

UNIVERZITA KONŠTANTÍNA FILOZOFA V NITRE
FAKULTA PRÍRODNÝCH VIED

**VPLYV GENETICKÝCH POLYMORFIZMOV
V GÉNE CYP1B1 NA UKAZOVATELE KOSTNÉHO
METABOLIZMU A ICH VYUŽITIE PRI PREDIKCII
RIZIKA VZNIKU OSTEOPORÓZY U ŽIEN**

RIGORÓZNA PRÁCA

2012

Mgr. Jana Španková

UNIVERZITA KONŠTANTÍNA FILOZOFA V NITRE
FAKULTA PRÍRODNÝCH VIED

**VPLYV GENETICKÝCH POLYMORFIZMOV V GÉNE
CYP1B1 NA UKAZOVATELE KOSTNÉHO
METABOLIZMU A ICH VYUŽITIE PRI PREDIKCII
RIZIKA VZNIKU OSTEOPORÓZY U ŽIEN**

Rigorózna práca

Študijný program: Biológia

Študijný odbor: 4.2.1 Biológia

Školiace pracovisko: Katedra botaniky a genetiky

Školiteľ: doc. RNDr. Radoslav Omelka, PhD.

Nitra 2012

Mgr. Jana Španková

ABSTRAKT

ŠPANKOVÁ, Jana: Vplyv genetických polymorfizmov v géne CYP1B1 na ukazovatele kostného metabolizmu a ich využitie pri predikcii rizika vzniku osteoporózy u žien. Rigorózna práca. Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre. Fakulta prírodných vied, Katedra botaniky a genetiky. Školiteľ: doc. RNDr. Radoslav Omelka, PhD. Stupeň odbornej kvalifikácie: Doktor prírodných vied v odbore „Biológia“. Nitra: FPV, 2012. 79 s.

Predkladaná práca sa venuje asociácii medzi polymorfizmami génu pre cytochróm P450 (CYP1B1) a ukazovateľmi kostného metabolizmu – markermi kostnej remodelácie a hustotou kostného minerálu krčka femuru (F-BMD) a driekovej chrbtice (S-BMD). Osteoporóza je metabolické ochorenie kostí, ktoré sa vyznačuje porušením mikroarchitektúry kostného tkaniva a zahŕňa široké spektrum genetických, environmentálnych a hormonálnych faktorov, ktoré môžu ovplyvňovať BMD. Sledované skupiny pozostávali zo 100 (pre polymorfizmus Arg48Gly), 154 (Ala119Ser), 149 (Leu432Val) a 144 (Asn453Ser) postmenopauzálnych žien. DNA sme získali z krvných vzoriek a genotyp každého polymorfizmu bol určený pomocou PCR-RFLP. Frekvencie genotypov a alel jednotlivých CYP1B1 polymorfizmov boli nasledovné: Arg48Gly – CC (58 %), CG (33 %), GG (9 %), alela C (0,745), G (0,255); Ala119Ser – GG (51,3 %), GT (37 %), TT (11,7 %), alela G (0,698), T (0,302); Leu432Val – CC (35,6 %), CG (45 %), GG (19,5 %), alela C (0,581), G (0,419); Asn453Ser – AA (66,7 %), AG (27,8 %), GG (5,6 %), alela A (0,806), G (0,194). Distribúcia genotypov všetkých polymorfizmov bola v Hardyho-Weinbergovej rovnováhe ($P > 0,05$). Genotyp GG polymorfizmu Leu432Val génu CYP1B1 bol spojený so zvýšenou kostnou formáciou, ale len u žien s vekom do 45,3 roka. Nebola zistená žiadna ďalšia významná asociácia medzi CYP1B1 polymorfizmami a markermi kostného obratu alebo hustotou kostného minerálu (F-BMD, S-BMD). Výsledky rigorózneho práce môžu pomôcť pri spresnení poznatkov o genetickej podmienenosti osteoporózy u človeka a poukazujú na nevhodnosť využitia analyzovaných polymorfizmov v géne CYP1B1 na predikciu rizika vzniku osteoporózy.

Kľúčové slová: Osteoporóza. CYP1B1. Kostný metabolizmus. Biochemické markery. BMD.

ABSTRACT

ŠPANKOVÁ, Jana: Associations of genetic polymorphisms in the CYP1B1 gene with bone metabolism related traits and applications in women osteoporosis risk prediction. RNDr. Thesis. Constantine the Philosopher University in Nitra. Faculty of Natural Sciences, Department of Botany and Genetics. Supervisor: doc. RNDr. Radoslav Omelka, PhD. Degree of Qualification: Doctor of Natural Sciences in specialization "Biology". Nitra: FNS, 2012. 79 p.

In this work polymorphisms within the cytochrome P450 (CYP1B1) gene have been associated with bone metabolism related traits – markers of bone turnover and bone mineral density in femur (F-BMD) and spinal vertebrae (S-BMD). Osteoporosis is metabolic bone disease characterized by the microarchitectural deterioration of bone tissue and involving a broad spectrum of genetic, environmental and hormonal factors that may affect BMD. The study sample consisted of 100 (polymorphism Arg48Gly), 154 (Ala119Ser), 149 (Leu432Val) and 144 (Asn453Ser) postmenopausal women. Total DNA was extracted from blood samples and the genotypes were determined using PCR-RFLP. The genotype and allele frequencies of CYP1B1 polymorphisms were as follows: Arg48Gly – CC (58 %), CG (33 %), GG (9 %), allele C (0,745), G (0,255); Ala119Ser – GG (51,3 %), GT (37 %), TT (11,7 %), allele G (0,698), T (0,302); Leu432Val – CC (35,6 %), CG (45 %), GG (19,5 %), allele C (0,581), G (0,419); Asn453Ser – AA (66,7 %), AG (27,8 %), GG (5,6 %), allele A (0,806), G (0,194). The genotype distributions for all polymorphisms were in agreement with Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0,05$). The GG genotype of Leu432Val polymorphism in the CYP1B1 gene was found to be associated with increased bone formation, but only in women under 45, 3 years. No other significant association was observed between the CYP1B1 polymorphisms and bone turnover markers and bone mineral density (F-BMD, S-BMD). The results of this study can be used in the specification of knowledge about genetic conditionality of human osteoporosis and suggest inappropriate use of the analyzed polymorphisms in the CYP1B1 gene to predict risk of osteoporosis.

Keywords: Osteoporosis. CYP1B1. Bone metabolism. Biochemical markers. BMD.

OBSAH

| | |
|---|----|
| ZOZNAM OBRÁZKOV A TABULIEK..... | 7 |
| ZOZNAM SKRATIEK..... | 9 |
| ÚVOD..... | 12 |
| 1 PREHĽAD LITERATÚRY..... | 13 |
| 1.1 Kostné tkanivo..... | 13 |
| 1.1.1 Základná stavba kosti..... | 13 |
| 1.1.2 Kostné bunky..... | 14 |
| 1.1.3 Kostná remodelácia..... | 16 |
| 1.2 Charakteristika osteoporózy..... | 17 |
| 1.2.1 Klasifikácia osteoporózy..... | 20 |
| 1.2.2 Faktory ovplyvňujúce osteoporózu..... | 20 |
| 1.3 Metódy v diagnostike osteoporózy..... | 22 |
| 1.4 Markery kostnej remodelácie..... | 24 |
| 1.4.1 Markery kostnej formácie..... | 25 |
| 1.4.2 Markery kostnej resorpcie..... | 26 |
| 1.5 Steroidné hormóny a kosť..... | 27 |
| 1.5.1 Estrogény..... | 27 |
| 1.5.2 Androgény..... | 28 |
| 1.5.3 Cytochróm P450 a biotransformácia steroidných hormónov..... | 29 |
| 1.6 Genetika osteoporózy..... | 31 |
| 1.6.1 Gén CYP1B1..... | 33 |
| 1.7 Liečba osteoporózy..... | 35 |
| 2 CIELE PRÁCE..... | 38 |
| 3 MATERIÁL A METODIKA..... | 39 |
| 3.1 Sledovaná populácia..... | 39 |
| 3.2 Izolácia genómovej DNA..... | 40 |
| 3.3 Amplifikácia DNA..... | 40 |
| 3.4 Restrikčná analýza PCR produktu..... | 42 |
| 3.5 Elektroforéza..... | 43 |
| 3.6 Sledované ukazovatele spojené s osteoporózou..... | 43 |
| 3.7 Štatistické metódy..... | 44 |
| 4 VÝSLEDKY A DISKUSIA..... | 46 |

| | |
|---|----|
| 4.1 Detekcia analyzovaných polymorfizmov..... | 46 |
| 4.2 Zastúpenie CYP1B1/Arg48Gly genotypov v analyzovanej populácii..... | 48 |
| 4.2.1 Asociácia genotypov CYP1B1/Arg48Gly s koncentráciou sledovaných biochemických markerov kostnej remodelácie..... | 49 |
| 4.2.2 Asociácia genotypov CYP1B1/Arg48Gly s BMD v oblasti femuru (F-BMD) a chrbtice (S-BMD)..... | 51 |
| 4.3 Zastúpenie CYP1B1/Ala119Ser genotypov v analyzovanej populácii..... | 51 |
| 4.3.1 Asociácia genotypov CYP1B1/Ala119Ser s koncentráciou sledovaných biochemických markerov kostnej remodelácie..... | 52 |
| 4.3.2 Asociácia genotypov CYP1B1/Ala119Ser s BMD v oblasti femuru (F-BMD) a chrbtice (S-BMD)..... | 54 |
| 4.4 Zastúpenie CYP1B1/Leu432Val genotypov v analyzovanej populácii..... | 55 |
| 4.4.1 Asociácia genotypov CYP1B1/Leu432Val s koncentráciou sledovaných biochemických markerov kostnej remodelácie..... | 56 |
| 4.4.2 Asociácia genotypov CYP1B1/Leu432Val s BMD v oblasti femuru (F-BMD) a chrbtice (S-BMD)..... | 59 |
| 4.5 Zastúpenie CYP1B1/Asn453Ser genotypov v analyzovanej populácii..... | 59 |
| 4.5.1 Asociácia genotypov CYP1B1/Asn453Ser s koncentráciou sledovaných biochemických markerov kostnej remodelácie..... | 60 |
| 4.5.2 Asociácia genotypov CYP1B1/Asn453Ser s BMD v oblasti femuru (F-BMD) a chrbtice (S-BMD)..... | 62 |
| 4.6 Aplikácia výsledkov v praxi a v ďalšom výskume..... | 63 |
| ZÁVER..... | 65 |
| ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY..... | 67 |

ZOZNAM OBRÁZKOV A TABULIEK

- Obr. 1** Remodelácia kosti (Bone remodeling, 2011); s. 16
- Obr. 2** Zmena BMD počas života v závislosti od veku (Fracture prevention in adults, 2011); s. 17
- Obr. 3** Normálna a osteoporózou postihnutá kosť (Osteoporosis, 2011); s. 18
- Obr. 4** Densitometrický sken lumbálnej chrbtice a morfológia stavcov zdravej a osteoporotickej ženy (Yang et al., 2011); s. 23
- Obr. 5** Metabolizmus steroidných hormónov; s. 30
- Obr. 6** Chromozóm 2 a označenie lokalizácie génu CYP1B1 (červená čiarka) (GeneCards – CYP1B1 GC02M038206, 2010); s. 33
- Obr. 7** Reprezentatívne výsledky PCR-RFLP pri detekcii CYP1B1/Arg48Gly polymorfizmu; s. 46
- Obr. 8** Reprezentatívne výsledky PCR-RFLP pri detekcii CYP1B1/Ala119Ser polymorfizmu; s. 46
- Obr. 9** Reprezentatívne výsledky PCR-RFLP pri detekcii CYP1B1/Leu432Val polymorfizmu; s. 47
- Obr. 10** Reprezentatívne výsledky PCR-RFLP pri detekcii CYP1B1/Asn453Ser polymorfizmu; s. 47
- Obr. 11** Percentuálne zastúpenie CYP1B1/Arg48Gly genotypov v pozorovanej populácii; s. 48
- Obr. 12** Asociácie genotypov CYP1B1/Arg48Gly s koncentráciou ALP; s. 49
- Obr. 13** Asociácie genotypov CYP1B1/Arg48Gly s koncentráciou OC; s. 50
- Obr. 14** Asociácie genotypov CYP1B1/Arg48Gly s koncentráciou CTx; s. 50
- Obr. 15** Asociácie genotypov CYP1B1/Arg48Gly s F-BMD a S-BMD; s. 51
- Obr. 16** Percentuálne zastúpenie CYP1B1/Ala119Ser genotypov v pozorovanej populácii; s. 52
- Obr. 17** Asociácie genotypov CYP1B1/Ala119Ser s koncentráciou ALP; s. 53
- Obr. 18** Asociácie genotypov CYP1B1/Ala119Ser s koncentráciou OC; s. 53
- Obr. 19** Asociácie genotypov CYP1B1/Ala119Ser s koncentráciou CTx; s. 54
- Obr. 20** Asociácie genotypov CYP1B1/Ala119Ser s F-BMD a S-BMD; s. 55
- Obr. 21** Percentuálne zastúpenie CYP1B1/Leu432Val genotypov v pozorovanej populácii; s. 56
- Obr. 22** Asociácie genotypov CYP1B1/Leu432Val s koncentráciou ALP; s. 57
- Obr. 23** Asociácie genotypov CYP1B1/Leu432Val s koncentráciou OC; s. 57
- Obr. 24** Interakcia genotypov CYP1B1 génu s vekom; s. 58
- Obr. 25** Asociácie genotypov CYP1B1/Leu432Val s koncentráciou CTx; s. 58
- Obr. 26** Asociácie genotypov CYP1B1/Leu432Val s F-BMD a S-BMD; s. 59
- Obr. 27** Percentuálne zastúpenie CYP1B1/Asn453Ser genotypov v pozorovanej populácii; s. 60
- Obr. 28** Asociácie genotypov CYP1B1/Asn453Ser s koncentráciou ALP; s. 61

- Obr. 29** Asociácie genotypov CYP1B1/Asn453Ser s koncentráciou OC; s. 61
- Obr. 30** Asociácie genotypov CYP1B1/Asn453Ser s koncentráciou CTx; s. 62
- Obr. 31** Asociácie genotypov CYP1B1/Asn453Ser s F-BMD a S-BMD; s. 63

- Tabuľka 1** Odhadované celoživotné riziko zlomeniny u 50-ročnej ženy a 50-ročného muža bielej rasy (Melton et al., 1992); s. 19
- Tabuľka 2** QTL v asociácii s BMD u ľudí; s. 33
- Tabuľka 3** Sledované polymorfizmy génu CYP1B1; s. 35
- Tabuľka 4** Základná štatistika testovaného súboru; s. 39
- Tabuľka 5** Použité primery a restričné enzýmy sledovaných polymorfizmov; s. 41
- Tabuľka 6** Základné zložky PCR; s. 41
- Tabuľka 7** Základné zložky reakčnej zmesi pri restričnej analýze; Arg48Gly, Ala119Ser; s. 42
- Tabuľka 8** Základné zložky reakčnej zmesi pri restričnej analýze; Leu432Val; s. 42
- Tabuľka 9** Základné zložky reakčnej zmesi pri restričnej analýze; Asn453Ser; s. 42
- Tabuľka 10** Frekvencie CYP1B1/Arg48Gly genotypov a alel; s. 48
- Tabuľka 11** Frekvencie CYP1B1/Ala119Ser genotypov a alel; s. 52
- Tabuľka 12** Frekvencie CYP1B1/Leu432Val genotypov a alel; s. 55
- Tabuľka 13** Frekvencie CYP1B1/Asn453Ser genotypov a alel; s. 60

ZOZNAM SKRATIEK

| | |
|--|---|
| A | – Adenine – adenín |
| Ala | – Alanine – alanín |
| ALP | – Alkaline Phosphatase – alkalická fosfatáza produkovaná osteoblastmi |
| Arg | – Arginine – arginín |
| Asn | – Asparagine – asparagín |
| BGP | – Bone Gla Protein – kostný Gla proteín, osteokalcín |
| BMD | – Bone Mineral Density – hustota kostného tkaniva |
| BMI | – Body Mass Index – index telesnej hmotnosti |
| bp | – Base Pair – báзовý pár |
| BUA | – Broadband Ultrasound Attenuation – širokopásmové oslabenie ultrazvuku |
| C | – Cytosine – cytozín |
| CTx | – β -CrossLaps – C-terminálny telopeptid typu I kolagénu |
| CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP3A4, CYP11A, CYP1B1, CYP2B6, CYP2C, CYP2D6, CYP17, CYP19, CYP21 CYP450 | – skupina proteínov patriacich do rodiny CYP450 |
| DHEA | – Dehydroepiandrosterone – dehydroepiandrosterón |
| DNA | – Deoxyribonucleic Acid – deoxyribonukleová kyselina |
| DTH | – 5 α -dihydrotestosterone – 5 α -dihydrotestosterón |
| ER | – Estrogen Receptor – estrogénový receptor |
| F-BMD | – Hustota kostnej hmoty v oblasti krčka femuru |
| G | – Guanine – guanín |
| GLM | – General linear model |
| Gly | – Glycine – glycín |
| GWA | – Genome Wide Association (study) – asociačná analýza v rámci genómu |
| GWL | – Genome Wide Linkage (study) – väzbová analýza v rámci genómu |

| | |
|-----------------|--|
| ICTP | – C-terminal cross-linking Telopeptide of type I collagen – C-terminálny telopeptid typu I kolagénu |
| IGF-I | – Insulin-like Growth Factor-I – inzulínu podobný rastový faktor I |
| INTP | – N-terminal cross-linking Telopeptide of type I collagen – N-terminálny telopeptid typu I kolagénu |
| L | – Lumbales – drieková oblasť chrbtice |
| Leu | – Leucine – leucín |
| NTx | – N-terminálny telopeptid typu I kolagénu |
| OC | – Osteocalcin – osteokalcín |
| PBM | – Peak Bone Mass – maximálna kostná denzita |
| PCR | – Polymerase Chain Reaction – polymerázová reťazová reakcia |
| PCR-RFLP | – Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism – detekcia polymorfizmu dĺžky restričných fragmentov v PCR produkte |
| PICP | – Procollagen I Carboxyterminal Propeptide – karboxyterminálny propeptid kolagénu I |
| PINP | – Procollagen I Aminoterminal Propeptide – aminotermálny propeptid kolagénu I |
| PTH | – Parathormone – parathormón |
| QCT | – Quantitative Computed Tomography – kvantitatívna počítačová tomografia |
| QTL | – Quantitative Trait Loci – lokusy pre kvantitatívne znaky |
| RANKL | – Receptor Activator of Nuclear factor Kappa B Ligand – ligand receptorového aktivátora nukleárneho faktora κ B |
| RTG | – Röntgen |
| S-BMD | – Hustota kostnej hmoty v oblasti driekovej chrbtice |
| SD | – Standard Deviation – smerodajná odchýlka |
| Ser | – Serine – serín |
| SERM | – Selective estrogen receptor modulators – selektívne modulátory estrogénových receptorov |
| SHBG | – Sex Hormone Binding Globuline – transportný proteín steroidných hormónov |
| SNP | – Single nucleotide polymorphism – jednobodová mutácia |

| | |
|----------------------------|--|
| T | – Tymine – tymín |
| TGFβ | – Transforming Growth Factor β – transformujúci rastový faktor β |
| Th | – Thoracicae – hrudná oblasť chrbtice |
| Val | – Valine – valín |
| VOS | – Velocity Of Sound – rýchlosť šírenia ultrazvuku kostným tkanivom |
| WHO | – World Health Organization – Svetová zdravotnícka organizácia |
| WHR | – Waist-to-Hip Ratio – pomer obvodu pásu a bokov |
| χ^2 | – Chi-square test – chí kvadrát test |

ÚVOD

Pri súčasnom pohodlnom spôsobe života s nedostatkom pohybu a stravou chudobnou na látky potrebné pre výstavbu kostí, sa narušuje tvorba a výživa kostí, a tým sa vytvárajú podmienky pre vznik a rozvoj osteoporózy u geneticky rizikových jedincov. Zlomeniny, ktoré sú najzávažnejším dopadom tohto metabolického ochorenia kostí dokážu výrazne negatívne ovplyvniť kvalitu života. Osteoporóza je považovaná za „tichého zlodeja kostí“, lebo navonok sa neprejavujú žiadne príznaky ochorenia, takže ľuďom sa stenčujú a krehnú kosti, až kým nedôjde ku zlomenine, kedy si problém začnú uvedomovať.

