

POLYMORFIZMUS *PvuII* GÉNU *ESR1* A JEHO ASOCIÁCIA S KOSTNOU MINERÁLNOU HUSTOTOU U SLOVENSKÝCH ŽIEN S DIAGNOSTIKOVANOU OSTEOPORÓZOU

Matúš Mathia, Iveta Boroňová, Soňa Mačeková, Michaela Fecenková, Jarmila Bernasovská

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

Abstract: *Effect of PvuII polymorphism in ESR1 gene on bone mineral density in Slovak postmenopausal women with osteoporosis.* The aim of this study was to investigate rs2234693 polymorphism in *ESR1* gene in relation to bone mineral density in Slovak postmenopausal women with osteoporosis. The study group consisted of 97 postmenopausal osteoporotic women. Genomic DNA was extracted and purified from leukocytes by the commercial kit. Genotyping was performed using the TaqMan SNP Genotyping Assay Mix and genetic analysis was performed by real-time PCR. The basis personal, anthropometric and clinical data was obtained in cooperation with clinical osteologists. Genotype frequency of *PvuII* polymorphism was: CC 23.7%, CT 56.7%, and TT 19.6%. No significant difference was found in genotype frequency between fracture and non-fracture group. Lumbar spine BMD: 0.762 g/cm², femoral neck BMD: 0.604 g/cm² and total hip BMD: 0.690 g/cm² in TT carriers were detected. In contrast, BMD values in CC carriers were: lumbar spine BMD: 0.816 g/cm², femoral neck BMD: 0.640 g/cm², and total hip BMD: 0.750 g/cm². Further research, especially oriented on association analyses, is needed in Slovak population.

Key words: *ESR1* gene, estrogen receptor 1, bones, postmenopausal osteoporosis, rs2234693 polymorphism, Central Europe

Úvod

Osteoporóza je definovaná ako systémové ochorenie skeletu charakterizované zvýšenou úrovňou straty kostnej hmoty, poškodením mikroarchitektúry kostného tkaniva s následnou zvýšenou náchylnosťou k vzniku osteoporotických zlomenín (WHO 1993). Etiológia osteoporózy je multifaktoriálna a je ovplyvnená zložitými interakciami vonkajších faktorov so silným genetickým pozadím. Kostná minerálna hustota ako jeden z najdôležitejších diagnostických ukazovateľov je pod genetickou kontrolou a jej heritabilita varíruje v rozsahu od 0,50 do 0,90 (Boudin et al. 2016).

Počet kandidátnych génov osteoporózy je vysoký, v rozsahu proteínov regulujúcich kalciový metabolizmus až po lokálne produkty ovplyvňujúce aktivitu kostných buniek. Ukazuje sa, že polymorfizmy príslušných génov môžu signifikantne vplyvať na úroveň kostnej minerálnej hustoty a tak aj na náchylnosť k fraktúram (Peacock et al. 2002, Ralston 2007). Jedným z najviac študovaných génov v súvislosti s rizikom vzniku osteoporózy je gén pre estrogénový receptor 1 (*ESR1* alebo *ERα*).

ESR1 gén sa nachádza na 6. chromozóme v pozícii 6q25. Obsahuje osem exónov rozdelených siedmimi intrónmi s dĺžkou viac ako 140 kb. Kóduje estrogénový receptor 1 ktorý sprostredkúva biologické účinky estrogénu (estradiolu E2). Estradiol zohráva dôležitú úlohu v kostnom metabolizme, kontroluje prestavbu kostného tkaniva, udržiava kostnú hmotu a reguluje homeostázu kostného tkaniva (Almeida et al. 2017). Nedostatok estradiolu zvyšuje počet osteoklastov a osteoresorpčnú aktivitu (Khalid a Krum 2016).

Kobayashi et al. (1996) ako prví sledovali vplyv polymorfizmu *PvuII* (rs2234693) na kostnú minerálnu denzitu. Polymorfizmus *PvuII* sa nachádza v prvom intróne génu *ESR1* a vykazuje silnú väzbovú nerovnováhu s ďalšími dvoma významnými polymorfizmami v tomto géne: *XbaI* a *TAⁿ*,

ktoré taktiež vplyvajú na variabilitu kostnej minerálnej hustoty (Gennari et al. 2005). Bolo vykonaných množstvo ďalších štúdií, ktoré analyzovali vplyv polymorfizmus *PvuII* na náchylnosť k osteoporóze a kostnú minerálnu hustotu, avšak s nekonzistentnými výsledkami (Ioannidis et al. 2004, Tang, Chen a Xu 2013, Zhu et al. 2018).

