

Genetické predispozície k osteoporóze

Lazárová Katarína · Medicína

20.06.2012

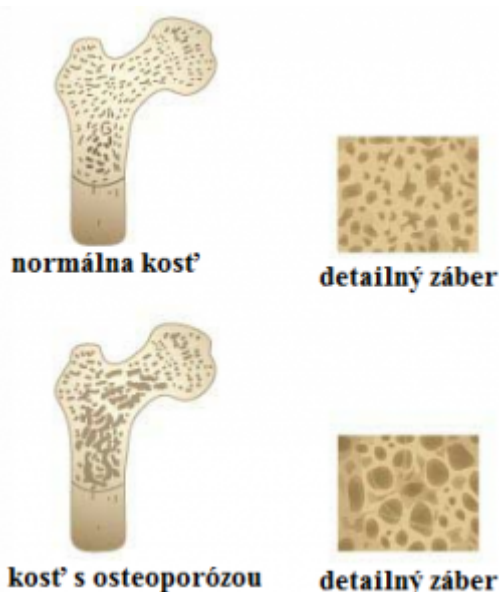


Osteoporózu považujeme za multifaktoriálne ochorenie, ktoré vedie k zníženiu kvality života, pretože zníženie pevnosti kostí vedie k zníženiu pevnosti kostí. V súčasnosti venuje vedecká spoločnosť veľkú pozornosť analýze kandidátnych génov, ktoré môžu korelovať so vznikom osteoporotického ochorenia. Táto štúdia je zameraná na analýzu OPG

génu.

1. Úvod

Osteoporóza patrí medzi najčastejšie ochorenia populácie. Postihuje hlavne staršie osoby, obe pohlavia a všetky etnické skupiny. Pre osteoporózu je charakteristické zníženie obsahu kostnej hmoty a porušenie mikroarchitektúry. Tieto faktory vedú k zvýšenej frekvencii výskytu fraktúr. Riziká vzniku osteoporózy môžu byť modifikovateľné, ktoré závisia predovšetkým na životnom štýle a riziká fixné, ktoré sú podmienené dedične. [1]



Obr. 1 Porovnanie kostnej hmoty zdravej kosti a kosti zasiahnutou osteoporózou [2]

2. Genetické predispozície osteoporózy

Ako sme už uviedli, osteoporóza je multifaktoriálne ochorenie, ktoré ovplyvňuje interakcia medzi vplyvom prostredia a génmi ako aj medzi génmi samotnými. V

mnohých prípadoch bola potvrdená asociácia medzi polymorfizmami génov, ktoré sa podieľajú na kostnom metabolizme a vznikom osteoporotického ochorenia. Polymorfizmy mnohých génov korelujú so vznikom tohto patologického stavu. Naznačujú to aj výsledky analýz zo štúdií dvojčiat a rodín, ktoré naznačujú, že dedičnosť BMD sa pohybuje v rozsahu od 25% do 85%. Vplyv dedičnosti nesporne zohráva zásadnú úlohu v regulácii kostnej hmoty a okrem ojedinelých prípadoch je dedičnosť BMD podmienená polygénne. [1]

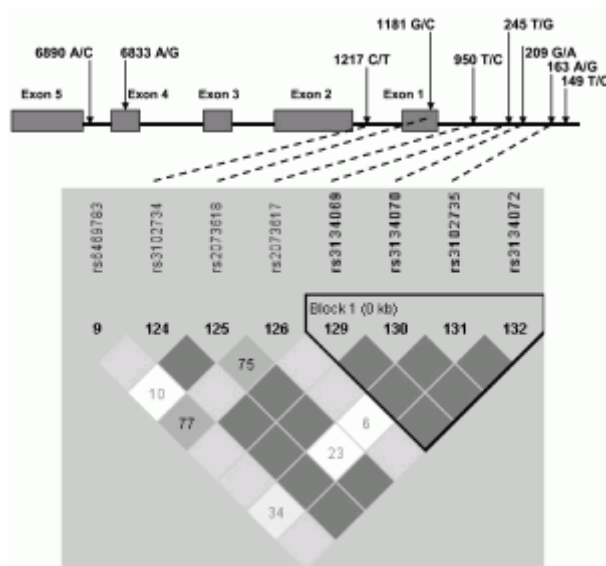
V rámci genetických predispozícií, ktoré môžu viesť k vzniku tohto patologického stavu rozlišujeme mnoho génov. Jednou z príčin môžu byť polymorfizmy génu pre OPG (gén kódujúci osteoprotegerín), VDR (gén kódujúci vitamín D receptor), LRP 5 (lypoproteínový receptor proteínu 5), polymorfizmus COLIA génu (gén pre kolagén), génu pre TGF- β 1 (gén kódujúci transformujúci rastový faktor), IGF - 1 (gén kódujúci inzulínový rastový faktor) a gén pre IL6 (gén pre interleukín 6).[3]

