

POLYMORFIZMUS *rs519129* GÉNU *SLC25A24* V PATOGENÉZE OSTEOPORÓZY U SLOVENSKÝCH POSTMENOPAUZÁLNYCH ŽIEN

¹Eva Petrejčíková, ¹Marta Mydlárová Blaščáková, ¹Kristína Krajňáková, ¹Andrea Avuková, ¹Michaela Zigová, ²Katarína Hricová

¹Prešovská univerzita v Prešove, Fakulta humanitných a prírodných vied, 17. novembra 1, 080 01, Prešov, Slovensko email: eva.petrejcikova@unipo.sk

²Nemocnica AGEL Košice-Šaca, Interná klinika, Lúčna 57, 04015 Košice-Šaca, Slovensko

Abstract: *Polymorphism rs519129 SLC25A24 gene in the pathogenesis of osteoporosis in Slovak postmenopausal women.* SNP polymorphisms in the *SLC25A24* gene are considered to be important in the regulation of body fat and association with BMI. The aim of the study was to determine the association of the *rs519129* polymorphism in the *SCL25A24* gene with BMI and BMD parameters that play a key role in the etiology of osteoporosis. The studies sample consists of 81 Slovak postmenopausal women; 43 with osteoporosis, 23 with osteopenia and 15 as a control group. Genotype analysis of the *rs519129* polymorphism was performed by Real-Time PCR. We observed statistically significant differences in mean values of body height, BMI, BMD hip and BMD lumbar spine in studied groups. No significant differences were recorded in the allele and genotype frequencies. We did not find an association between the SNP polymorphism *rs519129* in the *SLC25A24* gene and BMI and BMD levels, and therefore we cannot consider *rs519129* as a risk factor in our studied groups of Slovak postmenopausal women.

Key words: polygenic disease, bone mineral density, body mass index, genetics, osteopenia, single nucleotide polymorphism, Central Europe

Úvod

Osteoporóza sa pokladá za multifaktoriálne polygénne ochorenie, pri ktorom sa potvrdila asociácia viacerých génov tzv. silného a slabého účinku, ktoré sa podieľajú na kostnom metabolizme za súčasnej interakcie viacerých faktorov prostredia (Peacock et al. 2002). Ochorenie je charakterizované nízkou kostnou minerálnou denzitou (BMD) a poruchou mikroarchitektúry kostného tkaniva, čím dochádza k zvýšenej krehkosti kostí a tým k zvýšenému výskytu zlomenín už pri minimálnej traume (Harvey et al. 2010). Pre vysokú prevalenciu, morbiditu a mortalitu najmä v skupinách postmenopauzálnych žien je dôležitá prevencia a včasná diagnostika, ktorá by mala zahŕňať aj sledovanie molekulárno-genetických mechanizmov v patogenéze osteoporózy. Cieľom molekulárno-genetických metód je identifikácia kandidátnych génov a polymorfizmov ovplyvňujúcich aktivitu kostných buniek, znižovanie hodnôt BMD a zvyšovanie rizika osteoporotickej zlomeniny (Huang a Kung 2006). Jedným zo sledovaných génov v etiológii osteoporózy je *SLC25A24* gén uložený na krátkom ramene chromozómu 1. Pokladá sa za nový susceptibilný gén ovplyvňujúci adipogénu a percento telesného tuku v ľudskom organizme (Schumann et al. 2020). Výskum potvrdil, že genetické varianty v intróne 1 plnia dôležitú úlohu v regulácii génovej expresie na úrovni transkripcie a ovplyvňujú hladiny mRNA (Tokuhira et al. 2003). Predmetom nášho výskumu sa preto stal SNP polymorfizmus *rs519129* s cieľom zistiť jeho vplyv na hodnoty BMI a BMD u slovenských postmenopauzálnych žien s osteoporózou a osteopéniou.

Súbor a metódy

Sledovaný súbor tvorilo 81 slovenských postmenopauzálnych žien, ktoré boli na základe total T-skóre (WHO 1998) rozdelené do troch skupín – kontrolnej skupiny (n = 15), skupiny žien s diagnostikovanou osteopéniou (n = 23) a osteoporotickej skupiny (n = 43). U všetkých probandiek sa sledovali antropometrické parametre (vek, vek nástupu menopauzy, telesná hmotnosť, telesná výška) a prostredníctvom DEXA denzitometrie hodnoty BMD chrbtice a BMD bedrovej kosti. Pre molekulárno-genetické analýzy sa všetkým postmenopauzálnym ženám odobrala vzorka periférnej krvi. Genotypizačná analýza SNP polymorfizmu *rs519129* génu *SLC25A24* sa uskutočnila metódou Real-Time PCR prostredníctvom prístroja 7500 Fast Real – Time PCR System (Applied Biosystem) a stanovené boli genotypové a alelové frekvencie v sledovaných skupinách.