Cieľom našej štúdie bolo analyzovať polymorfizmus *PvuII* (rs2234693) *ESR1* génu vo vzťahu ku kostnej minerálnej hustote a k riziku zlomenín u slovenských postmenopauzálnych žien s diagnostikovanou osteoporózou/osteopéniou.

Súbor a metódy

Analýzovaný súbor tvorilo 97 postmenopauzálnych žien (priemerný vek: $67,27 \pm 9,02$ rokov) s diagnostikovanou osteoporózou (denzitometrické kritéria: T-skóre $< -2,5$ smerodajná odchýlka (SD)) alebo osteopéniou (denzitometrické kritéria: T-skóre -1 až $-2,5$ smerodajná odchýlka (SD)). V spolupráci s Národným endokrinologickým a diabetologickým ústavom (NEDÚ) v Ľubochni boli zozbierané základné antropometrické (vek, výška, hmotnosť a BMI) a klinicko-biochemické údaje (menopauzálny status, výskyt osteoporotických zlomenín, kostná minerálna hustota a T-skóre lumbálnych stavcov (BMD $L_1 - L_4$), krčka stehnovej kosti (BMD FN) a bedrovej kosti (BMD TH)). Pacientky sme rozdelili do skupiny bez predchádzajúcej osteoporotickej zlomeniny ($n = 45$; priemerný vek: $66,89 \pm 8,99$) a s výskytom jednej alebo viac osteoporotických zlomenín ($n = 52$; priemerný vek: $67,60 \pm 9,12$).

Izolácia génomovej DNA z leukocytov periférnej krvi bola vykonaná pomocou komerčného extrakčného kitu podľa štandardného protokolu (Promega, Madison, USA). Genetická analýza bola vykonaná metodikou real-time PCR sondou TaqMan (the Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays, C__3163590_10; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Všetky pacientky boli poučené o význame výskumu a podpísali informovaný súhlas. Na štatistickú analýzu dát sa použili štatistické testy v programe SPSS pre Windows, verzia 19.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Hardy-Weinbergova rovnováha sa testovala pomocou chí-kvadrát testu. Pre kontinuálne premenné bol použitý neparametrický Kruskal-Wallisov H Test a Mann-Whitneyho U Test. Pomocou histogramov sa zistilo nenormálne rozloženie dát všetkých parametrov. Pre všetky testy bola za kritérium štatistickej významnosti zvolená hodnota $p < 0,05$.

Výsledky a diskusia

Opisná charakteristika sledovaného súboru postmenopauzálnych žien s osteoporózou je uvedená v tab. 1. Polymorfny variant *PvuII* génu *ESR1* bol v Hardy-Weinbergovej genetickej rovnováhe v oboch skupinách (bez zlomenín: $\chi^2 = 0,164$; so zlomeninou: $\chi^2 = 0,591$). Priemerné hodnoty sledovaných antropometrických a klinických údajov vo vzťahu ku genotypom sú uvedené v tab. 2. Distribúciu alelových a genotypových frekvencií *PvuII* polymorfizmu génu *ESR1* u postmenopauzálnych žien s osteoporózou zobrazuje tab. 3. Kostná minerálna hustota dosahovala priemerne najnižšie hodnoty u žien s genotypom TT (BMD $L_1 - L_4 = 0,762 \text{ g/cm}^2$, BMD FN = $0,604 \text{ g/cm}^2$, BMD Total Hip = $0,690 \text{ g/cm}^2$) a priemerne najvyššie hodnoty u nositeliek genotypu CC (BMD $L_1 - L_4 = 0,816 \text{ g/cm}^2$, BMD FN = $0,640 \text{ g/cm}^2$, BMD Total Hip = $0,750 \text{ g/cm}^2$). Rozdiely neboli štatisticky významné.