Keďže sa predpokladá zvyšovanie ľudského veku, bude sa pravdepodobne zvyšovať aj výskyt osteoporózy. Je teda nevyhnutné, aby sa prišlo na genetickú podstatu tohto ochorenia a pri ohrozených jedincoch sa mohli zaviesť adekvátne preventívne opatrenia a aby došlo ku zníženiu rizika vzniku možných dôsledkov osteoporózy.

Pravidelná obnova kostí je nevyhnutná k tomu, aby kosť plnila svoje funkcie. Resorpcia kostí osteoklastmi a tvorba novej činnosťou osteoblastov je za optimálnych podmienok v rovnováhe. Jej porušenie vedie ku zvýšenému odbúravaniu kostí. Výsledkom je redukcia kostnej hmoty. Ideálny vzťah medzi kostnou resorpciou a novotvorbou udržuje celý rad regulačných mechanizmov. Jedným z dôležitých faktorov je pôsobenie estrogénov. Pri ich poklese dochádza ku zvyšovaniu resorpcie kostí, čo má za následok rednutie a slabnutie kostí.

Rigorózna práca je zameraná na štúdium polymorfizmov v estrogén inaktivujúcom géne CYP1B1 vo vzťahu k ukazovateľom osteoporózy ako sú biochemické markery kostnej remodelácie a hustota kostného minerálu.

Už sa vo svete dosiahol pokrok v identifikácii genetickej podstaty osteoporózy, je známych veľa genetických polymorfizmov a asociácií, ale ešte stále nie dosť, aby sa mohlo včas predchádzať vzniku tohto ochorenia. Naše výsledky teda môžu prispieť k základnému výskumu podstaty osteoporózy.

Dovoľujem si úprimne poďakovať svojmu školiteľovi doc. RNDr. Radoslavovi Omelkovi, PhD. za odborné vedenie, cenné rady, ochotu, metodické a praktické pripomienky, ktoré mi poskytol pri vypracovávaní rigoróznej práce.

1 PREHĽAD LITERATÚRY

1.1 KOSTNÉ TKANIVO

1.1.1 Základná stavba kosti

Kostné tkanivo je jedno z najtvrdších tkanív ľudského tela a po chrupke je to najodolnejšie tkanivo schopné vzdorovať mechanickému stresu. Kosti tvoria hlavný podiel skeletu dospelého jedinca, poskytujú oporu mäkkým tkanivám, chránia životne dôležité orgány, prechovávajú vo svojej dreni krvotvorný orgán a slúžia ako zásobáreň vápnika a fosforu (Junqueira et al., 2002).

Makroskopicky rozoznávame dva typy lamelózneho kostného tkaniva. Trabekulárna alebo špongiózna kosť, *substantia spongiosa* (tvorí približne 20 % celkového skeletu) a kortikálna kosť alebo kompakta, *substantia compacta* (asi 80 % skeletu) (Sikavitsas et al., 2001; Hill a Orth, 1998). Podiel zastúpenia v jednotlivých miestach v rámci skeletu je rozdielny. Kompaktná kosť je pevná, a len do 10 % pórovitá (Sikavitsas et al., 2001). Nachádza sa v rôznych typoch kostí: dlhé kosti (femur a tibia), krátke kosti (zápästie a členok) aj ploché kosti (lebka a nepravidelné kosti) (Sikavitsas et al., 2001). Špongiózna kosť je tvorená lamelózne upravenými trámčekomí kostí, ktoré sú prepojené tak, že vzniká priestorová sieť (Čihák, 2001). Vyplňa hlavne epifyzárne časti kostí a telá stavcov (Broulík, 1999). Predstavuje ju vyššia pórovitosť 50 – 90 %, čo jej poskytuje odolnosť v tlaku (Sikavitsas et al., 2001; Baron, 1993).

Povrch kosti

Väzivový obal kosti, **okostica (periost)** kryje vonkajší povrch kosti všade s výnimkou niektorých miest, kde je kosť spojená so svalom alebo kĺbovým púzdom. Na vnútornej ploche kosti, medzi kostným tkanivom a kostnou dreňou je väzivová vrstva podobná periostu, **endosteum (endost)** (Čihák, 2001). Hlavnou funkciou periostu a endostu je výživa kostného tkaniva a neustále dodávanie nových osteoblastov určených k obnove a rastu kosti (Junqueira et al., 2002).

Kostná matrix

Asi 60 % hydratovanej kosti pozostáva z kostného minerálu, z toho 38 % pripadá na vápnik. Neminerálna časť kostného tkaniva je tuk, kolagén, voda (Kalender, 1992) a nekolagénne bielkoviny (podiel jednotlivých zložiek závisí od veku a typu kosti). Tieto zložky majú ako mechanické aj metabolické funkcie (Robey a Boskey, 2008).

Hlavnou minerálnou zložkou je hydroxyapatit. Funkciou minerálov je zosilňovať kolagén, poskytovať tkanivu mechanickú odolnosť a tiež slúžiť ako zdroj vápnika, fosforu a horčíka pre minerálnu homeostázu (Boskey, 2007).

Stavebným prvkom vláknitej siete je kolagén typu I. Tvorí viac ako 90 % kostnej matrix (Zafeirakis, 2010). Závitnica kolagénu obsahuje aminokyseliny hydroxyprolín a hydroxylyzín. Každá z nich sa skladá z troch polypeptidových reťazcov (Broulík, 1999), z dvoch identických $\alpha 1$ vlákien a štrukturálne podobného, ale geneticky rozdielneho $\alpha 2$ vlákna (Rossert a De Crombrughe, 2002). Terciárna štruktúra kolagénu pozostáva z troch polypeptidov usporiadaných v triplex a je stabilná pri 37 °C (Broulík, 1999).

Nekolagénne bielkoviny tvoria 10 až 15 % z celkovej bielkovinovej zložky v kostiach. Zohrávajú úlohu v organizovaní kostnej matrix, koordinujú interakcie medzi bunkami, minerálmi a medzibunkovou hmotou a regulujú procesy mineralizácie. Počas prvých fáz kostnej formácie sa tvoria glykosaminoglykány, versikan a chondroitín sulfát proteoglykán. Dekorín je zahrnutý v tvorbe kolagénových fibríl (Young et al., 2006). Osteonektín, fosforylovaný glykoproteín je zapojený v raste osteoblastov a v mineralizácii kostnej matrix (Zhu et al., 2007). Kosti buniek syntetizujú množstvo proteínov, ktoré umožňujú bunkové prepojenie (osteopontín, kostný sialoproteín, fibronektín, trombospondín, vitronektín, fibrilín), tým, že sa pripájajú na skupinu integrínov na povrchu buniek (Paz et al., 2005).

Voda tvorí 10 % váhy kosti v závislosti od kostného veku. Je nevyhnutná pre výživu buniek a medzibunkovej hmoty, tok iónov a udržanie kolagénovej štruktúry (Lees, 2003).

Tuky sa podieľajú na suchej váhe kosti do 2 %. Fosfolipáza D sa zúčastňuje prvých fáz formácie budúcich kostí počas embryogenézy (Gregory et al., 2005).

1.1.2 Kostné bunky

V dospeljej kostre osteocyty tvoria 90 až 95 % z celkového zastúpenia kostných buniek v porovnaní so 4 až 6 % osteoblastov a 1 až 2 % osteoklastov (Bonewald, 2008).

Osteoblasty sú bunky mezodermálneho pôvodu (Harada a Rodan, 2003), plne diferencované, zodpovedné za produkciu kostnej matrix (Marks a Odgren, 2002). Sú to hranaté bunky formujúce súvislé vrstvy na vonkajšom povrchu kostného tkaniva (Suda et al., 2003). Majú dobre viditeľný Golgiho aparát a vyvinuté drsné endoplazmatické retikulum (Marks a Odgren, 2002). Dospelé sú nevyhnutné pre mineralizáciu vďaka procesu uskladňovania hydroxyapatitu. Na jeho formovanie sú nevyhnutné vápnik a fosfor,

a s tým súvisí aj regulácia ich lokálnych koncentrácií (Boskey, 1996, 1998). Hlavným produktom osteoblastov je kolagén typu I. Tento proteín je vylučovaný vo forme prekursorov s aminoterminálnymi a karboxyterminálnymi peptidmi na koncoch molekuly. Tieto propeptidy sú následne proteolyticky odstránené. Osteoblasty syntetizujú aj ďalšie proteíny, ktoré sú súčasťou kostnej matrix, ako sú osteokalcín a osteonektín, tvoriace 40 až 50 % nekolagénnych bielkovín kosti (Ducy et al., 1996). Ďalej sú to bielkoviny ako osteopontín, kostný sialoproteín, fibronektín, vitronektín a trombospondín slúžiace ako faktory, ktoré vzájomne pôsobia s integrínmi (Boskey, 1996, 1998). Osteoblasty tiež obnovujú kostnú matrix v oblastiach, kde bola kosť resorbovaná osteoklastmi (Suda et al., 2003). Životnosť osteoblastov je na jednotlivých miestach v rozpätí od 3 mesiacov do 1,5 roka (Roodman, 1996). Dozrievanie a funkcia osteoblastov sú regulované rastovými faktormi a cytokínmi, sprostredkované cez ich interakcie s proteínmi matrix. Niektoré sa zabudujú do kosti ako osteocyty, iné zostanú na kostnom povrchu ako osteoprogenitorové bunky (Harada a Rodan, 2003; Roodman, 1996).

Osteocyty sú zrelé osteoblasty uzavreté v kostnej matrix, a sú zodpovedné za jej zachovanie. Majú schopnosť nielen syntetizovať, ale tiež v obmedzenej miere resorbovať matrix (Marks a Odgren, 2002). Môžu však syntetizovať niektoré molekuly ako je osteokalcín a transportovať minerály vnútri kosti. Vytvárajú dlhý systém úzkych kanálikov, ktoré tvoria komunikačnú sieť s príľahlými osteocytmi a bunkami na kostnom povrchu, ako sú osteoblasty, osteoklasty a osteoprogenitorové bunky (Rho, 2005). Osteocyty produkujúce matrix majú bunkové organely podobné osteoblastom. Osteolytické osteocyty obsahujú lyzozómové vakuoly a štruktúry ako fagocytujúce bunky (Marks a Odgren, 2002).

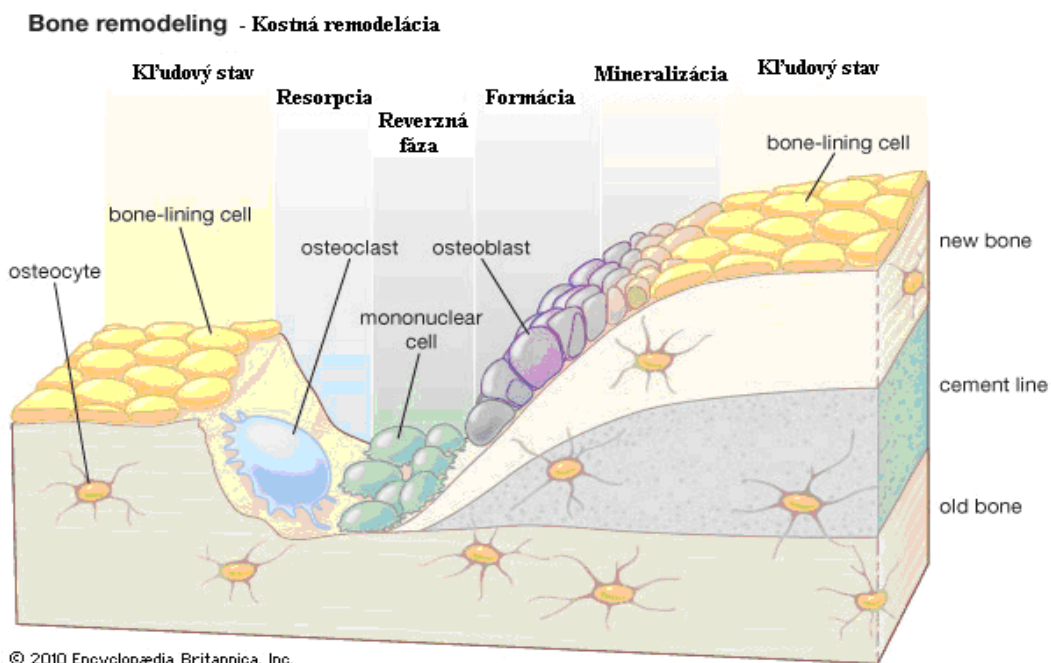
Osteoprogenitorové bunky (lining cells) sú kmeňové bunky, ktoré sa diferencujú z mezenchýmu. Bunky sú ploché, vretenovito pretiahnuté a nachádzajú sa na vnútornej strane periostu, v endoste a v kanálikoch kompaktnej kosti pozdĺž krvných ciev. Bunky si uchovávajú schopnosť mitoticky sa deliť a diferencovať na zrelé kostné bunky (Čech a Horký, 2004).

Osteoklasty sú veľké mnohjadrové bunky, obsahujú od 2 do 100 jadier na bunku (Roodman, 1996), množstvo mitochondrií, lyzozómov a voľných ribozómov (Roodman, 1996; Boskey, 1998). Formujú sa z mononukleárnych prekursorov hemopoetického pôvodu (Vaananen a Horton, 1995). Ich znakom je obsah tartarát-rezistentnej kyslej fosfatázy (Udagawa et al., 1990). Životnosť ľudských osteoklastov sa pohybuje v rozmedzí

dvoch týždňov (Hughes et al., 1996). Svojim kartáčikovým lemom a sekréciou osteolytických enzýmov odbúravajú minerálnu i organickú zložku kostnej hmoty (Broulík, 1999).

1.1.3 Kostná remodelácia

Tkanivo kostí nie je statické. Zdravé kosti vyžadujú neustálu remodeláciu pre prispôsobenie sa na podpornú funkciu, obnovu mikropoškodení a regulovanie minerálnej homeostázy. V tomto procese sa každoročne obnoví približne 10 % skeletu (Lerner, 2006). Pomocou neustáleho cyklu osteoformácie a osteoresorpcie kosť prispôsobuje svoju kompozíciu bežnej záťaži, preto je zloženie kosti odlišné v každom bode na priečnom aj pozdĺžnom priereze (Klabník, 2007). Častejšie je remodelovaná špongiózna kosť oproti kompaktnej, čo vysvetľuje, prečo je toto metabolické ochorenia skeletu pozorované viac v kostiach s pomerne veľkým množstvom špongióznej kosti ako sú distálne predlaktie, chrbtica a bedrová oblasť (Lerner, 2006).



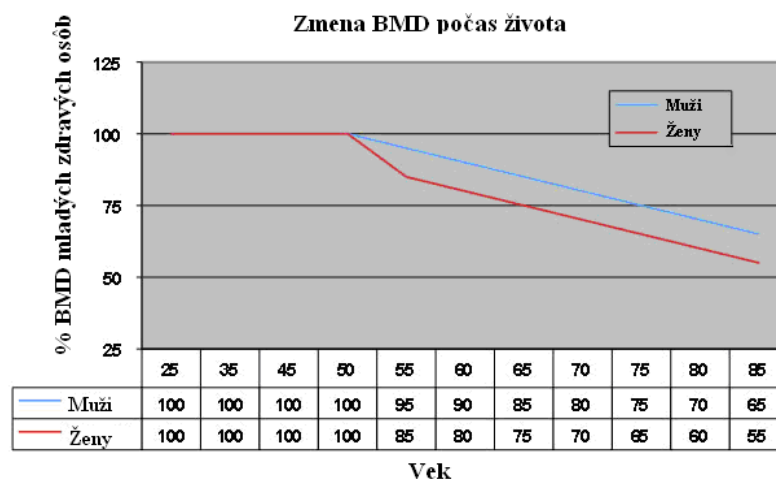
Obr. 1 Remodelácia kosti (Bone remodeling, 2011)

Prestavba kosti (obr. 1) začína na pokojnom kostnom povrchu, kde sa objavia osteoklasty – **kľudový stav** (Vaananen a Horton, 1995) a svojou lytickou činnosťou vytvoria v kompaktnej kosti raziaci kužeľ a v špongióznej kosti Howshipove lagúny – **resorpcia** (Broulík, 1999). Potom osteoklasty opúšťajú resorbované miesta a objavujú sa tu

mononukleárne bunky, ktoré vyčistia organickú matrix a na dne lagún formujú cementovú vrstvu – **reverzná fáza**. Následne sem prídu nezrelé bunky, ktoré sa formujú do zreých osteoblastov a začnú vyplňať osteoklastmi vytvorené medzery novou kostnou hmotou – **formácia**. Keď je vytvorené rovnaké množstvo kosti ako bolo resorbované a prestavba je dokončená, extracelulárna matrix je mineralizovaná – **mineralizácia** a pokrytá vrstvou osteoblastov (Lerner, 2006). Niektoré sa enkapsulujú v osteoide a menia na osteocyty. Iné sa môžu diferencovať na osteoprogenitorové bunky, ktoré vytvárajú nový povrch kosti – **kludový stav** (Lian a Stein, 2001).

