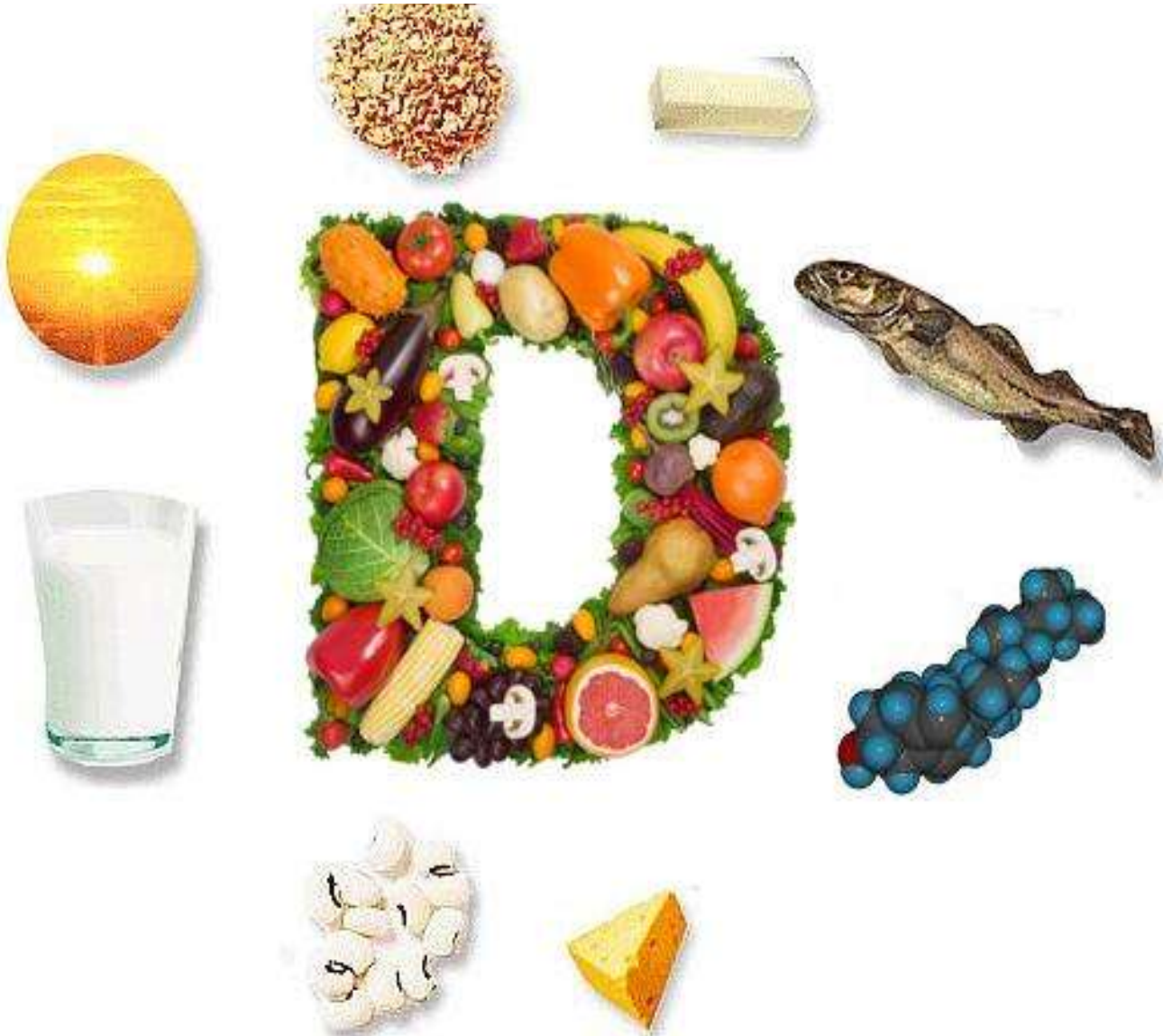


Η βιταμίνη D και ο υποδοχέας της.



ΔΙΒΑΝΟΓΛΟΥ ΝΑΤΑΛΙΑ -3757-

Επιβλέπουσες καθηγήτριες: κα. Κομνηνού Δέσποινα,

Κα.Καραγκιόζογλου-Λαμπούδη Θωμά

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ

Σεπτέμβριος 2014

Περιεχόμενα

Πρόλογος.....	4
Περίληψη	5
1. Εισαγωγή.....	6
1.1 Η οικογένεια της βιταμίνης D.....	7
1.2 Μεταβολισμός της βιταμίνης D.....	9
1.2.1 Μεταβολισμός της ενδογενούς βιταμίνης D	9
1.2.2 Απορρόφηση, μεταφορά και αποθήκευση.....	11
1.3 Το ανθρώπινο γονίδιο του υποδοχέα της βιταμίνης D (hVDR)	15
1.3.1 Οι πιο καλά μελετημένοι πολυμορφισμοί του VDR.....	16
1.3.2 Υποδοχέας βιταμίνης D (VDR).....	19
1.3.3 Σηματοδοτικό μονοπάτι VDR	21
1.3.4 Γονίδια-στόχοι του σηματοδοτικού μονοπατιού της βιταμίνης D	24
1.4 Λειτουργίες και μηχανισμοί δράσης της βιταμίνης D	26
1.4.1.Καλσιτριόλη και έντερο	28
1.4.2. Καλσιτριόλη και οστά	31
1.4.3. Καλσιτριόλη και ανοσοποιητικό σύστημα	33
1.4.4. Επαρκή πρόσληψη και ανεπάρκεια της βιταμίνης D	37
2. Αντικείμενο μελέτης.....	40
3. Μεθοδολογία	43
3.1 Μέτρηση ανθρωπομετρικών στοιχείων	44
3.2 Συλλογή αίματος.....	45
3.3 Απομόνωση gDNA από ανθρώπινο αίμα	45
3.4 Ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος του DNA.....	46
3.4.1 Φωτομέτρηση	46
3.4.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης	46
3.5 HRM (High Resolution Melt Assay and Analysis)	47
3.5.1 Σχεδιασμός HRM.....	48
3.5.2 Εφαρμογή αντίδρασης HRM.....	51
3.5.3 Σχεδιασμός αλληλούχισης (sequencing)	54
3.5.4 Καθαρισμός προϊόντων PCR	57
3.5.5 Ανάλυση HRM	58

3.6 Στατιστική Ανάλυση	58
4. Αποτελέσματα	59
4.1 Σωματομετρικά δεδομένα	60
4.2 Ανάλυση HRM για το δείγμα μας	64
4.2.1 Ανάλυση του πολυμορφισμού ApaI	64
4.2.2 Ανάλυση του πολυμορφισμού BsmI	68
4.2.3 Ανάλυση του πολυμορφισμού FokI	72
4.2.4 Ανάλυση του πολυμορφισμού TaqI	76
4.3 Αποτελέσματα στατιστικού ελέγχου	80
5. Συζήτηση	86
6. Βιβλιογραφία	89

Πρόλογος

Η πρώτη φάση της παρούσας μελέτης εκπονήθηκε στα πλαίσια της 3^{ης} φάσης παρακολούθησης της *Velesino study* το Σάββατο 19 και την Κυριακή 20 Οκτωβρίου 2013 στη πόλη του Βελεστίνου με σκοπό τη συλλογή του δείγματος. Η δεύτερη και τελευταία φάση της συγκεκριμένης μελέτης εκπονήθηκε στο INEB (Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών) του Ε.Κ.Ε.Τ.Α (Εθνικό Κέντρο Έρευνας & Τεχνολογικής Ανάπτυξης) με σκοπό να διεξαχθεί το πειραματικό μέρος της εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστώ θερμά την κα. Κομνηνού Δέσποινα για την άριστη συνεργασία μας, για την εμπιστοσύνη και την εκτίμηση που έδειξε στο πρόσωπό μου και βέβαια για το αμέριστο ενδιαφέρον της. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα.Καραγκιόζογλου-Λαμπούδη Θωμαή για την αποδοχή στην ομάδα των πτυχιακών εργασιών της.

Ευχαριστώ θερμά την επιστημονική υπεύθυνη της *Velesino study*, κα. Ελένη Πετρίδου για την συνεργασία μας στα πλαίσια της 3^{ης} φάσης της μελέτης και τη βοήθεια που μας έδωσε όσον αφορά τη συλλογή των δειγμάτων.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω στο INEB του Ε.Κ.Ε.Τ.Α και ιδιαίτερα στον διευθυντή του κ. Σταματόπουλο Κώστα. Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον κ. Αργυρίου Αναγνώστη για την ευκαιρία που μου έδωσε, την υποστήριξη και τις χρήσιμες συμβουλές του. Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω στην κα. Στέα Ελένη για το σχεδιασμό του πειραματικού μέρους, για την πολύπλευρη υποστήριξη της σε συνδυασμό με την υπομονή της και τη θέληση της να με εκπαιδεύσει.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Παπατζήκα Γρηγόρη για την καθοριστική βοήθεια του στο κομμάτι των στατιστικών αναλύσεων της παρούσας μελέτης. Επίσης, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου και την οικογένεια μου που ενθαρρύνουν τα όνειρα μου και στηρίζουν έμπρακτα κάθε μου προσπάθεια.

Περίληψη

Η βιταμίνη D είναι γνωστή ως η βιταμίνη της ηλιοφάνειας, διότι η έκθεση στο ηλιακό φως αρκεί στους περισσότερους ανθρώπους για να συνθέσουν από μόνοι τους τη βιταμίνη, υπό την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας στη χοληστερόλη του δέρματος. Η βιταμίνη αυτή μοιάζει περισσότερο με στεροειδή ορμόνη: μπορεί να συντεθεί από το ανθρώπινο σώμα και δρα σε συγκεκριμένα κύτταρα-στόχους (1).

Από τότε που ανακαλύφθηκε ο πυρηνικός υποδοχέας της βιταμίνης D (VDR) (1969), ο ρόλος του ενδοκρινικού συστήματος της βιταμίνης D και η παρουσία του υποδοχέα της σε πάνω από 30 ιστούς και όργανα έχουν μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό (2). Η βιταμίνη D τα τελευταία χρόνια εγείρει όλο και πιο πολύ το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας λόγω της πληθώρας των νέων δημοσιεύσεων που δείχνουν τη βιταμίνη D να διαδραματίζει μείζων ρόλο σε πληθώρα φυσιολογικών λειτουργιών. Τόσο η ευρεία συμμετοχή του VDR όσο και η πληθώρα των βιολογικών δράσεων της $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ μπορούν να εξηγήσουν πώς η βιταμίνη D μπορεί να συμβάλει στη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα πολλαπλών χρόνιων ασθενειών (5) (6).

Έχει δειχθεί ότι ο VDR εμπλέκεται στη σηματοδότηση πολλών μεταβολικών μονοπατιών όπως του ινσουλινομιμητικού αυξητικού παράγοντα (insulin-like growth factor, IGF), στη φλεγμονώδη αντίδραση, σε οιστρογονικά μονοπάτια, και βέβαια στην ενεργοποίηση και τη ρύθμιση της βιταμίνης D και του ασβεστίου (2). Επιστημονικά δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στη συσχέτιση της ανεπάρκειάς της, που έχει χαρακτηριστεί ως πανδημία, με πολλές οξείες αλλά και χρόνιες παθήσεις όπως διαταραχές του μεταβολισμού του ασβεστίου, αυτοάνοσες παθήσεις, κάποιοι τύποι καρκίνου, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου I & II, οι καρδιαγγειακές και λοιμώδεις νόσοι, η μυϊκή αδυναμία (3) (4).

Η παρούσα μελέτη ασχολείται με τη σχέση των αλληλομόρφων των τεσσάρων πιο κοινών και καλά μελετημένων πολυμορφισμών (AraI, BsmI, FokI & TaqI) του υποδοχέα της βιταμίνης D με τους ανθρωπομετρικούς δείκτες. Το δείγμα που μελετήσαμε περιλαμβάνει 69 γυναίκες και 35 άντρες ηλικίας 50+ σε συνεργασία μας με τη Velestino study. Αρχικά συλλέχθηκαν ανθρωπομετρικά δεδομένα του δείγματος, ΔΜΣ, ποσοστό λιπώδους μάζας, οστική και μυϊκή μάζα κ.α. καθώς και δείγματα ολικού αίματος και ορού. Πειράματα που πραγματοποιήσαμε στο ολικό αίμα του δείγματος μας έδωσαν την δυνατότητα να ταυτοποιήσουμε τους γονοτύπους των τεσσάρων πολυμορφισμών που θέλαμε να μελετήσουμε.

Συμπερασματικά, διαπιστώσαμε ότι όλοι οι ανθρωπομετρικοί δείκτες που αναλύσαμε στατιστικά εμφανίζουν να έχουν στατιστική διαφορά με τα αλληλόμορφα των πολυμορφισμών τόσο στους άντρες όσο και στις γυναίκες, με εξαίρεση το δείκτη του ποσοστού της λιπώδους μάζας με τα αλληλόμορφα για τον πολυμορφισμό TaqI ($p > 0,05$) στους άντρες.

1. Εισαγωγή

1.1 Η οικογένεια της βιταμίνης D

Οι χαρακτηριστικές παραμορφώσεις των οστών που είναι γνωστές ως ραχίτιδα ήταν πολύ συχνές στις βιομηχανικές πόλεις του δέκατου ένατου αιώνα. Δεδομένα δείχνουν ότι στη Βοστώνη, γύρω στο 1900, το 80% των φτωχών παιδιών υπέφεραν από παραμορφώσεις στα οστά τους (7). Η συμπτωματική θεραπεία με μουρουνόλαδο που είχε αναγνωρισθεί για πρώτη φορά από τον McCollum (8) και η έκθεση στο φυσικό φως δεν είχαν ανακαλυφθεί πριν το 1919. Χρειάστηκαν ακόμα 20 χρόνια μέχρι την *in vitro* σύνθεση αυτού του παράγοντα που ονομάστηκε βιταμίνη D (7). Από τότε, κάθε ουσία με θεραπευτική δράση έναντι της ραχίτιδας χαρακτηρίζεται ως βιταμίνη D (9).

Η βιταμίνη D είναι μια από τις τέσσερις λιποδιαλυτές βιταμίνες (K, E, D, A). Δομικά, προέρχεται από ένα στεροειδές και θεωρείται ότι είναι ένα σεκοστεροειδές επειδή φέρει ένα σπασμένο δακτύλιο από τους συνολικά τέσσερις που διαθέτει. Πιο συγκεκριμένα, αποτελείται από τρεις άθικτους δακτυλίους (A, C και D) και έναν σπασμένο δακτύλιο B μεταξύ του 9^{ου} και του 10^{ου} άνθρακα (9). Η βιταμίνη D απαντά σε πολλές μορφές οι οποίες όλες τους διαθέτουν βιταμινούχα δράση. Όμως, οι σπουδαιότερες για τη διατροφή του ανθρώπου είναι η βιταμίνη D₃ (χολοκαλσιφερόλη) και D₂ (εργοκαλσιφερόλη) (7) (10). Η D₃ απαντάται στα ζώα και σχηματίζεται από την 7- δεϋδροχοληστερόλη υπό την επίδραση του φωτός ενώ η προβιταμίνη της D₂ απαντάται στα φυτά και είναι η πιο συνηθισμένη μορφή βιταμίνης D που πωλείται στο εμπόριο. Οι δύο αυτές μορφές της βιταμίνης διαφέρουν κατά ένα διπλό δεσμό και μια μεθυλική ομάδα ενώ διαθέτουν την ίδια βιταμινούχα δράση (7) (9).

Όσον αφορά τις φυσικές ιδιότητες της οικογένειας αυτής των βιταμινών μπορούμε να πούμε ότι η διαιτητική βιταμίνη D είναι μια σταθερή ουσία και δεν παρουσιάζονται σημαντικές απώλειες κατά το μαγείρεμα, την αποθήκευση ή γενικότερα την επεξεργασία των τροφίμων (9). Όμως, είναι ιδιαίτερα ασταθής στην ακτινοβολία ενώ η παρατεταμένη της έκθεση σε αυτήν μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή τοξικών προϊόντων. Επιπλέον, εμφανίζει ευαισθησία στο οξυγόνο και το χαμηλό pH (10).

Η διαιτητική βιταμίνη D παρέχεται κυρίως από τρόφιμα ζωικής προέλευσης, ειδικότερα από το συκώτι, το βοδινό, το μοσχάρι και τα αυγά, τα γαλακτοκομικά προϊόντα όπως το γάλα, το τυρί και το βούτυρο, καθώς και κάποια ψάρια, όπως η ρέγκα, ο σολομός, ο τόνος και οι σαρδέλες (7) (9). Πιο συγκεκριμένα, 100gr ρέγκας περιέχουν 30μg βιταμίνης D ενώ η ίση ποσότητα μουρουνόλαδου μπορεί να περιέχει μέχρι και 200μg βιταμίνης D. Η περιεκτικότητα της στο αγελαδινό γάλα δεν είναι σημαντική αλλά αυξάνεται με την περιεκτικότητα σε λίπος: η πλήρης κρέμα γάλακτος περιέχει 1μg/100gr. Ενώ το μητρικό γάλα προσφέρει ελάχιστη βιταμίνη D, οι μεταβολίτες της σε αυτό είναι πολύ περισσότερο δραστικοί, οπότε ο κίνδυνος για ραχίτιδα είναι γενικά χαμηλός στα βρέφη που αποκλειστικά θηλάζουν.

Οι απαιτήσεις για εξωγενή βιταμίνη D, εξαρτώνται κυρίως από τη διάρκεια και την ένταση της έκθεσης στην UV ακτινοβολία και την προκύπτουσα ενδογενή σύνθεση της βιταμίνης καθώς και από το χρώμα του δέρματος. Για παράδειγμα, ένα μελαχρινό άτομο μπορεί να χρειαστεί πολύ περισσότερες ώρες έκθεσης στο φως σε σχέση με ένα ξανθό άτομο για να πετύχει τον ίδιο ρυθμό σύνθεσης βιταμίνης στο δέρμα. Οι τρέχουσες συστάσεις των 5μg/μέρα για παιδιά και ενήλικες προϋποθέτουν ανεπαρκή σύνθεση στο δέρμα (7). Στις Ηνωμένες πολιτείες, κάποια επιλεγμένα τρόφιμα, όπως το γάλα και η μαργαρίνη, είναι εμπλουτισμένα σε βιταμίνη D (9). Πιο συγκεκριμένα, το γάλα και όλα τα παραγόμενα βρεφικά σκευάσματα διατροφής εμπλουτίζονται με 10μg/l βιταμίνης D₃. Επίσης, είναι σημαντικό να ειπωθεί ότι η υγειονομική υπηρεσία του Καναδά προτείνει για τα βρέφη συμπληρώματα των 10μg κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού και 20μg κατά τη διάρκεια του χειμώνα. Στην πράξη, η συνήθης πρόσληψη βιταμίνης D από τους ενήλικες εμπίπτει εντός του συνιστώμενου εύρους ενώ αντίθετα η πρόσληψη από τα παιδιά, τους εφήβους και τους ηλικιωμένους τείνει να είναι ανεπαρκής (7).

1.2 Μεταβολισμός της βιταμίνης D

1.2.1 Μεταβολισμός της ενδογενούς βιταμίνης D

Η 7-δεϋδροχοληστερόλη, που συναντάται τόσο στα ζώα όσο και στον άνθρωπο, συντίθεται στους σμηγματογόνους αδένες του δέρματος, εκκρίνεται στην επιφάνεια της επιδερμίδας και μπορεί να επαναπορροφηθεί στις διάφορες στοιβάδες του δέρματος. Το στεροειδές αυτό φαίνεται να κατανέμεται ομοιόμορφα στην επιδερμίδα και το χόριο του δέρματος.

Το συζευγμένο σύστημα των διπλών δεσμών στο δακτύλιο B της 7-δεϋδροχοληστερόλης επιτρέπει την απορρόφηση ειδικών μηκών κύματος φωτός που βρίσκονται στο εύρος του υπεριώδους (UV-B, 280-315 nm). Έτσι, κατά την έκθεση στο ηλιακό φως, ένα μέρος από τα αποθέματα της 7-δεϋδροχοληστερόλης της επιδερμίδας μετατρέπονται σε προβιταμίνη D₃ (προκαλσιφερόλη) (9). Περίπου το 65% της συνολικής 7-δεϋδροχοληστερόλης βρίσκεται στην επιδερμίδα, και περισσότερο από το 95% της προβιταμίνης D₃ που παράγεται είναι σε μη ανανεώσιμες στιβάδες επιδερμίδας. Μόλις συντεθεί η προβιταμίνη D₃ στο δέρμα, μπορεί να μετατραπεί είτε σε λουμιστερόλη, ταχυστερόλη και 7-δεϋδροχοληστερόλη είτε να ισομεριωθεί σε βιταμίνη D₃ (11). Ένα μεγάλο ποσοστό της προβιταμίνης D₃ ισομερίζεται με τη βοήθεια της θερμότητας σε βιταμίνη D₃ μέσα σε 2 με 3 ημέρες.

Η βιταμίνη D₃ καλείται αλλιώς και ως χοληκαλσιφερόλη ή καλσιόλη. Η τελευταία διαχέεται από το δέρμα στο αίμα με τη βοήθεια μιας α2 σφαιρίνης (τρανσκαλσιφερίνη) που προσδένει την βιταμίνη D (D-Binding Protein, DBP) και η οποία συντίθεται στο ήπαρ. Ούτε η λουμιστερόλη ή η ταχυστερόλη, αλλά ούτε και η προβιταμίνη D δεν έχουν μεγάλη συγγένεια με την DBP. Έτσι, αντί να εισέρχονται στο αίμα, αποβάλλονται κατά τη διάρκεια ανανέωσης του δέρματος. Περίπου το 60% της χοληκαλσιφερόλης του πλάσματος είναι προσδεσμένη στην DBP και κατευθύνεται προς το ήπαρ. Ένα σημαντικό ποσοστό της εναποτίθεται στους μύες και το λιπώδη ιστό πριν να μεταφερθεί στο ήπαρ. Στο ήπαρ μεταβολίζεται από διάφορες υδροξυλάσες ώστε να παραχθεί η ενεργής μορφή της βιταμίνης D όπως ακριβώς συμβαίνει και με την βιταμίνη D που προέρχεται από τη διατροφή (9). Αυστηρά μιλώντας, η βιταμίνη D δεν αποτελεί βιταμίνη για τον άνθρωπο αφού, υπό ευνοϊκές συνθήκες, μπορεί να παραχθεί σε επαρκείς ποσότητες μέσω του μονοπατιού που μόλις περιγράφηκε (7).

Όπως προαναφέρθηκε, η βιταμίνη D₃ είναι ευαίσθητη στην ηλιακή ακτινοβολία και αδρανοποιείται σε σουπραστερόλη 1 και 2 και σε 5,6-trans-βιταμίνης D₃. Δεν είναι, όμως, δυνατό να λάβει ο οργανισμός μεγάλη ποσότητα βιταμίνης D από την έκθεση στον ήλιο, διότι υπάρχει ένας μηχανισμός αυτορύθμισης, που οδηγεί με την επίδραση της θερμότητας σε διάσπαση της βιταμίνης D στα μη δραστικά ανάλογά της. Είναι σημαντικό να ειπωθεί

ότι η δερματική παραγωγή της βιταμίνης D₃ επηρεάζεται από τη χρώση του δέρματος, τη χρήση αντηλιακού, την ώρα έκθεσης στον ήλιο, την εποχή, το γεωγραφικό πλάτος, το υψόμετρο, και την ατμοσφαιρική ρύπανση.

Η μικρή αύξηση της γωνίας των ακτινών του ήλιου κατά τη διάρκεια του χειμώνα, των πρώτων ωρών της ημέρας και των ωρών αργά το απόγευμα έχει ως αποτέλεσμα τα ηλιακά φωτόνια UV-B να διανύουν μια μεγαλύτερη διαδρομή μέσα στο στρώμα του όζοντος, και τελικά να απορροφώνται από αυτό. Αυτή είναι και η εξήγηση στο γιατί σε περιοχές με γεωγραφικό πλάτος περίπου 33° οι άνθρωποι συνθέτουν ελάχιστη ή και καθόλου βιταμίνη D₃ κατά τη διάρκεια του χειμώνα. Επίσης, για τον ίδιο λόγο στον ισημερινό καθώς και σε πολύ βόρειες και νότιες περιοχές του κόσμου το καλοκαίρι, όπου ο ήλιος λάμπει σχεδόν 24 ώρες, η βιταμίνη D₃ συντίθεται μόνο μεταξύ 10 π.μ. και 3μ.μ περίπου. Ομοίως, στις αστικές περιοχές, όπως το Λος Άντζελες, η Καλιφόρνια και το Μεξικό, όπου το διοξείδιο του αζώτου και του όζοντος βρίσκονται σε υψηλά επίπεδα, παράγονται μικρά ποσά βιταμίνης D₃ λόγω του μικρού αριθμού των παραγόμενων φωτονίων UV-B που φτάνουν τελικά στους ανθρώπους που ζουν σε αυτές τις πόλεις. Επιπλέον, επειδή το γυαλί απορροφά όλη την UV-B ακτινοβολία, δεν μπορεί να παραχθεί καθόλου βιταμίνη D₃ από τους ανθρώπους που εκτίθενται στο ηλιακό φως μέσα από γυάλινες επιφάνειες (11).

Είναι σημαντικό να ειπωθεί ότι η παρατεταμένη έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία προκαλεί άλλες ανεπιθύμητες συνέπειες όπως την πρόωρη εμφάνιση ρυτίδων και αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση καρκίνου του δέρματος. Ο κίνδυνος εμφάνισης αυτών των ανεπιθύμητων συνεπειών μειώνεται με τη χρήση αντηλιακών. Όμως όπως έχει προαναφερθεί η χρήση αντηλιακών με δείκτη προστασίας (sun protection factors, SPF) 8 και πάνω εμποδίζει την σύνθεση της βιταμίνης D. Το δίλημμα αυτό αποφεύγεται με την τόση έκθεση στον ήλιο όση είναι αρκετή για να παραχθεί επαρκής ποσότητα βιταμίνης. Για τους περισσότερους ανθρώπους, η έκθεση των χεριών, του προσώπου και των μπράτσων για δέκα λεπτά στον ήλιο σε καθαρή μέρα, λίγες μέρες την εβδομάδα, θα μπορούσε να είναι επαρκής για την διατήρηση των επιπέδων της βιταμίνης. Επίσης, οι σκουρόχρωμες επιδερμίδες απαιτούν εκτενέστερη έκθεση σε σχέση με τις ανοιχτόχρωμες για την επίτευξη του ίδιου αποτελέσματος (12) (13).

1.2.2 Απορρόφηση, μεταφορά και αποθήκευση

Η βιταμίνη D που προέρχεται από τη διατροφή, ως λιποδιαλυτή βιταμίνη, απορροφάται με τη βοήθεια των μυκηλίων, μαζί με το διατροφικό λίπος, και με τη βοήθεια των χολικών αλάτων εισέρχεται με παθητική διάχυση στο εντεροκύτταρο. Το 50% περίπου της βιταμίνης που προέρχεται από τη διατροφή απορροφάται κυρίως στα κατώτερα σημεία του λεπτού εντέρου και του δωδεκαδάκτυλου. Εντός του εντεροκυττάρου, η βιταμίνη D ενσωματώνεται αρχικά στα χυλομικρά, τα οποία εισέρχονται στο λεμφικό σύστημα και κατόπιν στο αίμα. Τα χυλομικρά μεταφέρουν περίπου το 40% της χοληκαλσιφερόλης στο αίμα, αν και ορισμένη ποσότητα βιταμίνης μπορεί να μεταφερθεί από τα χυλομικρά στην DBP για να απελευθερωθεί στους εξωηπατικούς ιστούς. Τα υπολείμματα των χυλομικρών μεταφέρουν την βιταμίνη στο ήπαρ. Είναι σημαντικό να ειπωθεί ότι η κατανομή της βιταμίνης στο σώμα εξαρτάται από τη διαφορά του μηχανισμού μεταφοράς της χοληκαλσιφερόλης που σχηματίζεται στην επιδερμίδα και αυτής που απορροφάται από τον εντερικό αυλό.

Η χοληκαλσιφερόλη που φτάνει στο ήπαρ είτε μέσω των υπολειμμάτων των χυλομικρών ή με την DBP συνήθως μεταβολίζεται από διάφορες υδροξυλάσες και έτσι παράγεται η ενεργή μορφή της βιταμίνης. Οι πολυλειτουργικές αυτές οξειδάσες είναι υδρολάσες του P450 του κυτοχρώματος (9). Στο ήπαρ η χοληκαλσιφερόλη υδροξυλιώνεται από την μιτοχονδριακή 25-υδροξυλάση (25-OHase), που κωδικοποιείται από το γονίδιο *CYP27A1*, στον άνθρακα 25 για να σχηματισθεί η 25-OH-D₃ ή αλλιώς καλσιδιόλη (9) (14). Η ικανότητα της 25-υδροξυλάσης στο ήπαρ να μετατρέπει τη χοληκαλσιφερόλη σε 25-OH-D₃ φαίνεται να σχετίζεται με τη συνολική διατροφική κατάσταση της βιταμίνης D στο σώμα. Αφού παραχθεί η καλσιδιόλη απελευθερώνεται στο αίμα και εκπροσωπεί την κύρια μορφή της βιταμίνης D. Το ένζυμο 25-υδροξυλάση, το οποίο εξαρτάται από το NADPH, είναι περισσότερο ενεργό σε περιόδους στέρησης της βιταμίνης D, από ότι όταν είναι διαθέσιμες φυσιολογικές ποσότητες χοληκαλσιφερόλης. Ενώ το ήπαρ είναι ο κύριος ιστός που εκφράζει την 25-υδροξυλάση, το συγκεκριμένο ένζυμο βρίσκεται και σε άλλα όργανα όπως οι πνεύμονες, το έντερο και οι νεφροί.

