

POLYMORFIZMUS G1181C (rs2073618) OPG GÉNU VO VZŤAHU KU KOSTNEJ DENZITE A VÝSKYTU FRAKTÚR V SÚBORE SLOVENSKÝCH POSTMENOPAUZÁLNYCH ŽIEN Z PREŠOVSKÉHO KRAJA

Michaela Gregušiak Fecenková, Jaroslava Hubcejová, Iveta Boroňová, Jarmila Bernasovská

Prešovská univerzita v Prešove, Fakulta humanitných a prírodných vied, Katedra biológie, Ul. 17. novembra č. 1, 081 16 Prešov, Slovensko, e-mail: michaela.fecenkova@unipo.sk

Abstract: *G1181C polymorphism of OPG gene in relation to bone density and incidence fracture in a cohort of Slovak postmenopausal women from the Prešov Region.* Osteoporosis is a common metabolic bone disease where the genetic component plays an important role. The aim of this study was to determine the relationship between G1181 single nucleotide polymorphism in the first exon of the OPG gene and bone mineral density and fracture incidence in the cohort of 152 Slovak postmenopausal women from the Prešov Region. Genomic DNA was isolated from peripheral blood using by commercial kit NucleoSpin® Blood Macherey-Nagel. Molecular-genetic analysis of G1181C polymorphism was performed by Real-time PCR. The frequencies of genotypes were 26.97%, 53.29%, and 19.40% for GG, CG and CC, respectively. Statistically significant association of G1181C single nucleotide polymorphism with fracture incidence was observed (vertebral fracture: $p=0.003$). The effect of G1181C polymorphism on bone mineral density has not been demonstrated.

Key words: osteoporosis, candidate genes, SNP polymorphism, bone mineral density, fracture risk, East Slovakia

Úvod

Osteoporóza je metabolické ochorenie skeletu, ktoré je charakterizované úbytkom množstva kostnej hmoty a celkovým zhoršením kvality kostného tkaniva. V dôsledku týchto poškodení je narušená mechanická odolnosť kosti a zvyšuje sa riziko vzniku fraktúry už pri minimálnom úraze (Vytršalová a Palička 2014). Osteoporotické zlomeniny postihujú takmer každého piateho muža a každú tretiu ženu vo veku 50 a viac rokov, z čoho vyplýva, že ženské pohlavie je významným rizikovým faktorom vzniku osteoporózy a následnej fraktúry (Johnell a Kanis 2005). Pre svoje závažné komplikácie v zmysle zlomenín a bolestivých symptómov spôsobuje výrazné funkčné obmedzenia, zvyšuje finančné náklady na zdravotnú, najmä ústavnú starostlivosť a v neposlednom rade zvyšuje úmrtnosť postihnutých jedincov (Šteňová, Šteňo a Brnka 2008, Payer et al. 2012).

Z doterajších vedeckých štúdií vyplýva, že osteoporóza je ochorenie vyznačujúce sa multifaktoriálnou etiológiou, v ktorej genetická výbava jedinca zohráva signifikantnú úlohu (Ralston 2005, Stazi, Trecca a Trinti 2008). Genetické faktory, uplatňujúce sa v patogenéze uvedeného ochorenia, podmieňujú nielen hustotu kostného minerálu, ale aj úroveň kostnej prestavby, kostnú geometriu či riziko fraktúr (Payer et al. 2012). S rozvojom molekulárnej biológie bol zaznamenaný aj významný pokrok v oblasti výskumu genetickej determinácie osteoporózy s cieľom identifikovať konkrétne gény, ktorých mutácie vedú k vzniku a rozvoju tohto závažného ochorenia. Jedným z kandidátnych génov osteoporózy je gén pre osteoprotegerín (OPG), ktorý zohráva dôležitú úlohu v regulácii kostnej resorpcie (Riggs a Melton 1995, Hofbauer et al. 2010). V rámci OPG génu bolo detegovaných niekoľko jednonukleotidových polymorfizmov (SNPs – single nucleotide polymorphisms), a to najmä vo vzťahu ku kostnej denzite (BMD – Body Mass

Density) a riziku fraktúr. Najčastejšie sa študuje genetický variant G1181C (rs2073618) lokalizovaný v prvom exóne OPG génu. V uvedenom polymorfizme dochádza k nukleotidovej zámene cytozínu (C) za guanín (G), výsledkom čoho je zámena aminokyseliny asparagín (Asn) za lyzín (Lys; Moffett et al. 2008).

Cieľom našej štúdie bolo testovanie asociácie G1181C (rs2073618) polymorfizmu OPG génu s kostnou denzitou a výskytom osteoporotických fraktúr v súbore postmenopauzálnych žien z Prešovského kraja.

