

Vztah polymorfizmov v ESR, CALCR a VDR génoch k hustote kostného minerálu, markerom kostného obratu a výskytu fraktúr v populácii slovenských osteoporotických žien

D. GALBAVÝ¹, R. OMELKA², M. BAUEROVÁ², O. HUNÁK¹

¹Ortopedické oddelenie, Nemocnica Topoľčany

²Katedra genetiky a botaniky, FPV UKF Nitra

SÚHRN

Galbavý D., Omelka R., Bauerová M., Hunák O.: **Vzťah polymorfizmov v ESR, CALCR a VDR génoch k hustote kostného minerálu, markerom kostného obratu a výskytu fraktúr v populácii slovenských osteoporotických žien**

Osteoporóza je ochorenie, pre ktoré je charakteristická nízka hladina kostného minerálu (BMD), čím dochádza k poškodeniu mikroarchitektúry kostného tkaniva s následným zvýšeným rizikom fraktúr. Genetické faktory majú významnú úlohu v patogenéze tohto ochorenia. Estrogénový receptor (ESR), receptor pre vitamín D (VDR) a kalcitonínový receptor (CALCR) sú proteíny, prostredníctvom ktorých pôsobia hormóny na cieľové tkanivá. Receptory sa nachádzajú na osteoblastoch ako aj osteoklastoch. Jednotlivé hormóny pôsobia na kosť formálne alebo resorpčne. Variabilita v ESR, VDR a CALCR génoch môže mať vplyv na variabilitu BMD, a tým aj vplývať na riziko fraktúr. Cieľom štúdie bolo vyhodnotiť efekt ESR/PvuII, ESR/XbaI, CALCR/AluI a VDR/FokI polymorfizmov na variabilitu BMD v oblasti lumbálnej chrbtice a krčku femoru, ako aj hladín markerov kostnej remodelácie: kostná alkalická fosfatáza (ALP) marker osteoformácie, osteokalcín (OC) marker osteoformácie, β -crosslaps (CTX) marker osteoresorpcie a incidenciu fraktúr u 121 slovenských osteoporotických žien (63,4 $\pm$ 7,5 roka). Ženy boli zaradené do štúdie podľa striktných inklúzných kritérií. Genetické polymorfizmy boli analyzované pomocou PCR-RFLP. Vplyv jednotlivých genotypov bol vyhodnotený analýzou kovariancie pomocou lineárneho modelu GLM. Výpočet zahŕňal korekciu na vek a BMI. Rozdiely v distribúcii fraktúr boli otestované χ^2 testom. V našej analýze sme zistili štatisticky významný vplyv ESR/pp genotypu na OC ($p = 0,016$), BMD krčku stehrovej kosti ($p = 0,001$), BMD lumbálnej chrbtice ($p = 0,041$) a výskyt fraktúr ($p < 0,001$). VDR/ff genotyp vykazoval vplyv na ALP ($p = 0,019$) a CTx ($p = 0,045$). ESR/XbaI a CALCR/AluI nevykazovali štatisticky významný vplyv na ukazovatele osteoporózy. Analýza kandidátskych génov a ich vplyv na BMD, fraktúry a biochemické markery kostnej remodelácie môže v budúcnosti prispieť ku komplexnému pohľadu na molekulárnu podstatu metabolizmu kostného tkaniva. Výsledky budú využité z hľadiska predikcie osteoporózy.

Kľúčové slová: osteoporóza, hustota kostného minerálu, fraktúra, kandidátske gény

SUMMARY

Galbavý D., Omelka R., Bauerová M., Hunák O.: **ESR, CALCR and VDR gene polymorphisms and their relation to bone mineral density, bone turnover markers and incidence of fractures in Slovak osteoporotic women**

Osteoporosis is a disease characterised by reduced bone mineral density (BMD) and microarchitectural deterioration of bone tissue with an increased fracture risk. Genetic factors play an important role in the pathogenesis of osteoporosis. The estrogen receptor (ESR), vitamin D receptor (VDR) and calcitonin receptor (CALCR) are proteins which mediate hormonal action in target tissues. Bone resorption and formation are caused by hormones through their receptors on osteoblasts and osteoclasts. Therefore, possible variability in the ESR, VDR and CALCR genes could play a role in variability of BMD followed by variability in fracture risk. The purpose of this study was to evaluate effects of the PvuII and XbaI polymorphisms in the ESR gene, AluI polymorphism in the CALCR gene and FokI polymorphism in the VDR gene on variability of femoral and lumbar BMD, as well as circulating bone alkaline phosphatase (ALP; formation marker), osteocalcin (OC; formation marker), β -crosslaps (CTX; resorption marker) and fracture incidence in 121 Slovak women with osteoporosis (63.4 $\pm$ 7.5 years). The subjects were selected according to strict inclusion criteria. Genetic polymorphisms were detected by the PCR-RFLP method. The differences between the genotypes were analyzed by the GLM procedure and covariance analysis after correction of the measurements for age and BMI. The frequencies of fractures were tested using the chi-square test. We found a significant effect of the ESR/pp genotype on OC ($p=0.016$), femoral ($p=0.001$) and lumbar ($p = 0.041$) BMD and fracture incidence ($p = 0.001$). In VDR/ff, there was a significant effect on ALP ($p = 0.019$) and CTx ($p = 0.045$). The ESR/XbaI and CALCR/AluI polymorphisms did not significantly affect any of the analyzed markers. The analysis of associations between candidate genes and BMD as well as bone-related biochemical markers can contribute to more detailed information about molecular background of bone remodelling and loss. The results could also be applicable in osteoporosis susceptibility prediction.

Keywords: osteoporosis, bone mineral density, fracture, candidate genes

Osteologický bulletin 2010;15(4):156–164

Adresa: MUDr. Drahomír Galbavý, PhD., ortopedické oddelenie, Pavlova 17, 955 20 Topoľčany, Slovenská republika, e-mail: drahomir.galbavy@post.sk

Došlo do redakcie: 18. 12. 2009

Prijato k tisku: 25. 11. 2010

Úvod

Osteoporóza (OP), rednutie kostí, je druhým najzávažnejším ochorením pohybového aparátu. V priebehu posledných dvadsiatich rokov sa stáva závažným epidemiologickým, sociálnym, ekonomickým, ako aj lekárske problémom. Vznik a priebeh tohto ochorenia býva pomalý a niekedy úplne nepozorovateľný. Charakteristickým rysom OP je dlhšie asymptomatické obdobie a jej prvým prejavom môže byť zlomenina v typických miestach pôsobením nepatrného nášlia. Osteoporotické zlomeniny, predovšetkým vo vyššom veku, majú mnohokrát až fatálne následky. V súčasnosti veľký problém predstavuje aj operačná liečba pre vysokú pravdepodobnosť biomechanického zlyhania osteosyntetických materiálov v porotickej kosti. Syndróm osteoporózy je považovaný za multifaktoriálne ochorenie [1,2]. Na jeho rozvoji sa podieľa množstvo exogénnych a endogénnych faktorov. Hlavnými etiologickými činiteľmi sú genetické, hereditárne a endokrinné ochorenia, chronické ochorenia vnútorných orgánov, svalov, kostí a kĺbov, dlhodobá imobilizácia a jatrogénne vplyvy. Samotný rozvoj ochorenia závisí aj od množstva vybudovanej kostnej hmoty, čo je determinované aj geneticky [3,4]. Rôzne štúdie dvojčiat (gemelologický výskum) a rodokmeňov (genealogický výskum) svedčia o tom, že maximálne dosiahnuteľné množstvo kostnej hmoty je determinované geneticky. Rozdiely medzi kostnou hmotou u monozygotných a dizygotných dvojčiat dokumentujú relatívny podiel dedičných vplyvov a vplyvov prostredia. Z týchto výskumov vyplýva, že niektoré predispozície na osteoporózu sú dedičné. Arden et al. [5] uvádza, že hodnota heritability (dedivosti) BMD sa pohybuje medzi 0,5–0,9. To znamená, že až 50–90 % variability BMD je možné pripísať genetickým faktorom, kým 10–50 % variability spôsobuje vplyv prostredia. Využitím metód molekulárnej biológie sa poukázalo na vplyv mutácií v tzv. **kandidátskych génoch** pre bielkoviny, ktoré zasahujú do metabolismu kostí, čím sa spolupodieľajú na vývoji ochorení pohybového aparátu. V súvislosti s osteoporózou bolo doposiaľ testované množstvo kandidátskych génov v rôznych populáciách, predovšetkým vo vzťahu k BMD a riziku fraktúr. Prvým génom, ktorý sa začal analyzovať v súvislosti s osteoporózou, bol **gén pre receptor vitamínu D (VDR)**. Gén pre VDR je lokalizovaný na dlhom ramene chromozómu 12q12–q14. Vzťah medzi polymorfizmami v VDR a kostnou remodeláciou prvýkrát popísal Morrison v r. 1989 [6]. Boli identifikované a skúmané RFLP polymorfizmy ako BsmI, TaqI, ApaI, FokI a Eco RV. FokI polymorfizmus je lokalizovaný v kódujúcej oblasti génu, čím spôsobuje štrukturálnu zmenu VDR proteínu. V súvislosti s osteoporózou najmä postmenopauzálnych žien je v súčasnosti najznámejší **gén pre estrogénový receptor (ESR)**. V ľudskom organizme boli identifikované 2 izoformy ESR génu a to ESR1 a ESR2, ktoré majú špecifickú tkanivovú expresiu. ESR1 gén je lokalizovaný na chromozóme 6q25–27 [7]. ESR2 je lokalizovaný na chromozóme 14q22–q24. Mutácie v géne pre ESR znižujú afinitu k ligandu a môžu zohrať dôležitú úlohu pri vzniku osteoporózy. Kobayashi et al. [8] poukázali na vplyv polymorfizmov PvuII a XbaI na hodnoty BMD a incidenciu fraktúr. Oba polymorfizmy sú lokalizované pred 2. exónom. V súčasnosti sa intenzívne skúma aj **gén pre kalcitonínový recepter (CALCR)**.

