



ΠΜΣ: ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

“Ο ρόλος του πολυμορφισμού +1340T→C του γονιδίου του υποδοχέα της καλσιτονίνης (CALCR) στην οστεοαρθρίτιδα”

ΠΡΑΣΙΑΝΑΚΗ ΔΑΝΑΗ
ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΟΣ

Εργαστήριο: ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ & ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Ασπασία Τσέζου

ΛΑΡΙΣΑ, Οκτώβρης 2013

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

κ. Γερμενής Αναστάσιος
Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας

κ. Μαλίζος Κωνσταντίνος
Καθηγητής Ορθοπαιδικής

κα. Τσέζου Ασπασία
Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περιεχόμενα	4
1. Περίληψη - Abstract	6
2. Εισαγωγή	7
2.1. Χόνδρος	8
2.2. Χαρακτηριστικά του ενήλικου αρθρικού χόνδρου	10
2.3. Οστεοαρθρίτιδα	12
2.4. Η καλσιτονίνη	15
2.5. Ο υποδοχέας της καλσιτονίνης	17
2.6. Μελέτες συσχέτισης στο γονίδιο του υποδοχέα της καλσιτονίνης	22
3. Υλικά και Μέθοδοι	28
3.1. Συλλογή δειγμάτων	28
3.2. Απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα	28
3.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR)	29
3.4. Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος PCR	33
3.5. Πέψη με περιοριστικό ένζυμο	34
3.6. Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος πέψης	36
3.7. Στατιστική μελέτη	37
4. Αποτελέσματα	38
4.1. Κατανομή των γονοτύπων και των αλληλομόρφων του πολυμορφισμού CALCR 1340T→C στο δείγμα μας	38
4.2. Σύγκριση της κατανομής του φύλου σε σχέση με τον πολυμορφισμό CALCR 1340T→C	39

4.3. Σύγκριση της κατανομής του δείκτη μάζας σώματος σε σχέση με τον πολυμορφισμό CALCR 1340T→C	40
4.4. Σύγκριση της σοβαρότητας της νόσου με την κατανομή των γονοτύπων του πολυμορφισμού CALCR 1340T→C	41
5. Συζήτηση	43
6. Συμπεράσματα	46
7. Βιβλιογραφία	47
Ευχαριστίες	60

1. Περίληψη

Ο ρόλος του γενετικού υποβάθρου στην οστεοαρθρίτιδα ως ρυθμιστικός και προγνωστικός παράγοντας και η αλληλεπίδρασή του με τους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου δεν έχει κατανοηθεί πλήρως. Σκοπός της παρούσας μελέτης αποτελεί η τεκμηρίωση ή όχι της συνεισφοράς των γενετικών παραγόντων καθώς και της συνέργειάς τους με τους επιβαρυντικούς παράγοντες της νόσου στον ελληνικό πληθυσμό. Η μελέτη επικεντρώθηκε στον πολυμορφισμό του γονιδίου του υποδοχέα της καλσιτονίνης, CALCR 1340T→C σε ασθενείς με ή χωρίς οστεοαρθρίτιδα. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι ο πολυμορφισμός αυτός σχετίζεται με την εμφάνιση της οστεοαρθρίτιδας με το φυσιολογικό γονότυπο (CC) να διαθέτει προστατευτικό ρόλο έναντι της εμφάνισης της νόσου.

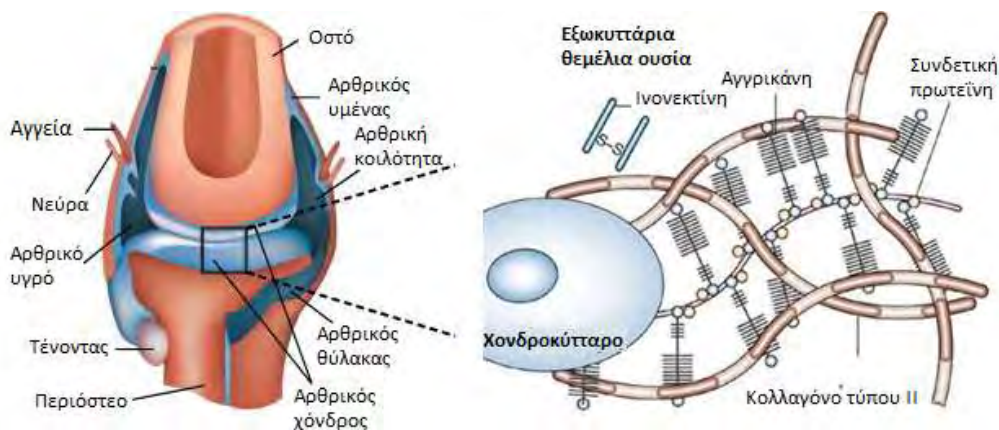
Abstract

The predisposition of the genetic factors in osteoarthritis as modulatory and prognostic factors, as well as their interaction with the risk factors, is not completely clear. In our study we tried to determine the contribution of these factors and their synergistic effect with the risk factors of osteoarthritis in the greek population. Patients with osteoarthritis or not were examined for the 1340T→C calcitonin receptor gene (CALCR) polymorphism. The results showed that the CALCR 1340T→C polymorphism is associated with osteoarthritis, and that the non-pathological genotype (CC) plays a protective role against the incidence of this disease.

2. Εισαγωγή

Το σκελετικό σύστημα αποτελεί μια εξειδικευμένη μορφή στηρικτικού και συνδετικού ιστού. Από τη μια πλευρά, τα οστά από τα οποία αποτελείται παρέχουν ένα ισχυρό προστατευτικό και στηρικτικό πλαίσιο για τους περισσότερους από τους μαλακούς ιστούς του σώματος. Από την άλλη, ο χόνδρος παρέχει μια ημίσκληρη στήριξη σε συγκεκριμένες θέσεις, όπως στα τοιχώματα των μεγαλύτερων αεραγωγών της ανώτερης αναπνευστικής οδού και στο εξωτερικό τους, ή στις αρθρώσεις [1].

Οι αρθρώσεις είναι σύνθετες δομές που συνδέουν τα οστά μεταξύ τους και ανάλογα με την κατασκευή και τη λειτουργία της κάθε άρθρωσης επιτρέπουν διαφορετικό βαθμό κινητικότητας [2]. Έτσι, ανάλογα με την κινητικότητα που επιτρέπουν μεταξύ των οστών που τις αποτελούν, οι αρθρώσεις μπορούν να ταξινομηθούν σε διαρθρώσεις, οι οποίες επιτρέπουν μεγάλη κινητικότητα μεταξύ των οστών, και σε συναρθρώσεις, όπου η κινητικότητα είναι περιορισμένη. Στις τελευταίες τα οστά δεν έχουν ελεύθερη αρθρική επιφάνεια και ενώνονται μεταξύ τους με πυκνό κολλαγονικό ιστό.



Εικόνα 1. Η επιφάνεια των διαρθρώσεων επικαλύπτεται με χόνδρινο ιστό, αποτελούμενο από χονδροκύτταρα. Κάθε χονδροκύτταρο απομονώνεται από τα διπλανά του μέσω μιας εξωκυττάριας ουσίας πλούσιας σε κολλαγόνο τύπου II και πρωτεογλυκάνες που συνθέτει το ίδιο.

Στις διαρθρώσεις οι αρθρικές επιφάνειες συγκρατούνται κοντά η μια στην άλλη στον αρθρικό θύλακα, του οποίου η σύσταση είναι ινώδης (Εικόνα 1). Η εσωτερική επιφάνεια του θύλακα επενδύεται από μια εξειδικευμένη στιβάδα κολλαγονικού ιστού, τον αρθρικό υμένα, ο οποίος ευθύνεται για την απελευθέρωση

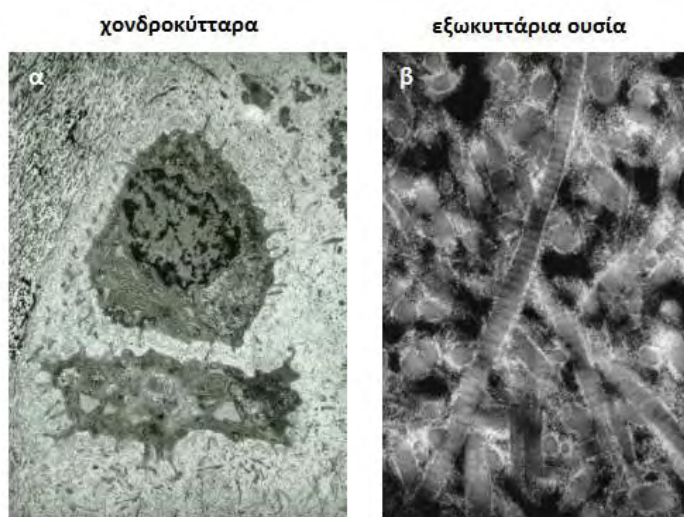
του αρθρικού υγρού που λιπαίνει τις αρθρικές επιφάνειες, διευκολύνοντας με τον τρόπο αυτό την κινητικότητά τους. Η επιφάνεια του αρθρικού υμένα μέσα στην αρθρική κοιλότητα αναδιπλώνεται σε πτυχές και μικρολάχνες. Ο ιστός αυτός περιέχει άφθονα αιμοφόρα αγγεία, λεμφαγγεία και νεύρα. Η επιφάνεια του αρθρικού υμένα δεν αποτελεί επιθήλιο, και τα αρθρικά κύτταρα που τον αποτελούν δεν ενώνονται μεταξύ τους μέσω συνάψεων, ούτε εφάπτονται πάνω σε μια βασική μεμβράνη [3].

Στη φυσιολογική άρθρωση το αρθρικό υγρό μπορεί να παρομοιαστεί με ένα λεπτό στρώμα που καλύπτει τις αρθρικές επιφάνειες κι επιτρέπει την ελεύθερη κίνηση των οστών της άρθρωσης ελαχιστοποιώντας την τριβή μεταξύ τους. Επειδή το διάστημα μεταξύ των οστών δε διαχωρίζεται από τον αρθρικό υμένα μέσω κάποιου επιθηλίου, το αρθρικό υγρό περιγράφεται καλύτερα ως ένα πολύ εξειδικευμένο είδος υγρού που παράγεται από την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία του αρθρικού υμένα, παρά μια έκκριση. Τα βασικά συστατικά του είναι το υαλουρονικό οξύ και οι συνδεδεμένες με αυτό γλυκοπρωτεΐνες που εκκρίνονται από τα αρθρικά κύτταρα, ενώ το υγρό του συστατικό αποτελεί ένα διάλυμα από τα τριχοειδή του αρθρικού υμένα. Αυτή η οργάνωση διευκολύνει τη συνεχή ανταλλαγή οξυγόνου, διοξειδίου του άνθρακα και μεταβολιτών μεταξύ του αίματος και του αρθρικού υγρού, το οποίο αποτελεί την κύρια πηγή μεταβολικής τροφοδότησης του αρθρικού χόνδρου [4, 5].

2.1. Χόνδρος

Ο αρθρικός χόνδρος αποτελεί ένα συνδετικό ιστό χωρίς αγγεία και νεύρα, που παρέχει κάλυψη στα οστικά συστατικά των αρθρώσεων. Λειτουργεί ως υποδοχέας βάρους, μέσω της απορρόφησης των κραδασμών, κι είναι ικανός να προστατεύει το οστό από τις δυνάμεις συνάφειας. Οι ιδιότητες αυτού του ιστού σχετίζονται με τη σύνθεση και τη δομή της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, που αποτελείται κυρίως από υψηλές συγκεντρώσεις πρωτεογλυκανών περιελιγμένες σε ένα πυκνό δίκτυο κολλαγονικών ινών και μεγάλη ποσότητα νερού (Εικόνα 2). Αυτός ο ιστός επιτρέπει την λεία κίνηση της άρθρωσης κατά την οποία απορροφά και κατανέμει το βάρος. Ο αρθρικός χόνδρος συντίθεται από σποραδικούς πληθυσμούς ενός τύπου κυττάρων, τα χονδροκύτταρα, που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση και τη διατήρηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας [6].

Τα χονδροκύτταρα, όπως τα κύτταρα όλων των σκελετικών ιστών, προέρχονται από τα αρχέγονα μεσεγγυματικά κύτταρα [7]. Ο σχηματισμός του χόνδρου αρχίζει με τη διαφοροποίηση των αστεροειδών αρχέγονων μεσεγγυματικών κυττάρων, τα οποία σχηματίζουν τα υποστρόγγυλα πρόδρομα κύτταρα του χόνδρου, τους χονδροβλάστες. Οι μιτωτικές διαιρέσεις που ακολουθούν δημιουργούν αθροίσματα στενά τοποθετημένων χονδροβλαστών που αναπτύσσονται και ξεκινούν



Εικόνα 2. α) Το χονδροκύτταρο και β) η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία

τη σύνθεση θεμέλιας ουσίας και ινώδους εξωκυττάριου υλικού. Η έκκριση του εξωκυττάριου υλικού παγιδεύει κάθε χονδροβλάστη στο εσωτερικό της θεμέλιας ουσίας, διαχωρίζοντας έτσι τους χονδροβλάστες μεταξύ τους. Στη συνέχεια, κάθε χονδροβλάστη υφίσταται μια ή δυο περαιτέρω μιτωτικές διαιρέσεις για το σχηματισμό μιας μικρότερης ομάδας ώριμων κυττάρων που διαχωρίζονται από μικρή ποσότητα εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Τα ώριμα κύτταρα του χόνδρου – τα χονδροκύτταρα – διατηρούν την ακεραιότητα της διακυτταρικής θεμέλιας ουσίας.

Κατά την ολοκλήρωση της αύξησης, ο χόνδρος αποτελείται από χονδροκύτταρα εγκλωβισμένα σε μια μεγάλη ποσότητα εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας [8]. Στην περιφέρεια του ώριμου χόνδρου βρίσκεται μια ζώνη συμπυκνωμένου στηρικτικού ιστού που ονομάζεται περιχόνδριο και περιέχει χονδροβλάστες σε πιο πρώιμα στάδια διαφοροποίησης με δυναμική σχηματισμού χόνδρου. Η αύξηση του χόνδρου πραγματοποιείται διαμέσου του πολλαπλασιασμού των χονδροβλαστών εντός της θεμέλιας ουσίας και μέσω της ανάπτυξης νέων χονδροβλαστών από το περιχόνδριο (αποθετική αύξηση).

Το μεγαλύτερο μέρος του χόνδρου δεν περιέχει αγγεία κι επομένως η ανταλλαγή μεταβολιτών μεταξύ των χονδροκυττάρων και των ιστών που τα περιβάλλουν εξαρτάται από διάχυση ουσιών διαμέσου της αρνητικά φορτισμένης εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Αυτό περιορίζει το πάχος ανάπτυξης του χόνδρου, ενώ ταυτόχρονα διατηρεί τη βιωσιμότητα των κυττάρων στο εσωτερικό. Στις

περιοχές όπου ο χόνδρος είναι ιδιαίτερα παχύς, είναι απαραίτητη η μεταφορά μικρών αγγείων προς το κέντρο της μάζας του. Στα ώριμα θηλαστικά ο χόνδρος έχει περιορισμένη κατανομή, ενώ στα άωρα σχηματίζει ένα υποστήριγμα για το μεγαλύτερο μέρος του αναπτυσσόμενου οστέινου σκελετού (μοντέλο χόνδρου), από το οποίο θα αναπτυχθούν τα οστά μέσω των διαδικασιών οστεοποίησης [9, 10].

2.2. Χαρακτηριστικά του υαλοειδούς αρθρικού χόνδρου

Ο υαλοειδής χόνδρος εντοπίζεται στις περισσότερες επιφάνειες. Μετά τη σκελετική ωρίμανση συνίσταται από μικρά συσσωματώματα χονδροκυττάρων εγκλωβισμένων σε μια άμορφη εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Ο φυσιολογικός χόνδρος κυρίως αποτελείται από κολλαγόνο και πρωτεογλυκάνες. Το κολλαγόνο που εκφράζεται σε αυτόν – κυρίως ο τύπος II, αλλά και οι τύποι IX και XI – παρέχουν την ικανότητά του να αντέχει στις δυνάμεις εφελκυσμού, ενώ η πρωτεογλυκάνη αγγρική διατηρεί το νερό της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας [11]. Στα παρασκευάσματα υαλοειδούς χόνδρου παρατηρούνται τρεις ζώνες: η επιφανειακή, η ενδιάμεση και η βαθιά. (Εικόνα 3) Η τελευταία ακολουθείται από τον ασβεστοποιημένο χόνδρο – που παρέχει τη σύνδεση του χόνδρου με το υποχόνδριο οστό. Αυτές οι ζώνες διαφέρουν στην έκφραση συγκεκριμένων μορίων της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, ένζυμα και ρυθμιστικούς αυξητικούς παράγοντες, που είναι υπεύθυνα για την ακεραιότητα και τη λειτουργία του αρθρικού χόνδρου. Παρότι τα φυσιολογικά αρθρικά χονδροκύτταρα είναι μεταβολικά λιγότερο ενεργά από τα χονδροκύτταρα της αυξητικής πλάκας, έχουν παρατηρηθεί ομοιότητες στα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης στις ζώνες της αυξητικής πλάκας (του χόνδρου που σχηματίζεται κατά την ανάπτυξη) και τις αντίστοιχες στον ενήλικο χόνδρο.