Získané výsledky sa štatisticky spracovali. Na zistenie Hardyho-Weinbergovej rovnováhy sa použil Chí-kvadrát test. Na porovnanie antropometrických a denzitometrických parametrov, a na sledovanie súvislosti medzi genotypmi a hodnotami BMI resp. BMD sa použila ANOVA. Miera asociácie bola stanovená na základe výpočtu pomeru šancí (odds ratio, OR), kde hodnoty OR > 1 indikovali rizikovú expozíciu príslušným faktorom. Testy sa realizovali pri hladine významnosti $\alpha = 0,05$.

Všetci probandi boli informovaní o cieľoch a metódach výskumu a poskytli svoj informovaný súhlas. Získané dáta boli anonymné a metódy použité pri realizácii štúdie boli v súlade s etickými štandardmi Etickej komisie pre oblasť výskumu Prešovskej univerzity a Helsinskej deklarácie z roku 1964 a jej neskorších dodatkov.

Výsledky a diskusia

Pri antropometrických a denzitometrických parametroch v skupinách postmenopauzálnych žien sme zistili vysoko štatisticky významné rozdiely najmä v telesnej hmotnosti, v hodnotách BMI, BMD bedrovej kosti a BMD chrbtice (tab. 1). Tak ako sme predpokladali, nízke priemerné hodnoty BMD bedrovej kosti ($0,81 \pm 0,09 \text{ g/cm}^2$) a BMD chrbtice ($0,79 \pm 0,07 \text{ g/cm}^2$) sa zaznamenali práve v skupine postmenopauzálnych žien s diagnostikovanou osteoporózou.

Tab. 1: Porovnanie antropometrických a denzitometrických parametrov probandiek
Table 1: Comparison of anthropometric and densitometric parameters of probands

	Osteoporotická skupina (n = 43)	Osteopénická skupina (n = 23)	Kontrolná skupina (n = 15)	p
	$x \pm SD$	$x \pm SD$	$x \pm SD$	
Vek (roky)	$66,51 \pm 8,28$	$61,48 \pm 7,76$	$59,87 \pm 11,00$	0,0174*
Vek nástupu menopauzy (roky)	$48,05 \pm 5,62$	$47,39 \pm 6,20$	$47,80 \pm 4,12$	0,9044
Telesná hmotnosť (kg)	$67,48 \pm 9,09$	$77,87 \pm 14,90$	$84,29 \pm 15,19$	< 0,001***
Telesná výška (cm)	$160,29 \pm 6,09$	$157,35 \pm 5,11$	$158,63 \pm 6,85$	0,1706
BMI (kg/m²)	$26,32 \pm 3,74$	$31,46 \pm 5,77$	$33,81 \pm 7,21$	< 0,001***
BMD bedrovej kosti (g/cm²)	$0,81 \pm 0,09$	$0,87 \pm 0,10$	$1,00 \pm 0,08$	< 0,001***
BMD chrbtice (g/cm²)	$0,79 \pm 0,07$	$0,92 \pm 0,07$	$1,14 \pm 0,09$	< 0,001***

BMD – kostná minerálna denzita, BMI – index telesnej hmotnosti, n – počet probandov, p – hodnota štatistickej významnosti, * – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$, SD – smerodajná odchýlka, x – priemerná hodnota

*BMD – bone mineral density, BMI – body mass index, n – number of probands, * – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$, SD – standard deviation, x – mean*

V súvislosti s BMI sme zaznamenali najnižšie hodnoty u žien s diagnostikovanou osteoporózou a na základe medzinárodnej klasifikácie je uvedená skupina na základe priemernej hodnoty ($26,32 \pm 3,74$) zaradená do kategórie nadváha. Skupina postmenopauzálnych žien s osteopéniou a kontrolná skupina s priemernou hodnotou BMI = $31,46 \pm 5,77$ vs. $33,81 \pm 7,21$ patria do kategórie obezita I. stupňa. Viaceré odborné štúdie potvrdzujú, že existuje asociácia medzi hodnotami BMI a rizikom osteoporózy. Jedinci s nízkym BMI majú menšie zásoby teleného tuku a nižšie hladiny cirkulujúceho estrogénu, ktorý pomáha predchádzať strate kostného tkaniva. Vyššie hodnoty telesného tuku ovplyvňujú hladiny aj iných hormónov ako sú leptín, inzulín, preptín, amyln, ktoré môžu nepriamo pôsobiť na aktivitu osteoblastov a osteoklastov a tak na vývoj kostnej hmoty (Mazocco a Chagas 2017, Asomaning et al. 2006).