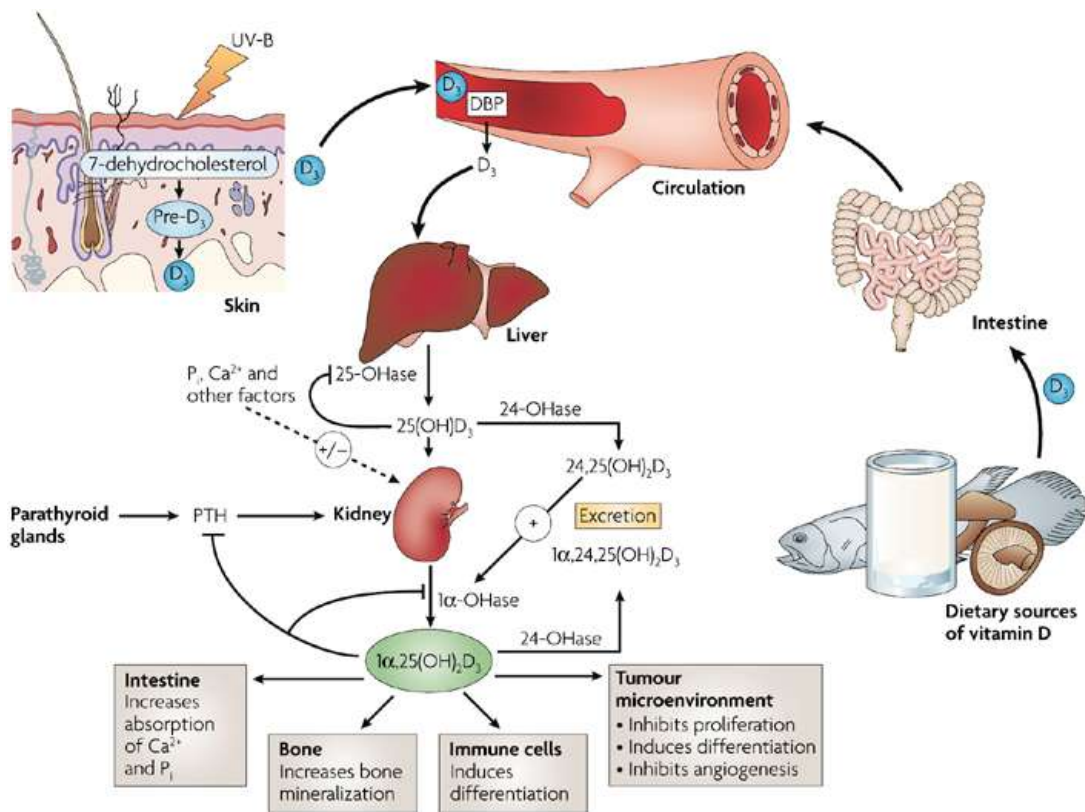
Τα επίπεδα της 25-OH-D₃ στο αίμα πιστεύεται ότι αντιπροσωπεύουν την κατάσταση της βιταμίνης D₃ στο σώμα και ποικίλουν ανάλογα, τόσο με την πρόσληψη της βιταμίνης μέσω της διατροφής, όσο και με την έκθεση στο ηλιακό φως. Τα επίπεδα της καλσιδιόλης κατά τους χειμερινούς μήνες μειώνονται ακόμα και στα υγιή άτομα, λόγω μείωσης της έκθεσης στον ήλιο. Είναι σημαντικό να ειπωθεί ότι η συγκέντρωση της καλσιδιόλης στο αίμα σχετίζεται αρνητικά με τα επίπεδα της παραθυρεοειδούς ορμόνης. Ωστόσο, η συγκέντρωση της καλσιδιόλης στον ορό παρουσιάζει σημαντική συσχέτιση με τη διαιτητική πρόσληψη της βιταμίνης D.

Το μεγαλύτερο ποσοστό της 25-OH-D₃ συντίθεται στο ήπαρ από εκεί εκκρίνεται στο αίμα και μεταφέρεται από την DBP. Το αίμα αποτελεί την κυριότερη δεξαμενή της 25-

OH-D₃, η οποία έχει χρόνο ημιζωής περίπου 3 βδομάδες, ενώ τόσο το ήπαρ όσο και οι εξωηπατικοί ιστοί διαθέτουν μια μικρή ποσότητα αυτής. Όταν τα αποθέματα της 25-OH-D₃ ελαττωθούν κατά τη διάρκεια της εξάντλησης της βιταμίνης D, η διατήρηση της δράσης της βιταμίνης γίνεται δυνατή μέσω της απελευθέρωσης της χοληκαλσιφερόλης από τα αποθέματά της στο δέρμα και από άλλα σημεία, όπως τους μύες και το λιπώδη ιστό.

Μετά την απελευθέρωση της 25-OH-D₃ στο αίμα προσδένεται στην DBP και μεταφέρεται στους νεφρούς. Εκεί, γίνεται μια δεύτερη υδροξυλίωση της 25-OH-D₃ στη θέση 1 και έτσι παράγεται η 1,25-(OH)₂-D₃ ή αλλιώς καλσιτριόλη. Η καλσιτριόλη θεωρείται η ενεργή μορφή της βιταμίνης D (9). Η παραγωγή της καλσιτριόλης στα νεφρικά σωληνάκια πραγματοποιείται από την 1-υδροξυλάση (1α-OHase), ένα ένζυμο που κωδικοποιείται από το γονίδιο *CYP27B1* και εξαρτάται από το NADPH.

Η δραστηριότητα της 1-υδροξυλάσης επηρεάζεται από ποικίλους παράγοντες. Για παράδειγμα, η παραθυροειδής ορμόνη και η χαμηλή συγκέντρωση ασβεστίου στο αίμα διεγείρουν την ενεργότητα της 1-υδροξυλάσης. Η συγκέντρωση του τελικού προϊόντος του ενζύμου, δηλαδή η καλσιτριόλη, επηρεάζει επίσης την ενεργότητα του ενζύμου: υψηλές συγκεντρώσεις του προϊόντος μειώνουν την ενεργότητα του ενζύμου, ενώ χαμηλές συγκεντρώσεις διεγείρουν την ενεργότητα του ενζύμου. Επιπλέον, μια υψηλή πρόσληψη φωσφόρου προκαλεί μείωση της καλσιτριόλης στον ορό, ενώ μια χαμηλή πρόσληψη φωσφόρου διεγείρει την παραγωγή της (9) (14). Όταν υπάρχουν επαρκείς ποσότητες καλσιτριόλης, η ενεργότητα της 1-υδροξυλάσης στους νεφρούς μειώνεται σημαντικά, ενώ αυξάνεται η ενεργότητα ενός άλλου ενζύμου, της 24-υδροξυλάσης (24-OHase), στους νεφρούς και πιθανόν και σε άλλους ιστούς, όπως οι χόνδροι και το έντερο. Οι μεταβολίτες 24,25-(OH)₂-D₃ και 1,24,25-(OH)₃-D₃ σχηματίζονται από την υδροξυλίωση της 25-OH-D₃ με την βοήθεια της 24-υδροξυλάσης, ένα ένζυμο που κωδικοποιείται από το γονίδιο *CYP24A* (9) (14). Η παραγωγή της 24,25-(OH)₂-D₃ φαίνεται να αυξάνεται κατά τις περιόδους επάρκειας της βιταμίνης D και όταν η ομοιόσταση του ασβεστίου βρίσκεται σε ισορροπία. Η 24,25-(OH)₂-D₃ μορφή της βιταμίνης απελευθερώνεται στο αίμα δεσμευμένη σε μια δεσμευτική πρωτεΐνη της βιταμίνης D για να επιτελέσει διάφορες λειτουργίες σε διάφορους ιστούς.



εικόνα 1: σχηματική αναπαράσταση του μεταβολισμού της βιταμίνης D (14).

Η καλσιτριόλη απελευθερώνεται από τους νεφρούς στο αίμα συνδεδεμένη με την DBP, μια από τις κυριότερες πρωτεΐνες στο αίμα. Η πρωτεΐνη αυτή μεταφέρει και άλλους μεταβολίτες της βιταμίνης D σε διάφορους ιστούς- στόχους αλλά με διαφορετική συγγένεια πρόσδεσης. Για παράδειγμα, συνδέεται χαλαρά με την $24R,25-(OH)_2-D_3$ και στενά με το μόριο της καλσιτριόλης. Στο αίμα, η καλσιτριόλη έχει χρόνο ημιζωής περίπου 4 με 6 ώρες. Όταν φτάσει στους ιστούς-στόχους της απελευθερώνεται εύκολα από την DBP και προσδένεται γρήγορα στον υποδοχέα της βιταμίνης D (Vitamin D Receptor, VDR) (9).

Συνοπτικά, μετά τη ηλιακή σύνθεση της βιταμίνης D στο δέρμα ή τη διαιτητική της πρόσληψη, αυτή αποθηκεύεται στο ήπαρ, το λιπώδη ιστό και τους μύες, όπου εμφανίζει χρόνο ημιζωής περίπου 60 ημέρες (15).

Είναι σημαντικό να ειπωθεί ότι η βιοδιαθεσιμότητα της βιταμίνης D μπορεί να επηρεαστεί από διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Ως λιποδιαλυτή βιταμίνη, η βιταμίνη D απαιτεί την παρουσία του διατροφικού λίπους στο έντερο για να απορροφηθεί. Έτσι ορισμένες παθολογικές καταστάσεις, όπως η νόσος του Crohn, η κυστική ίνωση, η

κοιλιοκάκη, οι γαστρεντερικές επεμβάσεις όπως η αφαίρεση τμήματος του στομάχου ή του εντέρου, οι οποίες σχετίζονται με δυσαπορρόφηση του λίπους, μπορεί να οδηγήσουν σε δυσαπορρόφηση της βιταμίνης D και επομένως σε ανεπάρκεια αυτής. Για παράδειγμα, ασθενείς με κυστική ίνωση υποφέρουν από παγκρεατική ανεπάρκεια εξωκρινούς μοίρας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα δυσαπορρόφηση των λιποδιαλυτών βιταμινών, συμπεριλαμβανομένης και της βιταμίνης D. Οι ασθενείς με κυστική ίνωση, ανάλογα με τον βαθμό της ανεπάρκειας τους, απορροφούν περίπου 50% λιγότερη βιταμίνη D από τη κανονική (4).

Η μακρόχρονη χρήση αντιεπιληπτικών φαρμάκων συμπεριλαμβανομένων της φαινοβαρβιτάλης, της φαινυτοΐνης, της καρβαμαζεπίνης και του αντιμικροβιακού παράγοντα της ριφαμπικίνης (RIF) μπορεί να οδηγήσουν σε οστεομαλάκια. Η επαγωγή του καταβολισμού της καλσιτριόλης από αυτά τα φάρμακα πιστεύεται ότι συμβάλλει στην εμφάνιση αυτών των παρενεργειών (16).

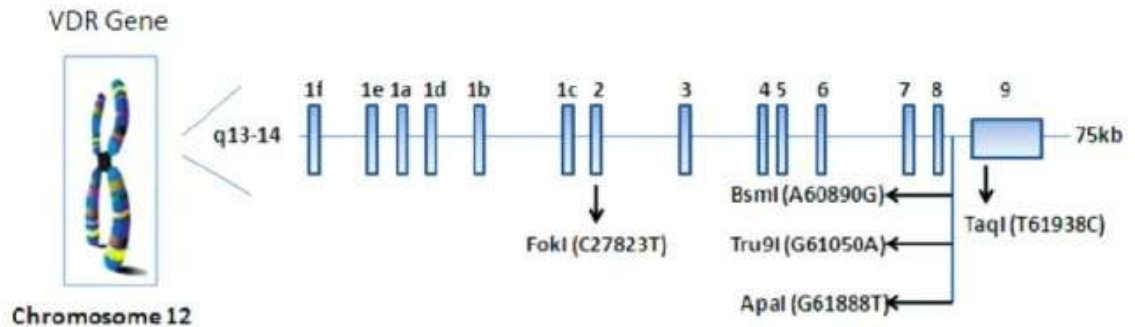
Όπως είναι ήδη γνωστό τα νεφρά διαδραματίζουν έναν από τους σημαντικότερους ρόλους στον μεταβολισμό της βιταμίνης D. Επομένως, γίνεται εύκολα κατανοητό ότι ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια και κυρίως σταδίου 4 ή 5, όπως και εκείνων που χρειάζονται αιμοκάθαρση, εμφανίζουν αδυναμία να συνθέσουν επαρκή καλσιτριόλη. Έτσι στους ασθενείς αυτούς κρίνεται απαραίτητη η χορήγηση συμπληρωμάτων της βιταμίνης D τόσο για την εξασφάλιση επαρκών επιπέδων της βιταμίνης όσο και για τον έλεγχο των επιπέδων της PTH (4) (17).

Έχει γίνει γνωστό εδώ και πολύ καιρό ότι οι παχύσαρκοι άνθρωποι εμφανίζουν την τάση για ανεπάρκεια της βιταμίνης D επειδή έχουν χαμηλότερα επίπεδα 25-(OH)D. Μια πιθανή εξήγηση δίνεται λόγω του αυξημένου υποδόριου λίπους που εμφανίζουν οι παχύσαρκοι και της μειωμένης βιοδιαθεσιμότητας της βιταμίνης που είναι αποθηκευμένη σε αυτό το λίπος. Βέβαια πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα της 7-δεϋδροχοληστερόλης στο δέρμα των παχύσαρκων ατόμων δεν είναι στατιστικά σημαντικά διαφορετικό από αυτό των μη παχύσαρκων ατόμων (4) (18).

1.3 Το ανθρώπινο γονίδιο του υποδοχέα της βιταμίνης D (hVDR)

Το ανθρώπινο γονίδιο του υποδοχέα της βιταμίνης D (hVDR) εδράζεται στο χρωμόσωμα 12q αποτελείται από τον υποκινητή, τις ρυθμιστικές περιοχές (1a-1f) και από τα εξόνια 2-9 και κωδικοποιεί 6 επικράτειες (A-F) της πρωτεΐνης VDR (14) (19). Το γονίδιο hVDR είναι παρόμοιο με άλλα γονίδια πυρηνικών υποδοχέων κατά το ότι καθένας από τους δύο δακτύλους ψευδαργύρου (zinc fingers) που διαθέτει κωδικοποιείται από ξεχωριστά εξόνια (II και III), και το 5' άκρο του γονιδίου παρουσιάζει κάποια πολυπλοκότητα ως προς τη μορφή του εναλλακτικού ματίσματος ή /και στις θέσεις έναρξης της μετάφρασης (εικόνα 2). Για το hVDR, το εναλλακτικό μάτισμα των τριών εξονίων (IA-IC) που κωδικοποιεί τμήματα της μη μεταφραζόμενης περιοχής 5' (UTR) παράγει τουλάχιστον οχτώ διαφορετικά mRNA (20), ενώ η παρουσία ενός σημειακού πολυμορφισμού (SNP, single nucleotide polymorphism) στο εξόνιο II (FokI) καθορίζει την παρουσία ή την απουσία μιας εναλλακτικής θέσης έναρξης της μετάφρασης. Ένα μοναδικό χαρακτηριστικό του γονιδίου hVDR είναι η παρουσία ενός πρόσθετου εξωνίου (V), το οποίο δεν αποτελεί τμήμα των γονιδίων των άλλων πυρηνικών υποδοχέων. Το εξόνιο V εδράζεται κοντά στο κέντρο του γονιδίου και κωδικοποιεί τα αμινοξικά κατάλοιπα 155-194 στον hVDR. Αυτή η περιοχή στο πρωτεϊνικό προϊόν του hVDR είναι πιο ευέλικτη από την αντίστοιχη περιοχή στους άλλους πυρηνικούς υποδοχείς, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο VDR μπορεί να έχει αποκτήσει ένα νέο εξόνιο άγνωστης λειτουργίας, στοιχείο εξελικτικής απόκλισης από τους άλλους πυρηνικούς υποδοχείς (19) (21).

Η έκφραση και η λειτουργία του VDR υποδοχέα μπορεί να επηρεάζεται από την ύπαρξη διαφόρων πολυμορφισμών του γονιδίου (22). Έχουν απομονωθεί ποικίλες πολυμορφικές αλληλουχίες όσον αφορά το ανθρώπινο γονίδιο του VDR αλλά οι πιο συχνά μελετημένοι αναφέρονται παρακάτω. Οι πολυμορφισμοί του 3' άκρου στο εσόνιο VIII [BsmI(rs1544410), Tru9I(rs757343), ApaI(rs7975232)], το εξόνιο IX [TaqI(rs731236)], και στην πολύ(A) μικροδορυφορική αλληλουχία (poly(A) microsatellite) μπορεί να συσχετίζονται με τη γονιδιακή μεταγραφή (19) (22). Στο εξόνιο 2 του 5' τελικού άκρου το αλληλόμορφο F του FokI (rs10735810) πολυμορφισμού μπορεί να στερείται του πρώτου κωδικονίου έναρξης, γεγονός που οδηγεί στην παραγωγή μιας μικρότερης κατά τρία αμινοξέα πρωτεΐνης VDR, η οποία φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματική στην ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων (22). Η ύπαρξη των άλλων πολυμορφισμών φαίνεται ότι επηρεάζουν όχι μόνο τα επίπεδα έκφρασης του VDR αλλά και την σταθερότητα του mRNA του VDR παίζοντας σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων (23).



εικόνα 2:σηματική απεικόνιση του ανθρώπινο γονιδίου του VDR (81).

1.3.1 Οι πιο καλά μελετημένοι πολυμορφισμοί του VDR.

Η συσχέτιση των πολυμορφισμών του VDR με την οστική πυκνότητα (bone mineral density, BMD) αλλά και με την παθοφυσιολογία ποικίλων ασθενειών όπως της οστεοπόρωσης, του υπερπαραθυροειδισμού, του καρκίνου του μαστού και του προστάτη έγινε αντικείμενο μελέτης για πολλές επιστημονικές ομάδες.

Οι Morrison, Eisman και οι συνεργάτες τους ήταν αυτοί που το 1994 πρώτοι ανέφεραν ότι τα διάφορα αλληλόμορφα του VDR θα μπορούσαν να προβλέψουν την οστική πυκνότητα υποστηρίζοντας ότι η εμφάνιση της θέσεως περιορισμού BsmI (αλληλόμορφο b,γονότυπος bb ή Bb) σχετίζεται με την αύξηση της οστικής πυκνότητας των οσφυϊκών σπονδύλων. Αντίθετα, η απουσία της θέσης BsmI (αλληλόμορφο B, γονότυπος BB) σχετίστηκε με χαμηλή οστική πυκνότητα (19). Μια πολύ πρόσφατη μελέτη του 2013 που αφορά 146 Ιρανές γυναίκες καταλήγει ακριβώς στα ίδια συμπεράσματα δηλαδή μιλά για μια έντονη συσχέτιση του πολυμορφισμού αυτού κυρίως με την οστική πυκνότητα των οσφυϊκών σπονδύλων (24). Υπάρχουν όμως και άλλες μελέτες συσχέτισης της οστικής πυκνότητας και αυτού του πολυμορφισμού του VDR με αντικρουόμενα συμπεράσματα (19). Μια άλλη μελέτη, του Xia και των συνεργατών του αποκαλύπτει την ύπαρξη συσχέτισης του BsmI πολυμορφισμού με παθολογικό πρότυπο ανάπτυξης και χαμηλής οστικής πυκνότητας σε κορίτσια με ιδιοπαθή εφηβική σκολίωση (AIS, Adolescent Idiopathic Scoliosis) (25). Παρόλα αυτά όμως έχει καταστεί σαφές ότι οι παράγοντες της ηλικίας, τα επίπεδα των οιστρογόνων, της εθνικότητας, και της πρόσληψης ασβεστίου αποκαλύπτουν την πραγματική κατάσταση της οστικής πυκνότητας (19).

Η ύπαρξη της θέσεως ApaI στο ίδιο εσόνιο (αλληλόμορφο a, γονότυπος aa ή Aa),

και μιας σιωπηλής μετάλλαξης εντός του κωδικονίου 352 στο IX εξόνιο, η οποία αλλάζει τη θέση περιορισμού TaqI (αλλολόμορφο t, γονότυπος tt ή Tt), συνδέονται όχι μόνο με τις μεταβολές των οστικών παραμέτρων αλλά επίσης και με συχνότερη εμφάνιση σποραδικού πρωτοπαθή υπερπαραθυροειδισμού σε ασθενείς με το B αλληλόμορφο, καθώς και καρκίνου του προστάτη. Ο καρκίνος του προστάτη φαίνεται να εμφανίζει ισχυρή συσχέτιση και με το αλληλόμορφο T (έλλειψη της θέσεως περιορισμού TaqI, γονότυπος TT) αλλά και με το μήκος της πολύ(A) μικροδορυφορικής αλληλουχίας ($L_{\text{ong}}\text{-grouping}$). Όσον αφορά το μήκος της πολύ(A) μικροδορυφορικής αλληλουχίας ($L_{\text{ong}}\text{-grouping}$) φαίνεται να επηρεάζει την σταθερότητα του mRNA του γονιδίου επιδρώντας προστατευτικά στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού. Επίσης, η μελέτη της πολύ(A) μικροδορυφορικής αλληλουχίας φαίνεται να παρέχει μια επιπρόσθετη εξήγηση όσον αφορά τη συσχέτιση των BsmI και TaqI γονοτύπων με την BMD και τις υπερπλαστικές διαταραχές. Γενικά, τόσο η $L_{\text{ong}}\text{-grouping}$ πολύ(A) μικροδορυφορική αλληλουχία όσο και το αλληλόμορφο F (γονότυπος FF) του πολυμορφισμού FokI (ισομορφή M_4) φαίνεται ότι μπορούν να παρέχουν μια μερική προστασία ενάντια στην οστεοπόρωση με την εξασφάλιση μεγαλύτερης οστικής πυκνότητας μέσω της αυξημένης δραστηριότητας του hVDR κατά τη διάρκεια της ζωής (19).

Η βιταμίνη D και οι πολυμορφισμοί του VDR έχουν προταθεί ως περιβαλλοντικοί και γενετικοί παράγοντες σε νευροεκφυλιστικές διαταραχές συμπεριλαμβανομένης της πολλαπλής σκλήρυνσης (MS), της νόσου του Alzheimer (AD), και πρόσφατα της νόσου του Parkinson (PD) (26). Ο πιθανός ρόλος της βιταμίνης D με την παθογένεση της σκλήρυνσης κατά πλάκας (multiple sclerosis, MS) οδήγησε πολλές επιστημονικές ομάδες να μελετήσουν την πιθανή συσχέτιση του με τους VDR πολυμορφισμούς. Ο πιθανός αυτός ρόλος αιτιολογείται από ποικίλες μελέτες που αναφέρουν συσχέτιση των αυξημένων επιπέδων της $25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$ με μείωση της υποτροπής σε ασθενείς με MS. Επίσης, μειωμένα επίπεδα της $25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$ φαίνονται να σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο για MS ενώ ο κίνδυνος για MS φαίνεται να είναι μειωμένος στις γυναίκες των οποίων οι μητέρες τους λάμβαναν συμπλήρωμα της βιταμίνης κατά την εγκυμοσύνη και στις γυναίκες που λάμβαναν συμπλήρωμα της βιταμίνης στην εφηβεία. Επιπλέον, τόσο η βιταμίνη D φαίνεται να ρυθμίζει μερικά σχετιζόμενα με την MS γονίδια όσο και ο CYP27B1, μεταβολίτης του μονοπατιού της βιταμίνης D, φαίνεται να έχει συσχέτιση με την MS. Μια πολύ πρόσφατη μελέτη (2013) που αφορούσε Ισπανούς Καυκάσιους ασθενείς με MS έδειξε ότι δεν υπάρχει καμία συσχέτιση του κινδύνου εμφάνισης της MS με τους πολυμορφισμούς TaqI και FokI (27).

Πολλές επιστημονικές ομάδες έχουν προσπαθήσει να ανακαλύψουν την ύπαρξη κάποιας συσχέτισης μεταξύ συγκεκριμένων γονοτύπων των πολυμορφισμών του VDR με διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Έτσι, ο γονότυπος FF, που δηλώνει απουσία της θέσεως περιορισμού FokI, έχει ενοχοποιηθεί από πολλές επιστημονικές ομάδες για αυξημένο κίνδυνο περιοδοντίτιδας (GAP, generalized aggressive periodontitis) (23). Ως

περιοδοντίτιδα εννοούμε την φλεγμονή, την εκφύλιση ή και τα δύο του οδοντικού περιόστεου, του φατνιακού οστού, της αδαμαντίνης και του παρακείμενου ούλου (28) (29). Επίσης, ο γονότυπος tt , που δηλώνει παρουσία της θέσεως περιορισμού TaqI, εμφανίζει μεγαλύτερη συχνότητα σε ασθενείς με νόσο του Crohn's σε σύγκριση με ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα και με την ομάδα ελέγχου (30).

Η συμμετοχή της βιταμίνης D και του υποδοχέα της σε πληθώρα μεταβολικά μονοπάτια δείχνει τη σημαντικότητα του VDR στην αιτιολογία του καρκίνου. Επιδημιολογικές μελέτες αναφέρουν τη συσχέτιση κάποιων πολυμορφισμών του VDR με το καρκίνο. Σημαντικές διαιτητικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του VDR και του καρκίνου έχουν παρατηρηθεί όσον αφορά το ασβέστιο, τη βιταμίνη D, τη συνολική προσλαμβανόμενη ενέργεια και το διατροφικό λίπος (2). Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν μελέτες που αποδεικνύουν ότι η ύπαρξη του αλληλομόρφου T (TaqI) μπορεί να ασκήσει έναν προστατευτικό ρόλο έναντι του καρκίνου μαστού (31) ή ότι το αλληλόμορφο t σχετίζεται με σημαντικά υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης του ίδιου καρκίνου (32) (33). Το νεφρικό καρκίνωμα (renal cell carcinoma, RCC) έχει συσχετισθεί με περισσότερους από έναν πολυμορφισμούς του VDR. Πιο αναλυτικά, μελέτες δείχνουν ότι άτομα με γονότυπο AA(ApaI) όχι μόνο ότι παρουσιάζουν υψηλότερο κίνδυνο γι' αυτό τον τύπο καρκίνου αλλά και ότι εμφανίζουν λιγότερο βιώσιμες μορφές αυτού του τύπου. Επίσης, μελέτες αναφέρουν ότι ο γονότυπος TT σχετίζεται με δυο φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης RCC σε σχέση με τους άλλους δυο πιθανούς γονοτύπους (34), και ότι ο γονότυπος ff (FokI) συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο για την εμφάνιση νεφρικού καρκινώματος σε σχέση με το γονότυπο FF (35).

Όσον αφορά τον καρκίνο του προστάτη, μια μελέτη του Yongheng Bai και των συνεργατών του το 2009 , αφού μελέτησε τους πολυμορφισμούς BsmI, FokI, TaqI, ApaI και Tru9I, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι μόνο τα αλληλόμορφα του BsmI συνδέονται στατιστικά σημαντικώς με τον καρκίνο του προστάτη στον κινεζικό πληθυσμό που μελέτησαν. Πιο συγκεκριμένα, αναφέρουν ότι το αλληλόμορφο B του BsmI σχετίζεται με 1/3 μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης του τύπου αυτού, με 1/5 μεγαλύτερο κίνδυνο χαμηλής διαφοροποίησης και με 1/10 μεγαλύτερο κίνδυνο για πιο επιθετική μορφή καρκίνου του προστάτη σε σχέση με το αλληλόμορφο b (36). Το μελάνωμα (melanoma) αποτελεί μια άλλη μορφή καρκίνου και συγκεκριμένα κακοήθειας του δέρματος, την οποία προσπάθησαν διάφοροι μελετητές να την συσχετίσουν με τους διάφορους πολυμορφισμούς του VDR. Πρόσφατες όμως μελέτες δείχνουν ότι το μελάνωμα δεν εμφανίζει καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τους πολυμορφισμούς TaqI, ApaI, Tru9I του VDR (37).

1.3.2 Υποδοχέας βιταμίνης D (VDR)

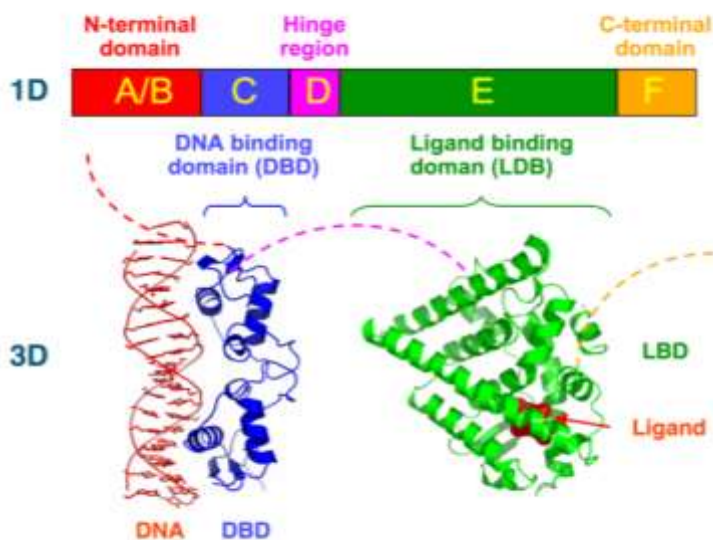
Ο υποδοχέας της βιταμίνης D είναι ένας προσδέτο (1,25(OH)₂D₃) -εξαρτώμενος μεταγραφικός παράγοντας που ανήκει στην υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων (nuclear receptors, NR), η οποία ελέγχει την κυτταρική αύξηση, την διαφοροποίηση, την ομοιόσταση, την ανάπτυξη και ποικίλες άλλες φυσιολογικές διαδικασίες (38).

Σε αυτήν την κατηγορία ο υποδοχέας του 9-cis-ρετινοϊκού οξέος (RXR) σχηματίζει ομοδιμερή αλλά και ετεροδιμερή με περίπου 15 άλλους υποδοχείς. Οι υποδοχείς των στεροειδών ορμονών προσδένονται αποκλειστικά ως ομοδιμερή σε στοιχεία απόκρισης τα οποία αποτελούνται από δυο γειτονικές ημιθέσεις που σχηματίζουν μια παλίνδρομη αλληλουχία. Άλλοι υποδοχείς του πυρήνα, εκτός από τον VDR, που σχηματίζουν ετεροδιμερή με τον RXR είναι ο υποδοχέας της θυροειδούς ορμόνης (T3R) και ο υποδοχέας του cis-ρετινοϊκού οξέος (RAR) (39) (40). Πυρηνικοί υποδοχείς για τη βιταμίνη D έχουν βρεθεί σε περισσότερα από 30 όργανα, όπως στα οστά, το έντερο, τους νεφρούς, τους πνεύμονες, τους μύες και το δέρμα (9).