CALCR gén je lokalizovaný na chromozóme 7q21.3. V tomto géne bol pozorovaný polymorfizmus AluI v pozícii 1377. nukleotidu [9], v dôsledku čoho dochádza k zámeně aminokyseliny prolín (CCG) za leucín (CTG) vo výslednom proteínovom produkte.

Materiál a metódy

Testovaný súbor pacientek

Vyšetrili sme a analyzovali 121 pacientov ženskej populácie vo veku 40–75 rokov v rámci základného diagnostického screeningu a liečby osteoporózy. Všetky pacientky boli podrobené rozboru inklúzy a exklúzy kritérií štúdie. Inklúzne kritériá štúdie zahŕňali: pacientky vo veku 40–75 rokov, neboli dosiaľ liečené na osteoporózu, mali BMI v norme (22–30), zníženie výšky, pravidelný menštruačný cyklus do menopauzy, zlomeniny pri minimálnej traume na predilekčných miestach, zlomeniny v rodine (predovšetkým krčka femoru), RTG známky zlomenín, BMD s T skóre

Tabuľka 1
Restrikčné endonukleázy použité pri detekcii skúmaných polymorfizmov

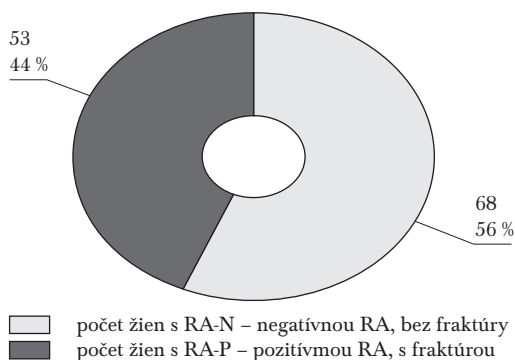
skúmaný polymorfizmus	restrikčná endonukleáza
ESR/Pvu II	Pvu II (Promega)
ESR/Xba	IXba I (Invitrogen)
VDR/Fok I	Fok I (Segenetic)
CALCR/Alu I	Alu I (Invitrogen)

Tabuľka 2
Základná štatistika testovaného súboru (N = 121)

Ukazovateľ	$\bar{x}$	S_D	S_E	min.	max.
vek	63,40	7,52	0,68	45	75
BMI	27,74	1,50	0,14	25,00	30,00
F-BMD	-2,28	0,38	0,03	-3,10	-1,60
L-BMD	-2,91	0,38	0,03	-4,20	-2,50
ALP	1,77	0,39	0,04	1,20	2,60
OC	3,97	1,09	0,10	2,14	7,12
CTx	694,62	209,71	19,06	430,00	1 242,00
S-Ca	2,41	0,21	0,02	2,04	2,89
S-P	1,15	0,11	0,01	0,78	1,38

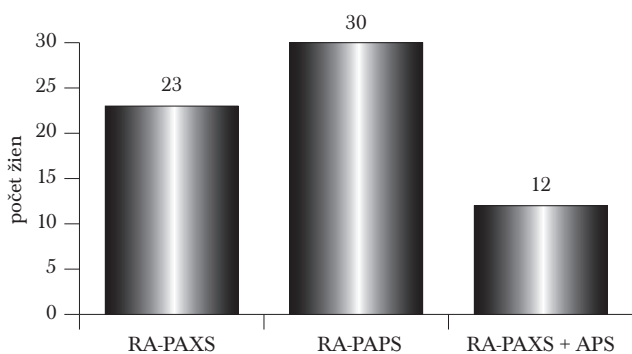
$\bar{x}$ – priemer; S_D – smerodajná odchýlka; S_E – stredná chyba priemeru; min. – minimum; max. – maximum; N – počet jedincov; BMI – body mass index; F-BMD – hustota kostnej hmoty v oblasti krčku femoru (T skóre); L-BMD – hustota kostnej hmoty v oblasti driekovej chrčtice (T skóre); ALP – kostný izoenzym alkalické fosfatázy ($\mu\text{kat/l}$); OC – osteokalcín ($\mu\text{g/l}$); CTx – β -crosslaps (pg/ml); S-Ca – koncentrácia sérového kalcia (mmol/l); S-P – koncentrácia sérového fosforu (mmol/l)

Graf 1a
Výskyt fraktúr v rodinnej anamnéze (RA) vo vyšetřovanom súbore



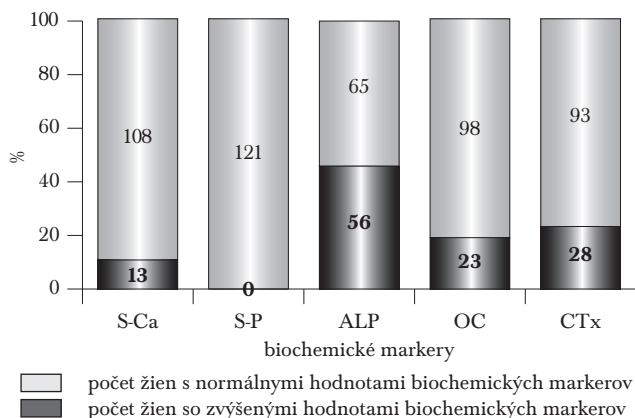
RA-N – negatívna RA, bez fraktúry; RA-P – pozitívna RA, s fraktúrou

Graf 1b
Výskyt fraktúr v rodinnej anamnéze (RA) vo vyšetřovanom súbore



RA-PAXS – pozitívna RA s lokalizáciou fraktúry v oblasti axiálneho skeletu; RA-PAPS – pozitívna RA s lokalizáciou fraktúry v oblasti apendikulárneho skeletu; RA-PAXS+APS – pozitívna RA so súčasným výskytom fraktúr v oboch lokalizáciách

Graf 2
Patologické hodnoty biochemických markerov kalciofosfátového metabolizmu a markerov kostnej remodelácie vo vyšetřovanom súbore



S-Ca – koncentrácia Ca v sére (mmol/l); S-P – koncentrácia P v sére (mmol/l); ALP – kostný izoenzým alkalické fosfatázy (μkat/l); OC – osteokalcín (μg/l); CTx – β-crosslaps (pg/ml)

≤ -2,5 aspoň v jednej lokalite, súhlasili s vyšetřením a liečbou, poskytli vzorku krvi na DNA analýzu a informovaný súhlas. Zo štúdie boli vylúčené tie pacientky, ktoré nespĺňali vyššie menované kritériá, pacientky so závažnými internými, endokrinologickými a chronickými ochoreniami, pacientky s vrodenými ochoreniami, pacientky liečené glukokortikoidmi, hormónmi, imunosupresívami, antikonvulzívami a tiazidmi, pacientky s výraznými abúzami (etylizmus, nikotinizmus, kofeinizmus), ženy s poruchami menštruačného cyklu a po gynekologických operáciách (obojsstranná adnexektómia), nesúhlasili s vyšetřením a liečbou, neposkytli vzorku krvi a informovaný súhlas. Vybrané pacientky boli vyšetřené anamnesticky a fyzikálne, uskutočnili sme biochemické analýzy markerov osteoresorpcie a osteoformácie, realizovali sme rtg vyšetřenie a densitometriu a analyzovali sme vybrané genetické markery vo vzťahu k OP. Pri všetkých analýzach boli rešpektované všetky etické i právne normy, požadované pre priebeh klinického výskumu.