Η επιφανειακή ζώνη του υγιούς αρθρικού χόνδρου περιέχει πεπλατυσμένα χονδροκύτταρα που περιβάλλονται από μια ειδικευμένη εξωκυττάρια θεμέλια ουσία πλούσια σε ινίδια κολλαγόνου και μικρές πλούσιες σε λευκίνη πρωτεογλυκάνες, τη διακοσμιτίνη και τη διγλυκάνη [12]. Επίσης περιέχει την μικρότερη ποσότητα της κύριας πρωτεογλυκάνης του χόνδρου, της αγγρικής, συγκρινόμενη με τις άλλες ζώνες του αρθρικού χόνδρου. Τα χονδροκύτταρα της ζώνης αυτής δεν πολλαπλασιάζονται, αλλά παρουσιάζουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού, καθώς και την ικανότητα αναστολής του. Η έκφραση της MMP-3 είναι μεγαλύτερη από

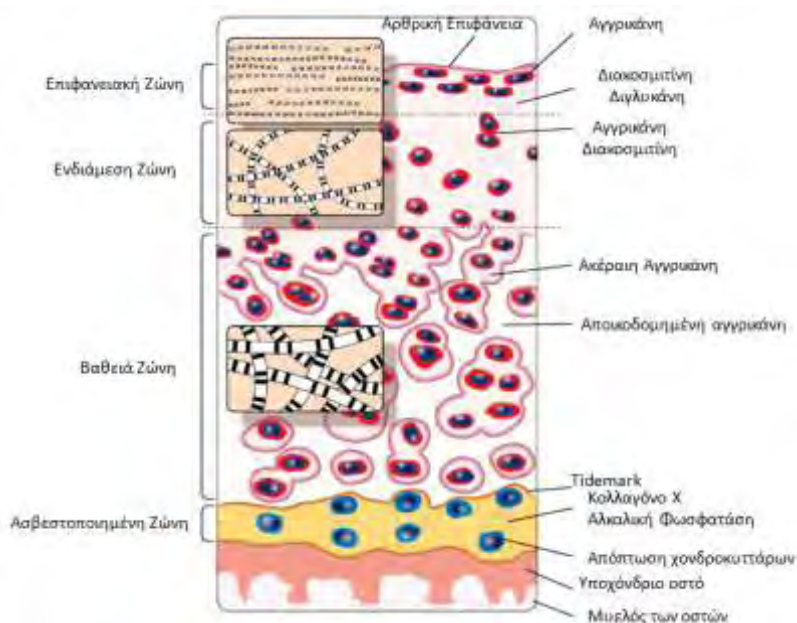
αυτή των MMP-1, -8, και -13 σε αυτή τη ζώνη. Ωστόσο αυτές οι μεταλλοπρωτεϊνάσες δεν οδηγούν σε αποικοδόμηση της θεμέλιας ουσίας αλλά πιθανά συμμετέχουν στην ανακύκλωσή της [13, 14]. Η επιφανειακή ζώνη περιέχει την υψηλότερη περιεκτικότητα σε ίνες κολλαγόνου μικρής διαμέτρου – περίπου 85% επί ξηρού βάρους – οι οποίες είναι προσανατολισμένες παράλληλα με την επιφάνεια της άρθρωσης, υποδεικνύοντας ότι η σημαντικότητα αυτής της ζώνης μπορεί κατά κύριο λόγο να έγκειται στην αντίσταση στο μηχανικό στρες [15, 16].

Τα χονδροκύτταρα της ενδιάμεσης ζώνης έχουν σφαιρικό σχήμα,

περιβάλλονται από μια εξωκυττάρια θεμέλια ουσία που αποτελείται από πυκνά ινίδια κολλαγόνου και είναι πλούσια σε αγγρικάνη. Τα χονδροκύτταρα αυτής της ζώνης δεν παρουσιάζουν δραστηριότητα πολλαπλασιασμού, ωστόσο αυτά τα κύτταρα είναι ικανά να πολλαπλασιαστούν,

παρόμοια με τα κύτταρα της επιφανειακής ζώνης. Το ποσοστό του κολλαγόνου μειώνεται σε κάθε ζώνη, συνεπώς στη ζώνη αυτή παρατηρείται μικρότερη περιεκτικότητα σε σύγκριση με την επιφανειακή [16].

Τα χονδροκύτταρα της βαθιάς ζώνης ομαδοποιούνται σε συσσωματώματα και μοιάζουν με τα υπερτροφικά χονδροκύτταρα της αυξητικής πλάκας. Σε αυτή τη ζώνη, ο αρθρικός χόνδρος διαθέτει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε αγγρικάνη [17], τις μικρότερες ποσότητες μικρών πλούσιων σε λευκίνες πρωτεογλυκανών [12], και τη μεγαλύτερη διάμετρο ινιδίων κολλαγόνου. Το τμήμα της βαθιάς ζώνης που βρίσκεται πλησιέστερα στο υποχόνδριο οστό, κι είναι μερικώς ασβεστοποιημένο, εκφράζει κολλαγόνο τύπου X, και είναι πλούσιο σε αλκαλική φωσφατάση. Τέλος, σε αυτή τη ζώνη έχει παρατηρηθεί μικρή αποπτωτική δραστηριότητα από τα χονδροκύτταρα [18, 19].



Εικόνα 3. Η οργάνωση του υαλοειδούς αρθρικού χόνδρου προσομοιάζει την οργάνωση της αυξητικής πλάκας.

Παρά την χαμηλή μεταβολική δραστηριότητα των χονδροκυττάρων και την περιορισμένη ανακύκλωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, ο υγιής αρθρικός χόνδρος διαθέτει μια ισχυρή μεταβολική δυναμική, η οποία ενεργοποιείται σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η οστεοαρθρίτιδα.

2.3. Οστεοαρθρίτιδα

Η οστεοαρθρίτιδα είναι η πιο συχνή μορφή αρθρίτιδας σε παγκόσμιο επίπεδο, που επηρεάζει όλο και περισσότερους ανθρώπους άνω των 65 ετών. Η υψηλή εμφάνιση, μαζί με το μεγάλο βαθμό αναπηρίας, καθιστά τη νόσο αυτή το επίκεντρο πολλών ερευνητικών μελετών. Στόχος είναι ο προσδιορισμός και η καλύτερη κατανόηση όλων των μηχανισμών που εμπλέκονται σε αυτή, και μακροπρόθεσμα η εύρεση θεραπευτικών στρατηγικών για την καθυστέρηση της προόδου της κι εν τέλει η αναχαίτισή της.

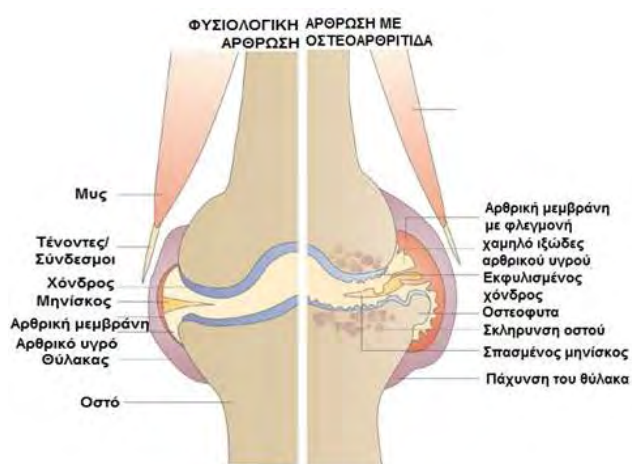
Η οστεοαρθρίτιδα διακρίνεται σε πρωτοπαθή και δευτεροπαθή, κι αποτελεί ένα πολυπαραγοντικό νόσημα. Επιδημιολογικά, ενώ προσβάλλει τουλάχιστον το μισό πληθυσμό άνω των 65 ετών, εμφανίζεται και σε νεότερα άτομα μετά από τραυματισμό της άρθρωσης. Το ποσοστό αυτό αυξάνεται αναλογικά με την παχυσαρκία και τη γήρανση του πληθυσμού [20, 21]. Πληθώρα μελετών έχουν αναδείξει τη επιρροή της ηλικίας, της παχυσαρκίας, του φύλου, της φυλής, καθώς και της γενετικής προδιάθεσης ως παράγοντες κινδύνου της εμφάνισης και της εξέλιξης της οστεοαρθρίτιδας [22].

Οι κλινικές εκδηλώσεις της οστεοαρθρίτιδας στην πλειονότητα των περιστατικών περιλαμβάνουν αρθρικό πόνο, ευαισθησία, ακαμψία και μερικές φορές τοπική φλεγμονή. Οι ασθενείς σε μεγάλο βαθμό υποφέρουν από πόνο και αναπηρία μετά από σημαντική απώλεια του χόνδρου. Προς το παρόν δεν διατίθενται θεραπευτικές αγωγές για την οστεοαρθρίτιδα, και οι υπάρχουσες προσεγγίσεις αφορούν στον έλεγχο του συμπτωματικού πόνου και των φλεγμονωδών αντιδράσεων μέσω αναλγητικών, μη-στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων και φυσιοθεραπείας, καθώς και αντικατάσταση της άρθρωσης με αρθροπλαστική σε προχωρημένα στάδια της νόσου [23].

Η οστεοαρθρίτιδα είναι το κλινικό και παθολογικό αποτέλεσμα μιας σειράς διαταραχών που οδηγεί σε δομικό και λειτουργικό εκφυλισμό των αρθρώσεων.

Ιστορικά, έχει χαρακτηριστεί ως κύρια διαταραχή του χόνδρου. Στην οστεοαρθρίτιδα, μια ποικιλία πιθανών παραγόντων (κληρονομικοί, αναπτυξιακοί, μεταβολικοί, και μηχανικοί) μπορεί να ξεκινήσουν τις διαδικασίες που οδηγούν σε απώλεια του χόνδρου. Αν και παρατηρείται απώλεια των συστατικών των αρθρικών ιστών, υπάρχει επίσης παραγωγή νέου ιστού, συμπεριλαμβανομένου του ινώδους χόνδρου. Ιδιαίτερα στα πρώτα στάδια της νόσου, έχουν εντοπιστεί προσπάθειες για την ανάπλαση του χόνδρου, γεγονός που αποδεικνύεται από την αυξημένη σύνθεση πρωτεογλυκανών από τα χονδροκύτταρα. Οι αλλαγές αυτές συνοδεύονται από ανάπλαση των υπόλοιπων ιστών της άρθρωσης [24]. (Εικόνα 4)

Στα αρχικά στάδια της οστεοαρθρίτιδας η επιφάνεια του χόνδρου διατηρεί την ακεραιότητά της, ωστόσο, μπορεί να παρατηρηθεί ο σχηματισμός σχισμών στην επιφανειακή ζώνη του αρθρικού χόνδρου και τοπικό οίδημα. Με την πρόοδο της νόσου, η διάσπαση της αρθρικής επιφάνειας προχωρά σε βαθύτερα στρώματα με επέκταση των



Εικόνα 4. Η οστεοαρθρίτιδα επηρεάζει τους ιστούς ολόκληρης της άρθρωσης.

σχισμών στο υποχόνδριο οστό, κατακερματισμό του χόνδρου με απελευθέρωση των θραυσμάτων μέσα στην άρθρωση, αποσύνθεση της θεμέλιας ουσίας των χονδροκυττάρων και, τελικά πλήρη εξαφάνιση του χόνδρου και αποκάλυψη του οστού. Παράλληλα παρατηρείται εισχώρηση τριχοειδών αγγείων στον ασβεστοποιημένο χόνδρο. Στα πρώιμα στάδια της νόσου η θεμέλια ουσία του χόνδρου υφίσταται σημαντική αύξηση της περιεκτικότητάς της σε νερό και μείωση σε πρωτεογλυκάνες. Επίσης, στις θέσεις πρόσφυσης του αρθρικού θύλακα έχει παρατηρηθεί ο σχηματισμός οστεόφυτων, οστέινων δομών που συμβάλλουν στον περιορισμό της κινητικότητας της άρθρωσης. Τα οστεόφυτα θεωρείται ότι σχηματίζονται ως απόκριση στον εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου, μέσω του μηχανισμού σχηματισμού νέου οστού. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός του σχηματισμού τους δεν είναι απόλυτα κατανοητός. Συνοψίζοντας, το οίδημα του αρθρικού χόνδρου, η δημιουργία μαρμαρυγών και η διάβρωση, η πύκνωση του υποχόνδριου οστού, η παραμόρφωση της αρθρικής επιφάνειας και ο σχηματισμός

οστεοφύτων, η υπερπλασία των ενδοθηλιακών κυττάρων και η ίνωση του αρθρικού υμένα, όλα αποτελούν ιστολογικά χαρακτηριστικά της οστεοαρθρίτιδας [25].

Σε κυτταρικό επίπεδο οι ζώνες του χόνδρου είναι ορατές και φαινομενικά ακέραιες. Στα αρχικά στάδια της οστεοαρθρίτιδας, τα χονδροκύτταρα αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται και να σχηματίζουν πολυκυτταρικά συσσωματώματα. Πέρα από την πολλαπλασιαστική τους δραστηριότητα, τα χονδροκύτταρα καθίστανται και μεταβολικά δραστήρια απελευθερώνοντας διαφορές κυτταροκίνες και μεταλλοπρωτεΐνες που συμβάλλουν στην αποικοδόμηση της θεμέλιας ουσίας, με αποτέλεσμα σε μεταγενέστερα στάδια οι σχισμές να επεκτείνονται στο υποχόνδριο οστό και τα θραύσματα του αποικοδομημένου χόνδρου να απελευθερώνονται στην αρθρική κοιλότητα. Επιπλέον, αρχίζουν να παράγουν δείκτες υπερτροφίας, που υπό φυσιολογικές συνθήκες εκφράζονται μόνο στα τελικά διαφοροποιημένα υπερτροφικά χονδροκύτταρα που φυσιολογικά εντοπίζονται στο χόνδρο των αυξητικών πλακών. Στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα έχει παρουσιαστεί συνεπώς η έκφραση της αλκαλικής φωσφατάσης και του κολλαγόνου τύπου X [26]. Επιπροσθέτως, τα χονδροκύτταρα του οστεοαρθρικού χόνδρου εκφράζουν υψηλά επίπεδα της μεταλλοπρωτεΐνης 13 (MMP-13), της ισχυρής κολλαγενάσης που αποικοδομεί το κολλαγόνο τύπου II [27, 28]. Εν τέλει, με την πρόοδο της νόσου και την επέκταση των σχισμών η επιφανειακή ζώνη χάνεται.

Κατά γενική ομολογία, υπάρχει η πεποίθηση ότι η οστεοαρθρίτιδα χαρακτηρίζεται από δύο φάσεις τουλάχιστον κατά τα αρχικά στάδια της νόσου: μία φάση βιοσύνθεσης, κατά την οποία τα χονδροκύτταρα προσπαθούν να αποκαταστήσουν την κατεστραμμένη εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, και μια φάση αποικοδόμησης, στην οποία η δράση των ενζύμων που παράγονται από τα χονδροκύτταρα αποικοδομεί τη θεμέλια ουσία. Συνεπώς, τα κύτταρα του χόνδρου κατά την έναρξη της οστεοαρθρίτιδας δεν είναι μεταβολικά αδρανή, αλλά συνθέτουν ενεργά πρωτεΐνες του χόνδρου – δομικά και λειτουργικά μακρομόρια, καθώς και ένζυμα αποικοδόμησης – ενώ οι περιοχές κυτταρικής αδράνειας είναι περιφερειακές. Μόνο στα όψιμα στάδια της οστεοαρθρίτιδας η σύνθεση των μορίων της θεμέλιας ουσίας περιορίζεται με αποτέλεσμα η αναβολική δραστηριότητα να μην είναι πλέον σε θέση να συμβαδίσει με την καταβολική. Αναπόφευκτο αποτέλεσμα αυτής της ανισορροπίας είναι ο εκφυλισμός του αρθρικού χόνδρου [29].

Όπως προαναφέρθηκε, τα φυσιολογικά χονδροκύτταρα των ενηλίκων διαθέτουν ένα φαινότυπο που χαρακτηρίζεται κυρίως από την έκφραση γονιδίων που

κωδικοποιούν μόρια της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας ή τους ρυθμιστές τους, όπως κολλαγόνο τύπου II και αγγρικάνη. Τα μόρια αυτά είναι αποτέλεσμα της αναβολικής δραστηριότητας του χόνδρου και της συντήρησης της θεμέλιας ουσίας των κυττάρων του [30, 31]. Η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία του χόνδρου αποτελείται από μεγάλα σύμπλοκα πρωτεογλυκανών και υαλουρονικού, ενσωματωμένα σε ένα τρισδιάστατο δίκτυο ινιδίων κολλαγόνου. Αυτά τα ινίδια συντίθενται από διαφορετικούς τύπους κολλαγόνου, μεταξύ των οποίων και οι τύποι II, XI και μερικές φορές IX [32, 33]. Αλλαγές στη θεμέλια ουσία των χονδροκυττάρων, όπως η μείωση της περιεκτικότητάς της σε πρωτεογλυκάνες και η αποσταθεροποίηση του κολλαγονικού δικτύου οδηγεί σε πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων και μερική απώλεια του αρθρικού φαινοτύπου, υπογραμμίζοντας έτσι τη σημαντικότητα της αλληλεπίδρασης μεταξύ χονδροκυττάρων και εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας [34]. Η ισορροπία μεταξύ της αναβολικής και καταβολικής δραστηριότητας που συμβάλλει στην ομοιοστάση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας διαταράσσεται στην οστεοαρθρίτιδα και συχνά σχετίζεται με την αλλαγή του φαινοτύπου των χονδροκυττάρων και/ή την ενισχυμένη απόπτωση. Με αυτό τον τρόπο, ο αρθρικός χόνδρος αποτελεί την ίδια στιγμή την πηγή και το στόχο σηματοδοτικών μονοπατιών που επάγονται από διάφορους παράγοντες [35-39]. Εν τέλει, έχειδειχτεί ότι οι αλλαγές στην οστεοαρθρίτιδα που σχετίζονται με τη σύνθεση του χόνδρου και το χονδροκυτταρικό φαινότυπο συνήθως συνοδεύονται από την ασβεστοποίηση του χόνδρου [40]. Τόσο η υπερτροφική διαφοροποίηση όσο και η ασβεστοποίηση της θεμέλιας ουσίας αποτελούν γεγονότα που συμβαίνουν φυσιολογικά κατά την επιμήκη αύξηση των οστών μέσω της ενδοχόνδριας οστεοποίησης στην αυξητική πλάκα. Συνεπώς, η παρατήρηση των ομοιοτήτων και η κατανόηση των υποκείμενων μηχανισμών που λαμβάνουν χώρα και στις δυο καταστάσεις, καθώς επίσης και το αν οι αλληλεπιδράσεις με την ECM επηρεάζουν αυτές τις διαδικασίες είναι πιθανό να ρίξουν νέο φως στην αντιμετώπιση της νόσου.

2.4. Η καλσιτονίνη

Η καλσιτονίνη, μια πεπτιδική ορμόνη 32 αμινοξέων που εκκρίνεται από τα παραφολιδωτά C κύτταρα του θυροειδούς αδένου, ταυτοποιήθηκε αρχικά βάσει της υπασβεσταιμικής δράσης της [41], η οποία προκύπτει από τις επιδράσεις της στο

οστό και στους νεφρούς. Η CT συντίθενται σε μια μεγάλη ποικιλία οργανισμών, από τους μονοκύτταρους οργανισμούς έως τα θηλαστικά.