Τα μέλη της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων παρουσιάζουν μικρή συγγένεια για τους εκάστοτε στόχους τους, υψηλή μεταξύ τους αμινοξική ομοιότητα και υιοθετούν παρόμοιες τρισδιάστατες διαμορφώσεις (40). Με λίγα λόγια, η δομή τους καθορίζεται από έναν αριθμό χαρακτηριστικών λειτουργικών περιοχών (functional domains). Γενικά,

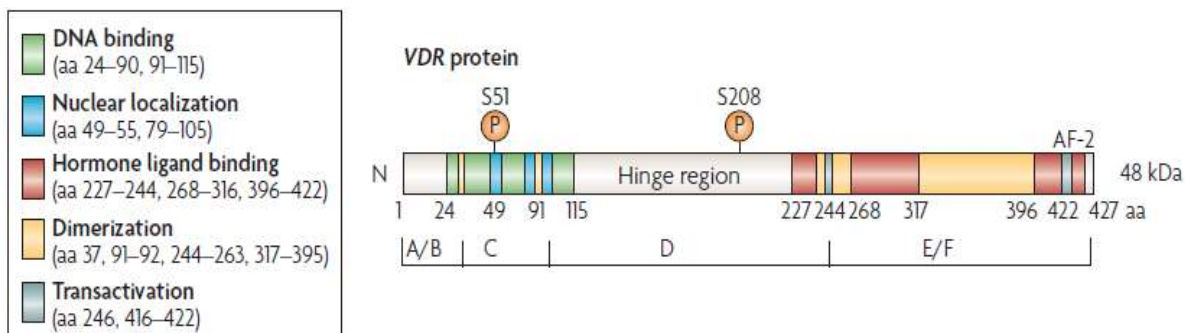
αποτελούνται από το αμινοτελικό άκρο (N-terminal), από την περιοχή ενεργοποίησης AF-1 (A/B domain), την περιοχή πρόσδεσης του DNA (DNA binding domain, DBD), την περιοχή άρθρωσης (hinge region) και τέλος το καρβοξυ-τελικό άκρο πρόσδεσης του προσδέτη που περιέχει μια δεύτερη περιοχή ενεργοποίησης AF-2 (41) (εικόνα 3).

Structural Organization of Nuclear Receptors



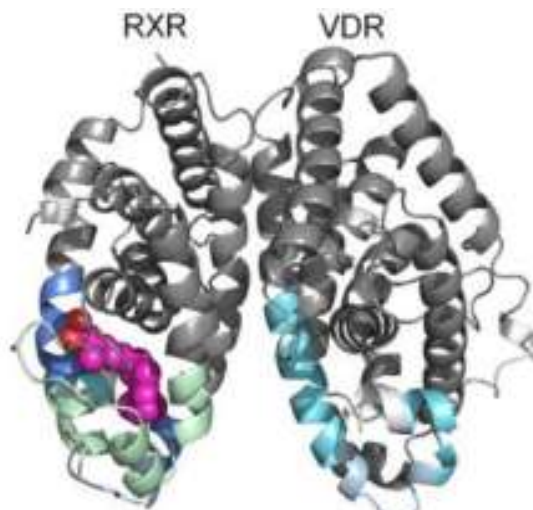
εικόνα 3: τρισδιάστατες διαμορφώσεις της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων.

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά τον υποδοχέα της βιταμίνης D, η περιοχή A/B, όπου αποτελεί την N- τελική περιοχή, είναι μια ευκίνητη μικρή περιοχή που εμφανίζει αυτόνομη λειτουργία ενεργοποίησης, AF-1, ανεξάρτητη του προσδέτη. Η μεταγραφική ενεργοποίηση της AF-1 δρα συνεργειακά με την AF-2 λειτουργία, η οποία χαρακτηρίζει την E περιοχή, για την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Η περιοχή C είναι η περιοχή πρόσδεσης του DNA και αποτελείται από 2 δακτυλίους ψευδαργύρου (zinc fingers) ενώ η περιοχή D αντιστοιχεί στην περιοχή άρθρωσης. Η περιοχή E είναι η περιοχή πρόσδεσης του προσδέτη (ligand binding domain, LBD) και η περιοχή F αποτελεί την C-τελική περιοχή (42).



εικόνα 4: σχηματική αναπαράσταση του γονιδίου του VDR και της κάθε ξεχωριστής περιοχής αυτού (14).

Είναι σημαντικό να ειπωθεί ότι οι δυο έλικες αναγνώρισης του ετεροδιμερούς RXR-VDR προσδένονται σε στοιχεία απόκρισης της βιταμίνης D (VDRE, VDR responsive elements) τα οποία βρίσκονται στις περιοχές του υποκινητή συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων. Οι ημιθέσεις (AGGTCA) αυτών των στοιχείων απόκρισης απέχουν μεταξύ τους τρία ζεύγη βάσεων, έχουν ταυτόσημες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες, οργανώνονται με τη μορφή απλών επαναλήψεων (direct repeats) και ανήκουν στη μεγάλη αύλακα του B-DNA της περιοχής του υποκινητή των γονιδίων στόχων (14) (40). Τόσο η πρόσδεση της καλσιτριόλης όσο και του 9cis RA στο ετεροδιμερές αλλάζουν δυναμικά την σταθερότητα της DBD περιοχής του VDR. Επομένως, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η πρόσδεση διαφόρων προσδετών στον VDR μπορεί να επιφέρει διαφορετικού τύπου αλλαγές της DBD περιοχής του VDR και την ενεργοποίηση διαφορετικών γονιδίων-στόχων (43).



εικόνα 5: το ετεροδιμερές RXR-VDR (43)

1.3.3 Σηματοδοτικό μονοπάτι VDR

Διο είναι οι κύριοι μηχανισμοί (γονιδιακοί και μη) με τους οποίους η καλσιτριόλη ($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) εκδηλώνει τις δράσεις της. Σε μερικές περιπτώσεις πιστεύεται ότι λειτουργεί μέσω οδών μεταγωγής σήματος ύστερα από την πρόσδεση της στους υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης (VDR). Σε άλλες περιπτώσεις, η καλσιτριόλη προάγει γονιδιακές δράσεις μέσω της αλληλεπίδρασης της με τους πυρηνικούς υποδοχείς της βιταμίνης D, επηρεάζοντας έτσι την μεταγραφή γονιδίων (9). Και στις δυο περιπτώσεις η πρόσδεση της καλσιτριόλης στον VDR υποδοχέα συνοδεύεται από τη φωσφορυλίωση του υποδοχέα στην S51 της DBD από την πρωτεϊνική κινάση C και στην S208 της περιοχής άρθρωσης από την κινάση καζεΐνης CKII (14).

Ο μη γονιδιακός μηχανισμός, πιστεύεται ότι αφορά στην πρόσδεση της $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ στον μεμβρανικό VDR (memVDR) και στον κυτταροπλασματικό υποδοχέα VDR και επίσης είναι σημαντικό να ειπωθεί ότι φαίνεται η καλσιτριόλη να εντοπίζεται στα κυστίδια εγκόλπωσης (caveolae, κυστίδια πινοκυττάρωσης που περιέχουν μια αντίστοιχη με την κλαθρίνη πρωτεΐνη, την καβεολίνη (44)). Επίσης, φαίνεται να ενεργοποιεί το σύμπλοκο της MAPK (mitogen-activated protein kinase)-ERK (extracellular signal-regulated kinase) 1 και 2 μέσω φωσφορυλίωσης και ενεργοποίησης της Raf από την πρωτεϊνική κινάση C (PKC, protein kinase), η οποία ενεργοποιείται από την εισροή Ca^{+2} διαμέσου των SOC (store-operated Ca^{+2}) καναλιών. Η καλσιτριόλη διεγείρει την εισροή Ca^{+2} στα SOC κανάλια (στα μυϊκά κύτταρα) από την αγκυροβόληση του κλασικού VDR στη μεμβράνη του πλάσματος, όπου ο VDR αλληλεπιδρά με το κανάλι SOC. Η ενεργός PKC, από την εισροή Ca^{+2} , μπορεί να φωσφορυλιώνει τον VDR. Η σύνδεση της καλσιτριόλης στον υποδοχέα της G πρωτεΐνης (GPCRs, G-protein coupled receptors) ενεργοποιεί τα μονοπάτια της φωσφολιπάσης Cγ (PLCγ), της Ras, της PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) και της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA), και επάγει έτσι την MAPK-ERK 1 και 2 σηματοδότηση. Το ενεργό σύμπλεγμα Raf - MAPK -ERK μπορεί να εμπλέκεται στη σύνδεση (cross-talk) με το κλασικό VDR μονοπάτι ρυθμίζοντας τη γονιδιακή έκφραση.

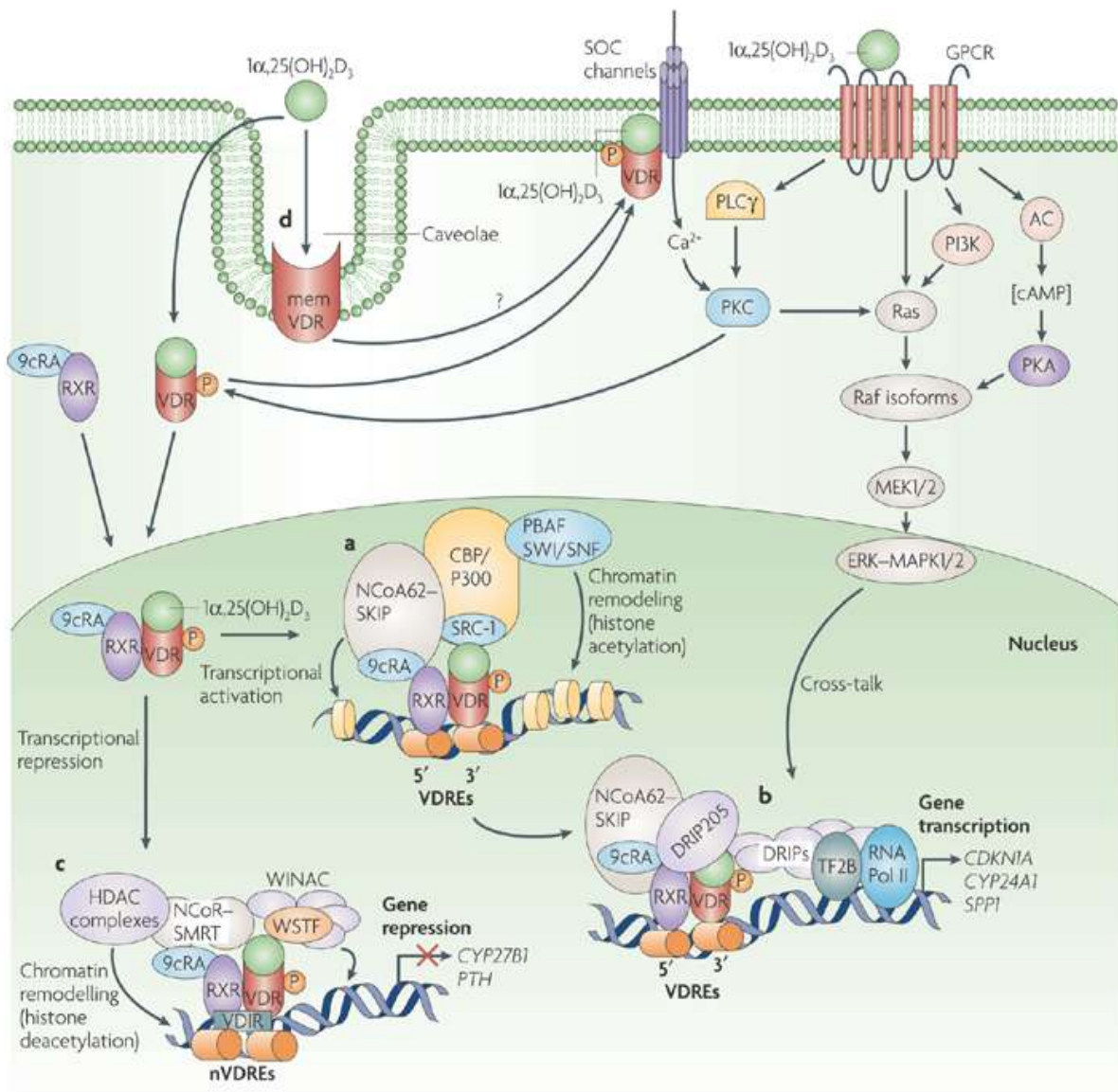
Όσον αφορά στο γονιδιακό μηχανισμό, η μεταγραφική ενεργοποίηση μεσολαβείται από την πρόσδεση του συμπλόκου $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDR-RXR στα θετικά στοιχεία απόκρισης της βιταμίνης D (VDREs) με κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$. Η μεταγραφική ενεργοποίηση προϋποθέτει την συναρμολόγηση ποικίλων συν-ενεργοποιητών (14). Γενικά, οι συν-ρυθμιστές (coregulators) των πυρηνικών υποδοχέων NRs μπορούν να χαρακτηριστούν ως κυτταρικοί παράγοντες που στρατολογούνται από τους NRs που λειτουργούν ως μεσολαβητές κυτταρικής απόκρισης σε ενδοκρινικά σήματα. Οι συρρυθμιστές χωρίζονται σε αυτούς που προάγουν την μεταγραφική ενεργοποίηση, συν-ενεργοποιητές (coactivators), και σε εκείνους που καταστέλλουν τη δραστηριότητα του υποκινητή, συγκαταστολείς (corepressors) (41). Οι συν-ενεργοποιητές μπορούν να διαιρεθούν σε τρεις κύριες

κατηγορίες : α)σε ATP - εξαρτώμενα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης των νουκλεοσωμάτων β)σε ένζυμα που καταλύουν τροποποιήσεις των ουρών των ιστονών για τη ρύθμιση των αλληλεπιδράσεων ιστόνης - ιστόνης και ιστόνης – DNA, γ)σε γενικούς προσαρμοστικούς παράγοντες μεταγραφής που γεφυρώνουν τις λειτουργίες μεταξύ των ρυθμιστών και της βασικής μεταγραφικής συσκευής (39) (45).Οι συν-ενεργοποιητές στο συγκεκριμένο σηματοδοτικό μονοπάτι περιλαμβάνουν αρχικά τους SRCs (steroid receptor coactivators), την NCoA62–SKIP (nuclear coactivator-62 kDa–Ski-interacting protein), τις HATs (histone acetyltransferases), την (CBP)–p300 (CREB binding protein (CBP)–p300) και τον παράγοντα PBAF–SNF (polybromo- and SWI-2-related gene 1 associated factor) για την ακετυλίωση ιστονών στην άρση της καταστολής της χρωματίνης. Έπειτα, η πρόσδεση της DRIP205 πρωτεΐνης (vitamin D receptor-interacting protein 205) στην περιοχή ενεργοποίησης AF2 του VDR (και RXR) προσελκύει ένα σύμπλοκο-μεσολαβητή που περιλαμβάνει και άλλες πρωτεΐνες αλληλεπίδρασης με την βιταμίνη D (DRIPs, vitamin D receptor-interacting proteins) που γεφυρώνουν το VDR-RXR-NCoA62-SKIP- DRIP205 σύμπλεγμα με τον παράγοντα μεταγραφής 2B (TF2B, transcription factor 2B) και την RNA πολυμεράση II (RNA Pol II) για την έναρξη της μεταγραφής. Η παρουσία του πολύ-πρωτεϊνικού συμπλόκου διευκολύνει τη μεταγραφή γονιδίων, όπως του CDKN1A (το οποίο κωδικοποιεί τον αναστολέα της κύκλινο-εξαρτώμενης κινάσης p21) , του CYP24A1 και του SPP1 (το οποίο κωδικοποιεί την οστεοποντίνη) (14).

Όσον αφορά την $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -μεσολαβούμενη μεταγραφική καταστολή περιλαμβάνει την πρόσδεση του ετεροδιμερούς VDR-RXR και της VDIR (VDR-interacting repressor) στο πλαίσιο τύπου E (E-box-type) των αρνητικών στοιχείων απόκρισης του VDR (nVDREs, negative VDREs)(DR3-type) , την απομάκρυνση του HAT συν-ενεργοποιητή και τη στρατολόγηση της απακετυλάσης των ιστονών (HDAC, histone deacetylase) (14) (46) .Ο παράγοντας WSTF (Williams syndrome transcription factor) ενισχύει την μεταγραφική καταστολή αλληλεπιδρώντας με ένα ATP εξαρτώμενο πολυλειτουργικό σύμπλοκο, το WinAC (ATP-dependent chromatin-remodelling complex) και με τη χρωματίνη. Αυτό οδηγεί στην καταστολή των γονιδίων, όπως του CYP27B1 και του PTH (το οποίο κωδικοποιεί την παραθυρεοειδής ορμόνη). Η περιοχή του υποκινητή των γονιδίων αυτών αποτελείται από το μοτίβο τύπου CANNTG, το οποίο είναι χαρακτηριστικό των DR3-τύπου στοιχείων απόκρισης (14) (47).

Άλλα παραδείγματα γονιδίων με στοιχεία απόκρισης τύπου DR3 τα οποία ενεργοποιούνται μεταγραφικά από την $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ είναι το γονίδιο της 24-OHάσης (CYP24A1) που αναφέρθηκε νωρίτερα, το γονίδιο της οστεοκαλσίνης BGLAP61 που εκφράζεται στους οστεοβλάστες και το γονίδιο CDKN1A του αναστολέα της p21 που είναι μια εξαρτώμενη από την κυκλίνη κινάση, CDK(cyclin dependent kinase). Αντίθετα, σε αυτή την κατηγορία ανήκει και το γονίδιο της PTH το οποίο καταστέλλεται μεταγραφικά από την $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Αν και συνήθως τα στοιχεία απόκρισης VDREs εντοπίζονται στον υποκινητή των γονιδίων-στόχων, στο γονίδιο GADD45 (growth arrest and DNA-damage-

inducible) εντοπίστηκε στο εξώνιο 4. Η μεσολαβούμενη από την $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ μεταγραφική καταστολή ή ενεργοποίηση πολλών πρώτο-ογκογονιδίων ή ογκοκατασταλτικών γονιδίων περιγράφεται τόσο σε φυσιολογικούς όσο και σε καρκινικούς ιστούς. Παρόλα αυτά, λίγα είναι αυτά τα γονίδια που περιέχουν στοιχεία απόκρισης VDREs και βρίσκονται υπό τον μεταγραφικό έλεγχο της $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Τέτοια είναι το γονίδιο της CDKN1A και της CCNC, το οποίο κωδικοποιεί τη κυκλίνη C και περιέχει στοιχεία απόκρισης DR4 τύπου VDRE.



Nature Reviews | Cancer

εικόνα 4: η $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -μεσολαβούμενη μεταγραφική ρύθμιση (14).

1.3.4 Γονίδια-στόχοι του σηματοδοτικού μονοπατιού της βιταμίνης D

Έρευνες έχουν δείξει ότι η βιταμίνη D ελέγχει ένα πλήθος γονιδίων σε όλη την έκταση του γονιδιώματος (11). Γενετικές μελέτες έχουν δείξει τις επιδράσεις της $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ τόσο στην έκφραση γονιδίων όσο και σε επιγενετικές τροποποιήσεις. Εκτιμάται ότι ο VDR ρυθμίζει είτε άμεσα είτε έμμεσα την έκφραση μεγάλου αριθμού γονιδίων (6) με τον αριθμό τους να φτάνει τα 200 έως 2000 γονίδια που έχουν στοιχεία απόκρισης για τη βιταμίνη D ή επηρεάζονται έμμεσα από αυτήν. Σε μια πρόσφατη μελέτη (2013) μικροσυστοιχιών (microarray) για την επίδραση των επιπέδων της βιταμίνης D και των συμπληρωμάτων βιταμίνης D_3 στην έκφραση του γονιδιώματος των λευκοκυττάρων του αίματος πριν και μετά τη χορήγηση συμπληρωμάτων βιταμίνης D_3 διαπίστωθηκε ότι μια καλή συγκέντρωση $25(\text{OH})\text{D}_3$ του ορού σχετίζεται με τουλάχιστον $1 \frac{1}{2}$ φορά αλλαγή στην έκφραση 291 γονιδίων. Η ίδια μελέτη προτείνει ότι οποιαδήποτε βελτίωση των επιπέδων της βιταμίνης D θα επηρέαζε σημαντικά την έκφραση ποικίλων γονιδίων των οποίων οι βιολογικές λειτουργίες εμπλέκονται σε πάνω από 80 μεταβολικά μονοπάτια που συνδέονται με τον καρκίνο, με αυτοάνοσες διαταραχές και καρδιαγγειακή νόσο (διαταραχές που έχουν συσχετισθεί με ανεπάρκεια της βιταμίνης D) (11).

Η κατανόηση της ιστο-ειδικής ρύθμισης των ενζύμων σύνθεσης της βιταμίνης D αλλά και των μεταβολικών προϊόντων της βοήθησε στην καλύτερη κατανόηση των παθολογικών καταστάσεων που σχετίζονται με το μονοπάτι της βιταμίνης D. Η καλσιτριόλη αποτελεί το προϊόν εκείνο που ρυθμίζει τόσο με αυτοκρινή όσο και με παρακρινή τρόπο την λειτουργία και τη σηματοδότηση της βιταμίνης D.

Η 1 α -υδροξυλάση εκφράζεται κυρίως στα νεφρά, στο παχύ έντερο, στον εγκέφαλο, στον πλακούντα, στο πάγκρεας, στους λεμφαδένες και στο δέρμα, επιτρέποντας έτσι τη τοπική μετατροπή της $25(\text{OH})\text{D}_3$ σε $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Είναι σημαντικό να ειπωθεί ότι αυξημένη έκφραση του γονιδίου CYP27B1 της 1 α -υδροξυλάσης παρατηρείται στον καρκίνο του μαστού και του προστάτη καθώς και κατά τη διάρκεια της πρώιμης εξέλιξης του όγκου του παχέος εντέρου υψηλού έως μέτριου διαφοροποιημένου σταδίου. Ενώ, παρατηρείται μείωση των επιπέδων έκφρασης του CYP27B1 σε χαμηλής διαφοροποίησης καρκίνωμα του παχέως εντέρου. Αυξημένη έκφραση του CYP27B1 γονιδίου σε καρκινικούς ιστούς οδηγεί σε τοπική μετατροπή της $25(\text{OH})\text{D}_3$ σε $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ γεγονός που μπορεί να ενισχύσει την άποψη ότι τόσο η $25(\text{OH})\text{D}_3$ όσο και η $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ μπορεί να παίζουν έναν ρόλο χημειοπρόληψης (chemoprevention) έναντι στον καρκίνο.

Ωστόσο, η αυξημένη έκφραση του CYP24A1 γονιδίου σε όγκους, φαίνεται πως εξουδετερώνει την αντι-πολλαπλασιαστική ενεργότητα της $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, προφανώς μέσω της μείωσης των επιπέδων της $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Η ομάδα του Cross και των συνεργατών του (2005) απέδειξε ότι η αυξημένη έκφραση του CYP24A1 γονιδίου και η μειωμένη έκφραση του CYP27B1 μπορούν να συμβούν σε προχωρημένα στάδια καρκινώματος του

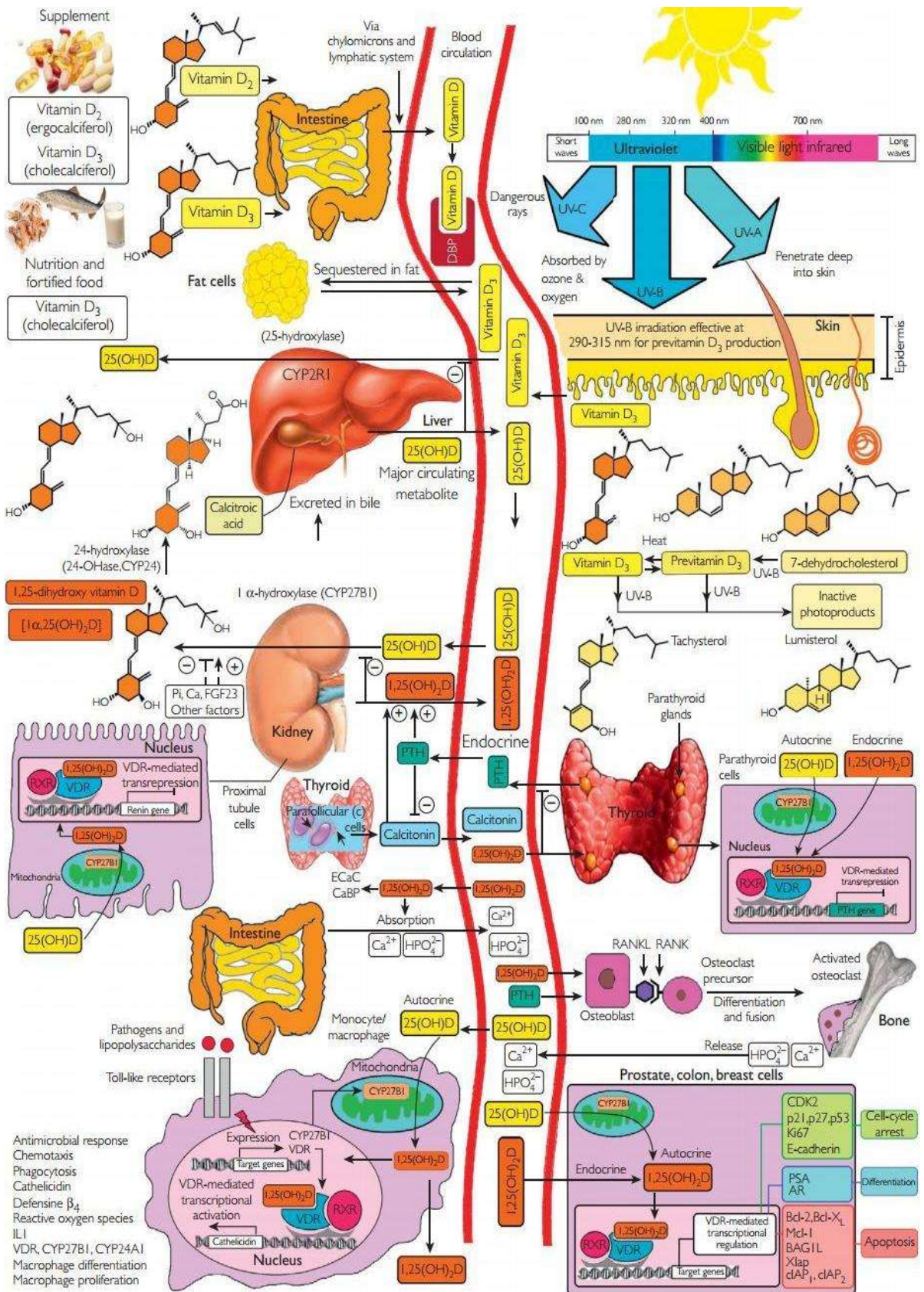
παχέος εντέρου. Λόγω της ενίσχυσης της χρωμοσωμικής περιοχής 20q13.2 του CYP24A1 σε ανθρώπινους μαστικούς όγκους και της αυξημένης έκφρασης του CYP24A1 γονιδίου (άρα και μείωση των επιπέδων της $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) σε ανθρώπινα δείγματα όγκων από πνεύμονα, παχύ έντερο και ωοθήκη, φαίνεται πως η αναστολή της έκφρασης της δραστηριότητας του CYP24A1 γονιδίου είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική πρόληψη. Μικρά μόρια αναστολέων με διαφορετική εξειδίκευση για την 24-ΟΗάση καθιστούν τα καρκινικά κύτταρα πιο ευαίσθητα στην δράση της $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ και των αναλόγων της υποδεικνύοντας έτσι τη δυνητική χρήση αναστολέων της 24-ΟΗάσης για την πρόληψη και τη θεραπεία του καρκίνου (14).

1.4 Λειτουργίες και μηχανισμοί δράσης της βιταμίνης D

Η καλσιτριόλη, $1,25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$, η ενεργή μορφή της βιταμίνης D, λειτουργεί ως στεροειδής ορμόνη. Αρχικά, επικρατούσε η άποψη ότι τα όργανα-στόχοι της ήταν το έντερο, τα οστά και οι νεφροί. Η παρουσία, όμως, μεμβρανικών υποδοχέων της ορμόνης σε πάνω από 30 ιστούς και όργανα άλλαξε τα δεδομένα, σύμφωνα με τα οποία τα όργανα-στόχοι της βιταμίνης D είναι εκτός των άλλων η καρδιά, οι μύες, ο εγκέφαλος, τα β-κύτταρα του παγκρέατος, το δέρμα και κάποια κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.), ο ρόλος του ενδοκρινικού συστήματος της βιταμίνης D και η παρουσία του υποδοχέα της σε έχουν μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό (2) (9).

Ως ορμόνη, η κύρια δράση της καλσιτριόλης στο σώμα είναι να δρα μαζί με την ορμόνη του παραθυροειδούς (Parathyroid Hormone, PTH) για τη ρύθμιση της ομοιόστασης της συγκέντρωσης του ασβεστίου στο αίμα. Η υποασβεστιναιμία (χαμηλή συγκέντρωση ασβεστίου στο αίμα) διεγείρει την έκκριση της PTH από τους παραθυροειδείς αδένες. Η PTH, με τη σειρά της, διεγείρει την 1α -υδροξυλάση στους νεφρούς και έτσι η 25-OH-D_3 μετατρέπεται σε καλσιτριόλη. Στη συνέχεια, η καλσιτριόλη δρα είτε μόνη της, ή μαζί με την PTH, στους ιστούς-στόχους της προκαλώντας αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου και του φωσφόρου (9).

Στην εικόνα 7 απεικονίζονται όλοι οι ιστοί-στόχοι και οι δράσεις της βιταμίνης D. Οι τέσσερις όμως βασικοί ιστοί-στόχοι είναι το έντερο, τα οστά, τα κύτταρα του ανοσοποιητικού και οι νεφροί. Συνοπτικά μπορούμε να πούμε ότι στο έντερο αυξάνει την απορρόφηση του Ca^{+2} και του P, ενώ στα οστά αυξάνει την επιμετάλλωση (mineralization) αυτών. Στα κύτταρα του ανοσοποιητικού προάγει τη διαφοροποίησή τους ενώ με τον ίδιο τρόπο φαίνεται πως λειτουργεί και στους όγκους. Επιπρόσθετα, στην τελευταία περίπτωση πιστεύεται ότι καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό ασκώντας έτσι αντικαρκινικό ρόλο αλλά καταστέλλει και την αγγειογένεση (14).