Fyzikálne vyšetřenia pacientov

Všetky pacientky boli podrobené štandardnému anamnestickému a fyzikálnemu vyšetřeniu. Realizovali sme rtg vyšetřenie panvy AP projekciu a L chrbtice v 2 projekciách. Densitometrické vyšetřenie bolo realizované na prístroji Hologic, model Discovery Wi /SN 80227/. Vyšetřili sme telá stavcov lumbálnej chrbtice L1–L5 v bočnej projekcii a oblasť krčku stehrovej kosti, trochanterickú časť a oblasť Wardovho trojuholníka. Hodnotili sme Z a T skóre v jednotlivých lokalitách a BMD v g/cm².

Biochemické vyšetřenie

Hladiny kalcia a fosforu v sére sme vyšetřili fotometricky pomocou setu a analyzátoru Olympus. Z markerov osteoresorpcie sme vyšetřovali C-terminálny peptid kolagénu I β-crosslaps v sére (βCTx). Na jeho stanovenie sme použili elektrochemiluminiscenčnú imunoanalýzu ECLIA na analyzátoře Elecsys 2010 (Roche). Ako markery osteoformácie sme vyšetřili osteokalcín a ALP kostný izoenzým. Na vyšetřenie osteokalcínu v sére sme použili elektrochemiluminiscenčnú imunoanalýzu ECLIA na analyzátoře Elecsys 2010 (Roche). Na stanovenie izoenzýmov ALP v sére sme použili set Hydragel ISO-PAL, ktorý umožňuje separáciu a identifikáciu jednotlivých izoenzýmov pomocou elektroforézy na agarózovom géli.

Detekcia genetických polymorfizmov metódou PCR-RFLP

Genómovú DNA sme izolovali z krvi lýzou s lyzačným roztokom za prítomnosti proteinázy K, následnou fenolchloroformovou extrakciou a vyzrážaním etanolom podľa Sambrooka et al. [10]. Pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) sme amplifikovali špecifické úseky génov ESR, VDR a CALCR s príslušnými polymorfizmami. PCR sme realizovali v termocykleri Primus 25/96 (MWG-BIO-TECH). Použili sme oligonukleotidové primery pre ESR – Pvu II a Xba I polymorfizmy podľa Kobayashi et al. [8], VDR – FokI polymorfizmus podľa Harris et al. [11] a CALCR – Alu I polymorfizmus [12].

Pri ESR géne PCR prebiehala v celkovom objeme 30 l, pričom PCR produkt bol pre účely restriktívnej analýzy

enzýmy Pvu II a Xba I následně rozdělily na 2 části. Ostatní geny byly amplifikovány v objemu 20 µl. Použili jsme Taq DNA polymerázu (Invitrogen) s reakčním roztokem (200 mmol/l Tris-HCL pH = 8,4, 500 mmol/l KCL). Teplotné profily pro amplifikaci specifických úseků testovaných genů byly následovné:

ESR – Pvu II a Xba I polymorfizmy: denaturace 4 min. při 94 °C, 35 x (denaturace 30 s při 94 °C; annealing 30 s při 62 °C; polymerizace 60 s při 72 °C), polymerizace 7 min při 72 °C;

VDR – FokI polymorfismus: denaturace 5 min. při 94 °C, 35 x (denaturace 30 s při 94 °C; annealing 30 s při 60 °C; polymerizace 60 s při 72 °C), polymerizace 10 min při 72 °C;

CALCR – Alu I polymorfismus: denaturace 4 min. při 94 °C, 35 x (denaturace 30 s při 94 °C; annealing 30 s při 57 °C; polymerizace 60 s při 72 °C), polymerizace 7 min při 72 °C.

PCR produkty jsme štípili restriktivními endonukleázami v celkovém objemu 20 µl při 37 °C (tab. 1). Produkty štípení jsme analyzovali elektroforeticky v 1,5 % (ESR), 3 % (CALCR) a 4 % (VDR) agarózovém gél. Fragmenty DNA jsme vizualizovali na UV transiluminátoru UVItec (Velká Británie) při vlnové délce 302 nm. Dokumentace gelů byla realizována systémem DigiDoc (BioRad), farbení gelů bylo uskutočněno etidiumbromidem. Z elektroforeogramu jsme vyhodnotili příslušný genotyp na základě přítomnosti různého počtu fragmentů nebo jejich různé velikosti.

Štatistické metódy

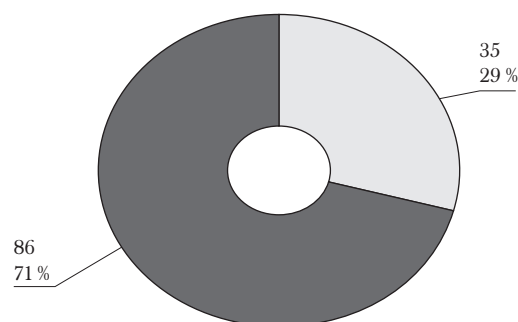
Vypočítali jsme frekvence výskytu jednotlivých genotypů (AA, AB, BB) a alel (A,B).

Zistené frekvencie genotypov v populácii boli porovnávané s teoretickými (frekvenciami očakávanými na základe platnosti Hardyho-Weinbergovho zákona). Homogenita frekvencií bola posúdená χ^2 testom. Na spracovanie údajov a štatistické hodnotenia sme použili programy STATISTICA 4.3 /1993/ a SPSS v.8.0. Vplyv jednotlivých genotypov na hodnotu BMD, biochemické ukazovatele a fraktúry bol vyhodnotený analýzou kovariancie (ANCOVA) pomocou lineárneho modelu (GLM), kde sledovaný ukazovateľ predstavoval závislú premennú a jednotlivé genotypy pevné efekty. Rozdiely v distribúcii fraktúr v rámci jednotlivých genotypov boli otestované χ^2 testom.

Výsledky

Základná štatistika testovaného súboru je uvedená v tab. 2. Testovaný súbor zahŕňal 121 postmenopauzálnych žien. Na základe anamnézy a fyzikálneho vyšetrenia pacientov sa v súbore nevyskytovali z hľadiska osteoporózy zdravé ženy. U všetkých boli prítomné epizódy torakolumbálnych bolestí so sniženou dynamikou lumbálnej chrbtice. Prítomnosť fraktúr a ich distribúciu, ktoré sme získali z rodinnej anamnézy, znázorňuje graf 1 a, b. Výsledky laboratorného skríningu vybraných markerov OP sú uvedené v grafe 2. Na základe rtg vyšetrení sme zistili, že 86 (71 %) žien malo fraktúru (manifestná osteoporóza), z toho 62 (72 %) axiálneho skeletu a 24 (28 %) apendikulárneho skeletu. Oba typy zlomenín malo 21 (24 %) žien (graf 3 a, b).