OPG

OPG bol identifikovaný počas projektu, ktorý sa venoval cDNA potkanov. Táto skupina vedcov sa zaoberala TNF- receptorom. OPG zohráva dôležitú úlohu pri osteoblastogenéze. Jeho biologický účinok spočíva v inhibícii aktivity a diferenciácie osteoklastov. U myši s cieľným odstránením génu pre OPG bolo pozorovaná ťažká osteoporóza. Podstatne nižšia hodnota BMD distálneho rádia sa vyskytuje u jedincov, homozygotov s recesívnou alelou (GG) v porovnaní s heterozygotmi a homozygotmi pre dominantnú alelu pri SNP 245T/G a 163A/G. OPG a RANKL asociujú s výskytom zlomením a BMD kostí v oblasti chrbtice a bedrovej kosti. [4]

Polymorfizmus A163G

Polymorfizmus A163G identifikujeme v oblasti promotora OPG. Výskyt polymorfizmu A163G značne dominoval u pacientok so zlomeninami stavcov. Pri štúdií Kaukazských žien po menopauze odhalili odborníci súvislosť medzi A163G polymorfizmom a výskytom fraktúr bedrovej kosti a zápästia.[5]



Obr.2 Polymorfizmy v proximálnej oblasti OPG [4]

3. Materiál a metodika práce

Izolácia DNA z krvi

V tejto práci sme použili bukalne stery a vzorky periférnej krvi získané od pacientok s diagnostikovanou osteoporózou, ktoré nám poskytlo Osteocentrum Prešov. Ako antikoagulant krvných vzoriek bol použitý EDTA. Analyzovali sme 110 vzoriek, pričom sme rešpektovali všetky etické a právne normy vyžadované pre priebeh výskumu.

Materiál a chemikálie pri izolácii:

Na izoláciu DNA zo vzoriek periférnej krvi sme využívali UltraClean® Blood DNA Isolation Kit (Non-Spin), ktorý je navrhnutý pre izoláciu genomickej DNA vysokej molekulovej hmotnosti. Jednotlivé chemikálie: pufo G1, G2, RNáza A, G3, 100% Izopropanol, 70% Etanol, pufo G4. Materiál a prístroje: ependorfky, pipety, špičky pre pipety, vortex, Hettich Mikro 200R centrifuga, Termostat CH-100.

Postup pri zadávaní Real-time PCR reakcie:

1. Real-time PCR chemikálie a materiál:

- Chemikálie:
 - TaqMan® Genotyping Master Mix, Applied Biosystems by Life Technologies, Foster City, California, USA,
 - TaqMan rs3102735; C__1971046_10, Applied Biosystems by Life Technologies, Foster City, California, USA
 - H₂O z Miliporu
- Materiál:
 - MicroAmp™ Fast Optical 48-jamkový reakčný plate (0,1ml), Applied Biosystems by Life Technologies, Foster City, California, USA
 - MicroAmp® 48-Well Optical Adhesive Film, Applied Biosystems by Life Technologies, Foster City, California, USA
 - pipety s rôznym objemom, špičky pre pipety

2. Prístroje:

- JOUAN B4i multifunction centrifuge, Esco Class II Biological Safety Cabinet (BSC)
- StepOne Real-Time PCR System s počítačovou kontrolou Applied Biosystems by Life Technologies, Foster City, California, USA

StepOne Real-Time PCR poskytuje možnosť analýzy dát z rôznych hľadísk pomocou multikomponentného zobrazenia. Výhodou tohto prístroja je, že je schopný identifikovať vzorku, resp. jamku v plate, ktorá by mohla nepriaznivo ovplyvniť celú analýzu. Je schopný detekovať farbivá FAM, VIC, SYBR Green, ROX. StepOne určí polohu a intenzitu fluorescenčných signálov, farbivá spojené s každou fluorescenciou a význam jednotlivých signálov.

