ομόζυγες γυναίκες για το *s* αλληλόμορφο του *Sr1* πολυμορφισμού του γονιδίου του κολλαγόνου τύπου *Ia 1* είχαν σημαντικά χαμηλότερη BMD σε σχέση με τις ομόζυγες γυναίκες για το *S* και για τις ετερόζυγες *Ss* (διαφορά  $-0.106 \text{ g/cm}^2$ ,  $p=0.01$ ). Κανείς άλλος από τους μελετηθέντες πολυμορφισμούς δεν φάνηκε να έχει παρόμοια επίδραση στη BMD.

Η πολυπαραγοντική ανάλυση επαναλήφθηκε, προσαρμόζοντας αυτή τη φορά τη BMD για όλες τις προαναφερθείσες παραμέτρους και επιπλέον για τους υπόλοιπους τέσσερις πολυμορφισμούς. Και πάλι ο *Sr 1* πολυμορφισμός αναδείχθηκε ως μοναδικός προγνωστικός παράγοντας της BMD, έναντι των υπολοίπων, των οποίων οι σταθερές συσχέτισης ήταν πολύ κοντά στο μηδέν.

Επίσης, στο μοντέλο αναζητήθηκαν πιθανοί όροι αλληλεπίδρασης (*interaction terms*) μεταξύ των πολυμορφισμών, αλλά η ανάλυση έδειξε ότι μεταξύ των μελετηθέντων πολυμορφισμών δεν υπήρχε σημαντική αλληλεπίδραση.

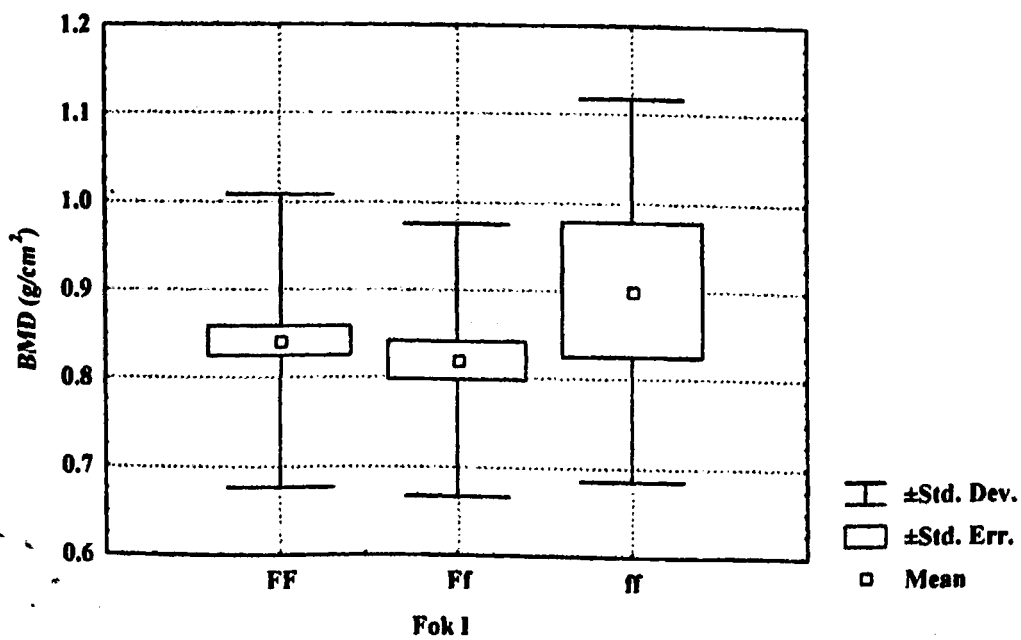
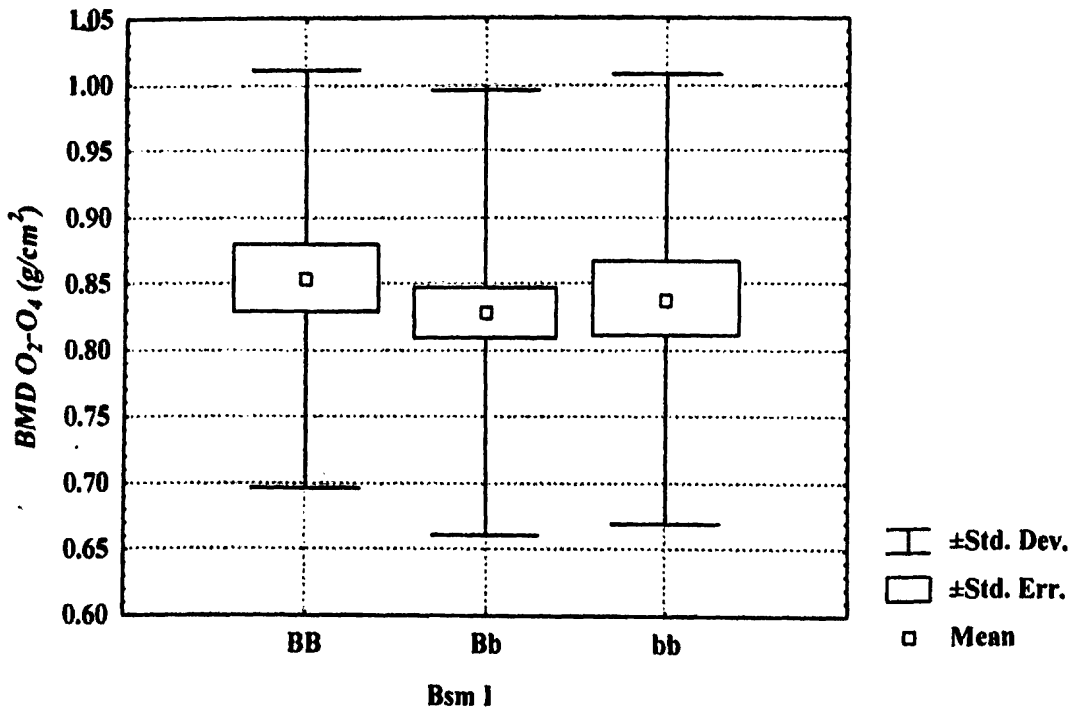
Τέλος, στο μοντέλο οπισθοδρομικής εξάλειψης μεταβλητών, όπου εισήχθησαν ως ανεξάρτητες μεταβλητές το βάρος, το ύψος, η ηλικία, η χρήση ορμονικής θεραπείας υποκατάστασης και το σύνολο των πέντε μελετηθέντων πολυμορφισμών, κανένας πολυμορφισμός εκτός από τον *Sr1* του *COL1A* δεν παρέμεινε ως σημαντικός ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας της οστικής πυκνότητας (πίνακας 9). Τα αποτελέσματα για τον γονότυπο *ss* ήταν παρόμοια όταν περιορίστηκε η σύγκριση μεταξύ αυτού και του *SS* εξαιρώντας τους ετερόζυγους *Ss* ( $-0.105 \text{ g/cm}^2$ ,  $p=0.016$ , μετά προσαρμογή για όλους τους άλλους παράγοντες).

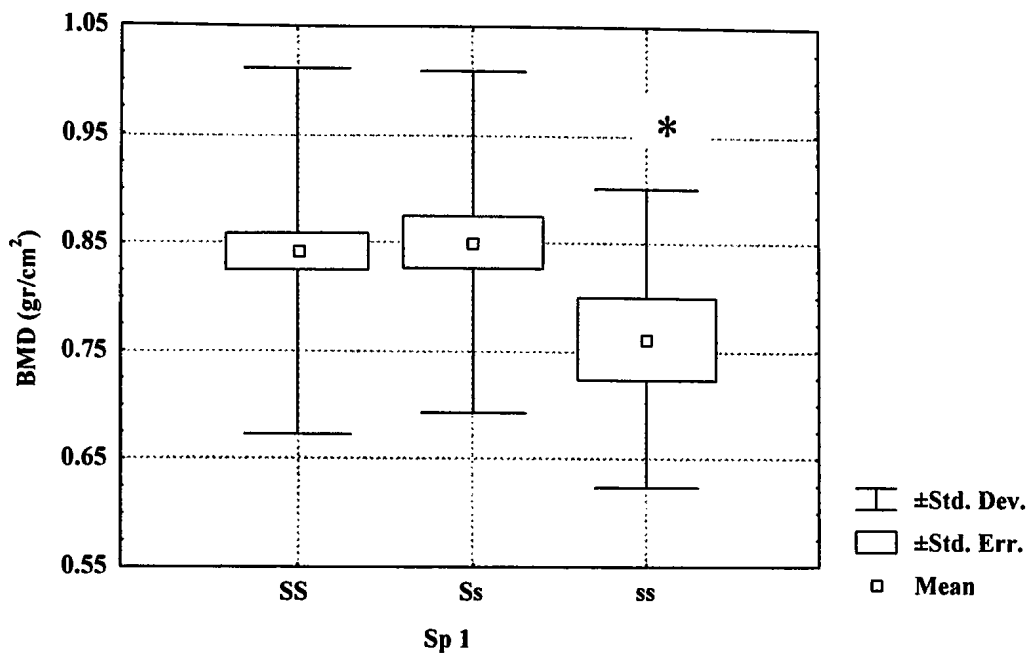
Λόγω του μικρού αριθμού καταγμάτων στην ομάδα, δεν ήταν δυνατόν να γίνουν συσχετίσεις με τους προκύπτοντες γονότυπους. Πάντως για κανέναν από τους πέντε πολυμορφισμούς δε φάνηκε να υπάρχει τάση υπερίσχυσης κάποιου γονοτύπου στην ομάδα καταγμάτων συγκριτικά με την ομάδα χωρίς κατάγματα.



Γράφημα 1. Οστική πυκνότητα οσφυϊκών σπονδύλων (προσαρμοσμένη για την ηλικία) κατά γονότυπο σε καθένα από τους 5 μελετούμενους πολυμορφισμούς

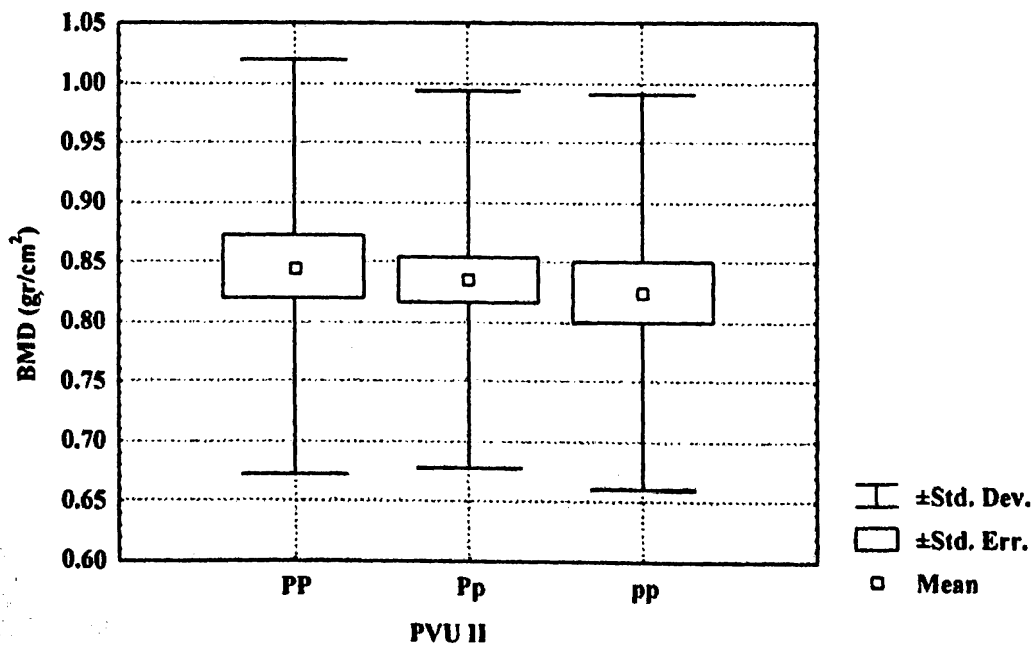
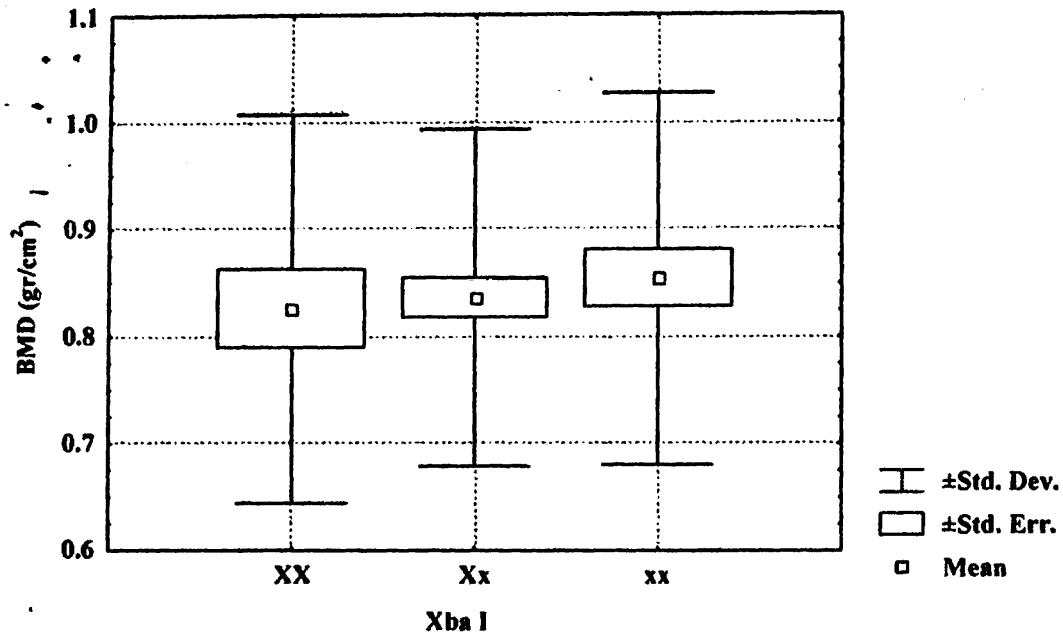
Α. Πολυμορφισμοί του γονιδίου του υποδοχέα της βιταμίνης D



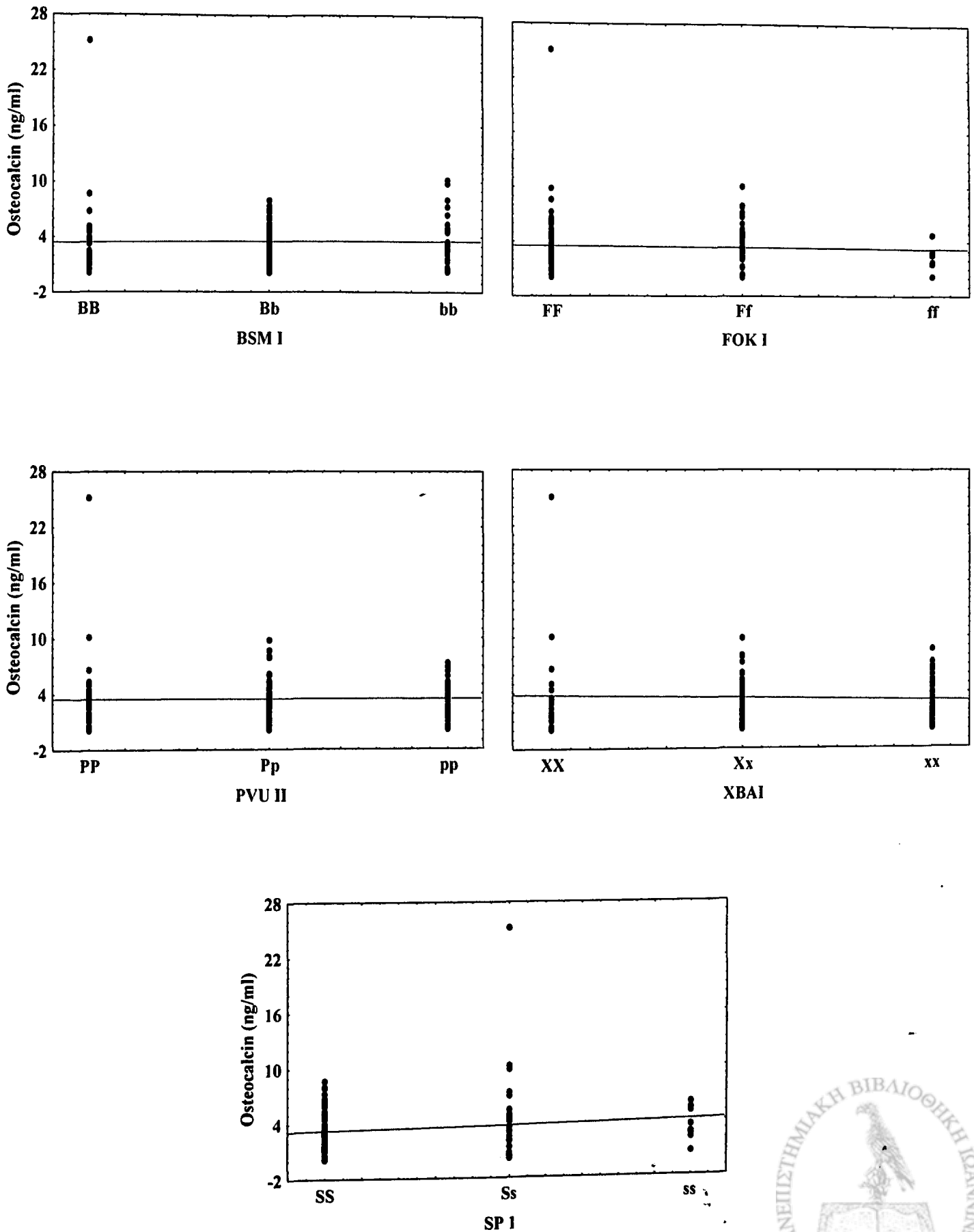
**B. Πολυμορφισμός του γονιδίου του κολλαγόνου τύπου Ια 1**