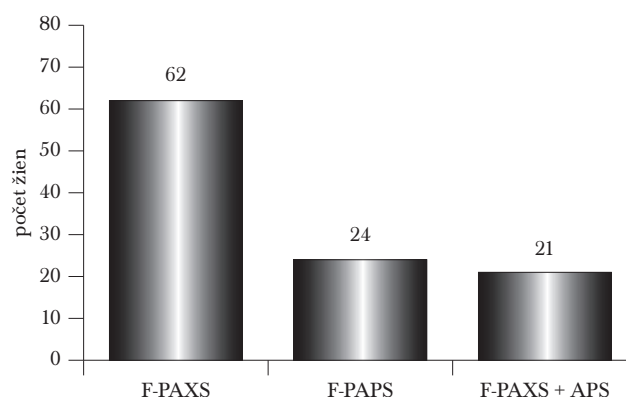
Graf 3a
Prítomnosť fraktúr podľa rtg vyšetrenia v sledovanom súbore



počet žien F-N – rtg bez fraktúr
počet žien F-P – rtg s fraktúrami

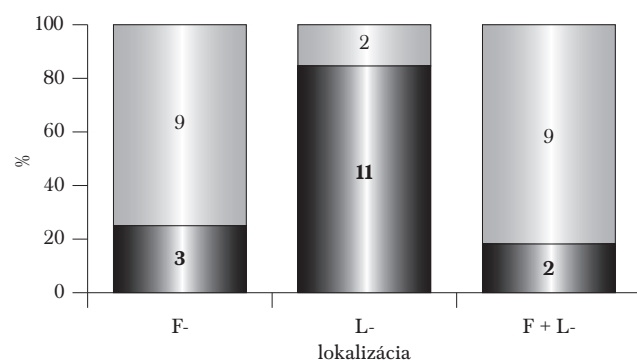
F-N – rtg bez fraktúr; F-P – rtg s fraktúrami

Graf 3b
Prítomnosť fraktúr podľa rtg vyšetrenia v sledovanom súbore



F-PAXS – rtg s fraktúrami axiálneho skeletu; F-PAPS – rtg s fraktúrami apendikulárneho skeletu; F-PAXS+APS – rtg s fraktúrami v oboch lokalizáciách

Graf 4
Výskyt BMD v pásme osteoporózy v oboch vyšetrovaných lokalizáciách v sledovanom súbore



počet žien s BMD mimo pásma osteoporózy v danej lokalizácii
počet žien s BMD v pásme osteoporózy v danej lokalizácii

F-BMD – hustota kostnej hmoty v oblasti krčka femoru;
L-BMD – hustota kostnej hmoty v oblasti driekovej chrbtice;
F+L-BMD – BMD v oboch lokalizáciách

Všetky pacientky mali hustotu kostného minerálu v pásme osteoporózy aspoň v jednej lokalite (graf 4).

Frekvencie jednotlivých genotypov sledovaných polymorfizmov sú uvedené v tab. 3. V analyzovanom súbore bol v najväčšej frekvencii zastúpený heterozygotný genotyp Pp (50,4 %), homozygotné genotypy sa vyskytovali v rovnakom zastúpení (24,8 %). Frekvencie alel P a p boli zhodné (0,5). Pri ESR/Xba I polymorfizme sme zaznamenali najvyššiu frekvenciu v prípade genotypu Xx (58,6 %), potom nasledoval genotyp xx (26,4 %). Najnižšiu frekvenciu sme zistili pri genotype XX (15 %), čo sa odrazilo aj vo frek-

venciách alel, kde vyššiu frekvenciu dosiahla alela x (0,56). Vzhľadom na to, že obidva analyzované polymorfizmy sú lokalizované v rovnakom intróne ESR génu, môžeme medzi nimi predpokladať prítomnosť väzby. V tab. 3 uvádzame aj zastúpenie ESR haplotypov v analyzovanom súbore. V najvyššej frekvencii bola zastúpená kombinácia genotypov PpXx, resp. haplotyp px. Vo vyššej frekvencii, než by bolo možné očakávať za predpokladu neprítomnosti väzby, sme zaznamenali genotypy PPXX, PpXx a ppxx. V analyzovanej skupine probandov sme nezistili prítomnosť genotypov PPxx a ppXX. Z haplotypov boli vo vyššej frekvencii (oproti voľnej kombinovateľnosti) zastúpené haplotypy PX a px. Najpočetnejším genotypom u CALCR/Alu I polymorfizmu bol genotyp TT (57,9 %), najnižšiu frekvenciu sme zaznamenali pri genotype CC (4,9 %). Frekvencia genotypu TC bola 37,2 %. Z alel sme zistili vyššiu frekvenciu alely T (0,76), kým frekvencia alely C bola 0,24. V rámci sledovania VDR/FokI polymorfizmu najpočetnejším genotypom v analyzovanom súbore bol genotyp Ff (56,2 %), najnižšiu frekvenciu sme zaznamenali pri genotype FF (21,5 %). Genotyp ff bol prítomný v 22,3 %. Distribúcia genotypov bola v Hardyho-Weinbergovej rovnováhe.

Asociácie genotypov jednotlivých polymorfizmov s biochemickými markermi OP, BMD a incidenciou fraktúr uvádzajú tab. 4–7. Zistili sme štatisticky významný vplyv ESR/Pvu II polymorfizmu na osteokalcín (OC), β -crosslaps (CTx) a koncentráciu kalcia v sére (S-Ca). Vplyv na kostný izoenzym alkalické fosfatázy (ALP) a koncentráciu fosforu v sére (S-P) nebol potvrdený. V rámci biochemických markerov kostnej remodelácie boli zaznamenané rozdiely ($P < 0,05$) pri OC a CTx, pričom najvyššie hodnoty koncentrácií boli zistené u jedincov s genotypom pp. V rámci sledovania hladín S-Ca a S-P sme zistili rozdiely v prípade S-Ca medzi genotypmi PP a Pp. Zvýšená koncentrácia osteoformačného i osteoresorpčného markera poukazuje na zvýšenú remodeláciu u jedincov s genotypom pp. Zaujímavé je, že pri všetkých biochemických markeroch bola zaznamenaná najnižšia hodnota pri heterozygotnom genotype. Pri polymorfizme ESR/Xba I neboli zistené preukazné rozdiely medzi jednotlivými genotypmi. V rámci sledovania kombinácií ESR genotypov sme zistili, že jedinci s genotypom PPXX disponovali preu-

Tabuľka 3

Frekvencie genotypov ESR/Pvu II, ESR/Xba I, CALCR/Alu I, VDR/Fok I polymorfizmov a ESR haplotypov v analyzovanom súbore

Genotypy	frekvencia (%)	χ^2	Genotypy	frekvencia (%)	χ^2
ESR/PP	24,79	0,03	ESR/PPXX	13,22	
ESR/Pp	50,41	P = 0,99	ESR/PPXx	11,57	
ESR/pp	24,79	ESR/PPxx	0		
ESR/XX	14,88	3,83	ESR/PpXX	1,65	55,5***
ESR/Xx	58,68	P = 0,15	ESR/PpXx	38,84	P < 0,001
ESR/xx	26,45	ESR/Ppxx	9,92		
CALCR/TT	57,85	0,15	ESR/ppXX	0	
CALCR/TC	37,19	P = 0,93	ESR/ppXx	8,26	
CALCR/CC	4,96	ESR/ppxx	16,53		
VDR/FF	21,50	1,90			
VDR/Ff	56,20	P = 0,39			
VDR/ff	22,30				

χ^2 – výsledok porovnania skutočných frekvencií genotypov s teoretickými frekvenciami (vypočítanými podľa Hardyho-Weinbergovho zákona) χ^2 testom. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$

Tabuľka 4

Biochemické markery kostného obratu, BMD a incidencia fraktúr vo vzťahu k Pvu II genotypom v analyzovanom súbore (n = 121)

	ESR/Pvu II			
	PP	Pp	pp	p (Anova)
S-Ca (mmol/l)	2,34 $\pm$ 0,04	2,44 $\pm$ 0,03	2,37 $\pm$ 0,04	0,030
S-P (mmol/l)	1,15 $\pm$ 0,02	1,16 $\pm$ 0,01	1,13 $\pm$ 0,02	0,123
ALP (μ kat/l)	1,83 $\pm$ 0,07	1,66 $\pm$ 0,04	2,07 $\pm$ 0,07	0,726
OC (μ g/l)	4,11 $\pm$ 0,22	3,80 $\pm$ 0,14	4,45 $\pm$ 0,23	0,016
CTx (pg/ml)	678,56 $\pm$ 37,24	627,67 $\pm$ 23,97	880,81 $\pm$ 39,05	0,028
F-BMD (T skóre)	-2,23 $\pm$ 0,07	-2,20 $\pm$ 0,04	-2,50 $\pm$ 0,07	0,001
L-BMD (T skóre)	-2,84 $\pm$ 0,08	-2,87 $\pm$ 0,05	-3,06 $\pm$ 0,08	0,046
Fx-N (počet)	21	38	7	
Fx-P (počet)	9	23	23	0,001

Fx-N – neprítomnosť fraktúr, Fx-P – prítomnosť fraktúr

kazne vyššou koncentráciou ALP a CTx. Pri CTx sme zistili signifikantne nižšiu koncentráciu tohto markera pri genotypu PpXx. Súbor s CALCR/Alu I polymorfizmom neobsahoval dostatočný počet jedincov s genotypom CC (4,96 %), preto sme štatisticky hodnotili len genotypy TC a TT, resp. rozdiel medzi nimi. Pri žiadnom z biochemických ukazovateľov neboli zistené signifikantné asociácie s CALCR genotypmi. U VDR/FokI polymorfizmu sme zistili štatisticky významné rozdiely v koncentráciách ALP a CTx medzi genotypmi Ff a ff. Podobne ako pri ESR/pp genotypu, zvýšená koncentrácia osteoformačného i osteoresorpčného markera poukazuje na zvýšenú remodeláciu u jedincov s heterozygotným genotypom. Naopak nezistili sme signifikantné rozdiely medzi genotypmi a hladinami S-Ca, P.