3. Návrh sondy a primerov:

Pre amplifikáciu požadovaného úseku génu OPG sme použili sondu: TaqMan rs3102735; C__1971046_10

Lokalizácia: chromozóm 8

Organizmus: Homo sapiens

Rodokmeň: Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;

Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae;

Homo

kontext sekvencie(VIC/FAM):

CTCTAGGGTTCGCTGTCTCCCCCAT[C/T]AATTCCCTGGTCTAGAAGTTAGACT

polymorfizmus: C/T transmisia

symbol génu: TNFRSF11B OPG; TR1; OCIF (www.bioinfo.appliedbiosystems.com)

4. Parametre jednotlivých cyklov:

	pred PCR	teplotné cykly			Post-PCR
krok	holding fáza	holding fáza	50 cyklov		holding fáza
			denaturácia	anealing	
teplota	60°C	95°C	92°C	60°C	60°C
čas	00:30	10:00	0:15	1:30	1:30
zber dát	áno	nie	nie	áno	áno

4. Výsledky a diskusia

Analýzovaný súbor tvorilo 110 jedincov s diagnostikovanou osteoporózou. Analýzu vzoriek sme vykonali pomocou real-time PCR metódy. V tejto štúdii sme sledovali polymorfizmus OPG génu A163G, ktorý je najčastejšie popisovaný v asociácii s osteoporózou.

Tab. 1 Priemerné vekové zloženie jedincov analyzovaného súboru

	ženy	muži
počet jedincov analyzovaného súboru	101	9
percentuálny podiel	91,8%	8,2%
vekové rozpätie	33-83 r.	47-79 r.
priemerný vek	64 r.	61r.

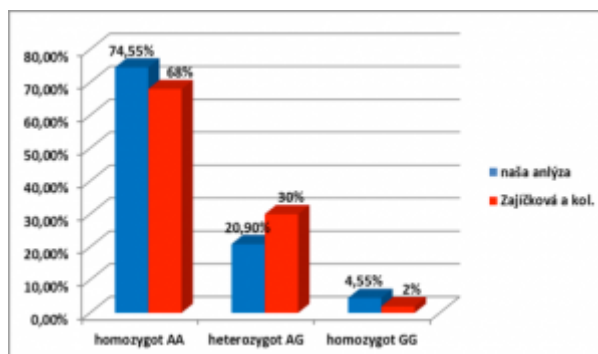
Najvyššiu frekvenciu výskytu v analyzovanej skupine sme zaznamenali pri genotype AA s frekvenciou 74,55%. Výskyt genotypu GG sme detekovali s frekvenciou 4,55%. Genotyp AG bol identifikovaný v 20,90% analyzovaných vzoriek. Distribúcia jednotlivých genotypov bola podľa Hardy-Weinbergovho zákona v rovnováhe, ako to dokumentuje aj výsledok Chi-kvadrát testu. Porovnaním alelových frekvencií sme detekovali v analyzovanom súbore vyššiu frekvenciu výskytu alely A, ktorá sa vyskytovala vo frekvencii 0,85. Frekvencia výskytu alely G bola 0,15.

Tab. 2 Frekvencia genotypov a alel A163G polymorfizmu v OPG géne

	Počet jedincov	Frekvencie genotypov			χ^2	Frekvencie alel	
	110	AG	AA	GG	3,5 P= 0,06578	A	G
A		82	23	5		0,85	0,15
S		74,55%	20,90%	4,55%			
T		79,5	28,05	2,5			

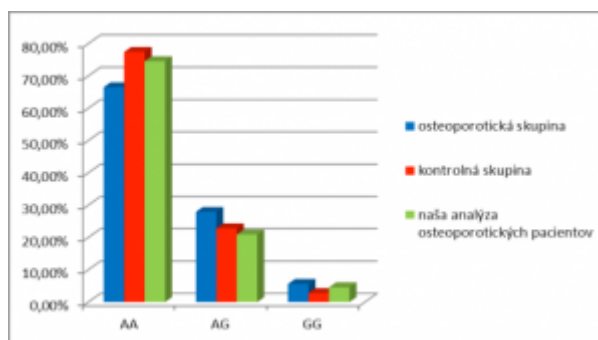
P - P hodnota, A - absolútny počet, S - pozorované frekvencie v percentách, T - teoretický počet podľa Hardy-Weinbergovho zákona.