\*  $p=0.056$  για τη σύγκριση των τριών γονοτύπων μεταξύ τους,  $p=0.018$  για τη σύγκριση ss/SS και  $p=0.028$  για τη σύγκριση ss/Ss

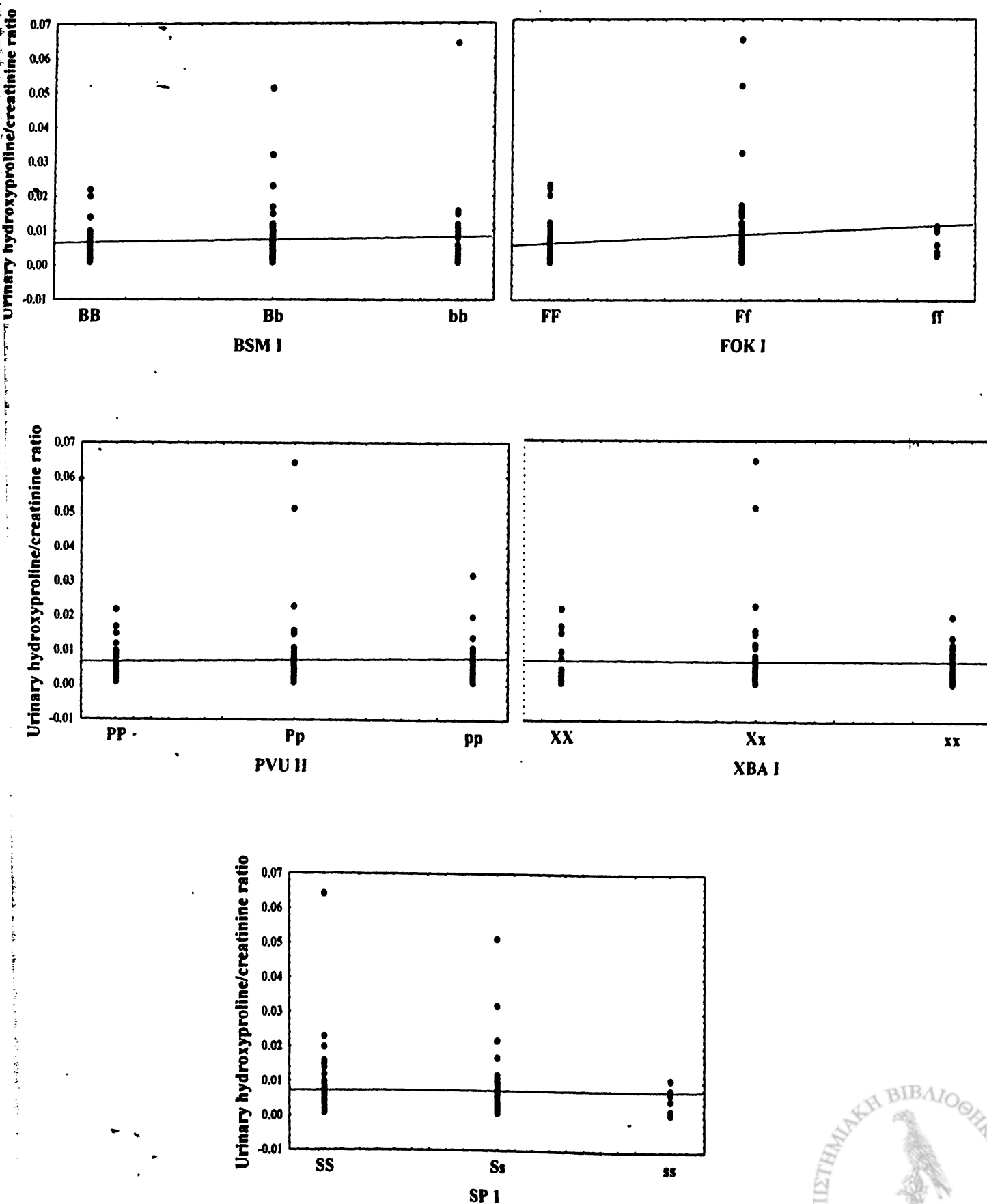
### Γ. Πολυμορφισμοί του γονιδίου του οιστρογονικού υποδοχέα τύπου α



**Γράφημα 2. Τιμές οστεοκαλσίνης ορού κατά γονότυπο για τους πέντε μελετηθέντες πολυμορφισμούς**



Γράφημα 3. Τιμές λόγου υδροξυπρολίνης/κρεατινίνη ούρων κατά γονότυπο για τους πέντε μελετηθέντες πολυμορφισμούς





## Συνέργεια μεταξύ των πολυμορφισμών των γονιδίων VDR και ESRa.

Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε άλλους πληθυσμούς προτάθηκε ότι υπήρχε συνέργεια μεταξύ συγκεκριμένων γονοτύπων των πολυμορφισμών των VDR και ER γονιδίων.<sup>61,64</sup> Αυτό το ενδεχόμενο εξετάστηκε λοιπόν και στον ελληνικό πληθυσμό, αλλά κανένας από τους προηγούμενα περιγραφέντες συνδυασμούς γονοτύπων δεν συνδεόταν στατιστικά σημαντικά με την οστική πυκνότητα. Συγκεκριμένα, για την αλληλεπίδραση μεταξύ των πολυμορφισμών *Pvu II* και *Bsm I*, η σημαντική διαφορά της οστικής πυκνότητας μεταξύ των γονοτύπων PPBB και PPbb που διατυπώθηκε από τους Willing και συν.<sup>64</sup> δεν επιβεβαιώθηκε στην παρούσα μελέτη, παρόλο που ο αριθμός γυναικών σε κάθε γονότυπο ήταν μεγαλύτερος από τους αντίστοιχους της προηγούμενης μελέτης (11 γυναίκες με PPBB και 12 με PPbb γονοτύπους, έναντι 5 και 11 αντίστοιχα στην αναφερόμενη μελέτη των Willing και συνεργατών<sup>64</sup>)

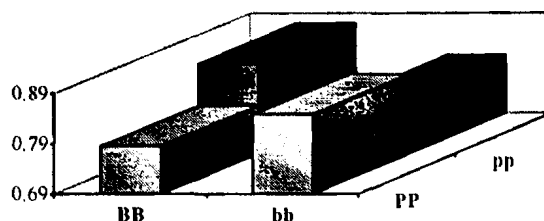
(πίνακας 10). Το ίδιο διαπιστώθηκε και κατά τον έλεγχο των γονοτύπων XXBB έναντι XXbb (γράφημα 4).

Στη μελέτη των Gennari και συν.<sup>61</sup> όπου συμμετείχε ένας μεγάλος αριθμός μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών ( $n=426$ ) και διερευνήθηκαν περισσότεροι πολυμορφισμοί των δύο γονιδίων (*Apa I*, *Bsm I* και *Taq I* για το VDR και *Pvu II* και *Xba I* για το ESRa), προέκυψαν περισσότεροι απλότυποι και κατ' επέκταση περισσότερες συγκρίσεις. Ως στατιστικά σημαντικές ξεχώρισαν οι διαφορές στην οσφυϊκή οστική πυκνότητα μεταξύ των ακραίων γονοτύπων: AABBTt-PPXX έναντι aabbTT-ppxx ( $p<0.05$ ).

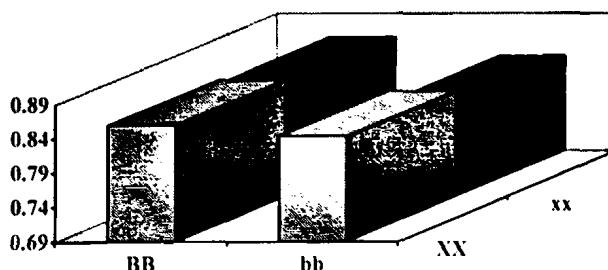
Στον ελληνικό πληθυσμό επιχειρήθηκε να πραγματοποιηθεί ανάλογη σύγκριση των ακραίων απλοτύπων για τους διαθέσιμους πολυμορφισμούς, με εξαίρεση δηλαδή των *Apa I* και *Taq I* πολυμορφισμών, οι οποίοι βρίσκονται σε ανισοκατανομή σύνδεσης με τον *Bsm I*. Το αποτέλεσμα αυτής της σύγκρισης ήταν αρνητικό ( $p=0.52$ ) (γράφημα 5). Ωστόσο, ο αριθμός των ατόμων που αντιστοιχούσαν σε καθένα από τους δύο απλότυπους ήταν μικρότερος στην παρούσα μελέτη ( $n=5$  και

**Γράφημα 4 . Διερεύνηση της πιθανής συνέργειας μεταξύ πολυμορφισμών των VDR και ESRa γονιδίων στον καθορισμό της οστικής πυκνότητας**

Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολυμορφισμών *Bsm I* και *Pvu II*



Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολυμορφισμών *Bsm I* και *Xba I*

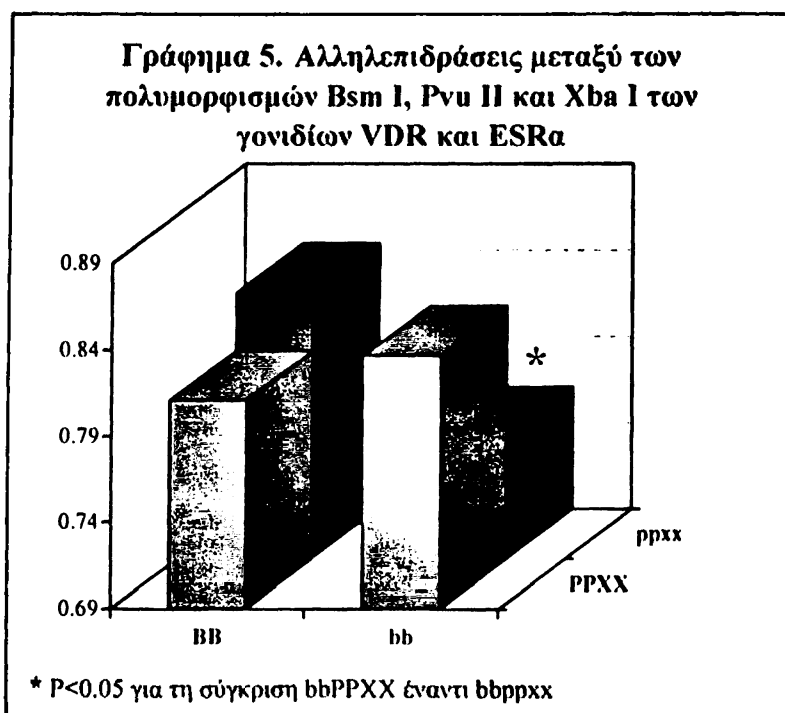


8 αντίστοιχα έναντι 9 και 14 στην προηγούμενη μελέτη). Εξάλλου, οι περισσότεροι συνδυασμοί γονοτύπων απέκλεισαν την ύπαρξη συνέργειας των δύο πολυμορφισμών για τον καθορισμό της οστικής πυκνότητας της σπονδυλικής στήλης (πίνακας 10).

Η μόνη στατιστικά σημαντική διαφορά που προέκυψε από τη διερεύνηση της αλληλεπίδρασης των δύο γονιδίων ήταν μεταξύ bbPPXX και bbrpxx ( $p < 0.05$ ) (γράφημα 5). Ωστόσο, χρειάζεται μεγάλη επιφύλαξη στην εξαγωγή συμπερασμάτων που προκύπτουν από πολλαπλές συγκρίσεις και που αφορούν τόσο μικρούς αριθμούς ανά ομάδα, γιατί είτε οι περισσότερες μελέτες δεν έχουν επαρκή δύναμη ώστε να καταδειχτούν λεπτές

διαφορές, είτε προκύπτουν στατιστικές σημαντικότητες οφειλόμενες αποκλειστικά στην τύχη, λόγω των πολλαπλών συγκρίσεων που λαμβάνουν χώρα.

Όλες οι παραπάνω συγκρίσεις έγιναν μετά από προσαρμογή της οστικής πυκνότητας για την ηλικία.



**Πίνακας 10.** Έλεγχος των πιθανότερων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πολυμορφισμών*Bsm I* του γονιδίου VDR και *Pvu II* και *Xba I* του γονιδίου ESRα

Συνδυασμοί γονοτύπων	Αριθμός γυναικών	BMD ( $\pm$ SD)	Τιμές p
BBPP   έναντι bbPP	11 12	0.786 (0.099) 0.849 (0.2)	0.2
BBpp   έναντι bbPP	11 12	0.869 (0.185) 0.849 (0.2)	0.57
BBPP   έναντι BBpp	11 11	0.786 (0.099) 0.869 (0.185)	0.21
BBXX   έναντι bbxx	7 10	0.861 (0.140) 0.829 (0.172)	0.73
BBXX   έναντι bbXX	7 7	0.861 (0.140) 0.844 (0.212)	0.69
BB PPXX   έναντι bb ppxx	5 8	0.811 (0.135) 0.761 (0.103)	0.52
bb PPXX   έναντι BB ppxx	7 9	0.844 (0.212) 0.837 (0.179)	0.48
BBppxx   έναντι bbppxx	9 8	0.837 (0.179) 0.761 (0.103)	0.37
PPXXBB   έναντι PPXXbb	5 7	0.811 (0.135) 0.844 (0.212)	0.49
PPXXbb   έναντι ppxxbb	7 8	0.844 (0.212) 0.761 (0.103)	0.05



## **B. Καθορισμός της σχέσης του πολυμορφισμού Sp1 του γονιδίου του κολλαγόνου τύπου Ia1 με τον επιπολασμό καταγμάτων.**

Τα κατάγματα είναι η πιο θεαματική και πιο σοβαρή φαινοτυπική εκδήλωση ελαττωματικού οστικού μεταβολισμού. Εξάλλου, από την ανάγκη πρόληψης των καταγμάτων και των επιπτώσεών τους απορρέει το ενδιαφέρον για τη μελέτη του οστικού μεταβολισμού και των παραγόντων που τον επηρεάζουν.

Οι μελέτες που είχαν αντικείμενο τη συμβολή των πολυμορφισμών του γονιδίου COLIA στο μεταβολισμό των οστών, δεν απέδειξαν καθολικά τη συμμετοχή του συγκεκριμένου πολυμορφισμού στην εκδήλωση οστεοπόρωσης.