Čo sa týka vzťahu jednotlivých genotypov s hladinami BMD zistili sme štatisticky významný vplyv ESR/Pvu II polymorfizmu na F-BMD a L-BMD. Jedinci s genotypom pp mali štatisticky významne nižšiu F-BMD ($P < 0,01$) ako aj L-BMD ($P < 0,05$). Podobne aj markery kostného obratu boli najvyššie pri tomto genotypu, čo naznačuje vzťah genotypu pp k BMD a ku kostnej remodelácii. Pri polymorfizme ESR/Xba I neboli zistené preukazné rozdiely medzi jednotlivými genotypmi. V našej štúdii sme nezaznamenali signifikantný vplyv kombinácií ESR genotypov na F-BMD a L-BMD. Podobne sme nezistili signifikantné asociácie BMD s CALCR a VDR genotypmi. Vo vzťahu k incidencii fraktúr sme zistili štatisticky významné rozdiely v distribúcii genotypov pri Pvu II polymorfizme v ESR géne ako aj v prípade kombinácií ESR genotypov. V skupine s fraktúrou(ami) sme v porovnaní so skupinou bez fraktúry zaznamenali signifikantne vyššie zastúpenie genotypov ESR/pp, ESR/xx (kombinácií ESR/ppXx a ESR/ppxx) a VDR/ff (nesignifikantne). Hranici štatistickej významnosti sa blížili rozdiely v distribúcii genotypov CALCR génu v oboch testovaných skupinách ($P = 0,06$). Porovnaním distribúcie genotypov v skupinách pacientov s rôznou lokalizáciou fraktúry (axiálny skelet vs apendikulárny skelet) sme zistili štatisticky významný vplyv ESR/Pvu II polymorfizmu. Jedinci s genotypom Pp vykazovali vyšší počet fraktúr axiálneho skeletu.

Diskusia

Na základe výsledkov prezentovaných v našej štúdii môžeme konštatovať, že štatisticky významné rozdiely medzi genotypmi vo vzťahu k ukazovateľom osteoporózy (biochemickým

markerom kostnej remodelácie, BMD a fraktúram) boli zistené pri polymorfizmoch ESR/Pvu II, kombináciách ESR/Pvu II-ESR/Xba I a VDR/FokI. Výsledky našej štúdie môžeme porovnať s údajmi získanými analýzou v porovnateľných (z hľadiska inklúzných kritérií) populáciách. V rámci frekvencie ESR genotypov Albagha et al. [13] zistili u postmenopauzálnych osteoporotických žien ($n = 206$) z Veľkej Británie najvyššiu frekvenciu Pp (49,5 %) a xx (43,7 %), resp. Xx (43,2 %) genotypov. Autori uvádzajú frekvenciu alely P 0,43, frekvencia alely X bola na úrovni 0,35. Z kombinácií genotypov boli najviac zastúpené PpXx (36,9 %) a ppxx (30,1 %) a haplotypy px (56,1 %) a PX (33,5 %). Naše výsledky korešpondujú (až na distribúciu genotypov ESR/Xba I) s uvedenými údajmi. Početnejšiu populáciu ($n = 610$) z Talianska analyzovali Becherini et al. [14], populácia však zahŕňala okrem osteoporotických aj

Tabuľka 5
Biochemické markery kostného obratu, BMD a incidencia fraktúr vo vzťahu k Xba I genotypom v analyzovanom súbore ($n = 121$)

	ESR/Xba I			p (Anova)
	XX	Xx	xx	
S-Ca (mmol/l)	2,38 ± 0,05	2,41 ± 0,03	2,41 ± 0,04	0,977
S-P (mmol/l)	1,18 ± 0,03	1,16 ± 0,01	1,10 ± 0,02	0,667
ALP (μkat/l)	1,80 ± 0,10	1,78 ± 0,05	1,80 ± 0,07	0,726
OC (μg/l)	4,09 ± 0,29	3,87 ± 0,13	4,12 ± 0,20	0,297
CTx (pg/ml)	709,60 ± 57,54	686,56 ± 26,15	698,50 ± 39,23	0,874
F-BMD (T skóre)	-2,30 ± 0,10	-2,29 ± 0,05	-2,32 ± 0,07	0,727
L-BMD (T skóre)	-2,90 ± 0,10	-2,93 ± 0,05	-2,96 ± 0,07	0,764
Fx-N (počet)	12	41	13	
Fx-P (počet)	6	30	19	0,014

Fx-N – neprítomnosť fraktúr, Fx-P – prítomnosť fraktúr

Tabuľka 6
Biochemické markery kostného obratu, BMD a incidencia fraktúr vo vzťahu k Alu I genotypom v analyzovanom súbore ($n = 121$)

	CALCR/Alu I			p (Anova)
	TT	TC	CC	
S-Ca (mmol/l)	2,39 ± 0,02	2,45 ± 0,04		0,202
S-P (mmol/l)	1,15 ± 0,01	1,16 ± 0,02		0,744
ALP (μkat/l)	1,77 ± 0,05	1,76 ± 0,07		0,980
OC (μg/l)	3,97 ± 0,13	3,83 ± 0,19		0,542
CTx (pg/ml)	673,50 ± 25,17	728,55 ± 36,28		0,215
F-BMD (T skóre)	-2,28 ± 0,05	-2,32 ± 0,06		0,607
L-BMD (T skóre)	-2,91 ± 0,05	-2,99 ± 0,07		0,360
Fx-N (počet)	35	25	6	
Fx-P (počet)	35	20	0	0,061

Fx-N – neprítomnosť fraktúr, Fx-P – prítomnosť fraktúr

zdravé postmenopauzálné ženy. Autori najvyššiu frekvenciu zaznamenali pri genotypoch Pp (49 %) a Xx (45,9 %), frekvencie alel boli $P = 0,48$, $X = 0,42$. Najpočetnejšie zastúpenie mal genotyp PpXx (41,2 %), resp. haplotyp px (52,1 %) a PX (40,9 %). Z hľadiska genetickej príbuznosti populácií je vhodné naše výsledky porovnať s údajmi, získanými v ČR. Zajíčková et al. [15] zistili vo vzorke 114 postmenopauzálnych žien najvyššiu frekvenciu genotypov Pp (50 %) a Xx (45 %), z alel boli zaznamenané frekvencie $P = 0,43$, $X = 0,35$. Autori neuvádzajú zastúpenie haplotypov. Jakimiuk et al. [16] hodnotil vzorku 64 poľských postmenopauzálnych žien, kde najvyššie frekvencie genotypov boli Pp (50 %) a xx (59,4 %). Ostatné genotypy boli v zastúpení PP (17,2 %), pp (32,8 %), XX (6,25 %) a Xx (34,4 %). Najčastejšie zastúpenie mali haplotypy px (47,4 %) a PX (17,3 %). V sledovaní Ivanovej et al. [17] bulharských osteoporotických žien ($n = 220$) bolo zastúpenie genotypov nasledovné: Pp (50 %), PP (26 %), pp (24 %), Xx (50 %), XX (33 %) a xx (17 %). Frekvencie haplotypov autori neuvádzajú. Naopak známe je zastúpenie haplotypov v niektorých ďalších kaukazských populáciách, pričom môžeme pozorovať výraznú dominanciu haplotypov px a PX. Sapir-Koren et al. [18] uvádza zastúpenie uvedených haplotypov v ruskej populácii ($n = 344$) px = 61,5 %, PX = 28,6 %; Bagger et al. [19] zistili v dánskej populácii ($n = 454$) zastúpenie px = 53,0 % a PX = 33,7 %; v holandskej populácii ($n = 1\,100$) boli zaznamenané frekvencie px = 53,0 %, PX = 36,1 % [20]. Haplotyp Px v uvedených štúdiách dosahoval frekvenciu 9,5–13,3 %, haplotyp pX nebol vôbec zaznamenaný. Gennari et al. [21] uvedené zistenia (neúplná väzbová nerovnováha) vysvetľuje výskytom (i keď nízkym) rekombinácie medzi Pvu II a Xba I polymorfizmami alebo vznikom mutácií. V nami analyzovanej populácii sme zistili prítomnosť haplotypu pX vo frekvencii takmer dosahujúcej frekvenciu haplotypu Px, čím sa vytvára typická väzbová nerovnováha. Na druhej strane je potrebné vziať do úvahy nízky počet doposiaľ otestovaných vzoriek ($n = 121$), čo môže prispievať k nepresnosti výsledkov. V rámci