Οι κύρια δομή της καλσιτονίνης έχει καθοριστεί σε οχτώ είδη: τον άνθρωπο, τα βοοειδή, το χοίρο, το πρόβατο, τον αρουραίο, το κοτόπουλο, το σολομό και το χέλι. Τα έξι πρώτα κατάλοιπα της N-τελικής επικράτειας είναι συντηρημένα, με ένα δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ κυστεϊνών Cys¹ και Cys⁷, σχηματίζοντας μια χαρακτηριστική δομή δαχτυλιδιού. Η Gly²⁸ και μια C-τελική ομάδα προλινών είναι επίσης παρούσα σε όλα τα είδη. Στις κεντρικές περιοχές τα πεπτίδια ποικίλουν, αν και υπάρχει μεγάλος βαθμός ταύτισης μεταξύ δυο ή τριών ειδών. Έτσι, η καλσιτονίνη του ανθρώπου και του αρουραίου είναι ταυτόσημες στις θέσεις 16 και 26, του χελιού διαφέρει από του σολομού και του κοτόπουλου κατά τρία και δυο κατάλοιπα αντίστοιχα, και των βοοειδών, του προβάτου και του χοίρου εμφανίζουν μεγάλη συγγένεια. Αυτές οι δομικές διαφορές διαθέτουν λειτουργική σημασία, επειδή οι σχετικές συγγένειες των διαφορετικών CT και των υποδοχέων τους (CTR), όπως καθορίζονται από την άμεση πρόσδεση και την κυτταρική απόκριση, διαφέρουν τουλάχιστον κατά 10%, με την CT του σολομού να προσδέεται με μεγαλύτερη συγγένεια από αυτή των θηλαστικών στους υποδοχείς όλων των ειδών, ανεξάρτητα από τον αν το μόριο και ο υποδοχέας ανήκουν στο ίδιο είδος [42, 43].

Στα θηλαστικά, οι κύριοι ιστοί-στόχοι της CT είναι το οστό και οι νεφροί, όπου μειώνει τις συγκεντρώσεις του ασβεστίου του ορού αναστέλλοντας την απορρόφηση του οστού από τους οστεοκλάστες και την επαναρρόφηση του ασβεστίου από τους νεφρούς, αντίστοιχα. Στους νεφρούς ρυθμίζει, επίσης, τη μεταφορά άλλων ιόντων και ύδατος, διαθέτοντας ισχυρή νατριουρητική δράση [44-47]. Η CT επηρεάζει και το κεντρικό νευρικό σύστημα, όπου επάγει την αναλγησία, την έκκριση γαστρικού οξέος και την αναστολή της όρεξης [48]. Τέλος, χρησιμοποιείται θεραπευτικά για την αντιμετώπιση μιας ποικιλίας διαταραχών, συμπεριλαμβανομένης της υπερασβεσταιμίας και της αυξημένης οστικής απορρόφησης, όπως η υπερασβεσταιμία στην κακοήθεια, η οστεοπόρωση και η νόσος του Paget, ενώ χρησιμοποιείται και για τις αναλγητικές της ιδιότητες.

Η υποασβεσταιμική επίδραση της CT οφείλεται κυρίως στην ανασταλτική της δράση στην απορρόφηση του οστού από τους οστεοκλάστες, σε συνδυασμό με την αυξημένη έκκριση Ca²⁺ από τους νεφρούς. Στο οστό, οι ενεργοποιημένοι οστεοκλάστες στεγανοποιούν μια οστική επιφάνεια κι εκκρίνουν οξύ, καθώς και μια ποικιλία όξινων υδρολασών στην προκύπτουσα επιφάνεια μεταξύ των κυττάρων και

του οστού μέσω μιας ειξειδικευμένης εγκολπωμένης υμενικής δομής που περιέχει μια ποσότητα πρωτεϊνών χαρακτηριστικών του ενδοσωμικού/λυσωμικού μονοπατιού. Η χορήγηση καλσιτονίνης επάγει την γρήγορη εσωτερίκευση των πρωτεϊνών αυτών σε μικρά κυστίδια, εμποδίζοντας την έκκριση οξέων, και την επακόλουθη ασβεστοποίηση της οστικής θεμέλιας ουσίας. Σε απομονωμένους οστεοκλάστες, η καλσιτονίνη προκαλεί μειωμένη κινητικότητα των οστεοκλαστών και αναίρεση της συνήθους εκτεταμένης μορφολογίας τους, και, πιθανά ως αποτέλεσμα των δυο αυτών δράσεων, αναστέλλει την οστική απορρόφηση [49, 50].

Στους νεφρούς, η καλσιτονίνη αυξάνει την έκκριση νατρίου, χλωρίου, καλίου, ασβεστίου και φωσφορικού και διεγείρει την ροή των ούρων, καθώς επίσης επηρεάζει και το μεταβολισμό της βιταμίνης D [51]. Η νατριουρητική δράση της καλσιτονίνης αποδίδεται κυρίως στην αναστολή της επαναρρόφησης του νατρίου στο εγγύ σωληνάριο [52], και τις μεταβολές της μεταφοράς του φωσφορικού και του μεταβολισμού της βιταμίνης D [53, 54]. Αντιθέτως, μελέτες σε απομονωμένους νεφρώνες ανθρώπων και αρουραίων αποδείχτηκε ότι η καλσιτονίνη ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση [55-57].

Παρότι οι πρώτες έρευνες πάνω στη μεταγωγή σήματος της καλσιτονίνης επικεντρώθηκαν στην αδενυλική κυκλάση, είναι πλέον σαφές ότι οι CTR ενεργοποιούν διαφορετικά ανεξάρτητα σηματοδοτικά μονοπάτια. Ο CTR ενεργοποιεί τη σηματοδότηση πολλαπλών μονοπατιών G πρωτεϊνών [58, 59].

2.5. Ο υποδοχέας της καλσιτονίνης

Ο υποδοχέας της καλσιτονίνης (calcitonin receptor - CTR) κλωνοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1991 [59]. Το γονίδιο που τον κωδικοποιεί, *CALCR*, εντοπίζεται στη θέση 7q21.3. Η αλληλουχία του πρωτεϊνικού του προϊόντος είναι ομόλογη με αυτή των υποδοχέων που ενεργοποιούν πρωτεΐνες G (G-protein coupled receptors – GPCR) τάξης II, μια ομάδα που περιλαμβάνει μια πληθώρα υποδοχέων που προσδένουν ρυθμιστικά πεπτίδια. Οι CTR εκφράζονται στα κύτταρα διαφόρων ιστών και οργάνων, όπως στα οστά (οστεοκλάστες), στους νεφρούς, στον εγκέφαλο, στους πνεύμονες, στον πλακούντα, στο μαστικό αδένα, στις ωοθήκες, στο μυελό των οστών και στα λεμφοκύτταρα [60-64]. Μελέτες έχουν δείξει ότι η πρόσδεση της καλσιτονίνης στον CTR ενεργοποιεί το μονοπάτι αδενυλικής

κυκλάσης/cAMP/πρωτεϊνικής κυκλάσης A και της φωσφολιπάσης C [81]. Επιπλέον, έχει δειχτεί μέσω φωσφορυλίωσης σε κατάλοιπα τυροσίνης, ενεργοποιούν τη μεταγωγή σήματος σε καθοδικούς τελεστές η MAPK και η φωσφολιπάση D [60, 61, 65].

Το cDNA που κωδικοποιεί για τον υποδοχέα της καλσιτονίνης στον άνθρωπο (H-CTR) περιγράφηκε για πρώτη φορά σε καρκινικές κυτταρικές σειρές των ωοθηκών [66]. Το κλωνοποιημένο cDNA περιέχει δυο περιοχές έναρξης της μεταγραφής και είναι πιθανό να κωδικοποιεί για δυο πεπτίδια μεγέθους 508 ή 490 αμινοξέων. Επιπλέον, όσο αφορά τη δομή και τη λειτουργία του υποδοχέα έχουν χαρακτηριστεί ακόμη τρεις ισομορφές [67-71], οι οποίες μεταφράζονται από το εναλλακτικά ματισμένο mRNA. Εξαιτίας της απουσίας του κωδικονίου έναρξης του 5' άκρου, και στις τρεις ισομορφές λείπουν τα 18 αμινοξέα του N-τελικού άκρου από το πεπτίδιο των 508 αμινοξέων. Μια άλλη κοινή διαφορά προκύπτει από την αντικατάσταση μιας προλίνης από μια λευκίνη στην C-τελική περιοχή. Συνεπώς, οι δυο από τις ισομορφές διαφέρουν στην παρουσία (hCTR1) ή απουσία (hCTR2) 16 αμινοξέων στον πρώτο ενδοκυττάριο βρόχο και στις λειτουργικές τους ιδιότητες [68, 70, 71]. Και τα δυο πρωτεϊνικά προϊόντα μπορούν να ενεργοποιήσουν το μονοπάτι της αδενυλικής κυκλάσης, αλλά μόνο ο hCTR2 μπορεί επίσης να επάγει τη σηματοδότηση της φωσφολιπάσης C. Στην τρίτη γνωστή ισομορφή (hCTR3) απουσιάζουν όχι μόνο τα 16 αμινοξέα του πρώτου ενδοκυττάρου βρόχου, αλλά και 47 επιπλέον αμινοξέα της N-τελικής περιοχής [69]. Η απουσία της δεύτερης αλληλουχίας έχει βρεθεί να σχετίζεται με οποιαδήποτε αλλαγή μπορεί να παρατηρηθεί στη σηματοδότηση. Επίσης, έχει προταθεί η παραγωγή μιας ισομορφής που διαπερνά την μεμβράνη μια μόνο φορά (hCTR4), εξαιτίας της παρουσίας ενός κωδικονίου λήξης στην C-τελική περιοχή της πρώτης διαμεμβρανικής επικράτειας που οδηγεί σε πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης [71].

Τέλος, σε πιο πρόσφατη μελέτη απομονώθηκαν δυο νέες ισομορφές του υποδοχέα μεγέθους 290 και 274 αμινοξέων αντίστοιχα [72]. Και οι δυο φαίνεται να είναι μικρότερες σε μέγεθος από τις μέχρι τότε γνωστές ισομορφές, και να διαφέρουν μεταξύ τους από την παρουσία (hCTR5) ή την απουσία (hCTR6) των 16 αμινοξέων του πρώτου ενδοκυττάρου βρόχου. Και οι δυο αυτές ισομορφές διαθέτουν μια νέα C-τελική αλληλουχία 7 αμινοξέων, ωστόσο τερματίζονται πρόωρα, γεγονός που προκύπτει από μια αλλαγή στο πλαίσιο ανάγνωσης που προκαλείται από παρουσία μιας άγνωστης αλληλουχίας 50 ζευγών βάσεων, μεταξύ των εξωνίων 9 και 10. Οι

hCTR5 και hCTR6 δεν διαθέτουν μια σειρά από επικράτειες σημαντικές για την ενεργοποίηση των καθοδικών σηματοδοτικών μονοπατιών. Και στα δυο πεπτιδία παρατηρήθηκε μια έλλειψη που εκτείνεται από την τέταρτη διαμεμβρανική επικράτεια ως την C-τελική ουρά. Η περιοχή αυτή εμφανίζεται να διαθέτει λειτουργικές ιδιότητες σε πολλά είδη. Στο λαγό η έλλειψη της έβδομης διαμεμβρανικής επικράτειας σχετίζεται με την ολοσχερή αναχαίτιση της ενδοκυττάριας σηματοδότησης του ασβεστίου [73]. Μελέτες στον χοίρο που χρησιμοποίησαν υποδοχείς χημικούς και τροποποιημένους έτσι ώστε να απουσιάζει ο τρίτος ενδοκυττάριος βρόχος και η C-τελικής ουρά ανέδειξαν ότι αυτές οι περιοχές περιέχουν επικράτειες ειδικές για την αλληλεπίδραση των υποδοχέων με G-πρωτεΐνες, και η αποκοπή τους προκαλεί αλλαγές στη μεταγωγή σήματος μέσω της αδενυλικής κυκλάσης και της φωσφολιπάσης C, και στην ενδοκυττάρωση του υποδοχέα [74, 75].

Η μελέτη της έκφρασης και της επίδρασης του υποδοχέα της καλσιτονίνης έλαβε χώρα αρχικά σε μοντέλα ζώων χειρουργικά επαγόμενης αστάθειας λόγω της ταχείας και ομοιόμορφης εμφάνισης της νόσου. Ένα καλά καθιερωμένο μοντέλο είναι το μοντέλο σκύλων και επίμυων με ACLT (anterior cruciate ligament transection), που βασίζεται στην αστάθεια του γονάτου εξαιτίας της ανάπτυξης οστεοαρθρικών μαρμαρυγών που μιμούνται τις συνέπειες του τραυματισμού στον άνθρωπο [76]. Τα χαρακτηριστικά μακροσκοπικά ευρήματα περιλαμβάνουν την εμφάνιση οστεοφύτων και την έλκωση του χόνδρου, ενώ μικροσκοπικά ο χόνδρος αποδομείται και παρατηρείται υπέρμετρος κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Πρόσφατα, σε μοντέλα σκύλων ACLT η καλσιτονίνη παρουσίασε αναστροφή της εξέλιξης των αρθρικών μαρμαρυγών [77]. Συνεπώς, είναι πιθανό ότι η αναστολή του καταβολισμού του υποχόνδριου οστού να αποτελεί το μηχανισμό θετικής επίδρασης της καλσιτονίνης στο χόνδρο. Πιο συγκεκριμένα, η άμεση επίδραση της καλσιτονίνης στο σχηματισμό του χόνδρου ανέδειξε ότι η καλσιτονίνη οδηγεί σε σημαντική αύξηση της σύνθεσης πρωτεογλυκανών [78, 79].

Ένα άλλο μοντέλο αφορά στην ανεπάρκεια οιστρογόνων που ακολουθούν την εμμηνόπαυση, κι έχει δείξει ότι σχετίζεται με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης και τη οξύτητα των συμπτωμάτων της οστεοαρθρίτιδας [80]. Αντιθέτως, η θεραπεία αντικατάστασης οιστρογόνων και ορμονών (ERT/HRT) θεωρείται ότι μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου σε γυναίκες κατά την εμμηνόπαυση, γεγονός που αποδεικνύουν οι αλλαγές που παρατηρούνται στα επίπεδα βιοχημικών δεικτών κατά

την ανακύκλωση των συστατικών στην εξωκυττάρια ουσία του χόνδρου [81, 82]. Τα επίπεδα των τμημάτων της αποικοδόμησης του κολλαγόνου τύπου II (CTX-II) εμφανίζονται διπλασιασμένα μετά την εμμηνόπαυση, ενώ η ορμονοθεραπεία σχετίζεται με την καταστολή των επιπέδων CTX-II στις ίδιες ηλικίες [83]. Μια πρόσφατη μελέτη σε πιθήκους ανέδειξε παθολογικές αλλαγές στις αρθρώσεις ζώων με ωοθηκεκτομή, οι οποίες ωστόσο προλαμβάνονται με τη χορήγηση οιστρογόνων [84]. Επιπλέον, η ωοθηκεκτομή επίμυων οδηγεί σε ανάπτυξη παθολογικών αλλαγών, παρόμοιες στη φύση τους με τις πρώιμες αλλαγές που παρατηρούνται στην οστεοαρθρίτιδα, μεταξύ των οποίων και ήπια διάβρωση του χόνδρου και απώλεια των πρωτεογλυκανών [85, 86]. Η ιστολογική εικόνα του αρθρικού χόνδρου γονάτου στα μοντέλα ωοθηκεκτομής διαφέρει από αυτήν μοντέλων όπως το ACLT. Οι αλλαγές στο χόνδρο του γονάτου που παρατηρούνται μετά από ωοθηκεκτομή είναι σχετικά ήπιες και είναι πιθανό να αντιπροσωπεύουν χαρακτηριστικά πρώιμης ή λιγότερο επιθετικής μορφής της πάθησης, γεγονός που είναι δύσκολο να ταυτοποιηθεί σε άλλα μοντέλα οστεοαρθρίτιδας. Συνεπώς, το μοντέλο αυτό είναι καταλληλότερο για την μελέτη των πρώιμων αλλαγών που παρατηρούνται στην νόσο.

Πρωτογενή ευρήματα σε κουνέλια, είτε μέσω χορήγησης κορτικοστεροειδών είτε εκτομής του μηνίσκου, έστρεψαν την προσοχή προς την υπόθεση ότι η καλσιτονίνη είναι πιθανό να αντιστρέφει την απώλεια του αρθρικού χόνδρου και στα μοντέλα με ανεπάρκεια σε οιστρογόνων [87, 88]. Στα μοντέλα αυτά η επίδραση της καλσιτονίνης εκτιμήθηκε με υπολογισμό των επιπέδων CTX-II. Η καλσιτονίνη ήταν ικανή να καταστείλει την απελευθέρωση CTX-II από τον αρθρικό χόνδρο. Σε αντίθεση με την απόλυτη καταστολή της παραγωγής CTX-II, ο CTX-I, ένας δείκτης της απορρόφησης του οστού από τους οστεοκλάστες, μειώθηκε μόνο κατά 50%. Αυτά τα ευρήματα αντανακλούν την παράλληλη επίδραση της καλσιτονίνης στην απορρόφηση του υποχόνδριου οστού και στα χονδροκύτταρα με συνέργεια για την πρόληψη της οστεοαρθρίτιδας [89].

Επιπλέον, η *in vivo* χορήγηση καλσιτονίνης σε αναπτυσσόμενους επίμυες είχε ως αποτέλεσμα την επαυξημένη επιμήκη ανάπτυξη του σκελετού, που υπό το φως της αντιαπορροφητικής της δράσης είναι κάτι πολύ ενδιαφέρον, αφού άλλες αντιαπορροφητικές ουσίες θα οδηγούσαν σε μείωση αντί για αύξηση στην επιμήκη ανάπτυξη, καθώς η λειτουργία των οστεοκλαστών είναι απαραίτητη κατά την ανάπτυξη [90]. Αυτά τα στοιχεία υποδεικνύουν ότι ο ρόλος της καλσιτονίνης μπορεί

πράγματι να μην περιορίζεται αποκλειστικά στη ρύθμιση της λειτουργίας των οστεοκλαστών, αλλά να επεκτείνεται και στα χονδροκύτταρα [91].

Τα επίπεδα καλσιτονίνης στο πλάσμα είναι αυξημένα στα νεογνά και παραμένουν υψηλά κατά τα πρώτα χρόνια της ζωής τους [92, 93]. Τα υψηλά επίπεδα καλσιτονίνης βοηθούν την επιμήκυνση των μακρών οστών, που αναπτύσσονται μέσω της ενδοχόνδριας οστεοποίησης, κι εξαρτώνται από τη διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την ωρίμανση των χονδροκυττάρων σε υπερτροφικά. Η αύξηση αυτή στα επίπεδα της καλσιτονίνης του πλάσματος συμπίπτει με την υψηλή ανακύκλωση της εξωκυττάριας ουσίας του χόνδρου, γεγονός που εξηγεί τη διέγερση της επιμήκυνσης των οστών μετά από χορήγηση καλσιτονίνης σε νεαρούς αναπτυσσόμενους επίμυες που διαθέτουν μεγάλες αυξητικές πλάκες [94]. Τα δεδομένα που διατίθενται για την άμεση επίδραση της καλσιτονίνης έχουν εξαχθεί κυρίως από πειράματα σε χόνδρο, με χονδροκύτταρα ή εκφυτεύματα που απομονώθηκαν από την αυξητική πλάκα χονδροκυττάρων και υπερτροφικά χονδροκύτταρα [95-101]. Συνεπώς, η καλσιτονίνη διεγείρει το σχηματισμό του χόνδρου και την ωρίμανση, συνεισφέροντας επιπλέον στις επιδράσεις της καλσιτονίνης κατά την ενδοχόνδρια οστεοποίηση.