Výsledky sú v súlade s niektorými štúdiami (Mitra, Desai a Khatkhatay 2006, Bustamante et al. 2007, Erdogan et al. 2011). U tureckých postmenopauzálnych žien zistili, že najvyššie zastúpenie genotypu TT v polymorfizme *PvuII* génu *ESR1* bolo u žien s osteoporózou, naopak v skupine zdravých žien bolo najvyššie zastúpenie genotypu CC (Erdogan et al. 2011). U kórejských postmenopauzálnych žien zaznamenali o 7,5 % nižšiu hodnotu BMD lumbálnych stavcov u nositeľov genotypu TT v porovnaní s CC genotypom (Kim et al. 2001).

Tab. 1: Charakteristika sledovaného súboru postmenopauzálnych žien s osteoporózou a osteopéniou
 Table 1: Descriptive characteristics of group of postmenopausal osteoporotic women

Parameter	Súbor pacientiek (n = 97)	Skupina s fraktúrami (n = 52)	Skupina bez fraktúr (n = 45)	p hodnota*
	Priemer ± SD	Priemer ± SD	Priemer ± SD	
Vek (roky)	67,27 ± 9,02	67,60 ± 9,12	66,89 ± 8,99	0,822
Výška (cm)	160,71 ± 7,71	160,92 ± 7,24	160,47 ± 8,31	0,768
Hmotnosť (kg)	65,91 ± 12,09	66,20 ± 12,31	65,57 ± 11,97	0,906
BMI (kg/m ²)	25,45 ± 4,04	25,53 ± 4,24	25,39 ± 3,86	0,991
Menopauza (roky)	48,49 ± 5,54	47,82 ± 6,32	49,27 ± 4,41	0,248
BMD FN (g/cm ²)	0,613 ± 0,08	0,610 ± 0,07	0,616 ± 0,095	0,542
BMD TH (g/cm ²)	0,738 ± 0,11	0,733 ± 0,10	0,743 ± 0,12	0,691
BMD L ₁ -L ₄ (g/cm ²)	0,802 ± 0,12	0,788 ± 0,08	0,815 ± 0,15	0,899
FN (T-skóre)	-2,25 ± 0,83	-2,35 ± 0,79	-2,13 ± 0,87	0,138
TH (T-skóre)	-1,79 ± 1,01	-1,89 ± 0,94	-1,67 ± 1,09	0,313
L ₁ – L ₄ (T-skóre)	-2,57 ± 1,15	-2,67 ± 0,77	-2,44 ± 1,47	0,886

n – počet jedincov, SD – smerodajná odchýlka, p – hladina významnosti, BMD – kostná minerálna hustota, FN – krček stehrovej kosti, TH – bedrová kosť, L₁ – L₄ – lumbálne stavce, *Mann-Whitneyho U test

*n – the number of individuals, SD – standard deviation, p – level of significance, BMD – bone mineral density, FN – femoral neck, TH – total hip, L₁ – L₄ – lumbar spine, *Mann-Whitney U Test*

Tab. 2: Antropometrické a klinické hodnoty vo vzťahu ku genotypom polymorfizmu PvuII ESRI génu

Table. 2: Anthropometrics and clinical values according to genotype of PvuII polymorphism of ESRI gene

Súbor pacientiek (n = 97)				
Parameter/PvuII genotyp	CC	CT	TT	p hodnota*
Vek (roky)	67,22 ± 8,77	66,53 ± 9,21	69,47 ± 8,88	0,384
Výška (cm)	161,22 ± 7,48	160,62 ± 7,92	160,37 ± 7,75	0,899
Hmotnosť (kg)	65,97 ± 11,89	67,60 ± 12,77	60,94 ± 9,13	0,092
BMI (kg/m ²)	25,33 ± 3,95	26,15 ± 4,36	23,61 ± 2,47	0,074
Menopauza (roky)	48,76 ± 4,65	48,11 ± 5,93	49,32 ± 5,42	0,248
BMD FN (g/cm ²)	0,640 ± 0,82	0,604 ± 0,08	0,604 ± 0,08	0,328
BMD TH (g/cm ²)	0,750 ± 0,10	0,749 ± 0,12	0,690 ± 0,10	0,128
BMD L ₁ -L ₄ (g/cm ²)	0,816 ± 0,18	0,809 ± 0,10	0,762 ± 0,07	0,217
FN (T-skóre)	-1,95 ± 0,76	-2,34 ± 0,87	-2,32 ± 0,76	0,223
TH (T-skóre)	-1,641 ± 0,85	-1,73 ± 1,09	-2,14 ± 0,91	0,182
L ₁ -L ₄ (T-skóre)	-2,43 ± 1,66	-2,50 ± 0,98	-2,92 ± 0,75	0,267

n – počet jedincov, p – hladina významnosti, BMD – kostná minerálna hustota, FN – krček stehrovej kosti, TH – bedrová kosť, L₁ – L₄ – lumbálne stavce, *Kruskal-Wallisov H test