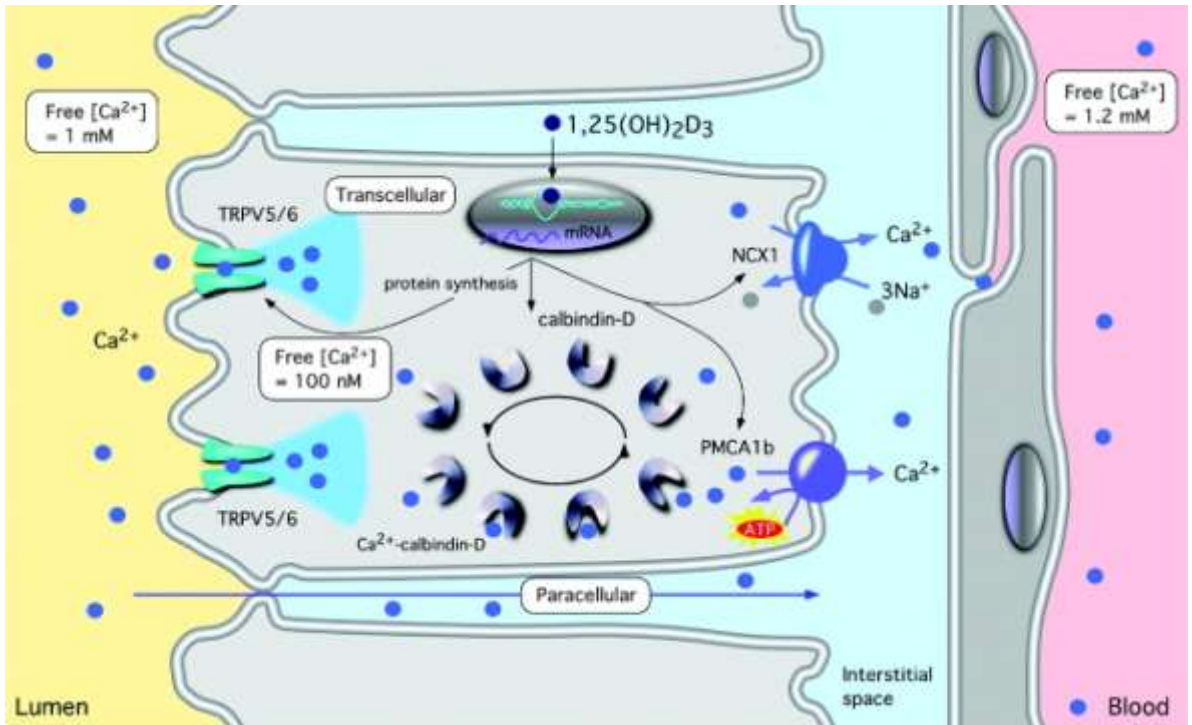
εικόνα 7: σχηματική αναπαράσταση όλων των ιστών-οργάνων που είναι στόχοι της βιταμίνης D καθώς και οι δράσεις σε αυτά (11).

1.4.1 Καλσιτριόλη και έντερο

Το έντερο αποτελεί τον πιο καλά μελετημένο ιστό-στόχο της καλσιτριόλης. Η κύρια λειτουργία της σε αυτόν τον ιστό είναι η αύξηση της απορρόφησης του ασβεστίου και του φωσφόρου (9). Τρεις είναι οι κύριοι ιστοί που ρυθμίζουν το μεταβολισμό και την ισορροπία του ασβεστίου σε όλο το ανθρώπινο σώμα, το έντερο, τα νεφρά και τα οστά (48). Όσον αφορά το έντερο μεταφέρεται διαμέσου του εντεροκυττάρου χρησιμοποιώντας την παρακυτταρική (paracellular pathway) ή την διακυτταρική οδό (transcellular pathway).

Η παρακυτταρική οδός είναι κατά κύριο λόγο μια παθητική μη ελεγχόμενη διαδικασία η οποία πραγματοποιείται με βάση τη διαβάθμιση της συγκέντρωσης του ασβεστίου και λαμβάνει χώρα σε όλο το μήκος του λεπτού εντέρου. Ενώ η διακυτταρική οδός είναι μια ελεγχόμενη διαδικασία που ρυθμίζεται σε μεγάλο βαθμό από την καλσιτριόλη και λαμβάνει χώρα στο δωδεκαδάκτυλο και την εγγύς νήστιδα (7) (49) (50). Σε αυτή την οδό πιστεύεται ότι η βιταμίνη λειτουργεί μέσω αλληλεπιδράσεων τόσο με τους υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης, όσο και με πυρηνικούς υποδοχείς για την επίδραση στην έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων (9). Αυτά τα γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες όπως οι πρωτεΐνες μεταφοράς του Ca^{+2} , TRPV5 (Transient receptor potential vanilloid member 5) και TRPV6 (Transient receptor potential vanilloid member 6), οι καλβιδίνες (calbindins), μια ATP-εξαρτώμενη από Ca^{+2} -ATPάσης (PMCA1b) και έναν $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ αντισταφορέα (NCX1), οι οποίες δρουν στην ψηκτροειδή παρυφή, το κυτταρόπλασμα και/ή τη βασικοπλευρική μεμβράνη των εντεροκυττάρων για την αύξηση της απορρόφησης του ασβεστίου (7) (9). Οι καλβιδίνες, είναι πρωτεΐνες δέσμευσης του ασβεστίου στο εντερικό βλεννογόνο και φαίνεται ότι συντίθενται σε απόκριση στη δράση της καλσιτριόλης (9).

Όσον αφορά την ομοιότητα του ασβεστίου στο εντερικό επιθήλιο, η καλσιτριόλη πιστεύεται ότι προκαλεί μεταβολές στη σύσταση και την τοπολογία της ψηκτροειδούς παρυφής των εντεροκυττάρων, οι οποίες επίσης οδηγούν στην αύξηση της απορρόφησης του ασβεστίου. Η βιταμίνη D μπορεί να προκαλέσει άμεση και ταχεία απορρόφηση του ασβεστίου από το έντερο, μια διαδικασία που αναφέρεται ως transcaltachia (9). Η διακυτταρική μεταφορά του Ca^{+2} πραγματοποιείται σε τρία βήματα. Αρχικά όταν το Ca^{+2} από τον αυλό εισέρχεται στο εντεροκύτταρο μέσω των έτερο-τετραμερών καναλιών Ca^{+2} , TRPV5 και TRPV6 (50). Τα κανάλια αυτά εκφράζονται σε μεγαλύτερο βαθμό στο δωδεκαδάκτυλο σε σύγκριση με την νήστιδα και τον ειλέο. Στις γυναίκες, τα επίπεδα έκφρασης των καναλιών αυτών μειώνονται με τη γήρανση, γεγονός που εξηγεί εν μέρει την σχετιζόμενη με την ηλικία ελάττωση της απορρόφησης του ασβεστίου σε αυτές (49). Ύστερα από την είσοδο του ασβεστίου στο εντεροκύτταρο δεσμεύεται από την καλβιδίνη και διαχέεται προς την βασικοπλευρική μεμβράνη. Σε αυτήν εξωθείται εξωκυττάρια μέσω μιας ATP-εξαρτώμενης από Ca^{+2} -ATPάσης (PMCA1b) και ενός $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ αντισταφορέα (NCX1) (50)(εικόνα 8).



εικόνα 8: παρακυτταρική και διακυτταρική μεταφορά του ασβεστίου στο έντερο (Journal of the American society of nephrology).

Χαμηλή διαιτητική πρόσληψη του ασβεστίου αλλά και αυξημένες διαιτητικές απαιτήσεις σε αυτό λόγω ανάπτυξης, εγκυμοσύνης ή θηλασμού μειώνουν τα επίπεδα του ασβεστίου στον ορό του αίματος. Τα μειωμένα αυτά επίπεδα του ασβεστίου ενεργοποιούν την ορμονική σύνθεση της καλσιτριόλης, η οποία με τη σειρά της δρα στο εντερικό επιθήλιο αυξάνοντας την απορρόφηση του ασβεστίου (51). Τα επιθυμητά επίπεδα της βιταμίνης D είναι αναγκαία για να επιτευχθεί αύξηση της απορρόφησης του ασβεστίου. Χωρίς επαρκή βιταμίνη D, το σώμα απορροφά όχι περισσότερο από το 10% με 15% του διαιτητικού προσλαμβανόμενου ασβεστίου. Επαρκή επίπεδα βιταμίνης D μπορούν να αυξήσουν την εντερική απορρόφηση του ασβεστίου από 30% μέχρι και 40% (49). Πειράματα σε ποντίκια έδειξαν ότι knockout ποντίκια του γονιδίου του υποδοχέα της βιταμίνης D ανέπτυξαν οστεομαλακία και ραχίτιδα, οι οποίες ήταν αντιστρέψιμες με δίαιτα υψηλή σε ασβέστιο και λακτόζη. Επιπλέον, τόσο η συγκέντρωση του ασβεστίου όσο και της PTH επανερχόντουσαν στα φυσιολογικά επίπεδα (49) (51). Αν όμως η αύξηση της εντερικής απορρόφησης του ασβεστίου δεν καταφέρει να επαναφέρει το ασβέστιο στα φυσιολογικά του επίπεδα τότε η καλσιτριόλη και η PTH κινητοποιούν το ασβέστιο από τα οστά και αυξάνουν την επαναρρόφηση του ασβεστίου από τα νεφρικά σωληνάκια (51). Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών δείχνουν ότι η κύρια λειτουργία της βιταμίνης D είναι

να αυξάνει την εντερική απορρόφηση του ασβεστίου για τη σωστή επιμετάλλωση των οστών (49).

Όσον αφορά το φώσφορο, πιστεύεται ότι η καλσιτριόλη αυξάνει την ενεργότητα της αλκαλικής φωσφατάσης της ψηκτροειδούς παρυφής των εντεροκυττάρων και έτσι προκαλεί αύξηση της εντερικής απορρόφησης του φωσφόρου σε ποσοστό από 60% μέχρι και 80% (3) (9). Το ένζυμο αυτό υδρολύει τους δεσμούς των φωσφορικών εστέρων, κάνοντας έτσι δυνατή την απορρόφηση του φωσφόρου. Η καλσιτριόλη πιστεύεται επίσης ότι μπορεί να επηρεάσει τον αριθμό των μεταφορέων που είναι διαθέσιμοι στη μεμβράνη της ψηκτροειδούς παρυφής του εντέρου (κυρίως της νήστιδας και ειλεού) για την εξαρτώμενη από το νάτριο απορρόφηση του φωσφόρου (9).

1.4.2 Καλσιτριόλη και οστά

Στα μέσα του 1600 τα περισσότερα παιδιά των βιομηχανικών πόλεων της βόρειας Ευρώπης εμφάνιζαν σοβαρές οστικές παραμορφώσεις οι οποίες συνοδευόντουσαν από καθυστέρηση στην ανάπτυξη, επιμήκυνση της επίφυσης των μακρών οστών, δυσμορφία των κάτω άκρων, κάμψη της σπονδυλικής στήλης, οστέινες προεκβολές των πλευρών και αδύναμους και άτονους μύες (3). Η ραχίτιδα ή οστεομαλακία όπως ονομάστηκε δεν ήταν απόλυτα διαφοροδιαγνωσμένη από την οστεοπόρωση μέχρι το 1885 όταν ο Pommer έδειξε ότι η οστεοπόρωση δεν οφείλεται στην μετακίνηση του ασβεστίου από τα οστά αλλά στην αποτυχία εναπόθεσης ασβεστίου στα νέα οστά (52). Αυτοψία σε παιδιά της Ολλανδίας και της Βοστώνης στις αρχές του 1900 έδειξαν ότι ο επιπολασμός της ραχίτιδας ήταν στο 80-90%. Μέσα στο 19^ο και 20^ο αιώνα, οι κύριες ανακαλύψεις σχετικά με την παθογένεια και την αντιμετώπιση της ραχίτιδας είχαν πραγματοποιηθεί. Το 1822, η σπουδαιότητα της έκθεσης στον ήλιο ως θεραπεία για την ραχίτιδα είχε αναγνωρισθεί από τον Sniadecki. Το 1890, αυτές οι παρατηρήσεις επεκτάθηκαν και η έκθεση στον ήλιο δινόταν ως σύσταση από τον Palm. Το 1919 ο Huldschinski ανακάλυψε ότι όταν εξέθεσε παιδιά σε UV ακτινοβολία από λάμπα χαλαζία ή κάρβουνου η ραχίτιδά τους αντιμετωπιζόταν. Το 1918, ο Mellanby και οι συνεργάτες του εμπόδισαν την εμφάνιση ραχίτιδας σε κουτάβια με τη χορήγηση μωρουινόλαδου. Ο McCollum και οι συνεργάτες του ονόμασαν για πρώτη φορά αυτό το διατροφικό παράγοντα του μωρουινόλαδου, ως βιταμίνη D. Επιπλέον, οι Hess & Weinstock και Steenbock & Black παρατήρησαν ότι η UV ακτινοβολία διαφόρων τροφίμων και ελαίων τους πρόσδιδε αντιραχίτιδική ενεργότητα (3) (7).

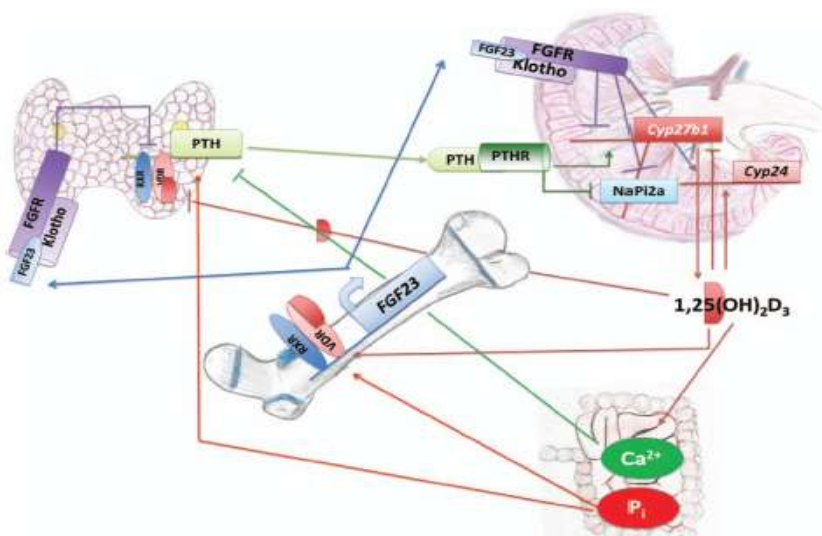
Η καλσιτριόλη επηρεάζει τη κυτταρική διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη σε μια ποικιλία διαφορετικών ιστών. Για παράδειγμα, σε απάντηση στις γονιδιακές επιδράσεις της, ενεργοποιούνται οι οστεοβλάστες, οι οποίοι παράγουν τον παράγοντα διαφοροποίησης οστεοκλαστών, ο οποίος με τη σειρά του προάγει τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών. Η κυτταρική διαφοροποίηση των αρχέγονων κυττάρων του μυελού των οστών σε οστεοκλάστες (μια διαδικασία που προάγεται από την καλσιτριόλη), αυξάνει τον αριθμό των οστεοκλαστών, προάγοντας έτσι την κινητοποίηση του ασβεστίου και του φωσφόρου στα οστά, έτσι ώστε να επιτευχθεί μια φυσιολογική συγκέντρωση ασβεστίου στο αίμα (9).

Πιο συγκεκριμένα, όταν τα επίπεδα ασβεστίου στο αίμα ξεπεράσουν τις φυσιολογικές συγκεντρώσεις, απελευθερώνεται η καλσιτονίνη (η ορμόνη που παράγεται από τα ενδοκρινή κύτταρα που βρίσκονται στο συνδετικό ιστό του θυροειδούς αδένου), η οποία προωθεί τη εναπόθεση ασβεστίου και φωσφόρου στα οστά (επιμετάλλωση) (9). Η καλσιτριόλη ή ο μεταβολίτης 24,25(OH)₂D₃ μπορούν επίσης να εμπλέκονται στην επιμετάλλωση των οστών. Τα αυξημένα επίπεδα καλσιτριόλης στον ορό και τα αυξημένα επίπεδα του ιονισμένου ασβεστίου προκαλούν μείωση της παραγωγής της PTH μέσω ενός μηχανισμού παλίνδρομης ρύθμισης, ο οποίος μπορεί να είναι είτε έμμεσος είτε άμεσος. Η

έμμεση ρύθμιση οφείλεται στην ανασταλτική επίδραση των αυξημένων επιπέδων ιόντων ασβεστίου στην έκκριση PTH. Η άμεση ρύθμιση οφείλεται στη μείωση της μεταγραφής του γονιδίου της παραθυροειδούς ορμόνης από την καλσιτριόλη, προφανώς αντιδρώντας με τον υποδοχέα της βιταμίνης D στον παραθυροειδή ιστό και επηρεάζοντας τη ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου της PTH (3) (9).

Επιπλέον κατά τη διάρκεια διαφόρων σταδίων διαφοροποίησης και πιθανόν πολλαπλασιασμού των οστικών κυττάρων, η 24,25-(OH)₂D₃ ενεργοποιεί τη σύνθεση διαφόρων πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη διαμόρφωση και την επαναδιαμόρφωση των οστών. Στους οστεοβλάστες η καλσιτριόλη ενεργοποιεί επίσης τη σύνθεση του κολλαγόνου τύπου I αλλά και μη-κολλαγονούχων πρωτεϊνών, μεταξύ των οποίων η οστεοποντίνη και η οστεοκαλσίνη, καθώς και οι ενεργοποιητές του πλασμινογόνου, η κολλαγονάση και η αλκαλική φωσφατάση (9).

Ποικίλες μελέτες δείχνουν ότι η επάρκεια της βιταμίνης D είναι ζωτικής σημασίας για την φυσιολογική ανάπτυξη του σκελετού κατά την παιδική ηλικία αλλά και την διατήρηση της σκελετικής αρτιότητας κατά την ενήλικη ζωή. Ανεπάρκεια της βιταμίνης D κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης σχετίζεται με σημαντική μείωση της οστικής πυκνότητας σε έμβρυα, η οποία μπορεί να επιμένει και 9 χρόνια μετά τη γέννηση. Στους ενήλικες η χαμηλή συγκέντρωση 25(OH)D και η υψηλή συγκέντρωση PTH επίσης οδηγούν σε χαμηλά επίπεδα προϊόντων ασβεστίου και φωσφόρου γεγονός που προκαλεί οστεομαλακία. Η ελαττωματική αυτή επιμετάλλωση του κολλαγόνου της μήτρας του οστού προκαλεί μείωση της υποστηρικτικής ικανότητας του σκελετού και σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο καταγμάτων. Αποτελέσματα της μελέτης NHANES III (National Health and Nutrition Examination Survey) έδειξε ότι η οστική πυκνότητα των γοφών σχετίζεται άμεσα με τα επίπεδα του 25(OH)D ανεξαρτήτου φύλου και εθνότητας (3). Άλλες τυχαίες μελέτες απέδειξαν ότι η βιταμίνης D με ή χωρίς το ασβέστιο μείωσε το κίνδυνο εμφάνισης ισχιακών και/ή μη σπονδυλικών καταγμάτων κατά 20-30% (15) (49).



εικόνα 9: ρυθμιστικοί μηχανισμοί μεταξύ οστού, νεφρών, παραθυροειδούς αδένου και εντέρου (82)

1.4.3 Καλσιτριόλη και ανοσοποιητικό σύστημα

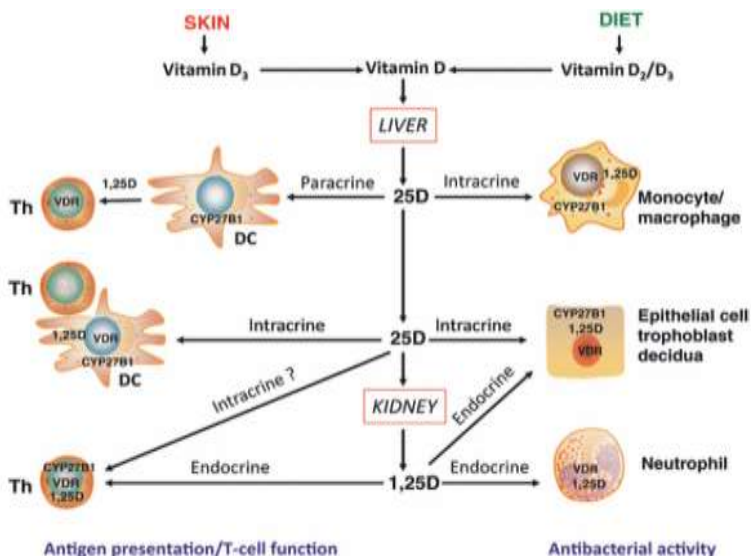
Ποικίλα επιστημονικά δεδομένα υπογραμμίζουν τον σημαντικό ρόλο της βιταμίνης D ως ενεργοποιητή τόσο του έμφυτου (innate) όσο και του επίκτητου ανοσοποιητικού συστήματος (adaptive immune system). Τα μεταβολικά ένζυμα της βιταμίνης D αλλά και ο υποδοχέας της είναι παρόντα σε πολλούς τύπους κυττάρων του ανοσοποιητικού όπως στα αντιγονοπαρουσιαστικά T και B λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα/μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η έκφραση του VDR σε αυτά τα κύτταρα είναι χαμηλή σε μη ενεργοποιημένες συνθήκες. Αντίθετα σε συνθήκες ενεργοποίησης και πολλαπλασιασμού των T και B κυττάρων φαίνεται πως εκφράζονται περισσότερα από 500 γονίδια που φέρουν στοιχεία απόκρισης για την βιταμίνη D τα οποία προωθούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση αυτών των κυττάρων (53). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί μια αντίστροφη σχέση μεταξύ των συγκεντρώσεων της βιταμίνης D και της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP), ένας δείκτης φλεγμονής, τόσο σε υγιή άτομα όσο και σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα και αδυναμία. Επίσης, η ανασταλτική δράση της βιταμίνης D επί της φλεγμονώδους απόκρισης οδηγεί σε μια πιθανή σύνδεση αυτής της βιταμίνης με τα τελομερή των λευκοκυττάρων ως προς το μήκος και το ρυθμό κοντέματός τους (54).

Στα B κύτταρα, η αντιπολλαπλασιαστική επίδραση της καλσιτριόλης περιλαμβάνει την καταστολή της διαφοροποίησης, του πολλαπλασιασμού, της έναρξης της απόπτωσης και την μείωση της παραγωγής των ανοσοσφαιρινών. Πρόσφατες μελέτες επιβεβαιώνουν τον ρόλο της καλσιτριόλης στην ομοιοστάση των B κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων της καταστολή της παραγωγής των πλασματοκυττάρων και κυττάρων μνήμης καθώς και της προώθησης της απόπτωσης των B κυττάρων που παράγουν ανοσοσφαιρίνες. Αυτός ο έλεγχος της ενεργοποίησης και του πολλαπλασιασμού των B κυττάρων πιστεύεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στις αυτοάνοσες παθήσεις, αφού η παραγωγή των αυτοαντιδραστικών αντισωμάτων από τα B κύτταρα παίζει πρωταρχικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της αυτοανοσίας (55).

Όσον αφορά τα T κύτταρα τέσσερις είναι οι πιθανοί μηχανισμοί κατά τους οποίους φαίνεται η βιταμίνη D να επηρεάζει την λειτουργία τους (εικόνα 10):

1. Άμεσα, ενδοκρινικές επιδράσεις της καλσιτριόλης στα T κύτταρα
2. Άμεσα, αυτοκρινή μετατροπή της 25(OH)D σε καλσιτριόλη από τα T κύτταρα
3. Άμεσα, παρακρινικές επιδράσεις της καλσιτριόλης στα T κύτταρα επηρεάζοντας την μετατροπή της 25(OH)D σε καλσιτριόλη από τα μονοκύτταρα και δενδριτικά κύτταρα.
4. Έμμεσες επιδράσεις στην παρουσίαση του αντιγόνου στα T κύτταρα από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC) που έχουν αλληλεπιδράσει με την καλσιτριόλη.



εικόνα 10: οι πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους επηρεάζει η βιταμίνη d τα κύτταρα του ανοσοποιητικού (55).

Πιο αναλυτικά όσον αφορά τους διαφόρους υποτύπους των T κυττάρων η καλσιτριόλη καταστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των T βοηθητικών κυττάρων (Th), και ρυθμίζει την παραγωγή κυτοκινών τους. Ειδικότερα, θεραπείες με καλσιτριόλη ή ανάλογα αυτής αναστέλλουν την έκκριση προφλεγμονωδών κυτοκινών των Th1 (IL2, ιντερφερόνη-γ, παράγοντα νέκρωσης όγκων α (TNFα)), των Th9 (IL9) και των Th22 (IL22), αλλά προωθεί την παραγωγή περισσότερων αντι-φλεγμονωδών κυτοκινών των Th2 (IL3, IL4, IL5, IL10) (55). Επίσης, είναι σημαντικό να ειπωθεί ότι μειώνει την έκφραση των μορίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας MCH-II στην επιφάνεια των κυττάρων αλλά και μορίων όπως CD86, CD80 και CD40 (56) (57).

Η παραγωγή της IL17 από τα Th17 φαίνεται να επηρεάζεται και αυτή από την βιταμίνη D. Η αναστολή της δραστηριότητας των Th17 φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη θεραπεία των αυτοάνοσων νοσημάτων, όπως φαίνεται σε πειράματα με μη-παχύσαρκους διαβητικούς (NOD) ποντικούς. Πρόσφατα, η καλσιτριόλη βρέθηκε να καταστέλλει άμεσα την παραγωγή της IL17 σε μεταγραφικό επίπεδο. Επίσης, μια άλλη μελέτη έδειξε ότι ενεργοποιημένα ανθρώπινα T-κύτταρα που εκτέθηκαν σε καλσιτριόλη παρήγαγαν σημαντικά μειωμένα επίπεδα IL17, ιντερφερόνη-γ και IL21 (55) (58).

Η ίδια μελέτη πρόσθεσε ένα συνδυασμό από καλσιτριόλη και IL2 σε πρωτογενείς καλλιέργειες ανθρώπινων T κυττάρων και παρατήρησε αύξηση της έκφρασης των γονιδίων των ρυθμιστικών-κατασταλτικών Tα λεμφοκυττάρων (Tregs). Τα Tregs φαίνεται ότι διεγείρονται έμμεσα από την βιταμίνη D, μέσω των APC τα οποία παραμένουν σε μία ανώριμη κατάσταση ύστερα από θεραπεία με βιταμίνη D και ως εκ τούτου παρουσιάζουν λιγότερα αντιγόνα. Η άμεση οδός περιλαμβάνει την αυτοκρινή μετατροπή της 25(OH)D σε

καλσιτριόλη στα Tregs (53) (55) (58).

Ποικίλες επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν συσχέτιση της ανεπάρκειας της βιταμίνης D με υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης αυτοάνοσων νόσων, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου I (T1D), η σκλήρυνση κατά πλάκας (MS), ο συστηματικός ερυθρηματώδης λύκος (SLE), η ρευματοειδής αρθρίτιδα (RA) και η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (IBD) (55) (56) (59). Επίσης, είναι σημαντικό να ειπωθεί ότι πειράματα ChIP-seq σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος δείχνουν ότι περιοχές του γονιδιώματος, κοντά σε αυτές που έχουν συσχετισθεί με αυτοάνοσες νόσους, εμφανίζουν ποικίλες θέσεις πρόσδεσης του VDR (60).

Στην προσπάθεια πολλών ερευνητικών ομάδων να ερμηνεύσουν τη σχέση της ανεπάρκειας της βιταμίνης D με τις αυτοάνοσες νόσους μελέτησαν την πιθανή ύπαρξη συσχέτισης των νόσων αυτών με τους πολυμορφισμούς του υποδοχέα της βιταμίνης. Μια τέτοια μελέτη που πραγματοποιήθηκε από το πανεπιστήμιο της Κρήτης έχοντας υπόψη ποικίλες μελέτες που δείχνουν μείωση του κινδύνου για T1D σε παιδιά που λάμβαναν συμπληρώματα βιταμίνης τα πρώτα χρόνια της παιδικής τους ηλικίας (61) και σε παιδιά που οι μητέρες τους λάμβαναν συμπληρώματα κατά την εγκυμοσύνη (62), θέλησαν να βγάλουν τα δικά τους συμπεράσματα για τον ελληνικό πληθυσμό της Κρήτης. Σε αυτή τη μελέτη έλαβαν μέρος 100 ασθενείς με T1D και 96 άτομα ελέγχου τα οποία εξετάστηκαν ως προς τους τέσσερις κοινούς πολυμορφισμούς του υποδοχέα της βιταμίνης D (ApaI, BsmI, FokI, TaqI). Η μελέτη κατέληξε στο συμπέρασμα ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών και της ομάδας ελέγχου και συγκεκριμένα αναφέρει ότι η ομάδα των ασθενών εμφάνισε λιγότερο συχνά το αλληλόμορφο B (BsmI) και F (FokI) ενώ εμφάνισε πιο συχνά το αλληλόμορφο A (ApaI) και T (TaqI) (63).

Υπάρχουν πολυάριθμες μελέτες που συσχετίζουν την σκλήρυνση κατά πλάκας και την οστεοπόρωση με την ανεπάρκεια της βιταμίνης D και με τους πολυμορφισμούς του υποδοχέα της. Έτσι μια ελληνική μελέτη του 2011 θέλησε να εξετάσει την ύπαρξη συσχέτισης των πολυμορφισμών BsmI και TaqI σε ασθενείς με MS και σε υγιείς. Όμως, τα αποτελέσματα τους δείχνουν ότι δεν υπάρχει καμιά στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του κινδύνου εμφάνισης MS και των ανωτέρω πολυμορφισμών αλλά και του δείκτη μάζας σώματος (BMI) και του δείκτη της οστικής πυκνότητας (BMD) στον ελληνικό πληθυσμό που μελέτησαν (64).

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει επιτάχυνση του κοντέματος των τελομερών σε κύτταρα της κυκλοφορίας ασθενών με SLE. Το μήκος των τελομερών των λευκοκυττάρων (LTL) είναι ένας προγνωστικός δείκτης ασθενειών που σχετίζονται με την ηλικία και μειώνεται με κάθε κυτταρικό κύκλο και φλεγμονή. Μελέτη του Ηνωμένου Βασιλείου κατέδειξε την ύπαρξη θετικής σχέσης μεταξύ του μήκους των τελομερών των λευκοκυττάρων και των επιπέδων της 25(OH)D. Η ομάδα του Hoffecker και των συνεργατών του απέδειξαν ότι η αύξηση των επιπέδων της 25(OH)D μπορεί να είναι ευεργετική τόσο στην επιβράδυνση όσο και την πρόληψη της πρόωρης κυτταρικής

γήρανσης και ότι μετρήσεις των αντι-τελομερικών αντισωμάτων χρησιμεύουν ως ένας σημαντικός βιοδείκτης του SLE (65).

Τα τελευταία 40 χρόνια, αρκετές κλινικές μελέτες ασχολήθηκαν με το αν τα επίπεδα της βιταμίνης D σε ανθρώπους σχετίζονται με τον κίνδυνο ανάπτυξης αυτοανοσίας και με το αν η ανάπτυξη ή η εξέλιξη αυτών μπορεί να επηρεαστεί από συμπληρώματα βιταμίνης D. Σε μια πρόσφατη συστηματική ανασκόπηση αναλύονται τα αποτελέσματα από 219 δημοσιευμένες μελέτες όπου φαίνεται η βιταμίνη D να παίζει έναν ευεργετικό ρόλο στην πρόληψη της αυτοανοσίας, αλλά εξακολουθεί να υπάρχει έλλειψη τυχαιοποιημένων ελεγχόμενων κλινικών δοκιμών σε αυτόν τον τομέα (55).