Na základe genotypovej analýzy polymorfizmu *rs519129* sme nezistili štatisticky významné rozdiely v distribúcii alel a genotypov ($p > 0,05$) medzi skupinou žien s osteoporózou, osteopéniou a kontrolným súborom (tab. 2). Sledované skupiny boli na základe χ^2 testu v Hardy-Weinbergovej rovnováhe. Ancestrálna alela C sa vyskytovala vo vyšších frekvenciách vo všetkých skupinách probandiek. Minoritná alela T mala u pacientiek s osteoporózou frekvenciu 33,72 % a v skupine žien s osteopéniou 23,91 %. V európskych populáciách sa frekvencia alely T pohybuje na úrovni 29,3 % (National Library of Medicine 2021). Vyššia prevalencia minoritnej alely T sa zaznamenala v kontrolnom súbore (36,67 %), výsledok však mohol byť ovplyvnený nízkym počtom probandov.

Tab. 2: Alelové a genotypové frekvencie polymorfizmu *rs519129* v sledovaných skupinách postmenopauzálnych žien

Table 2: Allele and genotypes frequencies of *rs519129* polymorphism in studied groups of postmenopausal women

	n	Genotypové frekvencie			Alelové frekvencie	
		CC	CT	TT	C	T
Osteoporotická skupina	43	19 (44,19 %)	19 (44,19 %)	5 (11,62 %)	57	29
	HWE	$\chi^2 = 0,0056; p = 0,9399$			(66,28 %)	(33,72 %)
Osteopénická skupina	23	13 (56,52 %)	9 (39,13 %)	1 (4,35 %)	35	11
	HWE	$\chi^2 = 1,305; p = 0,7179$			(76,09 %)	(23,91 %)
Kontrolný skupina	15	5 (33,33 %)	9 (60,00%)	1 (6,67 %)	19	11
	HWE	$\chi^2 = 1,2777; p = 0,2583$			(63,33 %)	(36,67 %)
Štatistické porovnanie		$\chi^2 = 3,0259$ $p = 0,5535$			$\chi^2 = 1,7954$ $p = 0,4075$	

HWE – Hardy-Weinbergova rovnováha, n – počet probandov, χ^2 – chí-kvadrát test, p – hodnota štatistickej významnosti

HWE – Hardy-Weinberg equilibrium, n – number of probands, χ^2 – chí-kvadrát test, p – value of significance

V rámci asociačnej štúdie sme sledovali vplyv genotypov polymorfizmu *rs519129* na hodnoty BMI a BMD u postmenopauzálnych žien s osteoporózou a osteopéniou (tab. 3). Nezistili sme štatisticky signifikantné rozdiely v priemerných hodnotách uvedených parametrov v závislosti od genotypu.

Na rozdiel od nášho výskumu, GWAS štúdia od Urana et al. (2015) na vzorke japonských postmenopauzálnych žien potvrdila asociáciu SNP polymorfizmov génu *SLC25A24* ležiacich v oblastiach intrónu (*rs491785*, *rs547364* a *rs519129*) s nízkymi hodnotami telesného tuku a BMI. U jedincov s majoritnou alelou sa v ľudských primárnych preadipocytoch zaznamenala nižšia hladina mRNA v porovnaní s jedincami s minoritnou alelou. To znamená, že SNP varianty prítomné v intrónovej oblasti ovplyvňujú úroveň expresie génu *SLC25A24* a tým aj percento telesného tuku a BMI, čím sa môžu podieľať na patogenéze osteoporózy. Pri štúdiu asociácie