Súbor a metódy

Do štúdie bolo zaradených 152 postmenopauzálnych žien vo veku 40 – 88 rokov (priemerný vek $66,68 \pm 10,12$ rokov), u ktorých bola v rámci diagnostického skríningu potvrdená osteoporóza/osteopénia súvisiaca s postmenopauzálnym statusom. U pacientok analyzovaného súboru sme sledovali nasledujúce parametre: vek, vek nástupu menopauzy, telesnú hmotnosť, telesnú výšku, index telesnej hmotnosti (BMI – Body Mass Index), kostnú denzitu v oblasti lumbálnej chrbtice a proximálnej časti femuru, ako aj výskyt osteoporotických fraktúr. Prezentovaná štúdia sa realizovala v spolupráci so súkromnými ortopedickými ambulanciami v rámci Prešovského kraja. Všetci sledovaní jedinci podpísali informovaný súhlas potrebný pre zaradenie vzorky do vedecko-výskumnej štúdie.

Genomická DNA bola izolovaná zo vzoriek periférnej krvi pomocou komerčného kitu NucleoSpin® Blood Macherey-Nagel podľa štandardného protokolu. Genotypová analýza vybraného polymorfizmu G1181C (rs2073618) OPG génu sa uskutočnila metódou real-time PCR s použitím TaqMan® SNP Genotyping Assay Mix (C__1971047_40) na prístroji Applied Biosystems StepOne Real-time PCR System podľa príslušného protokolu.

Rozdiely v priemerných hodnotách sledovaných parametrov medzi jednotlivými skupinami sa testovali analýzou rozptylu (ANOVA). Rozdiely v distribúcii alel a genotypov medzi sledovanými skupinami jedincov boli stanovené Pearsonovým chí-kvadrát testom. Pri vyhodnocovaní získaných údajov sme použili štatistické programy Social Science Statistics 2019 a Free Statistic Calculator verzia 4.0. Za kritérium štatistickej významnosti bola zvolená hodnota $p < 0,05$.

Výsledky a diskusia

Frekvencie alel a genotypov analyzovaného polymorfizmu G1181C (rs2073618) OPG génu uvádzame v tab. 1. V sledovanom súbore sa najčastejšie vyskytoval heterozygotný genotyp CG (53,29%), homozygotné genotypy sa vyskytovali vo frekvencii 26,97 % (GG) a 19,74 % (CC). Prostredníctvom χ^2 testu sme nezistili štatisticky významnú odchýlku od Hardy-Weinbergovej rovnováhy ($p = 0,379$).

V tab. 2 uvádzame klinické charakteristiky pacientok analyzovaného súboru rozdelených podľa genotypov G1181C (rs2073618) polymorfizmu OPG génu. Štatistickou analýzou sa nepotvrdili signifikantne významné rozdiely priemerných hodnôt sledovaných parametrov medzi jednotlivými genotypmi G1181C (rs2073618) polymorfizmu OPG génu. Výsledky viacerých zahraničných štúdií preukázali, že jedinci s genotypmi GG a CG mali v porovnaní s jedincami s homozygotným genotypom CC štatisticky významne nižšie priemerné hodnoty BMD v oblasti lumbálnej chrbtice (Langhaldal et al. 2002, Kim et al. 2007). Podobne ako štúdie od Ohmoriho et al. (2002) a Uelanda et al. (2007), naše zistenia túto asociáciu nepotvrdili.

Tab. 1: Alelové a genotypové frekvencie G1181C (rs2073618) polymorfizmu OPG génu v sledovanom súbore postmenopauzálnych žien

Table 1: Allele and genotypes frequencies of G1181C (rs2073618) polymorphism of OPG gene in the whole group of postmenopausal women

	Genotyp	N	%
Frekvencie genotypov	GG	41	26,97
	CG	81	53,29
	CC	30	19,74
Frekvencie alel	G	163	53,62
	C	141	46,38
HWR	$\chi^2 = 0,775, df = 2, p = 0,379$		

N – počet jedincov, HWR – Hardy-Weinbergova rovnováha, χ^2 – chí-kvadrát, df – stupeň voľnosti, p – hodnota štatistickej významnosti

N – number of individuals, HWR – Hardy-Weinberg equilibrium, χ^2 – Chi-square test, df – degree of freedom, p – value of significance

Tab. 2: Klinické parametre vo vzťahu ku genotypom G1181C (rs2073618) polymorfizmu OPG génu v sledovanom súbore postmenopauzálnych žien

Table 2: Clinical parameters in relation to genotypes of G1181C (rs2073618) polymorphism of OPG gene in whole group of postmenopausal women