Με σκοπό την ανασκόπηση και ενοποίηση όλων των υπάρχουσών πληροφοριών σε σχέση με το συγκεκριμένο πολυμορφισμό και την εξαγωγή ενός ενιαίου συμπεράσματος που θα αποτελούσε το αποστάλαγμα για το ρόλο του πολυμορφισμού Sp1 στον οστικό φαινότυπο, πραγματοποιήσαμε μια μετα-ανάλυση η οποία περιελάμβανε όλες τις πληροφορίες που ανακοινώθηκαν σε σχέση με τον Sp1 και τον επιπολασμό οστεοπορωτικών καταγμάτων. Είναι φανερό πως η ενοποίηση των στοιχείων που προέρχονται από πολλές διαφορετικές γυναίκες έχει το πλεονέκτημα της συγκέντρωσης μεγάλου αριθμού περιπτώσεων που αλλιώς θα ήταν δύσκολο να συλλεχθούν δεδομένου του μικρού αριθμού καταγμάτων στις διάφορες ομάδες μελέτης. Κατά αυτόν τον τρόπο δίνεται επίσης η δυνατότητα της απάντησης του πιο καίριου ίσως ερωτήματος στη γονιδιακή μελέτη του οστικού μεταβολισμού: υπάρχει κλινικός αντίκτυπος των μελετούμενων γονιδιακών πολυμορφισμών; Έτσι το ποσοστό των καταγμάτων που μπορεί να αποδοθεί στο συγκεκριμένο γονίδιο υπολογισμένο με τις μεθόδους της μετα-ανάλυσης αποτελεί ένα δείκτη της συμβολής του συγκεκριμένου γονιδίου τόσο στον οστικό μεταβολισμό, αλλά κυρίως στην κλινική του έκφανση.

Εξάλλου, με τη μετα-ανάλυση γίνεται δυνατή η διερεύνηση πιθανής ανομοιογένειας μεταξύ των μελετηθέντων πληθυσμών καθώς και αν τα αίτια αυτής της ανομοιογένειας οφείλονται στο σχεδιασμό των διαφορετικών μελετών, στα χαρακτηριστικά των μελετηθέντων πληθυσμών ή σε άλλους λόγους.

### **Μέθοδοι**

#### **Εντοπισμός και επιλογή μελετών**

Μετά από βιβλιογραφική αναζήτηση στις βάσεις δεδομένων MEDLINE και EMBASE μέχρι τον Αύγουστο 2000 απομονώθηκαν οι δημοσιεύσεις καθώς και οι ανακοινώσεις με τη μορφή περιλήψεων που σχετίζονταν με τη μελέτη του πολυμορφισμού Sp1 του COLIA σε σχέση με την οστική πυκνότητα, την ύπαρξη οστεοπόρωσης ή την εμφάνιση καταγμάτων.

Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα μόνο από τα επιπολάζοντα κατάγματα και όχι από επίπτωση καταγμάτων.



### Κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη

Από τη μετα-ανάλυση αποκλείστηκαν οι οικολογικές μελέτες (μελέτες που συνδέουν τον επιπολασμό των καταγμάτων σε διαφορετικούς πληθυσμούς χωρίς όμως συγκρίσεις μεμονωμένων ατόμων), μελέτες στις οποίες δεν ανιχνεύτηκε ο πολυμορφισμός Sp1 και τέλος μελέτες στις οποίες δεν αναφέρονταν κατάγματα (μελέτες σε παιδιά και νεαρούς ενήλικες ή όπου δεν αναφέρονται κατάγματα).

### Εξαγωγή πληροφοριών

Οι εξαγωγή πληροφοριών επικεντρώθηκε σε δημογραφικά στοιχεία, χώρα προέλευσης, ορισμός των καταγμάτων, τύπος μελέτης και χαρακτηρισμός της ομάδας ελέγχου. Καταγράφηκαν επίσης οι αριθμοί των ατόμων με και χωρίς κατάγματα για κάθε γονότυπο του πολυμορφισμού Sp1 (SS, Ss και ss).

### Μέθοδοι μετα-ανάλυσης

Πραγματοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές συγκρίσεις: (α) Ss ετεροζυγώτες έναντι SS ομοζυγωτών, (β) ss ομοζυγώτες έναντι SS ομοζυγωτών, και (γ) Ss ετεροζυγώτες έναντι ss ομοζυγωτών. Με αυτήν τη προσέγγιση είναι δυνατό να εκτιμηθεί η πιθανή ύπαρξη κλιμάκωσης του κινδύνου καταγμάτων περνώντας από τους Ss ετεροζυγώτες στους ss ομοζυγώτες. Μια εναλλακτική μέθοδος περιλαμβάνει λογισμικές γραμμικές εξαρτήσεις χρησιμοποιώντας ως εξαρτώμενη μεταβλητή τη δόση του μειονεκτικού αλληλίου. Αυτή η μέθοδος όμως δέχεται εξ αρχής ότι υπάρχει επίδραση της δόσης του αλληλίου και για αυτό το λόγο είναι λιγότερο αξιόπιστη.

Στην κύρια ανάλυση χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο συγκρίσεων ο λόγος κινδύνου (risk ratio). Ωστόσο, υπολογίστηκε και ο λόγος πιθανοτήτων (odds ratio) ο οποίος όμως φάνηκε να παρουσιάζει μεγαλύτερη ανομοιογένεια. Αυτό ήταν αναμενόμενο, αφού λόγω της ποικιλίας στους μελετούμενους πληθυσμούς και στον τρόπο σχεδιασμού των μελετών, ήταν λογικό να διαφέρει η αναλογία των ατόμων με κατάγματα από μελέτη σε μελέτη. Ο λόγος πιθανοτήτων αποκλίνει περισσότερο από τον λόγο κινδύνου, όσο το ποσοστό των καταγμάτων πλησιάζει το 50%.

Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με μοντέλα που στηρίζονταν στη μέθοδο σταθερών επιδράσεων (fixed effects), αλλά και στη μέθοδο τυχαίων επιδράσεων (random effects). Κάθε μελέτη σταθμιζόταν ανάλογα με την ακρίβειά της, η οποία αντιπροσωπεύει το αντίθετο της υπολογιζόμενης διακύμανσης.<sup>117</sup>

Το μοντέλο των Mantel-Haenszel για fixed effects<sup>118</sup> υποθέτει ότι υπάρχει μια κοινή επίδραση του πολυμορφισμού Sp1 σε όλες τις διαφορετικές μελέτες και ότι τα αποτελέσματα διαφέρουν μόνο από τύχη. Η ετερογένεια υπολογίστηκε με στατιστικό test Q βασισμένο σε  $\chi^2$  και θεωρούταν σημαντική όταν το  $p < 0.10$ .<sup>117</sup>

Το μοντέλο των DerSimonian και Laird για random effects ενσωματώνει στην ετερογένεια που παρατηρείται μέσα σε κάθε μελέτη και την ετερογένεια που προκύπτει μεταξύ μελετών και δεν θεωρεί

δεδομένο ότι η επίδραση του πολυμορφισμού είναι κοινή σε όλες τις διαφορετικές μελέτες.<sup>119</sup> Σε γενικές γραμμές τα random effects έχουν μεγαλύτερα διαστήματα εμπιστοσύνης και έτσι είναι πιο συντηρητικά. Τα δύο μοντέλα συμπίπτουν όταν δεν υπάρχει καθόλου ετερογένεια.

Για να αποκλειστεί το ενδεχόμενο η παρατηρούμενη ετερογένεια να οφείλεται σε παραμέτρους που έχουν βιολογική ή κλινική σημασία ή σε μεροληψία κατά την επιλογή πραγματοποιήθηκαν οι εξής επιμέρους αναλύσεις:

- (i) ανάλυση ευαισθησίας στην οποία εξαιρέθηκαν δύο μελέτες στις οποίες συμπεριλήφθησαν στην ομάδα των καταγμάτων, άτομα χωρίς κάταγμα αλλά με πολύ χαμηλή οστική πυκνότητα
- (ii) αναλύσεις υποομάδων μελετών που είχαν διαφορετικό σχεδιασμό (μελέτη με ομάδα ελέγχου, μελέτη αντιπροσωπευτικού δείγματος, σειρά με ομάδα ελέγχου από τον γενικό πληθυσμό), διαφορετικά σημεία καταγμάτων (σπονδυλικά κατάγματα έναντι άλλων σημείων ή μικτές μελέτες) και διαφορετικό μέσο όρο ηλικίας στην ομάδα των καταγμάτων ( $\geq 65$  έναντι  $<65$  έτη).

Ακόμη έγινε έλεγχος για πιθανή μεροληψία κατά τη διαδοχική δημοσίευση των μελετών που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη. Εξετάστηκαν λοιπόν δύο ενδεχόμενα: Πρώτον, εάν μικρές μελέτες με μεγάλη διακύμανση των αποτελεσμάτων τους δίνουν πιο ευνοϊκά αποτελέσματα από μεγαλύτερες μελέτες με μεγαλύτερη ακρίβεια στα αποτελέσματά τους. Δεύτερον, εάν το μέγεθος των συσχετίσεων μεταξύ γονοτύπων και επιπολασμού καταγμάτων μεταβάλλεται σημαντικά με το χρόνο, καθόσον νέες μελέτες συνεχίζουν να δημοσιεύονται για το ίδιο θέμα. Στην περίπτωση που υπάρχει μεροληψία, μια μελέτη που δημοσιεύτηκε στην αρχή μπορεί να έδειχνε εντυπωσιακά αποτελέσματα τα οποία όμως να μην επιβεβαιώνονται από μεταγενέστερες μελέτες.

Το ποσοστό των καταγμάτων που αποδίδεται με βάση τη μετα-ανάλυση στον πολυμορφισμό Sp1 υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο:

$$AF = [PR_1 \times (RR_1 - 1)] / \{1 + [PR_1 (RR_1 - 1)]\} + [PR_2 \times (RR_2 - 1)] / \{1 + [PR_2 (RR_2 - 1)]\}$$

Όπου  $PR_1$  είναι η συχνότητα του γονοτύπου Ss και  $RR_1$  ο λόγος κινδύνου που σχετίζεται με την Ss ετεροζυγωτία του Sp1 πολυμορφισμού ενώ  $PR_2$  και  $RR_2$  οι αντίστοιχες τιμές που σχετίζονται με το γονότυπο ss.

## Αποτελέσματα

### Χαρακτηριστικά των μελετών που συμπεριλήφθησαν στη μετα-ανάλυση

Είκοσι δύο μελέτες που αναφέρονταν στη σχέση μεταξύ του COL1A1 και της οστικής πυκνότητας ή/και των καταγμάτων βρέθηκαν κατά την αναζήτηση. Από αυτές εννέα αποκλείστηκαν



για διάφορους λόγους (πίνακας 11). Κατά συνέπεια στη μετα-ανάλυση συμπεριλήφθησαν 13 μελέτες (πίνακας 12) στις οποίες συμπεριλαμβάνονταν άτομα με κατάγματα καθώς και υγιή ομάδα ελέγχου και είχε γίνει γονοτυπικός προσδιορισμός του πολυμορφισμού Sp1. Μόνο μια μελέτη παρείχε επιπλέον πληροφορίες πέραν του επιπολασμού και για την επίπτωση καταγμάτων. Σε αυτή τη μελέτη, το s αλληλόμορφο είχε σοβαρότερη επίδραση στην επίπτωση παρά στον επιπολασμό.

Στο σύνολο, συγκεντρώθηκαν για τη μετα-ανάλυση 3641 άτομα εκ των οποίων 3542 ήταν γυναίκες. Η κατανομή των γονοτύπων ήταν ως εξής: 2418 SS ομοζυγώτες (67.7%), 1086 Ss ετεροζυγώτες (29.8%), και 137 ss ομοζυγώτες (2.5%). Οι μελέτες διεξήχθησαν στη Γαλλία (v=2) στο Ηνωμένο Βασίλειο (v=2), στη Δανία (v=2), στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, στην Ισπανία, Ολλανδία, Σουηδία, Βέλγιο και στην Δημοκρατία της Τσεχίας. Ακόμη, στη μετα-ανάλυση συμπεριλήφθησαν και τα στοιχεία της μελέτης του Ελληνικού πληθυσμού.

Ανάλογα με τον τύπο τους, οι μελέτες ταξινομήθηκαν ως εξής: 8 μελέτες με ομάδα ασθενών και ομάδα ελέγχου (case-control), 4 μελέτες αντιπροσωπευτικού δείγματος (cross-sectional cohort) και 2 όπου η σύγκριση έγινε με ομάδα ελέγχου προερχόμενη από το γενικό πληθυσμό (population controls). Στις δύο τελευταίες μελέτες δεν υπήρχε ως αναμενόμενο απόλυτο ταίριασμα στις ηλικίες των δύο συγκρινόμενων ομάδων. Αυτό το πρόβλημα δεν υπήρχε στις υπόλοιπες μελέτες. Σε δύο μελέτες, η ομάδα των ατόμων με κατάγματα συμπεριλάμβανε επίσης μικρό αριθμό γυναικών με βαριά οστεοπόρωση χωρίς κατάγματα, αλλά η ανάλυση ευαισθησίας που πραγματοποιήθηκε με αποκλεισμό των δύο αυτών μελετών δεν έδωσε διαφορετικά αποτελέσματα.

### **Αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης**

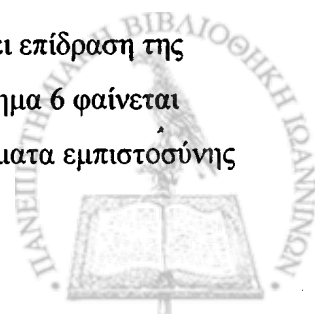
#### Συνολικά αποτελέσματα.

Χρησιμοποιώντας το μοντέλο των DerSimonian και Laird, ο λόγος κινδύνου για τα κατάγματα ήταν 1.25 (διάστημα εμπιστοσύνης 95% 1.09-1.45) φορές υψηλότερο για το γονότυπο Ss έναντι του SS, 1.68 (διάστημα εμπιστοσύνης 95% , 1.35-2.10) για την ομάδα ss έναντι της SS και τέλος 1.35 (διάστημα εμπιστοσύνης 95% 1.04-1.75) για την ομάδα ss έναντι της Ss. Οριακά στατιστικά σημαντική ετερογένεια υπήρξε μόνο στη σύγκριση ss έναντι Ss ( $p=0.08$  με τη δοκιμασία Q).

Με τη χρήση του ίδιου μοντέλου ο υπολογισμός των λόγων πιθανοτήτων έδινε πιο εντυπωσιακά αποτελέσματα (1.43, 1.84 και 1.37 αντίστοιχα), αλλά ταυτοχρόνως με σημαντική ετερογένεια και για τις τρεις συγκρίσεις (0.04, 0.07 και 0.10 αντίστοιχα).

Ίδια ποιοτικά αλλά μικρότερου μεγέθους αποτελέσματα έδωσε και η χρησιμοποίηση του μοντέλου των Mantel-Haenszel για σταθερή επίδραση (fixed effects).

Σημαντική είναι η παρατήρηση ότι και στα δύο μοντέλα φάνηκε να υπάρχει επίδραση της δόσης του αλληλομόρφου γονιδίου s στον επιπολασμό των καταγμάτων. Στο γράφημα 6 φαίνεται παραστατικά ο λόγος κινδύνου που προκύπτει από κάθε μελέτη (μαζί με τα διαστήματα εμπιστοσύνης



95%) καθώς και ο συνολικός λόγος κινδύνου, για τις συγκρίσεις ανά δύο των τριών γονοτύπων του Sp1 πολυμορφισμού.

#### Αποτελέσματα αναλύσεων ευαισθησίας.

Τα αποτελέσματα δε μεταβλήθηκαν με τον αποκλεισμό των δύο μελετών όπου στην ομάδα καταγμάτων συμπεριλαμβάνονταν και άτομα χωρίς κατάγματα, αλλά με πολύ χαμηλή οστική πυκνότητα. Παράλληλα όμως δεν ελαττώθηκε και η παρατηρούμενη ετερογένεια μεταξύ των υπολοίπων μελετών.