polymorfizmu *rs519129* s expresiou mRNA *SLC25A24* génu v ľudských primárnych preadipocytoch Urano et al. (2015) zistili, že pri genotype TT sa zistili vyššie hladiny mRNA v porovnaní s hladinami mRNA v preadipocytoch u jedincov s iným genotypom. V skúmanom súbore postmenopauzálnych žien s osteoporózou a osteopéniou sa v genotype TT zistili o niečo vyššie hodnoty BMI v porovnaní s inými genotypmi, ale rozdiely neboli štatisticky významné. Pri sledovaní miery rizika (OR) sme u slovenských postmenopauzálnych žien nezistili asociáciu majoritnej alely C so zvyšujúcim sa rizikom vzniku osteoporózy (odds ratio [OR] 0,75; 95 % CI 0,32 – 1,72; $p = 0,4990$). U majoritnej alely C sme mohli predpokladať, že bude riziková v etiológii osteoporózy práve z toho dôvodu, že je asociovaná s nízkymi hodnotami telesného tuku a BMI; však v našom súbore sa to však nepotvrdilo. Pre ďalšie potvrdenie rizikovosti alel a genotypov polymorfizmu *rs519129* v hodnotách BMI a BMD budú potrebné ďalšie výskumy – predovšetkým navýšenie počtu jedincov v sledovaných súboroch, aby bola rizikovosť štatisticky relevantná.

Tab. 3: BMI a BMD vo vzťahu ku genotypom polymorfizmu *rs519129* u postmenopauzálnych žien s diagnostikovanou osteoporózou a osteopéniou.

Table 3: BMI and BMD with respect to the genotypes of the *rs519129* polymorphism postmenopausal women with osteoporosis and osteopenia

Parameter	Genotyp			p
	CC (n = 32)	CT (n = 28)	TT (n = 6)	
	$x \pm SD$	$x \pm SD$	$x \pm SD$	
BMI (kg/m²)	28,05 ± 5,68	27,60 ± 4,47	28,34 ± 6,90	0,8640
BMD bedrovej kosti (g/cm²)	0,82 ± 0,11	0,83 ± 0,08	0,83 ± 0,09	0,8375
BMD chrbtice (g/cm²)	0,83 ± 0,11	0,83 ± 0,09	0,83 ± 0,07	0,9992

BMD – kostná minerálna denzita, BMI – index telesnej hmotnosti, n – počet probandov, p – hodnota štatistickej významnosti, SD – smerodajná odchýlka, x – priemerná hodnota

BMD – bone mineral density, BMI – body mass index, n – number of probands, SD – standard deviation, x – mean

Význam a funkcia génu *SLC25A24* spočíva v tom, že kóduje proteínový nosič dôležitý pre reverzibilnú výmenu ATP-Mg a fosfátu medzi cytozolom a mitochondriami, čím udržiava optimálnu hladinu adenínu v mitochondriálnom matrici (Aprille 1993). Optimálna hladina adenínu v mitochondriálnom matrici je dôležitá pre metabolické procesy (glukoneogénu a syntézu močoviny), syntézu a proliferáciu mitochondriálnych proteínov a pre reguláciu Ca²⁺ homeostázy (Aprille 1993, Traba et al. 2012). Varianty a mutácie v géne *SLC25A24* vedú k narušeniu mitochondriálnej syntézy ATP, spôsobujú hyperpolarizáciu a zvýšený únik protónov, čo vedie k narušeniu energetického metabolizmu (Writzl et al. 2017). Potvrdila sa asociácia SNP polymorfizmov s obezitou a lipodystrofiou, takže vedci odporúčajú ich výskum zaradiť do prevencie a liečby týchto ochorení (Urano et al. 2015). Štúdia Writzla et al. (2017) potvrdzuje, že *de novo* missense mutácie v tomto géne spôsobujú aj tzv. Fontainov syndróm (angl. Fontaine progeroid syndrome), ktorý je charakterizovaný kostnou dyspláziou, poruchami rastu a tiež práve zníženým množstvom podkožného tukového tkaniva.

Záver

V predloženej pilotnej štúdii sme u slovenských postmenopauzálnych žien uskutočnili analýzu SNP polymorfizmu *rs519129* v géne *SLC25A24*, ktorý je asociovaný s nízkymi hodnotami telesného tuku a BMI, čo je negatívny faktor vo vývoji kostnej hmoty a v etiológii osteoporózy. Pri sledovaní parametrov – BMI a BMD sme zistili, že u žien s diagnostikovanou osteoporózou a osteopéniou boli hodnoty významne nižšie v porovnaní s kontrolným súborom. Výsledky genotypovej analýzy nepreukázali súvislosť medzi SNP polymorfizmom *rs519129* v géne *SLC25A24* a hladinami BMI a BMD, preto ho nemôžeme u sledovaných probandiek zaradiť

medzi rizikové faktory v patogeneze osteoporózy. Pokladáme za nevyhnutné zväčšiť počty jedincov v sledovaných súboroch, pretože predpokladáme veľký vplyv génu *SLC25A24* v etiológii osteoporózy, ako aj obezity.

