

GENOTYPOVÉ A ALELOVÉ FREKVENCIE POLYMORFIZMU rs1544410 VDR GÉNU VO VZŤAHU K OSTEOPORÓZE U ŽIEN ZO SLOVENSKA

Iveta Boroňová¹, Jarmila Bernasovská¹, Viktória Tesľuková¹, Soňa Mačeková¹, Matúš Mathia¹, Marta Mydlárová Blaščáková¹, Eva Petrejčíková¹, Michaela Zigová¹, Zuzana Midová¹, Michaela Fecenková¹, Jaroslava Hubcejová¹, Jana Gaľová¹, Mária Majherová²

¹ Prešovská univerzita v Prešove, Fakulta humanitných a prírodných vied, Katedra biológie, ul. 17. novembra 1, 081 16 Prešov, Slovensko, e-mail: iveta.boronova@unipo.sk

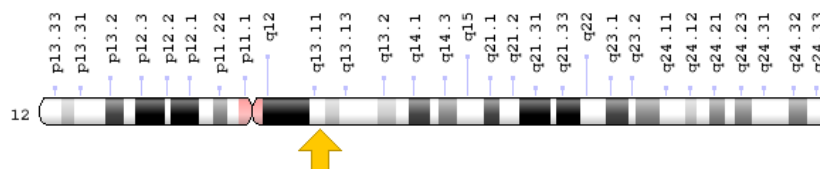
² Prešovská univerzita v Prešove, Fakulta humanitných a prírodných vied, Katedra fyziky, matematiky a techniky, ul. 17. novembra 1, 081 16 Prešov, Slovensko, e-mail: maria.majherova@unipo.sk

Abstract: *Genotype and allele frequencies of rs1544410 VDR gene polymorphism in relation to osteoporosis in women from Slovakia.* Osteoporosis is a multifactorial disease with a significant proportion of genetic factors involved in the etiopathogenesis. VDR gene encoding the vitamin D receptor is one of the candidate genes of osteoporosis. The aim of our study was to determine genotype and allele frequencies of rs1544410 polymorphism of VDR gene and to test the association with fracture risk in the group of 86 Slovak postmenopausal women with diagnosed osteoporosis/osteopenia and the control group of 86 healthy postmenopausal women. Genomic DNA was isolated using a commercial NucleoSpin®Blood kit from peripheral blood. Analyses of rs1544410 VDR gene polymorphism were performed by real-time PCR using the 7500 Fast Real-Time PCR System and the Step One Real-Time PCR System using the TaqMan®SNP Genotyping Assay. We detected the following distribution of rs1544410 VDR gene genotypes and alleles: CC – 44.2%, CT – 55.8%, TT – 0.0%; C – 72.1%, T – 27.9%. The following genotype and allele frequencies were detected in the control group: CC – 41.9%, CT – 58.1%, TT – 0.0%, C – 70.9%, T – 29.1%. The differences in the frequencies of genotypes and alleles of the BsmI polymorphism of VDR gene were not statistically significant.

Key words: disease, genetic factors, DNA, real-time PCR analysis, females, Central Europe

Úvod

Osteoporóza (OP) je systémové ochorenie skeletu charakterizované nerovnováhou kostnej prestavby v zmysle prevažujúcej osteoresorpcie nad novotvorbou kosti. Dôsledkom týchto zmien dochádza k úbytku kostnej hmoty a strate pevnosti kosti s následným zvýšením rizika vzniku zlomeniny (Šteňová, Šteňo a Baqi 2008). Osteoporóza je multifaktoriálne podmienené ochorenie, pričom genetická zložka má výrazný podiel. Predpokladá sa, že genetické faktory podmieňujú nielen kostnú hustotu, ale aj úroveň kostnej obnovy, mikroarchitektúru kostí a celkovú kvalitu kostí (Payer a Killinger 2012, Ralston a Uitterlinden 2010). Jedným z kandidátnych génov osteoporózy je VDR gén. V géne VDR bolo opísaných niekoľko sekvenčných variantov, ktoré sa môžu vyskytovať v kódujúcich aj nekódujúcich častiach génu (obr. 1). V súvislosti s kostnou minerálnou denzitou (BMD) a rizikom rozvoja komplikácií súvisiacich s osteoporózou sú najčastejšie analyzované nasledovné polymorfizmy génu pre receptor vitamínu D: BsmI G>A (rs1544410), TaqI T>C (rs731236), ApaI G>T (rs7975232) a FokI T>C (rs2228570) (Techapatiphandee et al. 2018, Rivera-Paredes et al. 2018, Marozik et al. 2018, Zhang et al. 2018, González-Mercado et al. 2013).



