



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΚΑΡΑΓΙΑΝΝΗΣ ΣΕΡΑΦΕΙΜ-ΙΑΣΩΝ

(Α.Μ: 00127)

«Διερεύνηση μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (Single Nucleotide Polymorphisms:SNPs) ως δεικτών προδιάθεσης ασθενειών και η επιχειρηματική αξιοποίηση τους. »

"Investigation of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) as predisposition markers of disease and their business exploitation. »

Τριμελής επιτροπή

Γεωργιάδης Παναγιώτης Ερευνητής Β, ΕΙΕ

Πλέτσα Βασιλική Ερευνήτρια Β, ΕΙΕ

Μπαλατσός Νικόλαος Αν. Καθηγητής, Παν. Θεσσαλίας

ΑΘΗΝΑ, 2024

Περιεχόμενα

Περίληψη - Abstract	3
Εισαγωγή	4
 <i>Κεφάλαιο I: Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί</i>	
Γενετικοί πολυμορφισμοί	5
Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί	6
Χαρακτηριστικά και ταξινόμηση SNPs	7
 <i>Κεφάλαιο II: Οστεοπόρωση και μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί</i>	
Πολυπαραγοντικές ασθένειες	11
Οστεοπόρωση.....	12
Πολυμορφισμοί και οστεοπόρωση	14
 <i>Κεφάλαιο III: rtPCR kit Οστεοπόρωσης</i>	
A. Πλεονεκτήματα kit Οστεοπόρωσης.....	20
Σύγκριση με array kit.....	21
B. Σχεδιασμός kit.....	22
Ανάλυση kit.....	23
Τι περιλαμβάνει το kit.....	24
 <i>Κεφάλαιο IV: Επιχειρηματική ανάλυση</i>	
SWOT analysis.....	29
Business model canvas.....	31
Risk management.....	36
 Βιβλιογραφία...../.....	 38

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία ασχολείται με τη διερεύνηση της επίδρασης ποικίλων μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) σε πολυπαραγοντικές ασθένειες δίνοντας έμφαση στην οστεοπόρωση. Οι πολυμορφισμοί, ως αλλαγές στην νουκλεοτιδική αλληλουχία, που πραγματοποιούνται σε ένα συγκεκριμένο γενετικό τόπο, επιφέρουν σημαντικές αλλαγές, συμβάλλοντας στη διαμόρφωση γενετικής ποικιλομορφίας. Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί ως η πιο κοινή μορφή γενετικών παραλλαγών, συχνά σχετίζονται με την εκδήλωση ποικίλων νόσων προκαλώντας γονιδιακή απορρύθμιση. Στόχος της εν λόγω μεταπτυχιακής εργασίας είναι η ανασκόπηση της βιβλιογραφίας σχετικά με μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς που σχετίζονται με την οστεοπόρωση και η περαιτέρω διερεύνηση της ενδεχόμενης χρήσης τους ως δεικτών προδιάθεσης για την συγκεκριμένη ασθένεια, με σκοπό τον σχεδιασμό ενός αξιόπιστου διαγνωστικού κιτ που θα μπορούσε να αξιοποιηθεί εμπορικά.

Λέξεις – κλειδιά: μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs), πολυπαραγοντικές ασθένειες, οστεοπόρωση

ABSTRACT

This master's thesis deals with the investigation of the effect of various single nucleotide polymorphisms in multifactorial diseases, emphasizing osteoporosis. Polymorphisms, as changes in the nucleotide sequence, occurring at a specific genetic locus, bring about significant changes, contributing to the formation of genetic diversity. Single nucleotide polymorphisms, as the most common form of genetic variation, are often associated with the manifestation of various diseases causing gene dysregulation. The aim of this master's thesis is to review the literature on single nucleotide polymorphisms related to osteoporosis and to further investigate their possible use as predisposition markers for this disease, with the aim of designing a reliable diagnostic kit that could be exploited commercially .

Keywords: single nucleotide polymorphisms (SNPs), multifactorial diseases, osteoporosis

Εισαγωγή

Οι πολυμορφισμοί μέσω της εμφάνισης δυο ή περισσότερων αλληλομόρφων σε ένα γενετικό τόπο, εκδηλώνονται συχνά και συμβάλλουν στη διατήρηση της ποικιλομορφίας ενός πληθυσμού. Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs), που συνιστούν αλλαγές ενός νουκλεοτιδίου στην αλληλουχία του γενετικού υλικού, είναι η πιο κοινή μορφή γενετικών πολυμορφισμών που συναντάται και είναι ευρέως γνωστό πως σχετίζονται με την εκδήλωση ποικίλων ασθενειών, μεταξύ αυτών και την οστεοπόρωση (Wang & Moul, 2001 ; Sukhumsirichart, 2018 ; Esmaeili et al., 2023) .

Κυρίαρχος σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανασκόπηση της μέχρι στιγμής βιβλιογραφίας σχετικά με τους μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNPs) που συνδέονται με την εκδήλωση οστεοπόρωσης και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες προδιάθεσης αυτής, με απώτερο στόχο τον σχεδιασμό ενός αξιόπιστου διαγνωστικού κιτ που θα μπορούσε να αξιοποιηθεί εμπορικά .

Η εν λόγω διπλωματική εργασία περιλαμβάνει 4 κεφάλαια. Το πρώτο κεφάλαιο αναφέρεται στους γενετικούς πολυμορφισμούς και τα χαρακτηριστικά τους και αναλύει τα χαρακτηριστικά και τα είδη των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) με εκτενή αναφορά στην ταξινόμησή τους.

Το δεύτερο κεφάλαιο εμπεριέχει πληροφορίες που αφορούν τη σύνδεση και τη συσχέτιση συγκεκριμένων μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών με μειωμένη οστική πυκνότητα και την πρόκληση οστεοπόρωσης και/ή οστεοπορωτικών καταγμάτων σε ενήλικες και παιδιά. Επιπρόσθετα, στο συγκεκριμένο κεφάλαιο περιγράφονται οι ορισμοί των πολυπαραγοντικών ασθενειών (συγκρίνοντας τις με τις μονοπαραγοντικές ασθένειες), της οστεοπόρωσης και των χαρακτηριστικών που αυτή παρουσιάζει.

Στο τρίτο κεφάλαιο αναλύονται τα βήματα αξιολόγησης συγκεκριμένων πολυμορφισμών ώστε να αποδειχθεί η εμπλοκή τους με την οστεοπόρωση και η ενδεχόμενη χρήση τους ως προγνωστικοί δείκτες.

Τέλος στο τέταρτο και τελευταίο κεφάλαιο αναλύονται τα βήματα προς το σχεδιασμό και την εμπορική αξιοποίηση ενός διαγνωστικού κιτ που θα περιλαμβάνει όλους τους

γνωστούς μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς που σχετίζονται με την οστεοπόρωση.

Κεφάλαιο I: Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs)

Γενετικοί πολυμορφισμοί

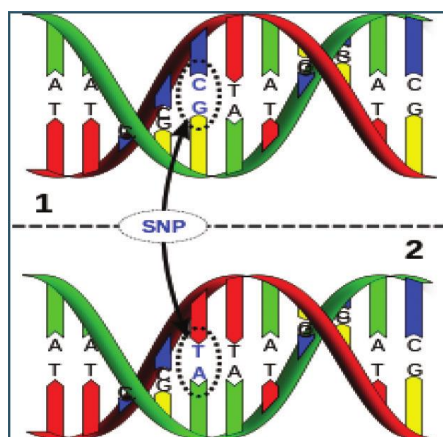
Οι πολυμορφισμοί και οι παραλλαγές στην αλληλουχία του γενετικού υλικού, μπορεί να οδηγήσουν στην εκδήλωση ατομικών διαφορών, όπως για παράδειγμα είναι οι διαφορές σε φαινοτύπους, ο κίνδυνος εκδήλωσης ποικίλων ασθενειών και η απόκριση σε φάρμακα, εμβόλια και παθογόνους μικροοργανισμούς. Οι πολυμορφισμοί ανιχνεύονται συχνά, συμβάλλουν στη διατήρηση της ποικιλομορφίας ενός πληθυσμού που διαβιεί σε ποικίλα περιβάλλοντα, ενώ ταυτόχρονα συνδέονται με το φαινόμενο της προσαρμογής, τη βιοποικιλότητα και τη γενετική ποικιλομορφία (Gray et al., 2000 ; Kim & Mirsa, 2007 ; Sukhumsirichart, 2018).

Ως αλληλόμορφο ορίζεται μια από τις παραλλαγμένες μορφές ενός γονιδίου, σε ένα συγκεκριμένο γενετικό τόπο, ενός ομόλογου χρωμοσώματος (Sukhumsirichart, 2018). Ο ορισμός του γενετικού πολυμορφισμού περιλαμβάνει την εμφάνιση δύο ή περισσότερων αλληλομόρφων σε ένα γενετικό τόπο, στον ίδιο πληθυσμό, με το σπανιότερο αλληλόμορφο να παρουσιάζει συχνότητα μεγαλύτερη από 1%. Οι ποικίλες μορφές των πολυμορφισμών φαίνεται πως είναι συχνότερες στο γενικό πληθυσμό από τις μεταλλάξεις, ενώ με την ολοκλήρωση της αλληλούχησης ολόκληρου του ανθρώπινου γονιδιώματος, παρατηρήθηκε πως ο πιο συχνός τύπος πολυμορφισμών που εντοπίζεται είναι οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί, γνωστοί και ως SNPs, με περισσότερους από 9 εκατομμύρια να αναφέρονται στις υπάρχουσες βάσεις δεδομένων (Sukhumsirichart, 2018).

Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphisms)

Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) συνιστούν αλλαγές σε ένα ζεύγος βάσεων (δηλαδή σημειακές μεταλλάξεις) που πραγματοποιούνται στην αλληλουχία του γενετικού υλικού, σε μια συγκεκριμένη θέση (γενετικό τόπο) ενός μεμονωμένου νουκλεοτιδίου, λόγω μεταφραστικών σφαλμάτων ή μεταλλάξεων (Weber, 1990 ; van

Oeveren & Janssen, 2009 ; Moszyńska et al., 2017 ; Mathur et al., 2018 ; Azizzadeh-Roodpish et al., 2021 ; Esmaeili et al., 2023). Σύμφωνα με την Sukhumsirichart (2018), τα SNPs αποτελούν την αλλαγή μιας βάσης σε μια αλληλουχία DNA, μέσω μιας εναλλακτικής επιλογής μεταξύ δυο πιθανών νουκλεοτιδίων σε μια συγκεκριμένη θέση. Όπως αντικατοπτρίζεται και στην εικόνα 1 που ακολουθεί, η αλληλουχία του γενετικού υλικού του ατόμου 1 είναι σχεδόν παρόμοια με την αλληλουχία του ατόμου 2 στο σύνολο της. Η μοναδική διαφορά των δυο αλληλουχιών έγκειται στο γεγονός πως στο σημείο που εντοπίζεται η κυτοσίνη (C) του νουκλεοτιδίου στο άτομο 1 (πλειοψηφία πληθυσμού), παρατηρείται μια αντικατάσταση από μια θυμίνη (T) στην αλληλουχία του ατόμου 2 (μειοψηφία πληθυσμού). Αυτή η αλλαγή μεταξύ του αλληλομόρφου C – T αντιπροσωπεύει και τον ορισμό των SNPs (Sukhumsirichart, 2018). Σπάνιες είναι οι περιπτώσεις δημιουργίας SNPs, λόγω αυθόρμητων μεταλλαγών, που πραγματοποιούνται μέσω σφαλμάτων κατά τη διαδικασία της αντιγραφής (Azizzadeh-Roodpish et al., 2021).



Εικόνα 1: Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs): Σύγκριση μιας συγκεκριμένης περιοχής του ανθρώπινου γονιδιώματος μεταξύ δυο διαφορετικών ατόμων (1 και 2) και αλληλουχιών DNA (Azizzadeh-Roodpish et al., 2021).

Τα SNPs αποτελούν την πιο κοινή μορφή γενετικών παραλλαγών με συχνότητα $\geq 1\%$ σε να πληθυσμό, και είναι αυτά που ευθύνονται για το 90-95% της γενετικής ποικιλομορφίας που εντοπίζεται στην αλληλουχία του ανθρώπινου γενετικού υλικού (Moszyńska et al., 2017 ; Mathur et al., 2018 ; Sukhumsirichart, 2018 ; Azizzadeh-Roodpish et al., 2021). Σύμφωνα με τη διαθέσιμη βιβλιογραφία, έχει υπολογισθεί πως

κατά μέσο όρο υπάρχει ένας μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός ανά 300 – 350 ζεύγη βάσεων (base-pairs: bps) τόσο σε κωδικές όσο και σε μη κωδικές περιοχές των γονιδίων, και περίπου 15 εκατομμύρια SNPs σε ολόκληρο το ανθρώπινο γονιδίωμα (σε συχνότητες 1% ή υψηλότερες), σε διαφορετικούς πληθυσμούς παγκοσμίως (Moszyńska et al., 2017 ; Azizzadeh-Roodpish et al., 2021).

Χαρακτηριστικά και ταξινόμηση των SNPs

Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) αναγνωρίζονται και χαρακτηρίζονται μέσω της αλληλούχησης της γονιδιωματικής περιοχής, στην οποία και εντοπίζονται, σε διάφορους πληθυσμούς. Η πλειοψηφία των SNPs παρουσιάζει δυο αλληλόμορφα, τα οποία και αντιπροσωπεύουν την υποκατάσταση μιας βάσης από μια άλλη. Ανάλογα με τη συχνότητα του αλληλομόρφου, σε ένα SNP εκχωρείται ο χαρακτηρισμός του μείζονος ή του ελάσσονος. Πιο συγκεκριμένα, εάν το SNP εμφανίζεται πιο συχνά στο γενικό πληθυσμό, τότε ορίζεται ως μείζον αλληλόμορφο, ενώ αντίθετα εάν εμφανίζεται πιο σπάνια στο γενικό πληθυσμό, αποκτά το χαρακτηρισμό του ελάσσονος. Προκειμένου να χαρακτηρίσουμε ένα αλληλόμορφο ως μείζον ή ελάσσον, θα πρέπει να γνωρίζουμε το γονίδιο, τον οργανισμό και τον υπό μελέτη πληθυσμό , καθώς δεν υπάρχει μια γενική συχνότητα εμφάνισης σε όλους τους οργανισμούς. (Sukhumsirichart, 2018).

Όσον αφορά στη διάκριση των SNPs, αυτή πραγματοποιείται μέσω της περιοχής στην οποία εντοπίζονται. Πιο συγκεκριμένα, οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί που εντοπίζονται στη μη κωδικεύουσα περιοχή καλούνται μη κωδικεύοντες SNPs, ενώ αυτοί που εδράζονται στην κωδικεύουσα περιοχή (κωδικεύοντες SNPs) είναι γνωστοί ως συνώνυμοι (Synonymous SNPs) ή μη συνώνυμοι (non-synonymous SNPs) (Moszyńska et al., 2017 ; Mathur et al., 2018 ; Sukhumsirichart, 2018).