Ωστόσο, υπάρχουν μεγάλες διαφορές μεταξύ των χαρακτηριστικών των υπερτροφικών χονδροκυττάρων της αυξητικής πλάκας και των αρθρικών χονδροκυττάρων. Παρόλα αυτά, έχει δείχτει ότι η καλσιτονίνη διεγείρει με τρόπο δοσο-εξαρτώμενο τη σύνθεση των πρωτεογλυκανών και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό *in vitro*, σε απομονωμένα αρθρικά χονδροκύτταρα [102]. Σε εκφυτεύματα αρθρικού χόνδρου στον άνθρωπο, η καλσιτονίνη δείχτηκε ότι διεγείρει τη σύνθεση τόσο των πρωτεογλυκανών όσο και του κολλαγόνου τύπου II, καθώς επίσης αναστέλλει τη δράση των MMP [103]. Μελέτες διαφορετικών σηματοδοτικών μορίων που αυξάνουν τα επίπεδα του cAMP στα χονδροκύτταρα προκαλούν αύξηση της μεταγραφής της αγγικάνης [104]. Είναι, συνεπώς, λογικό να αναμένεται ότι και η καλσιτονίνη που επάγει την παραγωγή cAMP, ακολούθως θα οδηγεί και αυτή σε αυξημένη σύνθεση των μορίων της εξωκυττάριας ουσίας των χονδροκυττάρων.

Η επίδραση της καλσιτονίνης στην καταβολική δραστηριότητα των χονδροκυττάρων δεν έχει μελετηθεί διεξοδικά. Σε απομονωμένα χονδροκύτταρα η καλσιτονίνη εμποδίζει τη δράση των ενζύμων που αποικοδομούν το κολλαγόνο τύπου II [105]. Είναι πιθανό η μετρίαση αυτή να οφείλεται στην αναστολή της σηματοδότησης φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως ο TNF- α (Tumor Necrosis

Factor alpha), αν και δεν έχει ταυτοποιηθεί ο τρόπος με τον οποίο επιτυγχάνεται αυτό. Πιο πρόσφατα μελετήθηκε η άμεση επίδραση της καλσιτονίνης σε αρθρικά εκφυτεύματα, όπου εμπόδισε την επαγόμενη αποδόμηση του χόνδρου από τις φλεγμονώδεις κυτταροκίνες OSM (ογκοστατίνη M – oncostatin M) και TNF- α , αναστέλλοντας την έκφραση των MMP στα αρθρικά χονδροκύτταρα [106].

Ωστόσο, όσο αφορά στην έκφραση του CTR στα χονδροκύτταρα η βιβλιογραφία περιέχει αντιφατικές απόψεις. Οι Lin et al. χρησιμοποίησαν καλλιέργειες πρωτογενών χονδροκυττάρων κι έδειξαν ότι ο υποδοχέας της καλσιτονίνης δεν εκφράζεται στα χονδροκύτταρα, με ανοσοϊστοχημεία και υπολογίζοντας τις αλλαγές στα επίπεδα cAMP και έκφρασης του κολαγόνου τύπου II, της αγγικάνης και των MMP-1, -3 και -13 [107]. Έτσι, πρότειναν ότι ο προστατευτικός ρόλος της καλσιτονίνης στο χόνδρο είναι έμμεση και να προκύπτει από το υποχόνδριο οστό και τους οστεοκλάστες. Αντίθετα, οι Sondergaard et al. απομόνωσαν οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα [106]. Ο τελευταίος σε προγενέστερες μελέτες είχε δείξει ότι η επίδραση με καλσιτονίνη σε αρθρικά χονδροκυττάρων οδηγεί σε σημαντικά αυξημένα επίπεδα cAMP, αναδεικνύοντας την έκφραση λειτουργικών υποδοχέων στα χονδροκύτταρα [103]. Επιπλέον, ο CTR εντοπίστηκε σε τομές οστεοαρθρικού χόνδρου *in situ*. Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και πιο πρόσφατα, όπου δείχτηκε ότι τα πρωτογενή χονδροκύτταρα εκφράζουν τον CTR, τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε μεταφραστικό επίπεδο με ποσοτική PCR και Western blotting, αντίστοιχα, ενώ με γονοτύπηση βρέθηκε ότι εκφράζουν την ισομορφή 2 του υποδοχέα. [108].

2.6. Μελέτες συσχέτισης στο γονίδιο του υποδοχέα της καλσιτονίνης

Μεταξύ των παραγόντων κινδύνου για την εμφάνιση της οστεοαρθρίτιδας, έχει αναγνωριστεί μέσα από επιδημιολογικές μελέτες και η γενετική βάση της νόσου [109]. Οι μελέτες γενετικής σύνδεσης οικογενειών που ακολούθησαν ανέδειξαν ότι εμπλέκονται ευρείες γενετικές περιοχές. Οι αναλύσεις συσχέτισης σε ευρείας κλίμακας ομάδες ελέγχου-ασθενών βοήθησαν στη χαρτογράφηση των περιοχών αυτών και την ανάδειξη πολυμορφικών δεικτών. Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών, καθώς και των μελετών συσχέτισης όλου του γονιδιώματος (Genome Wide Association Studies – GWAS) έχουν συνεισφέρει σε μεγάλο βαθμό στην κατανόηση

της παθογένεσης αυτής της νόσου [110]. Τα τελευταία χρόνια έχει αναφερθεί ένας αριθμός υποψήφιων γονιδίων ως παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της οστεοαρθρίτιδας, τα οποία επιλέχθηκαν βάσει του γεγονότος ότι τα πρωτεϊνικά του προϊόντα ενέχονται στο σχηματισμό και το μεταβολισμό των αρθρώσεων. Τα αλληλόμορφα των γονιδίων αυτών συχνά εμφανίζουν διαφοροποιήσεις με βάση την εθνικότητα, γεγονός που αποδίδεται σε διαφορές στη συχνότητα των αλληλομόρφων, το γενετικό υπόβαθρο στο οποίο τα αλληλόμορφα λειτουργούν και/ή μη γενετικούς παράγοντες που ρυθμίζουν την επίδρασή τους.

Ένα από αυτά αποτελεί και το γονίδιο του υποδοχέα της καλσιτονίνης CALCR, στο οποίο έχουν εντοπιστεί αρκετοί πολυμορφισμοί. Σε μια μελέτη προ δεκαετίας που πραγματοποιήθηκε σε πληθυσμιακές ομάδες Καυκάσιων και Αφρο-Αμερικανών εντοπίστηκαν 11 πολυμορφισμοί [111]. Οι δυο πληθυσμοί παρουσιάζουν διαφορετικές συχνότητες στις ίδιες πολυμορφικές θέσεις (πίνακας 1). Από τους 11 πολυμορφισμούς οι 10 αφορούν σε αλλαγή ενός νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphism – SNP), δυο εκ των οποίων σε δυο κωδικές περιοχές του γονιδίου. Ο ένας εξ αυτών (CALCR 162A→G) αφορά σε μια σιωπηλή μετάλλαξη στο κωδικόνιο που κωδικοποιεί για την λυσίνη 54. Οι υπόλοιποι πολυμορφισμοί της μελέτης αυτής δεν έχουν μελετηθεί ιδιαίτερα, αν και είναι γενικώς αποδεκτό ότι οι πολυμορφισμοί που βρίσκονται σε μη κωδικές περιοχές είναι πιθανό να σχετίζονται με την εμφάνιση νοσημάτων. Ένας επιπλέον πολυμορφισμός που αναγνωρίζεται από το περιοριστικό ένζυμο TaqI έχει εντοπιστεί το γονίδιο CALCR. Ο πολυμορφισμός αυτός, και συνεπώς οι τρεις γονότυποι που προκύπτουν από την παρουσία ή απουσία του, έχει συσχετιστεί με την οστική πυκνότητα στο άνω μέρος του μηριαίου οστού [112]. Τέλος, έχει περιγραφεί ένας επαναλαμβανόμενος πολυμορφισμός δυο νουκλεοτιδίων (CA) στο γονίδιο του υποδοχέα της καλσιτονίνης [113]. Ο πολυμορφισμός αυτός έχει σχετιστεί με την οστική μάζα στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης.

Πίνακας 1

Πολυμορφισμοί του γονιδίου του υποδοχέα της καλσιτονίνης [111].

Πολυμορφισμοί	Αλλαγή αλληλίου	Θέση	MAF στους Καυκάσιους (%)	MAF στους Αφρο-Αμερικανούς (%)
CALCR-A(-108)G	A>G	5'UT	25	6,25
CALCR-A6(198)A7	A6>A7	5'UT	29,1	50
CALCR-T(-6)C	T>C	5'UT	41,7	60,4
CALCR-A162ntG	A>G	Σιωπηλή (Lys54Lys)	0	3,3
CALCR-AIVS3G	A>G	Ιντρόνιο 3	46,7	73,3
CALCR-TIVS4G	T>G	Ιντρόνιο 4	0	13,6
CALCR-(GTTT) ₃ IVS4(GTTT) _n	(GTTT) ₃ >(GTTT) _n	Ιντρόνιο 4	4 για το (GTTT) ₃	12,7 για το (GTTT) ₃
CALCR-GIVS7C	G>C	Ιντρόνιο 7	43,35	60
CALCR-T2IVS11T1	T2>T1	Ιντρόνιο 11	50	16,7
CALCR-CIVS12A	C>A	Ιντρόνιο 12	23,3	23,3
CALCR-T1340ntC	T>C	Leu447Pro	26,7	63,3

Οι Nakamura et al. [114] περιέγραψαν έναν πολυμορφισμό αντικατάστασης μιας βάσης θυμίνης (T) σε κυτοσίνη (C) στη θέση 1340 της ισομορφής 2 του ανθρώπινου cDNA του γονιδίου CALCR στον ιαπωνικό πληθυσμό (rs1801197), η οποία οδηγεί σε αλλαγή του αμινοξέος λευκίνη (Leu, CTG) σε προλίνη (Pro, CCG) στη θέση 447 της 4^{ης} ενδοκυττάριας περιοχής του 7διαμεμβρανικού υποδοχέα που κωδικοποιεί. Ο πολυμορφισμός αυτός αναγνωρίζεται από το ένζυμο περιορισμού Alu I, ενώ η παρουσία του αλληλομόρφου C έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της θέσης αναγνώρισης του ενζύμου. Το Alu I αναγνωρίζει την αλληλουχία AGCT. Παρουσία του αλληλομόρφου C. Η παραπάνω αλληλουχία μετατρέπεται σε AGCC με συνέπεια να μην αναγνωρίζεται από το περιοριστικό ένζυμο [112, 114, 115]. Ακολούθως αυτός ο πολυμορφισμός χρησιμοποιήθηκε ως γενετικός δείκτης για μια σειρά μελετών συσχέτισης όπως η οστεοπόρωση [116] και ο καρκίνος του μαστού [117]. Άλλες μεταγενέστερες εργασίες μελέτησαν την ισομορφή 1 του υποδοχέα, όπου ο παραπάνω πολυμορφισμός εντοπίζεται στη θέση 1377 του cDNA ή στο αμινοξύ 463.

Σε πολλές περιπτώσεις, μια και μόνο μετάλλαξη στο γονίδιο ενός υποδοχέα GPCR μπορεί να οδηγήσει σε νόσο. Συνεπώς, είναι πιθανό οι διαφορετικοί γονότυποι του παραπάνω πολυμορφισμού του γονιδίου CALCR (CC, CT, TT) να είναι υπεύθυνοι για την έκφραση υποδοχέων που να διαφέρουν ως προς την ενδοκυττάρια σηματοδότηση και τη βιολογική απόκριση που διεγείρουν [115]. Πράγματι, διάφορες μελέτες έχουν προσπαθήσει να δείξουν τη λειτουργική σημασία του C-τελικού άκρου

ρου CTR. Χιμαιρικοί υποδοχείς με σταδιακά αποκομμένο το C-τελικό άκρο παρουσίασαν περιορισμένη πρόσδεση της καλσιτονίνης στον υποδοχέα της σε νεφρικούς ινοβλάστες στο χοίρο [78]. Παράλληλα, μια ισομορφή του CTR, η οποία εκφράεται φυσιολογικά στους λαγούς και από την οποία απουσιάζει το εξώνιο 13, αποτυγχάνει να ενεργοποιήσει την ενδοκυττάρια σηματοδότηση του ασβεστίου [74]. Αντιθέτως, σε μια πρόσφατη μελέτη φαίνεται ότι η ύπαρξη λευκίνης ή προλίνης στη θέση 447 δεν επηρεάζει τη συγγένεια της καλσιτονίνης στον υποδοχέα. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς την ενεργοποίηση των καθοδικών σηματοδοτικών μορίων από τον υποδοχέα που να σχετίζονται με την παρουσία διαφορετικών αμινοξέων στη θέση αυτή [111].

Άλλες μελέτες σε ζώα αποπειράθηκαν να δείξουν τη λειτουργική σημασία του C-τελικού άκρου όσο αφορά την ενδοκυττάρωση του συμπλόκου καλσιτονίνης-υποδοχέα ή την μεταφορά του CTR στην κυτταρική επιφάνεια. Μια παλαιότερη μελέτη σε χοίρους έδειξε ότι η σταδιακή αποκοπή του C-τελικού άκρου οδηγεί σε μείωση της ενδοκυττάρωσης του υποδοχέα μετά την πρόσδεση της ορμόνης και την επακόλουθη παραγωγή cAMP [75]. Τέλος, η ισομορφή που εκφράζεται φυσιολογικά στους λαγούς παρουσίασε μειωμένη αποτελεσματικότητα στην μεταφορά του στην κυτταρική μεμβράνη και μείωση τόσο της παραγωγής cAMP όσο και της φωσφορυλίωσης των MAPK, Erk1/2 [118].

Τα ευρήματα συσχέτισης του πολυμορφισμού CALCR 1340T→C με την οστική πυκνότητα είναι αμφιλεγόμενα. Αρχικά, σε Καυκάσιους πληθυσμούς υπολογίστηκε ότι το συχνότερο αλληλόμορφο είναι το T, ενώ ο γονότυπος TT σχετίζεται με χαμηλή οστική πυκνότητα στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης σε μεταεμμηνοπαυστικό ιταλικό πληθυσμό [119]. Μια παρόμοια μελέτη στο Γαλλικό γυναικείο πληθυσμό, ανέδειξε ότι η οστική πυκνότητα στον αυχένα του μηριαίου ήταν υψηλότερη στα ετερόζυγα άτομα (CT) σε σύγκριση με τα ομόζυγα (TT και CC) [115].

Αντιθέτως, τα ευρήματα μιας νεότερης μελέτης στον ιταλικό γυναικείο πληθυσμό μετά την εμμηνόπαυση έδειξαν ότι οι χαμηλότερες τιμές της οστικής μάζας στην περιοχή της οσφυϊκής μοίρας της σπονδυλικής στήλης σχετίζονται με το γονότυπο CC. Επιπλέον, σε μια υποομάδα νεότερων γυναικών μετά την εμμηνόπαυση ο γονότυπος CC συσχετίστηκε με χαμηλή οστική πυκνότητα και στο ισχίο, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι γονότυποι του υποδοχέα της καλσιτονίνης φαίνεται να επηρεάζουν την επίτευξη των μέγιστων τιμών της οστικής μάζας

ανεξάρτητα από τους μηχανισμούς της οστικής απώλειας [120]. Τέλος, σε μια πιο πρόσφατη μελέτη σε ασιατικό γυναικείο πληθυσμό μετά την εμμηνόπαυση, δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού με την οστική πυκνότητα της οσφυϊκής μοίρας της σπονδυλικής στήλης [121].

Η συχνότητα των αλληλομόρφων στον πολυμορφισμό CALCR 1340T→C διαφέρει μεταξύ των πληθυσμών. Το αλληλόμορφο C φαίνεται να υπερτερεί σε συχνότητα στους Ασιατικούς πληθυσμούς [115] ενώ το T να υπερτερεί στους Καυκάσιους [115, 119, 120] (πίνακας 2). Επιπλέον, από πολλές μελέτες φαίνεται ότι οι γονότυποι που προκύπτουν από τον πολυμορφισμό αυτό, είναι πιθανό να σχετίζονται με διαφορές στο σωματικό βάρος [121, 122] και στον κίνδυνο εμφάνισης καταγμάτων [115]. Παράλληλα, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι είναι πιθανό οι διαφορετικοί γονότυποι του γονιδίου του υποδοχέα της καλσιτονίνης να εξηγούν τις διαφορές που παρατηρούνται στην ανταπόκριση διαφορετικών ασθενών, τόσο στην οστεοπόρωση όσο και στην οστεοαρθρίτιδα, στη θεραπεία με καλσιτονίνη [123].

Πίνακας 2

Η συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού CALCR 1340T→C σε διάφορους πληθυσμούς.

Πληθυσμός	Μέγεθος δείγματος	Αλληλόμορφα		Γονότυποι		
		T (%)	C (%)	TT (%)	CT (%)	CC (%)
Καυκάσιοι	176	272 (77,3)	80 (22,7)	104 (59,09)	64 (36,36)	8 (4,54)
Αφρο-αμερικανοί	86	87 (50,6)	85 (49,4)	23 (25,6)	41 (47,7)	22 (26,7)
Ασιάτες	20	5 (12,5)	35 (87,5)	0	5 (25)	15 (75)
Ισπανοί	50	46 (46)	54 (54)	10 (20)	26 (52)	14 (28)
Ιταλοί	307			112 (36,5)	136 (44,3)	59 (19,2)
Γάλλοι	215			105 (48,8)	96 (44,7)	14 (6,5)
Ιάπωνες	117			1 (0,9)	22 (18,8)	94 (80,3)

Σημαντικός είναι και ο ρόλος του πολυμορφισμού CALCR1340T→C σε συνδυασμό με άλλα γονίδια που μπορεί να ελέγχουν το μεταβολισμό του ασβεστίου, όπως ο υποδοχέας της βιταμίνης D (VDR) και ο οιστρογονικός υποδοχέας 1 (ER1). Έτσι, ο παθολογικός γονότυπος TT του CALCR σε συνδυασμό με τον παθολογικό γονότυπο BB του VDR έχει βρεθεί ότι εμφανίζει τάση για αύξηση της οστικής μάζας BMC των άνω άκρων σε άνδρες νεαρής ηλικίας στον ελληνικό πληθυσμό [124]. Τέλος, ο φυσιολογικός γονότυπος CC του CALCR και ο συνδυασμός των γονοτύπων CC του CALCR και CT του

ER1 φαίνεται να προστατεύουν έναντι της οστεοπόρωσης, σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση στον τουρκικό πληθυσμό [125].