	Súbor pacientiek (N = 152)		G1181C polymorfizmus OPG génu						P
			GG (N = 41)		CG (N = 81)		CC (N = 30)		
	x	SD	x	SD	x	SD	x	SD	
Vek (roky)	66,68	10,12	68,88	10,16	65,89	10,20	65,80	9,39	0,262
Vek NM (roky)	49,33	3,81	49,27	3,84	49,32	4,08	49,43	2,86	0,984
TH (kg)	68,46	11,75	66,68	10,63	68,80	12,42	69,97	11,01	0,470
TV (cm)	161,05	6,12	160,98	5,63	161,32	6,25	160,43	6,35	0,790
BMI (kg/m ²)	26,40	4,39	25,70	3,79	26,46	4,63	27,20	4,36	0,357
BMD L ₁ -L ₄ (g/cm ²)	0,90	0,14	0,91	0,14	0,91	0,13	0,87	0,13	0,338
T-skóre L ₁ -L ₄	-2,32	1,11	-2,21	1,13	-2,28	1,10	-2,59	1,07	0,317
BMD FN (g/cm ²)	0,80	0,11	0,79	0,09	0,79	0,11	0,81	0,14	0,681
T-skóre FN	-1,72	0,79	-1,73	0,65	-1,74	0,77	-1,70	0,98	0,972
BMD FT (g/cm ²)	0,84	0,11	0,85	0,10	0,84	0,11	0,83	0,12	0,747
T-skóre FT	-1,32	0,87	-1,26	0,80	-1,33	0,88	-1,40	0,92	0,796

N – počet jedincov, x – priemer, SD – smerodajná odchýlka, NM – nástup menopauzy, TH – telesná hmotnosť, TV – telesná výška, BMI – index telesnej hmotnosti, BMD – kostná denzita, L₁ – L₄ – prvý až štvrtý lumbálny stavec, FN – krček femuru, FT – proximálna časť femuru

N – number of individuals, x – average, SD – standard deviation, NM – age at menopause, TH – body weight, TV – body height, BMI – Body Mass Index, BMD – Bone Mineral Density, L₁ – L₄ – first to fourth lumbar vertebrae, FN – femur neck, FT – femur total

V rámci asociačnej analýzy medzi genetickým variantom G1181C (rs2073618) OPG génu a výskytom osteoporotických fraktúr sme zistili štatisticky významné rozdiely medzi sledovanými skupinami postmenopauzálnych žien (tab. 3 a 4). Najvyšší výskyt osteoporotických fraktúr sme zaznamenali u žien s heterozygotným genotypom CG (52,63%), najnižší u žien s genotypom GG (22,37%). U žien s prítomnou alelou C v genotype sme zaznamenali štatisticky významný rozdiel vo výskyte verebrálnych fraktúr (p = 0,002). Moffett et al. (2008) vo svojej štúdií taktiež potvrdili

asociáciu medzi homozygotným genotypom CC a zvýšeným rizikom fraktúr, avšak len vo vzťahu k fraktúram krčka stehrovej kosti.

Tab. 3: Výskyt osteoporotických fraktúr vo vzťahu ku genotypom G1181C (rs2073618) polymorfizmu OPG génu v sledovanom súbore postmenopauzálnych žien

Table 3: Incidence of osteoporotic fractures in relation to genotypes of G1181C (rs2073618) polymorphism of OPG gene in whole group of postmenopausal women

	G1181C polymorfizmus OPG génu			χ^2	p
	GG (N = 41)	CG (N = 81)	CC (N = 30)		
Všetky fraktúry	17	40	19	3,3408	0,188
Bez fraktúr	24	41	11		
Vertebrálne fraktúry	7	14	14	11,7861	0,003
Bez vertebrálnych fraktúr	34	67	16		
Non-vertebrálne fraktúry	15	37	13	0,9247	0,630
Bez non-vertebrálnych fraktúr	26	44	17		

N – počet, χ^2 – chí-kvadrát, p – hodnota štatistickej významnosti

N – number of individuals, χ^2 – Chi-square test, p – value of significance

Tab. 4: Výskyt osteoporotických fraktúr vo vzťahu k alelám G1181C (rs2073618) polymorfizmu OPG génu v sledovanom súbore postmenopauzálnych žien

Table 4: Incidence of osteoporotic fractures in relation to alleles of G1181C (rs2073618) polymorphism of OPG gene in whole group of postmenopausal women

	G1181C polymorfizmus OPG génu		χ^2	p
	G (N = 163)	C (N = 141)		
Všetky fraktúry	74	78	2,9761	0,085
Bez fraktúr	89	63		
Vertebrálne fraktúry	28	42	9,5499	0,002
Bez vertebrálnych fraktúr	153	99		
Non-vertebrálne fraktúry	67	63	0,3951	0,530
Bez non-vertebrálnych fraktúr	96	78		