Πρόσφατες μελέτες έχουν στρέψει το ενδιαφέρον τους στην δημιουργία VDR αγωνιστών (agonists) που έχουν ως σκοπό την εφαρμογή ενός ανοσοκατασταλτικού σχήματος με στόχο είτε την αντιμετώπιση μιας αυτοάνοσης νόσου είτε την αποφυγή απόρριψης μοσχεύματος. Συγκεκριμένα, η ομάδα της Scolletta και των συνεργατών της έχουν δημοσιεύσει δυο VDR προσδέτες, τον BXL-01-0029 και τον BXL-628 (elocalcitol), οι οποίοι επάγουν καταστολή των φλεγμονωδών διεργασιών της ανοσοαπόκρισης μειώνοντας την απελευθέρωση της CXCL10 ή αλλιώς IFN- γ . Άλλες ομάδες έχουν δημοσιεύσει άλλους VDR-αγωνιστές όπως του KH1060 για την αντιμετώπιση του T1D ή του TX527 για την αντιμετώπιση του IBD (66).

1.4.4 Επαρκής πρόσληψη και ανεπάρκεια βιταμίνης D.

Ενώ, σε γενικές γραμμές, η ανεπάρκεια μακροθρεπτικών συστατικών είναι εύκολο να διαγνωστούν κλινικά, η ανεπάρκεια μικροθρεπτικών συστατικών τις περισσότερες φορές δεν μπορούν να διαγνωστούν κλινικά και απαιτούν περαιτέρω βιοχημικές εξετάσεις. Ο καλύτερος δείκτης των επιπέδων της βιταμίνης D στον οργανισμό μας αποτελεί η συγκέντρωση της 25(OH)D₃ στον ορό του αίματος. Όταν τα επίπεδα της 25(OH)D₃ πέσουν κάτω από 12ng/mL (30 nmol/L, 2.5nmol/L serum 25(OH)D=1ng/ml serum 25(OH)D) τότε μιλάμε για έλλειψη βιταμίνης D. Παρόλα αυτά πολύ άνθρωποι εμφανίζουν έλλειψη και σε συγκεντρώσεις 12-20 ng/mL (67). Όταν τα επίπεδα της 25(OH)D₃ κυμαίνονται από 21-29 ng/mL (52,5-72,5 nmol/L) τότε μιλάμε για ανεπάρκεια βιταμίνης D, ενώ τα επίπεδα 30-100 ng/mL (75-250 nmol/L) αντιπροσωπεύουν τα φυσιολογικά επίπεδα της βιταμίνης D (17) (68) (69). Μελέτες δείχνουν ότι δόση πάνω από 50.000 IU/μέρα μπορεί να οδηγήσει σε συγκεντρώσεις 25(OH)D₃ υψηλότερες των 150 ng/mL και να προκαλέσει τοξικότητα (3) (4).

Οι συστάσεις για την κατάλληλη ποσότητα της βιταμίνης D που πρέπει να λαμβάνεται για την σωστή υγεία του οργανισμού είναι αμφιλεγόμενες. Πιστεύεται ότι η σύσταση των 400IU(10μg) βιταμίνης D ανά μέρα είναι ανεπαρκής. Πρόσφατα, το ινστιτούτο IOM (Institute of Medicine) εξέδωσε νέες συστάσεις για την βιταμίνη D στα 600 IU/μέρα για άτομα από 1 μέχρι 70 ετών ενώ για άτομα άνω των 70 ετών την αυξημένη δόση των 800 IU/μέρα (58). Σε περίπτωση μη επαρκούς έκθεσης στον ήλιο είναι απαραίτητη η δόση των 800-1000 IU/μέρα ώστε να επιτευχθούν φυσιολογικά επίπεδα της βιταμίνης D (70). Επίσης, είναι σημαντικό να ειπωθεί ότι και δόσεις που φτάνουν τα 4000 IU/μέρα έχουν θεωρηθεί από πολλούς ασφαλείς (67). Παρακάτω, παρατίθεται ο αναλυτικός πίνακας των συστάσεων του ινστιτούτου IOM για την βιταμίνη D για όλες της ηλικιακές ομάδες (71).

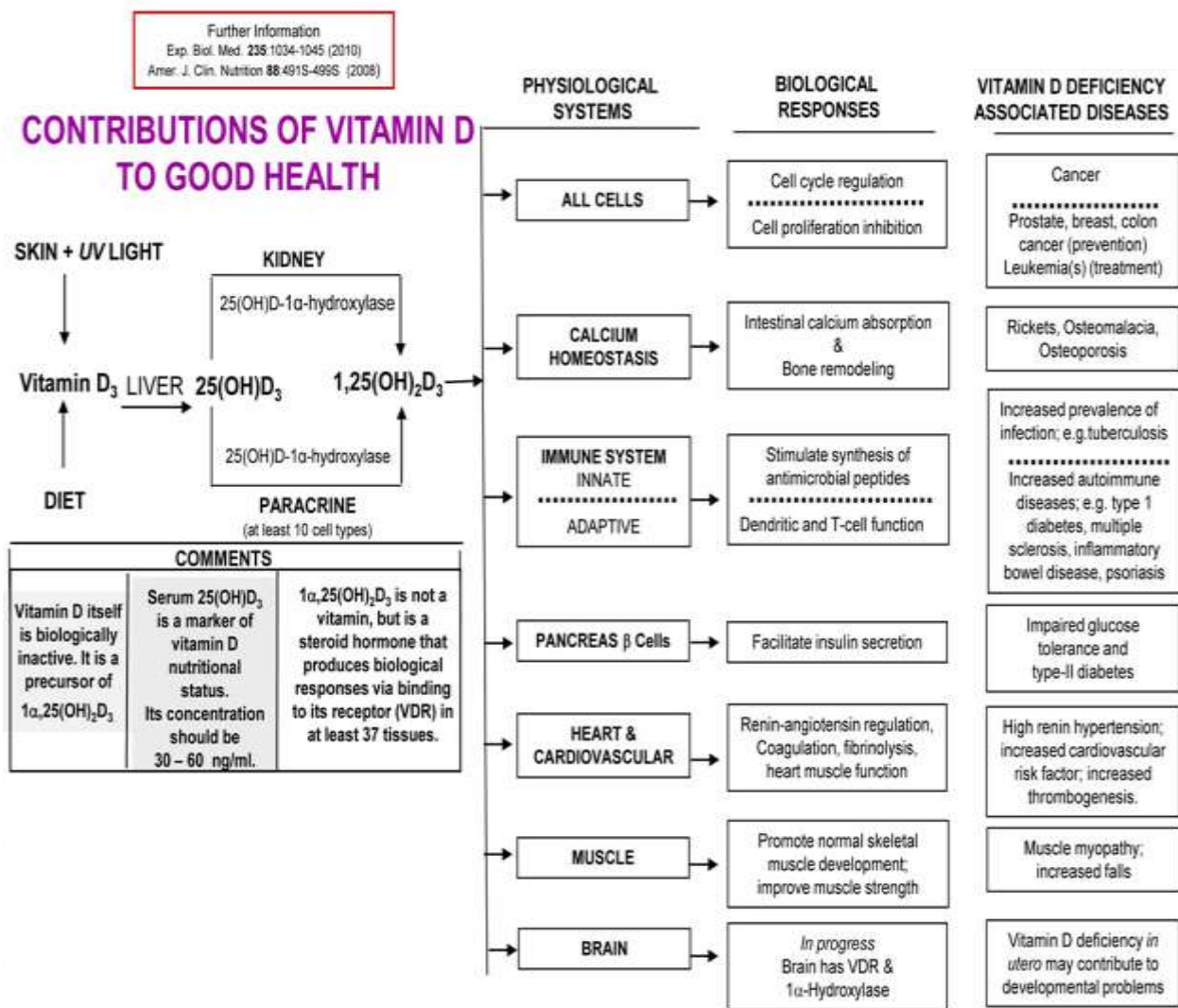
Life Stage Group	IOM Recommendations				Committee recommendations for patients at risk for vitamin D deficiency	
	AI	EAR	RDA	UL	Daily requirement	UL
INFANTS						
0 to 6 months	400 IU (10 µg)			1,000 IU (25 µg)	400–1,000 IU	2,000 IU
6 to 12 months	400 IU (10 µg)			1,500 IU (38 µg)	400–1,000 IU	2,000 IU
CHILDREN						
1–3 yr		400 IU (10 µg)	600 IU (15 µg)	2,500 IU (63 µg)	600–1,000 IU	4,000 IU
4–8 yr		400 IU (10 µg)	600 IU (15 µg)	3,000 IU (75 µg)	600–1,000 IU	4,000 IU
MALES						
9–13 yr		400 IU (10 µg)	600 IU (15 µg)	4,000 IU (100 µg)	600–1,000 IU	4,000 IU
14–18 yr		400 IU (10 µg)	600 IU (15 µg)	4,000 IU (100 µg)	600–1,000 IU	4,000 IU
19–30 yr		400 IU (10 µg)	600 IU (15 µg)	4,000 IU (100 µg)	1,500–2,000 IU	10,000 IU
31–50 yr		400 IU (10 µg)	600 IU (15 µg)	4,000 IU (100 µg)	1,500–2,000 IU	10,000 IU
51–70 yr		400 IU (10 µg)	600 IU (15 µg)	4,000 IU (100 µg)	1,500–2,000 IU	10,000 IU
> 70 yr		400 IU (10 µg)	800 IU (20 µg)	4,000 IU (100 µg)	1,500–2,000 IU	10,000 IU
FEMALES						
9–13 yr		400 IU (10 µg)	600 IU (15 µg)	4,000 IU (100 µg)	600–1,000 IU	4,000 IU
14–18 yr		400 IU (10 µg)	600 IU (15 µg)	4,000 IU (100 µg)	600–1,000 IU	4,000 IU
19–30 yr		400 IU (10 µg)	600 IU (15 µg)	4,000 IU (100 µg)	1,500–2,000 IU	10,000 IU
31–50 yr		400 IU (10 µg)	600 IU (15 µg)	4,000 IU (100 µg)	1,500–2,000 IU	10,000 IU
51–70 yr		400 IU (10 µg)	600 IU (15 µg)	4,000 IU (100 µg)	1,500–2,000 IU	10,000 IU
> 70 yr		400 IU (10 µg)	800 IU (20 µg)	4,000 IU (100 µg)	1,500–2,000 IU	10,000 IU
PREGNANCY						
14–18 yr		400 IU (10 µg)	600 IU (15 µg)	4,000 IU (100 µg)	600–1,000 IU	4,000 IU
19–30 yr		400 IU (10 µg)	600 IU (15 µg)	4,000 IU (100 µg)	1,500–2,000 IU	10,000 IU
31–50 yr		400 IU (10 µg)	600 IU (15 µg)	4,000 IU (100 µg)	1,500–2,000 IU	10,000 IU
LACTATION^a						
14–18 yr		400 IU (10 µg)	600 IU (15 µg)	4,000 IU (100 µg)	600–1,000 IU	4,000 IU
19–30 yr		400 IU (10 µg)	600 IU (15 µg)	4,000 IU (100 µg)	1,500–2,000 IU	10,000 IU
31–50 yr		400 IU (10 µg)	600 IU (15 µg)	4,000 IU (100 µg)	1,500–2,000 IU	10,000 IU

AI, Adequate intake; EAR, estimated average requirement; UL, tolerable upper intake level.

a Mother's requirement, 4,000–6,000 IU/d (mother's intake for infant's requirement if infant is not receiving 400 IU/d).

πίνακας 1: συστάσεις για την βιταμίνη D από τον ΙΟΜ.

Συνεισφορά του ενδοκρινικού συστήματος της βιταμίνης D στον οργανισμό και οι συνέπειες της ανεπάρκειάς της.



εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση του ενδοκρινικού συστήματος της βιταμίνης D και οι συνέπειες της ανεπάρκειάς της σε όλο τον οργανισμό (80).

2. Αντικείμενο μελέτης

Η ενασχόληση παγκοσμίως πολυάριθμων επιστημονικών ομάδων με το ενδοκρινικό σύστημα της βιταμίνης D σε φυσιολογικές και μη καταστάσεις, ο ρόλος της ανεπάρκειας της βιταμίνης D σε ποικίλες παθολογικές καταστάσεις και των πολυμορφισμών του υποδοχέα της σε αυτές αλλά και ο πολύ μικρός αριθμός τέτοιων μελετών στον ελληνικό χώρο, μας οδήγησαν στην απόφαση να ασχοληθούμε και εμείς με αυτό το επίκαιρο θέμα της βιταμίνης D και του υποδοχέα της.

Το ενδοκρινικό σύστημα της βιταμίνης D, όπως έχει αρχίσει να καθιερώνεται, εγείρει όλο και πιο πολύ το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας λόγω των νέων δημοσιεύσεων που δείχνουν τη βιταμίνη D να διαδραματίζει μείζων ρόλο σε πληθώρα φυσιολογικών λειτουργιών. Επίσης, η ανακάλυψη ότι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί του υποδοχέα της, VDR, μπορούν να επηρεάσουν ακόμα και τα επίπεδα αυτής, έδωσε νέα σκοπιά επιστημονικής μελέτης.

Τόσο η ευρεία συμμετοχή του VDR όσο και η πληθώρα των βιολογικών δράσεων της $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ μπορούν να εξηγήσουν πώς η βιταμίνη D μπορεί να εμποδίσει ποικίλες ασθένειες (6). Έτσι, η συσχέτιση της ανεπάρκειάς της, που έχει χαρακτηριστεί ως πανδημία, με πολλές οξείες αλλά και χρόνιες παθήσεις όπως διαταραχές του μεταβολισμού του ασβεστίου, αυτοάνοσες παθήσεις, κάποιοι τύποι καρκίνου, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II, οι καρδιαγγειακές και λοιμώδεις νόσοι, η μυϊκή αδυναμία είναι μερικά από τα θέματα ενασχόλησης επιστημονικών ομάδων ανά τον κόσμο (3) (4).

Η δικιά μας μελέτη ασχολήθηκε με 104 άτομα, από τα οποία 69 είναι γυναίκες και 35 άντρες, που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της 3^{ης} φάσης της Velestino study. Η 3^η φάση παρακολούθησης της Velestino study πραγματοποιήθηκε το Σάββατο 19 και την Κυριακή 20 Οκτωβρίου 2013 στη πόλη του Βελεστίνου.

Ο πρωταρχικός στόχος της Velestino study είναι να αναζητήσει σε άτομα ηλικίας άνω των 60 ετών, τη σχέση μεταξύ των συστατικών διατροφής όπως φυλλικού οξέος και βιταμίνης B12 με (α) την κατάθλιψη και (β) τη γνωστική δυσλειτουργία. Κατά τη διάρκεια της 3^{ης} φάσης εξυπηρετήθηκαν με σειρά ιατρικών εξετάσεων 149 ηλικιωμένοι που επισκέφτηκαν το χώρο του Κέντρου Υγείας του Βελεστίνου, ενώ πραγματοποιήθηκαν και 12 κατ'οίκον επισκέψεις με συμβολή του προγράμματος «βοήθεια στο σπίτι» σε όσους ήταν κληίρεις. Ανταποκρινόμενο στις ανάγκες των κατοίκων, το πρόγραμμα εμπλούτισε τις παρεχόμενες υπηρεσίες για ορθοπεδική, γυναικολογική, δερματολογική και διατροφική εξέταση και έλεγχο της σύστασης σώματος, πέραν του ελέγχου γενικής υγείας και διαταραχών του ύπνου, καρδιολογικής, νευρολογικής, ψυχολογικής/ψυχιατρικής, οφθαλμολογικής και ωτορινολαρυγγολογικής εξέτασης. Λόγω εποχικότητας, στην 3^η επίσκεψη δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στη συμπλήρωση των εμβολιασμών των ηλικιωμένων με έμφαση στον εμβολιασμό για γρίπη και πνευμονιόκοκκο.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η συσχέτιση της σύστασης του σώματος του δείγματος με τα αλληλόμορφα των τεσσάρων πολυμορφισμών του VDR (AraI, BsmI, FokI & TaqI) που μελετάμε. Γι' αυτό το σκοπό, αρχικά συλλέχθηκαν ανθρωπομετρικά δεδομένα όσον αφορά τον ΔΜΣ, την περιφέρεια ομφαλού, το κοιλιακό λίπος, το ποσοστό της λιπώδους, μυϊκής και οστικής μάζας. Έπειτα έγιναν αναλύσεις του αίματος ώστε να γίνει ταυτοποίηση των γονοτύπων ως προς τους τέσσερις πολυμορφισμούς του VDR. Πιο αναλυτικά, προσπαθήσαμε να δούμε αν υπάρχει κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του κάθε αλληλομόρφου για κάθε πολυμορφισμό με τους τέσσερις από τους ανωτέρω ανθρωπομετρικούς δείκτες (ΔΜΣ, περιφέρεια ομφαλού, κοιλιακό λίπος, ποσοστό της λιπώδους μάζας).

3. Μεθοδολογία

3.1 Μέτρηση ανθρωπομετρικών στοιχείων

Η συλλογή των ανθρωπομετρικών δεδομένων του δείγματος αφορούσε πληροφορίες για το βάρος, το ύψος, την περίμετρο μέσης, ισχίου και κοιλιάς (στο σημείο του ομφαλού), τη διαβάθμιση του σπλαχνικού λίπους (visceral fat rating) καθώς και το συνολικό ποσοστό λίπους.



εικόνα 12: λιπομετρητής Tanina Body Composition Analyzer, BC-420 MA

Οι μετρήσεις του βάρους, της διαβάθμισης του σπλαχνικού λίπους καθώς και του ποσοστού του σωματικού λίπους πραγματοποιήθηκαν με τον λιπομετρητή Tanina Body Composition Analyzer, BC-420 MA. Ενώ οι μετρήσεις της περιμέτρου μέσης, ισχίων και κοιλιάς πραγματοποιήθηκαν με την βοήθεια της μεζούρας seca. Τέλος, η μέτρηση του ύψους έγινε με την βοήθεια αναστημόμετρου.



εικόνα 13: μεζούρα seca

Η διαβάθμιση σπλαχνικού λίπους (Visceral Fat Rating), αποτελεί μέρος μέτρησης του λιπομετρητή Tanita Body Composition Analyzer, BC-420 MA και αφορά τη διαβάθμιση του σπλαχνικού λίπους. Η μέθοδος υπολογισμού της στηρίζεται στην βιοηλεκτρική αγωγιμότητα και έχει εφαρμογή σε ηλικίες 18 έως και 99 ετών. Η διαβάθμιση σπλαχνικού λίπους, δεδομένων των τελευταίων χρόνων, χρησιμοποιείται σε πολλές έρευνες και έχει συσχετιστεί θετικά με την παχυσαρκία και την ανάπτυξη καρδιαγγειακών ασθενειών (72).

WEIGHT	56.2kg
FAT %	21.0 %
FAT MASS	12.2kg
FFM	46.0kg
MUSCLE MASS	43.7kg
TBW	32.1kg
TBW %	55.2 %
BONE MASS	2.3kg
BMR	5774 kJ 1380kcal
METABOLIC AGE	12
VISCERAL FAT RATING	1
BMI	18.2
IDEAL BODY WEIGHT	70.5kg
DEGREE OF OBESITY	-17.4 %

DESIRABLE RANGE	
FAT %	21.0-32.9 %
FAT MASS	12.2-22.8kg

εικόνα 14: απόκομμα του λιπομετρητή tanina.

Στο τέλος της διαδικασίας της μέτρησης ο λιπομετρητής Tanita, εκδίδει εκτυπωμένα τα αποτελέσματα των μετρήσεων στα οποία μεταξύ άλλων αναγράφεται και ο αριθμός της διαβάθμισης σπλαχνικού λίπους. Ο αριθμός αυτός κυμαίνεται μεταξύ 1 και 59. Αποτελέσματα μεταξύ 1 και 9 υποδεικνύει φυσιολογικά επίπεδα σπλαχνικού λίπους, ενώ αποτελέσματα μεταξύ 10 και 59 δείχνουν αυξημένα επίπεδα σπλαχνικού λίπους (73).

3.2 Συλλογή αίματος

Με τη βοήθεια μιας νοσηλεύτριας πραγματοποιήσαμε τη συλλογή 2,5 ml αίματος από τον πληθυσμό μας. Τα δείγματα αίματος τοποθετήθηκαν σε σωληνάκια συλλογής αίματος με αντιπηκτικό παράγοντα και αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη.

3.3 Απομόνωση gDNA από ανθρώπινο αίμα

Το γενωμικό DNA των δειγμάτων απομονώθηκε από τα λευκοκύτταρα ολικού αίματος με το εμπορικά διαθέσιμο kit Nucleospin Blood του οίκου Macherey – Nagel, ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η μέθοδος βασίζεται σε χρωματογραφία συγγένειας. Αναλυτικά η διαδικασία έχει ως εξής:

Υλικά για την αντίδραση:

- Πρωτεΐνάση K (Macherey-Nagel)
- Διάλυμα λύσης (Buffer lysis B₃, Macherey-Nagel)
- Απόλυτη αιθανόλη (Molecular Biology Grade)
- Διάλυμα πλύσης BW (Wash buffer, Macherey-Nagel)
- Διάλυμα B₅ (Macherey-Nagel)
- Διάλυμα έκλυσης BE (Elution buffer, Macherey-Nagel)
- Στήλη διαχωρισμού (Macherey-Nagel)

Πειραματική διαδικασία:

Παρασκευάζουμε μείγμα ύστερα από ανάμειξη 25μl πρωτεΐνάσης K, 200 μl αίμα και 200 μl διάλυμα B₃. Αφού κάνουμε καλή ανάμειξη με vortex πραγματοποιούμε επώαση στους 70°C για 30'. Με το τέλος της επώασης φυγοκεντρούμε για 1' στις 11.000g και προσθέτουμε 210 μl απόλυτης αιθανόλης στο υπερκείμενο. Προσθέτουμε όλο το μείγμα στη στήλη διαχωρισμού της Macherey-Nagel και πραγματοποιούμε φυγοκέντρωση για 1' στις 11.000g. Αφού αλλάξουμε δοχείο συλλογής προσθέτουμε 500 μl από το διάλυμα WB και φυγοκεντρούμε για 1' στις 11.000g. Αφού αλλάξουμε δοχείο συλλογής προσθέτουμε 600 μl από το διάλυμα B₅ και φυγοκεντρούμε για 1' στις 11.000g. Πραγματοποιούμε άλλη μια φυγοκέντρωση, αφού αλλάξουμε δοχείο συλλογής, για 1' στις 11.000g. Βάζουμε τα τελικά σωληνάκια (ependorf) στη στήλη, προσθέτω 70μl από το διάλυμα έκλυσης (BE), το οποίο έχει προεπωαστεί στους 70°C και φυγοκεντρούμε για 1' στις 11.000g.

3.4 Ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος του DNA

3.4.1 Φωτομέτρηση

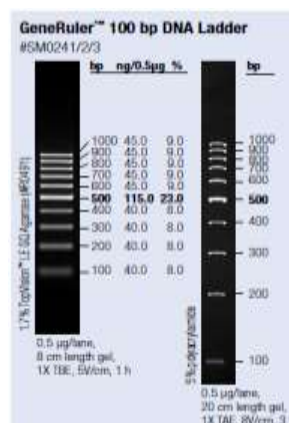
Με την μέθοδο της φωτομέτρησης επιτυγχάνεται ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA αλλά και της καθαρότητας του. Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) μετά από έκθεση του αραιωμένου με DEPC-ddH₂O δείγματος σε υπεριώδη ακτινοβολία μήκους κύματος 260 nm και 280 nm. Η ποσότητα του DNA προκύπτει από τον τύπο : τιμή OD στα 260nm x αραιώση x 50 = ng/μl DNA. Η καθαρότητα του DNA εκτιμάται από τον λόγο OD 260nm/OD 280nm > 1.5

3.4.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

Υλικά:

- Αγαρόζη (molecular biology grade)
- TBE 1 X (89mM Tris, 89mM βορικό οξύ, 2.5mM EDTA, ph=8.0)
- Loading dye solution 6X (10mM Tris-HCL (ph=7.6), 0.03% bromophenol blue, 0.03% xylene cyanol FF, 60% γλυκερόλη, 60mM EDTA)
- 100bp Ladder Invitrogen
- χρωστική βρωμιούχου αιθυλίου (EtBr) 10mg/ml
- DEPC-ddH₂O

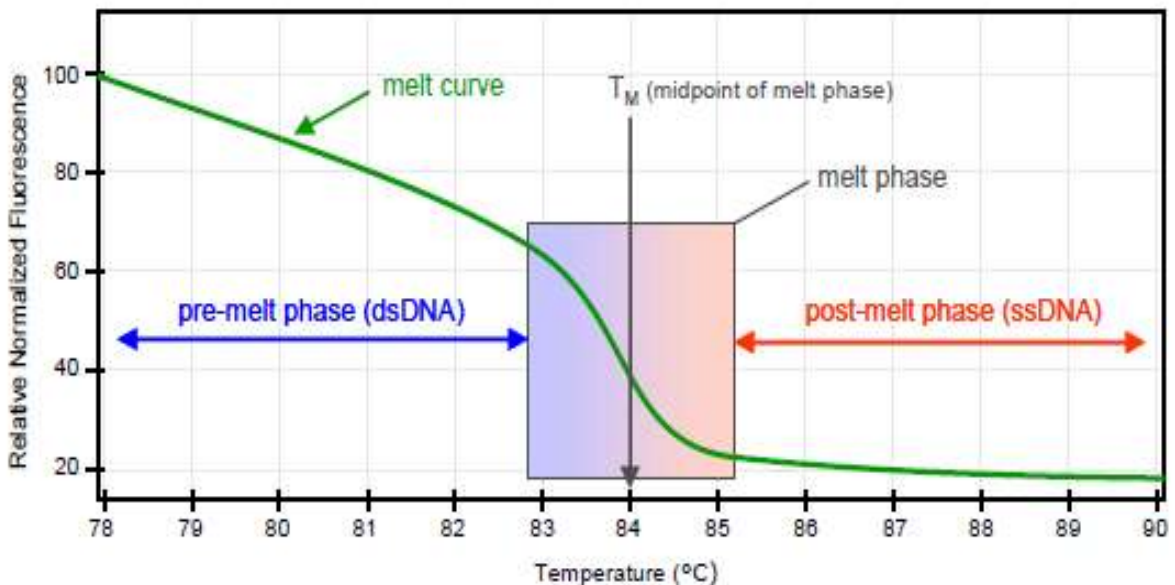
Με τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης του DNA σε πηκτή αγαρόζης επιτυγχάνεται ο ποιοτικός έλεγχος του. Παρασκευάζεται πηκτή αγαρόζης 1% w/v σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x TBE σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης . Αφού κρυώσει καλά η πηκτή προστίθεται σε αυτή χρωστική EtBr (1,8μl σε 40ml πηκτής). Σε 4 μl από το DNA των δειγμάτων προστίθενται 2μl loading dye solution 6X. Ως μάρτυρας εντοπισμού των ζωνών του γενωμικού DNA χρησιμοποιήθηκε ο ladder 100bp (εικόνα). Οι ζώνες των DNA δειγμάτων γίνονταν ορατές ύστερα από έκθεση της πηκτής σε υπεριώδη ακτινοβολία και απεικονίζονταν με το σύστημα MiniBIS DNR bio-imaging systems.



εικόνα 15: ο 100bp DNA ladder

3.5 HRM (High Resolution Melt Assay and Analysis)

HHRM ή ανάλυση υψηλής ευκρίνειας του σημείου τήξεως είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για να χαρακτηρίσει δείγματα DNA. Βασίζεται αρχικά στον πολλαπλασιασμό του DNA στόχου με την τεχνική της PCR (polymerase chain reaction, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) και στη συνέχεια στην ανάλυση του σημείου τήξης του DNA στόχου κατά τη μετάβαση του από τη δίκλωνη στη μονόκλωνη μορφή με αύξηση της θερμοκρασίας με σταθερό και ορισμένο ρυθμό. Ως σημείο τήξης ορίζεται η θερμοκρασία στην οποία τα μισά αντίγραφα του DNA στόχου βρίσκονται στη δίκλωνη μορφή (dsDNA) και τα άλλα μισά στην μονόκλωνη μορφή (ssDNA). Πιο συγκεκριμένα, η διαδικασία της PCR διεξάγεται παρουσία μιας φθορίζουσας ουσίας (SYTO[®]9), η οποία έχει την ικανότητα να προσδένεται στα dsDNA και όχι στα ssDNA. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα καθώς θερμαίνονται τα dsDNA και μετατρέπονται στην μονόκλωνη μορφή τους (ssDNA) να μειώνεται και το σήμα του φθορισμού που παράγεται. Το σήμα του φθορισμού μετράται σε πραγματικό χρόνο και ο τρόπος με τον οποίο μειώνεται σε κάθε δείγμα επιτρέπει τον εντοπισμό και την ταυτοποίηση γενετικών πολυμορφισμών. Ένα όργανο HRM συλλέγει σήματα φθορισμού με πολύ μεγαλύτερη οπτική και θερμική ακρίβεια από ό,τι προηγούμενες μέθοδοι και έτσι δημιουργεί νέες δυνατότητες εφαρμογής. Ένα δίκλωνο μόριο DNA που διαφέρει σε ένα μόνο νουκλεοτίδιο από ένα άλλο μόριο DNA θα έχει διαφορετικό σημείο τήξης κι επομένως οι καμπύλες τήξης θα είναι διαφορετικές. Με την μέθοδο της HRM είναι δυνατή η γονοτύπηση για πολυμορφισμούς ενός νουκλεοτιδίου (SNP), όπως αυτοί του VDR.



εικόνα 16: πρότυπη καμπύλη τήξης ενός μορίου DNA.

Πρόγραμμα HRM για ApaI

Διαδικασία	βήμα	θερμοκρασία	χρόνος
Προετοιμασία (Holding)	Δράση ενζύμου	95°C	10'
PCR, cycling 40	Αποδιάταξη εκμαγείου Πρόσδεση εκκινητών + επιμήκυνση αλυσίδας	95°C 64°C	15'' 15''
HRM	Αποδιάταξη προϊόντος	78-88 °C	ramp 0,1 °C hold 2''

Πρόγραμμα HRM για BsmI

Διαδικασία	βήμα	θερμοκρασία	χρόνος
Προετοιμασία (Holding)	Δράση ενζύμου	95°C	10'
PCR, cycling 35	Αποδιάταξη εκμαγείου Πρόσδεση εκκινητών + επιμήκυνση αλυσίδας	95°C 60°C	10'' 30''
HRM	Αποδιάταξη προϊόντος	77-87 °C	ramp 0,1 °C hold 2''

Πρόγραμμα HRM για TaqI

Διαδικασία	βήμα	θερμοκρασία	χρόνος
Προετοιμασία (Holding)	Δράση ενζύμου	95°C	10'
PCR, cycling 40	Αποδιάταξη εκμαγείου Πρόσδεση εκκινητών + επιμήκυνση αλυσίδας	95°C 60°C	15'' 30''
HRM	Αποδιάταξη προϊόντος	79-89 °C	ramp 0,1 °C hold 2''

Η αντίδραση HRM για τον πολυμορφισμό FokI πραγματοποιήθηκε με το αντιδραστήριο TypeIt του οίκου Qiagen λόγω μεγαλύτερης ευκρίνειας.