CALCR/Alu I polymorfizmu môžeme frekvencie nami získaných genotypov porovnať s výsledkami analýz kaukazských populácií. Masi et al. [12] analyzovali 307 postmenopauzálnych talianskych žien (166 osteoporotických, 141 neosteoporotických), pričom zaznamenali vyššie zastúpenie genotypov s alelou T, v najvyššej frekvencii bol zaznamenaný genotyp TC (46,6 % u osteoporotických žien). TT genotyp sa vyskytoval v 38 %. Z výsledkov je možné vypočítať frekvencie alel $C = 0,41$ a $T = 0,59$. Naše výsledky viac korešpondujú s výsledkami Tabouleta et al. [22], ktorí u 215 postmenopauzálnych francúzskych žien zistili najvyššiu frekvenciu pri genotypu TT (48,8 %), pričom frekvencia alely T bola 0,71. Braga et al. [23] u 715 žien uvádzajú najvyššiu frekvenciu genotypu TT (47,8 %). V ČR bola tiež zaznamenaná najvyššia frekvencia genotypu TT (57 %), TC bolo prítomné v 39 % a CC v 4 % [24]. Podobné výsledky boli zaznamenané v poľskej populácii, pričom najčastejšie sa vyskytujúci genotyp TT mal hodnotu frekvencie 46,1 %. Ostatné genotypy boli v zastúpení TC (45,3 %) a CC (8,6 %) [25]. Vo všetkých citovaných prácach sa v najnižšej frekvencii vyskytoval genotyp CC, pričom hodnota frekvencie sa pohybovala od 4 do 10 %. Naše výsledky potvrdili, že odlišnosť v distribúcii genotypov v rámci príbuzných populácií (SR, ČR, Poľsko) nie je výrazná. Pri hodnotení FokI genotypov Nakamura et al. [9] zistili na vzorke 88 mladých mužov najvyššie zastúpenie genotypu s alelou F, pričom percento zastúpenia genotypu ff bolo veľmi nízke (2,3 %). Morita et al. [26] v populácii japonských postmenopauzálnych žien pozorovali prítomnosť F alely v 62,5 % a f alely v 37,5 %. Najčastejšie sa vyskytoval genotyp Ff (47,7 %), najmenej frekventovaný bol genotyp ff (13,6 %). Genotyp FF (50 %) bol najviac frekventovaný aj vo vzorke 154 amerických žien oproti genotypom Ff (38 %) a ff (12 %) [11]. Autori zistili rozdiely v distribúcii jednotlivých genotypov medzi černochoch a belochmi. U jedincov čiernej pleti dominoval genotyp FF (65 %), u belochov sa vo vyššej frekvencii vyskytoval genotyp Ff (45 %). I v tomto prípade bolo zaznamenané nízke percento zastúpenia genotypu ff

(4 % u černochoch, 18 % u belochov). Podobné výsledky v rámci amerických belochov zistil aj Wengreen et al. [27]. Frekvencia genotypu sa pohybovala na úrovni 16,7 %. Európske populácie majú podobnú distribúciu VDR/FokI genotypov, napríklad Macdonald et al. [28] uvádza u britských žien: FF 38,2 %; Ff 46,3 %; ff 15,5 %; v Španielsku sa frekvencia alely f pohybuje na úrovni 0,35 [29], v Taliansku 0,51 [30]. Naše výsledky sa najviac zhodujú (najmä vo vyššej frekvencii genotypu ff) s európskymi údajmi, ako aj s dátami z Českej republiky. Zajíčková et al. [31] v skupine 114 postmenopauzálnych žien zistili nasledovné zastúpenie jednotlivých genotypov: FF (34 %), Ff (50 %) a ff (16 %). Z alel bola viac zastúpená alela F (0,60) v porovnaní s alelou f (0,40).

Tabuľka 7

Biochemické markery kostného obratu, BMD a incidencia fraktúr vo vzťahu k Fok I genotypom v analyzovanom súbore ($n = 121$)

	VDR/FokI			p (Anova)
	FF	Ff	ff	
S-Ca (mmol/l)	2,46 ± 0,05	2,38 ± 0,03	2,39 ± 0,05	0,193
S-P (mmol/l)	1,16 ± 0,03	1,16 ± 0,01	1,13 ± 0,03	0,355
ALP (μkat/l)	1,76 ± 0,09	1,90 ± 0,05	1,68 ± 0,08	0,019
OC (μg/l)	3,71 ± 0,28	4,08 ± 0,15	4,06 ± 0,26	0,243
CTx (pg/ml)	684,74 ± 49,46	735,20 ± 26,63	628,27 ± 45,50	0,045
F-BMD (T skóre)	-2,43 ± 0,09	-2,27 ± 0,05	-2,31 ± 0,08	0,125
L-BMD (T skóre)	-2,91 ± 0,09	-2,91 ± 0,05	-2,98 ± 0,08	0,988
Fx-N (počet)	14	41	11	
Fx-P (počet)	12	27	16	0,225

Fx-N – neprítomnosť fraktúr, Fx-P – prítomnosť fraktúr

Vzáhy jednotlivých ESR genotypov k biochemickým markerom kostnej remodelácie potvrdila Willingova štúdia amerických žien [32], kde bol zistený zvýšený kostný obrat u genotypu pp. Po viac ako 3 rokoch sa rozdiely medzi genotypmi PP a pp v biochemických markeroch znižovali. V ďalšej americkej štúdii postmenopauzálnych žien Rapuri et al. [33] potvrdili biochemicky zvýšený kostný obrat, zvýšené kostné straty a nízke BMD trabekulárnej kosti u genotypov pp a xx, čo čiastočne korešponduje s našimi výsledkami. Vzťah haplotypov k biochemickým markerom kostného obratu v publikáciách nebol analyzovaný. Podobne ako v prípade markerov kostného obratu ani pri hladinách minerálov v sére (S-Ca,P) vo vzťahu k ESR haplotypom nemáme dostupné údaje z literatúry. V rámci sledovania vzťahu CALCR genotypov k markerom kostnej remodelácie a kalciofosfátového metabolizmu sme v našom súbore nezaznamenali štatisticky významné rozdiely. V dostupných publikáciách neboli tieto vzťahy analyzované. V štúdii Harris et al. [11] bol zistený preukazný vplyv VDR/FokI polymorfizmu na koncentráciu biochemických markerov kostného obratu v krvi: jedinci s genotypom FF mali štatisticky nižšiu koncentráciu osteokalcínu a crosslapsových markerov. Rovnaké výsledky dosiahli Falchetti et al. [30]. V rámci OC v našej práci môžeme pozorovať podobnú, avšak nepreukaznú tendenciu, naopak štatisticky významné rozdiely pri ALP a CTx vychádzali vyššie koncentrácie uvedených markerov u jedincov s heterozygotným genotypom. V českej štúdii autori nezaznamenali preukazné asociácie VDR/FokI genotypov s biochemickými markermi kostnej remodelácie [31]. Koncentrácie osteokalcínu neboli ovplyvnené VDR/ FokI polymorfizmom ani v štúdii McClure et al. [34].