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1. Συλλογή δειγμάτων

Συλλέχθηκε περιφερικό αίμα από 194 ασθενείς με πρωτοπαθή ΟΑ που είχαν υποβληθεί σε ολική αρθροπλαστική γόνατος. Εξαιρέθηκαν άτομα με ρευματοειδή αρθρίτιδα και άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, όπως χονδροδυσπλασία, μετατραυματική ΟΑ και σηπτική αρθρίτιδα. Από τους 194 ασθενείς οι 152 ήταν γυναίκες και οι 42 άνδρες. Υπολογίστηκαν οι ηλικίες (38-91) με μέσο όρο τα 68 έτη, και ο δείκτης μάζας σώματος (BMI – body mass index) με μέσο όρο 29,643. Η τιμή του K/L προσδιορίστηκε άνω του 2.

Επίσης, συλλέχθηκε περιφερικό αίμα από 208 υγιή άτομα που νοσηλεύτηκαν για χειρουργική αποκατάσταση καταγμάτων χωρίς να έχουν ιστορικό παθήσεων των αρθρώσεων. Από την ομάδα ελέγχου, οι 123 ήταν γυναίκες και οι 85 άνδρες. Υπολογίστηκε ο μέσος όρος των ηλικιών (28-90) στα 62 έτη και του BMI 25,674.

3.2. Απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα

Βασικό και πρωταρχικό βήμα για τη μελέτη των πολυμορφισμών αποτελεί η σωστή κι αποτελεσματική απομόνωση του DNA από τα κύτταρα του οργανισμού που μελετάμε. Το απομονωμένο DNA πρέπει να είναι ελεύθερο προσμίξεων και να μην κατακερματιστεί με μικρά τμήματα, ώστε να μπορεί να ενισχυθεί περαιτέρω με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και να αναλυθεί.

Στη συγκεκριμένη μελέτη η απομόνωση του DNA έγινε από ολικό αίμα με το QIAamp DNA Blood Mini kit της QIAGEN βάσει του πρωτοκόλλου που προτείνει ο παρασκευαστής:

1. Αρχικά, τοποθετούμε 20 μl πρωτεϊνάσης K στα σωληνάρια των 1,5 ml που θα χρησιμοποιήσουμε για την απομόνωση του DNA των δειγμάτων, για την πεπτιδική υδρόλυση και την αποδόμηση των πρωτεϊνών.

2. Προσθέτουμε 200 μl αίματος από κάθε δείγμα σε κάθε σωληνάριο των 1,5 ml και αραιώνουμε με 200 μl buffer AL. Ανακατεύουμε καλά με vortex (τα κύτταρα λύνονται σε υπότονο περιβάλλον) και τοποθετούμε τα δείγματα σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 56°C για 10 min.
3. Πραγματοποιούμε μια γρήγορη φυγοκέντρηση για μερικά δευτερόλεπτα για την απομάκρυνση τυχών σταγονιδίων στα τοιχώματα των σωληναρίων.
4. Ακολουθεί κατακρήμνιση με προσθήκη 200 μl απόλυτης αιθανόλης, καθώς και ανάδευση με vortex και γρήγορη φυγοκέντρηση.
5. Μεταφέρουμε το μίγμα σε QIAamp Spin Column (σωληνάριο συλλογής των 2 ml), και φυγοκεντρούμε στις 8000 rpm για 1 min. Στο τέλος της φυγοκέντρησης, απομακρύνουμε το παραπροϊόν του σωληναρίου συλλογής.
6. Αφού το μεταφέρουμε τη στήλη σε QIAamp Spin Column εκ νέου, προσθέτουμε 500μl buffer AW1 για το πρώτο ξέπλυμα του DNA και φυγοκεντρούμε στις 8000 rpm για 1 min. Απομακρύνουμε το παραπροϊόν του σωληναρίου συλλογής.
7. Μεταφέρουμε τη στήλη σε καθαρό QIAamp Spin Column, προσθέτουμε 500μl buffer AW2 για το δεύτερο ξέπλυμα του DNA και φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 4 min.
8. Για ακόμη μια φορά, μεταφέρουμε τη στήλη σε καθαρό QIAamp Spin Column και φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 1 min.
9. Τέλος, τοποθετούμε τη στήλη σε καθαρό σωληνάριο των 1,5 ml, προσθέτουμε νερό εκχύλισης και φυγοκεντρούμε στις 8000 rpm για 1 min, για να λάβουμε το καθαρό DNA.

3.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR)

Η PCR είναι μια μέθοδος για την *in vitro* κλωνοποίηση συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA, εκμεταλλεζόμενη ορισμένα χαρακτηριστικά του *in vivo* μηχανισμού αντιγραφής του DNA. Η μέθοδος αυτή διαθέτει εξαιρετική ευαισθησία κι επιτρέπει τη γρήγορη ανάλυση περιοχών που περιέχονται σε δείγματα χαμηλής συγκέντρωσης και μικρής ποσότητας.

Η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο μόριο DNA ως εκμαγείο για τη σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου, ενώ απαιτεί επίσης την παρουσία ενός

βραχέος τμήματος δίκλωνου DNA για την έναρξη της αντιγραφής. Το σημείο έναρξης μπορεί να καθοριστεί με τη χρήση ενός ολιγονουκλεοτιδικού εναρκτήριου μορίου (εκκινητή, primer) που συνδέεται με το μητρικό μόριο σε αυτό ακριβώς το σημείο. Ένα τυπικό πρωτόκολλο PCR περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους, ο καθένας εκ των οποίων επιτρέπει την επώαση των δειγμάτων σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες:

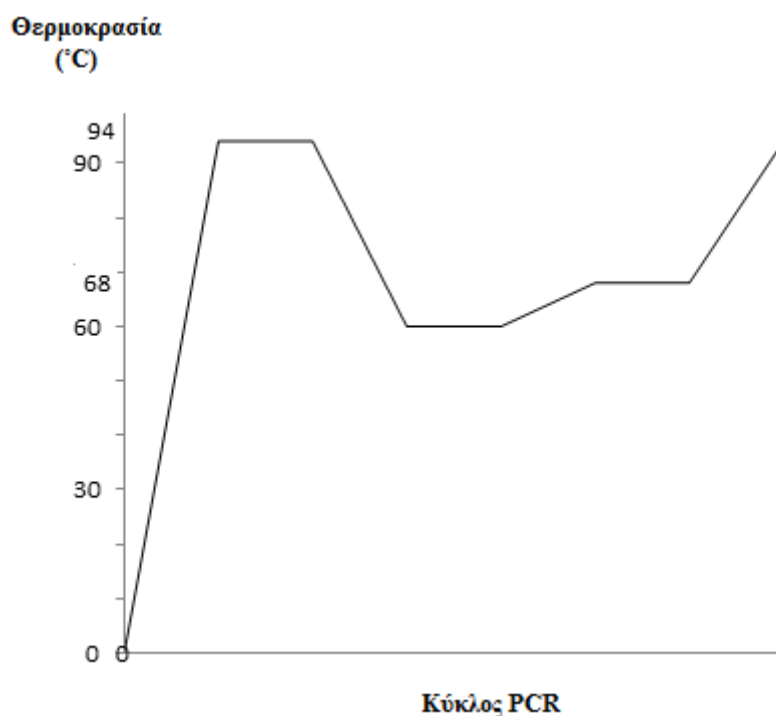
1. Θερμική αποδιάταξη του DNA-εκμαγείου
2. Υβριδοποίηση – σύζευξη των εκκινητών με τις συμπληρωματικές του αλληλουχίες στα μόρια του μητρικού μονόκλωνου DNA
3. Επιμήκυνση, όπου, παρουσία Taq DNA πολυμεράσης και dNTP, τα συμπληρωματικά νουκλεοτίδια ως προς το εκμαγείο προστίθενται στα 3' άκρα των εκκινητών. Η επιμήκυνση πραγματοποιείται πάντα προς την κατεύθυνση 5'→3'.

Όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα, η τεχνική της PCR περιλαμβάνει μια επαναλαμβανόμενη εναλλαγή μιας υψηλής θερμοκρασίας αποδιάταξης, μιας χαμηλής θερμοκρασίας υβριδισμού των εκκινητών με τη μητρική αλυσίδα DNA και μιας ενδιάμεσης θερμοκρασίας επιμήκυνσης (διάγραμμα 1).

Οι θερμικοί κυκλοποιητές (thermal cycler) αποτελούν συσκευές που επιτυγχάνουν την αυτοματοποιημένη εναλλαγή της θερμοκρασίας, σύμφωνα με το ρυθμισμένο πρόγραμμα. Η επιλογή της κατάλληλης θερμοκρασίας και του χρόνου σε κάθε στάδιό της καθορίζει και την ειδικότητα της αντίδρασης. Πιο συγκεκριμένα η θερμοκρασία αποδιάταξης εξαρτάται από το μήκος του DNA-στόχου και την περιεκτικότητα σε G+C. Ένα υπόστρωμα DNA πλούσιο σε G+C απαιτεί υψηλότερη θερμοκρασία αποδιάταξης, εξαιτίας του σχηματισμού 3 δεσμών υδρογόνου με τη συμπληρωματική τους βάση (σε αντίθεση με το ζεύγος βάσεων A-T που αναπτύσσονται 2 δεσμοί υδρογόνου).

Διάγραμμα 1

Εναλλαγή των θερμοκρασιών κατά τη διάρκεια ενός κύκλου PCR



Η επιλογή της κατάλληλης θερμοκρασίας υβριδισμού των εκκινητών εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους, το μήκος και την αλληλουχία των βάσεων τους. Η ιδανική θερμοκρασία υβριδισμού ρυθμίζεται γενικά 2-5°C χαμηλότερα από το σημείο τήξης (T_m) των εναρκτήριων ολιγονουκλεοτιδίων. Η αύξηση της θερμοκρασίας υβριδοποίησης αυξάνει την ειδικότητα του τελικού προϊόντος. Αυτό συμβαίνει επειδή επιτυγχάνεται ο περιορισμός της υβριδοποίησης των εκκινητών σε μη ειδικές περιοχές του DNA. Εάν η θερμοκρασία είναι χαμηλότερη από τη βέλτιστη, παρατηρείται η εμφάνιση παραπροϊόντων. Έχει αποδειχτεί ότι η θερμοκρασία τήξεως ενός τμήματος δίκλωνου DNA αποτελεί συνάρτηση της αλληλουχίας του μορίου και υπολογίζεται με βάση την περιεκτικότητά του σε πουρίνες και πυριμιδίνες ως εξής:

$$T_m = (4 \times \text{αριθμός βάσεων G+C}) + (2 \times \text{αριθμός βάσεων A+T})$$

Ο χρόνος επιμήκυνσης εξαρτάται από το μήκος και τη συγκέντρωση της αλληλουχίας-στόχου, καθώς και τη θερμοκρασία που χρησιμοποιείται για την επιμήκυνση. Ωστόσο, είναι απαραίτητο να λαμβάνουμε υπόψη και τη θερμοκρασία μέγιστης απόδοσης της Taq πολυμεράσης.

Μετά την απομόνωση του DNA ακολούθησε εφαρμογή της μεθόδου PCR, η οποία αποσκοπεί στην εκλεκτική παραγωγή εκατομμυρίων αντιγράφων ειδικών τμημάτων DNA και τελικά την ενίσχυση της περιοχής που μας ενδιαφέρει. Για τον πολλαπλασιασμό της υπό μελέτη περιοχής του γονιδίου του CTR (στο 13^ο εξόνιο) χρησιμοποιήθηκαν οι εξής δυο εκκινητές (primers):

Primer 1 (F)	5'-AGG TCC AAA CCA CCG TGA AG-3'
Primer 2 (R)	5'-GCA GTG GGA GAC TCC ATT CC-3'

*χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές της εταιρίας eurofins mwg operon.

Κατά τη διάρκεια της PCR αντίδρασης, ο primer 1 τοποθετείται στο 5' άκρο της περιοχής που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε και ο primer 2 στο 3' άκρο. Συγκεντρωτικά, τα συστατικά της PCR αντίδρασης παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3

Συστατικά της PCR του CTR

Αντιδραστήριο	Ποσότητα (μl)
DNA	3
5x PCR Buffer	5
Primer F(20pmol/μl)	0,5
Primer R(20pmol/μl)	0.5
dNTPs	0,5
Taq DNA polymerase (5000U/ml)	0,125
DdH ₂ O	14,375
Σύνολο	24

*όπου χρησιμοποιήθηκε OneTaqTM Hot Start DNA Polymerase και OneTaqTM Standard Reaction Buffer (5x) της εταιρίας New England BiolabsTM.

**η αρχική αραιώση των εκκινητών δίνονται από τον παρασκευαστή για τον Primer F 266 Vol για τα 100 pmol/ml και για τον Primer R 346 Vol για τα 100 pmol/ml.

Η PCR αντίδραση πραγματοποιείται σε ένα πρώτο στάδιο στους 94°C για 30 sec, ακολουθούμενο από 40 κύκλους σε θερμικό κυκλοποιητή. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει ένα στάδιο αποδιάταξης (30 sec στους 94°C), ένα στάδιο σύζευξης των εκκινητών με τη μητρική αλυσίδα (30 sec στους 60°C) και ένα τελικό στάδιο επιμήκυνσης των εκκινητών (60 sec στους 68°C). Μετά το τέλος των κύκλων ακολουθεί το στάδιο προέκτασης με στόχο τη σταθεροποίηση του προϊόντος της αντίδρασης (5 min στους 68°C) (πίνακας 4).

Πίνακας 4

Συνθήκες της PCR του CTR

Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	
94	30 sec	} → 40 κύκλοι
94	30 sec	
60	30 sec	
68	60 sec	
68	5 min	

*για τη θερμοκρασία υβριδισμού υπολογίστηκαν οι θερμοκρασίες τήξης των εκκινητών $T_m(F)=62^{\circ}C$ και $T_m(P)=64^{\circ}C$.

3.4. Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR

Η ηλεκτροφόρηση ορίζεται ως η μετακίνηση ενός φορτισμένου μορίου υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Περιγράφεται από τον τύπο:

$$v = E \times z / f$$

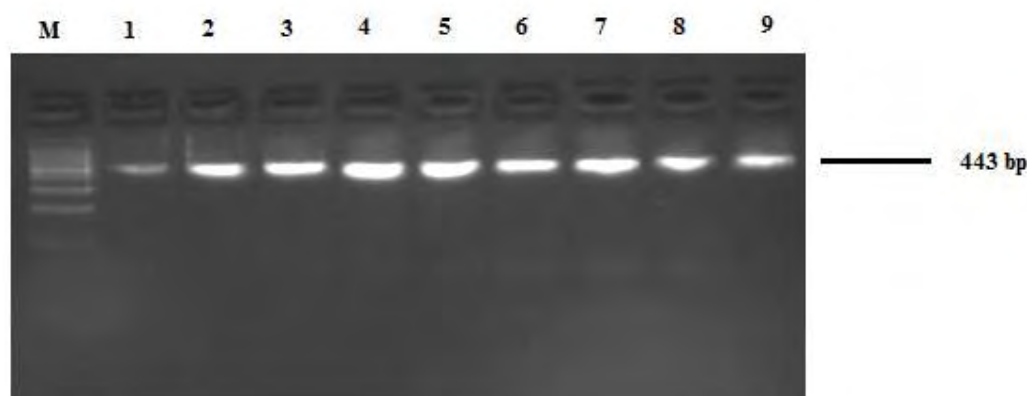
*όπου v είναι η ταχύτητα μετακίνησης κάθε μορίου, z το καθαρό φορτίο του μορίου, E η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου και f ο συντελεστής τριβής.

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των νουκλεϊκών οξέων με βάση το φορτίο και το μοριακό τους βάρος.

Η πηκτή αгарόζης παρασκευάζεται μέσω της αραιώσης αгарόζης στο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα μέχρις ότου αυτό γίνει τελείως διαυγές. Το

ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε είναι το Tris- Βορικό-EDTA (1×TBE). Στη συνέχεια, αφού προστεθεί ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου (5μl/ml), το διάλυμα τοποθετείται σε κατάλληλη συσκευή-εκμαγείο όπου και πήζει. Ακολουθεί ανάμιξη του δείγματος DNA με χρωστική. Στη συνέχεια, όταν εφαρμοστεί το ηλεκτρικό πεδίο κατά μήκος της πηκτής, το DNA κατευθύνεται προς την άνοδο. Αυτό οφείλεται στο αρνητικό φορτίο του DNA σε ουδέτερο pH, λόγω παρουσίας των φωσφορικών ομάδων. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης οι ζώνες του DNA γίνονται ορατές υπό υπεριώδη ακτινοβολία.

Στην παρούσα μελέτη, τα προϊόντα της PCR ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 3% παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου υπό σταθερή τάση 116 V (10 μl προϊόν PCR και 3μl χρωστική) κι έγιναν ορατά με υπεριώδη ακτινοβολία. Το μέγεθος του προϊόντος PCR ήταν το αναμενόμενο στα 443 bp.



Εικόνα 5. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR του CTR σε πηκτή αгарόζης 3%. Διαδρομή 1-9: προϊόντα της PCR, διαδρομή M: Marker

3.5. Πέψη με περιοριστικό ένζυμο

Τα ένζυμα περιορισμού αποτελούν ενδονουκλεάσες που κόβουν, κατά τρόπο καθορισμένο, το DNA, ανεξάρτητα από την προέλευσή του. Ο δεσμός που υδρολύουν οι ενδονουκλεάσες είναι ομοιοπολικός. Η κοινή ιδιότητα που χαρακτηρίζει όλα τα ένζυμα περιορισμού είναι ότι αναγνωρίζουν μια εξειδικευμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων στο DNA. Η δράση τους μετά την αναγνώριση αυτή εξαρτάται από τον τύπο του ενζύμου. Εδώ χρησιμοποιήσαμε ένζυμα τα οποία

αναγνωρίζουν την αλληλουχία-στόχο και πέπτουν το δίκλωνο μόριο DNA, και των οποίων η δράση εξαρτάται από την θερμοκρασία, τη σύσταση του διαλύματος επώασης και τη μοριακή σχέση του ενζύμου με το υπόστρωμα. Αν και οι ενδονουκλεάσες διαθέτουν εξειδίκευση έναντι των βάσεων που θα πέσουν, η εξειδίκευση αυτή μπορεί να μην είναι απόλυτη. Ένα άλλο αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό των ενζύμων αυτών είναι ότι οι αλληλουχίες που αναγνωρίζουν είναι παλίνδρομες.

Συνεπώς, το προϊόν της PCR του γονιδίου του CTR υποβλήθηκε σε πέψη από το ένζυμο περιορισμού *Alu I* (New England Biolabs), μέλος μιας ομάδας ενζύμων βακτηριακής προέλευσης που αναγνωρίζει και τέμνει ειδικές αλληλουχίες δίκλωνου DNA. Το ένζυμο *Alu I* αναγνωρίζει την αλληλουχία που παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 6. Αλληλουχία που αναγνωρίζει και πέπτει (μαύρα βέλη) το ένζυμο *Alu I*

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη παρουσιάζονται στον πίνακα 5 [125].