#### Αποτελέσματα αναλύσεων υποομάδων.

Όταν η ανάλυση έγινε κατά ομάδες ανάλογα με τον τύπο της μελέτης, φάνηκαν αξιοσημείωτες διαφορές μεταξύ διαφορετικών τύπων μελετών (πίνακας 12). Έτσι, οι cross-sectional μελέτες αναδείκνυαν την επίδραση του γονότυπου στα κατάγματα μόνο για τους ss ομοζυγώτες, οι μελέτες που χρησιμοποίησαν ομάδα ελέγχου από το γενικό πληθυσμό αναδείκνυαν ως σημαντική μόνο τη σχέση Ss, ενώ οι case-control μελέτες ήταν οι μόνες που έδειχναν την τυπική επίδραση της δόσεως του s αλληλομόρφου. Οι περιγραφείσες διαφορές ωστόσο θα μπορούσαν να αποδοθούν στην τύχη, αφού τα διαστήματα εμπιστοσύνης είχαν μεγάλο εύρος.

Η υπο-ανάλυση που περιέλαβε τις οκτώ μελέτες που αναφέρονταν μόνο σε σπονδυλικά κατάγματα και όχι σε συνδυασμό σημείων, διέγραψε πιο καθαρά την επίδραση του μελετούμενου πολυμορφισμού στα κατάγματα.

Τέλος, υπήρξαν τάσεις για μεγαλύτερη επίδραση του γονοτύπου σε μελέτες όπου η μέση ηλικία των ατόμων ήταν μικρότερη των 65 ετών, έναντι των μελετών που συμπεριλάμβαναν μεγαλύτερης ηλικίας άτομα. Ωστόσο, οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές καθώς και τα διαστήματα εμπιστοσύνης είχαν μεγάλη αλληλοεπικάλυψη.

#### **Ποσοστό καταγμάτων που αποδίδονται στον πολυμορφισμό Sp1 του γονιδίου COL1A1.**

Με τη χρήση του τύπου που παρατέθηκε πιο πάνω και με δεδομένο ότι η συχνότητα του γονοτύπου Ss ήταν 29.8% και του ss 2.5%, εκτιμήθηκε ότι το μέσο ποσοστό καταγμάτων που μπορεί να αποδοθεί στο αλληλόμορφο s είναι περίπου 9.4% (6.9% από τον Ss και 2.5% από τον ss).





**Πίνακας 11. Δημοσιευμένες εργασίες σε σχέση με τον πολυμορφισμό Sr1 και τα οστά έως τον Αύγουστο 2000 που αποκλείστηκαν από τη μετα-ανάλυση**

Συγγραφείς	Χώρα διεξαγωγής της μελέτης	Αίτια αποκλεισμού
Grant και συν., 1996 <sup>67</sup>	Ηνωμένο Βασίλειο	Αρχική δημοσίευση με πληροφορίες που συμπεριλαμβάνονται σε μεταγενέστερη μελέτη
Beavan και συν., 1998 <sup>81</sup>	Αφρική-Κίνα-Κορέα-Γαλλία-Δανία-Ολλανδία-Ηνωμένο Βασίλειο	Οικολογική ανάλυση
Han και συν., 1999 <sup>79</sup>	Κορέα	Ασιατικός πληθυσμός- μη ανιχνεύσιμος ο πολυμορφισμός
Nakajima και συν., 1999 <sup>80</sup>	Ιαπωνία	Ασιατικός πληθυσμός- μη ανιχνεύσιμος ο πολυμορφισμός
Garnero και συν., 1998 <sup>72</sup>	Γαλλία	Προεμμηνόπαυσιακές γυναίκες χωρίς στοιχεία για κατάγματα
Sowers και συν., 1999 <sup>55</sup>	ΗΠΑ	Προεμμηνόπαυσιακές γυναίκες χωρίς στοιχεία για κατάγματα
Hampson και συν., 1998 <sup>120</sup>	Ηνωμένο Βασίλειο	Προεμμηνόπαυσιακές γυναίκες χωρίς στοιχεία για κατάγματα
Sainz και συν., 1999 <sup>74</sup>	ΗΠΑ	Παιδιά προεφηβικά χωρίς κατάγματα
Vandevyver και συν., 1997 <sup>121</sup>	Βέλγιο	Απουσία αναφοράς σε κατάγματα



Πίνακας 12. Δημοσιευμένες εργασίες σε σχέση με τον πολυμορφισμό SrsI και τα οστά έως τον Αύγουστο 2000 που συμπεριλήφθηκαν στη μετα-ανάλυση

Συγγραφείς	Χώρα	Ορισμός καταγμάτων	Σχεδιασμός	Μέση ηλικία ± SD			Συχνότητα γονοτύπων				
				Ομάδα καταγμάτων	Ομάδα χωρίς κατάγματα	Ομάδα καταγμάτων					
						SS	Ss	ss			
De Vernejoul και συν., 1997 <sup>122</sup>	Γαλλία (A)	≥1 σπονδυλικό	Cross-sectional	69±7	65±5	62	29	5	85	51	1
Uitterlinden και συν., 1998 <sup>68</sup>	Ολλανδία	≥1 σπονδυλικό	Cross-sectional	66±7		44	28	2	905	392	42
Lidén και συν., 1998 <sup>75</sup>	Σουηδία	≥1 σπονδυλικό	Case control	68±9		23	13	0	44	20	3
Roux και συν., 1998 <sup>69</sup>	Γαλλία (B)	≥1 κάταγμα ή BMD<-2.5 SD	Population controls	63±12	Δεν αναφέρεται	68	40	2	81	24	2
Langdahl και συν., 1999 <sup>70</sup>	Δανία (A)	≥1 σπονδυλικό	Case control	58±8	56±11	55	35	15	94	48	2
Keen και συν., 1999 <sup>71</sup>	Ηνωμένο Βασίλειο (A)	≥1 κάταγμα	Case control	54±5		28	27	0	85	40	5
Hustmyer και συν., 1999 <sup>76</sup>	ΗΠΑ	≥1 σπονδυλικό	Population controls	71±10	34±6	35	19	2	58	16	4
Alvarez και συν., 1999 <sup>73</sup>	Ισπανία	≥1 σπονδυλικό ή BMD<-2.5 SD	Case control	40±9	43±7	20	9	1	21	3	0
McGuigan και συν., 2000 <sup>116</sup>	Ηνωμένο Βασίλειο (B)		Case control	71±6	70±6	54	33	6	70	17	1
Aerssens και συν., 2000 <sup>123</sup>	Βέλγιο	≥1 ισχίου	Case control	78±9	76±4	93	35	7	151	73	15
Heegaard και συν., 2000 <sup>77</sup>	Δανία (B)	≥1 σπονδυλικό	Cross-sectional	69±2		12	5	0	82	27	2
Weichertova και συν., 2000 <sup>82</sup>	Δημ. Τσεχίας	≥1 καρπού	Case control	62±6	61±6	79	40	7	94	30	2
Efstathiadou και συν., 2001 <sup>124</sup>	Ελλάς	≥1 κάταγμα	Cross-sectional	56±10	54±8	12	3	2	73	29	9



**Πίνακας 13.** Αναλύσεις υποομάδων για τον κίνδυνο επιπολαζόντων καταγμάτων

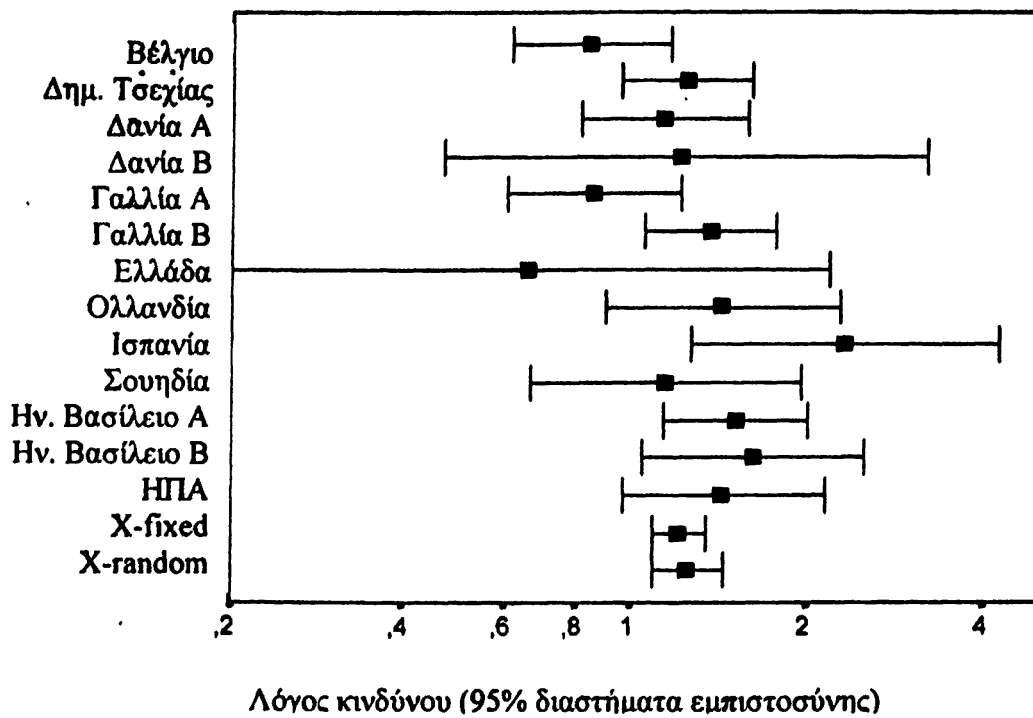
Random effects pooled risk ratio (95% Διαστήματα εμπιστοσύνης)			
	ss έναντι SS	ss έναντι SS	ss έναντι Ss
<b>Ανάλογα με το σχεδιασμό</b>			
Cross-sectional (n=4)	1.04 (0.76-1.43)	1.80 (1.25-2.61)	2.00 (1.32-3.04)
Case-control (n=7)	1.29 (1.05-1.58)**	1.71 (1.24-2.36)**	1.35 (0.99-1.83)*
Με ομάδα ελέγχου από το γενικό πληθυσμό (n=2)	1.39 (1.12-1.73)	1.00 (0.47-2.13)	0.72 (0.33-1.53)
<b>Ανάλογα με την εντόπιση των καταγμάτων</b>			
Σπονδυλικά μόνο (n=8)	1.30 (1.07-1.58)	2.07 (1.73-2.49)	1.46 (1.04-2.05)*
Άλλες εντοπίσεις ή μικτά (n=5)	1.20 (0.95-1.52)*	1.26 (0.86-1.84)	1.18 (0.86-1.62)
<b>Ανάλογα με τη μέση ηλικία</b>			
≥65 έτη	1.17 (0.94-1.46)*	1.45 (1.01-2.07)	1.24 (0.83-1.85)
<65 έτη	1.35 (1.13-1.61)	1.94 (1.49-2.53)	1.41 (0.96-2.08)

\* 0.05 < p < 0.10 για τη δοκιμασία ετερογένειας μεταξύ των μελετών

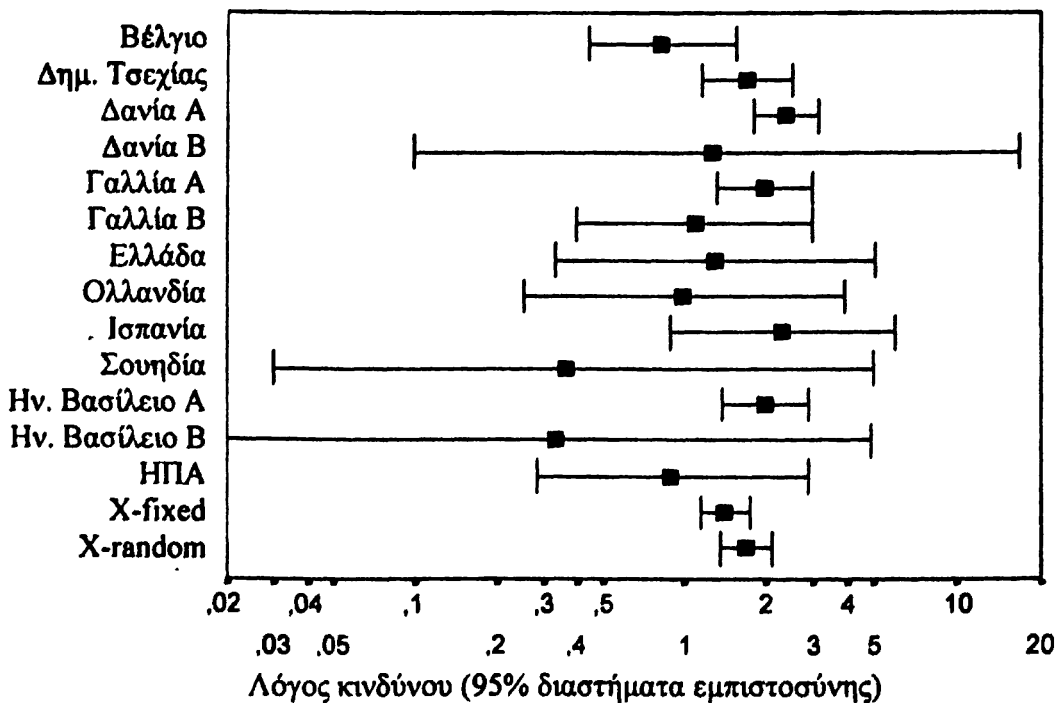
\*\* p < 0.05 για τη δοκιμασία ετερογένειας μεταξύ των μελετών

Γράφημα 6. Επίδραση του πολυμορφισμού Sr 1 στον επιπολασμό καταγμάτων

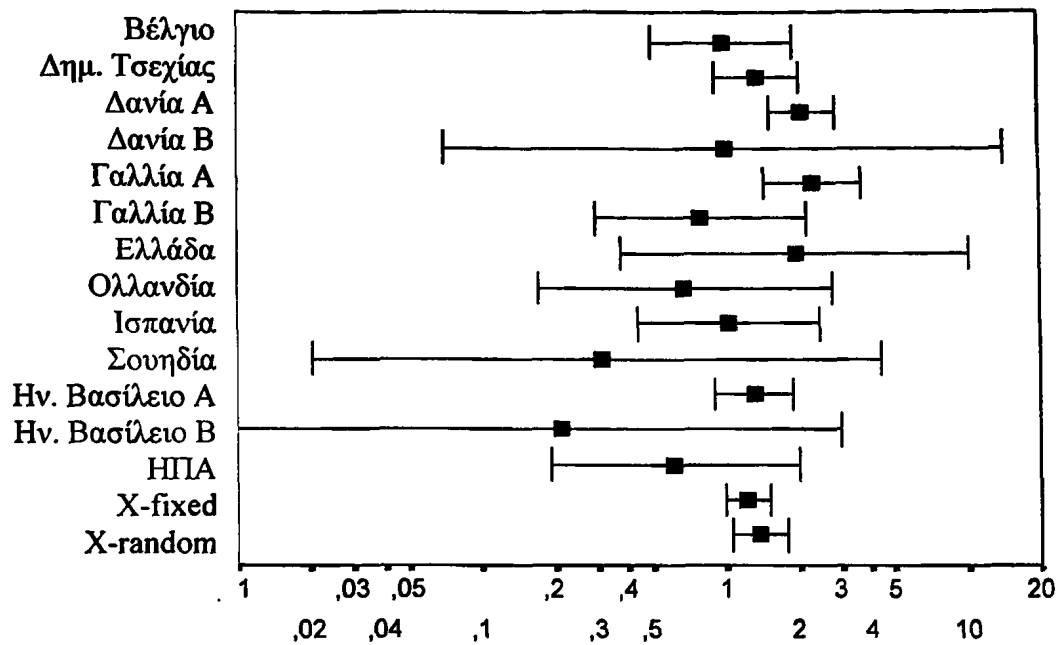
A. Ss ετεροζυγώτες έναντι SS ομοζυγωτών



B. ss ομοζυγώτες έναντι SS ομοζυγωτών



### Γ. ss ομοζυγώτες έναντι Ss ετεροζυγωτών



Λόγος κινδύνου (95% διαστήματα εμπιστοσύνης)

Κάθε μελέτη εκπροσωπείται από τον υπολογιζόμενο λόγο κινδύνου και τα διαστήματα εμπιστοσύνης 95%. Επίσης φαίνονται τα συνολικά fixed και random effects για όλες τις μελέτες μαζί.