Σύμφωνα με τα υπάρχοντα δεδομένα (Giral et al., 2018) περίπου το 90% των λειτουργικών SNPs εντοπίζονται στις μη κωδικεύουσες περιοχές. Τα εν λόγω SNPs έχουν ονομασθεί ως ρυθμιστικά SNPs (regulatory SNPs), καθώς επηρεάζουν τη μεταγραφική ρύθμιση ή τη μετα-μεταγραφική γονιδιακή έκφραση, ενώ ταυτόχρονα επιφέρουν αλλαγές στη λειτουργία των κυττάρων σε διαφορετικά επίπεδα γονιδιακής ρύθμισης, επηρεάζοντας μεταξύ άλλων το μάτισμα γονιδίων και τη δέσμευση του μεταγραφικού παράγοντα. Τα προαναφερθέντα rSNPs εντοπίζονται στην αλληλουχία

του μη κωδικεύοντος RNA στον εκκινητή και στις περιοχές ενίσχυσης, και έχουν την δυνατότητα να επηρεάσουν τον χρόνο ημιζωής του αγγελιαφόρου RNA (mRNA), και να οδηγούν σε μειωμένα επίπεδα πρωτεΐνης μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ του mRNA και του miRNA (Moszyńska et al., 2017)

Εντός των ρυθμιστικών περιοχών του γονιδιώματος εντοπίζεται ένας άλλος τύπος μη κωδικευόντων SNPs τα οποία είναι γνωστά ως dSNPs (disease-associated SNPs). Τα συγκεκριμένα SNPs σχετίζονται με την εκδήλωση ποικίλων νόσων (Νόσος Parkinson, Σύνδρομο Tourette, καρδιαγγειακές και νευροεκφυλιστικές νόσοι, διάφοροι τύποι καρκίνων κ.α.) και μπορούν να προκαλέσουν γονιδιακή απορρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφής ή μετάφρασης. Η εν λόγω γονιδιακή απορρύθμιση μπορεί να προκύψει μέσω σχηματισμού, αποδόμησης ή τροποποίησης της αποτελεσματικότητας αλληλεπίδρασης του miRNA στο 3' UTR των mRNA (Bruno et al., 2012 ; Xiao et al., 2018).

Πέρα από τα SNPs που εντοπίζονται στη θέση δέσμευσης του miRNA, τα SNPs που εντοπίζονται εκτός της θέσης δέσμευσης του miRNA, μπορούν να επηρεάσουν τη λειτουργία του τελευταίου. Όπως αναφέρουν και οι Bruno et al., (2012), η ύπαρξη ενός πολυμορφισμού εκτός της θέσης δέσμευσης του miR-24 στην 3- ' UTR της αναγωγάσης του διυδροφυλικού των θηλαστικών (Dihydrofolate reductase: DHFR), επηρεάζει την έκφραση της τελευταίας, παρεμβαίνοντας στη δράση του miR-24, έχοντας ως αποτέλεσμα την υπερέκφραση του DHFR και την απόκτηση αντοχής στη μεθοτρεξάτη. Παράλληλα, η υπάρχουσα βιβλιογραφία αναφέρει πως τα SNPs που εντοπίζονται σε ένα συγκεκριμένο χώρο μεταξύ των δυο πλευρών της στοχευμένης περιοχής του miRNA, επιδρούν περισσότερο στη δέσμευση του miRNA στην εν λόγω περιοχή, ενώ τα SNPs που εδράζονται στις υπόλοιπες 3' UTR αλληλουχίες, επηρεάζουν περισσότερο τη λειτουργία του miRNA (Bruno et al., 2012).

Σχετικά με τους συνώνυμους SNPs, αυτοί δεν επιφέρουν αλλαγές στην αλληλουχία των αμινοξέων, ούτε επηρεάζουν τη λειτουργία της πρωτεΐνης, γι' αυτό και αναφέρονται ως σιωπηλές μεταλλάξεις. Παρόλα αυτά, σύμφωνα με τους Moszyńska et al., (2017), υπάρχει ένας αυξανόμενος όγκος δεδομένων που υποδεικνύει πως συνώνυμα SNPs μπορούν να επηρεάσουν τη σωστή πρωτεϊνική λειτουργία. Χαρακτηριστικά, η ύπαρξη δυο συνώνυμων SNPs στην αλληλουχία που κωδικοποιεί την MDR1 (Multidrug Resistance Protein 1), επηρεάζει την αναδίπλωση και τη

λειτουργία της εν λόγω πρωτεΐνης. Επιπρόσθετα, η πιο κοινή μετάλλαξη, η οποία σχετίζεται με εκδήλωση κυστικής ίνωσης στο γονίδιο CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator – ρυθμιστής διαμεμβρανικής αγωγιμότητας της κυστικής ίνωσης), συνιστά μια εκτός πλαισίου απαλοιφή της Φαινυλαλανίνης 508 (ΔF 508), και εισάγει ένα SNP στην Ισολευκίνη 507 (I507), συμβάλλοντας και μετέχοντας με αυτό τον τρόπο στη δυσλειτουργία του καναλιού ΔF508 CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) (Moszyńska et al., 2017 ; Mathur et al., 2018).

Όσον αφορά τα μη συνώνυμα SNPs, αυτά μπορεί επιφέρουν αμινοξικές αλλαγές ή να προκαλέσουν την εισαγωγή ενός κωδικονίου λήξης, συνέπειες που μπορούν να οδηγήσουν στην εκδήλωση διάφορων γενετικών ασθενειών. Όπως αναφέρουν και οι Moszyńska et al., (2017), τουλάχιστον το 25 % των μη συνώνυμων SNPs προηγινώσκει ότι επηρεάζει αρνητικά την λειτουργία των πρωτεϊνών (Moszyńska et al., 2017 ; Mathur et al., 2018 ; Sukhumsirichart, 2018).

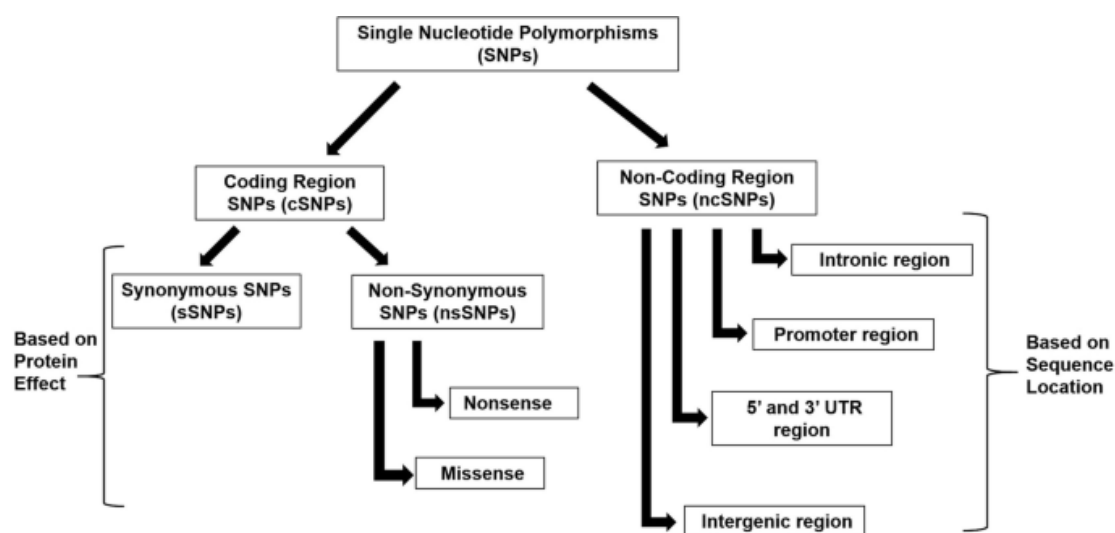
Τα SNPs μπορεί να εμπίπτουν είτε στις κωδικεύουσες αλληλουχίες των γονιδίων, είτε στις μη κωδικεύουσες γονιδιακές περιοχές, ενώ πολλές είναι οι περιπτώσεις που εντοπίζονται στις διαγονιδιακές περιοχές. Το σημείο στο οποίο εντοπίζονται τα SNPs καθορίζει και τον ρόλο που αυτά θα διαδραματίσουν, τόσο στις πρωτεΐνες όσο και στα γονίδια. Αναλυτικότερα, εάν τα SNPs εντοπίζονται μέσα στο γονίδιο, τότε δύναται να επιφέρουν αλλαγές στις πρωτεϊνικές δομές. Παράλληλα, εάν τα SNPs εδράζονται στη ρυθμιστική περιοχή των γονιδίων, μπορεί να επηρεάσουν τον τρόπο ενεργοποίησης αυτού, καθώς και το χρονικό πλαίσιο αυτής της ενεργοποίησης, όπως επίσης και την ποσότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης. Επιπρόσθετα, δύναται να επηρεάσουν το μάτισμα των γονιδίων, τη δέσμευση του μεταγραφικού παράγοντα και την αλληλουχία του μη κωδικεύοντος RNA (non-coding RNA). Τέλος, τα SNPs που δεν εδράζονται κοντά σε ένα γονίδιο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως γενετικοί δείκτες για τον εντοπισμό γονιδίων που εμπλέκονται στην εκδήλωση ασθενειών (Mathur et al., 2018 ; Sukhumsirichart, 2018).

Οι SNP συνιστούν πολύτιμους βιοδείκτες για μια ευρεία γκάμα ασθενειών, όπως είναι η δρεπανοκυτταρική αναιμία, η β-θαλασσαιμία και η κυστική ίνωση. Επιπρόσθετα, ασθένειες όπως ο διαβήτης, οι καρδιαγγειακές παθήσεις και διάφοροι τύποι καρκίνων σχετίζονται με την ύπαρξη SNPs. Ακόμη, πολλές είναι οι μελέτες που αναφέρουν πως

η προδιάθεση στις προαναφερθείσες νόσους, σε συνδυασμό με την ύπαρξη SNPs, δύνανται να οδηγήσουν σε εκδήλωση ασθενειών όπως είναι η οστεοπόρωση και η οστεοαρθρίτιδα. Τέλος, υψηλότερος κίνδυνος εκδήλωσης καρκίνου συσχετίζεται με την ύπαρξη SNPs σε μη κωδικεύουσες περιοχές, γεγονός που οδηγεί περαιτέρω σε αλληλεπιδράσεις του mRNA και αυξημένη ευαισθησία στην εκδήλωση ποικίλων ασθενειών και νόσων (Mathur et al., 2018).

Οι μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (Genome-Wide Association Study – GWAS), αποτελούν ένα ισχυρό εργαλείο διερεύνησης της αρχιτεκτονικής ποικίλων ανθρώπινων γενετικών ασθενειών μέσω εύρεσης διαφόρων γενετικών παραλλαγών (Azizzadeh-Roodpish et al., 2021). Τα SNPs χρησιμοποιούνται ως μοριακοί δείκτες σε ένα ευρύ φάσμα μελετών (γενετικών ασθενειών) και στη φαρμακογονιδιωματική έρευνα, μέσω των επιπτώσεων τους στη λειτουργία των πρωτεϊνών και την γονιδιακή έκφραση. Γι' αυτό το λόγο οι προσεγγίσεις GWAS αναζητούν SNPs που παρουσιάζουν συχνότερη εμφάνιση σε άτομα με συγκεκριμένες ασθένειες, παρά σε άτομα χωρίς τις νόσους, και εντοπίζουν γονίδια ή περιοχές που δύναται να συμβάλλουν στον κίνδυνο εκδήλωσης ασθενειών (Bruno et al., 2012 ; Mathur et al., 2018 ; Sukhumsirichart, 2018).

Εικόνα 2: Ταξινόμηση SNPs (Sukumar, S., Krishnan, A., Banerjee, S. (2021))



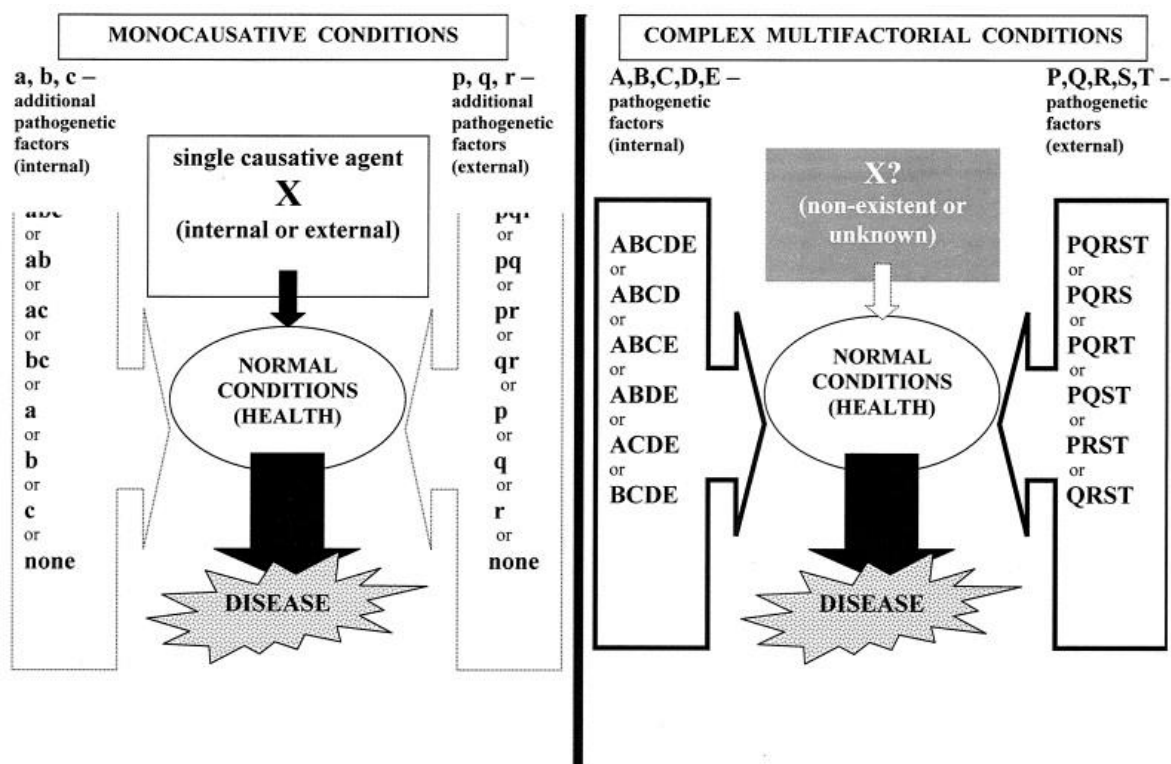
Κεφάλαιο II: Οστεοπόρωση και SNPs

Πολυπαραγοντικές ασθένειες

Οι ταχείες εξελίξεις στην αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος, δημιούργησαν ένα πρόσφορο έδαφος για την διερεύνηση της ύπαρξης και του ρόλου πολλών SNPs που εντοπίζονται σε διάφορους πληθυσμούς, και της επίδρασης αυτών στην παθογένεση διαφόρων παθολογικών καταστάσεων. Τα παραπάνω βρίσκουν ευρεία εφαρμογή σε ασθένειες που προκαλούνται από ένα μόνο αιτιολογικό γενετικό παράγοντα, όμως δεν ισχύει το ίδιο σε διαταραχές με πολύπλοκη πολυπαραγοντική παθογένεση που περιλαμβάνουν και μια ισχυρή περιβαλλοντική συνιστώσα (Loktionov, 2003 ; Wang et al., 2005 ; Xiao et al., 2018).