N – počet, χ^2 – chí-kvadrát, p – hodnota štatistickej významnosti

N – number of individuals, χ^2 – Chi-square test, p – value of significance

Záver

Na základe výsledkov molekulárno-genetických analýz sme v sledovanom súbore postmenopauzálnych žien potvrdili asociáciu medzi jednonukleotidovým polymorfizmom G1181C (rs2073618) OPG génu a rizikom vertebrálnych fraktúr. Je však nutné zdôrazniť, že istým limitujúcim faktorom prezentovanej štúdie mohla byť veľkosť sledovaného súboru, preto je potrebné, aby bola v budúcnosti uskutočnená rozsiahlejšia štúdia, ktorá by jednoznačne preukázala, že genetický variant G1181C (rs2073618) OPG génu zvyšuje riziko osteoporotických fraktúr v populácii slovenských postmenopauzálnych žien.

PodĎakovanie

Štúdia sa realizovala v rámci projektu 001-PU-2-1/2018.

Literatúra

HOFBAUER, L. C., KUHNE, C. A., VIERECK, V., 2010: The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone disease. *J. Musculoskelet. Neuronal. Interact.*, 4(3):268-275.

JOHNELL, O., KANIS, J. A., 2005: Epidemiology of osteoporotic fractures. *Osteoporos. Int.*, Suppl 2:S3-7 s. Online. Available: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00198-004-1702-6>. 10. júna 2019.

KIM, J. G., KIM, J. H., KIM, J. Y., KU, S. Y., JEE, B. C., SUH, C. S., KIM, S. H., CHOI, Y. M., 2007: Association between osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK), and RANK ligand (RANKL) gene polymorphism and circulating OPG, soluble RANKL levels, and bone mineral density in Korean postmenopausal women. *Menopause*, 14(5):913-918.

LANGDAHL, B. L., CARTENS, M., STENKJAER, L., ERIKSEN, E. F., 2002: Polymorphism in the osteoprotegerin gene are associated with osteoporotic fractures. *J. Bone Miner. Res.*, 17(7):1245-1255.

MOFFETT, S. P., OAKLEY, J. I., CAULEY, J. A., LUI, L. Y., ENSRUD, K. E., TAYLOR, B. C., HILLIER, T. A., HOCHBERG, M. C., LI, J., CAYABYAB, S., LEE, J. M., PELTZ, G., CUMMINGS, S. R., ZMUDA, J. M.; STUDY OF OSTEOPOROTIC FRACTURES RESEARCH GROUP, 2008: Osteoprotegerin Lys3Asn polymorphism and the risk of fracture in older women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 93(5):2002-2008.

OHMORI, H., MIKITA, Y., FUNAMIZU, M., HIROOKA, K., HOSOI, T., ORIMO, H., SUZUKI, T., IKARI, K., NAKAJIMA, T., INOUE, I., HATA, A., 2002: Linkage and association analyses of the osteoprotegerin gene locus with human osteoporosis. *J. Hum. Genet.*, 47(8):400-406.

PAYER, J., KILLINGER, Z., JACKULIAK, P., TOMKOVÁ, S., BAŇÁROVÁ, A., BRÁZDILOVÁ, K., ČIERNY, D., KOLLEROVÁ, J., KUŽMA, M., NÉMETHOVÁ, E., 2012: Osteoporóza. Bratislava, Herba, 264 s.

RALSTON, S. H., UITTERLINDEN, A. G., 2010: Genetics of osteoporosis. *Endocr. Rev.*, 31(5):629-662.

RIGGS, B. L., MELTON, L. J., 1995: The worldwide problem of osteoporosis: insights afforded by epidemiology. *Bone*, 17(5):505-511.

STAZI, A. V., TRECCA, A., TRINTI, B., 2008: Osteoporosis in celiac disease and in endocrine and reproductive disorders. *World J. Gastroenterol.*, 14(4):498-505.

ŠTEŇOVÁ, E., ŠTEŇO, B., BRNKA, R., 2008. Diagnostika a liečba sekundárnej osteoporózy. *Súč. Klin. Pr.*, 2:46-51.

UEALAND, T., BOLLERSLEV, J., WILSON, S. G., DICK, I. M., ISLAM, F. M., MULLIN, B. H., DEVINE, A., PRINCE, R. L., 2007: No association between OPG gene polymorphism or serum levels and measures of osteoporosis in elderly Australian women. *Bone*, 40(1):175-181.

VYTRÍŠALOVÁ, M., PALIČKA, V., 2014: Osteoporóza. In: Vlček, J., Vytříšalová, M. (ed.): *Klinická farmacie II*. Praha, Grada Publishing, s. 143-156.