Το πολυμορφικό σημείο Sp1 σχετίζεται άμεσα με τον οστικό μεταβολισμό ή πρόκειται για σημείο δείκτη που βρίσκεται σε ανισοκατανομή σύνδεσης με το αληθινά ευθυνόμενο σημείο;

Την απάντηση σε αυτό το ερώτημα επιχείρησε να δώσει μια μελέτη που διεξήχθη στη Σκωτία.<sup>116</sup> Σε αυτήν μελετήθηκαν 4 γνωστοί πολυμορφισμοί του γονιδίου που κωδικοποιεί το κολλαγόνο τύπου Ια1 (Sp1, Rsa I, Msp I και Mnl I) σε ομάδα ατόμων με οστεοπορωτικά σπονδυλικά κατάγματα και σε ομάδα ελέγχου. Όλοι αυτοί οι πολυμορφισμοί είναι SNPs, δηλαδή αφορούν μεταλλάξεις ενός μόνου νουκλεοτιδίου και βρίσκονται διάσπαρτοι στο γονίδιο (εικόνα 4). Όπως φάνηκε από την ανάλυση των αποτελεσμάτων ο πολυμορφισμός Rsa I, ο οποίος και είχε αναφερθεί προηγουμένως ότι σχετίζεται με την παρουσία καταγμάτων,<sup>125</sup> βρίσκεται σε ισχυρή ανισοκατανομή σύνδεσης με τον πολυμορφισμό Sp1 και αποτελούν μαζί τους ισχυρότερους προγνωστικούς παράγοντες καταγμάτων. Με την χρήση όμως πολλαπλού λογισμικού μοντέλου όπου συμπεριλήφθηκαν και οι τέσσερις πολυμορφισμοί μόνο ο Sp1 ξεχώρισε ως ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για κατάγματα. Έτσι με σχετική ασφάλεια μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι αποτελεί το αληθές σημείο που εμπλέκεται στην ευαισθησία στα κατάγματα. Αυτή η διαπίστωση βέβαια δεν μπορεί να αποκλείσει το ενδεχόμενο να υπάρχει και άλλο σημείο στο γονίδιο ανεξερεύνητο ακόμη το οποίο βρίσκεται επίσης σε ανισοκατανομή σύνδεσης με το Sp1.



### III. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

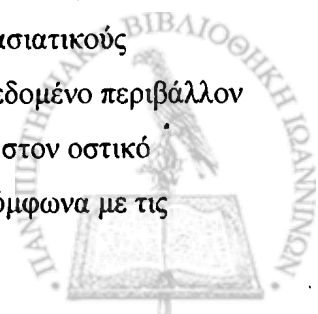
Όπως προκύπτει από γενετικές μελέτες, η οστική πυκνότητα και η παρουσία οστεοπόρωσης αποτελούν σύμπλοκα γενετικά στίγματα.

Από τη μια μεριά, μελέτες σε διδύμους και οικογένειες αποδεικνύουν πέραν αμφιβολίας τη συμβολή σε μεγάλο ποσοστό της κληρονομικότητας στην εκδήλωση αυτών των φαινοτύπων. Ωστόσο, η κληρονομικότητα της οστικής πυκνότητας είναι πολυπαραγοντική και στην έκφραση του οστικού φαινοτύπου συμβάλλουν περισσότερα γονίδια, σε άλλοτε άλλο βαθμό, με πάντα παρούσα και μη αμελητέα την επίδραση των περιβαλλοντικών συνθηκών. Μια αρμόζουσα προσέγγιση της γενετικής σύμπλοκων γενετικών χαρακτηριστικών είναι αυτή των υποψηφίων γονιδίων, η οποία εφαρμόστηκε ευρέως στη μελέτη του οστικού μεταβολισμού. Σύμφωνα με αυτήν διερευνάται η πιθανή συμβολή συγκεκριμένων γονιδίων σε κλινικές και εργαστηριακές εκφάνσεις του οστικού φαινοτύπου –πχ στην οστική πυκνότητα, στα κατάγματα και σε βιοχημικούς δείκτες του οστικού μεταβολισμού-, σε πληθυσμιακές ομάδες. Αυτός ο τύπος προσέγγισης εφαρμόζεται και στην παρούσα μελέτη.

Στο παρόν εγχείρημα, διερευνήθηκε η επίδραση πέντε διαφορετικών πολυμορφισμών, που εντοπίζονται σε τρία διαφορετικά υποψήφια γονίδια, στην ρύθμιση της σπονδυλικής οστικής πυκνότητας και δεικτών οστικού μεταβολισμού, σε αντιπροσωπευτικό δείγμα Ελληνίδων περι- και μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών.

Τα αποτελέσματα συνηγορούν υπέρ της συμβολής του πολυμορφισμού Sp 1 του γονιδίου του κολλαγόνου τύπου Ia1 στην ρύθμιση της οστικής πυκνότητας, κατά τρόπο ώστε, οι ομόζυγες για την G→T αντικατάσταση στην περιοχή του επαγωγέα του γονιδίου του κολλαγόνου τύπου Ia1 (ss) να έχουν κατά μέσο όρο 10,5% χαμηλότερη οστική πυκνότητα από τις ομόζυγες χωρίς την αντικατάσταση (SS). Αντίθετα, οι δύο πολυμορφισμοί του γονιδίου του υποδοχέα της βιταμίνης D – *Bsm I* και *Fok I*- και οι δύο του υποδοχέα των οιστρογόνων –*Pvu II* και *Xba I*- δεν φαίνεται να έχουν καμμία επίδραση στην οστική πυκνότητα του υπό μελέτη ελληνικού πληθυσμού. Ακόμη, καμμία συσχέτιση δε βρέθηκε μεταξύ των πολυμορφισμών και των μελετηθέντων δεικτών οστικού μεταβολισμού.

Από τη βιβλιογραφία καθίσταται σαφές ότι οι γενετικές επιδράσεις συγκεκριμένων γονιδίων δεν ανευρίσκονται σταθερά σε όλους τους πληθυσμούς. Τα αντικρουόμενα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη μελέτη διαφορετικών πληθυσμιακών ομάδων είναι πιθανότατα απόρροια της πραγματικής ετερογένειας των πληθυσμών, τόσο ως προς τη συχνότητα συγκεκριμένων μειονεκτικών γονοτύπων (πχ. ο πολυμορφισμός του COLIA1 δεν ανιχνεύτηκε σε μελετηθέντες ασιατικούς πληθυσμούς), όσο και ως προς την ουσιαστική συμβολή του πολυμορφισμού σε δεδομένο περιβάλλον και γονιδιακό υπόστρωμα. Άρα, η διαπίστωση επίδρασης συγκεκριμένου γονιδίου στον οστικό μεταβολισμό σε ένα πληθυσμό, δεν συνεπάγεται το ίδιο αποτέλεσμα σε άλλους. Σύμφωνα με τις



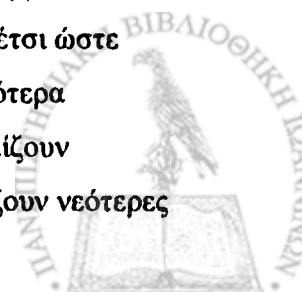
παραπάνω διαπιστώσεις, προκύπτει η ανάγκη να διεξαχθούν περισσότερες γενετικές μελέτες σε διαφορετικές, αλλά ομοιογενείς πληθυσμιακές ομάδες που να αφορούν όσο γίνεται περισσότερα υποψήφια γονίδια. Με αυτό τον τρόπο θα καταστεί δυνατή η βαθύτερη κατανόηση των γενετικών επιδράσεων στον οστικό μεταβολισμό και για κάθε πληθυσμό, θα εξαχθούν γενετικοί προγνωστικοί δείκτες, οι οποίοι θα μπορούσαν μελλοντικά να χρησιμοποιηθούν για την πρόγνωση εμφάνισης οστεοπόρωσης ή οστεοπορωτικών καταγμάτων.

Η παρούσα είναι η πρώτη μελέτη που ερευνά πολυμορφισμούς των γονιδίων του οιστρογονικού υποδοχέα α και του κολλαγόνου τύπου Ια1 στον Ελληνικό πληθυσμό.

Εκτός από την πραγματική ετερογένεια μεταξύ πληθυσμών ως προς συγκεκριμένη γενετική επίδραση, η εφαρμοζόμενη μεθοδολογία στη διεξαγωγή των μελετών αποτελεί μια άλλη σημαντική παράμετρο, η οποία οφείλεται να ληφθεί υπόψη στην αξιολόγηση των ευρημάτων, για την εξαγωγή ορθών συμπερασμάτων. Στην γενετική της οστεοπόρωσης σημασία έχει τόσο ο τρόπος επιλογής της ομάδας μελέτης (ηλικία, φύλο, προ ή μετεμμηνοπαυσιακή κατάσταση), όσο και οι μελετούμενοι φαινότυποι, πχ ο προσδιορισμός της οστικής πυκνότητας σε εναλλακτικές περιοχές, (σπόνδυλοι, ισχίο, και αντιβράχιο), ή η επιλογή διαφορετικών βιοχημικών δεικτών οστικής απορρόφησης και επανφδόμησης.

Αναλυτικότερα, πρώτον, η ανακατανομή των πληθυσμών μπορεί να αποτελέσει αιτία μεροληπτικών αποτελεσμάτων. Κατά την επιλογή του πληθυσμού μελέτης πρέπει να αποφεύγονται προσμίξεις από διαφορετικές εθνικότητες, γιατί η ταυτόχρονη μελέτη ομάδων με διαφορετικές συχνότητες γονοτύπων είναι δυνατόν να δώσουν λανθασμένα συμπεράσματα. Η παρούσα μελέτη έχει το πλεονέκτημα να διεξάγεται σε μια περιοχή με σχετικά κλειστό πληθυσμό, όπου δεν έχουν εισχωρήσει ομάδες διαφορετικής προέλευσης. Εξάλλου, όλες οι συμμετέχουσες ήταν ελληνικής καταγωγής και στη μελέτη δεν συμπεριλήφθησαν άτομα που πρόσφατα μετανάστευσαν από γειτονικές χώρες.

Δεύτερον, δεν θα πρέπει να αγνοηθεί το γεγονός ότι η ηλικία και η παρουσία ή όχι εμμηνόπαυσης στη γυναίκα αποτελούν καθοριστικούς παράγοντες για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων και τη διατύπωση ασφαλών συμπερασμάτων που αφορούν τον οστικό μεταβολισμό. Διαφορές στα χαρακτηριστικά μεταξύ ομάδων μελέτης μπορεί να είναι υπεύθυνες για τα αντιφατικά αποτελέσματα. Στην παρούσα μελέτη, η επιλογή του γυναικείου φύλου ως αντικείμενο μελέτης έγινε με βάση το γεγονός ότι -χωρίς να υποτιμάται το μέγεθος του προβλήματος στους άρρενες- οι γυναίκες έχουν σε μεγαλύτερο βαθμό οστεοπενία και οστεοπόρωση<sup>126</sup> και επίσης υφίστανται σε μεγαλύτερη συχνότητα οστεοπορωτικά κατάγματα.<sup>127</sup> Όσον αφορά την επιλογή της ηλικίας, αυτή έγινε με βάση το γεγονός ότι η περι- και μετεμμηνοπαυσιακή περίοδος με τις ακόλουθες δραματικές αλλαγές στο ορμονικό milieu συνοδεύεται από αυξημένο οστικό μεταβολισμό, κυρίως στη σπονδυλική στήλη, έτσι ώστε μικρές διαφορές που πιθανά να οφείλονται σε γενετικούς παράγοντες να γίνονται ευκολότερα αντιληπτές. Επιπρόσθετα, διαιτητικοί παράγοντες και έλλειψη φυσικής άσκησης, που παίζουν καταλυτικό ρόλο στην οστική απώλεια σε ηλικιωμένες γυναίκες, δε φαίνεται να επηρεάζουν νεότερες





γυναίκες όχι πολύ μακριά χρονικά από την εμμηνόπαυση,<sup>4</sup> όπως ήταν η πλειοψηφία των γυναικών που συμμετείχαν στην παρούσα μελέτη.

Τα σπογγώδη οστά είναι αυτά που κυρίως πλήττονται άμεσα στην εμμηνόπαυση και για το λόγο αυτό επιλέχθηκε η οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης ως σημείο αναφοράς, όπως συμβαίνει και στην πλειοψηφία των δημοσιευμένων μελετών.

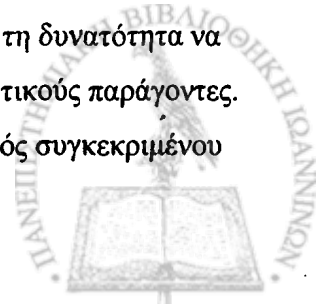
Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη διεθνώς που απευθύνει ταυτόχρονα το ερώτημα της δράσης, αλλά και συνέργειας των πέντε συγκεκριμένων πολυμορφισμών. Συγκεκριμένα, ο *Fok I* πολυμορφισμός δεν έχει προηγουμένως μελετηθεί μαζί με τους άλλους τρεις γνωστούς πολυμορφισμούς *Bsm I*, *Taq I* και *Apa I*. Εξάλλου, γενικότερα αποτέλεσε αντικείμενο περιορισμένου αριθμού μελετών, παρά το ότι λόγω της λειτουργίας του, προσφέρει λογικές εξηγήσεις για τη δράση του.

Δεδομένου του ότι οι τρεις πολυμορφισμοί *-Bsm I*, *Taq I* και *Apa I* αποδεδειγμένα βρίσκονται σε ανισοκατανομή σύνδεσης μεταξύ τους και κατά συνέπεια τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη μελέτη του ενός μπορούν με σχετική ασφάλεια να επεκταθούν και στους άλλους δύο, η παρούσα εργασία περιορίστηκε στην ανίχνευση του ενός μόνο εκ των τριών, του *Bsm I*.

Κατά τον ίδιο τρόπο οι δύο πολυμορφισμοί του ιντρονίου 1 του οιστρογονικού υποδοχέα α είναι σε ανισοκατανομή σύνδεσης τόσο μεταξύ τους όσο και με το μικροδορυφορικό πολυμορφισμό VNTR που βρίσκεται μπροστά από το γονίδιο. Συνεπώς, τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τους *Pvu II* και *Xba I* πολυμορφισμούς θα μπορούσαν να αποδοθούν με ασφάλεια και στον μικροδορυφορικό TA πολυμορφισμό.

Το γεγονός ότι γενετικές και περιβαλλοντικές επιδράσεις δεν είναι ανεξάρτητες η μια από την άλλη, αλλά διαρκώς αλληλεπιδρούσες μεταξύ τους, συνεπάγεται ότι είναι αδύνατον το τελικό αποτέλεσμα που επιφέρουν να είναι απόλυτα προβλέψιμο. Η παρατήρηση αυτή παρέχει μια λογική εξήγηση στο ερώτημα που εγείρεται από την απουσία στην παρούσα μελέτη επίδρασης δόσης-γονιδίου (dose-effect) κατά τον προσδιορισμό της οστικής πυκνότητας στους τρεις γονοτύπους του *Sp I* πολυμορφισμού. Έτσι, οι ετερόζυγοι *Ss* φέρονται με ελαφρώς υψηλότερη BMD από τους *SS*, ενώ θα ήταν πιο λογικό να υπάρχει μια διαβάθμιση της BMD από τον *SS* προς τον *ss* γονότυπο. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, οι επιδράσεις του περιβάλλοντος φαίνεται να είναι πιο ισχυρές στους ετερόζυγους από ότι στους δύο ακραίους γονοτύπους.

Η πολυπλοκότητα των γενετικών επιδράσεων στην ρύθμιση της οστικής πυκνότητας μπορεί να μελετηθεί με τη βοήθεια πολυπαραγοντικών μοντέλων τα οποία μας παρέχουν τη δυνατότητα να υπολογίσουμε την επίδραση κάθε παράγοντα ανεξάρτητα από πιθανούς τροποποιητικούς παράγοντες. Με τη χρήση τέτοιων μοντέλων είναι επίσης δυνατό να αξιολογηθεί η επίδραση ενός συγκεκριμένου γονιδίου ανεξάρτητα από άλλες γενετικές επιδράσεις.