Οι πολυπαραγοντικές ασθένειες διαθέτουν ως βασικό γνώρισμα την μη ύπαρξη ενός μόνο ειδικού αιτιολογικού παράγοντα, η απομάκρυνση ή εξάλειψη του οποίου δύναται να περιορίσει, να εμποδίσει ή να σταματήσει την ανάπτυξη μιας παθολογικής διαδικασίας (όπως αντίθετα συμβαίνει στις μονοπαραγοντικές ασθένειες) (εικόνα 2). Στις πολυπαραγοντικές ασθένειες πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ πολλαπλών εσωτερικών και εξωτερικών παραγόντων, φαίνεται πως καθορίζουν την πιθανότητα ανάπτυξης και εκδήλωσης αυτών των ασθενειών (Loktionov, 2003).

Το γενετικό υπόβαθρο το οποίο περιλαμβάνει ένα μοναδικό συνδυασμό κοινών παραλλαγών χιλιάδων πολυμορφικών γονιδίων, τα οποία μετέχουν σε ποικίλες μεταβολικές οδούς και ρυθμιστικά μονοπάτια, στις πολυπαραγοντικές ασθένειες αλληλοεπιδρά με πολλαπλές περιβαλλοντικές επιρροές. Αυτό έχει ως συνέπεια η πολυπλοκότητα των πολυπαραγοντικών ασθενειών να καθιστά ανέφικτη την αξιολόγηση των επιπτώσεων όλων των συμβαλλόμενων παραγόντων. Όσον αφορά τη διερεύνηση της παθογένειας των ασθενειών αυτών, μερικά από τα πολυμορφικά γονίδια, τα προϊόντα των οποίων είναι περισσότερο πιθανό να μετέχουν στην ανάπτυξη ασθενειών, επιλέγονται και χαρακτηρίζονται ως υποψήφια. Τα περισσότερα δεδομένα που αφορούν τις χρόνιες πολυπαραγοντικές ασθένειες, έχουν προκύψει από μελέτες που βασίζονται στη διερεύνηση συσχετίσεων μεταξύ παραλλαγών στα υποψήφια πολυμορφικά γονίδια με τη συχνότητα ή την εκδήλωση των νόσων (Loktionov, 2003 ; Wang et al., 2005).



Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση και σύγκριση των μονοπαραγοντικών και πολυπαραγοντικών ασθενειών και των συνθηκών που συμβάλλουν στη δημιουργία τους. Οι μονοπαραγοντικές ασθένειες διαθέτουν πάντα ένα μόνο αιτιολογικό παράγοντα (X), ο οποίος καθορίζει την αιτιολογία της νόσου. Υπάρχουν πρόσθετοι παθογενετικοί παράγοντες (a, b, bc, pq κλπ) οι οποίοι δύναται να τροποποιήσουν την παθογένεση και τις κλινικές εκδηλώσεις της εκάστοτε πάθησης με ευνοϊκές ή δυσμενείς επιπτώσεις, ωστόσο η παρουσία και ο ρόλος που εξυπηρετούν δεν είναι υποχρεωτικός. Οι μονοπαραγοντικές ασθένειες δεν είναι εφικτό να προκληθούν μέσω απουσίας του κύριου παράγοντα και μέσω συνδυασμού επιπρόσθετων παθογενετικών παραγόντων. Αντίθετα, οι πολύπλοκες πολυπαραγοντικές ασθένειες προκύπτουν από συνδυασμό επιδράσεων πολλαπλών αιτιοπαθογενετικών παραγόντων (ABCDE, PQRS, QRST κλπ) που δρουν ταυτόχρονα σε διαφορετικούς συνδυασμούς. Οι πολυπαραγοντικές ασθένειες προκαλούνται από συσσώρευση αυτών των αιτιοπαθογενετικών παραγόντων σε συνδυασμό πολλές φορές με την αποτυχία δράσης των προστατευτικών μηχανισμών (Loktionov, 2003).

Οστεοπόρωση

Η οστεοπόρωση περιλαμβάνει την απώλεια της αντοχής των οστών, ενώ παράλληλα συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο πρόκλησης καταγμάτων. Πιο συγκεκριμένα, ως οστεοπόρωση ορίζεται η κατάσταση κατά την οποία παρατηρείται χαμηλή οστική πυκνότητα (BMD - bone mineral density), η οποία συνδέεται αντιστρόφως ανάλογα με τον κίνδυνο πρόκλησης οστεοπορωτικών καταγμάτων (όσο μικρότερη είναι η οστική πυκνότητα, τόσο υψηλότερος ο κίνδυνος πρόκλησης οστεοπορωτικών καταγμάτων

και το αντίστροφο) (Zmuda,& Kammerer, 2008 ; Estrada et al., 2012 ; Warrington et al., 2015 ; Qin et al., 2016 ; Xiao et al., 2018).

Οι Qin et al., (2016) περιγράφουν την οστεοπόρωση ως μια πολύπλοκη πολυγονιδιακή νόσο, η οποία περιλαμβάνει την μείωση της οστικής μάζας και τη μικρό-αρχιτεκτονική αλλοίωση των οστικών ιστών, προκαλώντας με αυτό τον τρόπο απώλεια μυϊκής δύναμης και αύξηση του κινδύνου πρόκλησης καταγμάτων. Η οστεοπόρωση λόγω των συμπτωμάτων και των χαρακτηριστικών που διαθέτει, παρουσιάζει αρκετά υψηλή νοσηρότητα και θνησιμότητα. Όσον αφορά τα κυρίαρχα αίτια που συμβάλλουν στην εκδήλωση της οστεοπόρωσης, αυτά περιλαμβάνουν το γενετικό υπόβαθρο, τους ποικίλους περιβαλλοντικούς παράγοντες και τις αλληλεπιδράσεις που παρατηρούνται μεταξύ αυτών (Qin et al., 2016).

Κλινικά, η διάγνωση της οστεοπόρωσης βασίζεται στη μέτρηση της οστικής πυκνότητας (BMD). Η τελευταία συνιστά ένα κληρονομικό ποσοτικό χαρακτηριστικό, με πιθανότητα κληρονόμησης που κυμαίνεται από 72 έως 90%. Η μέγιστη οστική μάζα, που θεωρείται πως παρουσιάζεται από την εφηβεία μέχρι και τα πρώιμα στάδια της ενήλικης ζωής, αποτελεί ένα ιδιαίτερα καθοριστικό παράγοντα στον προσδιορισμό της μελλοντικής εμφάνισης οστεοπόρωσης και του μακροπρόθεσμου κινδύνου πρόκλησης κατάγματος. Μελέτες που ασχολήθηκαν με την συσχέτιση ολόκληρου του γονιδιώματος (GWAS), εντόπισαν την ύπαρξη πολλών SNPs και γονιδίων, που συσχετίζονται με την ύπαρξη μειωμένης οστικής πυκνότητας και υψηλού κινδύνου πρόκλησης οστεοπόρωσης και οστεοπορωτικών καταγμάτων σε ενήλικα άτομα (Warrington et al., 2015 ; Qin et al., 2016).

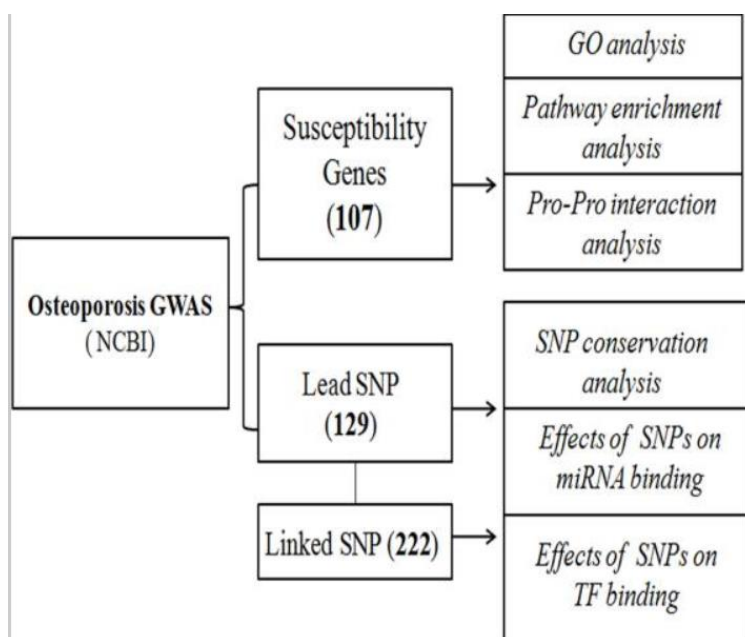
Τόσο η οστική αντοχή όσο και ο κίνδυνος οστεοπορωτικών καταγμάτων, επηρεάζονται από τις 3 ακόλουθες καταστάσεις:

- την επίτευξη της μέγιστης οστικής μάζας κατά την εφηβεία και τις αρχές της ενήλικης ζωής
- την επακόλουθη διατήρηση της οστικής μάζας κατά τη διάρκεια της ενήλικης ζωής και
- την προοδευτική απώλεια οστικής μάζας και πυκνότητας σε μεταγενέστερο στάδιο (κατά τη γήρανση) (Warrington et al., 2015).

Πολυμορφισμοί και οστεοπόρωση

Ποικίλα εργαλεία υπολογιστής βιολογίας σε συνδυασμό με μελέτες GWAS αποτελούν πολύ ισχυρά εργαλεία που συμβάλλουν στο προσδιορισμό των πιθανών SNPs, τα οποία εμπλέκονται και μετέχουν στην εκδήλωση διαφόρων ασθενειών, όπως για παράδειγμα η οστεοπόρωση. Στο World Wide Web υπάρχουν διαθέσιμες διάφορες υπολογιστικές μέθοδοι και εργαλεία επικυρωμένα για τον εντοπισμό SNPs, που σχετίζονται με την εκδήλωση ασθενειών, με στόχο την περαιτέρω διερεύνηση και αναζήτηση των άγνωστων μηχανισμών που εμπλέκονται στις πολυπαραγοντικές ασθένειες (Qin et al., 2016).

Πολλές είναι οι μελέτες που αναφέρουν πως πολυάριθμα είναι τα SNPs τα οποία μετέχουν στην εκδήλωση οστεοπόρωσης, επηρεάζοντας το μεταγραφικό παράγοντα (transcription factor :NFATC2, MEF2C, SOX9, RUNX2, ESR2, FOXA1 and STAT3) ή τη δέσμευση του miRNA. Οι Qin et al., (2016), συμπεριέλαβαν στη μελέτη τους ένα διάγραμμα ροής (εικόνα 4), το οποίο αναπαριστά το σύνολο των γονιδίων και των πολυμορφισμών που εντόπισαν πως μετέχουν στην εκδήλωση της οστεοπόρωσης μέσα από μελέτες GWAS. Όπως παρουσιάζεται και στην εικόνα 4, οι μελέτες GWAS που αφορούν την οστεοπόρωση απέδειξαν πως 107 γονίδια και 129 κύρια SNPs εμπλέκονται στην οστεοπόρωση, ενώ άλλα 222 SNPs συνδέονται με την οστεοπόρωση δευτερογενώς (συσχέτιση διαφόρων SNPs και γονιδίων) (Qin et al., 2016 ; Liu et al., 2021).



Εικόνα 4: Διάγραμμα ροής της μελέτης των Qin et al., (2016), το οποίο παρουσιάζει το σύνολο των γονιδίων και των SNPs που εμπλέκονται στην οστεοπόρωση.

Περισσότεροι από 120 μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) έχει εντοπισθεί πως σχετίζονται με την οστική πυκνότητα και κατ' επέκταση με την οστεοπόρωση σε ενήλικους ασθενείς και παιδιά (Qin et al., 2016). Με τα υπάρχοντα δεδομένα φαίνεται πως οι προαναφερθέντες πολυμορφισμοί επηρεάζουν τη συντήρηση και/ ή την απώλεια των οστών στα ενήλικα άτομα, ενώ δεν είναι πλήρως γνωστό κατά πόσο αυτοί οι πολυμορφισμοί επηρεάζουν το ρυθμό σχηματισμού της (μέγιστης) οστικής μάζας και πυκνότητας κατά την εφηβεία (Warrington et al., 2015).

Οι Qin et al., (2016) με βάση τα δεδομένα του NCBI (National Center for Biotechnology Information) ανέφεραν την ύπαρξη συνολικά 129 κυρίαρχων SNPs και 107 γονιδίων, τα οποία συνδέονται με την εκδήλωση οστεοπόρωσης. Από αυτά τα 129 SNPs τα 72 εντοπίστηκαν σε ιντρόνια, τα 35 σε διαγονιδιακές περιοχές, τα 6 σε εξόνια και 3 στην 3' UTR περιοχή. Επιπλέον, οι ίδιοι ερευνητές εντόπισαν την ύπαρξη 222 SNPs που συσχετίζονται (δευτερογενώς) με την εκδήλωση οστεοπόρωσης. Αναλυτικότερα, οι Qin et al., (2016) όπως παρουσιάζεται και στον πίνακα που ακολουθεί, ανέφεραν πως οι κυριότεροι μεταγραφικοί παράγοντες που επηρεάζονται πρωτογενώς και δευτερογενώς από SNPs και συνδέονται με την οστεοπόρωση είναι οι : SRY (sex-determining region Y gene), SPIB (Spi-B transcription factor), JUN::FOS

(Jun Proto-Oncogene) (Fos proto-oncogene), THAP1 (THAP domain-containing, apoptosis-associated protein 1) και NFATC2 (Nuclear Factor Of Activated T Cells 2). Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται και τα SNPs (κυρίαρχα και δευτερογενή) τα οποία μαζί με τους TF εμπλέκονται στο μεταβολισμό των οστών, και στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των κυττάρων των οστών. Οι RUNX2 (Runt-related transcription factor 2) και MEF2C (transcription enhancer factor 2) συνιστούν μεταγραφικούς παράγοντες που μετέχουν στη ρύθμιση της διαφοροποίησης και της ανάπτυξης των οστών, ενώ οι FOXA1 (Forkhead box protein A1) και ESR (Estrogen Receptor 1) απαιτούνται για τη δράση των οιστρογόνων στην οστεοπόρωση (Qin et al., 2016).

Πίνακας 1: Το σύνολο των μεταγραφικών παραγόντων και SNPs που μετέχουν στην οστεοπόρωση (Qin et al., 2016).