1.2 CHARAKTERISTIKA OSTEOPORÓZY

Kosť je živé tkanivo a počas života sa neustále obmieňa. Stará kosť je činnosťou osteoklastov odbúravaná a nahrádza ju kostná hmota nová, ktorá je produktom osteoblastov. Rovnovážny stav medzi tvorbou a odbúraním kosti sa fyziologicky narúša s narastajúcim vekom (asi od 45. roku ženy a 60. roku u muža) (Ďurišová, 2004). Negatívna bilancia kostnej hmoty (keď prevažuje resorpcia kosti nad jej tvorbou) je patogenetickým podkladom osteoporózy (Klabník, 2007) (Obr. 3).



Obr. 2 Zmena BMD počas života v závislosti od veku (Fracture prevention in adults, 2011)

Kanis et al. (1994) charakterizujú osteoporózu zníženou hustotou kostného tkaniva (Obr. 2), redukovanou pevnosťou kostí a zvýšeným rizikom vzniku zlomenín. Ďalej uvádzajú, že osteoporóza sa rozvíja spolu s vekom kvôli nerovnováhe v remodelačnom cykle kosti, ktorý je nevyhnutný pre udržanie zdravej kostry.

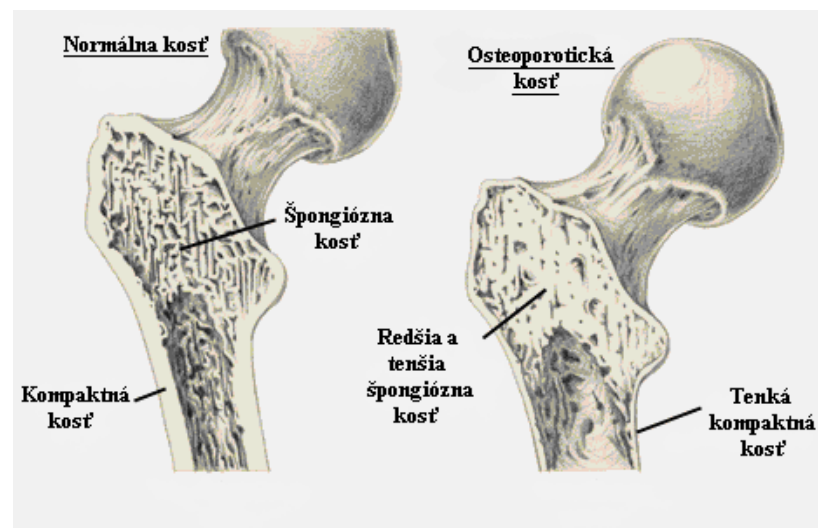
Aj napriek tomu, že kvalita kostnej hmoty je dôležitou zložkou pri riziku fraktúr, aj kostné abnormality prispievajú ku krehkosti kostí. Rôzne neskeletálne faktory ako náchylnosť ku pádu a sila nárazu, prispievajú k riziku fraktúr (Kanis et al., 2005).

Štúdie dokazujú, že genetické vplyvy sa môžu líšiť medzi pohlaviami a rôznymi populáciami (Dvornyk et al., 2003; Kung et al., 2006; Foroud et al., 2007).

Osteoporóza bola Svetovou zdravotníckou organizáciou (WHO, 2003) označená za prednostný zdravotnícky problém pre jej vysoké náklady na zlomeninu a dôsledky ako individuálne, tak aj spoločenské: bolesť, invalidita, zvýšené riziko skorej smrti a ekonomické náklady vlád.

Riziko osteoporotickej zlomeniny nie je dané len denzitou kosti, podieľa sa na ňom aj množstvo iných ukazovateľov pevnosti kosti (Masaryk, 2005). Kostná sila je tvorená zložkami ako sú množstvo kostnej hmoty, mikroarchitektonika (počet a hrúbka kostných trámecov), makroarchitektonika (veľkosť a tvar kosti), vlastností minerálu (minerály, kolagén) a dynamická zložka kostného obratu (osteofórmácia a osteoresorpcia) (Jenšovský, 2004).

Tomková a Telepková (2005) odhadujú prevalenciu osteoporózy v slovenskej populácii asi na 6 %.



Obr. 3 Normálna a osteoporózou postihnutá kosť (Osteoporosis, 2011)

Prejavy osteoporózy

Oblasť proximálneho femuru

Zlomenina v oblasti proximálneho femuru je najzávažnejšou osteoporotickou komplikáciou a je spojená s vysokou mortalitou aj morbiditou. Úmrtnosť po tejto zlomenine je najvyššia v prvých 6 mesiacoch (Wehren a Magaziner, 2003). Z tých, ktorí

prežijú akútne stavy, prakticky polovica zostane pohybovo obmedzená a odkázaná na lôžko alebo sociálnu starostlivosť (Ďurišová, 2004). Približne 90 % zlomenín krčka stehrovej kosti u oboch pohlaví je pritom výsledkom obyčajných pádov (Youm et al., 1999). Incidencia zlomenín proximálneho femuru sa zvyšuje exponenciálne s vekom pri oboch pohlaviach (Cooper et al., 1992a).

Vertebrálna oblasť

Vážne deformity vo vertebrálnej oblasti sa vyskytujú hlavne v torakolumbálnom spojení Th10 – L1, kým menej závažné sú rozšírené difúzne cez celú torakolumbálnu oblasť. Muži vykazujú skôr exponenciálny rast výskytu, zatiaľ čo ženy skôr lineárny rast (Melton et al., 1993). Len asi štvrtina zlomenín stavcov je v dôsledku pádov (Cooper et al., 1992b), väčšina z nich je výsledkom bežných každodenných činností. Zdanlivo neškodné aktivity ako ohýbanie sa alebo dvíhanie ľahkých predmetov môže spôsobiť veľké zaťaženie, ktoré ľahko zapríčini fraktúru stavcov (Myers a Wilson, 1997). Zlomeniny v tejto oblasti sú spojené s kyfózami, stratou výšky (Cummings a Melton, 2002), chronickou bolesťou chrbtice, deformáciami stavcov, pohybovým obmedzením a zvýšeným rizikom hospitalizácie (Ensrud et al., 2000).

Oblasť distálneho predlaktia

Pri zlomeninách tohto typu je výrazná prevaha žien oproti mužom (4:1) s výskytom až 85 % (Owen et al., 1982) (Tab. 1). Incidencia u mužov je relatívne stála medzi 20. až 80. rokom, v porovnaní so ženami, pri ktorých sa pozoruje lineárny nárast do 60. roku, po ktorom nasleduje fáza dočasného poklesu. Dôvodom môže byť zastavenie rýchlej straty špongióznej kosti, ku ktorej dochádza po menopauze a rozdielny typ pádov s postupujúcim vekom (Nevitt et al., 1993).

Tabuľka 1 Odhadované celoživotné riziko zlomeniny u 50-ročnej ženy a 50-ročného muža bielej rasy (Melton et al., 1992)

| | Ženy (%) | Muži (%) |
|--------------------------------------|-----------------|-----------------|
| Zlomenina proximálneho femuru | 17,5 | 6 |
| Zlomenina stavca | 15,6 | 5 |
| Zlomenina distálneho zápästia | 16 | 2,5 |

1.2.1 Klasifikácia osteoporózy

- **Primárna osteoporóza**, Šteňová et al. (2008a) ju definujú ako metabolické ochorenie kosti, najčastejšie asociované s postmenopauzálnym stavom alebo vekom bez prítomnosti sekundárnej príčiny straty kostnej hmoty:

I. typ: Postmenopauzálna osteoporóza – hlavným patofyziologickým mechanizmom vzniku je deficit estrogénov. Dochádza k postihnutiu hlavne špongiózných kostí (Payer et al., 2006) a komplikáciou ochorenia sú kompresívne zlomeniny stavcov a Collesova fraktúra predlaktia. Estrogénový deficit u postmenopauzálnych žien spôsobuje akceleráciu straty kostného tkaniva viacerými mechanizmami cez estrogénové receptory na osteoblastoch a pravdepodobne aj na osteoklastoch (Šteňová et al., 2008a).

II. typ: Senilná osteoporóza – mierna atrofia kostí je fyziologický jav a patrí medzi involučné prejavy starnutia. Až keď sa hustota kosti zníži viac ako o 25 % sa dá hovoriť o patologickom stave (Payer et al., 2006). Senilná osteoporóza navodená deficitom vápnika a vitamínu D pri nedostatočnom príjme alebo renálnej insuficiencii je častým ochorením u oboch pohlaví v starobe (Šteňová et al., 2008b). Fraktúry sú časté ako v kompaktnej aj v špongióznej kosti. Vyskytuje sa u jedincov nad 70 rokov a patogenetickými faktormi sú: vekom sa znižujúca formácia kosti, neurotrofické a cirkulačné kostné poruchy a štrukturálne zmeny podmienené vekom (Payer et al., 2006).

- **Sekundárna osteoporóza** je spôsobená známym alebo zatiaľ neznámym ochorením:

Osteoporóza pri deficite alebo nadbytku hormónov, Osteoporóza spôsobená poruchami výživy a inaktivitou, Renálna osteopatia, Osteoporóza pri chronických zápalových ochoreniach, Osteoporóza pri nádorovom ochorení, Osteoporóza navodená medikamentózne (Payer et al., 2006), prípadne vonkajším vplyvom. Vyskytuje sa u premenopauzálnych žien, mladých mužov, ale aj starších pacientov, kde sekundárna príčina môže prispieť ku akcelerácii a zhoršeniu už existujúcich kostných zmien pri primárnej osteoporóze (Šteňová et al., 2008b).

1.2.2 Faktory ovplyvňujúce osteoporózu

Etiológia osteoporózy je multifaktoriálna. Interakcia medzi genetickými a negenetickými faktormi určuje riziko osteoporotických fraktúr (Ralston, 2002). Množstvo z týchto faktorov je zahrnutých do hromadenia a udržania kostnej hmoty počas

dospelosti, ale vplývajú aj na urýchlenie kostnej straty počas šiestej dekády života (Ralston, 1997). O rozvoji osteoporózy u jedinca rozhodujú podľa Ďurišovej (2004) dve hlavné okolnosti: množstvo kostnej hmoty, s ktorou vstupujeme do dospelosti (dosahované medzi 30. – 35. rokom života) a rýchlosť, akou kostná hmota ubúda.

Osteoporózu ovplyvňujú nasledovné faktory:

Genetické vplyvy – genetické faktory zohrávajú dôležitú úlohu v dedičnosti kostnej štruktúry, v regulácii BMD a určení kostnej hmoty (Ralston, 2002). Štúdie s rodinami dokazujú, že matky, ktoré prekonal osteoporotickú zlomeninu majú dcéry s redukovaným kostným tkanivom a v špecifických miestach zníženou kostnou hustotou (Eisma, 1999).

Vek – ku osteoporóze dochádza hlavne s pribúdajúcim vekom, kedy sa mení množstvo osteoidu a počet osteoblastov prítomných v kostnom tkanive u oboch pohlaví (Nimni et al., 1993). Prispieva k tomu zníženie kostnej formácie spôsobené zníženou mierou dozrievania preosteoblastov na osteoblasty a znížením počtu osteoprogenitorových buniek (Quarto et al., 1995). S pribúdajúcim vekom sa zvyšuje aj aktivita osteoklastov (Jiang et al., 2010).

Pohlavie – u žien začína strata kosti pred menopauzou (35 – 45 rokov), s výrazným zrýchlením úbytku kostného tkaniva asi po 5 až 10 rokoch od menopauzy. Ženy počas života stratia približne 35 % kompaktnéj a 50 % špongiózneho kosti, zatiaľ čo muži len dve tretiny z uvedeného množstva (Weaver, 1992).

Fyzická aktivita – keď sa pretvára kosť vplyvom fyzickej aktivity, dochádza k stimulovaniu aktívnych osteoblastov a osteoprogenitorových buniek a tie priamo reagujú na mechanickú námahu. Dochádza k zmene génovej expresie osteoblastov a reverzii osteoprogenitorových buniek na osteoblasty (Forwood et al., 1996). Iný spôsob je pôsobením cez druhých poslov. Osteoblasty vysielajú správy o zaťažení cez tieto biochemické intermediáty, avšak môžu komunikovať aj priamo s osteocytmi (Lean et al., 1995). Osteocyty následne môžu produkovať anabolické rastové hormóny, ktoré sú transportované na kostný povrch, kde sa zhromažďujú prekursori kostných buniek (Chow a Chambers, 1994).

Stravovanie – dôležitý je hlavne správny pomer jednotlivých základných živín. Nedostatočný príjem bielkovín spôsobuje úbytok stavebného materiálu pre osteoid (Ďurišová, 2004). Adekvátny príjem vápnika je dôležitý pre dosiahnutie a udržanie dostatočného množstva kostnej hmoty a vitamín D je potrebný pre absorpciu vápnika črevom (Dawson-Hughes et al., 1997).

Postava – najväčšie riziko osteoporózy hrozí jednotlivcom s BMI pod 20 kg/m². S rastom BMI nad 20 kg/m² sa zvyšuje telesná hmotnosť a to má mierny protektívny účinok (De Laet et al., 2005). Nízka telesná hmotnosť zvyšuje riziko osteoporózy menším vyvíjaním tlaku na kosti, ktorý zvyšuje ich hustotu (Ďurišová, 2004).

Demografické vplyvy – riziko zlomeniny 50 ročnej Kaukazskej Američanky je takmer 40 %, čo je dvojnásobné riziko v porovnaní s Africkou Američankou (Fujiwara, 2005). Africké Američanky majú hustejšie kostné tkanivo ako Kaukazské, pretože majú vyšší PBM pri kostnej maturácii (Meier et al., 1992). U kaukazských žien tiež boli pozorované nižšie hladiny vápnika ako u afrických, pretože tieto absorbujú vápnik lepšie (Rasmussen et al., 1993).

Fajčenie – vplyv fajčenia u premenopauzálnych žien je biologicky signifikantný. Znížená telesná hmotnosť u fajčiarov je z časti vysvetlená negatívnym vplyvom fajčenia na skelet a tiež zložitými interakciami medzi fajčením, tukovým tkanivom a kosťou. Aj hladina sérového 25-hydroxyvitamínu D a osteokalcínu je nižšia u fajčiarov, čo môže vplývať na rýchlosť kostnej straty (Hermann et al., 2000).

Nadmerný príjem alkoholu – chronický príjem alkoholu má negatívny vplyv na kostnú hmotu. Spôsobuje znižovanie kostnej hustoty a zvyšuje sa riziko fraktúr. Spomaľuje sa diferenciácia osteoblastov a ich aktivita, znižuje sa úroveň absorpcie vápnika črevom a tlmí sa premena vitamínu D na jeho aktívne formy (Zittermann, 2007; Scholz-Ahrens a Schrezenmeier, 2004).

Iné polygénne ochorenia – riziko osteoporotických fraktúr je určené tiež prítomnosťou iných súčasne prebiehajúcich polygénnych ochorení ako sú neurologické, kardiovaskulárne poruchy a tiež chronické ochorenie pľúc, obličiek a žalúdka (Watson, 2002).

1.3 METÓDY V DIAGNOSTIKE OSTEOPORÓZY

Osteodenzitometria

Kostná denzitometria je považovaná za najlepšiu metódu v klinickej praxi na diagnostiku osteoporózy (Killinger et al., 2005). Dokáže odhaliť aj skoré štádiá rednutia kosti a pri kontrolných vyšetreniach spolu s ďalšími metodikami informovať o úspešnosti komplexnej liečby (Ďurišová, 2004). Odporúčaným miestom merania je lumbálna časť chrbtice (stavce L1 až L4) (obr. 4), u osôb vyššieho veku a u osôb s deformitami chrbtice je preferovaným miestom proximálna oblasť femuru. Je možné merať aj iné miesta skeletu, ako je napríklad distálne predlaktie (Blahoš et al., 2006). Metóda vyhodnocuje zatienie energetického

lúča, ktorý prechádza stavcami, predlaktím alebo proximálnou časťou femuru (Broulík, 1999).



Obr. a
Vek = 71 rokov, Žena
T skóre = -0,71 (Normál)



Obr. b
Vek = 73 rokov, Žena
T skóre = -4,2 (Osteoporóza)

Obr. 4 Densitometrický sken lumbálnej chrbtice a morfológia stavcov zdravej a osteoporotickej ženy (Yang et al., 2011)

Diagnostický záver je založený na porovnaní nameranej kostnej denzity s maximálnym obsahom kostného minerálu v mladom veku. Odchýlka od tejto hodnoty, vyjadrená v počte štandardných deviácií (SD) a označovaná ako **T-skóre**, je základným diagnostickým kritériom. Zdravé osoby majú T-skóre vyššie ako -1 (optimálne nulové). Hodnoty v rozmedzí od -1 do -2,5 sú označované ako osteopénia, hodnoty pod -2,5 ako osteoporóza. U detí, mladistvých a osôb starších ako 70 rokov je vhodnejším diagnostickým kritériom hodnota **Z-skóre**, ktorá udáva počet SD od priemeru hodnoty osoby rovnakého veku a pohlavia (Blahoš et al., 2006). Pokles o jednu SD znamená 2-3násobne zvýšené riziko zlomeniny nielen v danej lokalite skeletu, ale aj akejkol'vek zlomeniny (Johnell et al., 2005).