Υλικά για μια αντίδραση HRM για τον πολυμορφισμό FokI :

	Όγκος για 1 αντίδραση	Τελική συγκέντρωση
Typeit master mix (Qiagen)	5 μ l	1 X
Forward Primer (invitrogen)	0.7 μ l	10 μ mol/ μ l
Reverse Primer (invitrogen)	0.7 μ l	10 μ mol/ μ l
Genomic DNA	1 μ l	25ng/ μ l
PCR grade water	2.6 μ l	-
Συνολικός όγκος	10 μ l	

Πρόγραμμα HRM για FokI

Διαδικασία	βήμα	θερμοκρασία	χρόνος
Προετοιμασία (Holding)	Δράση ενζύμου	95°C	5'
PCR, cycling 35	Αποδιάταξη εκμαγείου Πρόσδεση εκκινητών + επιμήκυνση αλυσίδας	95°C 60°C 72 °C	10'' 30'' 3''
HRM	Αποδιάταξη προϊόντος	75-89 °C	ramp 0,1 °C hold 2''

Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στην πλατφόρμα Rotor-Gene 6000 Q Series του οίκου Qiagen.



Εικόνα 17: ο Rotor-Gene 6000 Q Series Qiagen.

3.5.4 Καθαρισμός προϊόντων PCR

Τα προϊόντα που υπόκεινται σε αλληλούχιση θα πρέπει να είναι απαλλαγμένα από τυχόν υπολείμματα της PCR αντίδρασης (όπως dNTPs και εκκινητές) και για το λόγο αυτό ακολούθησε καθαρισμός τους με το εμπορικά διαθέσιμο kit NucleospinExtra του οίκου Macherey-Nagel. Η μέθοδος βασίζεται σε χρωματογραφία συγγένειας και αναλυτικά έχει ως εξής:

Υλικά για την αντίδραση:

- Διάλυμα NTI (Macherey-Nagel)
- Στήλη καθαρισμού (Macherey-Nagel)
- Διάλυμα NT₃ (Macherey-Nagel)
- Διάλυμα έκλουσης BE (Elution buffer, Macherey-Nagel)

Πειραματική διαδικασία:

Στα 45μl του PCR προϊόντος μας προσθέτουμε διπλάσιο όγκο από το διάλυμα πρόσδεσης (binding buffer) δηλαδή 90μl και μεταφέρουμε το μείγμα στην στήλη καθαρισμού. Φυγοκεντρούμε τη στήλη μας για 30'' στις 11.000g. Έπειτα αδειάζουμε τον συλλέκτη και προσθέτουμε στη στήλη 700μl διαλύματος NT₃ και φυγοκεντρούμε τη στήλη μας για 30'' στις 11.000g. Αδειάζουμε πάλι τον συλλέκτη και επαναλαμβάνουμε τη φυγοκέντρηση για 1' στις 11.000g ώστε να στεγνώσει η στήλη μας από τυχόν υπολείμματα αιθανόλης που περιέχονται στο διάλυμα NT₃ και δεν θα επιτρέψουν την έκλυση DNA. Τέλος αφαιρούμε το συλλέκτη από τη στήλη μας και τοποθετούμε τα τελικά σωληνάκια και προσθέτουμε 25μl από το διάλυμα έκλουσης και φυγοκεντρούμε για 1' στις 11.000g.

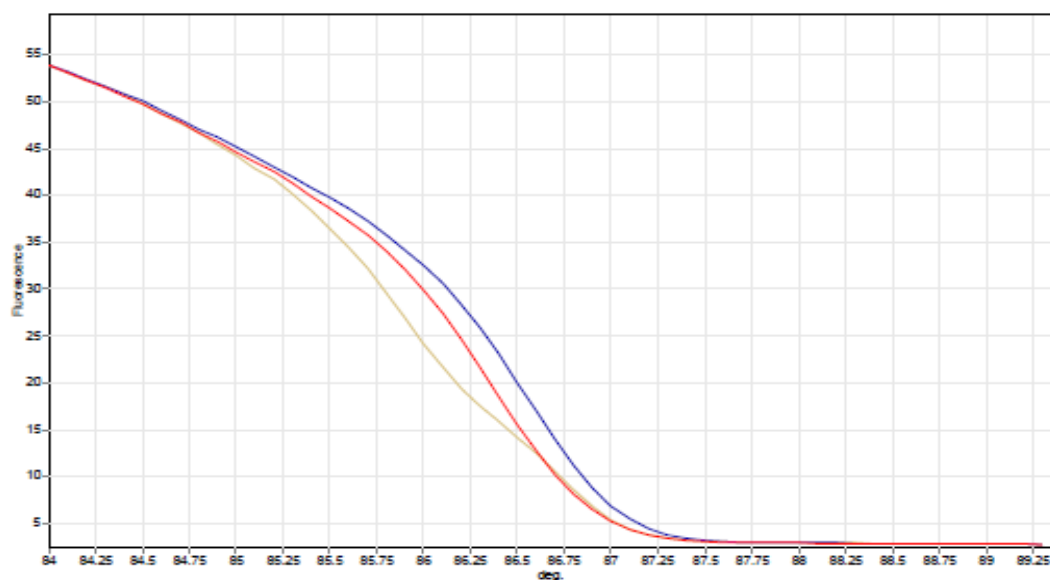
Από τα 25μl του καθαρού προϊόντος κάθε δείγματος χρησιμοποιήσαμε τα 5μl και τα τρέξαμε σε gel αгарόζης 1% προκειμένου να διαπιστώσουμε την καθαρότητα του προϊόντος. Η παρακάτω φωτογραφία απεικονίζει τα 11 δείγματα που στάλθηκαν για αλληλούχιση μαζί με το μάρτυρα 100bp ladder.



εικόνα 18: φωτογραφία πηκτής των δειγμάτων DNA που στάλθηκαν για αλληλούχιση.

3.5.5 Ανάλυση HRM

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με βάση την καμπύλη τήξης HRM. Παρακάτω δίνονται οι καμπύλες τήξης τριών δειγμάτων για έναν πολυμορφισμό τύπου SNP ανάλογο με αυτούς του VDR. Με μπλε χρώμα συμβολίζεται το δείγμα που είναι ομόζυγος ως προς το ένα αλληλόμορφο του πολυμορφισμού και με κόκκινο ως προς το άλλο. Τέλος, με κίτρινο συμβολίζεται το ετερόζυγο δείγμα.



εικόνα 19: καμπύλες τήξης τριών δειγμάτων DNA που διαφέρουν ως προς μια βάση (SNP)

3.6 Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση της παρούσας μελέτης χρειάστηκε να μετατρέψουμε κάποιες ποσοτικές μεταβλητές σε ποιοτικές όπως το ΔΜΣ, το ποσοστό της λιπώδους μάζας, το κοιλιακό λίπος και την περίμετρο ομφαλού (πίνακας 4, εικόνα 20&21). Για τη σύγκριση των ποιοτικών μεταβλητών χρησιμοποιήσαμε το στατιστικό έλεγχο McNemar test (ή δοκιμασία κατά ζεύγη χ^2). Επιλέχθηκε ο συγκεκριμένος στατιστικός έλεγχος γιατί οι παρατηρήσεις μας είναι κατά ζεύγη αφού προκύπτουν από το ίδιο άτομο την ίδια χρονική περίοδο αλλά από διαφορετικά μέρη του σώματος. Ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε το 5% ($\alpha=0,05$) (76). Τέλος, το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για τη στατιστική ανάλυση είναι το SPSS v.22.0.0

4. Αποτελέσματα

4.1 Σωματομετρικά δεδομένα

πίνακας 2: Σωματομετρικά δεδομένα γυναικών

αριθμός	Κωδικός αριθμός	ηλικία	ΔΜΣ	Λιπώδης μάζα %	Μυϊκή μάζα %	Οστική μάζα%	Κοιλιακό λίπος	Περίμετρος ομφαλού
1	252	88	29.9	42.2	54.9	2.9	14	119
2	015	70	32.1	38.5	58.4	3.1	12	99
3	261	75	25.9	34.3	62.3	3.4	10	100
4	027	74	25.7	37.9	58.9	3.2	10	101
5	178	73	41.8	52.7	44.9	2.4	19	117
6	020	75	30.6	45.2	52.0	2.8	13	117
7	093	76	35.7	39.6	57.3	3.1	14	115
8	254	68	31.2	36.9	59.9	3.2	11	97.5
9	174	78	22.9	31.3	65.2	3.6	9	93
10	244	59	30.1	41.7	55.4	3.0	10	107
11	263	63	42	49.5	47.9	2.6	17	123
12	284	75	23.8	32.2	64.4	3.5	9	96
13	143	76	34.3	42.7	54.3	2.9	14	111
14	083	83	29.9	38.7	58.1	3.1	13	116
15	220	82	28.8	39.2	57.7	3.0	12	108
16	237	66	28.5	35.4	61.4	3.3	9	111
17	238	73	40.5	49	48.4	2.6	17	117
18	240	72	35.2	45.2	52.0	2.8	14	114
19	258	67	35.5	43.7	53.4	2.9	13	105
20	016	73	39.2	44.4	52.8	2.8	15	121
21	066	82	23.8	32	64.5	3.6	10	93
22	176	76	30	40.8	56.2	3.1	12	106
23	227	80	32.1	45	52.2	2.8	14	118
24	228	60	31.4	42.7	54.4	2.9	11	114
25	233	66	29.6	36.4	60.5	3.2	10	93
26	239	73	29.7	41.4	55.6	3.0	12	114
27	246	68	38.9	46.5	50.8	2.7	15	130
28	275	73	38.9	42	55.1	3.0	15	123
29	287	84	26.1	35.9	60.9	3.2	11	102
30	057	73	29.6	39.4	57.5	3.1	11	103.5
31	071	69	38.4	47.1	50.3	2.7	16	118
32	213	64	29.4	36.3	60.5	3.2	10	102
33	278	73	41	45.4	51.9	2.7	16	119

αριθμός	Κωδικός αριθμός	ηλικία	ΔΜΣ	Λιπώδης μάζα %	Μυϊκή μάζα %	Οστική μάζα%	Κοιλιακό λίπος	Περίμετρος ομφαλού
34	280	73	25	31.7	64.8	3.6	9	99
35	282	67	34.1	43.1	54.0	2.9	13	116
36	300	67	34.3	44	53.2	2.9	13	102
37	ΕΠ	61	24.3	32.9	63.6	3.5	7	87
38	026	68	29.6	42	55.1	3.0	11	95
39	077	72	35	40.3	56.6	3.1	13	120
40	101	76	27.9	38.5	58.3	3.2	11	107
41	243	67	33.4	42.5	54.6	2.9	13	101
42	248	60	22.8	33.9	62.8	3.3	7	89.5
43	301	73	29	40.7	56.3	3.1	11	112
44	313	67	25.8	35	61.7	3.3	9	91
45	316	50	43.2	46.9	50.5	2.6	15	128
46	317	78	23.4	23.9	72.3	3.8	8	94
47	031	66	34.5	40.2	56.8	3.0	12	107
48	078	77	28.1	41.3	55.6	3.0	12	104
49	177	58	22.7	30.6	65.9	3.6	6	81
50	216	66	26.7	32	64.6	3.4	8	86
51	292	75	39.5	46.7	50.6	2.7	16	130
52	294	66	33.2	45.5	51.7	2.8	13	114
53	296	71	36.9	48.5	48.9	2.6	16	120
54	306	75	36.1	42.5	54.6	3.0	14	113
55	307	66	32.2	39.1	57.9	3.0	11	112
56	312	72	45	49.8	47.7	2.5	19	135
57	018	82	27.2	40.1	56.8	3.1	12	95
58	139	72	30.6	41	56.0	3.0	12	96.5
59	230	64	38.4	45.9	51.4	2.7	15	125
60	255	70	26.5	37.7	59.0	3.3	10	94
61	264	75	31.1	42.2	54.8	2.9	13	112
62	271	73	35.7	36.8	60.1	3.2	12	112
63	283	66	30.7	43.5	53.7	2.9	12	114
64	302	53	44.2	50.9	46.7	2.4	17	124
65	217	68	27	44.2	53.0	2.8	11	109
66	224	65	31.6	42.3	54.8	2.9	12	118
67	257	77	31.6	37.9	58.9	3.1	12	108
68	276	78	28.9	37.6	59.1	3.2	11	113
69	277	67	32.8	42.3	54.8	2.9	12	106
70	279	68	23.1	32.4	64.3	3.4	8	95

πίνακας 3 : Σωματομετρικά δεδομένα Αντρών

αριθμός	Κωδικός αριθμός	ηλικία	ΔΜΣ	Λιπώδης μάζα %	Μυϊκή μάζα %	Οστική μάζα%	Κοιλιακό λίπος	Περίμετρος ομφαλού
1	231	70	27	29	67.4	3.6	16	102
2	068	74	26.7	26.8	69.5	3.7	16	106
3	288	71	33.7	31.7	64.9	3.3	20	129
4	295	74	26.1	23.1	73.0	3.9	14	91
5	311	71	29.7	32.3	64.3	3.4	18	103
6	251	70	27	23.4	72.7	3.8	14	104
7	245	83	26.8	23.7	72.5	3.8	16	104
8	058	71	27.8	29.2	67.3	3.5	17	104
9	099	71	29.9	29.7	66.7	3.6	18	99
10	102	83	24.5	22.2	73.9	3.9	15	93
11	260	76	27.2	21	75.0	4.0	14	101
12	304	82	33.1	33	63.6	3.4	22	107
13	226	81	28.9	25.1	71.4	3.7	17	114
14	242	74	29.2	28.9	67.6	3.5	17	103
15	007	85	28.7	21.4	74.6	4.0	16	104.5
16	103	66	24.9	22.2	73.9	3.9	12	103
17	222	77	25	27.1	69.2	3.7	16	95
18	234	69	24.8	21.1	74.9	4.0	12	98
19	270	85	27.8	29.5	66.9	3.6	19	109
20	029	72	31.6	32.2	64.5	3.4	19	113
21	273	74	17.5	12	83.5	4.6	9	77
22	293	81	24	25.5	70.7	3.8	16	93
23	298	66	27.7	27.9	68.4	3.7	15	105
24	009	73	22.3	20.9	75.2	4.0	12	96
25	030	67	24.4	25.4	70.7	3.8	13	100
26	060	78	30.6	23.2	72.9	3.9	16	105
27	214	71	26.1	25.7	70.6	3.8	15	100
28	215	74	29.1	46.3	51.1	2.7	13	108
29	247	75	29.1	30.3	66.2	3.5	18	116
30	005	82	27	24.2	72.0	3.8	16	102.5
31	067	77	25	25.2	71.0	3.8	15	92
32	092	75	22	20.2	75.8	4.0	12	98
33	119	82	28.2	24.8	71.5	3.7	17	111
34	262	77	27	28.6	67.8	3.5	17	115
35	266	75	30.4	25.2	71.0	3.8	17	112

Παρακάτω δίνονται τα όρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη σύμφωνα με το WHO (World Health Organization) (77) για τις μετρήσεις της περιμέτρου του ομφαλού που υποδηλώνουν "αυξημένο κίνδυνο" και "ιδιαίτερα αυξημένο κίνδυνο" για την εμφάνιση μεταβολικών διαταραχών που σχετίζονται με την παχυσαρκία (78), του δείκτη μάζας σώματος και ποσοστό λιπώδους μάζας (79).

Κίνδυνος		
	Περιφέρεια μέσης(ομφαλού)	
φύλο	αυξημένος	Ιδιαίτερα αυξημένος
άνδρες	>94cm	≥102cm
γυναίκες	≥ 80cm	≥88cm

Πίνακας 4: όρια μετατροπής της ποσοτικής μεταβλητής της περιφέρειας ομφαλού σε ποιοτική

Κατάταξη υπερβάλλοντος βάρους και παχυσαρκίας ενηλίκων	
Κατηγορία	ΔΜΣ (kg/m ²)
Ελλιποβαρής	<18.5
Φυσιολογικός	18.5 - 24.9
Υπέρβαρος	25 - 29.9
Παχύσαρκος (I βαθμού)	30 - 34.9
Παχύσαρκος (II βαθμού)	35 - 39.9
Παχύσαρκος (III βαθμού)	40≤

Πηγή: Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας 1997

εικόνα 20: μετατροπή της ποσοτικής μεταβλητής του ΔΜΣ σε ποιοτική.

FEMALE

AGE	BODY FAT (%)				BODY WATER (%)	MUSCLE MASS (%)	BONE MASS (%)
	Low	Normal	Moderate	High			
					Normal	Normal	Normal
6-12	<7	7-19	19-25	>25	>58	>36	>1.3
13-19	<20	20-31	31-37	>37	>56	>34	>1.5
20-39	<21	21-32	32-38	>38	>54	>33	>2.5
40-59	<23	23-34	34-40	>40	>53	>32	
60-79	<25	25-36	36-42	>42	>52	>30	>2.0
Athlete		12-25			>56	>38	>3.2

MALE

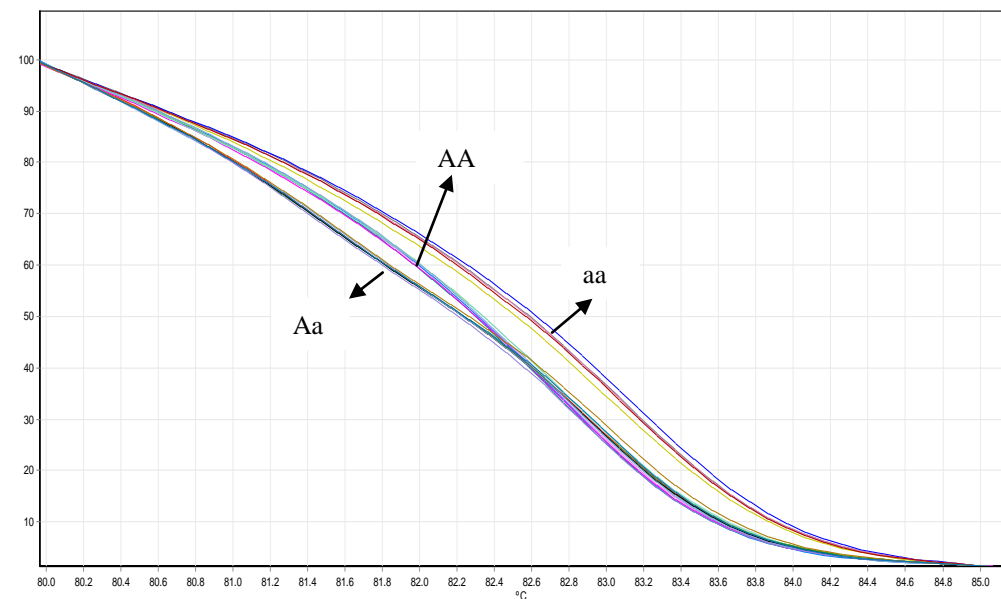
AGE	BODY FAT (%)				BODY WATER (%)	MUSCLE MASS (%)	BONE MASS (%)
	Low	Normal	Moderate	High			
					Normal	Normal	Normal
6-12	<7	7-18	18-25	>25	>60	>40	>1.3
13-19	<8	8-19	19-25	>25	>58	>38	>1.7
20-39	<9	9-20	20-26	>26	>56	>37	>2.8
40-59	<11	11-22	22-28	>28	>55	>36	
60-79	<13	13-24	24-30	>30	>54	>34	>2.4
Athlete		3-15			>60	>42	>3.5

εικόνα 21: όρια με βάση την ηλικία και το φύλο του ποσοστού της λιπώδους μάζας σώματος

4.2 Ανάλυση HRM για το δείγμα μας

4.2.1 Ανάλυση του πολυμορφισμού AaI

Το διάγραμμα που παρουσιάζεται πιο κάτω αποτελεί την καμπύλη HRM για τον πολυμορφισμό του AaI. Βάσει της ομαδοποίησης των καμπυλών αυτών έγινε η ταυτοποίηση των γονοτύπων στον συγκεκριμένο πολυμορφισμό για το δείγμα μας. Με *a* συμβολίζεται το αλληλόμορφο που φέρει την περιοριστική θέση AaI, ενώ με *A* συμβολίζεται η απουσία της περιοριστικής θέσης. Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι αναλυτικοί συγκεντρωτικοί πίνακες των γονοτύπων για τον AaI για γυναίκες και άντρες του δείγματος μας.



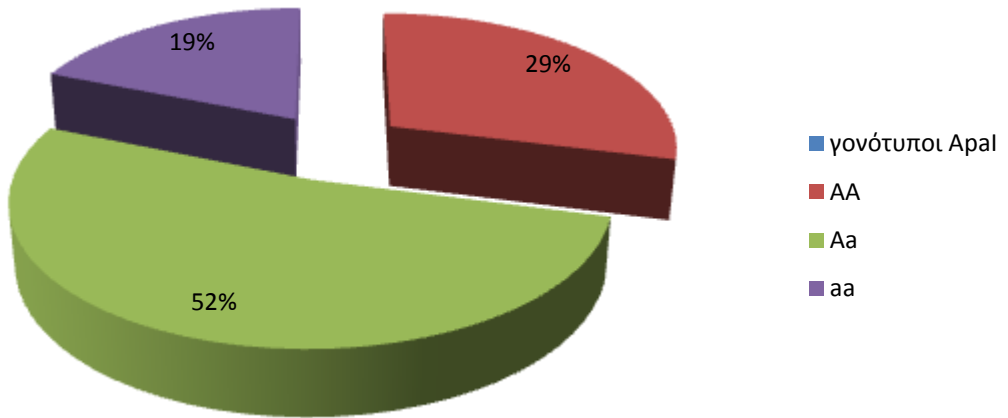
εικόνα 22: καμπύλες HRM των δειγμάτων για τον AaI.

Πίνακας 5: γονότυποι ΑραΙ στις Γυναίκες						
αριθμός	Κωδικός δείγματος	ΑραΙ		αριθμός	Κωδικός δείγματος	ΑραΙ
1	252	Aa		38	026	Aa
2	015	Aa		39	077	aa
3	261	Aa		40	101	AA
4	027	Aa		41	243	aa
5	178	Aa		42	248	Aa
6	020	AA		43	301	aa
7	093	Aa		44	313	AA
8	254	AA		45	316	Aa
9	174	aa		46	317	aa
10	244	Aa		47	031	Aa
11	263	Aa		48	078	aa
12	284	Aa		49	177	Aa
13	143	Aa		50	216	Aa
14	083	AA		51	292	AA
15	220	Aa		52	294	Aa
16	237	aa		53	296	aa
17	238	AA		54	306	Aa
18	240	AA		55	307	AA
19	258	AA		56	312	aa
20	016	Aa		57	018	Aa
21	066	Aa		58	139	AA
22	176	AA		59	230	Aa
23	227	Aa		60	255	aa
24	228	aa		61	264	AA
25	233	AA		62	271	AA
26	239	Aa		63	283	Aa
27	246	AA		64	302	Aa
28	275	Aa		65	217	AA
29	287	aa		66	224	AA
30	057	Aa		67	276	AA
31	071	Aa		70	277	Aa
32	213	Aa		71	279	Aa
33	278	aa				
34	280	Aa				
35	282	Aa				
36	300	Aa				
37	ΕΠ	AA				

Πίνακας 6: γονότυποι AραI στους άντρες

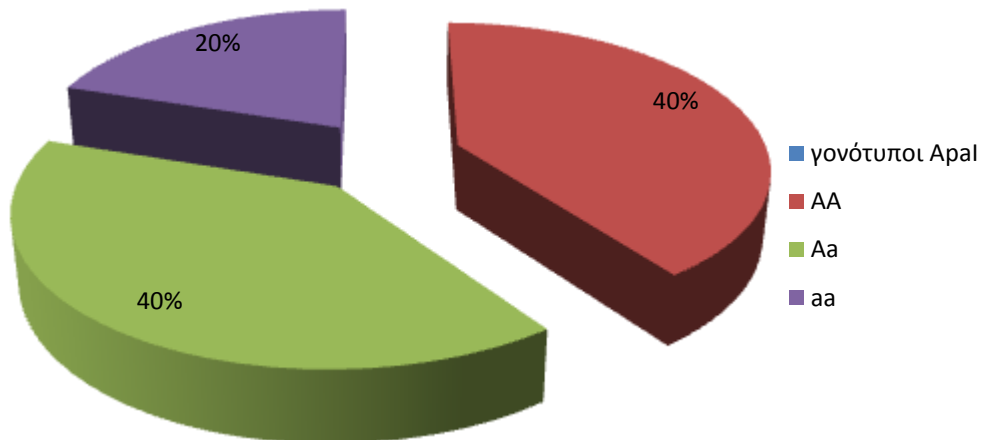
αριθμός	Κωδικός δείγματος	AραI
1	231	aa
2	068	aa
3	288	Aa
4	295	AA
5	311	Aa
6	251	AA
7	245	AA
8	058	AA
9	099	AA
10	102	AA
11	260	Aa
12	304	aa
13	226	Aa
14	242	Aa
15	007	Aa
16	103	Aa
17	222	Aa
18	234	AA
19	270	AA
20	029	AA
21	273	aa
22	293	AA
23	298	Aa
24	009	AA
25	030	AA
26	060	aa
27	214	Aa
28	215	AA
29	247	AA
30	005	Aa
31	067	aa
32	092	aa
33	119	Aa
34	262	Aa
35	266	Aa

γυναίκες



γράφημα 1: πίτα παρουσίασης των ποσοστών των γονοτύπων για το Arai στις γυναίκες

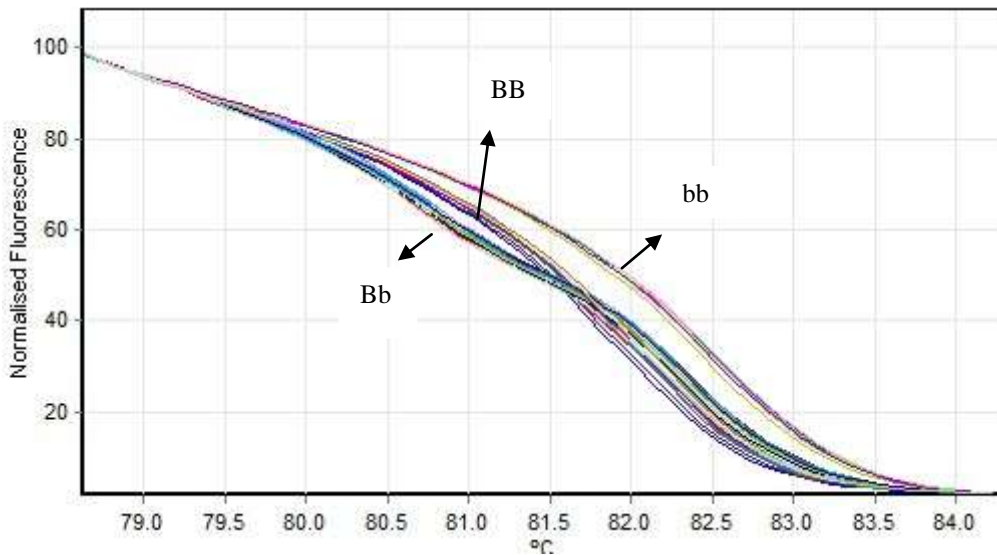
άντρες



γράφημα 2: πίτα παρουσίασης των ποσοστών των γονοτύπων για το Arai στους άντρες.

4.2.2 Ανάλυση του πολυμορφισμού BsmI

Το διάγραμμα που παρουσιάζεται πιο κάτω αποτελεί την καμπύλη HRM για τον πολυμορφισμό του BsmI. Βάσει της ομαδοποίησης των καμπυλών αυτών έγινε η ταυτοποίηση των γονοτύπων στον συγκεκριμένο πολυμορφισμό για το δείγμα μας. Με b συμβολίζεται το αλληλόμορφο που φέρει την περιοριστική θέση BsmI, ενώ με B συμβολίζεται η απουσία της περιοριστικής θέσης. Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι αναλυτικοί συγκεντρωτικοί πίνακες των γονοτύπων για τον BsmI για γυναίκες και άντρες του δείγματος μας.



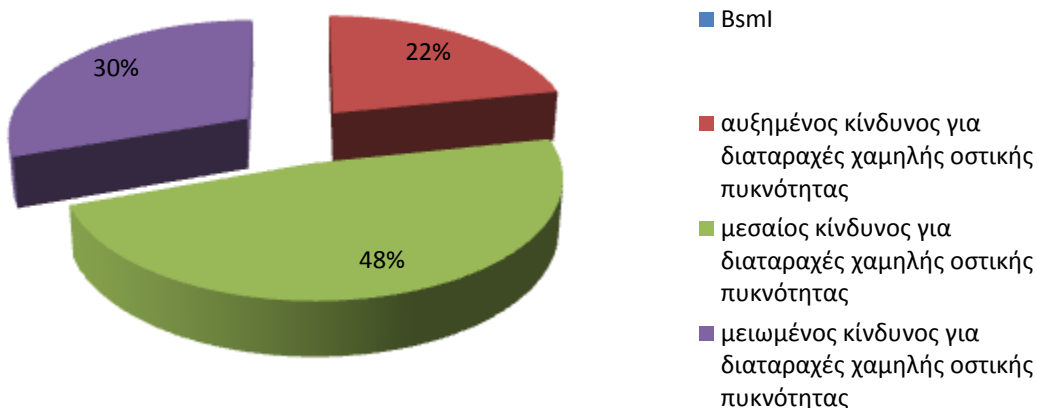
εικόνα 23: καμπύλες HRM των δειγμάτων για τον BsmI.