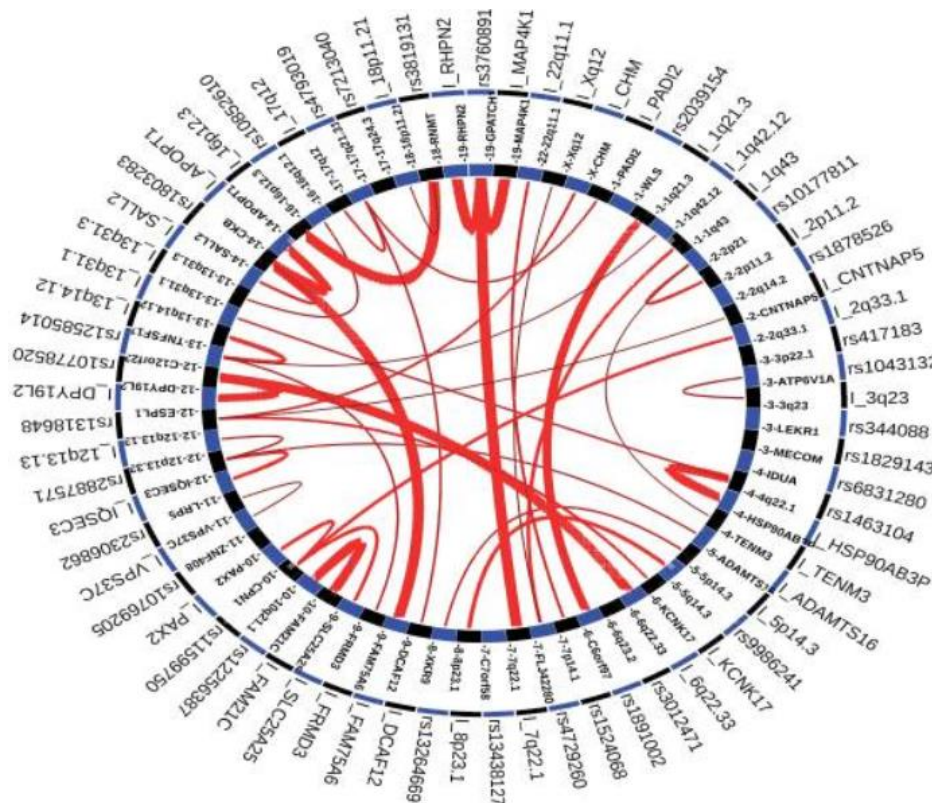
TFs	Number	Lead SNPs	Linked SNPs
NFATC2	+	16	rs344081,rs271170,rs4869739 rs4729260,rs16921914,rs9533095 rs9303521
	-	15	rs1430742,rs2566755,rs1463104,rs2887571
MEF2C	+	10	rs1463104,rs479336,rs9287237 rs6894139,rs1286083
	-	11	rs17509082,rs87938,rs10048146 rs6930633
SOX9	+	10	rs2707466,rs718766,rs1286083 rs2273061,rs1366594
	-	10	rs13247600,rs479336
RUNX2	+	7	rs7084921,rs3801387
	-	4	rs7932354
ESR2	+	3	-
	-	6	rs1430740,rs6993813,rs7117858 rs2887571
FOXA1	+	1	rs1053051
	-	4	rs4729260
STAT3	+	1	-
	-	3	-

Επιπρόσθετα, οι Qin et al., (2016), εξέτασαν τους πολυμορφισμούς που επιδρούν στο miRNA. Πιο συγκεκριμένα, εντόπισαν ότι οι rs884205 και rs1026364 πολυμορφισμοί δύναται να επηρεάσουν την αναγνώριση και στόχευση του miRNA (τα αλληλόμορφα rs884205 C και rs1026364 T δημιουργούν τη θέση δέσμευσης για τα miR-3658 και miR-345-5p αντίστοιχα). Όταν λήφθηκαν υπόψη και τα 222 SNPs που δρουν δευτερογενώς, τότε εντοπίστηκε πως ο συνολικός αριθμός των SNPs που επιδρούν στο miRNA αυξάνεται σε 13 (Πίνακας 2). Επιπλέον, στην ίδια ερευνητική προσπάθεια εντοπίστηκαν 3 SNPs: rs1463104, rs4729260 και rs2887571 τα οποία φαίνεται πως παρουσιάζουν μια μακροπρόθεσμη επιρροή στην εκδήλωση οστεοπόρωσης σε CEU πληθυσμούς (Utah residents with Northern and Western European ancestry from the

CEPH collection – Κάτοικοι της Utah με καταγωγή από τη Βόρεια και Δυτική Ευρώπη)
(εικόνα γ) (Qin et al., 2016).

Πίνακας 2: Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) που επηρεάζουν την αναγνώριση και στόχευση του miRNA και σχετίζονται με πρόκληση οστεοπόρωσης (Qin et al., 2016)

SNP/Gene	miRNA (loss)	miRNA (gain)
<i>Lead SNP</i>		
rs884205(A→C)/ <i>TNFRSF11A</i>		miR-3658
rs1026364(G→T)/ <i>KIAA2018</i>		miR-345-5p
<i>Linked SNP</i>		
rs3204848(A→G)/ <i>C12orf23</i>	miR-493-5p/miR-4718	
rs3734805(A→C)/ <i>CCDC170</i>	miR-641/3617-5p/miR-3915	miR-4524b-3p/miR-4459
rs6932260(T→C)/ <i>CCDC170</i>	miR-16-2-3p/miR-195-3p/miR-656	
rs6904261(G→A)/ <i>CCDC170</i>		miR-4778-3p
rs6932603(T→C)/ <i>CCDC170</i>	miR-153/miR-544a	
rs9383935(C→T)/ <i>CCDC170</i>	miR-4798-3p	miR-5197-5p
rs3734806(G→A)/ <i>CCDC170</i>		miR-2964a-5p/miR-572
rs3757322(T→G)/ <i>CCDC170</i>		miR-4274/miR-374b-3p
rs1741(G→C)/ <i>PDXDC1</i>		miR-548t-5p/miR-4536-5p/miR-4796-3p/miR-548az-5p
rs6498540(A→G)/ <i>PDXDC1</i>	miR-3156-3p	miR-1260a/miR-1260b
rs1121(G→A)/ <i>PDXDC1</i>		miR-550a-5p/miR-550a-3-5p/miR-1271-3p/miR-3064-5p/miR-6504-5p



Εικόνα 5: Γραφική αναπαράσταση GWAS-3D βασισμένη σε μελέτες GWAS, που αναπαριστά τις αλληλεπιδράσεις ποικίλων SNPs στην εκδήλωση οστεοπόρωσης σε πληθυσμούς CEU. Οι κόκκινες γραμμές αντιπροσωπεύουν σήματα αλληλεπίδρασης, ενώ το πλάτος και μήκος της κάθε γραμμής αναπαριστά το μέγεθος της αλληλεπίδρασης αυτής. Σημαντικά SNPs σημαίνονται με 'I_' (Qin et al., 2016).

Μια ακόμη σημαντική ερευνητική προσπάθεια είναι αυτή των Warrington et al., (2015) οι οποίοι εξέτασαν την επίδραση 63 αυτοσωμικών γενετικών παραλλαγών (από 55 γενετικού τύπου), σχετιζόμενων με την χαμηλή οστική πυκνότητα (και τον ρυθμό μεταβολής αυτής), και τον κίνδυνο πρόκλησης καταγμάτων σε εφήβους και νεαρούς ενήλικες, με απώτερο στόχο την εύρεση και συσχέτιση των γενετικών παραλλαγών που επιδρούν στην απώλεια της οστικής μάζας. Αναλυτικότερα, απέδειξαν πως κάθε μεμονωμένο αλληλόμορφο των 63 SNPs, φαίνεται να μετέχει στη μείωση της οστικής πυκνότητας στα ενήλικα άτομα, αυξάνοντας τον κίνδυνο πρόκλησης καταγμάτων και εκδήλωσης οστεοπόρωσης (Warrington et al., 2015).

Η συγκεκριμένη μελέτη απέδειξε επίσης πως οι 14 από τους 63 SNPs σχετίζονται με μειωμένη οστική πυκνότητα σε παιδιά ηλικίας 13 ετών. Πιο συγκεκριμένα δείχθηκε πως τα 14 αυτά SPNs δύναται να μεταβάλλουν το ρυθμό αποδόμησης των οστών σε βάθος χρόνου και να αυξήσουν τον κίνδυνο πρόκλησης κατάγματος κατά την ενήλικη

ζωή, γεγονός που υποδεικνύει ότι παρατηρείται μια επικάλυψη μεταξύ των γενετικών παραλλαγών που σχετίζονται με χαμηλή οστική πυκνότητα στους ενήλικες και με χαμηλή οστική πυκνότητα σε παιδιά και εφήβους. Αναλυτικότερα, τα ακόλουθα 11 μεμονωμένα SNPs έδειξαν σημαντική συσχέτιση με ύπαρξη χαμηλής οστικής πυκνότητας: rs9921222 (AXIN1), rs7851693 (FUBP3), rs4233949 (SPTBN1), rs13204965 (RSP03), rs7812088 (ABCF2), rs3801387 (WNT16), rs13245690 (C7orf58), rs6426749 (ZBTB40), rs7521902 (WNT4), rs12407028 (WLS) και rs1286083 (RSP6KA5). Οι πολυμορφισμοί rs13204965, rs381387, rs13245690 και rs7521902, που σχετίζονται με χαμηλή οστική πυκνότητα σε παιδιά, παρουσίασαν επίδραση που ξεκινά από πολύ νωρίς χρονικά στη ζωή ενός ατόμου, ενώ παραμένει σε όλη τη διάρκεια της ζωής του (Warrington et al., 2015).

Μια ακόμη ενδιαφέρουσα μελέτη γύρω από τους SNPs και την οστεοπόρωση είναι αυτή των Richards et al., (2008). Η εν λόγω ερευνητική προσπάθεια εντόπισε γενετικές παραλλαγές που οδηγούν σε χαμηλή οστική πυκνότητα και εκδήλωση προδιάθεσης σε οστεοπόρωση και οστεοπορωτικά κατάγματα. Χαρακτηριστικά, οι Richards et al., (2008), εντόπισαν δυο πολυμορφισμούς: το rs4355801 (που εδράζεται στο χρωμόσωμα 8 κοντά στο γονίδιο TNFRSF11B – γονίδιο οστεοπροτεγερίνης) και το rs3736228 (που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 11 στο γονίδιο LRP5 - LDL Receptor Related Protein 5), που συσχετίζονται με χαμηλή οστική πυκνότητα ή οστεοπορωτικά κατάγματα (Richards et al., 2008).

Αναλυτικότερα, οι Richards et al., (2008), εντόπισαν πως ο SNPS με rs3736228 που εδράζεται στο γονίδιο LRP5, συσχετίζεται με μειωμένη οστική πυκνότητα, οστεοπόρωση, και αυξημένο κίνδυνο οστεοπορωτικού κατάγματος. Ταυτόχρονα, εντόπισαν την ύπαρξη ενός μονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού rs4355801, που συσχετίζεται με την οστική πυκνότητα, την οστεοπόρωση και την έκφραση οστεοπροτεγερίνης. Η τελευταία συνιστά ένα καθοριστικό γενετικό παράγοντα της οστικής πυκνότητας και της οστεοπόρωσης, αποτελώντας παράλληλα στόχο αρκετών θεραπευτικών παραγόντων, καθώς διαδραματίζει ένα θεμελιώδη ρόλο στη ρύθμιση της δημιουργίας των οστεοκλαστών. Σύμφωνα με Khan AA et al 2023 ,τα μονοκλωνικά αντισώματα όπως για παράδειγμα η δενοσουμάμπη (Denosumab), η οποία μιμείται την δράση της οστεοπροτεγερίνης, αποτρέπουν την απώλεια οστικών μαζών.

Εν κατακλείδι, πολλοί είναι οι SNPs οι οποίοι εμπλέκονται στην οστεοπόρωση, επηρεάζοντας την οστική πυκνότητα και την πρόκληση οστεοπορωτικών καταγμάτων. Πλέον, μέσω της χρήσης τεχνικών υπολογιστής βιολογίας και ποικίλων τεχνικών και μεθοδολογιών αλληλούχησης, καθίσταται αποδοτικότερη η αναζήτηση και διερεύνηση της επίδρασης πολυάριθμων SNPs σε πολυπαραγοντικές ασθένειες όπως η οστεοπόρωση.

Κεφάλαιο III: Σχεδιασμός διαγνωστικού κιτ οστεοπόρωσης

Η Εταιρεία

Η Osteo Diagnostics, ένα κορυφαίο διαγνωστικό εργαστήριο (παράρτημα βιομηχανίας Osteo Pharma) γνωστό για την αφοσίωσή του στην ακρίβεια και τη δημιουργικότητα, ξεκινά ένα πρωτοποριακό έργο για την ανάπτυξη και την εισαγωγή ενός κιτ rtPCR (real time) οστεοπόρωσης. Αναγνωρίζοντας την επείγουσα ανάγκη για ακριβή και αποτελεσματική διάγνωση της οστεοπόρωσης, η Osteo Diagnostics σκοπεύει να δημιουργήσει ένα προηγμένο κιτ που θα εξελίξει τη διάγνωση της οστεοπόρωσης. Η Osteo diagnostics απασχολείται από μια ομάδα ταλαντούχων επιστημόνων, ερευνητών και επαγγελματιών υγείας. Επιπλέον, η Osteo Diagnostics είναι αφοσιωμένη στη διασφάλιση της ακρίβειας, της αξιοπιστίας και της κλινικής χρησιμότητας του κιτ, συνεργαζόμενη με αναγνωρισμένες αρχές στον τομέα υγείας. Προκειμένου να εξασφαλίσει τις απαιτούμενες άδειες για την δημιουργία και εμπορευματοποίηση, το εργαστήριο διαπραγματεύεται το δύσκολο πεδίο της συμμόρφωσης με τους ρυθμιστικούς κανονισμούς μέσω στρατηγικών σχέσεων με τους ενδιαφερόμενους φορείς της βιομηχανίας και τους ρυθμιστικούς φορείς. Πριν όμως τον επιχειρησιακό καμβά, την ανάλυση SWOT και το επιχειρηματικό ρίσκο, θα αναφερθούν τα πλεονεκτήματα ενός κιτ rtPCR, σε ποιους απευθύνεται, τι περιλαμβάνει το κιτ και ποια είναι η μέθοδος ανάλυσης του.

Κριτήρια κιτ rtPCR οστεοπόρωσης

Για να εισαχθεί ένα νέο kit rtPCR στην αγορά πρέπει να πληροί ορισμένα κριτήρια όπως είναι η επιλογή γονιδίων-στόχων που συνδέονται με την οστεοπόρωση, όπως αυτοί που ρυθμίζουν την πυκνότητα ή το μεταβολισμό των οστών. Ισχυρές κλινικές έρευνες θα πρέπει να αποδεικνύουν το ρόλο αυτών των γονιδίων στην παθοφυσιολογία της οστεοπόρωσης. Θα πρέπει επίσης να τονιστεί η ειδικότητα και την ευαισθησία του kit μέσω της στόχευσης των διατηρημένων περιοχών (conserved regions) των επιλεγμένων γονιδίων .

Αναγκαία είναι και η <<συμμόρφωση>> του kit με τις κανονιστικές απαιτήσεις καθώς και η παροχή φιλικών προς το χρήστη μεθόδων για ανάλυση RT-PCR. Αυτό θα βοηθήσει τελικά τους ασθενείς με οστεοπόρωση με προσαρμοσμένα σχέδια θεραπείας και την έγκαιρη αναγνώριση της νόσου.

Χρηματοδότηση

Η εξασφάλιση δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας για την τεχνολογία και τους γενετικούς δείκτες που χρησιμοποιούνται στο kit μπορεί να δημιουργήσει ανταγωνιστικό πλεονέκτημα της επιχείρησης, οδηγώντας σε ευκαιρίες χρηματοδότησης και συνεργασίας με παρόχους υγειονομικής περίθαλψης, φαρμακευτικές εταιρείες και ερευνητικά ιδρύματα.