Πίνακας 5

Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη του προϊόντος της PCR του CTR

Αντιδραστήριο	Ποσότητα (μl)
Προϊόν PCR	10
Ένζυμο <i>Alu I</i> (10000 U/ml)	1
CutSmart™ Buffer 10x	2
ddH ₂ O	7
Τελικός όγκος	20

Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία 37°C για 16 ώρες.

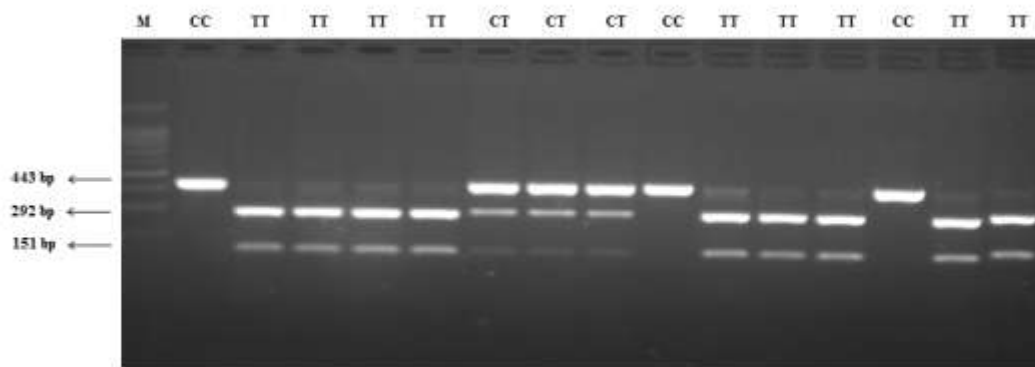
3.6. Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος πέψης

Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα της πέψης, καθώς και το μέγεθος των τμημάτων ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση ολόκληρης της ποσότητας του προϊόντος πέψης (20 μ l), σε πηκτή αγαρόζης 3% περιέχουσα βρωμιούχο αιθίδιο, υπό σταθερή τάση 116 V και ακολούθησε φωτογράφιση της πηκτής υπό υπεριώδη φωτισμό, όπου οι ζώνες του DNA φθορίζουν και γίνονται ορατές.

Με τη χρήση του περιοριστικού ενζύμου Alu I αναγνωρίστηκαν δυο αλληλόμορφα:

- Αλληλόμορφο 1 με νουκλεοτίδιο C στη θέση +1340 του γονιδίου, που κωδικοποιεί για προλίνη.
- Αλληλόμορφο 2 με νουκλεοτίδιο T στη θέση +1340 του γονιδίου, που κωδικοποιεί για λευκίνη.

Η παρουσία του αλληλομόρφου 2 κατόπιν της πέψεως, διαπιστώνεται από τη διάσπαση του κλωνοποιημένου, κατά την PCR, τμήματος DNA, μεγέθους 443 bp, σε δυο τμήματα, μεγέθους 292 bp και 151 bp. Αντιθέτως, η παρουσία του αλληλομόρφου 1 διαπιστώνεται από την απουσία διάσπασης. Συνεπώς, όταν μετά από πέψη εμφανίζονται δυο ζώνες, μεγέθους 292 bp και 151 bp, πρόκειται για ομοζυγωτία του αλληλομόρφου 2 (αλληλόμορφο T, γονότυπος TT). Όταν εμφανίζεται μια μόνο ζώνη μεγέθους 443 bp πρόκειται για ομοζυγωτία του αλληλομόρφου 1 (αλληλόμορφο C, γονότυπος CC). Τέλος, όταν εμφανίζονται τρεις ζώνες, μεγέθους 443 bp, 292 bp και 151 bp, πρόκειται για ετεροζυγωτία, δηλαδή παρουσία ενός αλληλομόρφου T κι ενός αλληλομόρφου C (γονότυπος CT) (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Παραδείγματα πολυμορφισμών του γονιδίου CTR σε πηκτή αгарόζης 3%.

3.7. Στατιστική ανάλυση

Η κατανομή των γονοτύπων, οι συχνότητες των αλληλομόρφων και η συσχέτισή τους με παράγοντες κινδύνου εμφάνισης της οστεοαρθρίτιδας, όπως η τιμή K/L, ο δείκτης μάζας σώματος και το φύλο υπολογίστηκαν εδώ με τη δοκιμή του χ^2 . Επιπλέον, στην απόκλιση της εξαρτημένης στατιστικής μεταβλητής (logistic regression analysis) συμπεριλήφθηκε και η επίδραση των παραγόντων που σχετίζονται με την οστεοαρθρίτιδα. Τους παράγοντες αυτούς αποτελούν το φύλο και ο BMI. Ο λόγος πιθανοτήτων (odds ratio - OR) και το διάστημα εμπιστοσύνης 95% (confidence interval - CI) υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τη δοκιμή Fisher όπου εκτιμήθηκε απαραίτητο. Το επίπεδο σημαντικότητας (probability - P) που υπολογίστηκε βασίστηκε σε δοκιμές σύγκρισης δυο ποσοστών, και οι τιμές χαμηλότερες ή ίσες του 0,05 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με χρήση του υπολογιστικού προγράμματος SPSS software (version 20.0).

4. Αποτελέσματα

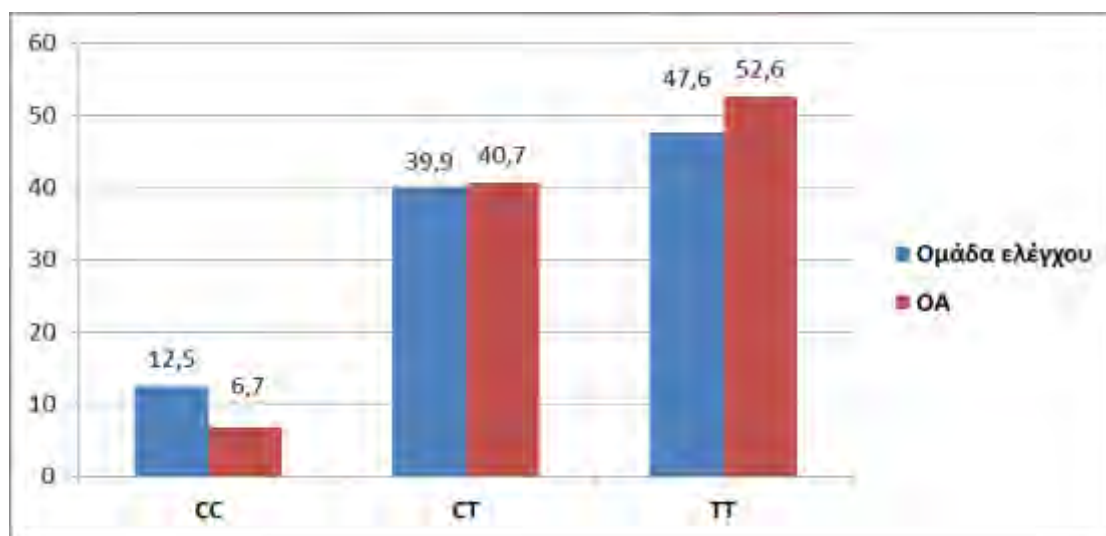
Στην παρούσα μελέτη, το δείγμα μας αποτέλεσαν 194 ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα, ηλικίας 38-91 ετών και 208 υγιή άτομα που νοσηλεύτηκαν για χειρουργική αποκατάσταση καταγμάτων, χωρίς να έχουν ιστορικό παθήσεων των αρθρώσεων, ηλικίας 28-90 ετών. Τα κριτήρια ένταξης και αποκλεισμού του πληθυσμού μας αναφέρθηκαν παραπάνω.

4.1. Κατανομή των γονοτύπων και των αλληλομόρφων του πολυμορφισμού CALCR 1340T→C στο δείγμα μας

Η ποσοστιαία κατανομή των τριών γονοτύπων του πολυμορφισμού CALCR 1340T→C (CC, CT και TT), απεικονίζεται στο διάγραμμα 2. Ο ετερόζυγος γονότυπος CT και ο ομόζυγος TT ήταν οι πιο συχνοί σε ποσοστό 39,9% και 47,6%, αντίστοιχα, ενώ πιο σπάνιος ήταν ο ομόζυγος γονότυπος για το αλληλόμορφο C με ποσοστό 12,5%. Σε απόλυτο αριθμό, τα άτομα γονότυπο TT αριθμούν 99, με CT 83 και με CC 26. Η συγκεκριμένη κατανομή είναι παρόμοια με την κατανομή στον γενικό Καυκάσιο πληθυσμό.

Διάγραμμα 2

Η ποσοστιαία εμφάνιση των γονοτύπων του πολυμορφισμού CALCR 1340T→C.



Οι συχνότητες των γονοτύπων και των αλληλομόρφων τόσο στην ομάδα ελέγχου όσο και στην ομάδα των ασθενών με οστεοαρθρίτιδα φαίνεται στον πίνακα 6. Το επίπεδο σημαντικότητας υπολογίστηκε $P=0,05$, με τη συχνότητα του γονοτύπου CC να εμφανίζεται στατιστικά αυξημένη στην ομάδα ελέγχου σε σύγκριση με την ομάδα των ασθενών. Ωστόσο, δεν παρουσιάζεται στατιστικά σημαντική διαφορά στον ετερόζυγο γονότυπο ή στο αλληλόμορφο C ($P>0,05$) μεταξύ των δυο πληθυσμών.

Πίνακας 6

Συχνότητες των γονοτύπων και των αλληλομόρφων στο δείγμα

rs1801197	Ομάδα ελέγχου N=208		ΟΑ N=194		P value	OR (95% CI)
	n	%	n	%		
Γονότυποι						
CC	26	12.5	13	6.7	0.05	0.503 (0.250-1.009)
CT	83	39.9	79	40.7	0.867	1.035 (0.694, 1.542)
TT	99	47.6	102	52.6		
	Ομάδα ελέγχου N=416		ΟΑ N=388			
Αλληλόμορφα	n	%	n	%	P value	OR (95% CI)
C	135	32.5	105	27.1	0.095	0.772 (0.570, 1.046)
T	281	67.5	283	72.9		

4.2. Σύγκριση της κατανομής του φύλου σε σχέση με τον πολυμορφισμό CALCR 1340T→C

Στη συνέχεια μελετήσαμε κατά πόσον οι συχνότητες των γονοτύπων και των αλληλομόρφων που παρατηρήσαμε επηρεάζονται από τους παράγοντες κινδύνου, συμβάλλοντας στην εμφάνιση ή μη της νόσου. Στο δείγμα μας, 123 εκ των 208 υγιών ατόμων και 152 εκ των ασθενών με οστεοαρθρίτιδα ήταν γυναίκες. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι δεν υπάρχει στο δείγμα μας στατιστικά σημαντική διαφορά στην κατανομή των γονοτύπων ή των αλληλομόρφων του δείγματός μας και της εμφάνισης

της νόσου μεταξύ των δυο φύλων ($P>0,05$). Οι συχνότητες των γονοτύπων και των αλληλομόρφων σε σχέση με το φύλο παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 7

Κατανομή των συχνοτήτων των γονοτύπων και των αλληλομόρφων σε σχέση με το φύλο

rs1801197	Ομάδα ελέγχου		ΟΑ		P value
	F(59,1%)	M(40,9%)	F(78,4%)	M(21,6%)	
Γονότυποι					
CC	16(13%)	10(11,8%)	9(5,6%)	4(9,5%)	0,951
CT	51(41,5%)	32(37,6%)	65(42,8%)	14(33,3%)	0,233
TT	56(45,5%)	43(50,6%)	78(51,3%)	24(57,1%)	
Σύνολο	123	85	152	42	
Αλληλόμορφα					
C	83(33,7%)	52(30,6%)	83(26,9%)	22(26,2%)	0,509
T	163(66,3%)	118(69,4%)	221(72,7%)	62(73,8%)	
Σύνολο	246	170	304	84	

4.3. Σύγκριση της κατανομή του δείκτη μάζας σώματος σε σχέση με τον πολυμορφισμό CALCR 1340T→C

Μελετήσαμε, επίσης, την επίδραση του δείκτη μάζας σώματος στην συσχέτιση των γονοτύπων και των αλληλομόρφων του πολυμορφισμού CALCR 1340T→C με την εμφάνιση της οστεοαρθρίτιδας. Στο δείγμα μας φαίνεται ότι οι τιμές του BMI στην ομάδα των ασθενών με οστεοαρθρίτιδα είναι μεγαλύτερες από αυτές της ομάδας των υγιών ατόμων, με μέσο όρο τιμών 29,643 και 25,674, αντίστοιχα. Από τον υπολογισμό του επιπέδου σημαντικότητας φαίνεται ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην κατανομή των γονοτύπων ή των αλληλομόρφων και της εμφάνισης της νόσου σε σχέση με το BMI. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 8.

Πίνακας 8

Κατανομή των συχνοτήτων των γονοτύπων και των αλληλομόρφων σε σχέση με το BMI

rs1801197	Ομάδα ελέγχου (N=208)				ΟΑ (N=176)				P value
	<18,5	(18,5,25]	(25,30]	>30	<18,5	(18,5,25]	(25,30]	>30	
Γονότυποι									
CC	1(50%)	7(0,8%)	16(15,7%)	2(9,5%)	0	2(9,1%)	3(4%)	5(6,3%)	0,223
CT	0	33(39,8%)	40(39,2%)	10(47,6%)	0	9(40,9%)	30(40%)	34(43%)	0,608
TT	1(50%)	43(51,8%)	46(45,1%)	9(42,9%)	0	11(50%)	42(56%)	40(50,6%)	
Σύνολο	2(0,1%)	83(39,9%)	102(49%)	21(10,1%)	0	22(12,5%)	75(42,6%)	79(44,9%)	
Αλληλόμορφα									
C	2(50%)	47(28,3%)	72(35,3%)	14(33,3%)	0	13(29,5%)	36(24%)	44(27,8%)	0,657
T	2(50%)	119(71,7%)	132(64,7%)	28(66,7%)	0	31(70,5%)	114(76%)	114(72,2%)	

4.4. Σύγκριση της σοβαρότητας της νόσου (K/L score) με την κατανομή των γονοτύπων του πολυμορφισμού CALCR 1340T→C

Στη συνέχεια μελετήσαμε κατά πόσον οι συχνότητες των γονοτύπων και των αλληλομόρφων που παρατηρήσαμε επηρεάζονται από το K/L score, που αποτελεί μέτρο αξιολόγησης της εξέλιξης της νόσου. Στο δείγμα μας, η συντριπτική πλειονότητα των περιστατικών με οστεοαρθρίτιδα παρουσίασαν όψιμη μορφή της νόσου (K/L>3). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το K/L score δεν επηρεάζεται από τους γονοτύπους ή τα αλληλόμορφα (P>0,05). Οι συχνότητες των γονοτύπων και των αλληλομόρφων σε σχέση με το K/L score παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 9

Κατανομή των συχνοτήτων των γονοτύπων και των αλληλομόρφων σε σχέση με το K/L score

rs1801197	OA (N=166)					
Γονότυποι	1(0,06%)	2(0,1%)	3(9,6%)	4(88,6%)	Σύνολο	P value
CC	0	0	1(6,3%)	9(6,1%)	10	0,701
CT	0	2(100%)	6(37,5%)	62(42,2%)	70	
TT	1(100%)	0	9(56,2%)	76(51,7%)	86	
Αλληλόμορφα	OA (N=332)					
C	0	2(50%)	8(25%)	80(27,2%)	90	0,598
T	2(100%)	2(50%)	24(75%)	214(72,8%)	242	

5. Συζήτηση

Παρότι είναι γενικά αποδεκτό ότι η γενετική προδιάθεση αποτελεί βασικό παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση της οστεοαρθρίτιδας, ο αντίκτυπος της αλληλεπίδρασης των γενετικών πολυμορφισμών και των περιβαλλοντικών παραγόντων στη νόσο αυτή δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Παράλληλα, ο ρόλος και το γενετικό αντίκτυπο των ασβεστοτρόπων ορμονών και των υποδοχέων τους, όπως ο υποδοχέας της καλσιτονίνης, στην οστεοαρθρίτιδα, σε συνδυασμό με την επίδραση επιβαρυντικών παραγόντων της νόσου, κρίνουν δικαιολογημένη κάθε αναζήτηση συσχέτισης μεταξύ συγκεκριμένων γονιδιακών πολυμορφισμών και ιδιαίτερων για τη νόσο χαρακτηριστικών.

Η υπόθεση της παρούσας μελέτης βασίζεται σε αυτό ακριβώς το σκεπτικό, και σκοπό της αποτελεί η τεκμηρίωση ή η απουσία της συνεισφοράς των γενετικών και υγειοδιαιτητικών παραγόντων στην εμφάνιση της οστεοαρθρίτιδας γονάτου στον ελληνικό πληθυσμό. Η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στον πολυμορφισμό Alu I του γονιδίου του υποδοχέα της καλσιτονίνης (CTR).

Η μελέτη μας αποτελεί την πρώτη απόπειρα συσχέτισης του πολυμορφισμού αυτού με την οστεοαρθρίτιδα γονάτου. Ωστόσο, συμφωνεί με τα ευρήματα προηγούμενων μελετών έκφρασης του υποδοχέα της καλσιτονίνης στα χονδροκύτταρα που έδειξαν ότι η επίδραση με καλσιτονίνη και η πρόσδεσή της στον υποδοχέα οδηγεί σε αύξηση του αναβολισμού του χόνδρου μέσω της αύξησης του cAMP και του μονοπατιού των MAPK [103-106]. Υπολογίζοντας με τη δοκιμή χ^2 τη στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς της συχνότητας των τριών γονοτύπων στο δείγμα μας, παρατηρήσαμε ότι ο σπάνιος γονότυπος CC εμφανίζεται στατιστικά σημαντικά αυξημένος στην ομάδα ελέγχου ($P=0,05$, $OR(CI)=0,503$). Συνεπώς, βάσει του γεγονότος αυτού, καθώς και της αναβολικής δράσης της καλσιτονίνης στο χόνδρο μπορούμε να συμπεράνουμε ότι ο γονότυπος CC διαθέτει προστατευτική δράση έναντι της οστεοαρθρίτιδας. Εν συνεχεία, θελήσαμε να μελετήσουμε αν υπάρχει στατιστική διαφορά της συχνότητας των αλληλομόρφων. Ωστόσο, η δοκιμή χ^2 έδειξε ότι δεν υπάρχει συσχέτιση του γονοτύπου C με την εμφάνιση της νόσου.