Obr. 1: Chromozómová lokalizácia VDR génu (Genetics home reference 2019; upravené)
 Fig. 1: Chromosome localization of the VDR gene (Genetics home reference 2019; modified)

V polymorfizme VDR génu *rs1544410* dochádza k tranzíčnej substitúcii báz cytozínu (C) a tymínu (T). Ide o jednonukleotidový polymorfizmus lokalizovaný v intróne 8. Tento sekvenčný variant je označovaný ako *BsmI* polymorfizmus (Poon et al. 2012). Polymorfizmus *BsmI* VDR génu je v reštrikčnom mieste genotypizovaný do troch kategórií genotypov: *BB*, *Bb*, *bb* (Qin et al. 2013).

Súbor a metódy

Cieľom tejto štúdie bolo stanovenie distribúcie genotypov a alel polymorfizmu *rs1544410* VDR génu a následné porovnanie týchto frekvencií v súbore 86 slovenských postmenopauzálnych pacientok s diagnostikovanou osteoporózou ($n = 30$) / osteopéniou ($n = 56$) s kontrolným súborom 86 zdravých postmenopauzálnych žien. Denzitometrické meranie BMD (body mass density) sa uskutočnilo prostredníctvom celotelového denzitometra DXA Hologic (Hologic, Waltham, USA) v oblasti lumbálnych stavcov L1 – L4, v oblasti proximálnej časti femuru a v oblasti krčka femuru, s následným rozdelením žien na základe T-skóre do dvoch skupín: pacientky s osteopéniou (T-skóre $-1,0 - -2,5$) a pacientky s osteoporózou (T-skóre $< -2,5$). Pacientky s diagnostikovanou osteoporózou/osteopéniou boli ďalej rozdelené ešte do ďalších dvoch skupín: pacientky bez fraktúry a pacientky s fraktúrou. Genómová DNA sa izolovala použitím komerčného kitu NucleoSpin® Blood z perifernej krvi. Na detekciu polymorfizmu *rs1544410* VDR génu bola použitá metóda alelickej diskriminácie, Real-Time PCR s využitím TaqMan® SNP Genotyping Assay, podľa štandardného protokolu prístrojom Step One Real-Time PCR System. Hardy-Weinbergova rovnováha sa testovala chí-kvadrát (χ^2) testom. Pacientky zahrnuté do štúdie boli informované o výskumnom zámere, účasť v štúdiu potvrdili informovaným súhlasom, ktorý schválila Etická komisia Prešovskej univerzity, pod číslom 2/2010.

Výsledky

Real-time PCR analýzy vzoriek jedincov analyzovaných súborov odhalili nasledovnú distribúciu genotypov a alel polymorfizmu *rs1544410* VDR génu v skupine osteopenických/osteoporotických pacientok: CC – 44,2 %, CT – 55,8 %, TT – 0 %; C – 72,1 %, T – 27,9 %. V kontrolnom súbore sa detegovali nasledovné frekvencie genotypov a alel: CC – 41,9 %, CT – 58,1 %, TT – 0 %, C – 70,9 %, T – 29,1 % (tab. 1).

Na základe molekulárno-genetickej analýzy sme zistili rozdiely v distribúcii genotypov a alel polymorfizmu *rs1544410* VDR génu v súbore pacientok s osteoporózou a v kontrolnom súbore zdravých postmenopauzálnych žien, avšak zistené rozdiely neboli štatistické významné ($p = 0,471$; $p = 0,811$).

Prítomnosť genotypu TT sa nedetegovala v súbore pacientok s osteopéniou/osteoporózou, ani v kontrolnom súbore žien. Hodnoty BMD v oblasti lumbálnych stavcov L1 – L4, v oblasti proximálnej časti femuru a v krčku femuru sa analyzovali vo vzťahu k detegovaným genotypom polymorfizmu *rs1544410* VDR génu (tab. 2).

Výsledky analýz nepotvrdili signifikantné rozdiely priemerných hodnôt BMD v oblasti lumbálnych stavcov L1 – L4, v krčku femuru a v oblasti proximálnej časti femuru vo vzťahu k jednotlivým genotypom polymorfizmu *rs1544410* VDR génu.