Η χρηματοδότηση για τη δημιουργία ενός rtPCR kit οστεοπόρωσης συνάδει με το μέλλον της ιατρικής και των φαρμακοβιομηχανιών το οποίο είναι η ιατρική ακριβείας (precision medicine). Η ανάπτυξη, η κατασκευή και η διανομή του rtPCR Kit οστεοπόρωσης μπορούν να υποστηριχθούν οικονομικά από διάφορες πηγές. Οι πρώτες φάσεις της έρευνας και ανάπτυξης υποστηρίζονται από ιδιωτικές επενδύσεις από επενδυτές-άγγελοι (angel investors), οι οποίοι προσελκύονται από τις πιθανές ευκαιρίες της αγοράς στον τομέα της υγειονομικής περίθαλψης και ιδιωτικά επενδυτικά κεφάλαια (private equity). Οι κυβερνήσεις και οι ερευνητικοί οργανισμοί διαθέτουν πόρους για να βοηθήσουν έργα στη διάγνωση και τη γενετική της οστεοπόρωσης, μέσω κρατικών επιχορηγήσεων και ταμείων έρευνας. Οι προσπάθειες συγκέντρωσης δημόσιων κεφαλαίων και οι ιστοσελίδες συλλογικής χρηματοδότησης (crowdfunding) ενθαρρύνουν τη συμμετοχή του κοινού στη δημιουργία του kit.

Πλεονεκτήματα χρήσης rtPCR kit οστεοπόρωσης έναντι kit συστοιχιών

Ο σχεδιασμός ενός kit (rtPCR) για την ανίχνευση της οστεοπόρωσης προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα όσον αφορά τη βελτίωση της ακρίβειας, της παραγωγικότητας και της θεραπευτικής χρησιμότητας σε σχέση με τα array kit. Λόγω των ποσοτικών δυνατοτήτων της, η PCR σε πραγματικό χρόνο προσφέρει μια δυναμική και πραγματική αξιολόγηση της έκφρασης γονιδίων στόχου, επιτρέποντας τη συνεχή παρακολούθηση της ενίσχυσης του DNA κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Σε αντίθεση με τα kit που δεν διαθέτουν τη δυνατότητα παρακολούθησης σε πραγματικό χρόνο, αυτό το βασικό χαρακτηριστικό επιτρέπει την ακριβέστερη ποσοτικοποίηση των γενετικών δεικτών που συνδέονται με την οστεοπόρωση, επιτρέποντας ένα πιο αξιόπιστο και ευαίσθητο διαγνωστικό αποτέλεσμα.

Με την rtPCR, η πιθανότητα ψευδών θετικών ή διασταυρούμενης αντίδρασης μειώνεται και ορισμένοι γενετικοί δείκτες που συνδέονται με την οστεοπόρωση μπορούν να ενισχυθούν και να ποσοτικοποιηθούν με ακρίβεια. Τα kit συστοιχιών, από την άλλη πλευρά, αξιολογούν πολλά γονίδια ταυτόχρονα, γεγονός που θα μπορούσε να περιπλέξει την ερμηνεία των αποτελεσμάτων και να μειώσει την ειδικότητα. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένες διαγνώσεις ή ανακριβείς εκτιμήσεις του κινδύνου οστεοπόρωσης.

Ένα από τα κύρια οφέλη της rtPCR όταν πρόκειται για τη διάγνωση της οστεοπόρωσης είναι η ταχύτητά της. Η rtPCR είναι μια μέθοδος που εξοικονομεί χρόνο τόσο για τους ασθενείς όσο και για τους επαγγελματίες της υγειονομικής περίθαλψης, καθώς μπορεί να παράγει δεδομένα γρήγορα. Η γρήγορη αντιμετώπιση είναι αναγκαία για τη διαχείριση της οστεοπόρωσης. Από την άλλη πλευρά, επειδή τα array kit αναλύουν πολλά γονίδια ταυτόχρονα, μπορεί να απαιτούν μια χρονοβόρα και περίπλοκη διαδικασία, η οποία θα μπορούσε να προκαλέσει καθυστέρηση στη διάγνωση και τη φροντίδα των ασθενών.

Σε αντίθεση με τα kit συστοιχιών, τα οποία απαιτούν μια πληθώρα εξαρτημάτων για ταυτόχρονη ανάλυση, τα σετ PCR σε πραγματικό χρόνο συχνά απαιτούν λιγότερα αντιδραστήρια, μειώνοντας το συνολικό κόστος δοκιμών. Επειδή η rtPCR είναι τόσο αποτελεσματική, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε καθημερινή κλινική χρήση με χαμηλό εργαστηριακό κόστος, επειδή δεν απαιτεί τόσους πολλούς εκτεταμένους εργαστηριακούς πόρους ή υλικά.

Ολοκληρώνοντας, η ευελιξία της rtPCR σε πραγματικό χρόνο την καθιστά ένα σημαντικό εργαλείο για τις επερχόμενες εξελίξεις στην έρευνα και την κλινική διάγνωση της οστεοπόρωσης, γιατί μπορεί εύκολα να ενσωματώσει νέους γενετικούς δείκτες ή να προσαρμοστεί σε νέες επιστημονικές ανακαλύψεις.

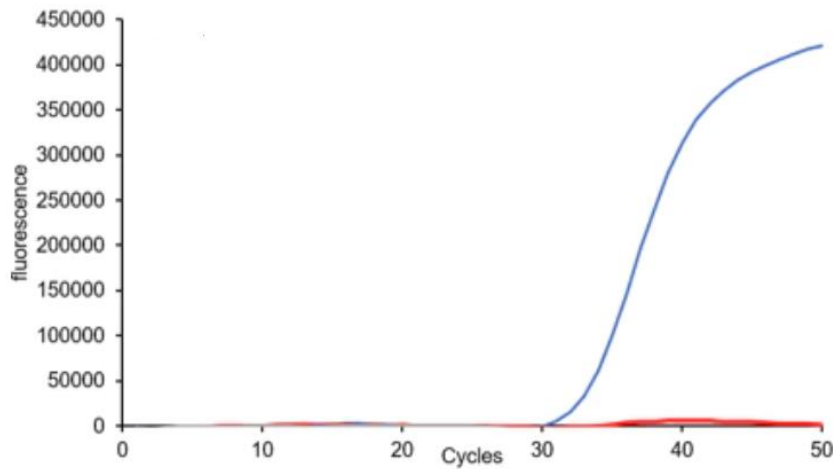
Συνοψίζοντας, τα οφέλη από την ανάπτυξη μιας rtPCR σε πραγματικό χρόνο για την οστεοπόρωση υπερτερούν εκείνων των array kit, παρέχοντας ένα μίγμα ακρίβειας, αποτελεσματικότητας, οικονομικής προσιτότητας και ευελιξίας που είναι απαραίτητα για τη βελτίωση της διάγνωσης και της θεραπείας των ασθενών

Μέθοδος ανάλυσης και επεξεργασίας δειγμάτων

Η ανίχνευση των πολυμορφισμών του kit βασίζεται σε ποιοτική ανάλυση των καμπυλών αναφοράς των φθοριοχρωμάτων (παρουσία/ύπαρξη κύκλων θετικοποίησης - ct) σε τρία κανάλια: FAM (φυσιολογικός φαινότυπος / φυσιολογικά αλληλόμορφα - wild type), HEX (ετερόζυγο αλληλόμορφο - mutant), ROX (IC – Internal Control). Η χρονική διάρκεια ανάλυσης και εξαγωγής αποτελεσμάτων είναι 1 ώρα και 40 λεπτά.

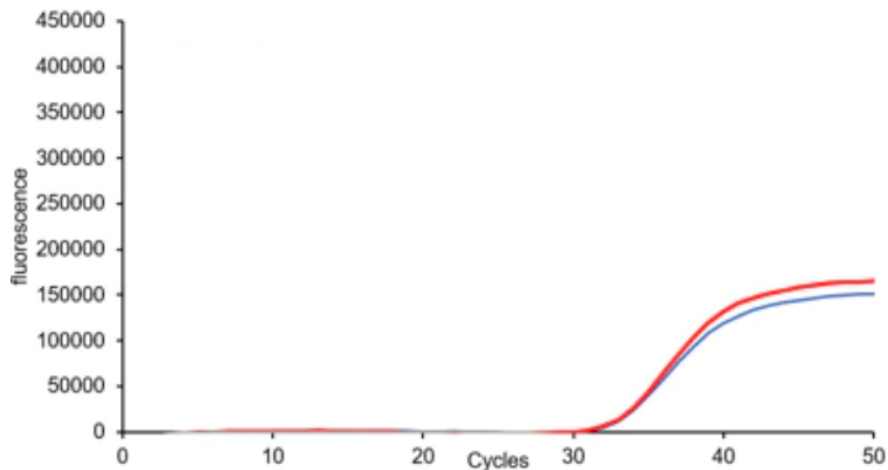
Ως δείγματα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν μη προ-επεξεργασμένα δείγματα ολικού αίματος σε EDTA (αυτούσια δείγματα), ή απομονωμένα δείγματα (extracted) γενετικού υλικού από φιαλίδια περιφερικού αίματος σε EDTA. Η απομόνωση μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω kit απομόνωσης διαφόρων εταιρειών με τη χρήση αντιδραστηρίων, κασετών, plate, ή εξοπλισμού πραγματοποίησης απομόνωσης στο 'χέρι'.

FAM κανάλι και φυσιολογικός φαινότυπος



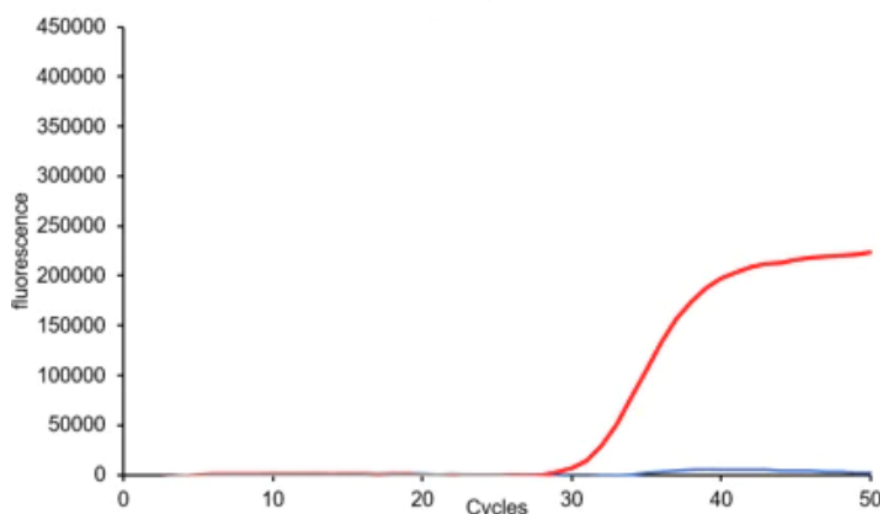
Ένας Φυσιολογικός φαινότυπος αναμένεται να παρουσιάζει καμπύλη μόνο στο κανάλι FAM και μηδενική καμπύλη στο κανάλι HEX.

Ετερόζυγος φαινότυπος



Ένας Ετερόζυγος φαινότυπος αναμένεται να παρουσιάσει καμπύλες παρόμοιας έντασης και στο FAM (φυσιολογικός φαινότυπος) και στο HEX (ετερόζυγα αλληλόμορφα) κανάλι.

Ομόζυγος φαινότυπος



Σε ομόζυγο φαινότυπο αναμένεται η ύπαρξη καμπύλης μόνο στο κανάλι HEX και απουσία καμπύλης στο κανάλι FAM.

Τι θα περιλαμβάνει το κιτ

Το κιτ θα περιλαμβάνει το *genotyping master mix* (mix γονοτύπησης που εμπεριέχει DNA Taq πολυμεράση, ρυθμιστικό διάλυμα και διφωσφορικά νουκλεοτίδια - dNTPs), τους εκκινητές και ιχνηθέτες και θετικούς μάρτυρες (φυσικού τύπου και μεταλλάξεων για περιπτώσεις ομοζυγωτίας) και θετικά control (positive control) (wild type and mutant για περιπτώσεις ομοζυγωτίας – ετεροζυγωτίας – φυσιολογικού φαινοτύπου). Στο *genotyping master mix* θα πρέπει να εμπεριέχεται και ο εσωτερικός μάρτυρας -IC που έχει ως ρόλο την ενίσχυση του γενετικού υλικού και τον έλεγχο της ποσότητας αυτού, με απώτερο στόχο τον περιορισμό και τον αποκλεισμό λαθών κατά τη διαδικασία της γονοτύπησης.

Επίσης, θα έχει ένα αρνητικό control καθώς παρέχει τη δυνατότητα άμεσης παρατήρησης και εντοπισμού των δειγμάτων που έχουν επιμολυνθεί.

Το κιτ θα εμπεριέχει μέσα αντιδραστήρια που φθάνουν για επεξεργασία μέχρι και 300 δειγμάτων. Προτείνεται να δημιουργούνται μικρότερες δόσεις από τα mix (aliquots), ώστε να μην ξεψύχεται συνέχεια το αντιδραστήριο και να παραμείνει η απόδοση του σε υψηλά επίπεδα. Κάτι τέτοιο θα βοηθήσει και στην προστασία των αντιδραστηρίων

από επιμολύνσεις (μέσω επιμολυσμένων πιπετών, απαγωγών, λανθασμένων εργαστηριακών πρακτικών, σφαλμάτων κλπ).

Όσον αφορά τις συνθήκες συντήρησης και αποθήκευσης του, θα μεταφέρεται προς τα εργαστήρια επιλογής σε ειδικά διαμορφωμένα κουτιά με ξηρό πάγο και παγοκύστες, προκειμένου να μην αποψύχονται τα αναλώσιμα του kit. Θα αποθηκεύεται σε καταψύκτες και όχι στη συντήρηση και οι μικρότερες δόσεις από τα mix (aliquots) που θα δημιουργούνται (εάν δημιουργούνται) θα φυλάσσονται και αυτές σε θερμοκρασίες μεταξύ -18 ... -22° C.

Προτεινόμενος Πίνακας αναλωσίμων του kit που παρουσιάζει τις ποσότητες αυτών και τα χαρακτηριστικά τους.