Röntgenové vyšetrenie

Známky osteoporózy sa pri röntgenovom vyšetrení objavujú až pri strate približne 30 % kostnej hmoty, čo umožňuje len neskorú diagnostiku. RTG vyšetrenie má však významné miesto v odhaľovaní zlomenín stavcov, kde prejavy vertebrálnej fraktúry sú prítomné niekoľko týždňov po bolestivej príhode (Šteňová et al., 2008b). Prínos má toto vyšetrenie aj pri vylúčení sekundárnych príčin osteoporózy, napr. pri nádoroch (Ďurišová, 2004). Vyšetrenie sa však odporúča, pretože už bočný röntgenový snímok Th a L chrbtice dokáže mnoho degeneratívnych zmien. Predozadný RTG snímok proximálnej časti femuru dokáže

určiť kvalitu a distribúciu architektúry špongióznej kosti, trochanteru a krčka femuru (Broulík, 1999).

Ultrazvukové techniky

Pri ultrasonodenzitometrii sa pomocou ultrazvukových vln z pulzného generátora meria rýchlosť priechodu ultrazvuku kostným tkanivom (VOS) a širokopásmové zoslabenie ultrazvuku v kosti (BUA). VOS je odrazom denzity a elasticity kosti a BUA udáva mieru denzity a štruktúry špongióznej kosti (Broulík, 1999). Ultrazvukové techniky vypovedajú nielen o obsahu kostného minerálu, ale aj o niektorých funkčných vlastnostiach kosti (Blahoš et al., 2006). Ultrazvukové meranie kostnej denzity sa vykonáva na päte, lebo 90 až 95 % jej objemu tvorí špongiózna kosť (Broulík, 1999).

Kvantitatívna počítačová tomografia (QCT)

QCT dokáže trojrozmerné určiť skutočnú objemovú hustotu (v jednotkách mg/cm^3) kompaktnej aj špongióznej kosti na ktoromkoľvek mieste skeletu. Kvôli vysokej citlivosti špongióznej kosti v oblasti chrbtice, a jej významu pre pevnosť chrbtice, sa QCT využíva prevažne na určenie kostnej hustoty vo vertebrálnej oblasti chrbtice (Hoonpongsimanon et al., 2005).

Histomorfometria

Biopsia z bedrovej kosti sa vykonáva nielen pre diagnostiku osteoporózy, ale aj pre výskumné účely. Najčastejšie sa sleduje proces straty špongióznej kosti z hľadiska straty kostného tkaniva bez sledovania rozloženia v priestore alebo mikroskopickej štruktúry (Parfitt et al., 1983). Histomorfometria je považovaná za veľmi cenný a dobre hodnotiteľný nástroj klinických štúdií a výskumu patogenézy kostných ochorení ako aj pre definovanie mechanizmov, ako pôsobia lieky na kosť (Kulak a Dempster, 2010).

1.4 MARKERY KOSTNEJ REMODELÁCIE

Kosť je neustále remodelovaná v cyklickom procese, v ktorom osteoklasty resorbujú kostné tkanivo a osteoblasty produkujú novú kostnú matrix, ktorá je ďalej mineralizovaná (Bonnick a Shulman, 2006). Zvýšenie kostného obratu je považované za možný rizikový faktor osteoporotickej zlomeniny, lebo môže urýchliť stratu kosti a spôsobiť porušenie mikroarchitektúry kostného tkaniva (Rosen et al., 2005).

Aby sa posúdila aktivita procesov prebiehajúcich v kosti, je nutné stanoviť biochemické parametre – kostné markery. Informujú o novotvorbe kosti alebo o jej odbúravaní.

Posúdením jednotlivých faktorov sa dokáže už v skorom štádiu odhaliť doba, kedy je potrebné začať s prevenciou osteoporózy (ešte aj pred prejavmi zmien na kostiach) (Ďurišová, 2004).

Sledovanie kostných markerov je tiež dôležité pri monitorovaní anti-resorpčnej terapie založenej na zmenách v BMD a kostnom obrate (Bonnick a Shulman, 2006).

Hodnoty niektorých kostných markerov sa zvyšujú po menopauze (Delmas, 2000). Kombinovaný prístup využívajúci BMD s ukazovateľmi kostného obratu teda môže zlepšiť predikciu zlomenín u postmenopauzálnych žien (Kanis et al., 2005).

1.4.1 Markery kostnej formácie

Markery kostnej formácie sú priame alebo nepriame produkty aktívnych osteoblastov tvorené počas ich diferenciačnej fázy a vývoja. Sú vyjadrením osteoblastickej činnosti a kostnej formácie. Markery kostnej formácie sa merajú v sére alebo plazme (Delmas et al., 2000).

Alkalická fosfatáza (ALP) – je enzým, ktorý je dôležitý pri formovaní osteoidu a pri mineralizácii. Hladina celkového sérového ALP pozostáva z niekoľkých dimerických izoformiem (Delmas et al., 2000). Nachádza sa v plazmatickej membráne osteoblastov kostí a v rôznych tkanivách ako pečeň, tenké črevo, slezina, obličky a placenta (Singer a Eyre, 2008). U dospelého človeka s normálnou činnosťou pečene, približne 50 % celkovej aktivity ALP pochádza z pečene a približne 50 % vzniká v kostiach (Delmas et al., 2000).

Osteokalcín (OC) – je hydroxyapatit viažuci proteín. Syntetizovaný je osteoblastmi, odontoblastmi a v menšej miere chondrocytmi. Obsahuje tri zvyšky kyseliny gama-karboxyglutámovej (Gla) (Gundberg a Nishimoto, 1999). Preto je nazývaný aj kostný Gla-proteín (BGP, Bone Gla-Protein) (Stančíková et al., 1997). Sérový osteokalcín je považovaný za špecifický marker funkcie osteoblastov, lebo jeho úroveň koreluje s rýchlosťou kostnej formácie (Gundberg a Nishimoto, 1999).

Terminálne propeptidy typu I prokolagénu – viac ako 90 % organickej kostnej hmoty pozostáva z typu I kolagénu, ktorý je syntetizovaný v kosti. Typ I kolagén je odvodený od typu I prokolagénu, ktorý je syntetizovaný fibroblastmi a osteoblastmi (Stavný, 2011). Počas osteoformácie a syntézy kolagénu, sú od prokolagénu I odštiepené peptidy z amino-aj karboxy-terminálneho konca svojej molekuly (Zafeirakis, 2010). Tieto propeptidy (PINP, PICP) sú odstraňované špecifickými proteázami počas konverzie prokolagénu na kolagén, ktorý je následne inkorporovaný do kostnej matrix (Stavný, 2011).

1.4.2 Markery kostnej resorpcie

Väčšina biochemických markerov kostnej resorpcie sú produkty degradácie kostného kolagénu, ale aj nekolagénne proteíny ako kostný sialoproteín, alebo tartarát-rezistentná kyslá fosfatáza (Delmas et al., 2000).

Hydroxyprolín a Hydroxylyzín – hydroxyprolín predstavuje 12 – 14 % všetkých aminokyselín obsiahnutých v kolagéne. 10 % hydroxyprolínu sa odbúrava počas kostnej resorpcie a uvoľňuje do moču (Delmas et al., 2000).

Hydroxylyzínové glykozidy sú neoddeliteľnou súčasťou kostného kolagénu a vyskytujú sa v dvoch formách: glykozyl-galaktozyl-hydroxylyzín a galaktozyl-hydroxylyzín. Počas degradácie kolagénu sú uvoľňujú do cirkulácie (Delmas et al., 2000).

Pyridinolín (PYD) a Deoxypyridinolín (DPD) – typ I kolagén pozostáva z dvoch $\alpha 1$ a jednej $\alpha 2$ molekuly usporiadaných do trojitej závitnice. Na amino- a karboxy-terminálnom konci sú nehelixové časti – telopeptidy. Telopeptid jednej molekuly kolagénu je spojený s príslušnou molekulou priečnoväzbovými molekulami PYD a DPD (Vesper et al., 2004). Formované sú počas extracelulárneho dozrievania fibrilárneho kolagénu a uvoľňované cez degradáciu zrelého kolagénu. Kým PYD bol nájdený v chrupke, kosti, väzive a cievach, DPD sa nachádza len v kostiach a dentíne (Delmas et al., 2000).

Tartarát rezistentná kyslá fosfatáza (TRAP) – kyslá fosfatáza je lyzozomálny enzým nachádzajúci sa v kostiach, prostate, krvných doštičkách, erytrocytoch a slezine. Z piatich izoformiem je kyslá fosfatáza v kostiach rezistentná proti tartarátu. TRAP môže byť meraná v plazme alebo sére (Watts, 1999). Stanovenie katalytickej aktivity TRAP v krvnom sére umožňuje spoznať osteoklastickú aktivitu, lebo je vylučovaný bunkami počas kostnej resorpcie (Topic et al., 2004).

Terminálne telopeptidy typu I kolagénu – C-terminálne (ICTP, CTx) a N-terminálne (INTP, NTx) – metódy na určenie markerov resorpcie v moči a sére boli vyvinuté pomocou protilátok proti telopeptidom helikálnej štruktúry molekuly kolagénu. NTx aj CTx sú 8 aminokyselinové epitopy odvodené od N-telopeptidu a C-telopeptidu typu I kolagénu. Ich odštiepenie od kolagénu I zapríčiňuje katepsín K a rýchlosť ich uvoľnenia z kosti poskytuje užitočný prehľad o resorpčnej aktivite osteoklastov (Hermann a Seibel, 2008).

1.5 STEROIDNÉ HORMÓNY A KOSŤ

1.5.1 Estrogény

Estrogény vykonávajú rozmanité biologické funkcie ako sú ženská sexuálna diferenciácia a vývoj, arteriálna vazodilatácia, zachovanie hustoty kostnej hmoty a pôsobia neuroprotektívne (Kumar et al., 1987). Približne 95 % cirkulujúceho estradiolu je produkovaných dominantnými ovariálnymi folikulmi a *corpus luteum*, zatiaľ čo sérový estrón je produkovaný konverziou z estradiolu a premenou z periférneho androstendiónu (Clarke a Khosla, 2010).

Efekt estrogénov na kosť a kalciovú homeostázu je komplexný. Majú inhibičný vplyv na kostnú resorpciu – bránia proresorpčnému účinku viacerých faktorov (parathormón, tyreoidálne hormóny, ťažké kovy) (Payer et al., 2006). Jedným z účinkov estrogénov na kosť je ich kompetícia s parathormónom (PTH). Pri nedostatku estrogénov sa zvyšuje citlivosť kostného tkaniva na PTH. PTH a kalcitriol zvyšujú tvorbu interleukínu 6, ktorý pri nedostatku estrogénov u jedincov podporuje vznik a tvorbu osteoklastov z preosteoklastov (Broulík, 1999). Estrogény stimulujú proliferáciu osteoblastov *in vitro* a ovplyvňujú zvýšenie syntézy kolagénu I v osteoblastoch a estrogény tiež uvoľňujú z osteoblastov faktory (TGF β , IGF-I, kolagén a nekolagénne proteíny), ktoré inhibujú aktivitu osteoklastov (Broulík, 1999).

Estrogény stimulujú génovú expresiu rastového faktora TGF β , ktorý inhibuje osteoklastickú novotvorbu. Estrogény regulujú aj produkciu prostaglandínov, ktoré ovplyvňujú tvorbu a účinnosť cytokínov (Payer et al., 2006). Stimulujú tiež produkciu osteoprotegerínu v osteoblastoch a inhibujú produkciu RANKL, a tým inhibujú aj osteoklastogenézu (Kmečová, 2008). Okrem spomínaných priamych účinkov na kosť vedie nedostatok estrogénov i k zásahu do rovnováhy vápnik-fosfátového metabolizmu (Payer et al., 2006).

Receptory estrogénov, podobne ako iných steroidných hormónov, sú molekuly proteínov prítomné v cytosole. Na rozdiel od receptorov peptidových hormónov, prítomných na bunkovom povrchu, receptory steroidných hormónov sú závislé na ligandoch. Až po pripojení ligandu, receptory dimerizujú a sú premiestnené do jadra bunky, kde spolu s množstvom transkripčných aktivátorov a represorov indukujú alebo inhibujú transkripciu génov (Lerner, 2006).

Sú známe dva typy estrogénových receptorov (ER), ER α a ER β . Hoci sú geneticky odlišné, oba receptory majú značne podobné ligandy v DNA-väzbovej doméne (Kuiper et

al., 1996). ER α sa nachádza ako u osteoblastov, tak aj u osteoklastov. ER β je častý v epiteliálnom a mezenchymálnom tkanive, vrátane osteoblastov. Jeho prítomnosť v osteoklastoch je však kontroverzná (Lerner, 2006).

1.5.2 Androgény

Androgény sú steroidy vylučované predovšetkým semenníkmi a nadobličkami (Riggs et al., 2002). Androgény indukujú mužskú pohlavnú diferenciáciu ešte pred narodením a pohlavné dozrievanie počas puberty. V dospelosti zachovávajú funkčnosť mužského pohlavného systému, vrátane spermatogenézy. Androgény zabezpečujú aj funkcie v iných cieľových orgánoch vrátane svalového tkaniva, kardiovaskulárneho, centrálného nervového a imunitného systému, a tiež v kostiach (Tenover, 1999).

Hlavným mužským pohlavným hormónom je testosterón. Prekursorom pre jeho syntézu je cholesterol, prípadne androstendión, uvoľňovaný kôrou nadobličiek. Testosterón je produkovaný v hladkom endoplazmatickom retikule Leydigových buniek semenníkov. Mimo nich sa v menšej asi 5 % produkuje aj v kôre nadobličiek, pečeni, obličkách a v tukovom aj svalovom tkanive (Bidingmaier et al., 1986). Približne 99 % celkového plazmatického testosterónu je viazaných na albumín, erytrocyty, no hlavne na transportný proteín steroidných hormónov (SHBG) (Diver et al., 2003). V periférnych tkanivách môže byť nevratne premenený enzýmom 5 α -reduktázou na silnejší 5 α -dihydrotestosterón (DHT). Receptory androgénov môžu byť aktivované cez testosterón aj DHT. Testosterón môže byť enzýmovým komplexom konvertovaný na estradiol (E2) (Vanderschueren et al., 2004).

Dehydroepiandrosterón (DHEA) a androstendión sú cirkulujúce androgény z nadobličiek ako u mužov aj u žien (Orwoll, 1996). Pokles koncentrácie sérového DHEA s vekom (o 10 % za dekádu) je spojený s rôznymi ochoreniami súvisiacimi s vekom a starnutím ako sú diabetes mellitus, obezita, kardiovaskulárne choroby a osteoporóza (Watson et al., 1996).

Androgénne hormóny a hlavne testosterón sú považované za významné látky, ktoré priamo prispievajú k regulácii kostnej novotvorby u mužov, lebo ich nedostatok vedie k úbytku celkovej kostnej hmoty (Stepan et al., 1989). Efekt testosterónu na kostné tkanivo je čiastočne spôsobený konverziou na estrogén, avšak vzhľadom k prítomnosti androgénnych receptorov na mnohých kostných bunkách (aktívne osteoblasty v mieste novotvorby kostnej matrix, osteocyty, bunky strómy odvodené z kostnej drene, miesta kortikálnej a dezmozogénnej tvorby kostnej matrix, chondrocyty v epifýzach, dreňové mononukleárne

bunky a bunky cievneho endotelu, osteoklasty) je jasné, že tieto látky hrajú významnú úlohu v regulácii kostnej novotvorby (Orwoll, 2001).

Chirurgická alebo chemická sterilizácia muža vyvolá kompletný a náhly pokles hladiny jeho pohlavných hormónov (Smith, 2002). Z údajov Swerdloffa a Wanga (1993) vyplýva, že aj ďalšie prípady hypogonadizmu u mužov (dysfunkcia hypotalamu, mentálna anorexia, Klinefelterov syndróm) sú spojené s nízkou BMD a zvýšeným rizikom zlomenín. Podľa meraní biochemických markerov sa zvyšuje kostný obrat. Hustota kostnej hmoty v lumbálnej oblasti chrbtice klesne počas jedného roka od porušenia funkcie o 5 až 10 % (Maillefert et al., 1999).

1.5.3 Cytochróm P450 a biotransformácia steroidných hormónov

Cytochróm P450

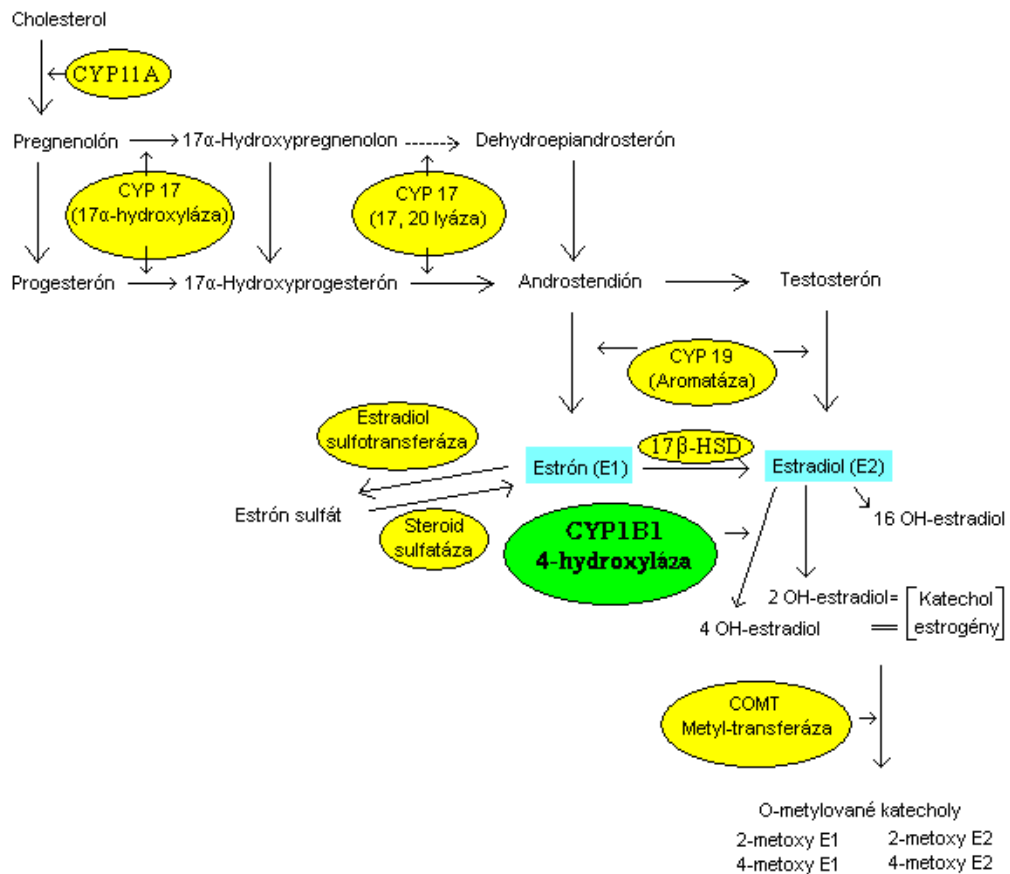
Cytochróm P450 predstavuje superrodinu hemtiolátových enzýmov (Porter a Coon, 1991) s aktivitou typickou pre monooxygenázy (Estabrook, 2003). Cytochrómy P450 (CYP) sú v organizme zodpovedné predovšetkým za reakcie I. fázy biotransformácie chemických látok, vedúcich k ich detoxikácii a po reakciách II. fázy biotransformácie k ich eliminácii z buniek a exkrécii z organizmu. Sú to enzýmy, ktoré katalyzujú oxidačné, peroxidačné a redukčné reakcie začlenené do metabolickej transformácie liečiv, environmentálnych chemikálií, ale aj látok prírodných alebo endogénnych (Spatzenegger a Jaeger, 1995). Cytochróm P450 sa zúčastňuje biosyntézy endogénnych látok ako sú steroidy a hormóny. V ľudskom tele sa vyskytujú hlavne v pečeni, významné sú hladiny v pľúcach, obličkách, tenkom čreve, koži, mozgu a nadobličkách. V bunkách sú lokalizované prevažne v membránach hladkého endoplazmatického retikula, niektoré v membránach mitochondrií (Stiborová et al., 1999).