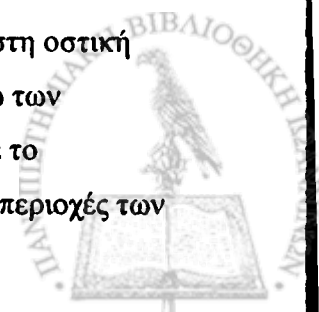
Οι συσχετίσεις που έδειξαν ότι οι γυναίκες με γονότυπο ss είχαν σημαντικά χαμηλότερη BMD από ότι όσες είχαν γονότυπο SS, παρέμειναν ισχυρές ακόμη και μετά από προσαρμογή των τιμών BMD για παράγοντες που θα μπορούσαν παρεμβαίνοντας στον οστικό μεταβολισμό να επηρεάσουν την οστική πυκνότητα. Στους παράγοντες για τους οποίους έγινε η προσαρμογή περιλαμβάνονται η ηλικία, το βάρος, το ύψος και η χρήση ορμονικής θεραπείας υποκατάστασης.

Με τη χρήση των πολυπαραγοντικών μοντέλων αποδείχτηκε, επίσης, ότι η επίδραση του πολυμορφισμού Sp1 στην οστική πυκνότητα δεν επηρεάζεται από τους υπόλοιπους 4 μελετηθέντες πολυμορφισμούς, ούτε άμεσα, ούτε με γονιδιακές αλληλεπιδράσεις. Όταν όλοι οι πολυμορφισμοί εξετάστηκαν συγχρόνως στο μοντέλο, μόνο ο Sp1 ξεχώρισε για την ανεξάρτητη και σημαντική επίδρασή του στην οστική πυκνότητα.

Στην παρούσα σειρά εξετάστηκε και το ενδεχόμενο της πιθανής συνέργειας συγκεκριμένων γονοτύπων μεταξύ των γονιδίων VDR και ESRa, η οποία είχε προταθεί από προηγούμενες μελέτες, αλλά δεν κατέστη δυνατό να αποδειχτεί. Το ενδεχόμενο τα αρνητικά αποτελέσματα να οφείλονται σε μικρότερο αριθμό ατόμων που φέρουν τους αντίστοιχους συνδυασμούς πολυμορφισμών αποκλείστηκε τουλάχιστον ως προς τη μελέτη της Willing και συν.,<sup>64</sup> γιατί η παρούσα σειρά είχε ακόμη μεγαλύτερους αριθμούς ατόμων σε κάθε ακραίο συνδυασμό γονοτύπων. Κατά συνέπεια δεν θα ήταν δυνατό κάποια σημαντική διαφορά να έχει παραληφθεί λόγω του μεγέθους της ομάδας μελέτης. Μια πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι η υπόθεση ότι η αλληλεπίδραση είναι σημαντική μόνο σε προ-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες, όπως ήταν οι γυναίκες της εν λόγω μελέτης, ενώ μετά την έλευση της εμμηνόπαυσης υπεισέρχονται και άλλοι παράγοντες και την αμβλύνουν. Αξιοσημείωτη ένδειξη της πολυπλοκότητας των επιδράσεων και της πιθανής σημασίας των εθνικών διαφορών μεταξύ των ομάδων μελέτης αποτελεί η παρατήρηση ότι οι δύο προηγούμενες μελέτες κατέληξαν σε διαφορετικά συμπεράσματα κατά τη μεμονωμένη μελέτη καθενός εκ των δύο γονιδίων. Σύμφωνα με τη μελέτη των Gennari και συν., μόνο το VDR γονίδιο βρέθηκε να επιδρά σημαντικά στην οστική πυκνότητα, ενώ οι Willing και συν. αυτό το απέδειξαν μόνο για το ESRa.

Από την παρούσα μελέτη, μόνο η σύγκριση δύο συγκεκριμένων απλοτύπων από αυτούς που προέκυψαν για τα γονίδια VDR και ESRa φάνηκε να έχει σημαντική διαφορά ως προς την οστική πυκνότητα, αλλά ο μικρός αριθμός των ατόμων που έφεραν τους συγκεκριμένους απλοτύπους καθώς και ο μεγάλος αριθμός των συγκρίσεων που πραγματοποιήθηκαν δεν επιτρέπει την διατύπωση ασφαλούς συμπεράσματος. Για να συμβεί αυτό, θα ήταν απαραίτητες πολύ μεγάλες σειρές ατόμων, πράγμα που δεν εξασφάλισε καμιά μελέτη.

Ο μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνεται η επίδραση του πολυμορφισμού Sp 1 στη οστική πυκνότητα παραμένει αδιευκρίνιστος. Οι «τοποθεσίες» (gene loci) που μελετούνται μέσω των πολυμορφισμών δεν είναι πάντα αυτά καθαυτά τα σημεία που λειτουργικά συνδέονται με το μεταβολισμό των οστών, αλλά πιθανά βρίσκονται σε ανισοκατανομή σύνδεσης με άλλες περιοχές των



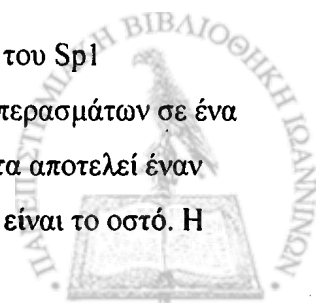
γονιδίων -πραγματικά υπεύθυνες-, οι οποίες ακόμη δεν έχουν εντοπιστεί. Αποτελούν πάντως οδηγία σημεία για την περαιτέρω εξέλιξη της μελέτης μέχρι τον ακριβή εντοπισμό της «αληθούς» τοποθεσίας. Έτσι, κατά τη μελέτη του πολυμορφισμού *Bsm I* του γονιδίου VDR, ενώ ως μειονεκτικός καθιερώθηκε από την πλειοψηφία των μελετών ο γονότυπος BB, υπήρξαν μελέτες που διεξήχθησαν στη Σκωτία και Ολλανδία, οι οποίες αποδείκνυαν ως μειονεκτικό τον ακριβώς αντίθετο bb, προφανώς από κάποια μετάλλαξη που εμφανίστηκε στους συγκεκριμένους πληθυσμούς μελέτης και η οποία οδήγησε σε αποσύζευξη του από την «αληθή» γονιδιακή τοποθεσία. Πάντως, για το γονίδιο του COL1A1, η μελέτη του πολυμορφισμού Sp 1 συγχρόνως με τους υπόλοιπους γνωστούς πολυμορφισμούς του γονιδίου αποδεικνύει πως ο Sp 1 είναι αυτός που πραγματικά ελέγχει την οστική πυκνότητα και τα κατάγματα.

Παρόλον ότι φαίνεται πιθανό κάποιες από τις γενετικές επιδράσεις στα οστά να ασκούνται μέσω ρύθμισης του οστικού μεταβολισμού, οι δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν στον πληθυσμό μας δεν φάνηκε να επηρεάζονται από κανέναν εκ των μελετηθέντων πολυμορφισμών, συμπεριλαμβανομένου και του Sp 1. Ενδεχομένως, το μέγεθος του δείγματος να μην ήταν αρκετά μεγάλο, ώστε να διακριθούν πιθανές μικρές γενετικές επιδράσεις στις βιοχημικές παραμέτρους, οι οποίες επιπλέον παρουσιάζουν αρκετά υψηλότερες σταθερές διακύμανσης από την οστική πυκνότητα. Ωστόσο, υπάρχουν σήμερα πιο εξειδικευμένοι δείκτες παραγωγής και αποδόμησης του κολλαγόνου οι οποίοι πιθανά να παρείχαν κάποια λογική ερμηνεία.

Η βασική έρευνα έχει δείξει ότι η G→T αντικατάσταση, που συμβαίνει σε σημείο κείμενο για τη μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου, οδηγεί σε αυξημένη μεταγραφή που με τη σειρά της καταλήγει σε αυξημένη μετάφραση πρωτεΐνης. Η παραγόμενη πρωτεΐνη δεν μπορεί να αφομοιωθεί και να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά στη σύνθεση των αλύσεων του κολλαγόνου τύπου 1, οδηγώντας τελικά σε μειωμένη οστική πυκνότητα.<sup>128</sup>

Έχει επίσης προταθεί ότι οι γενετικοί παράγοντες μπορεί να δρουν όχι μόνον άμεσα στα οστά, αλλά έμμεσα τροποποιώντας σωματομετρικά χαρακτηριστικά και συγκεκριμένα το ύψος ή το βάρος. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε το ενδεχόμενο η επίδραση του πολυμορφισμού Sp1 του γονιδίου του κολλαγόνου τύπου Ia1 στην οστική πυκνότητα, να οφείλεται μόνο σε επίδρασή του στο μέγεθος του σώματος (ύψος ή βάρος). Όμως, η επίδραση του πολυμορφισμού Sp1 παρέμεινε σταθερή ακόμη και μετά την προσαρμογή της οστικής πυκνότητας, χρησιμοποιώντας πολυπαραγοντική γραμμική εξάρτηση, για το βάρος και το ύψος των ατόμων. Στον Ελληνικό πληθυσμό αποδεικνύεται, λοιπόν, πως ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός συμβάλλει στην οστική πυκνότητα ανεξάρτητα από τα δύο σωματομετρικά στοιχεία.

Με βάση τα παρατιθέμενα δεδομένα της σημαντικής γενετικής επίδρασης του Sp1 πολυμορφισμού στην οστική πυκνότητα, επιχειρήθηκε να γίνει επέκταση των συμπερασμάτων σε ένα φαινότυπο ουσιαστικότερης κλινικής σημασίας, τα κατάγματα. Η οστική πυκνότητα αποτελεί έναν έμμεσο δείκτη ή ένα σχετικό μέτρο του πόσο γερό ή αντίθετα του πόσο ευαίσθητο είναι το οστό. Η



ικανότητα του οστού να αντέχει σε δυνάμεις που προκαλούν κατάγματα, εξαρτάται και από άλλες παραμέτρους, όπως η οστική μικροαρχιτεκτονική και η γεωμετρία, που είναι δύσκολο τεχνικά να προσδιοριστούν. Έτσι, τα κατάγματα, αποτελώντας την άμεση κλινική εκδήλωση που ενδιαφέρει τόσο τον ασθενή όσο και τον κλινικό, είναι ο ουσιαστικός στόχος των μελετών. Ωστόσο, η μελέτη των καταγμάτων χρειάζεται συμμετοχή πολύ μεγάλου αριθμού ατόμων, για να δώσει ασφαλή αποτελέσματα. Για να υπερκεραστεί αυτό το εμπόδιο χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της μετα-ανάλυσης, κατά την οποία συγκεντρώθηκε ικανοποιητικός αριθμός πληροφοριών για επιπολάζοντα κατάγματα από μελέτες που τα συσχέτισαν με τον μελετούμενο πολυμορφισμό.

Παρά την παρατηρούμενη ετερογένεια μεταξύ των μελετών που συμπεριλήφθηκαν στη μετα-ανάλυση αποδείχτηκε ότι υπάρχει σημαντική επίδραση του Sp 1 πολυμορφισμού του γονιδίου του κολλαγόνου τύπου Ia 1 και στον επιπολασμό σπονδυλικών καταγμάτων. Κατέστη επίσης σαφές ότι στην προκειμένη περίπτωση υπάρχει επίδραση της δόσης του αλληλομόρφου έτσι ώστε ο κίνδυνος κατάγματος να αυξάνει σταδιακά από το γονότυπο SS στον Ss και από τον τελευταίο στον ss. Η υπολογιζόμενη συνεισφορά της παρουσίας του s αλληλίου στα κατάγματα είναι 9%.

Τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης έδειξαν επίσης ότι η γενετική επίδραση του Sp1 πολυμορφισμού στα οστά, τουλάχιστον όσον αφορά τα κατάγματα, είναι πιο έντονη σε μικρότερες ηλικίες και αμβλύνεται με την πάροδο του χρόνου. Αυτό, έρχεται σε αντίθεση με τα επιμέρους συμπεράσματα δύο μελετών, όπου οι γενετικές επιδράσεις γινόταν πιο έντονες σε πιο ηλικιωμένα άτομα.<sup>68,113</sup> Ωστόσο, φαίνεται λογικότερο, οι γενετικές επιδράσεις να ασκούνται νωρίτερα στη ζωή του ατόμου προτού συμπαρομαρτούντες παράγοντες οδηγήσουν σε πιο σύνθετες αλληλεπιδράσεις. Άλλωστε, φαίνεται ότι ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός έχει επίδραση στην οστική πυκνότητα από την παιδική ηλικία.<sup>74</sup>

Πάντως, δεδομένων των ιδιαιτεροτήτων κάθε πληθυσμού, θα πρέπει κανείς να είναι επιφυλακτικός κατά την αναγωγή αυτών των συμπερασμάτων σε εθνικότητες που δεν συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη.

Συμπερασματικά, από την παρούσα μελέτη έγινε φανερό ότι ο πολυμορφισμός Sp1 του γονιδίου COL1A1 παίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της οστικής πυκνότητας, τουλάχιστον μετεμνηνοπαυσιακών Ελληνίδων, ενώ οι πολυμορφισμοί των υποδοχέων των οιστρογόνων και της βιταμίνης D δεν φαίνεται να έχουν καμιά σημαντική κλινική επίδραση. Ο ίδιος πολυμορφισμός φαίνεται να επιδρά στον επιπολασμό των σπονδυλικών καταγμάτων τα οποία αποτελούν την ουσιαστικότερη κλινική έκφραση της διαταραχής του οστικού μεταβολισμού.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οστική πυκνότητα και μεταβολισμός βρίσκονται υπό ισχυρό γενετικό έλεγχο. Διάφορα υποψήφια γονίδια έχουν μελετηθεί δίνοντας αντικρουόμενα αποτελέσματα σε διαφορετικούς πληθυσμούς. Μελετήσαμε την πιθανή ανεξάρτητη και συνεργική επίδραση πέντε διαφορετικών πολυμορφισμών και συγκεκριμένα των *Bsm I* και *Fok I* του γονιδίου του υποδοχέα της βιταμίνης D (VDR), των *Pvu II* και *Xba I* του γονιδίου του οιστρογονικού υποδοχέα τύπου α (ESRα) και του *Sr1* πολυμορφισμού του γονιδίου του κολλαγόνου τύπου Ia1 (COLIA1) στην οστική πυκνότητα (BMD) των οσφυϊκών σπονδύλων και σε βιοχημικούς δείκτες οστικού μεταβολισμού, σε μια σειρά περι- και μετεμμηνοπαυσιακών Ελληνίδων. Βρέθηκε ότι ο *ss* γονότυπος του πολυμορφισμού *Sr1* είχε χαμηλότερη BMD, προσαρμοσμένη για την ηλικία σε σύγκριση με τους *Ss* και *SS* (BMD= 0.842 g/cm<sup>2</sup> στους *SS*, 0.851 g/cm<sup>2</sup> στους *Ss*, 0.763 g/cm<sup>2</sup> στους *ss*. P=0.018 για τη σύγκριση *ss* έναντι *SS* και *Ss*).

Με τη χρήση πολυπαραγοντικού γραμμικού μοντέλου και προσαρμογή για παράγοντες όπως η ηλικία, το βάρος, το ύψος, ο παρελθών χρόνος από την έλευση εμμηνόπαυσης και η χρήση ορμονικής θεραπείας υποκατάστασης, η ομοζυγωτία *ss* αναδείχθηκε ως προγνωστικός παράγοντας χαμηλής BMD ανεξάρτητα από τους υπόλοιπους τέσσερις μελετηθέντες πολυμορφισμούς (p=0.013), και το εύρημα αυτό παρέμεινε σταθερό σε μοντέλο οπισθοδρομικής εξάλειψης.

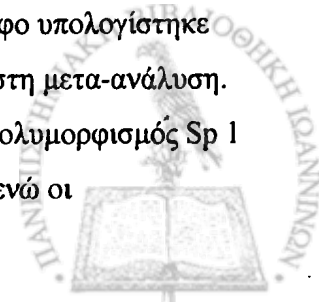
Επιπλέον, δεν υπήρξαν ενδείξεις ισχυρής συνέργιας μεταξύ κανενός συνδυασμού πολυμορφισμών, κατά τον έλεγχο πιθανών αλληλεπιδράσεων.

Ωστόσο, δε διαπιστώθηκαν συσχετίσεις μεταξύ κανενός πολυμορφισμού και των επιπέδων οστεοκαλσίνης και του λόγου υδροξυπρολίνης/κρεατινίνη ούρων.