<u>Αναλώσιμα kit</u>	<u>Χαρακτηριστικά αντιδραστηρίων</u>	<u>Ποσότητες</u>
<i>Genotyping Master Mix</i>	Μπλέ διάλυμα - υγρό	1500 μ L – 6 σωληνάκια (tubes)
<i>Εκκινητές και ιχνηθέτες</i>	Άγχρωμο Διαυγές διάλυμα – υγρό	1500 μ L – 4 διαφορετικά σωληνάκια (tubes)
<i>Θετικός μάρτυρας (Positive control)</i>	Άγχρωμο Διαυγές διάλυμα – υγρό	1000 μ L - 3 σωληνάκια (tubes)
<i>Αρνητικός μάρτυρας (Negative control)</i>	Άγχρωμο Διαυγές διάλυμα – υγρό	1000 μ L - 3 σωληνάκια (tubes)

Συνιστώμενο πρωτόκολλο εφαρμογής

1. Ανάδευση (vortex) για 3-5 δευτερόλεπτα και φυγοκέντρωση (spin down) (1-3 δευτερόλεπτα) των αντιδραστηρίων του kit Genotyping Master Mix και Primers & Probes Mix.
2. Παρασκευή ενός μείγματος από τα Genotyping Master Mix και Primers & Probes Mix σε ποσότητες (που αντιστοιχούν για κάθε δείγμα): 5 μ L $\times$ (N+1) Genotyping Master Mix και 3 μ L Primers & Probes Mix $\times$ (N+1)
3. Διαμοιρασμός του μείγματος σε μικρά tube ή plate σε όσα είναι τα δείγματα επιλογής/μελέτης (η κάθε θέση του plate και το κάθε tube αντίστοιχα αντιστοιχεί σε ένα δείγμα). Στα δείγματα πρέπει να προσμετρηθούν και ένα

δείγμα στο οποίο θα προστεθεί το μιξ και το θετικό control, και ένα δείγμα στο οποίο θα προστεθεί το μιξ και το αρνητικό control.

4. Προσθήκη σε κάθε tube ή σε κάθε θέση του plate 3 μL από κάθε δείγματος αίματος μελέτης.
5. Ανάδευση (vortex) για 3-5 δευτερόλεπτα και φυγοκέντρωση (spin down) (1-3 δευτερόλεπτα)

Συντήρηση και αποθήκευση του kit

Τα αντιδραστήρια και το kit πρέπει να φυλάσσονται μακριά από το ηλιακό φως. Η υπερβολική θερμοκρασία και το φως μπορεί να είναι επιζήμια για την απόδοση του kit.

Όλο το kit πρέπει να φυλάσσεται σε θερμοκρασίες από -18 έως -22°C . Υπάρχει η δυνατότητα δημιουργίας μικρότερων ποσοτήτων (aliquots) των δυο μιξ, η αποθήκευση των οποίων πρέπει να είναι μεταξύ $+2$ έως $+8^{\circ}\text{C}$. Εάν δεν γίνει διαμοιρασμός των δυο αυτών συστατικών, η αποθήκευση των αντιδραστηρίων πρέπει να φυλάσσεται στους -18 έως -22°C .

Η μεταφορά του kit πρέπει να γίνεται μέσω φραγισμένων κουτιών με παγοκύστες και θα πρέπει να φυλάσσεται απευθείας σε θερμοκρασίες από -18 έως -22°C .

Πίνακας οδηγιών αποθήκευσης και συντήρησης του kit

<u>Οδηγίες συντήρησης/ Αποθήκευσης</u>	<u>Θερμοκρασία</u>
Αποθήκευση μερικών υλικών του kit (aliquots)	$+2$ έως $+8^{\circ}\text{C}$ (ψυγεία)
Συντήρηση του kit	-18 έως -22°C (καταψύκτες)
Διάρκεια χρήσης kit	Έως 10 μήνες από την ημερομηνία παραγωγής

Σε ποιους απευθύνεται

Το συγκεκριμένο Real Time PCR kit απευθύνεται σε ασθενείς (ενηλίκους και παιδιά) με οστεοπόρωση, εύθραστα οστά ή οστεοπορωτικά κατάγματα και σε άτομα – συγγενείς αυτών (που θα επιθυμούσαν έλεγχο κληρονομικότητας, παρουσία ή απουσία κοινής συμπτωματολογίας). Ακόμη, το εν λόγω kit μπορεί να εφαρμοσθεί σε περιπτώσεις ασθενών που παρουσιάζουν μη γενετικούς παράγοντες κινδύνου για εκδήλωση οστεοπόρωσης ή πρόκλησης οστεοπορωτικών καταγμάτων. Στους μη γενετικούς παράγοντες κινδύνου εντάσσεται η μετεμμηνόπαυση, η ανεπάρκεια ή έλλειψη 25-υδροξυ βιταμίνης D3 (25-hydroxy vitamin D3), η περιορισμένη σωματική διάπλαση και η απουσία άσκησης, το χαμηλό βάρος, και διατροφικοί παράγοντες όπως η υπέρμετρη κατανάλωση καφεΐνης και αλκοολούχων ουσιών. Επιπλέον, το Osteo Real Time PCR kit μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για άτομα που λαμβάνουν φάρμακα (γλυκοκορτικοστεροειδή), ή παρουσιάζουν ενδοκρινικές διαταραχές (διαταραχές έμμηνης ρύσης), παθήσεις πεπτικού και κυκλοφορικού συστήματος, δυσανεξία στη λακτόζη κ.α.

Πολυμορφισμούς που εντοπίζει το kit

Γονίδιο μελέτης	Πολυμορφισμοί	Γονότυποι και κλινική συμπτωματολογία
VDR – υποδοχέας βιταμίνης D	A > G rs1544410	A/A: Φυσιολογικός φαινότυπος – καμία συμπτωματολογία A/G: μειωμένη οστική πυκνότητα G/G: μειωμένη οστική πυκνότητα
TNFRSF11B οστεοπρωτεγερίνη (ανασταλτικός	A > G rs4355801	A/A: Φυσιολογικός φαινότυπος

παράγοντας οστεοκλαστογένεσης)		A/G: μειωμένη οστική πυκνότητα και αυξημένος κίνδυνος οστεοπόρωσης G/G: μειωμένη οστική πυκνότητα και αυξημένος κίνδυνος οστεοπόρωσης
TNFRSF11A	A > C rs884205	A/A: Φυσιολογικός φαινότυπος A/C: μειωμένη οστική πυκνότητα και αυξημένος κίνδυνος οστεοπόρωσης C/C: μειωμένη οστική πυκνότητα και αυξημένος κίνδυνος οστεοπόρωσης
LRP5 – χαμηλής πυκνότητας υποδοχέας λιποπρωτεΐνης 5 (Low density lipoprotein receptor-related protein 5)	C > T rs3736228	C/C: Φυσιολογικός φαινότυπος C/T: Οστεοπόρωση και κατάγματα T/T: Οστεοπόρωση και κατάγματα

Πίνακας 3: Αντιστοίχιση SNPs σε κανάλια του rtPCR

Πολυμορφισμοί	FAM	HEX	Cy 5
rs1544410	A	G	IC
rs4355801	A	G	IC
rs884205	A	C	IC
rs3736228	C	T	IC

Ένα από τα κυρίαρχα γονίδια που σχετίζονται με την οστεοπόρωση είναι το γονίδιο του υποδοχέα της βιταμίνης D (γονίδιο VDR). Ο υποδοχέας της βιταμίνης D είναι ένας ενδοπυρηνικός ορμονικός υποδοχέας για τη βιταμίνη D3. Ο εν λόγω υποδοχέας δύναται να μεταβάλλει την έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στην ομοιόσταση του ασβεστίου και ανοσολογική απόκριση, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη οστική πυκνότητα, τόσο σε παιδιά όσο και σε νεαρά άτομα και σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Warrington et al., 2015 ; Qin et al., 2016 ; Zhang et al., 2020) .

Η ανισορροπία του συστήματος RANK/RANKL/OPG είναι ένας ισχυρός παράγοντας που οδηγεί στην ανάπτυξη μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης λόγω ανεπάρκειας οιστρογόνων. Ο βαθμός αναδιαμόρφωσης των οστών ελέγχεται από την ισορροπία μεταξύ της έκφρασης της οστεοπρωτεγερίνης (OPG) και της έκφρασης του ενεργοποιητή υποδοχέα του συνδέτη πυρηνικού παράγοντα KB (RANKL). Ο ανασταλτικός παράγοντας της OPG, αναστέλλει τη σύνδεση του RANK και του συνδέτη RANK, αναστέλλοντας έτσι την κινητοποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την ενεργοποίηση των οστεοκλαστών (Richards et al., 2008 ; Estrada et al., 2012 ; Warrington et al., 2015) .

Τέλος, το κομμάτι του μεταβολισμού του οστικού ιστού, που είναι ανεξάρτητο από τα οιστρογόνα, ενεργοποιείται με τη συμμετοχή του LRP5 (χαμηλής πυκνότητας πρωτεΐνη σχετιζόμενη με τον υποδοχέα λιποπρωτεΐνης 5), η οποία διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών. Πολυμορφισμοί στον LRP5 οδηγούν στην εκδήλωση οστεοπόρωσης και οστεοπορωτικών καταγμάτων (Richards et al., 2008 ; Qin et al., 2016).

Η Osteo Diagnostics μέσω της ανάλυσης SWOT, αποσκοπεί να εξάγει σημαντικές πληροφορίες για το περιβάλλον της αγοράς και τον τρόπο με τον οποίο το προϊόν μπορεί να γίνει ανταγωνιστικό. Με τη χρήση αυτής της στρατηγικής αξιολόγησης, μπορούν να εντοπιστούν πλεονεκτήματά τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκμετάλλευση των προοπτικών της αγοράς για τη διάγνωση της οστεοπόρωσης. Επιπλέον, έχοντας επίγνωση των αδυναμιών, όπως τυχόν ανοίγματα στο σχεδιασμό προϊόντων ή στα δίκτυα διανομής, ενδέχεται να διορθωθούν αυτά τα προβλήματα και να ενισχυθεί το ανταγωνιστικό πλεονέκτημα του κιτ.

Κεφάλαιο IV: Επιχειρηματική ανάλυση

Ανάλυση SWOT

Strengths	Weaknesses
Προηγμένη διαγνωστική τεχνολογία	Αρχικό κόστος δημιουργίας κιτ
Δυνατότητα έγκαιρης ανίχνευσης	Εξάρτηση από ερευνητικά ιδρύματα
Ευρεία δημογραφική εμβέλεια	
Opportunities	Threats
Συνεργασίες με παρόχους υγειονομικής περίθαλψης	Ανταγωνισμός αγοράς
Επέκταση στις διεθνείς αγορές	Ρυθμιστικές διαδικασίες
Συνεχής βελτίωση μέσω E&A	

Δυνατότητες (Strengths)

Η υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα του rtPCR κιτ αποτελούν δύο από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματά του. Η ευαισθησία και η ειδικότητα στην προκειμένη περίπτωση είναι βιολογικοί όροι που χρησιμοποιούνται για να δείξουν πόσο καλά μπορεί ένα κιτ να ανιχνεύσει την ύπαρξη ή την απουσία ενός οστεοπορωτικού δείκτη. Η ικανότητα του κιτ να ανιχνεύσει το δείκτη εκεί που όντως υπάρχει λέγεται

ευαισθησία, ενώ η ικανότητα του kit να μην ανιχνεύσει τον δείκτη εκεί που δεν υπάρχει λέγεται ειδικότητα.

Μερικά περαιτέρω πλεονεκτήματα του kit είναι η ταχύτητα και η αποτελεσματικότητά του. Αυτά, επιτρέπουν στους ιατρούς να εντοπίσουν γρήγορα την οστεοπόρωση, γεγονός που επιτρέπει την έγκαιρη παρέμβαση τους. Με αυτόν τον τρόπο καθιερώνεται το kit ως ένα χρήσιμο εργαλείο σε αρκετά διαγνωστικά εργαστήρια.

Η διαδικασία ανάπτυξης του rtPCR Kit οστεοπόρωσης συνεπάγεται μια σειρά από έξοδα, όπως εκείνα που σχετίζονται με την έρευνα και την ανάπτυξη (E&A), την παραγωγή, την εμπορία, τα τέλη συμμόρφωσης με τους κανονισμούς και τα στοχευμένα περιθώρια κέρδους. Για παράδειγμα, οι δαπάνες έρευνας και ανάπτυξης μπορεί να κυμαίνονται από 500.000 έως 1.000.000 ευρώ ανάλογα με την πολυπλοκότητα της τεχνολογίας και το επίπεδο επικύρωσης που απαιτείται. Το κόστος παραγωγής, το οποίο περιλαμβάνει την παραγωγή, τις διαδικασίες διασφάλισης ποιότητας και τις προμήθειες συσκευασίας, μπορεί να κυμαίνεται από 200.000 έως 500.000 ευρώ. Τα τέλη συμμόρφωσης με τους κανονισμούς, τα οποία περιλαμβάνουν το κόστος απόκτησης άδειας από ρυθμιστικούς φορείς όπως ο FDA ή ο EMA, μπορεί να κυμαίνονται από € 50.000 έως € 100.000. Για να διασφαλίσει την προσιτότητα, εκπληρώνοντας ταυτόχρονα τους οικονομικούς στόχους και τις προσδοκίες της αγοράς, η εταιρεία στοχεύει σε τιμή ανά ασθενή περίπου 50 έως 100 ευρώ. Αυτό το σημείο τιμών είναι ανταγωνιστικό, λαμβάνοντας υπόψη αυτά τα έξοδα. Λόγω της οικονομικής αποδοτικότητάς του, το kit μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μικρή κλίμακα (κλινική χρήση) και σε μεγάλη κλίμακα (large-scale screening programs). Αυτό αυξάνει την οικονομική βιωσιμότητα του kit για ευρεία χρήση.

Μειονεκτήματα (Weaknesses)

Το αρχικό κόστος σχεδιασμού του kit είναι ένα πιθανό μειονέκτημα.. Επιπλέον, η περιορισμένη αποδοχή του kit οστεοπόρωσης rtPCR σε περιβάλλοντα υγειονομικής περίθαλψης με χαμηλούς πόρους (δίχως εξειδικευμένο προσωπικό) μπορεί να οδηγήσει στην παρερμηνευση των αποτελεσμάτων. Ο στρατηγικός σχεδιασμός, οι επενδύσεις σε υποδομές και η χρηματοδότηση προγραμμάτων κατάρτισης είναι απαραίτητες για την αντιμετώπιση αυτών των ζητημάτων.

Η ακρίβεια της διάγνωσης του kit μπορεί να διακυβευτεί εάν οι επιλεγμένοι γενετικοί δείκτες αποδειχθούν στο μέλλον ότι δεν σχετίζονται ή ότι δεν καλύπτουν ολόκληρο το φάσμα της οστεοπόρωσης. Ο ταχύς εξελισσόμενος τομέας της διάγνωσης απαιτεί συνεχή έρευνα και τροποποιήσεις για να εξηγήσει τις νέες γενετικές γνώσεις.

Το kit ανιχνεύει λίγους από τους διαθέσιμους πολυμορφισμούς, καθιστώντας έτσι την ανίχνευση της οστεοπόρωσης ιδιαίτερα δύσκολη για περιστατικά που δεν φέρουν τους παραπάνω πολυμορφισμούς.

Ευκαιρίες (Opportunities)

Η ευελιξία της rtPCR καθιστά δυνατή την προσθήκη νέων γενετικών δεικτών ή τη βελτίωση των υφιστάμενων ως απάντηση στη συνεχή μελέτη. Λόγω της συνεχούς ανάπτυξής του, το kit βρίσκεται στην πρώτη γραμμή της διάγνωσης της οστεοπόρωσης και προσφέρει επιλογές για συνεργασία με επιστήμονες, ακαδημαϊκά ιδρύματα και φαρμακευτικές εταιρείες για να παραμείνουν ενημερωμένοι σχετικά με τα πιο πρόσφατα επιστημονικά ευρήματα.