Popísaných bolo 500 izoenzýmov P450, ktoré patria do 74 rodín. 14 z nich sú cicavčie rodiny a tieto obsahujú 26 podrodín. V ľudskom organizme bolo identifikovaných 43 foriem cytochrómu P450 (Nelson et al. 1996). Z pečňových cytochrómov P450 sú v procese metabolizmu cudzorodých látok najvýznamnejšie izoenzýmy CYP1A2, CYP2A6, CYP2D6, CYP2C. U ľudí CYP2A6 tvorí až 4 % celkového P450. Metabolizuje substráty významné pre ľudské zdravie ako sú nikotín, nitrosamíny alebo kumarín. CYP2B6 sa podieľa na aktivácii niektorých karcinogénov. CYP11 sú lokalizované v mitochondriách a iné formy (CYP17, CYP19, CYP21) v mikrozómoch. Reakcie, ktoré

tieto enzýmy katalyzujú, pomáhajú udržať steroidné látky v organizme na optimálnej hladine (Stiborová et al, 1999).

Biotransformácia steroidných hormónov

Estrogény sa môžu vďaka vysokej aktivite aromatázy v kosti vytvárať u žien aj mužov priamo v kostnom tkanive z androgénov. Cieľové tkanivo musí byť na estrogény citlivé (Broulík, 1999). Priemerná koncentrácia estrogénových receptorov v kultúre ľudských osteoblastov je dvojnásobná v porovnaní s priemernou koncentráciou androgénových receptorov (Colvard et al., 1989). Biosyntéza estrogénov z cholesterolu zahŕňa sériu enzymatických krokov (obr. 5). CYP11A katalyzuje vznik pregnenolónu z cholesterolu. 17 α -hydroxyláza (CYP17) je zodpovedná za hydroxyláciu pregnenolónu na 17 α -hydroxypregnenolón a progesterónu na 17 α -hydroxyprogesterón, ktoré sú následne konvertované 17,20 lyázou (CYP17) na dehydroepiandrosterón a androstendión (Yanase et al., 1991).



Obr. 5 Metabolizmus steroidných hormónov

Aromatáza (CYP19) je zložkou cytochróm P450 enzýmového systému, ktorý je zodpovedný za premenu androgénov na estrogény. Tento enzým je kódovaný CYP19A1 génom. Regulácia hladiny a aktivity aromatázy určuje hladinu estrogénov, ktoré majú endokrinné, parakrinné aj autokrinné účinky na cieľové tkanivá vrátane kostí. Je preukázané, že aktivita aromatázy a produkcia estrogénov sú nevyhnutné pre pozdĺžny rast kostí, dosiahnutie maximálnej kostnej hmoty, uzatvorenie epifýz a normálnu remodeláciu u mladých jedincov (Gennari et al., 2011).

Estrón (E1) je konvertovaný na účinný estradiol pomocou 17 β -hydroxysteroid dehydrogenázy (17 β -HSD) (Kristensen a Borresen-Dale, 2000).

U premenopauzálnych žien, vaječníky a nadobličky sú hlavným zdrojom estradiolu (Siiteri, 1987). U postmenopauzálnych žien, vaječníky zastavujú produkciu estrogénov a cirkulujúce neaktívne steroidy ako sú androstendión, testosterón a estrón sulfát sa považujú za hlavné substrátové prekurzory lokálnej produkcie estrogénov (Miki et al., 2002). V pečeni prebieha transformácia estradiolu približne z 80 % na 2-hydroxyestradiol a z 20 % na 4-hydroxyestradiol (Weisz et al., 1992).

Pre 2-hydroxyláciu estradiolu preukazujú katalytickú aktivitu skôr CYP1A1, CYP1A2 a CYP3A4, kým CYP1B1 vykazuje katalytickú aktivitu výlučne pre 4-hydroxyláciu estradiolu (Lee et al., 2003). Keďže u ľudí je v prsníku a maternici úroveň expresie CYP1B1 vysoká, 4-hydroxylácia je hlavnou cestou pre estradiol (Hayes et al., 1996).

4-hydroxyestradiol a 2-hydroxyestradiol môžu prejsť metabolickým redox cyklom, kedy vytvárajú voľné radikály a reaktívne medziprodukty semiquinóny a quinóny (Li et al., 1995).

Ku expresii ľudských CYP1B1 mRNA a proteínov dochádza v mimopečerňových tkanivách ako sú pľúca, obličky a tiež v cieľových tkanivách estrogénov vrátane prsníka, maternice a vaječníkov (Tang et al., 1999).

1.6 GENETIKA OSTEOPORÓZY

Je dlho známe, že genetické faktory zohrávajú dôležitú úlohu v patogenéze osteoporózy (Gueguen et al., 1995). Hoci genetické vplyvy sú zvyčajne nevýrazné, ich dopady sú rozsiahle, lebo ovplyvňujú veľkú časť širokej verejnosti (Gong a Haynatzki, 2002).

Je známych niekoľko metód na identifikáciu génov bežných ochorení (Gong a Haynatzki, 2002).

Väzbové analýzy testujú či fenotypový lokus je odovzdávaný spolu s genetickým markerom známej chromozomálnej pozície (Liu et al., 2003). Väzbové analýzy v rámci genómu (GWL studies) so štúdiami rodín skúmajú či sú markery mikrosatelitov rozmiestnených rovnomerne po celom ľudskom genóme v spojení v fenotypovom prejave. Na rozdiel od asociačných štúdií, je GWL prístup veľmi rozsiahly s ohľadom na miešanie populácií a stratifikáciu. Keďže táto metóda sa nespolieha na väzby medzi génmi alebo znakmi v susedných oblastiach genómu, je to sľubný prístup na identifikovanie oblastí genómu prispievajúcich ku relatívne veľkým odchýlkam v zložitých procesoch, lebo nevyžaduje predchádzajúce znalosti o dôležitosti danej oblasti genómu (Xu et al., 2010). Pri väzbových analýzach sa odhaľujú oblasti chromozómov, kde sa nachádzajú lokusy regulujúce kvantitatívne znaky (QTL) (Williams a Spector, 2007). Identifikovalo sa už niekoľko lokusov v asociácii s osteoporózou na každom ľudskom chromozóme. Bolo nájdených viac ako 200 kandidátskych génov ovplyvňujúcich toto ochorenie (Huang et al., 2003; Liu et al., 2006), ale presné genetické pozadie a interakcie medzi jednotlivými génmi ako aj medzi génmi a prostredím alebo spôsobom životného štýlu (Kitamura et al., 2007) sú stále veľmi málo objasnené (Xiong et al., 2006). Niektoré oblasti chromozómov, u ktorých sa dokázala asociácia so zmenami BMD sú uvedené v tabuľke 2.

Dedičné štúdie nám podávajú dôkaz aj o významnosti genetických vplyvov na iné kľúčové činitele pri riziku vzniku osteoporotickej zlomeniny, ako sú kvantitatívne ultrazvukové vlastnosti kosti, geometria krčka stehrovej kosti (Arden et al., 1996), sila svalov (Arden a Spector, 1997), markery kostného obratu (Hunter et al., 2001), a index telesnej hmotnosti (Kaprio et al., 1995).

Jeden z najdôležitejších činiteľov pôsobiacich pri strate kostného tkaniva u žien je nedostatok estrogénov v menopauze. Štúdie tiež naznačujú, že vek nástupu menopauzy je podmienený geneticky (Snieder et al., 1998).

Na rozdiel od štúdií kandidátskych génov, kedy sa vyberie gén na základe známych mechanizmov ochorenia alebo podozrenia na ochorenie, v asociačnej štúdií v rámci genómu (GWA studies) sa určí genotyp rozsiahlemu počtu osôb s ohľadom na veľké množstvo genetických markerov, ktoré vo forme SNP pokrývajú celý genóm. Následne sa pri tejto metóde môžu určiť úplne nové gény/genómové lokusy s malým účinkom na ľudské ochorenie (Hirschhorn et al., 2005).

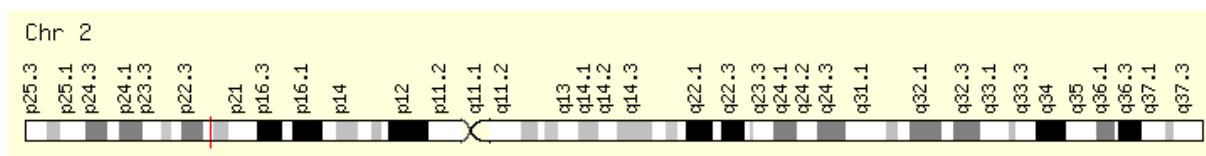
Tabuľka 2 QTL v asociácii s BMD u ľudí

| BMD | Oblasť na chromozóme | Odkaz |
|--|---|-----------------------|
| BMD v oblasti lumbálnej chrbtice | 1q42-43 11q12-13 12q23-24 17q21-23 21q22 22q11 | Kaufman et al., 2008 |
| | 1q36 | Willaert et al., 2008 |
| | 15q13 | Yan et al., 2009 |
| BMD v oblasti krčka stehnovej kosti | 5q31-33 13q12-14 | Kaufman et al., 2008 |
| Maximálne BMD pre oblasť bedrovej kosti | 12p12 15q26 | Zhang et al., 2008 |
| Maximálne BMD pre oblasť zápästia | 2p13 Xq27 | Zhang et al., 2008 |

Risch a Merikangas (1996) tvrdia, že asociačné štúdie sú účinnejšie ako analýza rodokmeňov v hľadaní zodpovedných génov. Morton a Collins (1998) tiež preukázali, že asociačné štúdie s nezávislými subjektmi sú viac efektívne ako rôzne typy neparametrických testov ako sú súrodenecké štúdie.

1.6.1 Gén CYP1B1

Produkt génu CYP1B1 je dôležitý estrogén metabolizujúci enzým (Wen et al., 2005), a je hlavný CYP1B1 enzým zodpovedný za katalýzu vzniku 4-hydroxyestradiolu (Kristensen a Borresen-Dale, 2000). Gén CYP1B1 je dlhý 8 546 bázových párov (GeneCards – CYP1B1 GC02M038206, 2011) a lokalizovaný je na chromozóme 2 v oblasti p21-p22 (obr. 6). Obsahuje tri exóny, celá kódujúca sekvencia génu je však obsiahnutá v exóne 2 a 3 (Tang et al., 1996).



Obr. 6 Chromozóm 2 a označenie lokalizácie génu CYP1B1 (červená čiarka) (GeneCards – CYP1B1 GC02M038206, 2011)

V polymorfizme Leu432Val, pri transverzii G za C na exóne 3 bola zaznamenaná substitúcia Leucínu (CTG) za Valín (GTG) na kodóne 432 (Stoilov et al., 1998). Táto záměna spôsobí vznik restriekčného miesta pre enzým *Eco57I*. Laboratórne štúdie dokazujú dôležitú úlohu CYP1B1 v metabolickej aktivácii estrogénov (Zheng et al., 2000). Aminokyselinová záměna Leu/Val je spojená so zvýšenou katalytickou aktivitou CYP1B1 (Landi et al., 2005; Shimada et al., 1999). Podľa Aklillu et al. (2002) substitúcia leucínu môže ovplyvniť aktivitu proteínu len v prítomnosti iných CYP1B1 polymorfizmov. De Vivo et al. (2002) so 456 postmenopauzálnymi ženami dokázali, že ženy s Val/Val genotypom mali signifikantne nižšie hladiny estradiolu v porovnaní s inými genotypmi. Napoli et al. (2009) u postmenopauzálnych Amerických žien zistili, že tie, ktoré mali Leu alelu, mali signifikantne zvýšené hladiny estrogénových metabolitov, z čoho sa dá usudzovať zvýšený estrogénový katabolizmus a zároveň mali signifikantne nižšiu kostnú hustotu v oblasti chrbtice a krčka stehrovej kosti.

Quan (2007) u japonských žien po menopauze s diagnostikovanou osteopéniou alebo osteoporózou preukázal asociáciu medzi Leu432Val polymorfizmom s rýchlosťou zmeny S-BMD v priebehu hormonálnej substituenej liečby.

Tranzícia Arginínu za Glycín, Arg48Gly má za následok zvýšenú expresiu génu CYP1B1 (Landi et al., 2005; McLellan et al., 2000), bez zmien v katalytických vlastnostiach ak nie je v kombinácii s inými funkčnými alelami (Bandiera et al., 2005).

Mutácia Asn453Ser bola sledovaná so znížením v expresii proteínu v dôsledku zvýšenia CYP1B1 degradácie (Bandiera et al., 2005).

Kým v haplotype CGG sú alela C v CYP1B1 Arg48Gly a G alely v CYP1B1 Ala119Ser a CYP1B1 Val432Leu spojené s vyššou hladinou estrónu a estradiolu, haplotyp GTC obsahujúci v lokuse alternatívne alely bol spojený s ich nižšou hladinou (Kristensen et al., 2006).

Long et al. (2006) sledovali polymorfizmy Arg48Gly, Ala119Ser a Leu432Val s vekom nástupu menopauzy. Pri Arg48Gly, u žien s alelou Gly nastúpila menopauza signifikantne neskôr ako u žien bez tejto alely. Alela Ser z polymorfizmu Ala119Ser bola spojená s oneskoreným nástupom o 0,9 roka. Pre ženy alela Val z polymorfizmu Leu432Val znamenala o rok kratšie reprodukčné obdobie v porovnaní so ženami bez tejto alely.

Varianty enzýmov, ktoré vzniknú po aminokyselinových záměnach (Tab. 3) preukazujú 2,4 až 3,4 krát vyššiu katalytickú aktivitu ako pôvodné enzýmy (Hanna et al., 2000; Shimada et al., 1999).

Tabuľka 3 Sledované polymorfizmy génu CYP1B1

| Polymorfizmus | SNP Identifikácia | Lokalizácia | Nukleotidová zámena | Pozícia na proteíne | Aminokyselinová zámena |
|---------------|-------------------|-------------|---------------------|---------------------|------------------------|
| Arg48Gly | rs10012 | Exón 2 | C→G | 48 | Arg→Gly |
| Ala119Ser | rs1056827 | Exón 2 | G→T | 119 | Ala→Ser |
| Leu432Val | rs1056836 | Exón 3 | C→G | 432 | Leu→Val |
| Asn453Ser | rs1800440 | Exón 3 | A→G | 453 | Asn→Ser |

Salinas-Sánchez et al. (2011) sledovali genotypy CYP1B1s renálnym karcinómom. Pri polymorfizme Ala119Ser zistili, že homozygoti s alelou Ala majú dvojnásobne vyššie riziko pre toto ochorenie v porovnaní s nositeľmi ostatných genotypov.

Polymorfizmy v géne CYP1B1 zapríčiňujú vznik enzýmov, ktoré môžu spôsobovať rakovinu prsníka (Kristensen a Borresen-Dale, 2000).

Rylander-Rudqvist et al. (2004) sledovali asociáciu genotypov Arg48Gly, Ala119Ser, Leu432Val a Asn453Ser s rizikom vzniku postmenopauzálnej rakoviny endometria. Nenašli žiadny dôkaz pre asociáciu medzi CYP1B1 genotypmi a rizikom vzniku rakoviny.

Pastina et al. (2010) vo svojej štúdií skúmali vplyv polymorfizmov génu CYP1B1 na rakovinu prostaty. Polymorfizmus Leu432Val sa ukázal ako možný marker predpovedajúci reakciu a klinické výsledky docetaxelu u týchto pacientov a predstavuje možný nástroj liečby.

1.7 LIEČBA OSTEOPORÓZY

Prevenčia

Keďže najlepšou liečbou je prevencia, malo by sa s ňou začať už v ranom veku. Cieľom primárnej prevencie v priebehu rastu a dospievania by malo byť nadobudnutie čo najväčšieho množstva kostnej hmoty adekvátnym príjmom vápnika a cvičením. Dôležitá je aj včasná diagnostika ochorenia a liečba existujúcich skeletálnych deformít (Karlsson, 2004; Rittweger, 2006). Pri sekundárnej prevencii sa identifikujú jednotlivci s nízkou kostnou hustotou a viac ako jedným rizikovým faktorom pre osteoporotickú zlomeninu (Boonen et al., 2006) a dôležité je tu spomalenie straty kostnej hmoty (Klabník, 2007). Terciárna prevencia je zameraná na ochranu pred budúcimi zlomeninami u ľudí s osteoporózou, ktorí už utrpeli zlomeninu. Zahŕňa zmenu životossprávy, farmakologickú liečbu a stratégie na ochranu pred pádmi (Schrager, 2003).

Základom terapeutických postupov osteoporózy je úprava životného štýlu s dostatkom pohybu a primeraná životospráva (Blahoš et al., 2006).

Fyzická aktivita

Pravidelné **fyzické cvičenie** zamerané na spevňovanie svalov spomaľuje fyziologický úbytok kostnej hmoty, ku ktorému dochádza s pribúdajúcim vekom. Pre seniorov je cvičenie obzvlášť prospešné, lebo pri zlepšení svalovej kondície a získaní koordinácie sa znižuje riziko pádov (Mithal a Malhotra, 2006).