Είναι γενικά αποδεκτό ότι οι γενετικοί και οι περιβαλλοντολογικοί παράγοντες συνεισφέρουν σημαντικά στην εμφάνιση της νόσου. Το γυναικείο φύλο

έχει σχετιστεί με την οστεοαρθρίτιδα με τρόπο εξαρτώμενο της άρθρωσης. Σε μελέτες μετα-ανάλυσης δείχτηκε ότι ο ανδρικός πληθυσμός εμφανίζει μικρότερη πιθανότητα προσβολής από οστεοαρθρίτιδα γονάτου, ισχίου και χεριών σε σύγκριση με τον γυναικείο [126]. Τα δεδομένα της μελέτης μας συμφωνούν με το γεγονός αυτό, καθώς η ομάδα των ασθενών με οστεοαρθρίτιδα περιλαμβάνει γυναίκες σε ποσοστό 78,4% έναντι του ποσοστού 59,1% των γυναικών της ομάδας ελέγχου. Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη ο υπολογισμός της επίδρασης των γονοτύπων στην εμφάνιση της οστεοαρθρίτιδας δεν εμφανίστηκε να επηρεάζεται από το φύλο, αφού η διαφορά της κατανομής τόσο του γονοτύπου CC όσο και του αλληλομόρφου C μεταξύ των ομάδων δε ήταν στατιστικά σημαντική ($P=0,951$ και $0,509$ αντίστοιχα) σε σχέση με το φύλο.

Ο δείκτης μάζας σώματος επίσης αποτελεί βασικό παράγοντα κινδύνου της εμφάνισης της οστεοαρθρίτιδας. Μελέτες έχουν δείξει ότι η μείωση του BMI κατά 2 μονάδες μπορεί να ελαττώσει τον κίνδυνο εμφάνισης OA γονάτου κατά 50% [127], ενώ ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου φτάνει το 30% για τιμές BMI μικρότερες του 25, 47% για τιμές BMI μεταξύ 25-30, και 61% για τιμές μεγαλύτερες του 30 [128]. Στην παρούσα μελέτη παρότι ο μέσος όρος των τιμών BMI των δυο ομάδων φαίνεται να ανήκει στην κατηγορία 25-30, οι τιμές BMI της ομάδας των ασθενών με οστεοαρθρίτιδα εμφανίζονται μεγαλύτερες από αυτές της ομάδας των υγιών ατόμων με πάνω από το 85% των περιστατικών να ανήκουν στις κατηγορίες τιμών BMI άνω των 25 σε αντίθεση με τα υγιή άτομα. Παρά τις εκ πρώτης όψεως διαφορές που παρατηρούνται στην κατανομή των γονοτύπων, δεν εμφανίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά, γεγονός που υποδηλώνει ότι τόσο ο γονότυπος CC όσο και το αλληλόμορφο C δεν επηρεάζουν στατιστικά σημαντικά την εμφάνιση ή μη της νόσου, στο παρόν δείγμα.

Παρότι υπάρχουν πολλοί τρόποι για να ορίσουμε τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων της οστεοαρθρίτιδας, οι ορισμοί αυτοί είναι πάντοτε κλινικά σχετικοί. Το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο σύστημα ραδιογραφικού καθορισμού της νόσου στην άρθρωση του γονάτου αποτελεί ο βαθμός Kellgren-Lawrence (K/L score), που καθορίζει τη σοβαρότητα της νόσου βάσει της παρουσίας και του βαθμού οστεοφύτωσης, της βράχυνσης του αρθρικού διαστήματος (joint-space narrowing - JSN), της σκλήρωσης και του βαθμού παραμόρφωσης που είναι πιθανό να επηρεάζει την άρθρωση, ανεξάρτητα από τα κλινικά συμπτώματα [129]. Ο ραδιογραφικός

χαρακτηρισμός της οστεοαρθρίτιδας του γονάτου ορίζεται με τιμές K/L μεγαλύτερες του 2.

Τα δεδομένα της μελέτης μας συμφωνούν με το γεγονός αυτό, καθώς η ομάδα των ασθενών με οστεοαρθρίτιδα περιλαμβάνει άτομα με τιμές K/L μεγαλύτερες του 2, με την πλειονότητα των δειγμάτων να διαθέτουν K/L score ίσο με 4 (88,6%). Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη ο γονότυπος CC δεν εμφανίστηκε να επηρεάζει τη σοβαρότητα της νόσου βάσει του K/L score, μετά από εφαρμογή της δοκιμής χ^2 .

Η ανάλυση των δεδομένων δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στους τρεις γονοτύπους που προέκυψαν από τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό και των επιβαρυντικών παραμέτρων. Επιπλέον, δεν εντοπίστηκε καμιά στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των γονοτύπων και των αλληλομόρφων του πολυμορφισμού CALCR 1340T→C σε σχέση με την οστεοαρθρίτιδα. Η συνισταμένη των παραπάνω ευρημάτων υποδηλώνει ότι ο πολυμορφισμός CALCR 1340T→C δεν φαίνεται να επηρεάζει την εμφάνιση της οστεοαρθρίτιδας σε σχέση με τους επιβαρυντικούς παράγοντες τουλάχιστον σε αυτό των πληθυσμό.

6. Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, τα ευρήματά μας δείχνουν ότι το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον υποδοχέα της καλσιτονίνης, CALCR, σχετίζεται με την εμφάνιση της οστεοαρθρίτιδας σε έλληνες ασθενείς της Κεντρικής Ελλάδας. Το φυσιολογικό αλληλόμορφο του πολυμορφισμού CALCR T→C φαίνεται να παίζει προστατευτικό ρόλο έναντι της εμφάνισης της οστεοαρθρίτιδας, χωρίς, ωστόσο, να επηρεάζει τους επιμέρους παράγοντες κινδύνου σε σχέση με τη νόσο. Παρόλα αυτά, απαιτείται μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων για την τεκμηρίωση της συσχέτισης αυτής.

7. Βιβλιογραφία

- [1] Karsenty G, "The complexities of skeletal biology." *Nature*, 2003, 423(6937):316-318.
- [2] Wheaters R, "Λειτουργική Ιστολογία." 8^η έκδοση, Αθήνα, *Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης*, 2002, σελ. 271-302.
- [3] Mow VC, Ratcliffe A, Poole AR, "Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures." *Biomaterials*, 1992, 13(2):67-97.
- [4] Hui AY, McCarty WJ, Masuda K, Firestein GS, Sah RL, "A systems biology approach to synovial joint lubrication in health, injury, and disease." *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine*, 2012, 4(1):15-37.
- [5] Ropes MW, Rossmeisl EC, Bauer W, "The origin and nature of normal human synovial fluid." *The Journal of Clinical Investigation*, 1940, 19(6):795-799.
- [6] Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier JP, Roughley PJ, "Cartilage in normal and osteoarthritis conditions." *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 2008, 22(2):351–384.
- [7] Hall BK, Miyake T, "All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development." *BioEssays*, 2000, 22(2):138-147.
- [8] Archer CW, Francis-West P, "The chondrocyte." *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2003, 35(4):401-404.
- [9] Delise AM, Fischer L, Tuan RS, "Cellular interactions and signaling in cartilage development." *Osteoarthritis and Cartilage*, 2000, 8(5):309-334.
- [10] Goldring MB, "Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis." *Therapeutic advances in musculoskeletal disease*, 2012, 4(4):269-285.
- [11] Buckwalter JA, Mankin HJ, "Articular cartilage repair and transplantation," *Arthritis and Rheumatism*, 1998, 41(8):1331–1342.
- [12] Poole AR, Rosenberg LC, Reiner A, Ionescu M, Bogoch E, Roughley PJ, "Contents and distributions of the proteoglycans decorin and biglycan in normal and osteoarthritic human articular cartilage." *Journal of Orthopaedic Research*, 1996, 14(5):681–689.

- [13] Tetlow LC, Adlam DJ, Woolley DE, "Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes." *Arthritis and Rheumatism*, 2001, 44(3):585–594.
- [14] Wu W, Billingham RC, Pidoux I, Antoniou J, Zukor D, Tanzer M, Poole AR, "Sites of collagenase cleavage and denaturation of type II collagen in aging and osteoarthritic articular cartilage and their relationship to the distribution of matrix metalloproteinase 1 and matrix metalloproteinase 13," *Arthritis and Rheumatism*, 2002, 46(8):2087–2094.
- [15] Kempson GE, Muir H, Pollard C, Tuke M, "The tensile properties of the cartilage of human femoral condyles related to the content of collagen and glycosaminoglycans," *Biochimica et Biophysica Acta*, 1973, 297(2):456–472.
- [16] Bertrand J, Cromme C, Umlauf D, Frank S, Pap T, "Molecular mechanisms of cartilage remodelling in osteoarthritis." *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2010, 42(10):1594-1601.
- [17] Maroudas A, Bayliss MT, Venn MF, "Further studies on the composition of human femoral head cartilage." *Annals of the Rheumatic Diseases*, 1980, 39(5):514–523.
- [18] Aigner T, Hemmel M, Neureiter D, Gebhard PM, Zeiler G, Kirchner T, McKenna L, "Apoptotic cell death is not a widespread phenomenon in normal aging and osteoarthritic human articular knee cartilage: a study of proliferation, programmed cell death (apoptosis), and viability of chondrocytes in normal and osteoarthritic human knee cartilage." *Arthritis and Rheumatism*, 2001, 44(6):1304–1312.
- [19] Kuhn K, D’Lima DD, Hashimoto S, Lotz M, "Cell death in cartilage," *Osteoarthritis and Cartilage*, 2004, 12(1):1–16.
- [20] Blagojevic M, Jinks C, Jeffery A, Jordan KP, "Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: A systematic review and meta-analysis." *Osteoarthritis Cartilage*, 2010, 18(1):24-33.
- [21] Oliveria SA, Felson DT, Cirillo PA, Reed JI, Walker AM, "Body weight, body mass index, and incident symptomatic osteoarthritis of the hand, hip, and knee." *Epidemiology*, 1999, 10(2):161-166.

- [22] Suri P, Morgenroth DC, Hunter DJ, "Epidemiology of Osteoarthritis and Associated Comorbidities." *PM&R*, 2012, 4(5 Suppl):S10-19.
- [23] Ge Z, Hu Y, Heng BC, Yang Z, Ouyang H, Lee EH, Cao T, "Osteoarthritis and Therapy." *Arthritis and Rheumatism*, 2006, 55(3):493-500.
- [24] Sofat N, Ejindu V, Kiely P, "What makes osteoarthritis painful? The evidence for local and central pain processing." *Rheumatology*, vol.50, no.12, pp.2157-2165, 2011.
- [25] Pritzker KP, "Animal models for osteoarthritis: processes, problems and prospects." *Annals of the Rheumatic Diseases*, 1994, 53(6):406–420.
- [26] Aigner T, Reichenberger E, Bertling W, Kirsch T, Stoss H, von der MK, "Type X collagen expression in osteoarthritic and rheumatoid articular cartilage." *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1993, 63:205-211.
- [27] Wang X, Manner PA, Horner A, Shum L, Tuan RS, Nuckolls GH, "Regulation of MMP-13 expression by RUNX2 and FGF2 in osteoarthritic cartilage." *Osteoarthritis and Cartilage*, 2004, 12(12):963-973.
- [28] Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, Cloutier JM, Martel-Pelletier J, "The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis." *The Journal of Clinical Investigation*, 1996, 97(9):2011-2019.
- [29] Sandell LJ, Aigner T, "Articular cartilage and changes in arthritis, an introduction: Cell biology of osteoarthritis." *Arthritis Research*, 2001, 3(2):pp.107–113.
- [30] Zhao Q, Eberspaecher H, Lefebvre V, De Crombrughe B, "Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis." *Developmental Dynamics*, 1997, 209(4):377–386.
- [31] Goldring MB, "Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases." *Best Practice and Research. Clinical Rheumatology*, 2006, 20(5):1003–1025.
- [32] Muller-Glauser W, Humbel B, Glatt M, Strauli P, Winterhalter KH, Bruckner P, "On the role of type IX collagen in the extracellular matrix of cartilage: type IX collagen is localized to intersections of collagen fibrils." *The Journal of Cell Biology*, 1986, 102(5):1931–1939.

- [33] Hagg R, Bruckner P, Hedbom E, "Cartilage fibrils of mammals are biochemically heterogeneous: differential distribution of decorin and collagen IX." *The Journal of Cell Biology*, 1998, 142(1):285–294.
- [34] Aigner T, McKenna L, "Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage." *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2002, 59(1):5–18.
- [35] Chia SL, Sawaji Y, Burleigh A, McLean C, Inglis J, Saklatvala J, Vincent T, "Fibroblast growth factor 2 is an intrinsic chondroprotective agent that suppresses ADAMTS-5 and delays cartilage degradation in murine osteoarthritis." *Arthritis and Rheumatism*, 2009, 60(7):2019–2027.
- [36] Dell'Accio F, De Bari C, El Tawil NM, Barone F, Mitsiadis TA, O'Dowd J, Pitzalis C, "Activation of WNT and BMP signaling in adult human articular cartilage following mechanical injury." *Arthritis Research and Therapy*, 2006, 8(5):R139.
- [37] Luyten FP, Tylzanowski P, Lories RJ, "Wnt signaling and osteoarthritis." *Bone*, 2009, 44(4):522–527.
- [38] Lories RJ, Luyten FP, "Bone morphogenetic protein signaling in joint homeostasis and disease." *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 2005, 16(3):287–298.
- [39] Lories RJ, Derese I, Luyten FP, "Modulation of bone morphogenetic protein signaling inhibits the onset and progression of ankylosing enthesitis." *The Journal of Clinical Investigation*, 2005, 115(6):1571–1579.
- [40] Rutsch F, Terkeltaub R, "Parallels between arterial and cartilage calcification: what understanding artery calcification can teach us about chondrocalcinosis." *Current Opinion in Rheumatology*, 2003, 15(3):302–310.
- [41] Copp DH, Cameron EC, Cheney BA, Davidson AGF, Henze KG, "Evidence for calcitonin: a new hormone from the parathyroid that lowers blood calcium." *Endocrinology*, 1962, 70:638-49.
- [42] Breimer LH, MacIntyre I, Zaidi M, "Peptides from the calcitonin genes: molecular genetics, structure and function." *Biochem J*, 1988, 255(2):377–90.
- [43] Houssami S, Findlay DM, Brady CL, Martin TJ, Epand RM, Moore EE, Murayama E, Tamura T, Orłowski RC, Sexton PM, "Divergent structural requirements exist for calcitonin receptor binding specificity and adenylate cyclase activation." *Mol Pharmacol*, 1995, 47(4):798–809.

- [44] Ardaillou R, "Kidney and calcitonin." *Nephron*, 1975, 15(3-5):250-260.
- [45] Bijvoet OL, van der Sluys Veer J, de Vries HR, van Koppen AT, "Natriuretic effect of calcitonin in man." *N Engl J Med*, 1971, 284(13):681-8.
- [46] Bidet M, Taut M, Gastineau M, Poujeol P, "Effect of calcitonin on the regulation of intracellular pH in primary cultures of rabbit early distal tubule." *Pflugers Arch*, 1992, 421(6):523-9.
- [47] Di Stefano A, Wittner M, Nitschke R, Braitsch R, Greger R, Bailly C, Amiel C, Roinel N, de Rouffignac C, "Effects of parathyroid hormone and calcitonin on Na^+ , Cl^- , K^+ , Mg^{2+} and Ca^{2+} transport in cortical and medullary thick ascending limbs of mouse kidney." *Pflugers Arch*, 1990, 417(2):161-7.
- [48] Fischer JA, Born W, "Calcitonin gene products: evolution, expression and biological targets." *Bone Miner*, 1987, 2(5):347-59.
- [49] Zaidi M, Datta HK, Moonga BS, MacIntyre I, "Evidence that the action of calcitonin on rat osteoclasts is mediated by two G proteins acting via separate post-receptor pathways." *J Endocrinol*, 1990, 126(3):473-81.
- [50] Su Y, Chakraborty M, Nathanson M, Baron R, "Differential effects of the 3',5'-cyclic adenosine monophosphate and protein kinase C pathways on the response of isolated rat osteoclasts to calcitonin." *Endocrinology*, 1992, 131(3):1497-1502.
- [51] Seldin DW, Giebisch G, "The Kidney: Physiology and Pathophysiology." New York, Raven, 2nd edition, pp1339-72.
- [52] Andreoli TE, Hoffman JF, Fanestil DD, Schultz SG, "Physiology of Membrane Disorders." New York, Plenum, 2nd edition, 669-700.
- [53] Bemdt TJ, Knox FG, "Proximal tubule site of inhibition of phosphate reabsorption by calcitonin." *Am J Physiol*, 1984, 246(6 Pt 2):F927-30.
- [54] Kawashima H, Torikai S, Kurokawa K, "Calcitonin selectively stimulates 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase in proximal straight tubule of rat kidney." *Nature*, 1981, 291(5813):327-9.
- [55] Chabardes D, Imbert-Teboul M, Montégut M, Clique A, Morel F, "Distribution of calcitonin-sensitive adenylate cyclase activity along the rabbit kidney." *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976, 73(10):3608-12.

- [56] Chabardès D, Gagnan-Brunette M, Imbert-Teboul M, Gontcharevskaia O, Montégut M, Clique A, Morel F, "Adenylate cyclase responsiveness to hormones in various portions of the human nephron." *J Clin Invest*, 1980, 65(2):439-48.
- [57] Murphy E, Chamberlin M, Mandel LJ, "Effects of calcitonin on cytosolic Ca in a suspension of rabbit medullary thick ascending limb tubules." *Am J Physiol*, 1986, 251(4 Pt 1):C491-5.
- [58] Chakraborty M, Chatterjee D, Kellokumpu S, Rasmussen H, Baron R, "Cell cycle-dependent coupling of the calcitonin receptor to different G proteins." *Science*, 1991, 251(4997):1078-82.
- [59] Chakraborty M, Chatterjee D, Gorelick FS, Baron R, "Cell cycle-dependent and kinase-specific regulation of the apical Na/H exchanger and the Na,K-ATPase in the kidney cell line LLC-PK, by calcitonin". *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(6):2115-9.
- [60] Lin HY, Harris TL, Flannery MS, Aruffo A, Kaji EH, Gorn A, Kolakowski LF Jr, Yamin M, Lodish HF, Goldring SR, "Expression cloning and characterization of a porcine renal calcitonin receptor." *Trans Assoc Am Physicians*, 1991, 104:265-72.
- [61] Hilton JM, Downton M, Houssami S, Sexton PM, "Identification of key components in the irreversibility of salmon calcitonin binding to calcitonin receptors." *J Endocrinol*, 2000, 166(1):213-26.
- [62] Sexton PM, Findlay DM, Martin TJ, "Calcitonin." *Curr Med Chem*, 1999, 6(11):1067-93.
- [63] Nicholson GC, Moseley JM, Sexton PM, Mendelsohn FA, Martin TJ, "Abundant calcitonin receptors in isolated rat osteoclasts. Biochemical and autoradiographic characterization." *J Clin Invest*, 1986, 78(2):355-60.
- [64] Quinn JM, Morfis M, Lam MH, Elliott J, Kartsogiannis V, Williams ED, Gillespie MT, Martin TJ, Sexton PM, "Calcitonin receptor antibodies in the identification of osteoclasts." *Bone*, 1999, 25(1):1-8.
- [65] Poyner DR, Sexton PM, Marshall I, Smith DM, Quirion R, Born W, Muff R, Fischer JA, Foord SM, "International Union of Pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors." *Pharmacol Rev*, 2002, 54(2):233-46.