Επιπλέον, η γήρανση του πληθυσμού και η αυξανόμενη ευαισθητοποίηση για την υγεία των οστών οδηγούν στην ανάπτυξη της παγκόσμιας αγοράς για τη διάγνωση της οστεοπόρωσης. Το kit οστεοπόρωσης έχει τώρα μια μεγάλη ευκαιρία να πάρει ένα σημαντικό κομμάτι της αγοράς. Η μακροπρόθεσμη επιτυχία του kit μπορεί να ενισχυθεί με στρατηγικό μάρκετινγκ και συνεργασίες με επαγγελματίες υγείας, οι οποίες μπορούν να βοηθήσουν με τη διείσδυση της αγοράς, ιδιαίτερα σε περιοχές όπου η οστεοπόρωση είναι υψηλή.

Απειλές (Threats)

Το ανταγωνιστικό περιβάλλον της τεχνολογίας ανίχνευσης της οστεοπόρωσης παρουσιάζει έναν πιθανό κίνδυνο. Τρέχουσες τεχνικές, όπως η διπλή ενέργεια απορρόφησης ακτίνων X (DEXA), χρησιμοποιούνται συχνά από τους ιατρούς. Μπορεί να είναι δύσκολο να πειστούν οι επαγγελματίες να μετακινηθούν σε νέες τεχνολογίες όπως η PCR λόγω των ριζωμένων συνηθειών τους. Προκειμένου να ξεπεραστεί με επιτυχία κάθε αντίσταση και να επιτευχθεί η υιοθέτηση του kit από την αγορά, είναι επιτακτική ανάγκη να αντιμετωπιστούν αυτά τα ζητήματα μέσω εκτεταμένων προγραμμάτων κατάρτισης.

Επιπλέον, το κιτ μπορεί να απειληθεί από ρυθμιστικά εμπόδια και προβλήματα συμμόρφωσης. Η αφιέρωση σημαντικών πόρων στην έρευνα, την ανάπτυξη και τις ρυθμιστικές υποθέσεις (regulatory affairs) είναι απαραίτητη για τη συμμόρφωση με τα αυστηρά ρυθμιστικά πρότυπα (ISO) για τα διαγνωστικά όργανα, ειδικά πέρα από τα εθνικά σύνορα. Εάν δεν ξεπεραστούν αυτά τα ρυθμιστικά εμπόδια, η είσοδος στην αγορά ενδέχεται να καθυστερήσει και η έγκαιρη αποδοχή του κιτ μπορεί να τεθεί σε κίνδυνο.

Ως αποτέλεσμα, στην ανάλυση SWOT τονίζεται η οικονομική αποδοτικότητα, η αποτελεσματικότητα και η ακρίβεια του σετ οστεοπόρωσης PCR. Η επιτυχής εισαγωγή του κιτ οστεοπόρωσης PCR και η συνεχής ανάπτυξη στο συνεχώς μεταβαλλόμενο τοπίο της υγειονομικής περίθαλψης θα εξαρτηθεί από την αντιμετώπιση των αδυναμιών, την εκμετάλλευση ευκαιριών για καινοτομία και επέκταση της αγοράς και τον μετριασμό των απειλών.

Μέσω της οπτικής αναπαράστασης βασικών στοιχείων όπως οι ομάδες πελατών, οι προτάσεις αξίας, τα κανάλια, οι ροές εσόδων και η δομή κόστους, η Osteo diagnostics είναι σε θέση να αποκτήσει μια ολοκληρωμένη κατανόηση των επιχειρηματικών δραστηριοτήτων της και να εντοπίσει ευκαιρίες για καινοτομία και βελτιστοποίηση.

Επιχειρηματικός καμβάς

Business Model Canvas

Κύριοι συνεργάτες (key partners) - Πανεπιστημιακά ιδρύματα - Κλινικές	Κύριες δραστηριότητες (key activities) - Έρευνα και η ανάπτυξη(R&D - Διαδικασίες κατασκευής και διασφάλισης ποιότητας	Πρόταση αξίας (value proposition) Ακριβή και έγκαιρη αναγνώριση-πιθανότητας εμφάνισης της οστεοπόρωσης	Πελατειακή σχέση (customer relationship) Έρευνες-δημοσκοπήσεις	Πελατειακές ομάδες (customer segments) - Διαγνωστικά εργαστήρια - Ιδρύματα υγειονομικής περίθαλψης - Φαρμακοβιομηχανίες
	Κύριοι Πόροι (key resources) - Σύγχρονες εργαστηριακές συσκευές - Έμπειρη επιστημονική ομάδα - Ισχυρή ομάδα πωλήσεων και μάρκετινγκ		Κανάλια (Channels) - Online πλατφόρμες και e-commerce - Εκπαιδευτικά προγράμματα - Συνεργασία με οργανισμούς υγείας	
Κόστος (cost structure) - Εκπαίδευση προσωπικού - Σχεδιασμός kit			Έσοδα (revenue streams) - Άμεσες πωλήσεις - Συνεργασίες με νοσοκομεία και κλινικές και ερευνητικά ιδρύματα	

• Πελάτες (customer segments)

Οι κύριοι πελάτες για το rtPCR Kit οστεοπόρωσης περιλαμβάνουν ιδρύματα υγειονομικής περίθαλψης, διαγνωστικά εργαστήρια και ερευνητικές εγκαταστάσεις. Οι επαγγελματίες της υγειονομικής περίθαλψης, όπως οι ορθοπεδικοί, οι ενδοκρινολόγοι και οι γενικοί ιατροί, αποτελούν μια κρίσιμη βάση πελατών. Επιπλέον, το kit

απευθύνεται σε φαρμακευτικές εταιρείες και ερευνητές στον τομέα της υγείας των οστών, προωθώντας συνεργασίες για την <<ενίσχυση>> της έρευνας στην οστεοπόρωση.

Παράδειγμα ιδανικού πελάτη

Ο ιδανικός πελάτης για το kit οστεοπόρωσης είναι ο <<Δρ.Μιχαηλίδης>> . Είναι ένας έμπειρος ορθοπαιδικός που εργάζεται σε πανεπιστημιακό νοσοκομείο. Ο Δρ. Μιχαηλίδης θέλει να παρέχει στους ασθενείς του την καλύτερη δυνατή φροντίδα και να συμβαδίζει με τις τελευταίες εξελίξεις στη διάγνωση και θεραπεία της οστεοπόρωσης. Εκτιμά τα διαγνωστικά όργανα που παρέχουν ακρίβεια και δυνατότητες έγκαιρης ανίχνευσης, ώστε να μπορούν να δημιουργηθούν εξατομικευμένα θεραπευτικά σχήματα. Επίσης είναι πρόθυμος να εφαρμόσει τεχνολογία αιχμής που θα βελτιώσει τη διαγνωστική ακρίβεια των ασθενών του . Τέλος, είναι λάτρης της συνεχούς κατάρτισης που μπορεί να του διασφαλίσει την ομαλή ενσωμάτωση των νέων τεχνολογιών στο έργο του. Η χρήση του kit από έναν κορυφαίο ρευματολόγο, όπως είναι ο Δρ. Μιχαηλίδης, θα έχει σημαντικό αντίκτυπο στην αποδοχή του kit από την ευρύτερη ιατρική κοινότητα. Η ανταγωνιστικότητα του kit στην αγορά εξαρτάται από την ικανότητά του να ικανοποιεί τις απαιτήσεις και τα πρότυπα των ιατρικών εμπειρογνομόνων όπως ο Δρ. Μιχαηλίδης.

- Πρόταση αξίας (value proposition)

Με την εξαιρετική ευαισθησία, την ειδικότητα και την δυνατότητα παρακολούθησης του PCR σε πραγματικό χρόνο, το kit οστεοπόρωσης rtPCR παρουσιάζει μια ισχυρή πρόταση αξίας. Το kit διευκολύνει την ακριβή και έγκαιρη αναγνώριση-πιθανότητας εμφάνισης της οστεοπόρωσης με τη βοήθεια συγκεκριμένων γενετικών δεικτών, επιτρέποντας έτσι στους ιατρούς να χορηγούν εξατομικευμένα θεραπευτικά σχήματα που ενισχύουν τα αποτελέσματα των ασθενών. Η χρησιμότητά του στην διάγνωση τονίζεται περαιτέρω από το χαμηλό κόστος και την ικανότητα προσαρμογής του στην αναδυόμενη έρευνα.

1. Κανάλια (channels)

Τα κανάλια διανομής και επικοινωνίας για το rtPCR Osteoporosis kit διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην προσέγγιση και τη συνεργασία με τους επαγγελματίες υγείας, τα διαγνωστικά εργαστήρια και τα ερευνητικά ιδρύματα.

2. Άμεση πώληση και εταιρικές σχέσεις

Οι άμεσες πωλήσεις σε ιατρικές εγκαταστάσεις, διαγνωστικά εργαστήρια και ερευνητικά κέντρα αποτελούν έναν από τους κύριους τρόπους διανομής. Η ομάδα πωλήσεων, θα παρουσιάζει τα πλεονεκτήματα και τα χαρακτηριστικά του rtPCR Osteoporosis kit σε διευθυντές διαγνωστικών τμημάτων και εργαστηρίων. Επιπλέον, η συνεργασία με διανομείς ιατρικού εξοπλισμού(πχ ιατρικούς επισκέπτες) θα επιταχύνει την παγκόσμια διάδοση του kit, διασφαλίζοντας την προσβασιμότητά του σε ένα ευρύτερο φάσμα υγειονομικής περίθαλψης.

3. Πλατφόρμες Online και ηλεκτρονικό εμπόριο (E-Commerce)

Το rtPCR Kit οστεοπόρωσης θα προσφέρεται μέσω διαδικτυακών πλατφορμών και καναλιών ηλεκτρονικού εμπορίου προκειμένου να βελτιωθεί η προσβασιμότητα και να επιταχυνθεί η διαδικασία αγοράς. Μέσω μιας ειδικής διαδικτυακής πύλης (πχ site εταιρείας), οι επαγγελματίες της υγειονομικής περίθαλψης μπορούν εύκολα να πραγματοποιούν παραγγελίες, να λαμβάνουν πληροφορίες για τα προϊόντα και να διαχειρίζονται τους λογαριασμούς τους. Αυτή η μέθοδος καθιστά την παρακολούθηση των παραγγελιών και τη διαχείριση της παράδοσης πιο αποτελεσματική, ενώ ταυτόχρονα διευκολύνει τη διαδικασία αγοράς.

4. Εργαστήρια και Εκπαιδευτικά Προγράμματα

Μια ουσιαστική συνιστώσα των <<καναλιών>> είναι η εκπαίδευση. Η δημιουργία εμπειριστατωμένων εκπαιδευτικών μαθημάτων και εργαστηρίων με σκοπό την εκπαίδευση των επαγγελματιών υγείας σχετικά με το πώς να χρησιμοποιούν το kit οστεοπόρωσης είναι απαραίτητη. Μία ομάδα επαγγελματιών μπορεί να διεξάγει προσωπικά εργαστήρια, εκπαιδευτικές ενότητες και webinars. Αυτά τα εκπαιδευτικά προγράμματα επιδιώκουν να επιδείξουν τις τεχνικές δυνατότητες του kit προσφέροντας παράλληλα καθοδήγηση σχετικά με τον τρόπο ερμηνείας των αποτελεσμάτων και την εφαρμογή τους σε κλινικές περιπτώσεις.

5. Συνεργασία με οργανισμούς υγείας

Η ανάπτυξη συνεργασιών με οργανισμούς (πχ ΕΟΔΥ) που επικεντρώνονται στην ενδοκρινολογία, τη ρευματολογία και την υγεία των οστών θα είναι ζωτικής σημασίας για την καθοδήγηση της υιοθέτησης του κιτ. Αυτές οι εταιρικές σχέσεις μπορούν να λάβουν τη μορφή συνεργατικών εκπαιδευτικών έργων, χορηγίας συνεδρίων, σεμιναρίων και ημερίδων.

6. Εξυπηρέτηση πελατών και διαχείριση σχέσεων (Relationship management)

Μετά την πρώτη <<συναλλαγή>>, εξακολουθούν να υπάρχουν τρόποι για συνεχή εξυπηρέτηση και οικοδόμηση σχέσεων με τον πελάτη. Το προσωπικό υποστήριξης πελατών θα είναι στη διάθεσή τους για να απαντήσει σε ερωτήσεις, να προσφέρει βοήθεια με τεχνικά ζητήματα και να εγγυηθεί μια άριστη εμπειρία χρήστη. Τα ενημερωτικά δελτία και το εταιρικό site, μεταξύ άλλων καναλιών επαφής (πχ σελίδα εταιρείας στο Instagram), θα ενημερώσουν τους πελάτες για τυχόν βελτιώσεις στο κιτ, ανακαλύψεις στην επιστήμη και τις βέλτιστες πρακτικές χρήσης του. Ο σκοπός αυτής της συνεχούς συμμετοχής είναι η ικανοποίηση του πελάτη και η ανάπτυξη διαρκής εταιρικής σχέσης.

7. Κέρδη (Revenue Streams)

Οι άμεσες πωλήσεις σε ιατρικές εγκαταστάσεις και διαγνωστικά εργαστήρια είναι η κύρια πηγή εσόδων για το rtPCR Osteoporosis κιτ. Πρόσθετες πηγές εσόδων γίνεται να προέλθουν από συνεργασίες με ερευνητικά πανεπιστήμια και συμφωνίες αδειοδότησης με φαρμακευτικές εταιρείες για ερευνητικούς σκοπούς. Διάφορες πηγές εσόδων προσφέρονται από τη συνεχή καινοτομία και βελτίωση του κιτ.

8. Σημαντικές πηγές (key resources)

Οι σύγχρονες εργαστηριακές συσκευές, οι ομάδες έρευνας και ανάπτυξης και τα δικαιώματα πνευματικής ιδιοκτησίας αποτελούν σημαντικούς πόρους για το rtPCR κιτ οστεοπόρωσης. Οι επαγγελματίες με εμπειρία στην τεχνολογία rtPCR είναι πηγή ζωτικής σημασίας, όπως και οι συνεργασίες που προωθούν τη συνεχή βελτίωση και ανάπτυξη των γενετικών δεικτών. Επιπλέον, ισχυρή ομάδα πωλήσεων και μάρκετινγκ είναι απαραίτητες για την οικοδόμηση μάρκας και τη διεύθυνση στην αγορά.

9. Σημαντικές διεργασίες (key activities)

Η έρευνα και η ανάπτυξη(R&D), συμπεριλαμβανομένης της ανακάλυψης νέων γενετικών δεικτών και των τεχνολογικών εξελίξεων, είναι οι κύριες διεργασίες που επικεντρώνονται στη συνεχή βελτίωση του κιτ. Οι διαδικασίες κατασκευής και διασφάλισης ποιότητας εγγυώνται τη δημιουργία αξιόπιστων PCR κιτ. Για να ενθαρρυνθεί η υιοθέτηση του κιτ, οι πρωτοβουλίες μάρκετινγκ και πωλήσεων επικεντρώνονται στη διεξαγωγή εκπαιδευτικών συνεδριών και τη συνεργασία με εταιρείες στον τομέα υγείας.