Πίνακας 7: γονότυποι BsmI στις γυναίκες						
αριθμός	Κωδικός δείγματος	BsmI		αριθμός	Κωδικός δείγματος	BsmI
1	252	Bb		38	026	Bb
2	015	Bb		39	077	bb
3	261	Bb		40	101	BB
4	027	Bb		41	243	BB
5	178	bb		42	248	Bb
6	020	BB		43	301	bb
7	093	bb		44	313	BB
8	254	Bb		45	316	Bb
9	174	bb		46	317	bb
10	244	bb		47	031	Bb
11	263	Bb		48	078	bb
12	284	bb		49	177	Bb
13	143	Bb		50	216	bb
14	083	Bb		51	292	Bb
15	220	Bb		52	294	Bb
16	237	bb		53	296	bb
17	238	BB		54	306	Bb
18	240	BB		55	307	BB
19	258	Bb		56	312	bb
20	016	Bb		57	018	Bb
21	066	Bb		58	139	BB
22	176	BB		59	230	bb
23	227	Bb		60	255	bb
24	228	bb		61	264	BB
25	233	bb		62	271	BB
26	239	Bb		63	283	bb
27	246	BB		64	302	Bb
28	275	Bb		65	217	BB
29	287	bb		66	224	Bb
30	057	bb		69	276	BB
31	071	Bb		70	277	Bb
32	213	Bb		71	279	Bb
33	278	bb				
34	280	Bb				
35	282	Bb				
36	300	Bb				
37	ΕΠ	BB				

**Πίνακας 8: γονότυποι BsmI
στους άντρες**

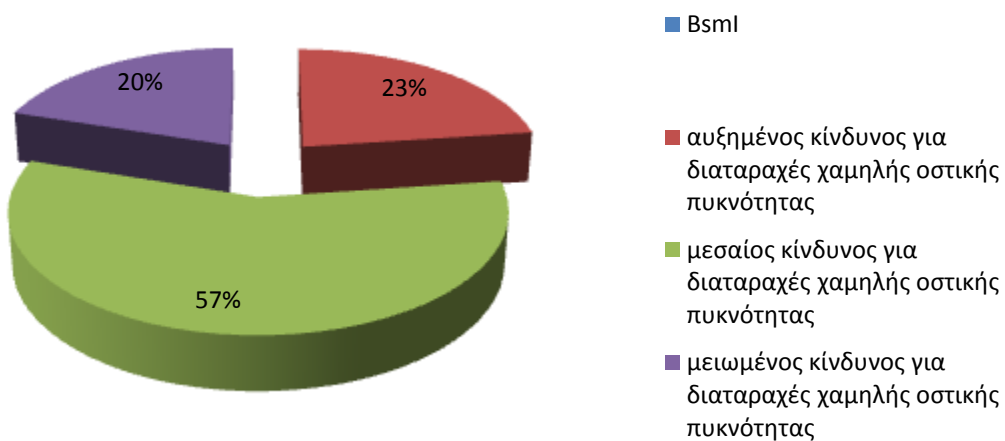
αριθμός	Κωδικός δείγματος	BsmI
1	231	bb
2	068	bb
3	288	Bb
4	295	Bb
5	311	Bb
6	251	Bb
7	245	BB
8	058	BB
9	099	Bb
10	102	BB
11	260	Bb
12	304	bb
13	226	Bb
14	242	Bb
15	007	Bb
16	103	Bb
17	222	bb
18	234	BB
19	270	Bb
20	029	BB
21	273	bb
22	293	Bb
23	298	Bb
24	009	Bb
25	030	Bb
26	060	BB
27	214	Bb
28	215	BB
29	247	BB
30	005	Bb
31	067	bb
32	092	bb
33	119	Bb
34	262	Bb
35	266	Bb

γυναίκες



γράφημα 3: πίτα παρουσίασης των ποσοστών των γονοτύπων για το BsmI στις γυναίκες και του κινδύνου που αντιπροσωπεύει.

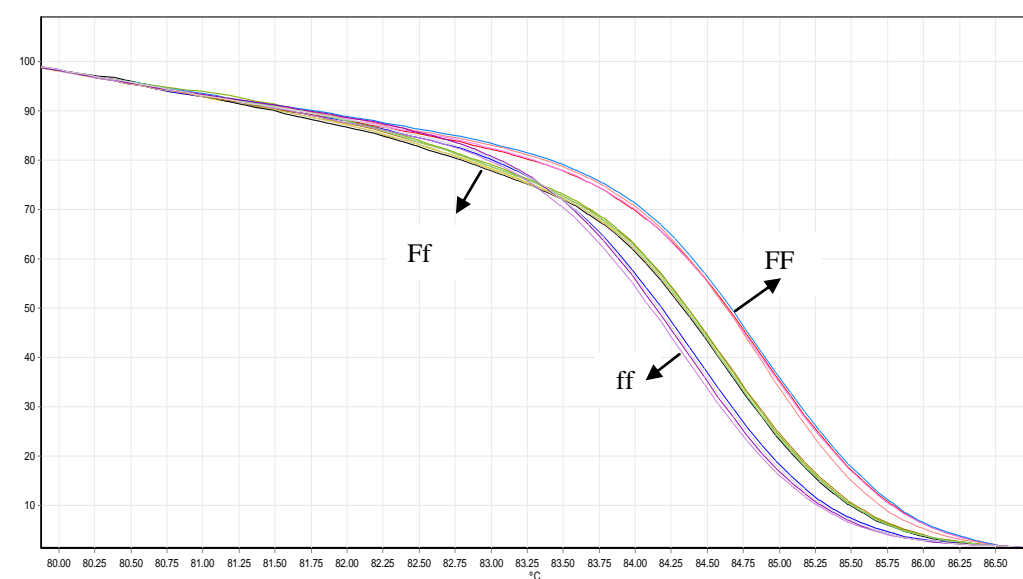
Άντρες



γράφημα 4: πίτα παρουσίασης των ποσοστών των γονοτύπων για το BsmI στους άντρες και του κινδύνου που αντιπροσωπεύει.

4.2.3 Ανάλυση του πολυμορφισμού FokI

Το διάγραμμα που παρουσιάζεται πιο κάτω αποτελεί τις καμπύλες HRM για τον πολυμορφισμό του FokI. Βάσει της ομαδοποίησης των καμπυλών αυτών έγινε η ταυτοποίηση των γονοτύπων στον συγκεκριμένο πολυμορφισμό για το δείγμα μας. Με f συμβολίζεται το αλληλόμορφο που φέρει την περιοριστική θέση FokI, ενώ με F συμβολίζεται η απουσία της περιοριστικής θέσης. Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι αναλυτικοί συγκεντρωτικοί πίνακες των γονοτύπων για τον FokI για γυναίκες και άντρες του δείγματος μας.



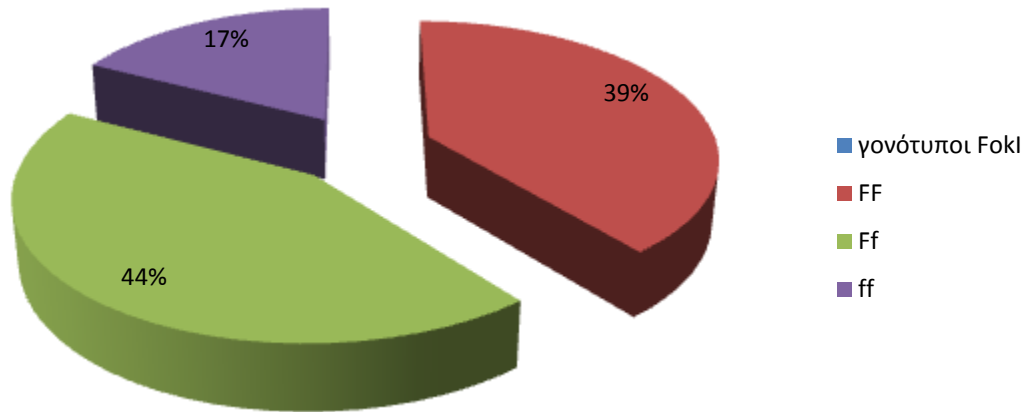
εικόνα 24: καμπύλες HRM των δειγμάτων για τον FokI.

Πίνακας 9: γονότυποι FokI στις γυναίκες						
αριθμός	Κωδικός δείγματος	FokI		αριθμός	Κωδικός δείγματος	FokI
1	252	FF		38	026	FF
2	015	Ff		39	077	ff
3	261	Ff		40	101	FF
4	027	ff		41	243	Ff
5	178	ff		42	248	FF
6	020	Ff		43	301	FF
7	093	Ff		44	313	FF
8	254	ff		45	316	FF
9	174	FF		46	317	TT
10	244	FF		47	031	Ff
11	263	ff		48	078	ff
12	284	FF		49	177	FF
13	143	Ff		50	216	FF
14	083	Ff		51	292	Ff
15	220	Ff		52	294	ff
16	237	Ff		53	296	FF
17	238	Ff		54	306	FF
18	240	Ff		55	307	Ff
19	258	Ff		56	312	FF
20	016	Ff		57	018	Ff
21	066	Ff		58	139	ff
22	176	Ff		59	230	Ff
23	227	Ff		60	255	ff
24	228	FF		61	264	Ff
25	233	Ff		62	271	Ff
26	239	Ff		63	283	FF
27	246	ff		64	302	FF
28	275	Ff		65	217	Ff
29	287	FF		66	224	FF
30	057	FF		69	276	Ff
31	071	FF		70	277	FF
32	213	FF		71	279	Ff
33	278	ff				
34	280	FF				
35	282	Ff				
36	300	FF				
37	ΕΠ	FF				

**Πίνακας 10: γονότυποι FokI
στους άντρες.**

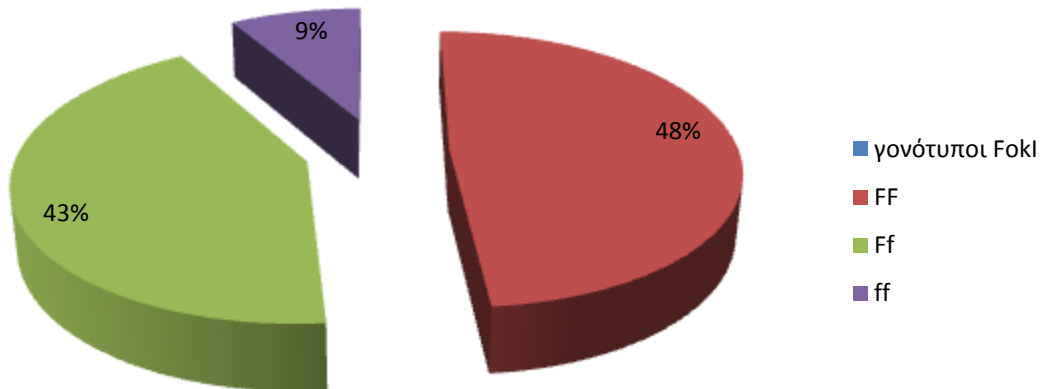
αριθμός	Κωδικός δείγματος	FokI
1	231	FF
2	068	Ff
3	288	Ff
4	295	Ff
5	311	FF
6	251	FF
7	245	ff
8	058	FF
9	099	Ff
10	102	Ff
11	260	Ff
12	304	Ff
13	226	FF
14	242	FF
15	007	Ff
16	103	FF
17	222	Ff
18	234	Ff
19	270	Ff
20	029	ff
21	273	ff
22	293	FF
23	298	FF
24	009	FF
25	030	FF
26	060	FF
27	214	FF
28	215	Ff
29	247	FF
30	005	Ff
31	067	FF
32	092	Ff
33	119	Ff
34	262	FF
35	266	FF

γυναίκες



γράφημα 5:πίτα παρουσίασης των ποσοστών των γονοτύπων για το FokI στις γυναίκες.

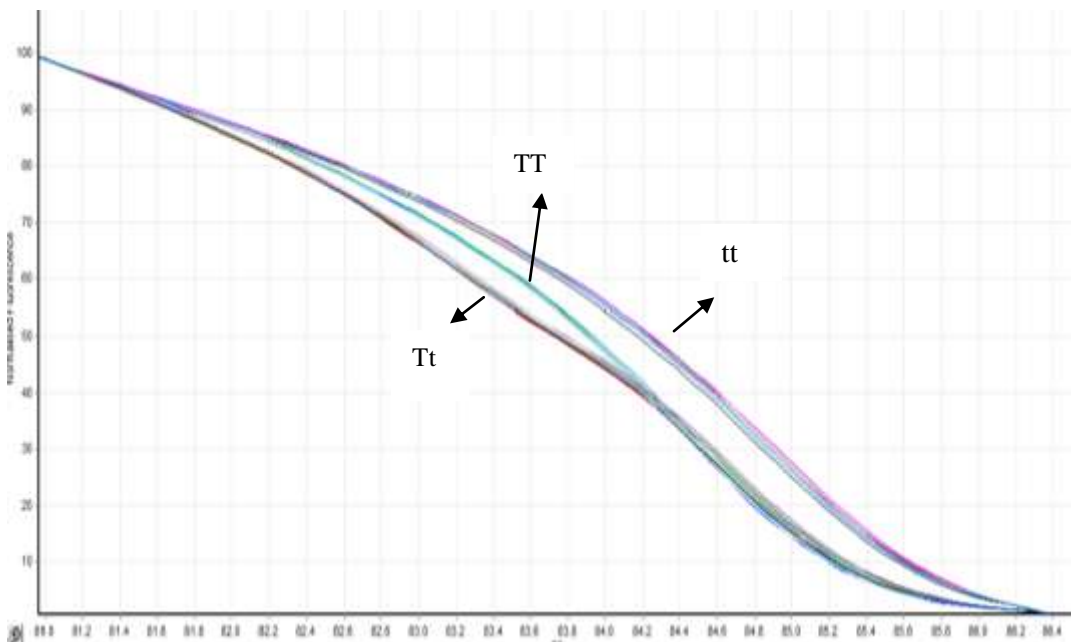
άντρες



γράφημα 6:πίτα παρουσίασης των ποσοστών των γονοτύπων για το FokI στους άντρες.

4.2.4 Ανάλυση του πολυμορφισμού ΤαqI

Το διάγραμμα που παρουσιάζεται πιο κάτω αποτελεί την καμπύλη HRM για τον πολυμορφισμό του ΤαqI. Βάσει της καμπύλης αυτής έγινε η ταυτοποίηση των αλληλομόρφων στον συγκεκριμένο πολυμορφισμό για το δείγμα μας. Ενώ στη συνέχεια παρουσιάζονται οι αναλυτικοί συγκεντρωτικοί πίνακες των γονοτύπων για τον ΤαqI για γυναίκες και άντρες του δείγματος μας.



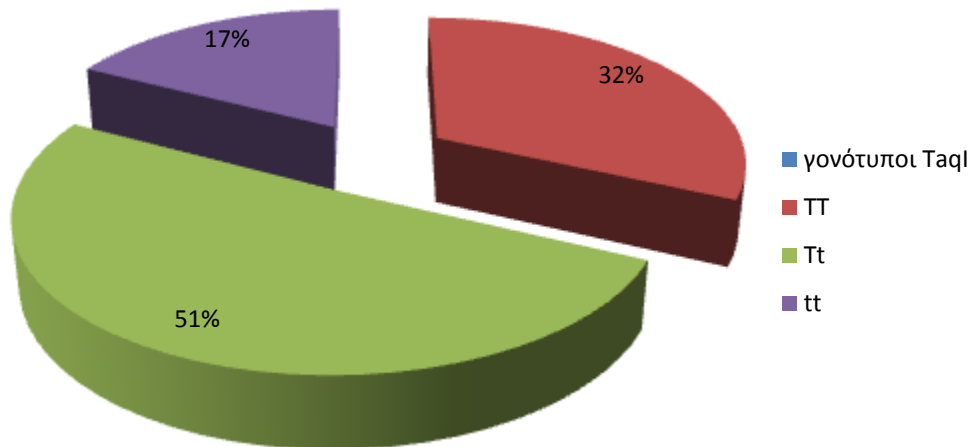
εικόνα 25: καμπύλες HRM των δειγμάτων για τον ΤαqI.

Πίνακας 11: γονότυποι ΤαqI στις γυναίκες.						
αριθμός	Κωδικός δείγματος	ΤaqI		αριθμός	Κωδικός δείγματος	ΤaqI
1	252	Tt		38	026	Tt
2	015	Tt		39	077	TT
3	261	Tt		40	101	Tt
4	027	TT		41	243	tt
5	178	TT		42	248	Tt
6	020	TT		43	301	TT
7	093	TT		44	313	tt
8	254	TT		45	316	Tt
9	174	TT		46	317	TT
10	244	Tt		47	031	Tt
11	263	Tt		48	078	TT
12	284	Tt		49	177	Tt
13	143	Tt		50	216	TT
14	083	Tt		51	292	Tt
15	220	Tt		52	294	Tt
16	237	TT		53	296	TT
17	238	tt		54	306	Tt
18	240	tt		55	307	tt
19	258	Tt		56	312	TT
20	016	Tt		57	018	Tt
21	066	Tt		58	139	tt
22	176	tt		59	230	TT
23	227	Tt		60	255	TT
24	228	TT		61	264	tt
25	233	TT		62	271	tt
26	239	Tt		63	283	TT
27	246	tt		64	302	Tt
28	275	Tt		65	217	tt
29	287	TT		66	224	Tt
30	057	TT		69	276	tt
31	071	Tt		70	277	Tt
32	213	Tt		71	279	Tt
33	278	TT				
34	280	Tt				
35	282	Tt				
36	300	Tt				
37	ΕΠ	Tt				

**Πίνακας 12: γονότυποι ΤαqI
στους άντρες.**

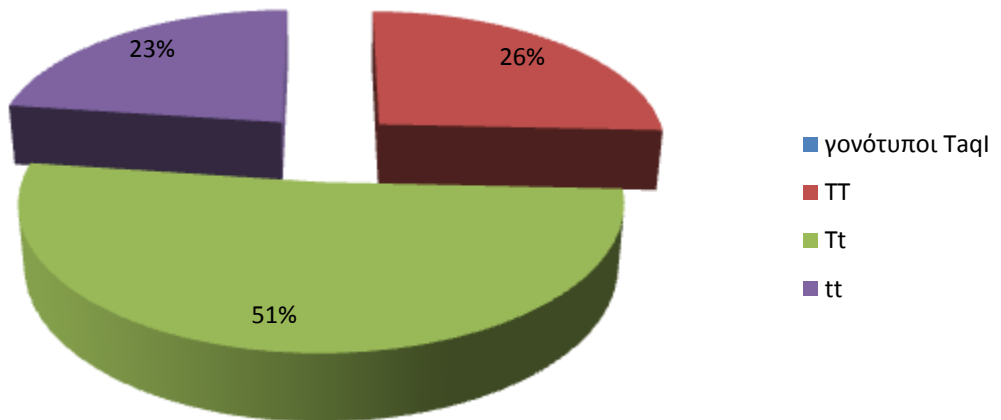
αριθμός	Κωδικός δείγματος	ΤaqI
1	231	TT
2	068	TT
3	288	Tt
4	295	TT
5	311	Tt
6	251	Tt
7	245	tt
8	058	tt
9	099	Tt
10	102	tt
11	260	Tt
12	304	TT
13	226	TT
14	242	Tt
15	007	Tt
16	103	Tt
17	222	TT
18	234	tt
19	270	Tt
20	029	tt
21	273	TT
22	293	Tt
23	298	Tt
24	009	Tt
25	030	Tt
26	060	tt
27	214	Tt
28	215	tt
29	247	tt
30	005	Tt
31	067	TT
32	092	TT
33	119	Tt
34	262	Tt
35	266	Tt

γυναίκες



γράφημα 7:πίτα παρουσίασης των ποσοστών των γονοτύπων για το TaqI στις γυναίκες.

άντρες



γράφημα 8:πίτα παρουσίασης των ποσοστών των γονοτύπων για το TaqI στους άντρες.

4.3 Αποτελέσματα στατιστικού ελέγχου

Συσχέτιση ΔΜΣ με τους πολυμορφισμούς του VDR σε 69 γυναίκες						
SNPs		φυσιολογικές	υπέρβαρες	παχύσαρκες	υπέρβαρες + παχύσαρκες(μη φυσιολογικές)	p-value
ApaI γονότυπος		n=9	n=22	n=38	n=60	
AA		1(11%)	7(32%)	12(32%)	19(32%)	
Aa		6(67%)	10(45%)	20(53%)	30(50%)	
aa		2(22%)	5(23%)	6(16%)	11(18%)	
ApaI αλληλόμορφο		n=18	n=44	n=76	n=120	
A		8(44%)	24(55%)	44(58%)	68(57%)	p<0,05
a		10(56%)	20(45%)	32(42%)	52(43%)	
BsmI γονότυπος		n=9	n=22	n=38	n=60	
BB		1(11%)	5(23%)	9(24%)	14(23%)	
Bb		5(55%)	9(41%)	19(50%)	28(47%)	
bb		3(33%)	8(36%)	10(26%)	18(30%)	
BsmI αλληλόμορφο		n=18	n=44	n=76	n=120	
B		7(39%)	19(43%)	37(49%)	56(47%)	p<0,05
b		11(61%)	25(57%)	39(51%)	64(53%)	
FokI γονότυπος		n=9	n=22	n=38	n=60	
FF		6(67%)	9(41%)	12(32%)	21(35%)	
Ff		2(22%)	10(45%)	18(47%)	28(47%)	
ff		1(11%)	3(16%)	8(21%)	11(18%)	
FokI αλληλόμορφο		n=18	n=44	n=76	n=120	
F		14(78%)	28(64%)	42(55%)	70(58%)	p<0,05
f		4(22%)	16(36%)	34(45%)	50(42%)	
TaqI γονότυπος		n=9	n=22	n=38	n=60	
TT		2(22%)	9(41%)	11(29%)	20(33%)	
Tt		7(78%)	9(41%)	19(50%)	28(47%)	
tt		-	4(18%)	8(21%)	12(20%)	
TaqI αλληλόμορφο		n=18	n=44	n=76	n=120	
T		11(61%)	27(61%)	41(54%)	68(57%)	p<0,05
t		7(39%)	17(39%)	35(46%)	52(43%)	

Πίνακας 13: συγκεντρωτικός πίνακας συσχέτισης του ΔΜΣ με τα αλληλόμορφα των πολυμορφισμών για τις γυναίκες. Mc Nemar test p-values για φυσιολογικές και μη ως προς τον ΔΜΣ σε σύγκριση με τα αλληλόμορφα των πολυμορφισμών.

Συσχέτιση ΔΜΣ με τους πολυμορφισμούς του VDR σε 35 άντρες						
SNPs		φυσιολογικοί	υπέρβαροι	παχύσαρκοι	υπέρβαροι + παχύσαρκοι(μη φυσιολογικοί	p-value
ApaI γονότυπος		n=10	n=21	n=4	n=25	
AA		5(50%)	8(38%)	1(25%)	9(36%)	
Aa		2(20%)	11(52%)	1(25%)	12(48%)	
aa		3(30%)	2(10%)	2(50%)	4(16%)	
ApaI αλληλόμορφο		n=20	n=42	n=8	n=50	
A		12(60%)	27(64%)	3(38%)	30(60%)	p<0,05
a		8(40%)	15(36%)	5(62%)	20(40%)	
BsmI γονότυπος		n=10	n=21	n=4	n=25	
BB		2(20%)	4(19%)	2(50%)	6(24%)	
Bb		4(40%)	15(71%)	1(25%)	16(64%)	
bb		4(40%)	2(10%)	1(25%)	3(12%)	
BsmI αλληλόμορφο		n=20	n=42	n=8	n=50	
B		8(40%)	23(55%)	5(62%)	28(56%)	p<0,05
b		12(60%)	19(45%)	3(38%)	22(44%)	
FokI γονότυπος		n=10	n=21	n=4	n=25	
FF		5(50%)	11(52%)	1(25%)	12(48%)	
Ff		4(40%)	9(43%)	2(50%)	11(44%)	
ff		1(10%)	1(5%)	1(25%)	2(8%)	
FokI αλληλόμορφο		n=20	n=42	n=8	n=50	
F		14(70%)	31(74%)	4(50%)	35(70%)	p<0,05
f		6(30%)	11(26%)	4(50%)	15(30%)	
TaqI γονότυπος		n=10	n=21	n=4	n=25	
TT		4(40%)	4(19%)	1(25%)	5(20%)	
Tt		4(40%)	13(62%)	1(25%)	14(56%)	
tt		2(20%)	4(19%)	2(50%)	6(24%)	
TaqI αλληλόμορφο		n=20	n=42	n=8	n=50	
T		12(60%)	21(50%)	3(38%)	28(56%)	p<0,05
t		8(40%)	21(50%)	5(62%)	26(44%)	

πίνακας 14: συγκεντρωτικός πίνακας συσχέτισης του ΔΜΣ με τα αλληλόμορφα των πολυμορφισμών σε άντρες. Mc Nemar test p-values για φυσιολογικούς και μη ως προς τον ΔΜΣ σε σύγκριση με τα αλληλόμορφα των πολυμορφισμών.

Συσχέτιση κοιλιακού λίπους με τους πολυμορφισμούς του VDR σε 69 γυναίκες

SNPs	Φυσιολογικό	αυξημένο	Πολύ αυξημένο	Μη φυσιολογικό	p-value
ApaI γονότυπος	n=11	n=29	n=29	n=58	
AA	2(18%)	10(34%)	8(28%)	18(31%)	
Aa	6(55%)	14(48%)	16(55%)	30(52%)	
aa	3(27%)	5(17%)	5(17%)	10(17%)	
ApaI αλληλόμορφο	n=22	n=58	n=58	n=116	
A	10(45%)	34(59%)	32(55%)	66(57%)	p<0,05
a	12(55%)	24(41%)	26(45%)	50(43%)	
BsmI γονότυπος	n=11	n=29	n=29	n=58	
BB	2(18%)	7(24%)	6(21%)	13(22%)	
Bb	4(36%)	13(45%)	16(55%)	29(50%)	
bb	5(45%)	9(31%)	7(24%)	16(28%)	
BsmI αλληλόμορφο	n=22	n=58	n=58	n=116	
B	8(36%)	27(47%)	28(48%)	55(47%)	p<0,05
b	14(64%)	31(53%)	30(52%)	61(53%)	
FokI γονότυπος	n=11	n=29	n=29	n=58	
FF	8(73%)	11(38%)	8(28%)	19(33%)	
Ff	2(18%)	13(45%)	15(52%)	28(48%)	
ff	1(9%)	5(17%)	6(21%)	11(19%)	
FokI αλληλόμορφο	n=22	n=58	n=58	n=116	
F	18(82%)	35(60%)	31(53%)	66(57%)	p<0,05
f	4(18%)	23(40%)	27(47%)	50(43%)	
TaqI γονότυπος	n=11	n=29	n=29	n=58	
TT	4(36%)	10(34%)	8(28%)	18(31%)	
Tt	6(55%)	13(45%)	16(55%)	29(50%)	
tt	1(9%)	6(21%)	5(17%)	11(19%)	
TaqI αλληλόμορφο	n=22	n=58	n=58	n=116	
T	14(64%)	33(57%)	32(55%)	65(56%)	p<0,05
t	8(36%)	25(43%)	26(45%)	51(44%)	

πίνακας 15: συγκεντρωτικός πίνακας συσχέτισης του κοιλιακού λίπους με τα αλληλόμορφα των πολυμορφισμών για τις γυναίκες. Με Nemar test p-values για φυσιολογικές και μη ως προς το κοιλιακό λίπος σε σύγκριση με τα αλληλόμορφα των πολυμορφισμών.

Συσχέτιση % λίπους με τους πολυμορφισμούς του VDR σε 69 γυναίκες

SNPs	φυσιολογικό	μέτριο	αυξημένο	Μη φυσιολογικό	p-value
ApaI γονότυπος	n=15	n=21	n=33	n=54	
AA	2(13%)	9(43%)	9(27%)	18(33%)	
Aa	9(60%)	8(38%)	19(58%)	27(50%)	
aa	4(27%)	4(19%)	5(15%)	9(17%)	
ApaI αλληλόμορφο	n=30	n=42	n=66	n=108	
A	13(43%)	28(62%)	37(56%)	63(58%)	p<0,05
a	17(57%)	16(38%)	29(44%)	45(42%)	
BsmI γονότυπος	n=15	n=21	n=33	n=54	
BB	2(13%)	6(29%)	7(21%)	13(24%)	
Bb	7(47%)	8(38%)	18(55%)	26(48%)	
bb	6(40%)	7(33%)	8(24%)	15(28%)	
BsmI αλληλόμορφο	n=30	n=42	n=66	n=108	
B	11(37%)	20(48%)	32(48%)	52(48%)	p<0,05
b	19(63%)	22(52%)	34(52%)	56(52%)	
FokI γονότυπος	n=15	n=21	n=33	n=54	
FF	9(60%)	4(19%)	14(42%)	18(33%)	
Ff	5(33%)	11(52%)	14(42%)	25(46%)	
ff	1(7%)	6(29%)	5(15%)	11(20%)	
FokI αλληλόμορφο	n=30	n=42	n=66	n=108	
F	23(77%)	19(45%)	42(64%)	61(56%)	p<0,05
f	7(23%)	23(55%)	24(36%)	47(44%)	
TaqI γονότυπος	n=15	n=21	n=33	n=54	
TT	5(33%)	9(43%)	8(24%)	17(31%)	
Tt	9(60%)	7(33%)	18(55%)	25(46%)	
tt	1(7%)	5(24%)	7(21%)	12(22%)	
TaqI αλληλόμορφο	n=30	n=42	n=66	n=108	
T	19(63%)	25(60%)	34(52%)	59(55%)	p<0,05
t	11(37%)	17(40%)	32(48%)	49(45%)	

πίνακας 16: συγκεντρωτικός πίνακας συσχέτισης του ποσοστού της λιπώδους μάζας με τα αλληλόμορφα των πολυμορφισμών για τις γυναίκες. Mc Nemar test p-values για φυσιολογικές και μη ως προς το ποσοστό της λιπώδους μάζας σε σύγκριση με τα αλληλόμορφα των πολυμορφισμών.

Συσχέτιση % λίπους με τους πολυμορφισμούς του VDR σε 35 άντρες						
SNPs		φυσιολογικό	μέτριο	αυξημένο	Μη φυσιολογικό	p-value
ApaI γονότυπος		n=12	n=17	n=6	n=23	
AA		6(50%)	5(29%)	3(50%)	8(35%)	
Aa		3(25%)	9(53%)	2(33%)	11(48%)	
aa		3(25%)	3(18%)	1(17%)	4(17%)	
ApaI αλληλόμορφο		n=24	n=34	n=12	n=46	
A		15(62%)	19(56%)	8(67%)	27(59%)	p<0,05
a		9(38%)	15(44%)	4(33%)	19(41%)	
BsmI γονότυπος		n=12	n=17	n=6	n=23	
BB		4(33%)	1(6%)	3(50%)	4(17%)	
Bb		6(50%)	12(71%)	2(33%)	14(61%)	
bb		2(17%)	4(24%)	1(17%)	5(22%)	
BsmI αλληλόμορφο		n=24	n=34	n=12	n=46	
B		14(58%)	14(41%)	8(67%)	22(48%)	P=0,05
b		10(42%)	20(59%)	4(33%)	24(52%)	
FokI γονότυπος		n=12	n=17	n=6	n=23	
FF		4(33%)	11(65%)	2(33%)	13(57%)	
Ff		6(50%)	6(35%)	3(50%)	9(39%)	
ff		2(17%)	-	1(17%)	1(4%)	
FokI αλληλόμορφο		n=24	n=34	n=12	n=46	
F		14(58%)	28(82%)	7(58%)	35(76%)	p<0,05
f		10(42%)	6 (18%)	5(42%)	11(24%)	
TaqI γονότυπος		n=12	n=17	n=6	n=23	
TT		3(25%)	5(29%)	1(17%)	6(26%)	
Tt		5(42%)	11(65%)	2(33%)	13(57%)	
tt		4(33%)	1(6%)	3(50%)	4(17%)	
TaqI αλληλόμορφο		n=24	n=34	n=12	n=46	
T		11(46%)	21(62%)	4(33%)	25(54%)	p>0,05
t		13(54%)	13(38%)	8(67%)	21(46%)	

πίνακας 17: συγκεντρωτικός πίνακας συσχέτισης του ποσοστού της λιπώδους μάζας με τα αλληλόμορφα των πολυμορφισμών για τους άντρες. Mc Nemar test p-values για φυσιολογικούς και μη ως προς το ποσοστό της λιπώδους μάζας σε σύγκριση με τα αλληλόμορφα των πολυμορφισμών.