*n – the number of individuals, p – level of significance, BMD – bone mineral density, FN – femoral neck, TH – total hip, L₁ – L₄ – lumbar spine, *Kruskal-Wallis H Test*

Tab. 3: Alelové a genotypové frekvencie *PvuII* polymorfizmu génu *ESR1* u žien bez fraktúr (NFG) a u žien s predchádzajúcimi fraktúrami (FG)

Table 3: Allele and genotype frequencies of *PvuII* of *ESR1* gene in postmenopausal osteoporotic women without fracture (NFG) and in postmenopausal women with fractures (FG)

Polymorfizmus <i>PvuII</i> T/C	Súbor	Skupina s fraktúrami (FG)	Skupina bez fraktúr (NFG)
	(N = 97)	(N = 52)	(N = 45)
CC	23 (23,7 %)	10 (18,2 %)	13 (28,9 %)
CT	55 (56,7 %)	31 (56,4 %)	24 (53,3 %)
TT	19 (19,6 %)	11 (20,0 %)	8 (17,8 %)
C	103 (53,1 %)	53 (51,0 %)	50 (55,6 %)
T	91 (46,9 %)	51 (49,0 %)	40 (44,4 %)
HWE	0,180	0,164	0,591
Rozdiel v genotypovej frekvencii	$\chi^2 = 1,257; df = 2, *p = 0,533$ (FG vs. NFG)		

n – počet jedincov, HWE – Hardy-Weinbergova rovnováha, χ^2 - chí-kvadrát, df – stupeň voľnosti, p – hladina významnosti

n – the number of individuals, HWE – Hardy-Weinberg equilibrium, χ^2 - chi-square, df – degree of freedom, p – level of significance

Signifikantne nižšie BMD u nositeľiek TT genotypu sa potvrdilo aj u japonských postmenopauzálnych žien (Kurabayashi et al. 2004), afroamerických žien (Greendale et al. 2006) a španielskych žien (Bustamante et al. 2007). Štúdia Mitru et al. (2006) ukázala, že v skupine postmenopauzálnych žien s normálnou hodnotou kostnej denzity sa vyskytuje vo vyššej frekvencii CC genotyp, naopak v skupine žien s postmenopauzálnou osteoporózou bol zaznamenaný vyšší výskyt genotypu TT.

Publikovali sa tiež vedecké práce, ktoré nepotvrdili zvýšené riziko osteoporózy u nositeľov TT genotypu (Brown et al. 2001, Salmén et al. 2000).

Výsledky štúdie Kurta et al. (2012) naopak ukázali, že v skupine osteoporotických postmenopauzálnych žien, nositeľky CC genotypu mali signifikantne nižšiu kostnú minerálnu hustotu v oblasti krčka stehnovej kosti v porovnaní s CT a TT genotypom. Podobný výsledok zaznamenali aj Ivanova et al. (2007), v osteoporotickej skupine mali vyššie BMD hodnoty (L₁ – L₄ a krčka stehnovej kosti) nositeľky TT genotypu a nižšie hodnoty nositeľky CC genotypu. Asociáciu CC genotypu k nižšej kostnej minerálnej hustote krčku stehnovej kosti u postmenopauzálny osteoporózy potvrdila aj najnovšia metaanalýza, avšak nepotvrdila asociáciu *PvuII* polymorfizmu génu *ESR1* so zvýšením rizikom osteoporózy (Zhu et al. 2018).

V skupine postmenopauzálnych žien bez zlomenín sme u 45 osteoporotických žien zaznamenali frekvenciu genotypu TT 17,8 %, CT 53,3 % a CC 28,9 %. V skupine so zlomeninou u 52 osteoporotických žien bola frekvencia genotypu TT 20 %, CT 56,4 % a CC 18,3 %. Nebol zistený signifikantný rozdiel (p = 0,533) v genotypovej frekvencii medzi pacientkami so zlomeninou a bez zlomeniny.