- [66] Chen Y, Shyu JF, Santhanagopal A, Inoue D, David JP, Dixon SJ, Horne WC, Baron R, "The calcitonin receptor stimulates Shc tyrosine phosphorylation and Erk1/2 activation. Involvement of Gi, protein kinase C, and calcium." *J Biol Chem*, 1998, 273(31):19809-16.
- [67] Gorn AH, Lin HY, Yamin M, Auron PE, Flannery MR, Tapp DR, Manning CA, Lodish HF, Krane SM, Goldring SR, "Cloning, characterization, and expression of a human calcitonin receptor from an ovarian carcinoma cell line." *J Clin Invest*, 1992, 90(5):1726-35.
- [68] Frendo JL, Pichaud F, Mourroux RD, Bouizar Z, Segond N, Moukhtar MS, Jullienne A, "An isoform of the human calcitonin receptor is expressed in TT cells and in medullary carcinoma of the thyroid." *FEBS Lett*, 1994, 342(2):214-6.
- [69] Kuestner RE, Elrod RD, Grant FJ, Hagen FS, Kuijper JL, Matthewes SL, O'Hara PJ, Sheppard PO, Stroop SD, Thompson DL, "Cloning and characterization of an abundant subtype of the human calcitonin receptor." *Mol Pharmacol*, 1994, 46(2):246-55.
- [70] Albrandt K, Brady EM, Moore CX, Mull E, Sierzega ME, Beaumont K, "Molecular cloning and functional expression of a third isoform of the human calcitonin receptor and partial characterization of the calcitonin receptor gene." *Endocrinology*, 1995, 136(12):5377-83.
- [71] Gorn AH, Rudolph SM, Flannery MR, Morton CC, Weremowicz S, Wang TZ, Krane SM, Goldring SR, "Expression of two human skeletal calcitonin receptor isoforms cloned from a giant cell tumor of bone." *J Clin Invest*, 1995, 95(6):2680-91.
- [72] Moore EE, Kuestner RE, Stroop SD, Grant FJ, Matthewes SL, Brady CL, Sexton PM, Findlay DM, "Functionally different isoforms of the human calcitonin receptor result from alternative splicing of the gene transcript." *Mol Endocrinol*, 1995, 9(8):959-68.
- [73] Beaudreuil J, Balasubramanian S, Chenais J, Taboulet J, Frenkian M, Orcel P, Jullienne A, Horne WC, de Vernejoul MC, Cressent M, "Molecular characterization of two novel isoforms of the human calcitonin receptor." *Gene*, 2004, 343(1):143-51.
- [74] Shyu JF, Inoue D, Baron R, Hornes WC, "The deletion of 14 amino acids in the seventh transmembrane domain of a naturally occurring calcitonin receptor

isoform alters ligand binding and selectively abolishes coupling to phospholipase C." *J Biol Chem*, 1996, 271(49):31127-34.

- [75] Findlay DM, Houssami S, Lin HY, Myers DE, Brady CL, Darcy PK, Ikeda K, Martin TJ, Sexton PM, "Truncation of the porcine calcitonin receptor cytoplasmic tail inhibits internalization and signal transduction but increases receptor affinity." *Mol Endocrinol*, 1994, 8(12):1691-700.
- [76] Orcel P, Tajima H, Murayama Y, Fujita T, Krane SM, Ogata E, Goldring SR, Nishimoto I, "Multiple domains interacting with Gs in the porcine calcitonin receptor." *Mol Endocrinol*, 2000, 14(1):170-82.
- [77] Marshall KW, Chan AD, "Bilateral canine model of osteoarthritis." *J Rheumatol*, 1996, 23(2):344-50.
- [78] Behets C, Williams JM, Chappard D, Devogelaer JP, Manicourt DH, "Effects of calcitonin on subchondral trabecular bone changes and on osteoarthritic cartilage lesions after acute anterior cruciate ligament deficiency." *J Bone Miner Res*, 2004, 19(11):1821-6.
- [79] Manicourt DH, Altman RD, Williams JM, Devogelaer JP, Druetz-Van Egeren A, Lenz ME, Pietryla D, Thonar EJ, "Treatment with calcitonin suppresses the responses of bone, cartilage, and synovium in the early stages of canine experimental osteoarthritis and significantly reduces the severity of the cartilage lesions." *Arthritis Rheum*, 1999, 42(6):1159-67.
- [80] El Hajjaji H, Williams JM, Devogelaer JP, Lenz ME, Thonar EJ, Manicourt DH, "Treatment with calcitonin prevents the net loss of collagen, hyaluronan and proteoglycan aggregates from cartilage in the early stages of canine experimental osteoarthritis." *Osteoarthritis Cartilage*, 2004, 12(11):904-11.
- [81] Wluka AE, Cicuttini FM, Spector TD, "Menopause, oestrogens and arthritis." *Maturitas*, 35(3):183-99, 2000.
- [82] Felson DT, Nevitt MC, "The effects of estrogen on osteoarthritis." *Curr Opin Rheumatol*, 10(3):269-72, 1998.
- [83] Nevitt MC, Felson DT, "Sex hormones and the risk of osteoarthritis in women: epidemiological evidence." *Ann Rheum Dis*, 55(9):673-6, 1996.
- [84] Mouritzen U, Christgau S, Lehmann HJ, Tankó LB, Christiansen C, "Cartilage turnover assessed with a newly developed assay measuring collagen type II

- degradation products: influence of age, sex, menopause, hormone replacement therapy, and body mass index." *Ann Rheum Dis*, 62(4):332-6, 2003.
- [85] Ham KD, Loeser RF, Lindgren BR, Carlson CS, "Effects of long-term estrogen replacement therapy on osteoarthritis severity in cynomolgus monkeys." *Arthritis Rheum*, 46(7):1956-64, 2002.
- [86] Walter H, Kawashima A, Nebelung W, Neumann W, Roessner A, "Immunohistochemical analysis of several proteolytic enzymes as parameters of cartilage degradation." *Pathol Res Pract*, 194(2):73-81, 1998.
- [87] Reginster JY, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Henrotin Y, "Osteoarthritis, Clinical and Experimental Aspects." Berlin: Springer-Verlag, 4-12, 1997.
- [88] Meunier PJ, Roux C, Seeman E, Ortolani S, Badurski JE, Spector TD, Cannata J, Balogh A, Lemmel EM, Pors-Nielsen S, Rizzoli R, Genant HK, Reginster JY, "The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis." *N Engl J Med*, 350(5):459-68, 2004.
- [89] Badurski JE, Schwamm W, Popko J, Zimnoch L, Rogowski F, Pawlica J, "Chondroprotective action of salmon calcitonin in experimental arthropathies." *Calcif Tissue Int*, 49(1):27-34, 1991.
- [90] Behets C, Williams JM, Chappard D, Devogelaer JP, Manicourt DH, "Effects of calcitonin on subchondral trabecular bone changes and on osteoarthritic cartilage lesions after acute anterior cruciate ligament deficiency." *J Bone Miner Res*, 19(11):1821-6, 2004.
- [91] Wallach S, Rousseau G, Martin L, Azria M, "Effects of calcitonin on animal and in vitro models of skeletal metabolism." *Bone*, 25(5):509-16, 1999.
- [92] Karsdal MA, Henriksen K, Sørensen MG, Gram J, Schaller S, Dziegiel MH, Heegaard AM, Christophersen P, Martin TJ, Christiansen C, Bollerslev J, "Acidification of the osteoclastic resorption compartment provides insight into the coupling of bone formation to bone resorption." *Am J Pathol*, 166(2):467-76, 2005.
- [93] Austin LA, Heath H 3rd, "Calcitonin: physiology and pathophysiology." *N Engl J Med*, 304(5):269-78, 1981.
- [94] Deftos LJ, First BP, "Calcitonin as a drug." *Ann Intern Med*, 95(2):192-7, 1981.

- [95] Khaldi L, Karachalios T, Galanos A, Lyritis GP, "Morphometric changes in the epiphyseal plate of the growing and young adult male rat after long-term salmon calcitonin administration." *Calcif Tissue Int*, 76(6):426-32, 2005.
- [96] Burch WM, "Calcitonin stimulates growth and maturation of embryonic chick pelvic cartilage in vitro." *Endocrinology*, 114(4):1196-202, 1984.
- [97] Burch WM, Corda G, "Calcitonin stimulates maturation of mammalian growth plate cartilage." *Endocrinology*, 116(5):1724-8, 1985.
- [98] Nishikawa T, Ishikawa H, Yamamoto S, Koshihara Y, "A novel calcitonin receptor gene in human osteoclasts from normal bone marrow." *FEBS Lett*, 458(3):409-14, 1999.
- [99] Ishikawa T, Nishigaki F, Christgau S, Noto T, Mo J, From N, Minoura K, Hirayama Y, Ohkubo Y, Mutoh S, "Cartilage destruction in collagen induced arthritis assessed with a new biochemical marker for collagen type II C-telopeptide fragments." *J Rheumatol*, 31(6):1174-9, 2004.
- [100] Ishikawa Y, Wu LN, Genge BR, Mwale F, Wuthier RE, "Effects of calcitonin and parathyroid hormone on calcification of primary cultures of chicken growth plate chondrocytes." *J Bone Miner Res*, 12(3):356-66, 1997.
- [101] Di Nino DL, Linsenmayer TF, "Positive regulation of endochondral cartilage growth by perichondrial and periosteal calcitonin." *Endocrinology*, 144(5):1979-83, 2003.
- [102] Franchimont P, Bassleer C, Henrotin Y, Gysen P, Bassleer R, "Effects of human and salmon calcitonin on human articular chondrocytes cultivated in clusters." *J Clin Endocrinol Metab*, 69(2):259-66, 1989.
- [103] Sondergaard BC, Wulf H, Henriksen K, Schaller S, Oestergaard S, Qvist P, Tankó LB, Bagger YZ, Christiansen C, Karsdal MA, "Calcitonin directly attenuates collagen Type II degradation by inhibition of MMP expression and activity in articular chondrocytes." *Osteoarthritis Cartilage*, 14(8):759-68, 2006.
- [104] Malemud CJ, Papay RS, Hering TM, "Forskolin stimulates aggrecan gene expression in cultured bovine chondrocytes." *Am J Ther*, 3(2):120-8, 1996.
- [105] Hellio MP, Peschard MJ, Cohen C, Richard M, Vignon E, "Calcitonin inhibits phospholipase A2 and collagenase activity of human osteoarthritic chondrocytes." *Osteoarthritis Cartilage*, 5(2):121-8, 1997.

- [106] Sondergaard BC, Madsen SH, Segovia-Silvestre T, Paulsen SJ, Christiansen T, Pedersen C, Bay-Jensen AC, Karsdal MA, "Investigation of the direct effects of salmon calcitonin on human osteoarthritic chondrocytes." *BMC Musculoskelet Disord*, 11:62, doi:10.1186/1471-2474-11-62, 2010.
- [107] Lin Z, Pavlos NJ, Cake MA, Wood DJ, Xu J, Zheng MH, "Evidence that human cartilage and chondrocytes do not express calcitonin receptor." *Osteoarthritis Cartilage*, 16(4):450–7, 2008.
- [108] Segovia-Silvestre T, Bonnefond C, Sondergaard BC, Christensen ST, Karsdal MA, Bay-Jensen AC, "Identification of the calcitonin receptor in osteoarthritic chondrocytes." *BMC Res Notes*, 4:407, doi: 10.1186/1756-0500-4-407, 2011.
- [109] Loughlin J, "Genome studies and linkage in primary osteoarthritis." *Rheum Dis Clin North Am*, 2002, 28(1):95-109.
- [110] Reynard LN, Loughlin J, "The genetics and functional analysis of primary osteoarthritis susceptibility." *Expert Rev Mol Med*, 2013, 18;15:e2, doi:10.1017/erm.2013.4.
- [111] Wolfe LA 3rd, Fling ME, Xue Z, Armour S, Kerner SA, Way J, Rimele T, Cox RF, "In vitro characterization of a human calcitonin receptor gene polymorphism." *Mutat Res*, 522(1-2):93-105, 2003.
- [112] Masi L, Becherini L, Colli E, Gennari L, Mansani R, Falchetti A, Becorpi AM, Cepollaro C, Gonnelli S, Tanini A, Brandi ML, "Polymorphisms of the calcitonin receptor gene are associated with bone mineral density in postmenopausal Italian women." *Biochem Biophys Res Commun*, 248(1):190-5, 1998.
- [113] Miyao M, Hosoi T, Emi M, Nakajima T, Inoue S, Hoshino S, Shiraki M, Orimo H, Ouchi Y, " Association of bone mineral density with a dinucleotide repeat polymorphism at the calcitonin (CT) locus." *J Hum Genet*, 45(6):346-50, 2000.
- [114] Nakamura M, Zhang Z, Shan L, Hisa T, Sasaki M, Tsukino R, Yokoi T, Kaname A, Kakudo K, "Allelic variants of human calcitonin receptor in the Japanese population." *Hum Genet*, 99(1):38–41, 1997.
- [115] Taboulet J, Frenkian M, Frenco JL, Feingold N, Jullienne A, de Vernejoul MC, "Calcitonin receptor polymorphism is associated with a decreased fracture risk in post-menopausal women." *Hum Mol Genet*, 7(13):2129-33, 1998.

- [116] Tsai FJ, Chen WC, Chen HY, Tsai CH, "The Alu I calcitonin receptor gene polymorphism (TT) is associated with low bone mineral density and susceptibility to osteoporosis in postmenopausal women." *Gynecol Obstet Invest*, 55(2):82–7, 2003.
- [117] Nakamura M, Jing X, Zhang Z, Yasuoka H, Nakamura Y, Yokoi T, Oura S, Sakurai T, Kakudo K, "Genetic variants of calcitonin receptor and breast cancer in Japanese." *Breast*, 8(3):104–6, 1999.
- [118] Seck T, Baron R, Horne WC, "The alternatively spliced deltae13 transcript of the rabbit calcitonin receptor dimerizes with the C1a isoform and inhibits its surface expression." *J Biol Chem*, 278(25):23085-93, 2003.
- [119] Masi L, Becherini L, Gennari L, Colli E, Mansani R, Falchetti A, Cepollaro C, Gonnelli S, Tanini A, Brandi ML. " Allelic variants of human calcitonin receptor: distribution and association with bone mass in postmenopausal Italian women." *Biochem Biophys Res Commun*, 245(2):622-6, 1998.
- [120] Braga V, Mottes M, Mirandola S, Lisi V, Malerba G, Sartori L, Bianchi G, Gatti D, Rossini M, Bianchini D, Adami S, "Association of CTR and COLIA1 alleles with BMD values in peri- and postmenopausal women." *Calcif Tissue Int*, 67(5):361-6, 2000.
- [121] Nakamura M, Morimoto S, Zhang Z, Utsunomiya H, Inagami T, Ogihara T, Kakudo K, "Calcitonin receptor gene polymorphism in japanese women: correlation with body mass and bone mineral density." *Calcif Tissue Int*, 68(4):211-5, 2001.
- [122] Braga V, Sangalli A, Malerba G, Mottes M, Mirandola S, Gatti D, Rossini M, Zamboni M, Adami S, "Relationship among VDR (BsmI and FokI), COLIA1, and CTR polymorphisms with bone mass, bone turnover markers, and sex hormones in men." *Calcif Tissue Int*, 70(6):457-62, 2002.
- [123] Falcini F, Bindi G, Ermini M, Galluzzi F, Poggi G, Rossi S, Masi L, Cimaz R, Brandi ML, "Comparison of quantitative calcaneal ultrasound and dual energy X-ray absorptiometry in the evaluation of osteoporotic risk in children with chronic rheumatic diseases." *Calcif Tissue Int*, 67(1):19-23, 2000.
- [124] Charopoulos I, Trovas G, Stathopoulou M, Kyriazopoulos P, Galanos A, Dedoussis G, Antonogiannakis E, Lyritis GP, "Lack of association between

- vitamin D and calcitonin receptor gene polymorphisms and forearm bone values of young Greek males." *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 8(2):196-203, 2008.
- [125] Tural S, Kara N, Alayli G, Tomak L, "Association between osteoporosis and polymorphisms of the bone Gla protein, estrogen receptor 1, collagen 1-A1 and calcitonin receptor genes in Turkish postmenopausal women." *Gene*, 515(1):167-72, 2013, doi:10.1016/j.gene.2012.10.041.
- [126] Srikanth VK, Fryer JL, Zhai G, Winzenberg TM, Hosmer D, Jones G, "A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis." *Osteoarthritis Cartilage*, 13(9):769-81, 2005.
- [127] Felson DT, Zhang Y, Anthony JM, Naimark A, Anderson JJ, "Weight loss reduces the risk for symptomatic knee osteoarthritis in women. The Framingham Study." *Ann Intern Med*, 116(7):535-9, 1992.
- [128] Murphy L, Schwartz TA, Helmick CG, Renner JB, Tudor G, Koch G, Dragomir A, Kalsbeek WD, Luta G, Jordan JM, "Lifetime risk of symptomatic knee osteoarthritis." *Arthritis Rheum*, 59(9):1207-13, 2008, doi: 10.1002/art.24021.
- [129] Kellgren JH, Lawrence JS, "Radiological assessment of osteo-arthrosis." *Ann Rheum Dis*, 16(4):494-502, 1957.

Ευχαριστίες

Θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής Αξιολόγησης για την αμέριστη βοήθεια που προσέφεραν κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης αυτής της διπλωματικής εργασίας.

Είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων στην Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής κα Τσέζου Ασπασία, για την ευκαιρία που μου έδωσε αναθέτωντάς μου την εργασία αυτή, καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Επίσης, για την καθοδήγηση που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια του σχεδιασμού και της εκτέλεσης της μελέτης. Η συνεισφορά της στην εκπόνηση της παρούσας μελέτης ήταν ανεκτίμητη.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τις συναδέλφους και υποψήφιες διδάκτορες Παπαθανασίου Ιωάννα και Μουρμούρα Ευανθία, καθώς και την Κωστοπούλου Φωτεινή για την αμέριστη βοήθεια που μου προσέφεραν τόσο στο τεχνικό όσο και στο επιστημονικό-συγγραφικό κομμάτι της διπλωματικής μου εργασίας.