Súčasťou tejto štúdie boli analýzy priemerných hodnôt T-skóre v oblasti lumbálnych stavcov L1 – L4, v krčku femuru a v oblasti proximálnej časti femuru v súbore pacientok s diagnostikovanou osteopéniou a v súbore pacientok s osteoporózou. V súbore pacientok s diagnostikovanou osteoporózou boli detegované nasledovné hodnoty T-skóre: -2,7; -2,5; -2,0. V súbore pacientok s diagnostikovanou osteopéniou to boli hodnoty T-skóre: -1,1; -1,6; -0,93.

Rozdiely priemerných hodnôt T-skóre v súbore pacientok s klinickou diagnózou osteoporózy a osteopéniou boli štatisticky významné ($p < 0,01$; obr. 1).

Tab. 1: Distribúcia genotypov a alel polymorfizmu *rs1544410* VDR génu

Table 1: Distribution of genotypes and alleles of polymorphism *rs1544410* VDR gene

	Súbor pacientok osteopénia/osteoporóza (n = 86)			Kontrolný súbor žien (n = 86)		
Distribúcia genotypov	CC	38	44,2 %	CC	36	41,9 %
	CT	48	55,8 %	CT	50	58,1 %
	TT	0	0,0 %	TT	0	0,0 %
	HWE (p) = 0,403			HWE (p) = 0,302		
	χ^2 test = 0,118 p = 0,471					
Distribúcia alel	C	124	72,1 %	C	122	70,9 %
	T	48	27,9 %	T	50	29,1 %
	χ^2 test = 0,06 p = 0,811					

p – hladina štatistickej významnosti, n – počet jedincov, CC, CT, TT – genotypy, HWE (p) – hodnota štatistickej významnosti vypočítaná podľa Hardyho-Weinbergovho zákona

p – significance value, *n* – number of individuals, *CC*, *CT*, *TT* – genotypes, *HWE (p)* – value of statistical significance calculated according to Hardy–Weinberg principle

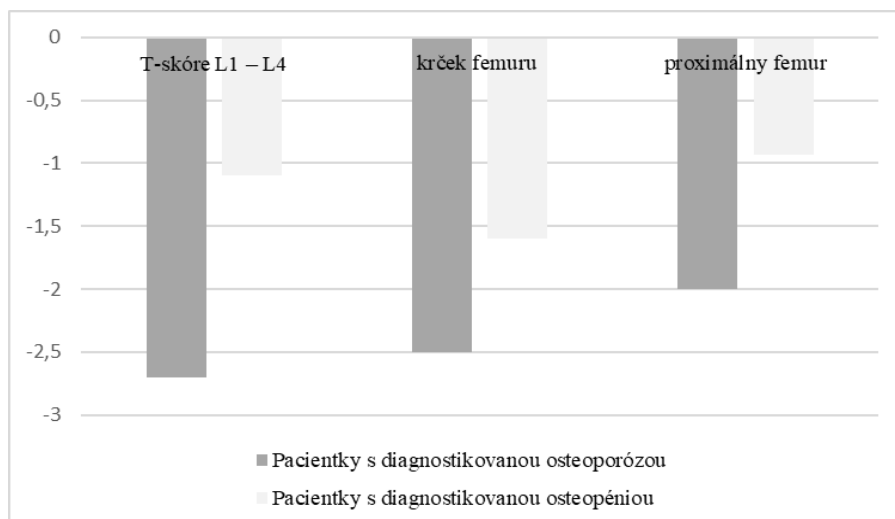
Tab. 2: Priemerné hodnoty BMD (g/cm^2) vo vzťahu k detegovaným genotypom polymorfizmu *rs1544410* VDR génu v súbore osteopenických/osteoporotických pacientok

Table 2: Average BMD values (g/cm^2) relative to detected genotype of the polymorphism *rs1544410* VDR gene in osteopenic/osteoporotic patient

Oblasť	Genotyp						p hodnota
	CC	SD	CT	SD	TT	SD	
stavce L1 – L4	0,994	0,149	0,996	0,173	0,00	0,000	0,957
proximálny femur	0,870	0,107	0,845	0,117	0,00	0,000	0,857
krček femuru	0,793	0,083	0,769	0,090	0,00	0,000	0,851

p – hladina štatistickej významnosti, CC, CT, TT – genotypy, SD – smerodajná odchýlka

p – significance value, *CC*, *CT*, *TT* – genotypes, *SD* – standard deviation



Obr. 1: Priemerné hodnoty T-skóre u pacientok s osteoporózou a osteopéniou

Fig. 1: Comparison of average values of T-scores in patients with osteoporosis and osteopenia

V súbore pacientok s klinickou diagnózou osteoporózy sa následne vykonali analýzy priemerných hodnôt BMD a T-skóre v oblasti L1 – L4, v krčku femuru a v oblasti proximálnej časti femuru vo vzťahu k výskytu fraktúr (tab. 3).