Kým vo viacerých európskych populáciách nebol zaznamenaný štatisticky významný vplyv ESR polymorfizmov na BMD [19,21,35], v holandskej populácii sa zistili štatisticky významné asociácie genotypov pp a xx so znížením BMD [20]. Jakimiuk [16] v štúdii poľských postmenopauzálnych žien uvádza vyššiu BMD u genotypu PP ako u genotypov Pp a pp. Príčinou môže byť zvýšená senzitivita receptoru na estrogény u nositeľov alely P, čo podporujú aj ďalšie nálezy ako skorší nástup menarché u žien s alelou p. Podobné výsledky zaznamenal Salmen [36] vo fínskej štúdii a Willing [32] v americkej štúdii bielych postmenopauzálnych žien. V oboch prípadoch vykazoval genotyp pp štatisticky nižšie hodnoty BMD. Po viac ako 3-ročnom období sa však rozdiely v hodnotách BMD medzi genotypmi pp a PP stierali. Tento nález podporuje predpoklad pozitívneho vplyvu genotypu PP na rast, maturáciu kosti a budovanie množstva kostnej hmoty – PBM (peak bone mass). V americkej štúdii vzťah genotypu pp k BMD krčku femoru nebol dokázaný. Opačné výsledky zaznamenali Kobayashi et al. [8] v štúdii japonských žien, kde nízke hodnoty BMD boli u pacientiek s PP genotypom. Napokon metaanalýza 30-tich štúdií [37] potvrdila pozitívny vplyv iba Xba I polymorfizmu na BMD. Podobné výsledky zaznamenal Salmen [36] vo fínskej štúdii a Ivanova [17] v bulharskej štúdii, ktoré potvrdili vzťah k nízkej BMD u genotypu xx. Navyše Ivanova [17] uvádza vzťah genotypu xx len ku trabekulárnej kosti (stavce a distálne predlaktie). Opačné výsledky uvádza Greendale [38] v americkej štúdii, ktorá nepotvrdila vzťah Xba I poly-

morfizmu ku zníženej BMD. Naše výsledky čiastočne korešponujú s výsledkami van Meurs et al. [20], avšak pozitívne asociácie Xba I polymorfizmu s BMD sme nezistili, čo podporuje kontroverzné výsledky predchádzajúcich štúdií. V prípade Xba I polymorfizmu tieto výsledky vysvetľuje Greendale [38] relatívne nízkou frekvenciou homozygotných genotypov, čo limituje detekciu ich vplyvu na BMD. Vzhľadom na lokalizáciu obidvoch polymorfizmov a predpoklad prítomnosti väzby medzi nimi by bolo možné očakávať ich synergický vplyv na analyzované ukazovatele. Tieto rozdiely naznačujú, že v prípade Pvu II a Xba I polymorfizmov ide len o väzbové markery (čo podporujú výsledky ostatných štúdií), alebo sú dôsledkom limitovaného počtu analyzovaných jedincov.

Z publikovaných prác je známy vplyv haplotypu Px na nízku BMD v škótskej [13] a ruskej populácii [18]. Analýza poľskej populácie postmenopauzálnych žien však nepreukázala žiadnu asociáciu haplotypu Px ku BMD podobne ako Van Meurs [20]. Haplotyp px vykazoval štatisticky pozitívny vzťah ku zníženej BMD lumbálnej chrbtice, kým haplotyp PX bol asociovaný so zvýšenou BMD lumbálnej chrbtice [16]. Van Meurs [20] v holandskej populácii tiež uvádza štatisticky významný pokles BMD u haplotypu px a zvýšenú BMD L chrbtice mali nositeľky haplotypu PX. Výsledky asociácií CALCR genotypov s BMD vo svete nie sú jednoznačné. V rôznych štúdiách, zahŕňajúcich populácie kaukazského pôvodu, boli zistené najvyššie hodnoty BMD pri genotypu TT [23]. Masi et al. [12] zistili nízke hodnoty BMD stavcov lumbálnej chrbtice u homozygotov CC v porovnaní s heterozygotmi TC. Opačné výsledky zaznamenali Taboulet [22] a Drews [25], ktorí zistili vyššie hodnoty BMD krčku femoru u heterozygotov TC v porovnaní s nositeľmi genotypu TT. Iné výsledky zaznamenali Zhang et al. [39] v štúdii čínskej populácie, kde nositelia genotypu TC mali štatisticky významne vyššiu BMD krčku femoru aj lumbálnej chrbtice, ako u genotypu CC. V ČR boli zaznamenané štatisticky významné rozdiely v BMD medzi homozygotnými genotypmi, pričom vyššie hodnoty BMD dosahovali postmenopauzálny ženy s genotypom TT [24]. V našom súbore je možné sledovať podobný trend, rozdiely však boli takmer zanedbateľné a nedosiahli štatisticky významnú hladinu. Harris et al. [11] vo svojej štúdii zistili preukazný vplyv VDR/FokI polymorfizmu na BMD: jedinci s genotypom ff mali nižšiu BMD ako homozygoti FF. Rovnaké výsledky dosiahli Falchetti et al. [30]. V analýze postmenopauzálnych mexických žien bol tiež zaznamenaný vzťah k nízkej BMD krčku femoru a lumbálnej chrbtice u genotypu ff v porovnaní s genotypom FF [40]. Na druhej strane Lisker et al. [41] nezaznamenali rozdiely v BMD medzi jednotlivými genotypmi. V ČR boli tiež zistené štatisticky významné rozdiely v BMD medzi VDR/FokI genotypmi, pričom ff genotyp disponoval nižšou BMD [31].

Pri ESR polymorfizmoch neboli vo svete zaznamenané štatisticky významné asociácie s výskytom fraktúr [42,43]. Výsledky analýzy VDR/FokI nie sú jednoznačné. Moffett et al. [44] zistili zvýšené riziko vzniku fraktúry u jedincov s genotypom FF, na druhej strane Horst-Sikorska et al. [45] a Wengreen [27] nezaznamenali žiadne rozdiely medzi genotypmi v tomto ukazovateli. V štúdii tureckej populácie Bolu et al. [46] zaznamenali štatisticky významne zníženú BMD

krčku femoru a zvýšený výskyt fraktúr u genotypu Ff. Naopak v populácii taiwanských žien bola nízka BMD a 2,8krát vyššie riziko fraktúr tiel stavcov u genotypu ff v porovnaní s genotypom FF, čo čiastočne korešponduje s našimi výsledkami. Pri CALCR/Alu I polymorfizme je známa práca Taboulet et al. [22], ktorí zistili znížené riziko fraktúr pri heterozygotnom genotypu.

Záver

V rámci predikcie rizika vzniku osteoporózy možno na základe našej analýzy považovať za najrizikovejší genotyp ESR/pp, čo potvrdilo aj jeho zastúpenie v skupine jedincov s fraktúrou, kde sme zaznamenali najväčšie rozdiely v porovnaní so skupinou bez fraktúry (najvyššia hodnota χ^2 testu). Naše výsledky však možno považovať za predbežné, pretože počet pacientiek zaradených do štúdie vzhľadom na jej náročnosť bol nízky. Išlo o pilotnú štúdiu v rámci nitrianskeho kraja. Potvrdenie vzťahov polymorfizmov v kandidátskych génoch k jednotlivým parametrom OP nám môže v budúcnosti napomôcť pri vyhľadávaní rizikových skupín (tzv. OP genotyp), pochopiť etiológiu, patogenézu a najšť senzitívne genotypy pre jednotlivé formy antiosteoporotickej liečby.