Správna výživa

Ďurišová (2004) udáva ako základnú podmienku úspešnej liečby správnu výživu. Mal by to byť predovšetkým dostatočný prívod **vápnika**, ako hlavného minerálu pri výstavbe kosti. Ďalším predpokladom je dostatok **vitamínu D**, hlavne jeho aktívnych foriem (Ďurišová, 2004). Vitamín D stimuluje aktívny transport vápnika v tenkom čreve a znižuje jeho straty. Zohráva tiež dôležitú úlohu v udržaní zdravej mineralizovanej kostry (Holick, 1996). Spolu s vápnikom je **fosfor** najhojnejší minerál v kostnom tkanive (Raisz, 1990). Približne 85 % fosforu v tele dospelého sa nachádza v kostiach (Institute of Medicine, 1997). Raisz (1990) uvádza, že fosfor je aktívne zahrnutý v regulácii kostnej formácie, a že vysoké koncentrácie fosfátu v bunkovej kultúre inhibujú kostnú resorpciu, zlepšujú kostnú mineralizáciu a syntézu kolagénu. **Horčík** je dôležitý pre činnosť kostných buniek (Rude a Gruber, 2004). Jeho nedostatok zapríčiňuje zastavenie rastu kosti, zníženie osteoblastickej a osteoklastickej aktivity, osteopéniu a lámavosť kosti (Sojka a Weaver, 1995). **Vitamín C** vystupuje ako kofaktor pri syntéze kolagénu (Otsuka et al., 2000), je nevyhnutný pre tvorbu kolagénu a jeho nedostatok je spojený s neprirodzeným vývojom kostí (Simon a Hudes, 2001). **Vitamín K** pôsobí ako koenzým v posttranslačných karboxylačných reakciách dvoch hlavných proteínov kosti, osteokalcínu a matrix Gla-proteínu (Ducy et al., 1996). U postmenopauzálnych žien vitamín K signifikantne zvyšuje reabsorpciu vápnika v obličkách a znižuje riziko fraktúr (Zittermann, 2007).

Medikamentózna liečba

Kalcitonín je telu vlastný hormón, produkovaný C-bunkami štítnej žľazy (Delmas, 2002). Má výrazne pozitívny účinok na zvýšenie kostnej hustoty a zvýšenie kvality kosti. Viaže sa na špecifické receptory na povrchu osteoklastov a znižuje ich aktivitu. Zvyšuje kostnú hustotu hlavne v oblasti stavcov a znižuje riziko fraktúr (Blahoš et al., 2006).

Teriparatid je rekombinant prvých 34 N-terminálnych aminokyselín paratyroidného hormónu, ktorý zlepšuje kostnú mikroštruktúru (Neer et al., 2001). Stimuluje novotvorbu kvalitnej kosti priamym vplyvom na osteoblasty, nepriamo zvýšením absorpcie kalcia v črevách a zvýšením reabsorpcie v tubuloch obličiek. Avšak vo výrazne menšej miere stimuluje aj osteoresorpciu (Klabník, 2007).

Selektívne modulátory estrogénových receptorov (SERM) sú nehormonálne preparáty so selektívnym účinkom na α a β receptory estrogénu (Klabník, 2007). Zvyšujú kostnú hustotu inhibovaním osteoresorpcie a pravdepodobne súčasne zlepšujú kvalitu kosti, čím možno vysvetliť ich veľmi dobrý efekt na zníženie rizika fraktúr (Blahoš et al., 2006).

Bisfosfonáty sú stabilné analógy pyrofosfátov (Adachi a Chole, 1990) a patria k inhibítorm osteoresorpcie (Klabník, 2007). Inhibujú resorpciu kosti redukovaním vývoja a aktivity osteoklastov a tiež bránia zvyšovaniu apoptózy (Harris et al., 1999).

Stroncium ranelát zlepšuje mikroarchitektoniku kompaktnej aj špongióznej kosti a tak zlepšuje jej pevnosť (Klabník, 2007). Stroncium ovplyvňuje kostné bunky a metabolizmus kostného tkaniva *in vitro* aj *in vivo*. Nízke dávky stroncia inhibujú kostnú resorpciu a stimulujú osteoformáciu. Zlúčenina stroncia s kyselinou ranelovou stimuluje replikáciu osteoblastov a súčasne inhibuje diferenciáciu a resorpčnú aktivitu osteoklastov (Blahoš et al., 2006).

2 CIELE PRÁCE

Za cieľ našej rigoróznejšej práce sme si stanovili analyzovanie vplyvu polymorfizmov Arg48Gly, Ala119Ser, Leu432Val a Asn453Ser v kandidátskom géne osteoporózy CYP1B1 na ukazovatele kostného metabolizmu, predovšetkým BMD v oblasti femuru a chrbtice a markery kostnej remodelácie.

Zrealizovanie nášho cieľa si vyžadovalo:

1. Detekciu sledovaných polymorfizmov metódou PCR-RFLP, t.j. optimalizácia PCR reakcie, restriktívnej analýzy produktov PCR (RFLP), elektroforetickú separáciu restriktívnych fragmentov a vyhodnotenie elektroforeogramov;
2. Vyhodnotiť výskyt jednotlivých polymorfizmov v analyzovanej populácii, t.j. vyhodnotiť zastúpenie genotypov, frekvencie alel uvedených génov, posúdenie homogenity frekvencií genotypov pomocou χ^2 -testu;
3. Štatistické vyhodnotenie vplyvu testovaných polymorfizmov vo vzťahu k hustote kostného minerálu (F-BMD a S-BMD) a biochemickým markerom kostnej remodelácie.

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 SLEDOVANÁ POPULÁCIA

Predmetom výskumu boli pacientky ošetrované v rámci základného diagnostického skríningu a liečby na osteoporózu. Výber pacientok bol uskutočnený v spolupráci s Osteocentrom, Špecializovaná nemocnica sv. Svorada v Nitre a Súkromnou ortopedickou ambulanciou v Nitre, pričom boli rešpektované všetky etické a právne normy vyžadované pre priebeh klinického výskumu.

Všeobecná charakteristika testovaného súboru je uvedená v tabuľke 4.

Tabuľka 4 Základná štatistika testovaného súboru

| | N | Minimum | Maximum | Priemer | Stredná chyba priemeru | Smerodajná odchýlka |
|--------------|-----|---------|---------|----------|------------------------|---------------------|
| VEK | 155 | 42 | 86 | 64,35 | 0,66 | 8,26 |
| BMI | | 22 | 31 | 27,42 | 0,12 | 1,49 |
| ALP | | 0,18 | 3,24 | 0,9503 | 0,06751 | 0,8405 |
| OC | | 2,14 | 7,12 | 4,0243 | 0,07796 | 0,9706 |
| CTx | | 321,4 | 1274,1 | 826,6943 | 17,4403 | 217,1295 |
| F-BMD | | -3,1 | -1,4 | -2,1529 | 0,03163 | 0,3938 |
| S-BMD | | -4,2 | -2,4 | -2,8574 | 0,02555 | 0,3181 |

N – počet jedincov; BMI – body mass index; ALP – alkalická fosfatáza ($\mu\text{kat/l}$); OC – osteokalcín ($\mu\text{g/l}$); CTx – beta CrossLaps (ng/l); F-BMD – hustota kostnej hmoty v oblasti krčka *femuru*; S-BMD – hustota kostnej hmoty v oblasti driekovej chrbtice.

V rámci bežného lekárskeho ošetrovania sa pacientky podrobili odberu vzorky krvi a bolo im urobené denzitometrické vyšetrenie. Predmetom analýzy boli pacientky s pozitívnou osobnou alebo rodinnou anamnézou, výsledky laboratórnych vyšetrení boli s negatívnym kostným obratom, RTG snímky dokázali osteoporózu s fraktúrami ale aj bez fraktúr, BMD preukázala štádium osteoporózy (T-skóre bolo nižšie ako $-2,5$). Ženy spĺňali vek od 42 do 86 rokov, postmenopauzálny stav, dovtedy s pravidelnou menštruáciou a u pacientok nebola zaznamenaná obezita (BMI do 31).

Do štúdie neboli zaradené ženy so závažnými internými, endokrinologickými, chronickými a vrodenými ochoreniami, pacientky liečené glukokortikoidmi, hormónmi, imunosupresívami, antikonvulzívami, thiazidmi, pacientky s výraznými abúzami (etylizmus, nikotinizmus, kofeinizmus), ženy so značnými poruchami menštruačného cyklu a tie, ktoré nesúhlasili s analýzou.

3.2 IZOLÁCIA GENÓMOVEJ DNA

Na izoláciu DNA sme použili krv odobratú do roztoku EDTA (0,5 M, pH = 8). Vzorky krvi (po 300 μ l) sme napipetovali do plastových mikroskúmaviek a premývali s 1 ml TE (10 mmol.l⁻¹ Tris-HCl pH = 8,1; 1 mmol.l⁻¹ EDTA) na odstránenie hemoglobínu. Vzorky sme premiešali a centrifugovali 5 min. pri 12 000 ot.min⁻¹. Pipetou sme odobrali supernatant a k peletu sme pridali 1 ml roztoku TE a znova centrifugovali 5 min. pri 12 000 ot.min⁻¹. Po opätovnom odstránení hornej vrstvy s hemolyzovanými erytrocytmi sme postup zopakovali. K usadenine leukocytov sme pridali 300 μ l lyzačného roztoku (100 mmol.l⁻¹ EDTA; 50 mmol.l⁻¹ Tris-HCl pH = 7,5; 1 % SDS) a 3 μ l proteinázy K (20 mg/ml). Vzorky sme dôkladne premiešali a nechali ich inkubovať cez noc pri teplote 60° C. Následne sme DNA purifikovali fenol-chloroformovou metódou (Sambrook et al., 1989), vyžrážaná etanolom a rozpustená v 50 ml vody alebo 10 mM Tris (pH = 8,0). Koncentráciu roztoku DNA sme merali pomocou spektrofotometra (SmartSpec 3000, Bio-Rad) a na základe výsledkov sme roztoky nariedili na výslednú koncentráciu 50 ng/ μ l.

DNA bola izolovaná i pomocou izolačného kitu (SiMax™ Genomic DNA Extraction Kit) založeného na kolónkovej metóde, poskytujúcej vysoké výťažky a čistotu, potrebnú pre úspešnosť následných experimentov. Princíp izolácie spočíva v selektívnej väzbe genomickej DNA v prítomnosti high salt tlmivého roztoku na SiMax™ membránu, ktorá je v centrifugačnej kolónke. Po premývacom kroku je DNA eluovaná TE pufrom alebo vodou bez potreby následnej alkoholovej precipitácie alebo odsolenia. Výhodou použitia izolačného kitu je jeho doba izolácie cca 30 min, pričom následné výťažky DNA z 200 μ l krvi predstavujú koncentráciu DNA cca 10 – 50 ng/ μ l.

3.3 AMPLIFIKÁCIA DNA

Polymerázovú reťazovú reakciu sme uskutočnili s termocyklerom Primus 25/96 (MWG-BIOTECH). Na amplifikáciu špecifických úsekov pri polymorfizmoch Arg48Gly, Ala119Ser, Leu432Val a Asn453Ser génu CYP1B1 sme použili oligonukleotidové primery podľa Wen et al., (2005) uvedené v tabuľke 5.

Tabuľka 5 Použité primery a restriktčné enzýmy sledovaných polymorfizmov

| Polymorfizmus | PCR primery | Restriktčný enzým (teplota, °C) | Alely | Restriktčné fragmenty |
|---------------|----------------------------|---------------------------------|--------------------|-----------------------|
| Arg48Gly | 5'-TAAACCCGCTGTCCATCCA-3' | <i>CpoI</i> (30°C) | Arg (C) | 270, 106 |
| | 5'-GAGTAGTGGCCGAAAGCCAT-3' | | Gly (G) | 376 |
| Ala119Ser | rovnaké ako pri Arg48Gly | <i>NaeI</i> (37°C) | Ala (G) Ser (T) | 314, 62 376 |
| Leu432Val | 5'-CACTGCCAACACCTCTGTCT-3' | <i>AcuI</i> (37°C) | Leu (C) | 187, 107 |
| | 5'-GCAGGCTCATTTGGGTTG-3' | | Val (G) | 294 |
| Asn453Ser | rovnaké ako pri Leu432Val | <i>MwoI</i> (60°C) | Ser (G) Asn (A) | 147, 147 294 |

Použili sme Taq DNA polymerázu (*Invitrogen*) a PCR prebehla v celkovom objeme 20 µl. Reakčná zmes pozostávala z nasledovných zložiek (Tab. 6):

Tabuľka 6 Základné zložky PCR

| Reagent | Výsledná koncentrácia |
|--------------------------------|-----------------------|
| Redestilovaná sterilná voda | - |
| PCR reakčný roztok (10x konc.) | 1x |
| MgCl ₂ (50 mmol/l) | 2,0 mmol/l |
| dNTP mix (2,5 mmol/l) | 0,2 mmol/l |
| DMSO | 10 % |
| Primer 1 (10 pmol/µl) | 0,5 µmol/l |
| Primer 2 (10 pmol/µl) | 0,5 µmol/l |
| Taq DNA polymeráza (5 U/µl) | 1 U |
| Templátová DNA | ~ 50 ng |

Teplotný profil polymerázovej reťazovej reakcie pre sledované polymorfizmy bol nasledovný:

Po 5 minútach denaturácie pri 95 °C bola DNA amplifikovaná počas 35 cyklov v podmienkach:

- denaturácia : 94°C 45s,
- annealing : 60°C 45s,
- polymerizácia : 72°C 45s.

Po poslednom cykle sme polymerizáciu predĺžili na 7 minút pri 72°C.

3.4 RESTRIKČNÁ ANALÝZA PCR PRODUKTU

Veľkosti PCR produktov, použité restriktčné endonukleázy, ich teplotné profily a veľkosti restriktčných fragmentov pre jednotlivé polymorfizmy génu CYP1B1 sú uvedené v tabuľke 5. Štiepenie všetkých PCR produktov prebiehalo cez noc pri uvedených teplotách.

Reakčná zmes pre restriktčnú analýzu polymorfizmov Arg48Gly a Ala119Ser pozostávala z nasledovných zložiek; množstvá pre jednu vzorku, (Tab. 7):

Tabuľka 7 Základné zložky reakčnej zmesi pri restriktčnej analýze; Arg48Gly, Ala119Ser

| | |
|---|-------------|
| Reakčný roztok (10x konc.) | 2 μ l |
| H ₂ O | 2,5 μ l |
| PCR produkt | 15 μ l |
| Enzým <i>CpoI</i> / <i>NaeI</i> (10 U/ μ l) | 0,5 μ l |

Reakčná zmes pre restriktčnú analýzu polymorfizmu Leu432Val pozostávala z nasledovných zložiek; množstvá pre jednu vzorku, (Tab. 8):

Tabuľka 8 Základné zložky reakčnej zmesi pri restriktčnej analýze; Leu432Val

| | |
|----------------------------------|---------------|
| Reakčný roztok (10x konc.) | 2 μ l |
| H ₂ O | 1,975 μ l |
| SAM | 0,025 μ l |
| PCR produkt | 15 μ l |
| Enzým <i>AcuI</i> (5 U/ μ l) | 1 μ l |

Reakčná zmes pre restriktčnú analýzu polymorfizmu Asn453Ser pozostávala z nasledovných zložiek; množstvá pre jednu vzorku, (Tab. 9):

Tabuľka 9 Základné zložky reakčnej zmesi pri restriktčnej analýze; Asn453Ser

| | |
|----------------------------------|------------|
| Reakčný roztok (10x konc.) | 2 μ l |
| H ₂ O | 2 μ l |
| PCR produkt | 15 μ l |
| Enzým <i>MwoI</i> (5 U/ μ l) | 1 μ l |

Reakcie zastavíme pridaním 5 μ l 6x koncentrovaného nanášacieho roztoku (30 % glycerol, 0,1 mol/l EDTA, 0,25 % brómfenolová modrá).

3.5 ELEKTROFORÉZA

Produkty štiepenia sme analyzovali elektroforeticky v agarózovom géle AGAROSE/SFRTM (Amresco), pričom koncentrácia bola závislá od veľkosti separovaných fragmentov. Produkty štiepenia restriktázami sme separovali elektroforeticky v 4 % agarózovom géle.

Roztok agarózy sme pripravili rozpustením príslušného množstva agarózy (Amresco) v Tris – borátovom tlmivom roztoku ($0,089 \text{ mol.l}^{-1}$ Tris, $0,089 \text{ mol.l}^{-1}$ kyselina boritá a $2,5 \text{ mmol.l}^{-1}$ EDTA, pH = 8,3). Zmes sme dôkladne rozvarili a po vychladnutí asi na 50 – 60 °C za stáleho miešania sme pridali 50 μl etídiumbromidu (výsledná koncentrácia bola 0,5 $\mu\text{g/ml}$). Roztok sme následne vyliali na elektroforetickú platňu a nechali polymerizovať 20 minút. Po stuhnutí gélu sme opatrne odstránili hrebeň, gél vložili do elektroforetickej komory a zaliali Tris – borátovým tlmivým roztokom tak, aby roztok presahoval 1 mm nad gél.

Vzorky DNA sme pred nanesením do gélu 1 – 2 sekundy scentrifugovali pri 12 000 ot.min^{-1} . Zmes DNA s nanášacím roztokom (24 μl) sme opatrne naniesli do pripraveného gélu. Elektroforéza bola uskutočnená pri konštantnom napätí 90 V počas 90 min. v elektroforetickej kyvete (Owl Scientific).

Fragmenty DNA sme vizualizovali na UV transiluminátore Bio-Imaging Systems (MiniBis Pro, Izrael) pri vlnovej dĺžke 302 nm. Dokumentáciu gélov sme zabezpečovali systémom GelCapture (Izrael). Z elektroforeogramu boli vyhodnotené genotypy na základe prítomnosti rôzneho počtu fragmentov alebo ich rôznej veľkosti.