Na základe štatistického vyhodnotenia výsledkov sme nezistili štatisticky významnú asociáciu priemerných hodnôt BMD a T-skóre v oblasti lumbálnych stavcov L1 – L4, v krčku femuru a v oblasti proximálnej časti femuru vo vzťahu k výskytu fraktúr.

Tab. 3: Analýzy priemerných hodnôt BMD a T-skóre vo vzťahu k výskytu fraktúr

Table 3: Analyses of average values of BMD and T-score with occurrence of fractures

	Pacientky s fraktúrou	Pacientky bez fraktúry	p hodnota
BMD L1 – L4	0,956	1,016	0,115
T-skóre L1 – L4	-1,857	-1,352	0,110
BMD krčiek femuru	0,766	0,786	0,315
T-skóre krčiek femuru	-1,961	-1,812	0,313
BMD proximálny femur	0,834	0,867	0,208
T-skóre proximálny femur	-1,371	-1,110	0,212

p – hladina štatistickej významnosti

p – significance value

Diskusia

Osteoporóza predstavuje multifaktoriálne ochorenie so silným genetickým komponentom, gén VDR je jedným z kandidátnych génov osteoporózy (Qin et al. 2013). Vitamín D má široké spektrum biologických funkcií vrátane úlohy v kalciovej aj fosfátovej homeostáze a kostnom metabolizme, ktoré ovplyvňujú funkčnosť ciev (Zhang et al. 2018). Doposiaľ sa realizovalo viacero štúdií s cieľom objasniť úlohu *BsmI* polymorfizmu VDR génu ako genetického determinantu osteoporózy (Zintzaras, Rodopoulou a Koukoulis 2006, Zhao, Zhang a Zhou 2016, Uitterlinden et al. 2006, Fang et al. 2006, González-Mercado et al. 2013, Techapatiphandee et al.

2018, Rivera-Paredes et al. 2018, Marozik et al. 2018, Zhang et al. 2018) s protichodnými výsledkami.

V štúdií Ivanovej et al. (2006) sa testovala asociácia polymorfizmov *FokI* (*rs2228570*) a *BsmI* (*rs1544410*) VDR génu s hodnotami BMD u žien bulharskej národnosti, v súbore 117 pacientok s diagnostikovanou osteoporózou/osteopéniou a v kontrolnom súbore 102 žien. Štúdia potvrdila korelácie *FokI* polymorfizmu VDR génu s nízkymi hodnotami BMD, korelácie *BsmI* polymorfizmu vo vzťahu k BMD sa nepotvrdili. Výsledky meta-analýzy štúdie An, Song a Chen (2017) po zahrnutí dostupných štúdií na základe analýzy súboru 688 pacientok s osteoporózou a kontrolného súboru 730 postmenopauzálnych žien v čínskej populácii taktiež nepotvrdili významnú asociáciu *BsmI* polymorfizmu VDR génu s osteoporózou.

Viacere štúdie potvrdili asociáciu *BsmI* polymorfizmu VDR génu s rizikom vzniku osteoporózy (Techapatiphandee et al. 2018, Rivera-Paredes et al. 2018, Marozik et al. 2018). Ahmad et al. (2018) vo svojej štúdií, do ktorej bolo zahrnutých 254 postmenopauzálnych žien s diagnostikovanou osteoporózou a v kontrolnom súbore 254 zdravých postmenopauzálnych žien potvrdili významnú asociáciu kombinácie genotypov *BbFF* a *bbff* polymorfizmov *FokI* a *BsmI* VDR génu s nízkymi hodnotami BMD ($p = 0,040$). Marozik et al. (2018) vo svojom výskume taktiež poukazujú na význam rizikových alel polymorfizmov *Apal*, *BsmI* a *TaqI*. Autori uvádzajú, že haplotyp C-G-C rizikových alel polymorfizmov *Apal*, *BsmI* a *TaqI* vykazoval významnú asociáciu s postmenopauzálnou osteoporózou (OR = 4,7; 95% CI 2,8 – 8,1; $p < 0,0001$).