Harsløf et al. (2010) odhalili, že osteoporotické ženy s TT genotypom v polymorfizme *PvuII* génu *ESR1* mali signifikantne vyššie riziko zlomeniny (konkrétne vertebrálnej fraktúry), naopak CC nositeľky boli častejšie v skupine bez fraktúr. Staršia meta-analýza (Ioannidis et al. 2002) a rozsiahla štúdia (Ioannidis et al. 2004) na 18 000 pacientoch (GENOMOS study) asociáciu medzi polymorfizmom *PvuII* a fraktúrami nepotvrdili. Zvýšene riziko vzniku zlomenín u nositeľov T alely potvrdili v metaanalýze Tang, Chen a Xu (2013). Táto štúdia preukázala, že alela T signifikantne zvyšuje riziko fraktúry bedrovej kosti u premenopauzálnych, postmenopauzálnych žien, aj u mužov.

V našej štúdií sme zaznamenali (v skupine pacientiek so zlomeninou) vyšší počet nositeľiek TT genotypu (20,0 %) oproti CC genotypu (18,2 %) a v skupine (pacientiek bez zlomenín) vyšší počet nositeľiek CC genotypu (28,9 %) oproti TT genotypu (17,8 %). Rozdiel v genotypových frekvenciách medzi oboma skupinami nebol signifikantný ($p = 0,533$).

Záver

V našej štúdií sme zistili mierne vyššie hodnoty kostnej minerálnej hustoty vo všetkých meraných oblastiach u nositeľov CC genotypu. Avšak nepotvrdil sa štatistický významný vzťah medzi polymorfizmom *PvuII* génu *ESR1* a kostnou minerálnou hustotou, ani v prípade výskytu osteoporotických zlomenín. Pre ďalší výskum bude potrebné rozšíriť súbor o väčší počet pacientov aj väčší kontrolný súbor, a potvrdiť alebo vyvrátiť vplyv uvedeného polymorfizmu na kostnú minerálnu hustotu v slovenskej populácii osteoporotických žien.

Literatúra

ALMEIDA, M., LAURENT, M. R., DUBOIS, V., CLAESSENS, F., O BRIEN, CH. A., BOUILLON, R., VANDERSCHUEREN, D., MANOLAGAS, S. C., ALMEIDA, M., DUBOIS, D., CLAESSENS, O BRIEN, C. A., BOUILLON, R., 2017: Estrogens and androgens in skeletal physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.*, 97(1):135-187.

BOUDIN, E., FIJALKOWSKI, I., HENDRICKX, G., VAN HUL, W., 2016: Genetic control of bone mass. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 5(432):3-13.

BROWN, M. A., HAUGHTON, M. A., GRANT, S. F., GUNNELL, A. S., HENDERSON, N. K., EISMAN, J. A., 2001: Genetic control of bone density and turnover: role of the collagen 1alpha1, estrogen receptor, and vitamin D receptor genes. *J. Bone. Miner. Res.*, 16(4):758-764.

BUSTAMANTE, M., NOGUÉS, X., ENJUANES, A., ELOSUA, R., 2007: COL1A1, ESR1, VDR and haplotypes in relation to BMD in Spanish postmenopausal women. *Osteoporos. Int.*, 18(2):235-243.

ERDOGAN, M. O., YILDIZ, H., ARTAN, S., SOLAK, M., TAŞCIOĞLU, F., DÜNDAR, U., ESER U., ÇOLAK, E., 2011: Association of estrogen receptor alpha and collagen type I alpha 1 gene polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal women. *Osteoporos. Int.*, 22(4):1219-1225.

GENNARI, L., MERLOTTI, D., DE PAOLA, V., CALABRÒ, A., BECHERINI, L., MARTINI G., NUTI, R., 2005: Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetics of osteoporosis: A HuGE review. *Am. J. Epidemiol.*, 161(4):307-320.

GREENDALE, G. A., CHU, J., FERRELL, R., RANDOLPH, J. F., JOHNSTON J., FRAN, M., SOWERS, R., 2006: The Association of Bone Mineral Density with Estrogen Receptor Gene Polymorphisms. *Am. J. Med.*, 119(9):79-86.

HARSLØF, T., HUSTED, L. B., CARSTENS, M., STENKJÆR, L., LANGDAHL, B. L., 2010: Genotypes and haplotypes of the estrogen receptor genes, but not the retinoblastoma-interacting zinc finger protein 1 gene, are associated with osteoporosis. *Calcif. Tissue Int.*, 87(1):25-35.