Για να εξεταστεί η επίδραση του πολυμορφισμού *Sr1* στα κατάγματα, που είναι ένας οστικός φαινότυπος ουσιαστικότερης κλινικής σημασίας, πραγματοποιήθηκε μια μετα-ανάλυση όλων των δημοσιευμένων εργασιών που συμπεριλάμβαναν γονοτυπικό προσδιορισμό για τον πολυμορφισμό *Sr1* και πληροφορίες για κατάγματα, έως τον Αύγουστο του 2000. Δεκατρείς μελέτες που πληρούσαν τα κριτήρια συγκέντρωσαν συνολικά 3641 άτομα. Ο πολυμορφισμός *Sr1* του γονιδίου COLIA1 παρουσίασε θετική σχέση επίδρασης δόσης αλληλομόρφου στον κίνδυνο καταγμάτων. Ο λόγος κινδύνου ήταν 1.25 (95% CI 1.09-1.45) για τους ετεροζυγώτες *Ss* έναντι των ομοζυγωτών *SS*, 1.68 (95% CI 1.35-2.10) για τους ομοζυγώτες *ss* έναντι των *SS* και 1.35 (95% CI 1.04-1.75) για τους ομοζυγώτες *ss* έναντι των *Ss* ετεροζυγωτών. Οι επιδράσεις ήταν εντονότερες στις μελέτες που αφορούσαν μόνο τα σπονδυλικά κατάγματα και στις μελέτες που συμπεριλάμβαναν άτομα ηλικίας κάτω των 65.

Το ολικό κλάσμα καταγμάτων που θα μπορούσαν να αποδοθούν στο *s* αλληλόμορφο υπολογίστηκε ως 9.4% για τους ευρωπαϊκούς και αμερικανικούς πληθυσμούς που μελετήθηκαν στη μετα-ανάλυση.

Συμπερασματικά, στον ελληνικό μετεμμηνοπαυσιακό πληθυσμό, μόνο ο πολυμορφισμός *Sr1* του γονιδίου COLIA1 φάνηκε να έχει επίδραση στην οσφυϊκή οστική πυκνότητα, ενώ οι



πολυμορφισμοί δύο άλλων υποψηφίων γονιδίων, του γονιδίου VDR και του ESRα δεν φάνηκε να έχουν καμιά επίδραση στον συγκεκριμένο πληθυσμό. Επιπλέον, ο Sp1 πολυμορφισμός επηρεάζει και τον κίνδυνο καταγμάτων σε ευρωπαϊκούς και αμερικανικούς πληθυσμούς.



## ABSTRACT

Bone mineral density and metabolism are under strong genetic control. Several candidate genes have been studied resulting in conflicting findings in different populations.

We have evaluated the possible independent and synergistic genetic effect of five different polymorphisms, namely the *Bsm I* and *Fok I* polymorphisms of the vitamin D receptor (VDR) gene, the *Pvu II* and *Xba I* polymorphisms of the estrogen receptor alpha (ESRa) gene and the Sp1 polymorphism of the collagen Ia1 (COLIA1) gene on spinal bone mineral density (BMD) and on biochemical markers of bone turnover, in a cohort of peri- and postmenopausal Greek women.

We found that the ss genotype of the Sp1 polymorphism had lower BMD, adjusted for age compared to Ss and SS (BMD= 0.842 g/cm<sup>2</sup> in SS, 0.851 g/cm<sup>2</sup> in Ss, 0.763 g/cm<sup>2</sup> in ss. P=0.018 for ss vs. SS and Ss).

In multivariate modeling, after adjusting for confounding factors such as age, weight, height, years since menopause and use of hormone replacement therapy, ss homozygosity was a predictive factor of low BMD independently of the other four polymorphisms studied (p=0.013) and this was consistent in a backward elimination model.

Furthermore, no evidence of strong synergism was found between any of the polymorphisms studied when interactions were tested.

However, no association between any of the polymorphisms studied and the levels of osteocalcin and urinary hydroxyproline to creatinine ratio was found.

In order to test the effect of Sp 1 polymorphism on fractures, which represent a clinically more significant phenotype, we conducted a meta-analysis of all published studies including genotyping for Sp 1 polymorphism and data on fractures, up to August 2000. Thirteen eligible studies conferred 3641 subjects. The COLIA1 Sp1 polymorphism showed a dose-response relationship with the prevalence of fractures. The risk ratio was 1.25 (95% CI 1.09-1.45) for Ss heterozygotes vs. SS homozygotes, 1.68 (95% CI 1.35-2.10) for ss homozygotes vs. SS homozygotes and 1.35 (95% CI 1.04-1.75) for ss homozygotes vs. Ss heterozygotes. The effects were larger among studies considering only vertebral fractures and in studies including subjects aged less than 65 years. The total average attributable fraction of fractures due to s allele was estimated to be 9.4% in the European and US populations studied.

In conclusion, in the Greek postmenopausal population only the Sp 1 polymorphism of the COLIA1 gene seems to exert a genetic effect on bone mineral density whereas polymorphisms of two other candidate genes, the VDR and the ESRa gene did not seem to have any effect on this particular population. Furthermore, the Sp 1 polymorphism seems to influence the risk of fractures in European and US populations.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine Reviews* 2000;21:115-137
2. National Osteoporosis Foundation. Osteoporosis: Review of the Evidence for Prevention Diagnosis and Treatment and Cost-Effectiveness Analysis. *Osteoporos Int* 1998;8(Suppl 4): S8
3. Cummings SR, Nevitt MC, Browner WS, et al., for the study of osteoporotic fractures research group. Risk factors for hip fracture in women. *N Engl J Med* 1995;332:767-773
4. Heaney RP. Pathophysiology of osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1998;27(2):255-265
5. Gilsanz V. Phenotype and genotype of osteoporosis. *Trends Endocrinol Metab* 1998;9(5):184-190
6. Pockop NA, Eisman JA, Hopper JL, Yeates MG, Sambrook PN, Eberl S. Genetic determinants of bone mass in adults: a twin study. *J Clin Invest* 1987;80:706-710
7. Gueguen R, Jouanny P, Guillemin F, Kuntz C, Pourel J, Siest G. Segregation analysis and variance components analysis of bone mineral density in healthy families. *J Bone Miner Res* 1995;10:2017-2022
8. Johnson ML, Gong G, Kimberling W, Recker SM, Kimmel DB, Recker RB. Linkage of a gene causing high bone mass to human chromosome 11 (11q12-13). *Am J Hum Genet* 1997;60:1326-1332
9. 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(1):146-151
10. Heaney-C, Shalev H, Elbedour K, et al. Human autosomal recessive osteopetrosis maps to 11q13, a position predicted by comparative mapping of the murine osteosclerosis (oc) mutation. *Hum Mol Genet* 1998;7:1407-1410
11. 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* 1999;13:1903-1908
12. Devoto M, Shimoya K, Caminis J, et al. First-stage autosomal genome screen in extended pedigrees suggests genes predisposing to low bone mineral density on chromosomes 1p, 2p and 4q. *Eur J Hum Genet* 1998;6:151-157
13. Koller DL, Rodriguez LA, Christian JC, et al. Genome screen for QTLs contributing to normal variation in bone mineral density and osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1999;14 (Suppl 1) S141(Abstract)
14. Niu T, Chen C, Cordell H, et al. A genome-wide scan for loci linked to forearm bone mineral density. *Hum Genet* 1999;104:226-233





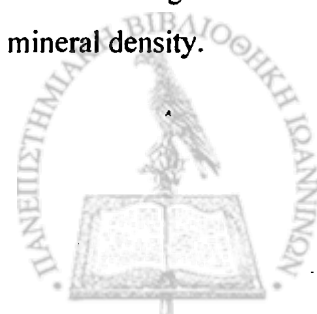
15. Duncan EL, Brown MA, Sinsheimer J, et al. Suggestive linkage of the parathyroid receptor type 1 to osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1999;14:1993-1999
16. Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ, Eisman JA. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphisms and circulating osteocalcin. *Proc Natl Acad Sci* 1992;89:6665-6669
17. Morrison NA, Qi JC, Tokita A, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 1994;367:284-287
18. Sainz J, Van Tornout JM, Loro ML, Sayre J, Roe TF, Gilsanz V. Vitamin D receptor gene polymorphisms and bone density in prepubertal American girls of Mexican descent. *N Engl J Med* 1997;337:77-82
19. Fleet JC, Harris SS, Wood RJ, Dawson-Hughes B. The *Bsm I* vitamin D receptor restriction fragment length polymorphism (BB) predicts low bone density in premenopausal black and white women. *J Bone Miner Res* 1995;10:985-990
20. Garnero P, Borel O, Sornay-Rendu E, Delmas P. Vitamin D receptor gene polymorphisms do not predict bone turnover and bone mass in healthy premenopausal women. *J Bone Miner Res* 1995;10:1283-1288
21. Kung AWC, Yeung SSC, Lau KS. Vitamin D receptor gene polymorphism and peak bone mass in southern chinese women. *Bone* 1998;22:389-393
22. Hustmyer FG, Peacock M, Hui S, Johnston CC, Christian J. Bone mineral density in relation to polymorphism at the vitamin D receptor gene locus. *J Clin Invest* 1994;94:2130-2134
23. Spector TD, Keen RW, Arden NK, et al. Influence of vitamin D receptor genotype on bone mineral density in postmenopausal women: a twin study in Britain. *BMJ* 1995;310:1357-1360
24. Langdahl BL, Gravholt CH, Brixen K, Eriksen EF. Polymorphisms of the vitamin D receptor gene and bone mass, bone turnover and osteoporotic fractures. *Eur J Clin Invest* 2000;30:608-617
25. Vandevyver C, Wylín T, Cassiman JJ, Raus J, Geusens P. Influence of the vitamin D receptor gene alleles on bone mineral density in postmenopausal and osteoporotic women. *J Bone Miner Res* 1997;12:241-247
26. Lim SK, Park YS, Park JM, et al. Lack of association between vitamin D receptor genotypes and osteoporosis in Koreans. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:3677-3681
27. Looney JE, Yoon HK, Fischer M, et al. Lack of high prevalence of the BB vitamin D receptor genotype in severely osteoporotic women. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:2158-2162
28. Jorgensen HL, Scholler J, Sand JC, Bjuring M, Hassager C, Christiansen C. Relation of common allelic variation at vitamin D receptor locus to bone mineral density and postmenopausal bone loss: cross sectional and longitudinal population study. *BMJ* 1996;313:586-590
29. Kröger H, Mahonen A, Ryhänen S, Turunen AM, Alhava E, Mäenpää. Vitamin D receptor genotypes and bone mineral density *Lancet* 1995;345:1238



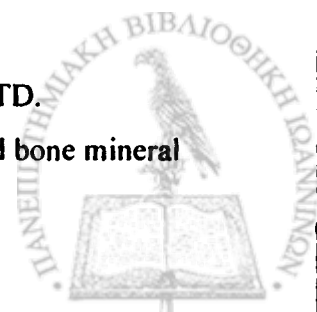
30. Spotila LD, Caminis J, Johnston R, et al. Vitamin D receptor genotype is not associated with bone mineral density in three ethnic/regional groups. *Calcif Tissue Int* 1996;59:235-237
31. Krall EA, Parry P, Lichter JB, Dawson-Hughes B. Vitamin D receptor alleles and rates of bone loss: influences of years since menopause and calcium intake. *J Bone Miner Res* 1995;10:978-984
32. Ferrari S, Rizzoli R, Chevalley T, Slosman D, Eisman JA, Bonjour J-P. Vitamin D receptor gene polymorphisms and change in lumbar spine bone mineral density. *Lancet* 1995;345:423-424
33. Keen RW, Major PJ, Lanchbury JS, Spector TD. Vitamin D receptor gene polymorphism and bone loss. *Lancet* 1995;345:990
34. Hansen TS, Abrahamsen B, Henriksen FL, et al. Vitamin D receptor alleles do not predict bone mineral density or bone loss in Danish postmenopausal women. *Bone* 1998;22:571-575
35. Uitterlinden AG, Pols HA, Burger H, et al. A large-scale population-based study of the association of vitamin D receptor gene polymorphisms with bone mineral density. *J Bone Miner Res* 1996;11:1241-1248
36. Houston LA, Grant SFA, Reid DM, Ralston SH. Vitamin D receptor polymorphism, bone mineral density, and osteoporotic vertebral fracture: studies in a UK population. *Bone* 1996;18(3):249-252
37. Feskanich D, Hunter DJ, Willet WC, et al. Vitamin D receptor genotype and the risk of bone fractures in women. *Epidemiology* 1998;9:535-539
38. Uitterlinden AG, Weel AE, Burger H, et al. Interaction between the vitamin D receptor gene and collagen type Ia1 gene in susceptibility for fracture. *J Bone Miner Res* 2001;16:379-385
39. Beavan S, Prentice A, Yan L, Dibba B, Ralston S. Differences in vitamin D receptor genotype and geographical variation in osteoporosis. *Lancet* 1996;348: 136-137
40. Young RP, Lau EMC, Birjandi Z, Critchley JA, Woo J. Interethnic differences in hip fracture rate and the vitamin D receptor polymorphism. *Lancet* 1996;348:688-689
41. Ensrud KE, Stone K, Cauley JA, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and the risk of fractures in older women. *J Bone Miner Res* 1999;14:1637-1645
42. Berg JP, Falch JA, Haug E. Fracture rate, pre- and postmenopausal bone mass and early and late postmenopausal bone loss are not associated with vitamin D receptor genotype in a high-endemic area of osteoporosis. *Eur J Endocrinol* 1996;135:96-100
43. Gross C, Eccleshall TR, Malloy PJ, Villa ML, Marcus R, Feldman D. The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in post-menopausal Mexican-American women. *J Bone Miner Res* 1996;11:1850-1855
44. Gennari L, Becherini L, Mansani R, et al. *FokI* polymorphism at translation initiation site of the vitamin D receptor gene predicts bone mineral density and vertebral fractures in postmenopausal Italian women. *J Bone Miner Res* 1999;14:1379-1386



45. Arai H, Miyamoto KI, Taketani Y, et al. A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. *J Bone Miner Res* 1997;12:915-921
46. Harris SS, Eccleshall TR, Malloy PJ, Villa ML, Marcus R, Feldman D. The vitamin D receptor start codon polymorphism (Fok I) and bone mineral density on premenopausal American black and white women. *J Bone Miner Res* 1997;12:1043-1048
47. Eccleshall TR, Garner P, Gross C, Delmas PD, Feldman D. Lack of correlation between start codon polymorphism of the vitamin D receptor gene and bone mineral density in premenopausal French women: the OFELY Study. *J Bone Miner Res* 1998;13:31-35
48. Cheng WC and Tsai KS. The vitamin D receptor start codon polymorphism (*Fok I*) and bone mineral density in premenopausal women in Taiwan. *Osteoporos Int* 1999;9:545-549
49. Ferrari S, Rizzoli R, Manen D, Slosman D, Bonjour J-P. Vitamin D receptor gene start codon polymorphisms (*Fok I*) and bone mineral density: interaction with age, dietary calcium and 3'-region polymorphisms. *J Bone Miner Res* 1998;13:925-930
50. Zee RY, Myers RH, Hannan MT, et al. Absence of linkage for bone mineral density to chromosome 12q12-14 in the region of the vitamin D receptor gene. *Calcif Tissue Int* 2000;67:434-439
51. Cooper GS and Umbach DM. Are vitamin D receptor polymorphisms associated with bone mineral density? A meta-analysis. *J Bone Miner Res* 1996;11:1841-1849
52. Gong G, Stern HS, Cheng SC, et al. The association of bone mineral density with vitamin D receptor gene polymorphisms. *Osteoporos Int* 1999;9:55-64
53. Sano M, Inoue S, Hosoi T, et al. Association of estrogen receptor dinucleotide repeat polymorphism with osteoporosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;217:378-383
54. Becherini L, Gennari L, Masi L, et al. Evidence of a linkage disequilibrium between polymorphisms in the human estrogen receptor  $\alpha$  gene and their relationship to bone mass variation in postmenopausal Italian women. *Hum Mol Genet* 2000;9:2043-2050
55. Sowers M, Willing M, Burns T, et al. Genetic markers, bone mineral density, and serum osteocalcin levels. *J Bone Miner Res* 1999;14:1411-1419
56. Kobayashi S, Inoue S, Hosoi T, Ouchi Y, Shiraki M, Orimo H. Association of bone mineral density with polymorphism of the estrogen receptor gene. *J Bone Miner Res* 1996;11:306-311
57. Qi J, Morrison N, Nguyen T, et al. Estrogen receptor genotypes and bone mineral density in women and men. *J Bone Miner Res* 1995;10 (Suppl1):S170
58. Van Leeuwen JPTM, Uitterlinden AG, Burger H, Huang Q, Birkenäger JC, Pols HAP. Estrogen receptor genotype effect is additive to the effect of VDR genotype on bone mineral density. *Osteoporos Int* 1996;6(Suppl 1):87 abstract