10. Βασικές Συνεργασίες(key partnerships)

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω εταιρικές σχέσεις περιλαμβάνουν συνεργασίες με ερευνητικά ιδρύματα, φαρμακευτικές εταιρείες και πανεπιστήμια για τη συνεχή έρευνα και επικύρωση γενετικών δεικτών. Η συνεργασία με διανομείς ιατρικού εξοπλισμού και με διάφορες πλατφόρμες διευκολύνουν την παγκόσμια διανομή. Η συνεργασία με οργανισμούς και εταιρείες ενισχύουν την αξιοπιστία και την υιοθέτηση του κιτ στην ιατρική κοινότητα.

11. Δαπάνες(cost structure)

Οι κύριες δαπάνες σχετίζονται με την κατασκευή και τον έλεγχο ποιότητας, την έρευνα ,την ανάπτυξη για τη συνεχή βελτίωση, και το μάρκετινγκ - πωλήσεις για την αποδοχή της αγοράς. Εκτός από τις δαπάνες διανομής και σχεδιασμού του κιτ, τα λειτουργικά έξοδα περιλαμβάνουν εξειδικευμένο προσωπικό για την εξυπηρέτηση πελατών και την ανάπτυξη προϊόντων. Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τη συνολική δομή του κόστους είναι η διατήρηση της πνευματικής ιδιοκτησίας και η συνεχιζόμενη συμμόρφωση με τους ρυθμιστικούς κανονισμούς (regulatory affairs). Η επιτυχία του κιτ απαιτεί την επίτευξη ισορροπίας μεταξύ ποιότητας, καινοτομίας και οικονομικής αποδοτικότητας.

Ανταγωνιστές

Ένας γνωστός ανταγωνιστής, η AffiGen® παρέχει ένα ολοκληρωμένο κιτ SNP για την αναγνώριση της οστεοπόρωσης. Το κιτ, το οποίο κοστίζει 35 ευρώ ανά χρήστη, περιλαμβάνει ένα μεγάλο πάνελ που καλύπτει μια ποικιλία από SNPs που συνδέονται με τον κίνδυνο οστεοπόρωσης. Αυτή η μέθοδος δίνει στους ιατρούς ένα ολόκληρο γενετικό προφίλ του κάθε ασθενούς, διευκολύνοντας την ακριβή αξιολόγηση του κινδύνου και εξατομικευμένα θεραπευτικά σχήματα. Η AffiGen εμπορεύεται τον εαυτό της ως πρωτοπόρο στη διάγνωση της οστεοπόρωσης παρέχοντας μια ολοκληρωμένη γενετική μελέτη. Ωστόσο, λόγω της υψηλότερης τιμής της, δεν θα μπορούσε να είναι προσιτή για ορισμένους πληθυσμούς, ειδικά σε περιοχές όπου το κόστος είναι ένας παράγοντας, όπως είναι η Ελλάδα.

Τέλος ένας δεύτερος ανταγωνιστής μας είναι η GeneQuery .Το κιτ περιλαμβάνει 88 γονίδια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της οστεοπόρωσης. Παρόλο που το κόστος του κιτ τους είναι μικρό, η εργαστηριακή επεργασία που χρειάζεται ένα array kti είναι χρονοβόρα και δύσκολη.

Η εφαρμογή διαδικασιών διαχείρισης κινδύνου στην Osteo Diagnostics αποτελεί μια προληπτική προσέγγιση για την αναγνώριση, αξιολόγηση και μείωση των πιθανών κινδύνων που μπορούν να επηρεάσουν τους στόχους και τις λειτουργίες της εταιρείας. Μέσω εξέτασης τόσο των εξωτερικών όσο και των εσωτερικών παραγόντων κινδύνου, όπως διαταραχές στην αλυσίδα εφοδιασμού, ρυθμιστικές αλλαγές ή τεχνικά εμπόδια, μπορούμε να δημιουργηθούν αποτελεσματικά σχέδια μετριασμού του ρίσκου για να προστατευτεί η επιχείρησή και να εξασφαλιστεί τη συνέχιση της. Στόχος της Osteo diagnostics είναι η διαφύλαξη της αξία των μετόχων και η ανάπτυξη μια κουλτούρα συνειδητής λήψης αποφάσεων μέσω της αποτελεσματικής διαχείρισης των κινδύνων. Αυτό θα εξασφαλίσει τελικά τη μακροπρόθεσμη επιτυχία και τη βιωσιμότητα της Osteo Diagnostics στον συνεχώς μεταβαλλόμενο τομέα της διάγνωσης της οστεοπόρωσης.

Διαχείριση Ρίσκου

Risk Analysis

1. Προσδιορισμός κινδύνου(Risk Identification):

- Προσδιορισμός του κινδύνου ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων λόγω γενετικών παραλλαγών που δεν λαμβάνονται υπόψη στον αλγόριθμο του kit SNP. Αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει σε περιττή ανησυχία και περαιτέρω διαγνωστικές διαδικασίες για τους ασθενείς.

2. Αξιολόγηση κινδύνου(Risk Assessment):

- Εξέταση της πιθανότητας το δείγμα να έχει επιμολυνθεί κατά τη διαδικασία συλλογής. Τα ανακριβή αποτελέσματα θα επηρεάζουν την διάγνωση και τη θεραπεία του ασθενούς.

3. Μείωση ρίσκου(Risk Mitigation):

- Μείωση της πιθανότητας λαθών, παρέχοντας στο ιατρικό προσωπικό εμπεριστατωμένες οδηγίες σχετικά με τον τρόπο αξιολόγησης των αποτελεσμάτων.

4. Επιτήρηση (Risk surveillance):

- Καθημερινή παρακολούθηση αποτελεσμάτων για τυχόν λάθη .Ενδέχεται να απαιτηθεί διερεύνηση και διορθωτικά μέτρα εάν ένα μεγάλο μέρος ασθενών αναφέρει ασυνεπή αποτελέσματα.

5. Συμμόρφωση (Regulatory Compliance):

- Ο ιατρικός εξοπλισμός είναι σύμφωνος με τον Κανονισμό (IVDR) της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Οι ανακλήσεις προϊόντων ή οι καθυστερήσεις στην κυκλοφορία ενδέχεται να προκύψουν από μη συμμόρφωση με ρυθμιστικούς κανονισμούς.

6. Επικοινωνία και Διαφάνεια (Communication and Transparency):

- Σαφέστατη δήλωση ότι το kit SNP έχει περιορισμένη ικανότητά να αναγνωρίζει συγκεκριμένες γενετικές παραλλαγές. Θα πρέπει να παρέχονται στους ασθενείς ενημερωτικά φυλλάδια, έτσι ώστε να ξέρουν ακριβώς ποια snps ανιχνεύει το kit και τι στατιστική σημαντικότητα έχει το καθένα.

7. Παρακολούθηση μετά την αγορά (Post-Market Surveillance):

- Παρακολούθηση πραγματικών δεδομένων για εντοπισμών τάσεων ή μοτίβων σε δυσμενή περιστατικά. Εάν το ποσοστό των ψευδώς αρνητικών είναι υψηλότερο από το αναμενόμενο, μπορεί να σημαίνει ότι το προϊόν χρήζει βελτίωσης .

8. Συνεχής βελτίωση(Continuous Improvement):

- Έλεγχος των σχολίων και των παραπόνων των πελατών σε καθημερινή βάση.

Η εισαγωγή του rtPCR Κιτ οστεοπόρωσης στην αγορά, είναι δικαιολογημένη λόγω της εξαιρετικής τιμής, της ακρίβειας του. Το κιτ, το οποίο αντιμετωπίζει οικονομικούς περιορισμούς και καθιστά διαθέσιμες τις εξετάσεις οστεοπόρωσης στην Ελλάδα, έχει λογική τιμή, η οποία ανέρχεται στα 50-100 ευρώ ανά χρήστη. Μέσω της στόχευσης τεσσάρων σημαντικών (SNPs) που συνδέονται με την οστεοπόρωση, το κιτ εγγυάται ακριβή διάγνωση-πιθανότητα εμφάνισης χωρίς περιττές επιπλοκές ή έξοδα ,παρέχοντας στους ιατρούς ένα προσιτό εργαλείο για την αναγνώριση ατόμων υψηλού κινδύνου και την εκτέλεση άμεσων παρεμβάσεων. Με τον συνδυασμό της ιατρικής ακρίβειας και της διαχείρισης της οστεοπόρωσης, το ντεμπούτο του κιτ στην αγορά όχι μόνο ανταπεξέρχεται στην τρέχουσα οικονομική κατάσταση της Ελλάδας αλλά και προάγει τη σωστή διαχείριση της οστεοπόρωσης.

Βιβλιογραφία

- Azizzadeh-Roodpish, S., Garzon, M. H., & Mainali, S. (2021). Classifying single nucleotide polymorphisms in humans. *Molecular Genetics and Genomics*, 296(5), 1161-1173. <https://doi.org/10.1007/s00438-021-01805-x>
- Bruno, A. E., Li, L., Kalabus, J. L., Pan, Y., Yu, A., & Hu, Z. (2012). miRdSNP: a database of disease-associated SNPs and microRNA target sites on 3'UTRs of human genes. *BMC Genomics*, 13(1), 44. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-44>
- Esmaeili, F., Narimani, Z. A.-O., & Vasighi, M. A.-O. (2023). Discovering SNP-disease relationships in genome-wide SNP data using an improved harmony search based on SNP locus and genetic inheritance patterns. *PloS one*(1932-6203 (Electronic)). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0292266>
- Estrada, K., Styrkarsdottir, U., Evangelou, E., Hsu, Y.-H., Duncan, E., Ntzani, E., Oei, L., Albagha, O., Amin, N., Kemp, J., Koller, D., li, G., Liu, C.-T., Minster, R., Moayyeri, A., Vandenput, L., Willner, D., Xiao, S., Yerges-Armstrong, L., & Rivadeneira, F. (2012). Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. *Nature genetics*, 44, 491-501. <https://doi.org/10.1038/ng.2249>
- Gray, I. C., Campbell Da Fau - Spurr, N. K., & Spurr, N. K. (2000). Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics. *Human molecular genetics*(0964-6906 (Print)), 9(16), 2403–2408. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.16.2403>

- Kim, S., & Misra, A. (2007). SNP Genotyping: Technologies and Biomedical Applications. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 9(1), 289-320. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.9.060906.152037>
- Liu, Y., Jin, G., Wang, X., Dong, Y., & Ding, F. (2021). Identification of New Genes and Loci Associated With Bone Mineral Density Based on Mendelian Randomization [Original Research]. *Frontiers in Genetics*, 12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.728563>
- Loktionov, A. (2003). Common gene polymorphisms and nutrition: emerging links with pathogenesis of multifactorial chronic diseases (review). *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 14(8), 426-451. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(03\)00032-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0955-2863(03)00032-9)
- Mathur, R., Singh, B., & Jha, A. (2018). S Single Nucleotide Polymorphism (SNP). In. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47829-6_2049-1
- Moszyńska, A., Gebert, M., Collawn, J. F., & Bartoszewski, R. (2017). SNPs in microRNA target sites and their potential role in human disease. *Open Biology*, 7(4), 170019. <https://doi.org/10.1098/rsob.170019>
- Qin, L., Liu, Y., Wang, Y., Wu, G., Chen, J., Ye, W., Yang, J., & Huang, Q. (2016). Computational Characterization of Osteoporosis Associated SNPs and Genes Identified by Genome-Wide Association Studies. *PLoS One*. (1932-6203 (Electronic)). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150070>
- Richards, J. B., Rivadeneira F Fau - Inouye, M., Inouye M Fau - Pastinen, T. M., Pastinen Tm Fau - Soranzo, N., Soranzo N Fau - Wilson, S. G., Wilson Sg Fau - Andrew, T., Andrew T Fau - Falchi, M., Falchi M Fau - Gwilliam, R., Gwilliam R Fau - Ahmadi, K. R., Ahmadi Kr Fau - Valdes, A. M., Valdes Am Fau - Arp, P., Arp P Fau - Whittaker, P., Whittaker P Fau - Verlaan, D. J., Verlaan Dj Fau - Jhamai, M., Jhamai M Fau - Kumanduri, V., Kumanduri V Fau - Moorhouse, M., Moorhouse M Fau - van Meurs, J. B., van Meurs Jb Fau - Hofman, A., Hofman A Fau - Pols, H. A. P., Pols Ha Fau - Hart, D., Hart D Fau - Zhai, G., Zhai G Fau - Kato, B. S., Kato Bs Fau - Mullin, B. H., Mullin Bh Fau - Zhang, F., Zhang F Fau - Deloukas, P., Deloukas P Fau - Uitterlinden, A. G., Uitterlinden Ag Fau - Spector, T. D., & Spector, T. D. (2008). Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study. *Lancet (London, England)*(1474-547X (Electronic)). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60599-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60599-1)

- Sukhumsirichart, W. (2018). Polymorphisms. In *Genetic Diversity and Disease Susceptibility*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76728>
- van Oeveren, J., & Janssen, A. (2009). Mining SNPs from DNA Sequence Data; Computational Approaches to SNP Discovery and Analysis. In A. A. Komar (Ed.), *Single Nucleotide Polymorphisms: Methods and Protocols* (pp. 73-91). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-411-1_4
- Wang, X., Tomso Dj Fau - Liu, X., Liu X Fau - Bell, D. A., & Bell, D. A. (2005). Single nucleotide polymorphism in transcriptional regulatory regions and expression of environmentally responsive genes. *Toxicology and applied pharmacology*(1096-0333 (Electronic)), 207(202 Suppl), 284–290. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.09.024>
- Wang, Z., & Moulton, J. (2001). SNPs, protein structure, and disease. *Human mutation*(1098-1004 (Electronic)), 17(14), 263–270. <https://doi.org/10.1002/humu.22>
- Warrington, N. M., Kemp, J. P., Tilling, K., Tobias, J. H., & Evans, D. M. (2015). Genetic variants in adult bone mineral density and fracture risk genes are associated with the rate of bone mineral density acquisition in adolescence. *Oxford Journals - Human Molecular Genetics* (1460-2083 (Electronic)). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv143>
- Weber, J. L. (1990). Human DNA polymorphisms and methods of analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 1(2), 166-171. [https://doi.org/10.1016/0958-1669\(90\)90026-H](https://doi.org/10.1016/0958-1669(90)90026-H)
- Xiao, X., Roohani, D., & Wu, Q. A.-O. (2018). Genetic profiling of decreased bone mineral density in an independent sample of Caucasian women. *a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*(1433-2965 (Electronic)). <https://doi.org/10.1007/s00198-018-4546-1>
- Zhang, L., He, J., Sun, X., Luo, X., Zeng, J., He, W., Liu, X., & Feng, B. (2020). Relationship between glucagon-like peptide-1 receptor gene polymorphism and bone mineral density in postmenopausal women in Shanghai. *Annals of Palliative Medicine*, 9(4), 1732-1741. <https://apm.amegroups.org/article/view/44286>

Zmuda, J. M., & Kammerer, C. M. (2008). Snipping away at osteoporosis susceptibility. *Lancet (London, England)*(1474-547X (Electronic)), 371(9623), 1479–1480. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60600-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60600-5)