Literatúra

- Štěpán J. Syndrom osteoporózy. Thomayerova sbírka, Praha, Avicenum, 1988.
- Sršeň Š, Sršňová K. Základy klinickej genetiky. Martin, Osveta, 2000.
- Riggs BL, Melton LJ. Involutional Osteoporosis. New Engl J Med 1986; 314: 1676–1686.
- Mazess RB et al. Etiology of Osteoporosis. Bone Mineral 1987;15:211.
- Arden NK, Baker J, Hogg C et al. The Heritability of Bone Mineral Density Ultrasound of The Calcaneus and Hip Axis Length: A Study of Postmenopausal Twins. J Bone Miner Res 1996;11:530–534.
- Morrison NA, Baker A et al. ApaI Dimorphism At The Human Vitamin D Receptor Gene Locus. Nucleic Acids Research 1989;17:2150–2155.
- Menasce LP, White GR, Harrison CJ et al. Localization of The Estrogen Receptor Locus To Chromosome 6q25.1 By FISH and a Simple Post-FISH Banding Technique. Genomics 1993;17:263–265.
- Kobayashi S, Inoue S, Hosi T et al. Association of Bone Mineral Density With Polymorphism of The Estrogen Receptor Gene. Journal of Bone And Mineral Research 1996;11:306–311.
- Nakamura M, Zhang Z, Shan L et al. Allelic Variants of Human Calcitonin Receptor In The Japanese Population. Human Genetics 1997;99:38–41.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold-Spring Harbor Lab., New York 1989, p 1626.
- Harris SS, Eccleshall TR, Gross C et al. The Vitamin D Receptor Start Codon Polymorphism (FokI) and BMD In Premenopausal American Black and White Women. J Bone Miner Res 1997;12:1043–1048.
- Masi L et al. Polymorphisms of The Calcitonin Receptor Gene Are Associated With Bone Mineral Density In Postmenopausal Italian Women. Biochemistry and Biophysics Research Communications 1998;248:190–195.
- Albagha OME, McGuigan FE, Reid DM et al. Estrogen Receptor Alpha Gene Polymorphisms and Bone Mineral Density. J Bone Miner Res 2001;16:128–134.
- Becherini L, Gennari L, Masi L et al. Evidence of A Linkage Disequilibrium Between Polymorphisms In The Human ESR1 Gene and Their Relationship To Bone Mass Variation In Postmenopausal Italian Women Hum Mol Genet 2000;9:2043–2050.
- Zajčková K, Žofková I et al. Osteoporosis: Genetic Analysis of Multifactorial Disease. Endocr Regul 2003;37:31–44.
- Jakimiuk AJ, Nowicka M, Adamiak A et al. Prevalence of ESR1 PvuII and XbaI Polymorphism In Population of Polish Postmenopausal Women. Pol Histochem Et Cytobiol 2007;4:331–338.
- Ivanova JT, Doukova PB, Boyanov MA et al. PvuII and XbaI Polymorphisms of The ER Gene and BMD I Bulgarian Population Sample Hormones 2007;6:36–43.
- Sapir-Koren R, Livshits G, Kobylansky E. Associations and Linkage Disequilibrium Analysis Suggest Genetic Effects of ESR1 and COL1A1 Genes On BMD In Caucasian Women. Calcif Tissue Int 2003;72:643–650.
- Bagger YZ, Jorgensen HL, Heegard AM et al. No Major Effect of ER Gene Polymorphisms On BMD of Bone Loss In Postmenopausal Danish Women. Bone 2000;26:111–116.
- Van Meurs JB, Schutt SC, Weel AE et al. Associations of 5' ESR1 Gene Polymorphisms With BMD, Vertebral Bone Area and Fracture Risk. Human Mol Genet 2003;12:1745–1754.
- Gennari L, Merlotti D, De Pala V et al. ER Gene Polymorphisms and The Genetics of Osteoporosis. Am Journal of Epidemiol 2005;161:307–320.
- Taboulet J, Frenkian M, Frendo J et al. Calcitonin Receptor Polymorphism Is Associated With A Decreased Fracture Risk In Postmenopausal Women. Human Molecular Genetics 1998;7:2129–2133.
- Braga V, Sangalli A, Malerba G et al. Relationship Among VDR (BsmI and FokI), COL1A1 and CALCR Polymorphisms With Bone Mass, Bone Turnover Markers and Sex Hormones In Men. Calcif Tissue Int 2002;70:457–462.
- Žofková I, Zajčková K, Hill M et al. Does Polymorphism C1377T of The CALCR Gene Determine BMD In Postmenopausal Women? Exp Clin Endocrinol Diabetes 2003;11:1:447.
- Dreus K et al. Genetic Polymorphism of The Calcitonin Receptor Gene and Bone Mineral Density In Polish Population of Postmenopausal Women. Gynecol Pol 2005;76:612–618.
- Morita A, Iki M, Dohi Y et al. Prediction of BMD From VDR Polymorphisms Is Uncertain In Representative Samples of Japanese Women. Int Journal of Epidemiol 2004;33:979–988.
- Wengreen H et al. Vitamin D Receptor Genotype and Risk of Osteoporotic Hip Fracture In Elderly Women of Utah. Osteoporosis International 2006;7:286–299.
- MacDonald HM, McGuigan FE, Stewart A et al. Large-Scale Population-Based Study Shows No Evidence of Association Between Common Polymorphism of The VDR Gene and BMD In British Women. J Bone Miner Res 2006;21:151–162.
- Bustamante M, Nogués X, Enjuanes A et al. COL1A1, ESR, VDR and TGFBI Polymorphisms and Haplotypes In Relation To BMD In Spanish Postmenopausal Women. Osteoporosis Int 2007;18:235–243.
- Falchetti A, Sferzza C, Cepollaro C et al. FokI Polymorphism of The Vitamin D Receptor Gene Correlates With Parameters of Bone Mass and Turnover In A Female Population of The Italian Island of Lampedusa. Calcif Tissue Int 2007;80:15–20.
- Zajčková K, Žofková I. Osteoporosis: Genetic Analysis of Multifactorial Disease. Endocrinology Regulation 2003;37:31–44.
- Willing MC, Sowers M, Aron D et al. Bone Mineral Density and Its Change In White Women: Estrogen and Vitamin D Receptor Genotypes and Their Interaction. J Bone Miner Res 1998;13:695–705.
- Rapury PB et al. ESR alpha Gene Polymorphisms Are Associated With Changes In Bone Remodeling Markers and Treatment Response To Estrogen. Maturitas 2006;53:371–379.
- McClure L et al. Vitamin D Receptor Polymorphisms, BMD and Bone Metabolism In Postmenopausal Mexican-American Women. J Bone Miner Res 1997;12:234–240.
- Aeressens J, Dequeker J, Peeters J et al. Polymorphisms of The VDR, ER and COL1A1 Genes and Osteoporotic Hip Fracture In Elderly Postmenopausal Women. Osteoporosis International 2000;11:583–591.
- Salmen T, Heikkinen AM, Mahonen A et al. Early Postmenopausal Bone Loss Is Associated With Pvu II ER Gene Polymorphism In Finish Women. J Bone Miner Res 2000;15:315–321.
- Ioannidis JP, Stavrou I, Zois C et al. Associations of Polymorphisms of The ESR1 Gene With BMD and Fracture Risk in Women. J Bone Miner Res 2002;17: 2048–2060.
- Grendale GA, Barrett-Connor E, Edelstein S et al. Lifetime Leisure Exercise and Osteoporosis. American Journal of Epidemiology 2006;14:951–959.
- Zhang YY, Long JR, Liu PY et al. ER and VDR Gene Polymorphisms and BMD: Association Study of Healthy Pre and Postmenopausal Chinese Women. Biochem Biophys Res Commun 2003;308:777–783.
- Wood RJ et al. The Genetics of Osteoporosis Vitamin D Receptor Polymorphisms 1998;18:233–258.
- Lisker R, Lopez MA, Jasqui S. Association of VDR Polymorphisms With Osteoporosis In Mexican Postmenopausal Women. Humn Biology 2003;75:399–403.
- Langdahl BL et al. A TA Repeat Polymorphism In The Estrogen Receptor Gene Is Associated With Osteoporotic Fractures But Polymorphisms In The First Exon and Intron Are Not. J Bone Miner Res 2000;15:2222–2230.
- Vandevyver C et al. Lack of Association Between Estrogen Receptor Genotypes and Bone Mineral Density, Fracture History or Muscle Strength In Elderly Women. J Bone Miner Res 1999;14:1576–1582.
- Moffett SP, Dillon KA, Yerples LA et al. Identification and Association Analysis of SNP In The Human Gene and Osteoporosis Phenotypes. Bone 2009; 44:999–1002.
- Horst-Sikorska V, Wawrzynińska A, Marcinkowska M et al. VDR Gene Polymorphisms As Indicator of Alendronate Therapy Postmenopausal Osteoporotic Women Effectiveness. Osteoporosis International 2009;20:121.
- Bolu SE, Orkunoglu E, Deniz F et al. The VDR FokI Start Codon Polymorphism and BMD In Male Hypogonadism. Journal of Endocrinol Invest 2005;9:345–351.