Záver

Táto štúdia poskytla údaje týkajúce sa významu polymorfizmu *rs1544410* VDR génu zahrnutého v etiopatogenéze osteoporózy. Výsledky štúdie potvrdili štatisticky významné rozdiely priemerných hodnôt T-skóre v súbore pacientok s klinickou diagnózou osteopénie/osteoporózy ($p < 0,01$). Výsledky analýz nepotvrdili asociáciu priemerných hodnôt BMD a T-skóre v oblasti lumbálnych stavcov L1 – L4, v krčku femuru a v oblasti proximálnej časti femuru s rizikom fraktúr. Sú nevyhnutné ďalšie štúdie zahŕňajúce početnejšie súbory pacientok a testovanie asociácií špecifických genotypov a alel viacerých polymorfizmov kauzálnych génov vo vzťahu k osteoporóze. Osteogenetika má v súčasnej dobe významné miesto v diagnostike a liečbe osteoporózy a výraznou mierou prispieva k rozvoju personalizovanej medicíny.

PodĎakovanie

Táto štúdia bola podporená projektom VEGA 1/0461/19 a 001PU-2-1/2018 a vznikla aj vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a inovácie pre projekt: „Inovatívne diagnostické postupy personalizovanej medicíny so zameraním na skeletomuskulárne ochorenia“ spolufinancovanej zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja – NFP313010T543.

Literatúra

AHMAD, I., JAFAR, T., MAHDI, F., ARSHAD, M., DAS, S. K., WALIULLAH, S., MAHDI, A. A., 2018: Association of Vitamin D Receptor (*FokI* and *BsmI*) Gene Polymorphism with Bone Mineral Density and Their Effect on 25-Hydroxyvitamin D Level in North Indian Postmenopausal Women with Osteoporosis. *Indian. J. Clin. Biochem.*, 33(4):429-437.

AN, M., SONG, X. B., CHEN, X. Y., 2017: Vitamin D receptor *BsmI* polymorphism may be associated with an decreased osteoporosis risk in South China. *Cell Mol Biol.*, 63(5):50-54.

FANG, Y., RIVADENEIRA, F., VAN MEURS, J. B., POLS, H. A., IOANNIDIS, J. P., UITTERLINDEN, A. G., 2006: Vitamin D receptor gene *BsmI* and *TaqI* polymorphisms and fracture risk: a meta-analysis. *Bone*, 39(4):938-945.

GENETICS HOME REFERENCE, 2019: VDR Gene. Online. Available: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/VDR#location>. 7. 3. 2019