IOANNIDIS, J. P., STAVROU, I., TRIKALINOS, T., ZOIS, CH., BRANDI, M. L., GENNARI, L., ALBAGHA, O., RALSTON, S. H., TSATSOSULIS, A., 2002: Association of polymorphisms of the estrogen receptor alpha gene with bone mineral density and fracture risk in women: a meta-analysis. *J. Bone Miner. Res.*, 17(11):2048-2060.

IOANNIDIS, J. P., BRANDI, M. L., RALSTON, S. H., BENNETT, S. T., GRINBERG, D., KARASSA, F. B., LANGDAHL, B., VAN MEURS, J. B., MOSEKILDE, L., SCOLLEN, S., ALBAGHA, O. M., BUSTAMANTE, M., CAREY, A. H., DUNNING, A. M., ENJUANES, A., VAN LEEUWEN, J. P., MAVILLA, C., MASI, L., MCGUIGAN, F. E., NOGUES, X., POLS, H. A., REID, D. M., SCHUIT, S. C., SHERLOCK, R. E., UITTERLINDEN, A. G., 2004: Differential genetic effects of ESR1 gene polymorphisms on osteoporosis outcomes. *JAMA*, 292(17):2105-2114.

IVANOVA, J. T., DOUKOVA, P. B., BOYANOV, M. A., POPIVANOV, P. R., 2007: PvuII and

XbaI polymorphisms of the estrogen receptor gene and bone mineral density in a Bulgarian population sample. *Hormones*, 6(1):36-43.

KHALID, A. B., KRUM, S. A., 2016: Estrogen receptors alpha and beta in bone. *Bone*, 87:130-135.

KIM, J. G., LIM, K. S., KIM, E. K., CHOI, Y. M., LEE, J. Y., 2001: Association of vitamin D receptor and estrogen receptor gene polymorphisms with bone mass in postmenopausal Korean women. *Menopause*, 8(3):222-228.

KURABAYASHI, T., MATSUSHITA, H., KATO, N., NAGATA, H., KIKUCHI, M., TOMITA, M., YAHATA, T., HONDA, A., TANAKA, K., 2004: Effect of vitamin D receptor and estrogen receptor gene polymorphism on the relationship between dietary calcium and bone mineral density in Japanese women. *J. Bone Miner. Metab.*, 22(2):139-147.

KURT, O., YILMAZ-AYDOGAN, H., UYAR, M., ISBIR, T., SEYHAN, M. F., CAN, A., 2012: Evaluation of ER α and VDR gene polymorphisms in relation to bone mineral density in Turkish postmenopausal women. *Mol. Biol. Rep.*, 39(6):6723-6730.

MITRA, S., DESAI, M., KHATKHATAY, M. I., 2006: Association of estrogen receptor a gene polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal Indian women. *Mol. Genet. Metab.*, 87(1):80-87.

PEACOCK, M., TURNER, CH. H., ECONS, M. J., FOROUD, T., 2002: Genetics of Osteoporosis. *Endocr. Rev.*, 23(3):303-326.

RALSTON, S. H., 2007: Genetics of osteoporosis. *Proc. Nutr. Soc.*, 66(2):158-165.

SALMÉN, T., HEIKKINEN, A. M., MAHONEN, A., KRÖGER, H., KOMULAINEN, M., SAARIKOSKI, S., HONKANEN, R., MÄENPÄÄ, P. H., 2000: Early Postmenopausal Bone Loss Is Associated with PvuII Estrogen Receptor Gene Polymorphism in Finnish Women: Effect of Hormone Replacement Therapy. *J. Bone Miner. Res.*, 15(2):315-321.

TANG, L., CHENG, G., XU, Z., 2013: Association between Estrogen Receptor a Gene (ESR1) PvuII (C/T) and XbaI (A/G) Polymorphisms and Hip Fracture Risk: Evidence from a Meta-Analysis. *PLoS One*, 8(12):1-12.

WHO, 1993: Consensus development conference. Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis. *Am. J. Med.*, 94:646-650.

ZHU, H., JIANG, J., WANG, Q., ZONG, J., ZHANG, L., MA, T., XU, Y., 2018: Associations between ER α/β gene polymorphisms and osteoporosis susceptibility and bone mineral density in postmenopausal women: a systematic review and meta-analysis. *BMC Enocr. Disord.*, 18(11):1-16.