59. Han KO, Moon IG, Kang YS, Chung HY, Min HK, Han IK. Non-association of estrogen receptor genotypes with bone mineral density and estrogen responsiveness to hormone replacement therapy in Korean postmenopausal women *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:991-995
60. Bagger YZ, Jorgensen HL, Heegaard A-M, Bayer L, Hansen L, Hassager C. No major effect of estrogen receptor polymorphisms on bone mineral density or bone loss in postmenopausal Danish women. *Bone* 2000;26:111-116
61. Gennari L, Becherini L, Masi L, et al. Vitamin D and estrogen receptor allelic variants in Italian postmenopausal women: evidence of multiple gene contribution to bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:939-944
62. Vandevyver C, Vanhoof J, Declerck K, et al. Lack of association between estrogen receptor genotypes and bone mineral density, fracture history, or muscle strength in elderly women. *J Bone Miner Res* 1999;14:1576-1582
63. Mizunuma H, Hosoi T, Okano H, et al. Estrogen receptor gene polymorphism and bone mineral density at the lumbar spine of pre- and post-menopausal women. *Bone* 1997;21:379-383
64. Willing M, Sowers M, Aron D, et al. Bone mineral density and its change in white women: estrogen and vitamin D receptor genotypes and their interaction. *J Bone Miner Res* 1998;13:695-705
65. Spotila LD, Constantinou CD, Sereda L, Ganguly A, Riggs BL, Prockop DJ. Mutation in a gene for type I procollagen (COL1A2) in a woman with postmenopausal osteoporosis: Evidence for phenotypic and genotypic overlap with mild osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci* 1991;88:5423-5427
66. Spotila LD, Colige A, Sereda L, et al. Mutation analysis of coding sequences for type I procollagen in individuals with low bone density. *J Bone Miner Res* 1994;9:923-932
67. Grant SFA, Reid DM, Blake G, Herd R, Fogelman I, Ralston ST. Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type Ia1 gene. *Nature Genetics* 1996;14:203-205
68. Uitterlinden AG, Burger H, Huang Q, et al. Relation of alleles of the collagen type Ia1 gene to bone density and the risk of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1998;338:1016-1021
69. Roux CH, Dougados M, Abel L, Mercier G, Lucotte G. Association of a polymorphism in the collagen I  $\alpha 1$  gene with osteoporosis in French women. *Arthritis Rheum* 1998;41:187-188
70. Langdahl BL, Ralston SH, Grant SFA, Eriksen EF. An Sp1 binding site polymorphism in the COL1A1 gene predicts osteoporotic fractures in both men and women. *J Bone Miner Res* 1998;13:1384-1389
71. Keen RW, Woodford-Richens KL, Grant SFA, Ralston SH, Lanchbury JS, Spector TD. Association of polymorphism at the type I collagen (COL1A) locus with reduced bone mineral



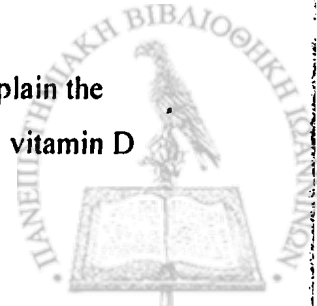
- density, increased fracture risk, and increased collagen turnover. *Arthritis Rheum* 1999;42:285-290
72. Garnero P, Borel O, Grant SFA, Ralston SH, Delmas PD. Collagen Ia1 Sp1 polymorphism, bone mass, and bone turnover in healthy French premenopausal women: the OFELY study. *J Bone Miner Res* 1998;13:813-817
  73. Alvarez L, Oriola J, Jo J, et al. Collagen type I  $\alpha$ 1 gene Sp1 polymorphism in premenopausal women with primary osteoporosis: improved detection of Sp1 binding site polymorphism in the collagen type 1 gene. *Clin Chem* 1999;45:904-906
  74. Sainz J, Van Tornout JM, Sayre J, Kaufman F, Gilsanz V. Association of collagen type Ia1 gene polymorphism with bone density in early childhood. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:853-855
  75. Lidén M, Wilén B, Ljunghall S, Melhus H. Polymorphism at the Sp1 binding site in the collagen type Ia1 gene does not predict bone mineral density in postmenopausal women in Sweden. *Calcif Tissue Int* 1998;63:293-295
  76. Hustmyer FG, Liu G, Johnston CC, Christian J, Peacock M. Polymorphism at an Sp1 binding site of COLIA1 and bone mineral density in premenopausal female twins and elderly fracture patients. *Osteoporos Int* 1999;9:346-350
  77. Heegaard A-M, Jorgensen HL, Vestergaard AW, Hassager C, Ralston SH. Lack of influence of collagen type Ia1 Sp1 binding site polymorphism on the rate of bone loss in a cohort of postmenopausal Danish women followed for 18 years. *Calcif Tissue Int* 2000;66:409-413
  78. Valimaki S, Tahtela R, Kainulainen K, et al. Relation of collagen type I alpha 1 (COLIA1) and vitamin D receptor genotypes to bone mass, turnover, and fractures in early postmenopausal women and to hip fractures in elderly people. *Eur J Intern Med* 2001;12:48-56
  79. Han KO, Moon IG, Hwang CS, et al. Lack of intronic Sp1 binding-site polymorphism at the collagen type Ia1 gene in healthy Korean women. *Bone* 1999;24:135-137
  80. Nakajima T, Ota N, Shirai Y, et al. Ethnic difference in contribution of Sp1 site variation of COLIA1 gene in genetic predisposition to osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 1999;65:352-353
  81. Beavan S, Prentice A, Bakary D, Yan L, Cooper C, Ralston SH. Polymorphism of the collagen type Ia1 gene and ethnic differences in hip-fracture rates. *N Engl J Med* 1998;339:351-352
  82. Weichetova M, Stepan JJ, Michalska D, Haas T, Pols HAP, Uitterlinden AG. COLIA1 polymorphism contributes to bone mineral density to assess prevalent wrist fractures. *Bone* 2000;26:287-290
  83. McGuigan FEA, Armbrecht G, Smith R, Felsenberg D, Reid DM, Ralston SH. Prediction of osteoporotic fractures by bone densitometry and COLIA1 genotyping: a prospective population-based study in men and women. *Osteoporos Int* 2001;12:91-96



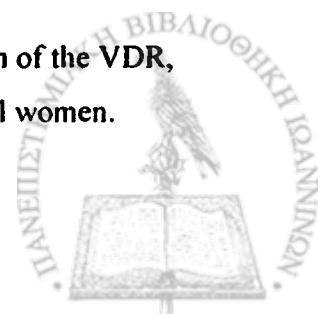
84. Harris SS, Patel MS, Cole DEC, Dawson-Hughes B. Associations of the collagen type Ia1 Sp1 polymorphism with five-year rates of bone loss in older adults. *Calcif Tissue Int* 2000;66:268-271
85. Langdahl BL, Knudsen JY, Jensen HK, Gregersen N, Eriksen EF. A sequence variation: 713-8 delC in the transforming 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;20:289-294
86. Hosoi T, Miyao M, Inoue S, et al. Association study of parathyroid hormone gene polymorphism and bone mineral density in Japanese postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 1999;64(3):205-208
87. Dohi Y, Iki M, Ohgushi H, et al. A novel polymorphism in the promoter region for the human osteocalcin gene: the possibility of a correlation with bone mineral density in postmenopausal Japanese women. *J Bone Miner Res* 1998;13:1633-1639
88. Cauley JA, Zmuda JM, Jaffe K, et al. Apolipoprotein E polymorphism: a new genetic marker of hip fracture risk-The Study of Osteoporotic Fractures. *J Bone Miner Res* 1999;14:1175-1181
89. Zmuda JM, Eichner JE, Ferrell RE, Bauer DC, Kuller H, Cauley JA. Genetic variation in alpha 2HS-glycoprotein is related to calcaneal broadband ultrasound attenuation in older women. *Calcif Tissue Int* 1998;63:5-8
90. Murray RF, McGuigan F, Grant SFA, Reid DM, Ralston SH. Polymorphisms of the interleukin-6 gene are associated with bone mineral density. *Bone* 1997;21:89-92
91. Keen RW, Woodford-Richens KL, Lanchbury JS, Spector TD. Allelic variation at the interleukin-1 receptor antagonist gene is associated with early postmenopausal bone loss at the spine. *Bone* 1998;23:367-371
92. Tabulet J, Frenkian M, Frenjo JL, Feingold N, Jullienne A, DeVernejoul MC. Calcitonin receptor polymorphism is associated with a decreased fracture risk in post-menopausal women. *Hum Mol Genet* 1998;7:2129-2133
93. Tsukamoto K, Orimo H, Hosoi T, et al. Association of bone mineral density with polymorphism of the human calcium-sensing receptor locus. *Calcif Tissue Int* 2000;66:181-183
94. Miyao M, Hosoi T, Inoue S, et al. Polymorphism of insulin-like growth factor I gene and bone mineral density. *Calcif Tissue Int* 1998;63:306-311
95. Ogawa S, Urano T, Hosoi T, et al. Association of bone mineral density with a polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene: PPAR gamma expression in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;260:122-126
96. Gennari L, Becherini L, Masi L, et al. Vitamin D receptor genotypes and intestinal calcium absorption in postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 1997;61:460-463



97. Barger-Lux MJ, Heaney RP, Hayes J, DeLuca HF, Johnson ML, Gong G. Vitamin D polymorphism, bone mass, body size and mucosal VDR density. *Calcif Tissue Int* 1995;57:161-162
98. Mocharla H, Butch AW, Pappas AA, et al. Quantification of vitamin D receptor mRNA by competitive polymerase chain reaction in PBMC: Lack of correspondence with common allelic variants. *J Bone Miner Res* 1997;12:726-733
99. Gross C, Musiol IM, Eccleshall TR, Malloy PJ, Feldman D. Vitamin D receptor gene polymorphisms: analysis of ligand binding and hormone responsiveness in cultured skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;242:467-473
100. Gross C, Krishnan AV, Malloy PJ, Eccleshall TR, Zhao XY, Feldman D. The vitamin D receptor gene start codon polymorphism: a functional analysis of Fok I variants. *J Bone Miner Res* 1998;13:1691-1699
101. Howard G, Nguyen T, Morrison N, et al. Genetic influences on bone density: physiological correlates of vitamin D receptor gene alleles in premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:2800-2805
102. Weel AEAM, Uitterlinden AG, Westendorp ICD, et al. Estrogen receptor polymorphism predicts the onset of natural and surgical menopause. *J Clin Endocrinol Metabol* 1999;84:3146-3150
103. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 1999;140:4367-4370
104. 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;107:899-907
105. Minamitani K, Takahashi Y, Minagawa M, Yasuda T, Niimi H. Difference in height associated with a translation start site polymorphism in the vitamin D receptor gene. *Pediatr Res* 1998;44:628-632
106. Lorentzon M, Lorentzon R, Nordström P. Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with birth height, growth to adolescence, and adult stature in healthy caucasian men: a cross-sectional and longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1666-1671
107. Lehrer S, Rabin J, Stone J, Berkowitz GS. Association of an estrogen receptor variant with increased height in women. *Horm Metab Res* 1994;26:486-488
108. Suarez F, Rossignol C, Garabédian M. Interactive effect of estradiol and vitamin D receptor gene polymorphisms as a possible determinant of growth in male and female infants. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3563-3568
109. Ferrari S, Rizzoli R, Slosman D, Bonjour J-P. Do dietary calcium and age explain the controversy surrounding the relationship between bone mineral density and vitamin D receptor gene polymorphisms? *J Bone Miner Res* 1998;13:363-370



110. Graafmans WC, Lips P, Ooms ME, Van Leeuwen JPTM, Pols HAP, Uitterlinden AG. The effect of vitamin D supplementation on the bone mineral density of the femoral neck is associated with vitamin D receptor genotype. *J Bone Miner Res* 1997;12:1241-1245
111. Deng HW, Li J, Li JL, et al. Change of bone mass in postmenopausal caucasian women with and without hormone replacement therapy is associated with vitamin D receptor and estrogen receptor genotypes. *Hum Genet* 1998;103:576-585
112. Riggs BL, Nguyen TV, Melton LJ, et al. The contribution of vitamin D receptor gene alleles to the determination of bone mineral density in normal and osteoporotic women. *J Bone Miner Res* 1995;10:991-996
113. Braga V, Mottes M, Mirandola S, et al. Association of CTR and COLIA1 alleles with BMD values in peri- and postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 2000;67:361-366
114. Genant HK, Grampp S, Glüer CC, et al. Universal standardization for dual X-ray absorptiometry: patient and phantom cross-calibration results. *J Bone Miner Res* 1994;9:1503-1514
115. Miyamoto K, Kesterson RA, Yamamoto H, et al. Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Mol Endocrinol* 1997;11:1165-1179
116. McGuigan FEA, Reid DM, Ralston SH. Susceptibility to osteoporotic fractures is determined by allelic variation at the Sp1 site, rather than other polymorphic sites at the COLIA1 locus. *Osteoporos Int* 2000;11:338-343
117. Lau J, Ioannidis JPA, Schmid CH. Quantitative methods for systematic reviews. *Ann Intern Med* 1997;127:820-826
118. Mantel N, Haenszel W. Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease. *J Natl Cancer Inst* 1959;22:719-748
119. Laird NM, Mosteller F. Some statistical methods for combining experimental results. *Int J Technol Assess Health Care* 1990;6:5-30
120. Hampson G, Evans C, Pettitt RJ, et al. Bone mineral density, collagen type Ia1 genotypes and bone turnover in premenopausal women with diabetes mellitus. *Diabetologia* 1998;41:1314-1320
121. Vandevyver C, Philippaerts L, Cassimn JJ, Raus J, Geusens P. Bone mineral density in postmenopausal women is not associated with type I collagen (COL-IA1 and COL-IA2) dimorphisms. *J Bone Miner Res* 1997;12:S550
122. De Vernejoul MC, Haguenaer D, Cohen-Solal ME, Beaudreuil J. Polymorphism of collagen I and vertebral osteoporosis: no association. *J Bone Miner Res* 1997;12:S549.
123. Aerssens J, Dequeker J, Peeters J, Breemans S, Broos P, Boonen S. Polymorphism of the VDR, ER and COLIA1 genes and osteoporotic hip fractures in elderly postmenopausal women. *Osteopor Int* 2000;11:583-591





124. Efstathiadou Z, Kranas V, Ioannidis JPA, Georgiou I, Tsatsoulis A. The Sp1 COLIA1 gene polymorphism, and not vitamin D receptor or estrogen receptor gene polymorphisms, determines bone mineral density in postmenopausal Greek women. *Osteoporosis International* 2001;12:326-331
125. Vandevyver C, Stinissen P, Michiels L, Guesens P. Type I collagen gene polymorphisms are associated with susceptibility for fractures in elderly women (abstract). *Osteoporos Int* 1998;8 (Suppl):S7
126. Kanis JA, Geusens P, Christiansen C. Guidelines for clinical trials in osteoporosis: a position paper of the European Foundation for Osteoporosis and Bone Disease. *Osteoporosis Int* 1991;1:182-188
127. Jones G, Nguyen T, Sambrook PN, et al. Symptomatic fracture incidence in elderly men and women: The Dubbo Osteoporosis Epidemiology Study (DOES). *Osteoporosis Int* 1994;4:277-282
128. Mann V, Hobson EE, Li B, et al. A COLIA1 Sp1 binding site polymorphism predisposes to osteoporotic fracture by affecting bone density and quality. *J Clin Invest* 2001;107:899-907