3.6 SLEDOVANÉ UKAZOVATELE SPOJENÉ S OSTEOPORÓZOU

Sledované ukazovatele spojené s osteoporózou sme získali zo zdravotnej dokumentácie pacientok s ich súhlasom v anonymnej podobe prostredníctvom ošetrojúceho lekára. Uvedené ukazovatele zahŕňali:

- Alkalická fosfatáza (ALP) – marker osteoformácie
- Osteokalcín (OC) – marker osteoformácie
- Beta-CrossLaps (Beta-CTx) – marker osteoresorpcie

Biochemické markery boli stanovené z krvi pomocou štandardizovaných metód v rámci diagnostiky a liečby pacientov s osteoporózou.

- Hustota kostnej hmoty v oblasti krčka femuru (F-BMD)
- Hustota kostnej hmoty v oblasti driekových stavcov (S-BMD)

Hustota kostnej hmoty bola meraná pomocou denzitometrického merania v jednotkách T-skóre.

3.7 ŠTATISTICKÉ METÓDY

Na výpočet frekvencií výskytu genotypov AA, AB, BB sme použili nasledovné vzorce (1), (2), (3):

$$P = \frac{n_{AA}}{n} \cdot 100 \quad (1) \quad H = \frac{n_{AB}}{n} \cdot 100 \quad (2) \quad Q = \frac{n_{BB}}{n} \cdot 100 \quad (3)$$

kde, P, H, Q sú frekvencie výskytu genotypov AA, AB, BB a n_{AA} , n_{AB} , n_{BB} označujú počty jedincov s príslušným genotypom v n-člennom súbore.

Frekvencie výskytu jednotlivých alel A a B sme počítali podľa vzorcov (4), (5):

$$p = \frac{2n_{AA} + n_{AB}}{2n} \quad (4) \quad q = \frac{2n_{BB} + n_{AB}}{2n} \quad (5)$$

kde p resp. q sú frekvencie alel A resp. B a n_{AA} , n_{AB} , n_{BB} označujú počty jedincov s príslušným genotypom v n-člennom súbore.

Zistené frekvencie genotypov v populácii sme porovnali s teoretickými frekvenciami (očakávanými na základe platnosti Hardyho-Weinbergovho zákona).

Homogenita frekvencií bola posúdená χ^2 testom na základe vzorca (6):

$$\chi^2_N = \sum_{i=1}^k \frac{(P_{ij} - P_{ij}^*)^2}{P_{ij}^*} \quad (6)$$

kde P_{ij} = skutočný počet jedincov s genotypom j

P_{ij}^* = očakávaný počet jedincov s genotypom j

i = počet porovnávaných genotypov (i = 1, 2, ..., k)

N = počet stupňov voľnosti (N = k-1)

Výsledok χ^2 testu:

$\chi^2_{(2; 0,05)} < 5,99 =$ štatisticky nepreukazný rozdiel

$5,99 < \chi^2_{(2; 0,05)} < 9,21 =$ štatisticky preukazný rozdiel na hladine významnosti 0,05 (*)

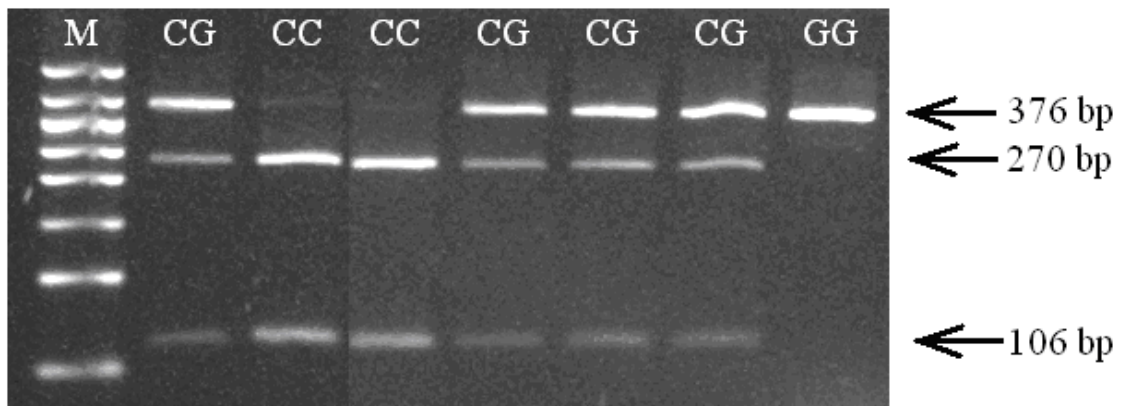
Na spracovanie údajov a štatistické vyhodnotenie sme použili programy Statistica 4.3 (1993), GraphPad (2005) a SPSS v. 8.0 (1997).

Vplyv polymorfizmov vo vybraných génoch vo vzťahu k ukazovateľom osteoporózy bol hodnotený analýzou kovariancie (ANCOVA) pomocou lineárneho modelu (GLM), kde sledovaný ukazovateľ predstavoval závislú premennú a jednotlivé genotypy pevné efekty. Výpočet zahŕňal korekciu na vek a BMI. Rozdiely v distribúcii fraktúr v rámci jednotlivých genotypov boli otestované χ^2 testom.

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

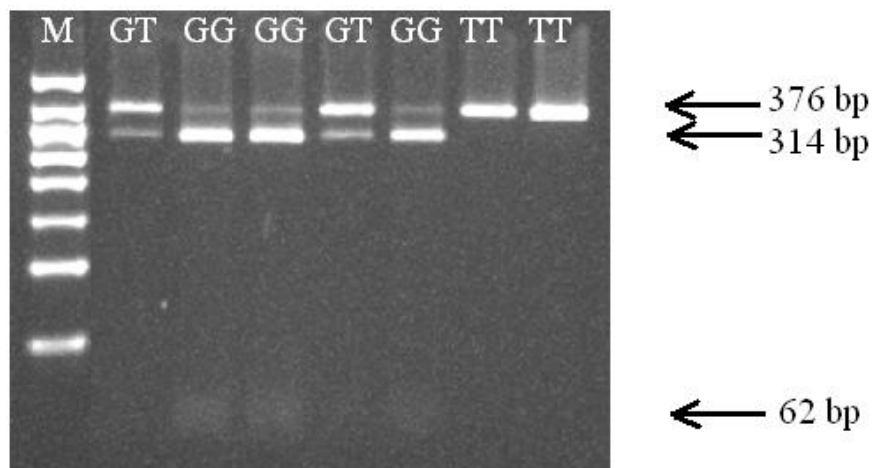
4.1 DETEKCIA ANALYZOVANÝCH POLYMORFIZMOV

Reprezentatívne výsledky detekcie **Arg48Gly** polymorfizmu v CYP1B1 géne sú uvedené na obr. 7. Vo vzorkách s genotypom CC vznikajú dva fragmenty s veľkosťou 270 bp a 106 bp, pri heterozygotoch CG tri fragmenty s veľkosťou 376 bp, 270 bp, 106 bp a v prípade genotypu GG jeden neštiepený fragment s veľkosťou 376 bp.



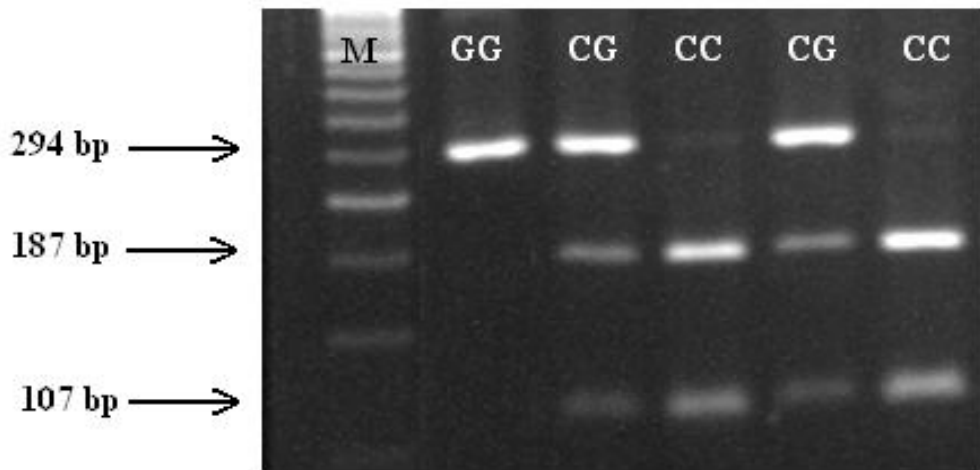
Obr. 7 Reprezentatívne výsledky PCR-RFLP pri detekcii CYP1B1/Arg48Gly polymorfizmu; M – marker 50 bp, CC, CG, GG – jednotlivé genotypy

Výsledky, ktoré reprezentujú detekciu **Ala119Ser** polymorfizmu v CYP1B1 géne sú zobrazené na obr. 8. Vo vzorkách s genotypom GG vznikajú dva fragmenty s veľkosťou 314 bp a 62 bp, pri heterozygotoch GT tri fragmenty s veľkosťou 376 bp, 314 bp a 62 bp a pri homozotytnom genotype TT fragment s veľkosťou 376 bp.



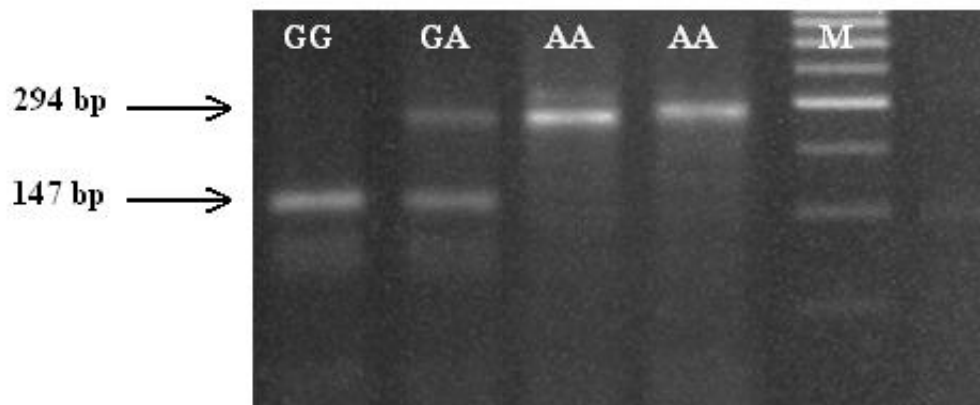
Obr. 8 Reprezentatívne výsledky PCR-RFLP pri detekcii CYP1B1/Ala119Ser polymorfizmu; M – marker 50 bp, GG, GT, TT – jednotlivé genotypy

Detekcia polymorfizmu **Leu432Val** génu CYP1B1 a jej reprezentatívne výsledky sú na obr. 9. Pri genotype GG vzniká jeden neštiepený fragment veľkosti 294 bp. Heteozygotný genotyp CG je zastúpený fragmentmi s veľkosťou 294 bp, 187 bp a 107 bp. Genotyp CC reprezentujú dva fragmenty veľké 187 bp a 107 bp.



Obr. 9 Reprezentatívne výsledky PCR-RFLP pri detekcii CYP1B1/Leu432Val polymorfizmu; M – marker 50 bp, CC, CG, GG – jednotlivé genotypy

Výsledky reprezentujúce detekciu polymorfizmu **Asn453Ser** v géne CYP1B1 sú uvedené na obr. 10. Vo vzorkách s homozygotným genotypom GG vzniká jeden fragment s veľkosťou 147 bp, heterozygotný genotyp GA je zastúpený fragmentmi veľkými 294 bp a 147 bp. Jedným fragmentom s veľkosťou 294 bp je charakteristický genotyp AA.



Obr. 10 Reprezentatívne výsledky PCR-RFLP pri detekcii CYP1B1/Asn453Ser polymorfizmu; M – marker 50 bp, GG, GA, AA – jednotlivé genotypy

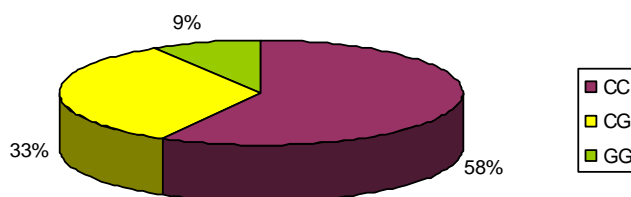
4.2 ZASTÚPENIE CYP1B1/ARG48GLY GENOTYPOV V ANALYZOVANEJ POPULÁCIÍ

Genotypové a alelové frekvencie CYP1B1/Arg48Gly sú uvedené v tabuľke 10. Najčastejšie sa v populácii vyskytoval genotyp CC (58 %), menej sa vyskytoval genotyp CG (33 %). Najnižšie zastúpenie mal genotyp GG (9 %) ako uvádza obr. 11. Distribúcia genotypov analyzovanej populácie bola v Hardyho-Weinbergovej rovnováhe, ako dokumentuje výsledok χ^2 testu. V rámci alel sme zistili vyššiu frekvenciu alely C (0,745) oproti alele G (0,255).

Tabuľka 10 Frekvencie CYP1B1/Arg48Gly genotypov a alel

| | Počet jedincov | Frekvencie genotypov | | | χ^2 | Frekvencie alel | |
|----------|----------------|----------------------|-----------|----------|------------------|-----------------|-------|
| | | CC | CG | GG | | C | G |
| A | 100 | 58 | 33 | 9 | 1,392 P=0,498 | 0,745 | 0,255 |
| S | | 58 | 33 | 9 | | | |
| T | | 55,5 | 38 | 6,5 | | | |

A – absolútny počet; S – skutočné frekvencie (%); T – teoretické frekvencie podľa Hardyho-Weinbergovho zákona (%).



Obr. 11 Percentuálne zastúpenie CYP1B1/Arg48Gly genotypov v pozorovanej populácii

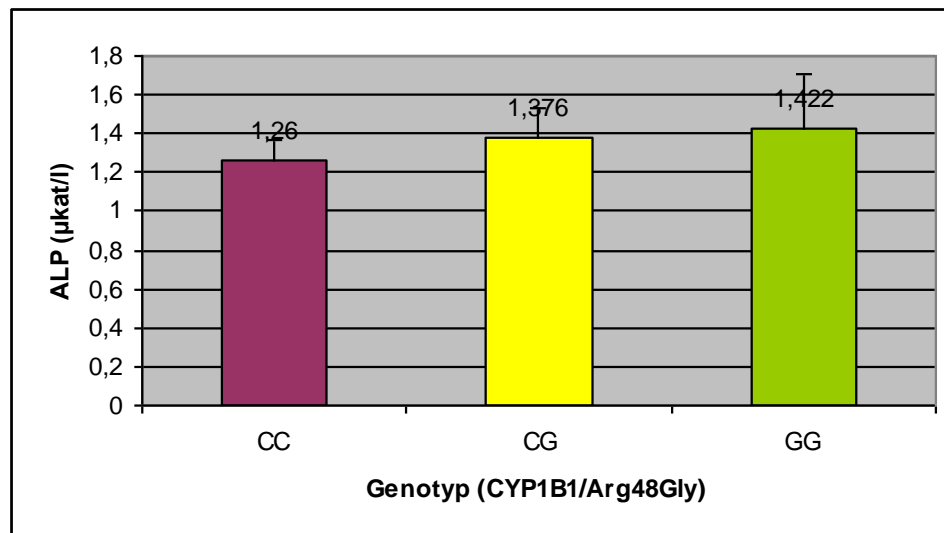
Podobnú distribúciu genotypov ako v našej práci zaznamenali aj v štúdiu Wen et al. (2005), ktorí sledovali skupinu 2321 pacientov. Najčastejšie sa vyskytoval genotyp CC (64,9 %), v menšej miere genotyp CG (31,5 %) a najmenej bol častý genotyp GG (3,6 %).

Výsledky našej práce môžeme porovnať aj so štúdiou Salinas-Sánchez et al. (2011), ktorí zaznamenali v skupine 331 žien distribúciu genotypov: CC (50,1 %), CG (45,3 %), GG (4,6 %).

Analýza práce Long et al. (2006) s celkovým počtom 1925 premenopauzálnych aj postmenopauzálnych žien tiež preukázala podobné výsledky. Najpočetnejší bol genotyp CC (65,3 %), menej sa vyskytoval genotyp CG (30,7 %) a najmenšiu frekvenciu vykazoval genotyp GG (4 %). Frekvencia alely C bola vyššia (0,806) v porovnaní s frekvenciou alely G (0,194).

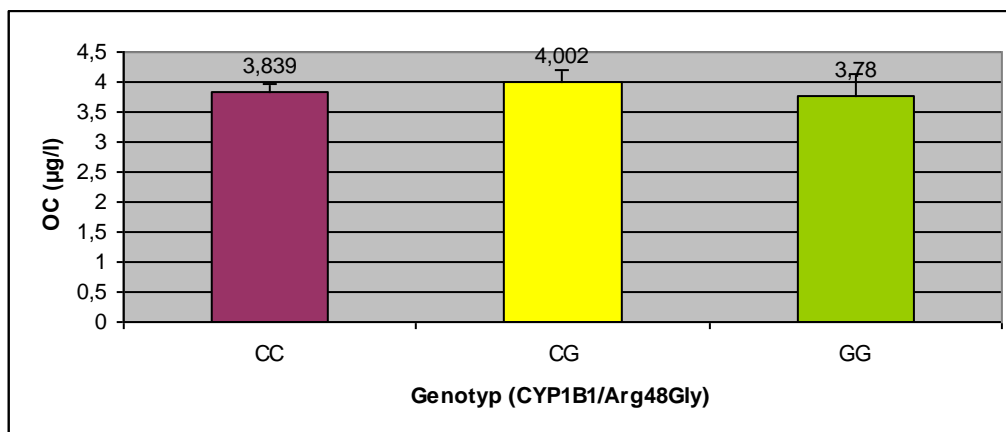
4.2.1 Asociácia genotypov CYP1B1/Arg48Gly s koncentráciou sledovaných biochemických markerov kostnej remodelácie

Na obr. 12 sú uvedené asociácie genotypov CYP1B1/Arg48Gly s koncentráciou alkalické fosfatázy **ALP** – marker kostnej formácie. Najvyššiu koncentráciu tohto markera sme zaznamenali pri genotype GG (1,422 ± 0,289 µkat/l). Nižšie hladiny sme namerali pri heterozygotnom genotype CG (1,376 ± 0,150 µkat/l) a najnižšie koncentrácie sme zaznamenali pri genotype CC (1,260 ± 0,113 µkat/l). Sledované genotypy štatisticky významne neovplyvňujú hladinu ALP (P = 0,766).