PodĎakovanie

Výskum bol realizovaný v rámci projektu VEGA 1/0461/19.

Literatúra

APRILLE, J. R., 1993: Mechanism and regulation of the mitochondrial ATP-Mg/P(i) carrier. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 25:473-481. DOI: 10.1007/BF01108404.

ASOMANING, K., BERTONE-JOHNSON, E. R., NASCA, P. C., HOOVEN, F., PEKOW, P. S., 2006. The association between body mass index and osteoporosis in patients referred for a bone mineral density examination. *J. Womens Health (Larchmt)*, 15(9):1028-1034. DOI: 10.1089/jwh.2006.15.1028.

HARVEY, N., DENNISON, E., COOPER, C., 2010: Osteoporosis: impact on health and economics. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 6:99-105. Online. Available: <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2009.260> [15.06. 2021].

HUANG O-Y., KUNG A. W. C., 2006: Genetics of osteoporosis. *Mol. Genet. Metab.*, 88(4):295-306. Online. Available: <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2006.04.009> [16. 06. 2021].

MAZOCCO, L., CHAGAS, P., 2017: Association between body mass index and osteoporosis in women from northwestern Rio Grande do Sul. *Rev. Bras. Reumatol. Engl. Ed.*, 57(4):299-305. DOI: 10.1016/j.rbre.2016.10.002.

PEACOCK, M., TURNER, CH., ECONS, M. J., FOROUD, T., 2002: Genetics of osteoporosis. *Endocr. Rev.*, 23(3):303-326. DOI: 10.1210/edrv.23.3.0464.

SCHUMANN, T., KÖNIG, J., HENKE, CH., WILLMES, D. M., BORNSTEIN, S. R., JORDAN, J., FROMM, M. F., BIRKENFELD, A. L., 2020: SLC Transporters as Targets to Treat Metabolic Disease. *Pharmacol. Rev.*, 72(1):343-379. Online. Available: <https://doi.org/10.1124/pr.118.015735> [15. 06. 2021].

TOKUHIRO, S., YAMADA, R., CHANG, X., SUZUKI, A., KOCHI, Y., SAWADA, T., SUZUKI, M., NAGASAKI, M., OHTSUKI, M., ONO, M., FURUKAWA, H., NAGASHIMA, M., YOSHINO, S., MABUCHI, A., SEKINE, A., SAITO, S., TAKAHASHI, A., TSUNODA, T., NAKAMURA, Y., YAMAMOTO, K., 2003: An intronic SNP in a RUNX1 binding site of SLC22A4, encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis. *Nat. Genet.*, 35(4):341-348. DOI: 10.1038/ng1267.

TRABA, J., DEL ARCO, A., DUCHEN, M. R., SZABADKAI, G., SATRÚSTEGUI, J., 2012: SCaMC-1 promotes cancer cell survival by desensitizing mitochondrial permeability transition via ATP/ADP-mediated matrix Ca(2+) buffering. *Cell Death Differ.*, 19(4):650-660. DOI: 10.1038/cdd.2011.139.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, 2021: dbSNP (rs519129), ALFA Allele Frequency. National Center for Biotechnology Information. Bethesda. Online. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs519129#frequency_tab [25. 06. 2021].

URANO, T., SHIRAKI, M., SASAKI, N., OUCHI, Y., INOUE, S., 2015: *SLC25A24* as a Novel Susceptibility Gene for Low Fat Mass in Humans and Mice. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 100(4): E655-E663. Online. Available: <https://doi.org/10.1210/jc.2014-2829> [16. 06. 2021].

WHO, 1998: Guidelines for preclinical evaluation and clinical trials in osteoporosis. World Health Organization. Geneva. ISBN 9241545224. Online. Available: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42088/9241545224_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y [25. 08. 2021].

WRITZL, K., MAVER, A., KOVAČIČ, L., MARTINEZ-VALERO, P., CONTRERAS, L., SATRUSTEGUI, J., CASTORI, M., FAIVRE, L., LAPUNZINA, P., VAN KUILENBURG, A. B. P., RADOVIĆ, S., THAUVIN-ROBINET, C., PETERLIN, B., DEL ARCO, A., HENNEKAM, R.

C., 2017: De Novo Mutations in SLC25A24 Cause a Disorder Characterized by Early Aging, Bone Dysplasia, Characteristic Face, and Early Demise. *Am. J. Hum. Genet.*, 101(5):844-855. DOI: 10.1016/j.ajhg.2017.09.017.