Συσχέτιση περιφέρειας ομφαλού με τους πολυμορφισμούς του VDR σε 35 άντρες

SNPs		φυσιολογική	αυξημένη	Πολύ αυξημένη	Μη φυσιολογική	p-value
ApaI γονότυπος		n=5	n=10	n=20	n=30	
AA		3(60%)	4(40%)	7(35%)	11(35%)	
Aa		-	4(40%)	10(50%)	14(48%)	
aa		2(40%)	2(20%)	3(15%)	5(17%)	
ApaI αλληλόμορφο		n=10	n=20	n=40	n=60	
A		6(60%)	12(60%)	24(60%)	36(60%)	p<0,05
a		4(40%)	8(40%)	16(40%)	24(40%)	
BsmI γονότυπος		n=5	n=10	n=20	n=30	
BB		1(20%)	1(10%)	6(30%)	7(17%)	
Bb		2(40%)	6(60%)	12(60%)	18(61%)	
bb		2(40%)	3(30%)	2(10%)	5(22%)	
BsmI αλληλόμορφο		n=10	n=20	n=40	n=60	
B		4(40%)	8(40%)	24(60%)	32(53%)	p<0,05
b		6(60%)	12(60%)	16(40%)	28(47%)	
FokI γονότυπος		n=5	n=10	n=20	n=30	
FF		2(40%)	4(40%)	11(55%)	15(57%)	
Ff		2(40%)	6(60%)	7(35%)	13(39%)	
ff		1(20%)	-	2(10%)	2(4%)	
FokI αλληλόμορφο		n=10	n=20	n=40	n=60	
F		6(60%)	14(70%)	29(73%)	43(72%)	p<0,05
f		4(40%)	6(30%)	11(27%)	17(28%)	
TaqI γονότυπος		n=5	n=10	n=20	n=30	
TT		3(60%)	3(30%)	3(15%)	6(26%)	
Tt		1(20%)	6(60%)	11(55%)	17(57%)	
tt		1(20%)	1(10%)	6(30%)	7(17%)	
TaqI αλληλόμορφο		n=10	n=20	n=40	n=60	
T		7(70%)	12(60%)	17(42%)	29(48%)	p<0,05
t		3(30%)	8(40%)	23(83%)	31(52%)	

πίνακας 18: συγκεντρωτικός πίνακας συσχέτισης της περιφέρειας του ομφαλού με τα αλληλόμορφα των πολυμορφισμών για τους άντρες. Mc Nemar test p-values για φυσιολογικούς και μη ως προς το περιφέρεια ομφαλού σε σύγκριση με τα αλληλόμορφα των πολυμορφισμών.

5. Συζήτηση

Το όλο και μεγαλύτερο ενδιαφέρον της παγκόσμιας επιστημονικής κοινότητας με το ενδοκρινικό σύστημα της βιταμίνης D σε φυσιολογικές και μη καταστάσεις, ο ρόλος της ανεπάρκειας της βιταμίνης D σε ποικίλες παθολογικές καταστάσεις και των πολυμορφισμών του υποδοχέα της σε αυτές αλλά και ο πολύ μικρός αριθμός τέτοιων μελετών στον ελληνικό χώρο, μας οδήγησαν στην απόφαση να ασχοληθούμε και εμείς με αυτό το επίκαιρο θέμα της βιταμίνης D και του υποδοχέα της.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ύπαρξη κάποιας πιθανής σχέσης μεταξύ της σύστασης του σώματος του δείγματος των 104 ατόμων με τα αλληλόμορφα των τεσσάρων πολυμορφισμών του VDR (ApaI, BsmI, FokI & TaqI) που μελετάμε. Γι' αυτό το σκοπό, αρχικά συλλέχθηκαν ανθρωπομετρικά δεδομένα όσον αφορά τον ΔΜΣ, την περιφέρεια ομφαλού, το κοιλιακό λίπος, το ποσοστό της λιπώδους, μυϊκής και οστικής μάζας. Έπειτα έγιναν αναλύσεις του αίματος ώστε να γίνει ταυτοποίηση των γονοτύπων ως προς τους τέσσερις πολυμορφισμούς του VDR.

Όσον αφορά τα ανθρωπομετρικά δεδομένα από τις 79 γυναίκες που εξετάστηκαν οι 9 είναι φυσιολογικές, οι 22 υπέρβαρες, οι 19 παχύσαρκες 1^{ου} βαθμού, οι 12 παχύσαρκες 2^{ου} βαθμού και οι 7 παχύσαρκες 3^{ου} βαθμού ως προς το ΔΜΣ. Αντίστοιχα οι 35 άντρες που μελετήθηκαν είναι ο 1 ελλιποβαρής, οι 9 φυσιολογικοί, οι 21 υπέρβαροι και οι 4 παχύσαρκοι 1^{ου} βαθμού ως προς τον ΔΜΣ. Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων μας κρίθηκε αναγκαίο, όσον αφορά τον ΔΜΣ, να ορίσουμε δυο ομάδες ατόμων, τους φυσιολογικούς και τους μη φυσιολογικούς ως προς αυτόν. Όσον αφορά την ομάδα των γυναικών παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στο ΔΜΣ και στα αλληλόμορφα για όλους τους πολυμορφισμούς ($p < 0,05$), άρα ο ΔΜΣ σχετίζεται με τα αλληλόμορφα και των τεσσάρων πολυμορφισμών στις γυναίκες του δείγματος μας. Ομοίως, το ίδιο ισχύει και για την ομάδα των αντρών του δείγματός μας.

Ως προς το κοιλιακό λίπος σχηματίστηκαν οι παρακάτω ομάδες: 11 γυναίκες με φυσιολογικό κοιλιακό λίπος, 29 γυναίκες με αυξημένο κοιλιακό λίπος και 29 γυναίκες με πολύ αυξημένο κοιλιακό λίπος. Αντίστοιχα, στους άντρες είχαμε 1 άντρα με φυσιολογικό κοιλιακό λίπος, 6 άντρες με αυξημένο κοιλιακό λίπος και 28 άντρες με πολύ αυξημένο κοιλιακό λίπος. Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων μας κρίθηκε αναγκαίο, όσον αφορά το κοιλιακό λίπος, να ορίσουμε δυο ομάδες ατόμων, τους φυσιολογικούς και τους μη φυσιολογικούς ως προς αυτόν. Όσον αφορά την ομάδα των γυναικών παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στο κοιλιακό λίπος και στα αλληλόμορφα για όλους τους πολυμορφισμούς ($p < 0,05$), άρα το κοιλιακό λίπος σχετίζεται με τα αλληλόμορφα και των τεσσάρων πολυμορφισμών στις γυναίκες του δείγματος μας. Όσον αφορά όμως τους άντρες επειδή υπήρχε μόνο ένας με φυσιολογικό κοιλιακό λίπος δεν μπορέσαμε να κάνουμε κάποια στατιστική ανάλυση με τα αλληλόμορφα των πολυμορφισμών.

Το ποσοστό της λιπώδους μάζας αποτέλεσε τον τρίτο ανθρωπομετρικό δείκτη που προσπαθήσαμε να δούμε αν υπάρχει κάποια σχέση με τα αλληλόμορφα που μελετήσαμε.

Ως προς τον δείκτη αυτό έχουμε 14 γυναίκες και 11 άντρες με φυσιολογικό ποσοστό λιπώδους μάζας, 21 γυναίκες και 17 άντρες με μέτριο ποσοστό λιπώδους μάζας και τέλος 33 γυναίκες και 6 άντρες με αυξημένο ποσοστό λιπώδους μάζας. Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων μας κρίθηκε αναγκαίο, όσον αφορά το ποσοστό της λιπώδους μάζας, να ορίσουμε δυο ομάδες ατόμων, τους φυσιολογικούς και τους μη φυσιολογικούς ως προς αυτόν. Όσον αφορά την ομάδα των γυναικών παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στο ποσοστό λιπώδους μάζας και στα αλληλόμορφα για όλους τους πολυμορφισμούς ($p < 0,05$), άρα το ποσοστό της λιπώδους μάζας σχετίζεται με τα αλληλόμορφα και των τεσσάρων πολυμορφισμών στις γυναίκες του δείγματος μας. Για την ομάδα των αντρών του δείγματός μας παρατηρήθηκε στατιστική διαφορά ανάμεσα στο ποσοστό λιπώδους μάζας και στα αλληλόμορφα για τους πολυμορφισμούς ApaI, BsmI και FokI ($p \leq 0,05$), ενώ δεν παρατηρήθηκε στατιστική διαφορά ανάμεσα στο ποσοστό λιπώδους μάζας και στα αλληλόμορφα για τον πολυμορφισμό TaqI ($p > 0,05$). Άρα το ποσοστό της λιπώδους μάζας σχετίζεται με τα αλληλόμορφα των ApaI, BsmI και FokI πολυμορφισμών στους άντρες του δείγματός μας.

Ως προς τον τέταρτο ανθρωπομετρικό δείκτη, την περίμετρο ομφαλού, δεν έχουμε καμία γυναίκα με φυσιολογική περίμετρο ομφαλού ενώ έχουμε 3 γυναίκες με αυξημένη περίμετρο ομφαλού και 66 γυναίκες με πολύ αυξημένη περίμετρο. Για το λόγο αυτό δεν μπορέσαμε να κάνουμε περαιτέρω στατιστική ανάλυση στις γυναίκες ως προς αυτό το δείκτη. Όσον αφορά τους άντρες όμως έχουμε 5 με φυσιολογική περίμετρο ομφαλού, 10 με αυξημένη και 20 με πολύ αυξημένη περίμετρο ομφαλού. Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων μας κρίθηκε αναγκαίο, όσον αφορά τη περίμετρο ομφαλού να ορίσουμε δυο ομάδες για τους άντρες, αυτούς με φυσιολογική περίμετρο ομφαλού και εκείνους με μη φυσιολογική περίμετρο ομφαλού. Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στη περίμετρο ομφαλού και στα αλληλόμορφα για όλους τους πολυμορφισμούς ($p < 0,05$), άρα η περίμετρος ομφαλού σχετίζεται με τα αλληλόμορφα και των τεσσάρων πολυμορφισμών στους άντρες του δείγματός μας.

Μελλοντικός μας στόχος είναι να υπολογίσουμε τα επίπεδα της 25(OH)D₃ στο δείγμα μας και να προσπαθήσουμε να δούμε αν υπάρχει κάποια σχέση με τα αλληλόμορφα των πολυμορφισμών του υποδοχέα της βιταμίνης D έτσι ώστε να διαχωρίσουμε το δείγμα μας σε ομάδες κινδύνου βάση του οποίου θα μπορούμε να στοχεύσουμε την παρέμβασή μας (διατροφή, δοσολογία βιταμίνης D, αλλαγή τρόπου ζωής, άσκηση) και να αξιολογήσουμε τα αποτελέσματά της.

6. Βιβλιογραφία

1. **L.kathleen Mahan, Sylvia Escott-Stump.** *Krause's Κλινική Διατροφή.* s.l. : Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας, 2014. 978-960-372-195-6.
2. **L.Slattery, Martha.** Vitamin D Receptor Gene (VDR) Associations with Cancer. *Nutrition Reviews.* 2007, 65(8): S102–S104.
3. **Holick, Matthias Wacker and Michael F.** Vitamin D—Effects on Skeletal and Extraskelatal Health and the Need for Supplementation. *Nutrients .* 2013, 5:111-148.
4. **Ran Zhang, Declan P Naughton.** Vitamin D in health and disease: Current perspectives. *Nutrition Journal .* 2010, 9:65.
5. **Armin Zittermann, Simona Iodice, Stefan Pilz, William B Grant, Vincenzo Bagnardi, and Sara Gandini.** Vitamin D deficiency and mortality risk in the general population: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Am J Clin Nutr. .* 2012, 95(1):91-100.
6. **Arash Hossein-nezhad, Avrum Spira, Michael F.Holick.** Influence of Vitamin D Status and Vitamin D3 Supplementation on Genome Wide Expression of White Blood Cells: A Randomized Double-Blind Clinical Trial. *PLoS ONE.* 8(3): e58725.
7. **Hans Konrad Biesalski, Peter Grimm.** *Εγχειρίδιο Διατροφής.* Αθήνα : Π.Χ. Πασχαλίδης, 2008.
8. **L.Kathleen Mahan, Sylvia Escott-Stump.** *Krause's Food, Nutrition & Diet Therapy.* s.l. : W.B. Saunders company, 1996. 9th edition .
9. **Sareen S. Gropper, Jack L. Smith, James L. Groff.** *Διατροφή και μεταβολισμός 2.* Αθήνα : Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2008.
10. **Μπόσκου, Δ.** *Χημεία Τροφίμων.* Θεσσαλονίκη : Γαρταγάνης, 2004.
11. **Arash Hossein-nezhad and Michael F. Holick.** Vitamin D for Health: A Global Perspective. *Mayo Clin Proc.* 2013, 88(7):720-755.
12. **Cataldo, DeBruyne, Whitney.** *Nutrition and Diet Therapy .* s.l. : Wadworth Publishing company, 1999. 5th edition .
13. **Barbara A. Bowman, Robert M. Russull.** *Present knowledge in nutrition. .* Washington : ILSI International Life Sciences Institute , 2001.
14. **Kristin K. Deeb, Donald L. Trump & Candace S. Johnson.** Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nature Reviews Cancer.* September, 2007, Τόμ. 7, 684-700.
15. **David A. Hanley, Ann Cranney, Glenville Jones, Susan J. Whiting,William D. Leslie.** Vitamin D in adult health and disease: a review and guideline statement from Osteoporosis Canada (summary). *CMAJ.* 2010, 182(12).

16. **Pack, Alison.** Bone health in people with epilepsy: Is it impaired and what are the risk factors? *European Journal of Epilepsy*. 2008, 17(2):181–186.
17. **Holick, Michael F.** Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007, 357:266-81.
18. **Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF.** Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr*. 2000, 72:690-693.
19. **Mark R.Haussler, G. Kerr Whitfield, Carol A. Haussler, Jui-Cheng Hsieh,Paul D. Thompson, Sanford H. Selznick, Carlos Encinas Dominguez and Peter W. Jurutka.** The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH*. 1998, Τόμ. vol 13, 3.
20. *www.ensembl.com*.
21. *www.SNPedia.com*.
22. **Yongheng Bai, Yaping Yu, Bin Yu, Jianrong Ge, Jingzhang Ji, Hong Lu, Jia Wei, Zhiliang Weng, Zhihua Tao and Jianxin Lu.** Association of vitamin D receptor polymorphisms with the risk of prostate cancer in the Han population of Southern China. *BMC Medical Genetics*. 2009, Τόμ. 10, 125.
23. **Kyung Sook Park, Jung Hyun Nam and Jeomil Choi.** The short vitamin D receptor is associated with increased risk for generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* . 2006, 33: 524–528.
24. **Farkhondeh Pouresmaeli, Javad Jamshidi, Eznollah Azargashb,Shahdokht Samangouee.** Association between Vitamin D Receptor Gene BsmI Polymorphism and Bone Mineral Density in A Population of 146 Iranian Women. *Cell Journal(Yakhteh)*. 2013, 15(1):75-82.
25. **Roman Nowak, Justyna Szota and Urszula Mazurek.** Vitamin D receptor gene (VDR) transcripts in bone, cartilage, muscles and blood and microarray analysis of vitamin D responsive genes expression in paravertebral muscles of Juvenile and Adolescent Idiopathic Scoliosis patients. . *BMC . Musculoskeletal Disorders*, 2012, 13:259.
26. **MEGAN W. BUTLER, AMBER BURT, TODD L. EDWARDS, STEPHAN ZUCHNER, WILLIAM K. SCOTT, EDEN R. MARTIN, JEFFERY M. VANCE, and LIYONG WANG.** Vitamin D Receptor Gene as a Candidate Gene for Parkinson disease. *Ann Hum Genet*. 2011, 75(2): 201–210.
27. **Elena Garcia-Martin, Jose A. G. Ag'undez, Carmen Martinez, Julian Benito-León, Jorge Millan Pascual, Patricia Calleja, Maria Diaz-Sanchez, Diana Pisa, Laura Turpin -Fenoll, Hortensia Alonso Navarro, Lucia Ayuso-Peralta, Dolores Torrecillas.** Vitamin D3 Receptor (VDR) Gene rs2228570 (Fok1) and rs731236 (Taq1) Variants Are Not Associated with the Risk for Multiple Sclerosis: Results of a New Study and a Meta-Analysis. *PLOS ONE*. 2013, Τόμ. 8, 6.

28. **Dorland's**. *Ιατρικό λεξικό*. . s.l. : Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης., 1997. 24η έκδοση..
29. **Taber's**. *Ιατρικό εγκυκλοπαιδικό λεξικό*. s.l. : Mendor, 2005.
30. **J D Simmons, C Mullighan, K I Welsh, D P Jewell**. Vitamin D receptor gene polymorphism:association with Crohn's disease susceptibility. *Gut* . 2000, 47:211–214.
31. **Eva Barroso, Lara P Fernandez, Roger L Milne, Guillermo Pita,Elena Sendagorta, Uxua Floristan, Marta Feito, Jose A Aviles,Manuel Martin-Gonzalez, Jose I Arias, Pilar Zamora, Monserrat Blanco,Pablo Lazaro, Javier Benitez and Gloria Ribas**. Genetic analysis of the vitamin D receptor gene in two epithelial cancers: melanoma and breast cancer case-control studies. *BMC Cancer* . 2008, 8:385.
32. **Sascha Abbas, Alexandra Nieters, Jakob Linseisen, Tracy Slinger, Silke Kropp, Elke Jonny Mutschelknauss, Dieter Flesch-Janys and Jenny Chang-Claude**. Vitamin D receptor gene polymorphisms and haplotypes and postmenopausal breast cancer risk. *Breast Cancer Research* . 2008, 10:R31 .
33. **Wang H, Wang W, Yang D, Wang S**. TaqI polymorphism of VDR gene contributes to breast cancer risk. *Tumour Biol* . 2014, 35(1):93-102.
34. **Sara Karami, Paul Brennan, Philip S. Rosenberg, Marie Navratilova, Dana Mates, David Zaridze,Vladimir Janout, Helena Kollarova, Vladimir Bencko, Vsevolod Matveev, Neonila Szeszenia-Dabrowska, Ivana Holcatova, Meredith Yeager, Stephen Chanock,Idan Menashe**. Analysis of SNPs and Haplotypes in Vitamin D Pathway Genes and Renal Cancer Risk. *PLoS ONE* . 2009, 4(9): e7013.
35. **S Karami, P Brennan, RJ Hung, P Boffetta, J Toro, RT Wilson, D Zaridze, M Navratilova, N Chatterjee, D Mates, V Janout, H Kollarova, V Bencko, N Szeszenia-Dabrowska, I Holcatova, A Moukeria, R Welch, S Chanock, N Rothman, W-H Chow, and LE Moore**. Vitamin D Receptor Polymorphisms and Renal Cancer Risk in Central and Eastern Europe. *J Toxicol Environ Health A* . 2008, 71(6): 367–372.
36. **Yongheng Bai, Yaping Yu, Bin Yu, Jianrong Ge, Jingzhang Ji, Hong Lu,Jia Wei, Zhiliang Weng, Zhihua Tao and Jianxin Lu**. Association of vitamin D receptor polymorphisms with the risk of prostate cancer in the Han population of Southern China. *BMC Medical Genetics*. 2009, 10:125.
37. **Annika Schafer, Steffen Emmert, Jochen Kruppa, Steffen Schubert, Mladen Tzvetkov, Rotraut Mossner, Kristian Reich, Carola Berking, Matthias Volkenandt,Claudia Pfohler, Michael P. Schon, Thomas Vogt, Inke R. Konig, Jorg Reichrath**. No association of vitamin D metabolism-related polymorphisms and melanoma risk as well as melanoma prognosis: a case–control study. *Arch Dermatol Res*. 2012 , Τόμ. 304, 353–361.

38. **N.Rochel, J.M.Wurtz, A.Mitschler, b.Klaholz, and D.Moras.** The crystal structure of the nuclear receptor for vitamin D bound to its natural ligand. *Molecular cell*. 2000, Τόμ. vol 5, 173-179.
39. **Lewin, Benjamin.** *Genes VIII*. Αλεξανδρούπολη : Ακαδημαϊκές εκδόσεις Ι.Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε., 2004.
40. **Tooze, Carl Branden and John.** *Εισαγωγή στη Δομή των Πρωτεϊνών* . Αλεξανδρούπολη : Ι.Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε., 2006. δεύτερη έκδοση.
41. **O'Malley, Neil J. Mckenna and Bert W.** Minireview: Nuclear Receptor Coactivators—An Update. *Endocrinology* . 2002, 143(7):2461–2465.
42. **Hector F.DeLuca and Claudia Zierold.** Mechanisms and fuctions of vitamin D. *Nutrition Reviews*. 1998, Τόμ. vol 56, No 2.
43. **Jun Zhang, Michael J. Chalmers, Keith R. Stayrook, Lorri L. Burris, Yongjun Wang,Scott A. Busby, Bruce D. Pascal, Ruben D Garcia-Ordenez, John B. Bruning, Monica A Istrate, Douglas J. Kojetin, Jeffrey A. Dodge, Thomas P. Burris, and Patrick R.Griffin.** DNA binding alters coactivator interaction surfaces of the intact VDR–RXR complex. *Nat Struct Mol Biol*. May, 2011, 18(5): 556–563.
44. **Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter.** Molecular biology of the cell. *Garland Science*. 2002, 4th.
45. **Parker, Borja Belandia and Malcolm G.** Nuclear Receptors: A Rendezvous for Chromatin Remodeling Factors. *Cell*. August 8, 2003, Τόμ. 114, 277-280.
46. **Mi-sun Kim, Ryoji Fujiki, Akiko Murayama, Hirochika Kitagawa, Kazuyoshi Yamaoka, Yoko Yamamoto, Masatomo Mihara, Ken-ichi Takeyama, and Shigeaki Kato.** 1 α ,25(OH)2D3-Induced Transrepression by Vitamin D Receptor through E-Box-Type Elements in the Human Parathyroid Hormone Gene Promoter. *Molecular Endocrinology*. 2007, Τόμ. 21(2):334–342.
47. **Parker, Borja Belandia and Malcolm G.** Nuclear Receptors: A Rendezvous for Chromatin Remodeling Factors. *Cell Press*. 2003, 114, 277–280.
48. **Schoch, James C. Fleet and Ryan D.** Molecular Mechanisms for Regulation of Intestinal Calcium Absorption by Vitamin D and Other Factors. *Crit Rev Clin Lab Sci* . 2010, 47(4): 181–195.
49. **Natasha Khazai, Suzanne E. Judd and Vin Tangpricha.** Calcium and Vitamin D: Skeletal and Extraskelatal Health. *Curr Rheumatol Rep*. April, 2008, 10(2): 110–117.
50. **Joost G. J. Hoenderop, Bernd Nilius , René J. M. Bindels.** Calcium Absorption Across Epithelia. *Physiological Reviews*. January , 2005, 85: 373-422.
51. **Sylvia Christakos, Puneet Dhawan, Angela Porta, Leila J. Mady, and Tanya Seth.** Vitamin D and Intestinal Calcium Absorption. *Mol Cell Endocrinol*. 2011, 347(1-2): 25–29.

52. **Nordin, Borje E. Christopher.** Evolution of the Calcium Paradigm: The Relation between Vitamin D, Serum Calcium and Calcium Absorption. *Nutrients*. 2010, 2: 997-1004.
53. **Aranow, Cynthia.** Vitamin D and the Immune System. *J Investig Med*. 2011, 59(6): 881–886.
54. **Brent J Richards, Ana M Valdes, Jeffrey P Gardner, Dimitri Paximadas, Masayuki Kimura, Ayrun Nessa, Xiaobin Lu, Gabriela L Surdulescu, Rami Swaminathan, Tim D Spector, and Abraham Aviv.** Higher serum vitamin D concentrations are associated with longer leukocyte telomere length in women. *Am J Clin Nutr*. 2007, vol. 86 no. 5.
55. **Barbara Prieti, Gerlies Treiber, Thomas R. Pieber, Karin Amrein.** Vitamin D and Immune Function . *Nutrients*. 2013, 5:2502-2521.
56. **Beata Kaleta, Jaroslaw Bogaczewicz, ewa Robak, Anna Sysa-Jedrzejowska, Malgorzata Wrzosek, Weronika Szubierajska, Piotr Mróz, Jacek Lukaszewicz and Anna Wozniacka.** Vitamin D Receptor gene BsmI polymorphism in Polish patients with Systemic Lupus Erythematosus. *ISRN Endocrinology*. 2013, vol2013.
57. **Zohreh Sabbagh, Janet Markland and Hassanali Vatanparast.** Vitamin d status is associated with disease activity among rheumatology outpatients. *Nutrients*. 2013, 5:2268-2275.
58. **Sylvia Christakos Martin Hewison, David G. Gardner, Carol L. Wagner, Igor N. Sergeev, Erica Rutten, Anastassios G. Pittas, Ricardo Boland, Luigi Ferrucci, and Daniel D. Bikle.** Vitamin D: beyond bone. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 2013, 1287: 45–58.
59. **Sreeram V Ramagopalan, Raph Goldacre, Giulio Disanto, Gavin Giovannoni and Michael J Goldacre.** Hospital admissions for vitamin D related conditions and subsequent immune-mediated disease: record-linkage studies. *BMC Medicine* . 2013, 11:171.
60. **Adam E Handel, Geir K Sandve, Giulio Disanto, Antonio J Berlanga-Taylor, Giuseppe Gallone, Heather Hanwell, Finn Drabløs, Gavin Giovannoni, George C Ebers and Sreeram V Ramagopalan.** Vitamin D receptor ChIP-seq in primary CD4+ cells: relationship to serum 25-hydroxyvitamin D levels and autoimmune disease. *BMC Medicine*. 2013, 11:163.
61. **Zipitis CS, Akobeng AK.** Vitamin D supplementation in early childhood and risk of type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child*. 2008 , 93(6):512-7.
62. **E. Hypponen, E. Laara, A. Reunanen, M.R. Jarvelin, S.M Virtanen.** Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet*. 2001 , 358(9292):1500-3.
63. **Charalambos Panierakis, George Goulielmos, Dimitris Mamoulakis, Eleni Petraki , Efstathios Papavasiliou, Emmanouil Galanakis.** Vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes in Crete, Greece. *Clinical Immunology*. 2009, 133, 276–281.
64. **Chrissa Sioka, Stylianos Papakonstantinou, Sofia Markoula, Foteini Gkartziou, Athanasia Georgiou, Ioannis Georgiou, Sygliti-Henrietta Pelidou, Athanassios P Kyritsis and Andreas**

- Fotopoulos.** Vitamin D receptor gene polymorphisms in multiple sclerosis patients in northwest Greece. *Journal of Negative Results in BioMedicine.* 2011, 10:3.
65. **Brett M. Hoffecker, Laura M. Raffield, Diane L. Kamen, Tamara K. Nowling.** Systemic Lupus Erythematosus and Vitamin D Deficiency Are Associated with Shorter Telomere Length among African Americans: A Case-Control Study. *PLoS ONE* . 8(5): e63725.
66. **Sabino Scolletta, Marta Colletti, Luigi Di Luigi, and Clara Crescioli.** Vitamin D Receptor Agonists Target CXCL10:New Therapeutic Tools for Resolution of Inflammation. *Mediators of Inflammation.* 2013, ID 876319.
67. **Roger Francis, Terry Aspray,William Fraser,Neil Gittoes,Kassim Javaid, Helen Macdonald, Sanjeev Patel,Peter Selby,Nuttan Tanna,Claire Bowring.** *Vitamin D and Bone Health: A Practical Clinical Guideline for Patient Management.* s.l. : National Osteoporosis Society, 2013. 1.
68. **RosenCJ.** Clinical Practice. Vitamin D insufficiency. 2011, 364:248-54.
69. **Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, Murad MH and Weaver CM.** Evaluation, treatment and prevention of vitamin D deficiency:an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011, 96:1911-30.
70. **Chen, Michael F Holick and Tai C.** Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr.* 2008, 87:1080S– 6S.
71. **Michael. F. Holick, Neil C.Binkley,Heike A.Bischoff-Ferrari, Catherine M. Gordon, David A. Hanley,Pobert P. Heaney, M.Hasan Murad and Connie M. Weaver.** *Evaluation, Treatment and Prevention of vitamin D deficiency: An endocrine Society Clinical Practice Guideline.* s.l. : Clinical Endocrinology & Metabolism., 2011. 96(7):1911-1930.
72. **Puri A., Singh V., Pandey S., Kant Singh C. and R.K.Singh S.** Visceral fat rating is a useful indicator in risk assessment among coronary artery disease patients treated with aggressive lipid lowering therapy. . *Clinical Epidemiology and Global Health.* 2014, Τόμ. 1-6.
73. **Tanina, monitoring your health.** *Understanding measurments.* s.l. : <http://www.tanita.eu>, understanding your measurements.
74. **Untergrasser A, CutcutacheI, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG.** Primer3 - new capabilities and interfaces. . *Nucleic Acids Research.* 2012, 40(15):e115.
75. **Koressaar T, Remm M.** Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* . 2007, 23(10):1289-91.
76. **Δημήτρης Τριχόπουλος, Αναστασία Τζώνου, Κλέα Κατσογιάννη.** *Βιοστατιστική.* s.l. : Παρισιάνου Α.Ε., 2001. ISBN 960-394-108-5, ISBN-13 978-960-394-108-8.

77. **Organization, Geneva: World Health.** ObesityQ Preventing and Managing the Global Epidemic. *Technical report 894*. 2000.

78. **Μανιός, Γιάννης.** Διατροφική Αξιολόγηση: Διατροφολογικό & ιατρικό ιστορικό, σωματομετρικοί, κλινικοί & βιοχημικοί δείκτες. . Αθήνα : Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2006.

79. **N. Α. Κατσιλάμπρος, Κ. Τσίγκος.** Παχυσαρκία. s.l. : ΒΗΤΑ ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ, 2003. ISBN: 978-960-8071-08-7.

80. **Norman AW, Bouillon R.** Vitamin D nutritional policy needs a vision for the future. *Exp Biol Med*. 2010, 235(9):1034-45.

81. **Parmeet Kaur Manchanda, Aaron J Kibler, Mei Zhang, Janani Ravi, Hemant K Bid.** Vitamin D receptor as a therapeutic target for benign prostatic hyperplasia. *Indian Journal of Urology*. 2012, 28(4) : 377-381.

82. **Beate Lanske, Michael J Densmore and Reinhold G Erben.** Vitamin D endocrine system and osteocytes. *BoneKEy Reports*. 2014, 494.