- GONZÁLEZ-MERCADO, A., SÁNCHEZ-LÓPEZ, J. Y., REGLA-NAVA, J. A., GÁMEZ-NAVA, J. I., GONZÁLEZ-LÓPEZ, L., DURAN-GONZALEZ, J., CELIS, A., PEREA-DÍAZ, F. J., SALAZAR-PÁRAMO, M., IBARRA, B., 2013: Association analysis of vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density in postmenopausal Mexican-Mestizo women. *Genet. Mol. Res.*, 12(3):2755-2763.
- IVANOVA, J., DOUKOVA, P., BOYANOV, M., POPIVANOV, P., 2006: FokI and BsmI Polymorphisms of the Vitamin D Receptor Gene and Bone Mineral Density in a Random Bulgarian Population Sample. *Endocrine*, 29(3):413-418.
- MAROZIK, P. M., TAMULAITIENE, M., RUDENKA, E., ALEKNA, V., MOSSE, I., RUDENKA, A., SAMOKHOVEC, V., KOBETS, K., 2018: Association of Vitamin D Receptor Gene Variation with Osteoporosis Risk in Belarusian and Lithuanian Postmenopausal Women. *Front Endocrinol.*, 5(9):1-9.
- MITCHELL, B. D., STREETEN, E. A., 2013: Clinical impact of recent genetic discoveries in osteoporosis. *Appl. Clin. Genet.*, 6:75-85.
- PAYER, J., KILLINGER, Z., 2012: *Osteoporóza*. Bratislava, Herba, 250 s.
- POON, A. H., GONG, L., BRASCH-ANDERSEN, C., LITONJUA, A. A., RABY, B. A., HAMID, Q., LAPRISE, C., WEISS, S. T., ALTMAN, R. B., KLEIN, T. E., 2012: Very important pharmacogene summary for VDR. *Pharmacogenet. Genomics*, 22(10):758-763.
- RALSTON, S. H., UITTERLINDEN, A. G., 2010: Genetics of osteoporosis. *Endocr. Rev.*, 31(5):629-662.
- POURESMAEILI, F., JAMSHIDI, J., AZARGASHB, E., SAMANGOUEE, S., 2013: Association between Vitamin D Receptor Gene BsmI Polymorphism and Bone Mineral Density in a population of 146 Iranian Women. *Cell J.*, 15(1):75-82.
- RIVERA-PAREDEZ, B., MACÍAS, N., MARTÍNEZ-AGUILAR, M. M., HIDALGO-BRAVO, A., FLORES, M., QUEZADA-SÁNCHEZ, A. D., DENOVA-GUTIÉRREZ, E., CID, M., MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, A., OROZCO, L., QUITERIO, M., FLORES, Y. N., SALMERÓN, J., VELÁZQUEZ-CRUZ, R., 2018: Association between Vitamin D Deficiency and Single Nucleotide Polymorphisms in the Vitamin D Receptor and GC Genes and Analysis of Their Distribution in Mexican Postmenopausal Women. *Nutrients*, 10(9):1-14.
- QIN, G., DONG, Z., ZENG, P., LIU, M., LIAO, X., 2013: Association of vitamin D receptor BsmI gene polymorphism with risk of osteoporosis: a meta-analysis of 41 studies. *Mol. Biol. Rep.*, 40(1):497-506.
- ŠTEŇOVÁ, E., ŠTEŇO, B., BAQI, L., 2008: Možnosti prevencie a liečby primárnej steoporózy v ambulancii lekára prvého kontaktu. *Via pract.*, 5(1):34-38.
- TECHAPATIPHANDEE, M., TAMMACHOTE, N., TAMMACHOTE, R, WONGKULARB, A., YANATATSANEEJIT, P., 2018: VDR and TNFSF11 polymorphisms are associated with osteoporosis in Thai patients, *Biomed. Rep.*, 9(4):350-356.
- UITTERLINDEN, A. G., RALSTON, S. H., BRANDI, M. L., CAREY, A. H., GRINBERG, D., LANGDAHL, B. L., LIPS, P., LORENC, R., OBERMAYER-PIETSCH, B., REEVE, J., REID, D.M., AMEDEI, A., BASSITI, A., BUSTAMANTE, M., HUSTED, L. B., DIEZ-PEREZ, A., DOBNIG, H., DUNNING, A. M., ENJUANES, A., FAHRLEITNER-PAMMER, A., FANG, Y., KARCZMAREWICZ, E., KRUK, M., VAN LEEUWEN, J. P., MAVILIA, C., van MEURS, J. B., MANGION, J., MCGUIGAN, F. E., POLS, H. A., RENNER, W., RIVADENEIRA, F., VAN SCHOOR, N. M., SCOLLEN, S., SHERLOCK, R. E., IOANNIDIS, J. P., APOSS INVESTIGATORS; EPOS INVESTIGATORS, EPOLOS INVESTIGATORS, FAMOS INVESTIGATORS, LASA INVESTIGATORS, ROTTERDAM STUDY INVESTIGATORS, GENOMOS STUDY, 2006: The association between common vitamin D receptor gene variations and osteoporosis: a participant-level meta-analysis. *Ann. Int. Med.*, 145(4):255-264.

ZHANG, L., YIN, X., WANG, J., XU, D., WANG, Y., YANG, J., TAO, Y., ZHANG, S., FENG, X., YAN, C., 2018. Associations between VDR Gene Polymorphisms and Osteoporosis Risk and Bone Mineral Density in Postmenopausal Women: A systematic 68 review and Meta-Analysis. *Sci. Rep.*, 8(1):1-13.

ZHAO, B., ZHANG, W., ZHOU, Z., 2016: Vitamin D receptor BsmI polymorphism and osteoporosis risk in post-menopausal women. *Arch. Med. Sci.*, 12(1):25-30.

ZINTZARAS, E., RODOPOULOU, P., KOUKOULIS, G. N., 2006: BsmI, TaqI, ApaI and FokI polymorphisms in the vitamin D receptor (VDR) gene and the risk of osteoporosis: A meta-analysis. *Dis. Markers*, 22(5-6):317-326.