Získané výsledky sú porovnateľné s výsledkami štúdií iných autorov, ako napr. s analýzou Zajíčkovej et al. (2008), ktorí vo svojej štúdií analyzovali 165 vzoriek pre prítomnosť polymorfizmov A163G, T245G, G1181C.



Graf 1. Porovnanie percentuálnych podielov jednotlivých genotypov [6]

Bentle et al. (2002) pri štúdií, ktorá sa zaoberala polymorfizmom OPG v asociácii s osteoporotickými fraktúrami venoval pozornosť aj A163G polymorfizmus. Frekvencia genotypov bola nasledovná: AA:66,5%, AG:27,9%, GG:5,6%. Vo svojej štúdií analyzovali zároveň kontrolné vzorky. V porovnaní s osteoporotickou skupinou zaznamenali vyššiu frekvenciu genotypu AA: 74,4% a nižší výskyt heterozygotov AG: 22,8% a homozygotov GG: 2,8%.



Graf 2. Porovnanie geontypov štúdie Bentle L. et al. a našej analýzy [5]

5. Záver

Osteoporóza je v súčasnosti závažným problémom dnešnej populácie celého sveta. Predstavuje obrovský zdravotnícky a sociálno-ekonomický problém. Náklady spojené s liečbou osteoporózy sú vysoké. Malé percento populácie je informovaných o tom, že osteoporóza je považovaná za civilizačné ochorenie, ktoré vedie k rapídne mu zníženiu kvality života a v mnohých prípadoch je príčinou úmrtia. Z týchto dôvodov je lepšie tomuto ochoreniu predchádzať ak je to možné.

OPG gén predstavuje jeden z „kandidátnych génov“ v spojitosti s genetickými predispozíciami k osteoporóze. Polymorfizmy v tomto géne korelujú s rôznymi fenotypmi kostí, vrátane zlomenín. Tieto výsledky a závery sú len prvým krokom k prevencii osteoporózy. Osteoporóze je možné predchádzať správnym životným štýlom. Významnú úlohu tu zohráva správna životospráva, ktorá predstavuje dostatok konzumácie mliečnych výrobkov a rýb, príjmu vitamínu D a dostatok pohybu.

Zoznam použitej literatúry

1. RALSON, H.S. 2002. Genetic Control of Susceptibility to Osteoporosis. In: The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism [online]. 2002, vol.87,no.6.,ISSN 0021-972X, Dostupné na internete:
<http://jcem.endojournals.org/content/87/6/2460.long#sec-11>
2. LAVELLE, P. 2004. Osteoporosis. In: ABC Health and Wellbeing [online]. 2004. Dostupné na internete:
<http://www.abc.net.au/health/library/stories/2004/04/29/1831468.htm>
3. MARINI, F.- BRANDI M.J.2010. Genetic Determinants of Osteoporosis: Common Bases to Cardiovascular Diseases?. In International Journal of Hypertension [online]. 2010, vol.2010, p.16., ISSN: 2090-0392, Dostupné na internete:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2949079/?tool=pubmed>
4. PIEDRA,M. et al. 2011. Single nucleotide polymorphisms of the OPG/RANKL system genes in primary hyperparathyroidism and their relationship with bone mineral density. In: BMC Medical Genetics [online]. 2011, vol.12, ISSN 1471-2350, Dostupné na internete:
<http://www.biomedcentral.com/1471-2350/12/168>
5. BENTLE, L. et al,2002. Polymorphisms in the Osteoprotegerin Gene Are Associated With Osteoporotic Fractures. In: Journal of Bone and Mineral Research [online]. 2002, vol.17, no.7 1245-1255 s., ISSN: 1523-4681, [cit. 2012-02-01]. Dostupné na internete:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1359/jbmr.2002.17.7.1245/full>
6. ZAJÍČKOVÁ,K. et al. 2008. Is A163G Polymorphism in the Osteoprotegerin Gene Associated with Heel Velocity of Sound in Postmenopausal Women?. In: Physiological Research [online]. 2008, vol.57.suppl 1, ISSN 1802-9973, [cit. 2012-01-01].Dostupné na internete:
http://www.biomed.cas.cz/physiolres/pdf/57%20Suppl%201/57_S153.pdf

Na analýze spolupracovala Fakulta humanitných a prírodných vied Prešovskej Univerzity v Prešove.