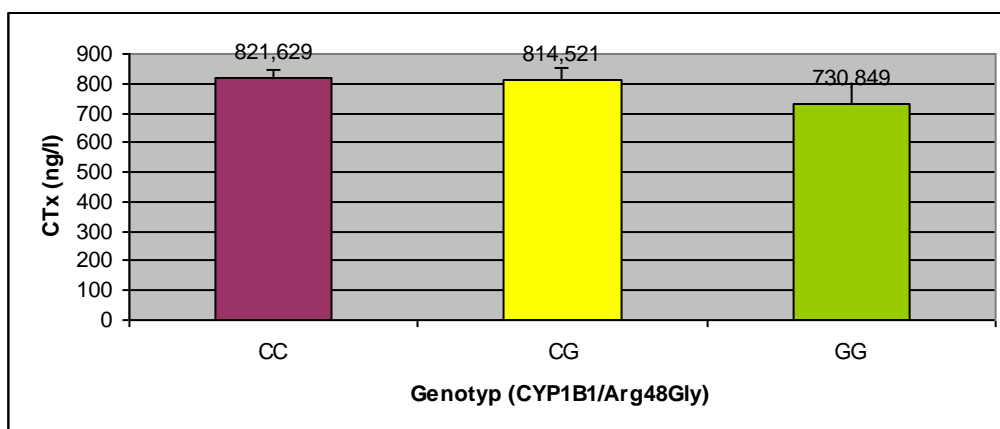
Obr. 12 Asociácie genotypov CYP1B1/Arg48Gly s koncentráciou ALP

Obr. 13 zobrazuje asociácie genotypov CYP1B1/Arg48Gly s koncentraciami osteokalcínu **OC**. V prípade tohto markera kostnej formácie, sme zistili jeho najvyššiu koncentráciu pri genotype CG (4,002 ± 0,188 µg/l). O niečo nižšia bola jeho koncentrácia pri genotype CC (3,839 ± 0,141 µg/l). Najnižšia koncentrácia patrila ku genotypu GG (3,780 ± 0,361 µg/l). Hladiny OC neboli štatisticky významne ovplyvnené genotypmi CYP1B1/Arg48Gly (P = 0,750).



Obr. 13 Asociácie genotypov CYP1B1/Arg48Gly s koncentráciou OC

Koncentrácie markera kostnej resorpcie **CTx** – terminálny telopeptid typu I kolagénu v asociácii s genotypmi CYP1B1/Arg48Gly sú zobrazené na obr. 14. O niečo vyššiu koncentráciu CTx sme zaznamenali pri genotype CC ($821,629 \pm 26,409$ ng/l) oproti genotypu CG ($814,521 \pm 35,062$ ng/l). Najnižšie hodnoty dosiahol marker resorpcie pri genotype GG ($730,849 \pm 67,344$ ng/l). Nebol zistený štatisticky významný vplyv genotypov na hladinu CTx ($P = 0,455$).

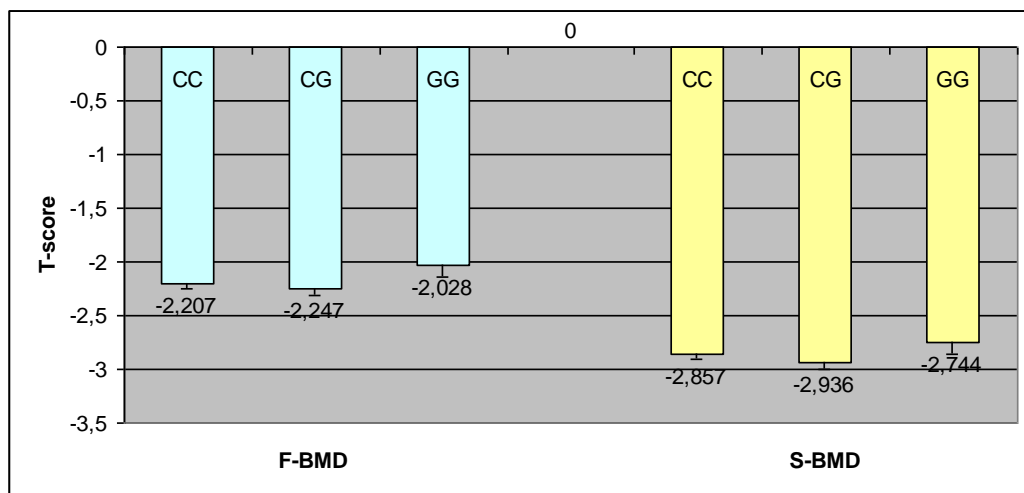


Obr. 14 Asociácie genotypov CYP1B1/Arg48Gly s koncentráciou CTx

Napriek nesignifikantným rozdielom medzi genotypmi, výsledky naznačujú negatívny trend CC genotypu na formáciu kostí (najvyššia hladina markera kostnej resorpcie a nízke hladiny markerov kostnej formácie). S asociáciou polymorfizmu Arg48Gly génu CYP1B1 a markermi kostnej formácie alebo resorpcie sme sa doposiaľ v literatúre nestretli.

4.2.2 Asociácia genotypov CYP1B1/Arg48Gly s BMD v oblasti femuru (F-BMD) a chrbtice (S-BMD)

Vplyv genotypov polymorfizmu Arg48Gly génu CYP1B1 na hodnoty BMD v oblasti femuru sa nepreukázal ($P = 0,259$) (Obr. 15). Najnižšie hodnoty T-skóre sme namerali u žien s genotypom CG ($-2,247 \pm 0,061$) a najvyššie pri genotype GG ($-2,028 \pm 0,117$). Najvyššie hodnoty BMD v oblasti chrbtice sme zaznamenali pri genotype GG ($-2,744 \pm 0,111$) ako je uvedené na obr. 15, a najnižšia S-BMD bola nameraná pri genotype CG ($-2,936 \pm 0,058$). Genotypy CYP1B1/Arg48Gly štatisticky významne neovplyvnili na hodnoty S-BMD ($P = 0,267$).



Obr. 15 Asociácie genotypov CYP1B1/Arg48Gly s F-BMD a S-BMD

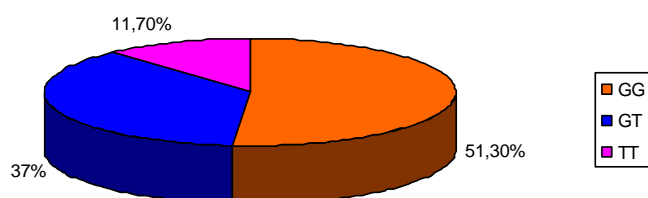
4.3 ZASTÚPENIE CYP1B1/ALA119SER GENOTYPOV V ANALYZOVANEJ POPULÁCI

Frekvencie CYP1B1/Ala119Ser genotypov a alel sú uvedené v tabuľke 11. Najpočetnejším genotypom bol genotyp GG (51,3 %), menej bol zastúpený genotyp GT (37 %). Ako znázorňuje obr. 16, najnižšia koncentrácia bola zaznamenaná pri genotype TT (11,7 %). Distribúcia genotypov v analyzovanej populácii bola v Hardyho-Weinbergovej rovnováhe, ako dokumentuje výsledok χ^2 testu. Z alel sme zistili vyššiu frekvenciu alely G (0,698) v porovnaní s alelou T (0,302).

Tabuľka 11 Frekvencie CYP1B1/Ala119Ser genotypov a alel

| | Počet jedincov | Frekvencie genotypov | | | χ^2 | Frekvencie alel | |
|---|----------------|----------------------|------|------|-----------------|-----------------|-------|
| | | GG | GT | TT | | G | T |
| A | 154 | 79 | 57 | 18 | 2,340 P=0,31 | 0,698 | 0,302 |
| S | | 51,3 | 37 | 11,7 | | | |
| T | | 48,7 | 42,2 | 9,1 | | | |

A – absolútny počet; S – skutočné frekvencie (%); T – teoretické frekvencie podľa Hardyho-Weinbergovho zákona (%).



Obz. 16 Percentuálne zastúpenie CYP1B1/Ala119Ser genotypov v pozorovanej populácii

Výsledky štúdie Napoli et al. (2009) realizovanej s 220 postmenopauzálnymi Americkými ženami dokázala podobne ako naše výsledky najvyšší výskyt genotypu GG (54,5 %), nižšie zastúpenie (39,1 %) mal genotyp GT a najmenej sa vyskytoval genotyp TT (6,4 %).

Výsledky podobné našim dostali aj Rylander-Rudqvist et al. (2004) s 2053 ženami. Zaznamenali najvyššiu frekvenciu pri genotypu GG (49,7 %), nižšiu pri genotypu GT (41,4 %) a najmenej sa v ich štúdiu vyskytoval genotyp TT (8,9 %).

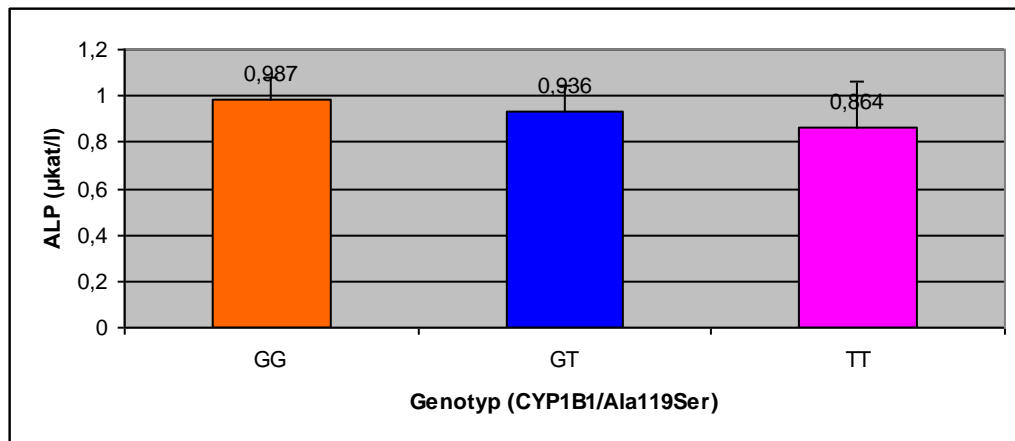
V analýze so skupinou 330 žien dostali Salinas-Sánchez et al. (2011) nasledovné frekvencie genotypov: GG (50,3 %), GT (44,8 %) a TT (4,9 %).

Približnú zhodu môžeme konštatovať s frekvenciami genotypov v práci Long et al. (2006) u 1212 pacientov: genotyp GG (65,2 %), GT (30,7 %) a genotyp TT (4,1 %). Častejšie sa v ich populácii vyskytovala alela G (0,805) oproti alele T (0,195).

4.3.1 Asociácia genotypov CYP1B1/Ala119Ser s koncentráciou sledovaných biochemických markerov kostnej remodelácie

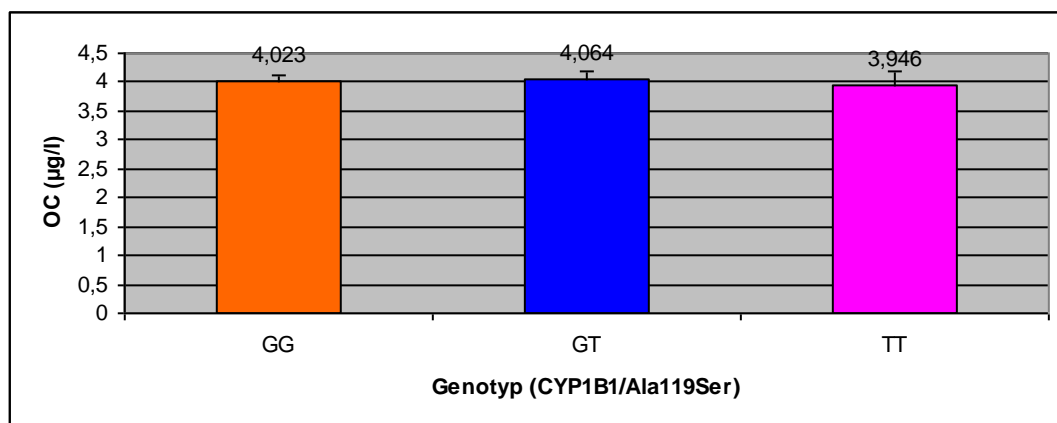
Na obr. 17 sú uvedené asociácie medzi genotypmi CYP1B1/Ala119Ser a koncentráciou alkalickej fosfatázy – ALP. Najvyššie koncentrácie sme zaznamenali pri genotypu GG ($0,987 \pm 0,095$ μ kat/l). O niečo menej dosiahol pri genotypu GT ($0,936 \pm$

0,112 μ kat/l). Najnižšiu koncentráciu ALP vykazovala pri genotype TT ($0,864 \pm 0,199$ μ kat/l). Pri sledovanej asociácii genotypy štatisticky významne neovplyvňovali hladinu alkalickej fosfatázy ($P = 0,839$).



Obr. 17 Asociácie genotypov CYP1B1/Ala119Ser s koncentráciou ALP

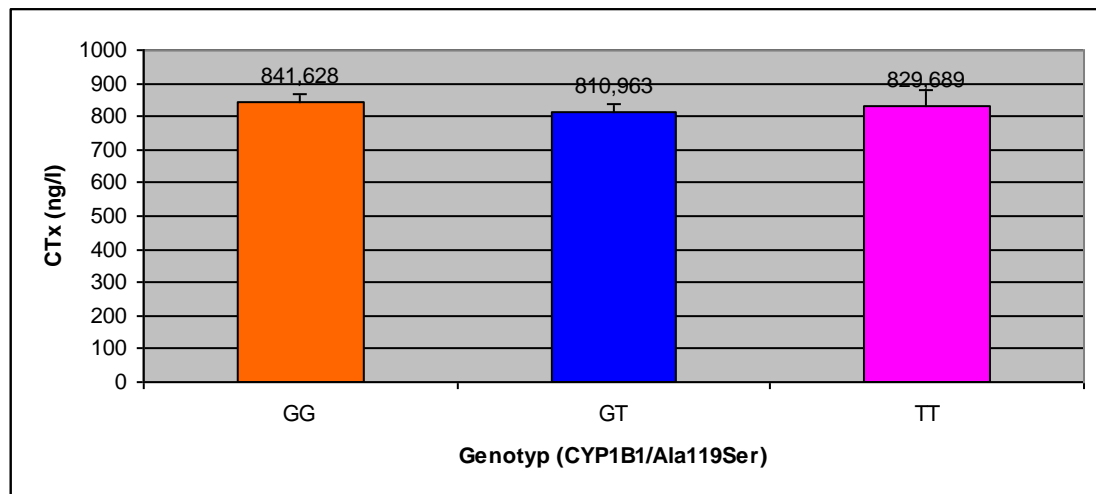
Ako uvádza obr. 18, v asociácii genotypov CYP1B1/Ala119Ser s koncentraciami osteokalcínu **OC**, tento marker kostnej formácie dosiahol o niečo vyššiu koncentráciu pri heterozygotnom genotype GT ($4,064 \pm 0,129$ μ g/l) oproti genotypu GG ($4,023 \pm 0,110$ μ g/l). Najmenšiu hodnotu mal pri genotype TT ($3,946 \pm 0,231$ μ g/l). Genotypy CYP1B1/Ala119Ser neovplyvňovali štatisticky významne OC ($P = 0,903$).



Obr. 18 Asociácie genotypov CYP1B1/Ala119Ser s koncentráciou OC

Asociácia medzi genotypmi CYP1B1/Ala119Ser a koncentraciami markera osteoresorpcie **CTx** je uvedená na obr. 19. Najvyššiu koncentráciu sme zaznamenali pri genotype GG ($841,628 \pm 23,659$ ng/l). Nižšiu hodnotu dosiahol marker pri genotype TT ($829,689 \pm 27,102$ ng/l) a najnižšiu pri genotype GT ($810,963 \pm 27,891$ ng/l). V tomto prípade sme

tiež nezistili štatisticky významný vplyv genotypov CYP1B1/Ala119Ser na hladinu CTx – terminálneho telopeptidu typu I kolagénu ($P = 0,704$).



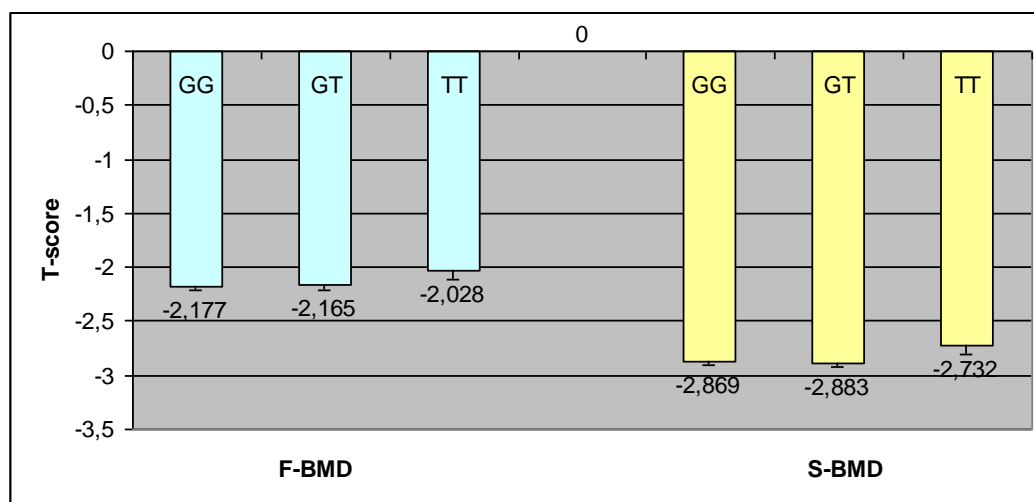
Obr. 19 Asociácie genotypov CYP1B1/Ala119Ser s koncentráciou CTx

Z našich výsledkov vyplýva, že polymorfizmus CYP1B1/Ala119Ser v nami analyzovanej populácii neovplyvňuje intenzitu procesu remodelácie kostného tkaniva.

4.3.2 Asociácia genotypov CYP1B1/Ala119Ser s BMD v oblasti femuru (F-BMD) a chrbtice (S-BMD)

Ako znázorňuje obr. 20, ženy s genotypom TT mali najvyššie hodnoty BMD v oblasti femuru ($-2,028 \pm 0,085$) a najnižšie F-BMD bolo namerané pri genotype GG ($-2,177 \pm 0,04$). Signifikantná asociácia medzi genotypmi CYP1B1/Ala119Ser a F-BMD sa nepotvrdila ($P = 0,278$).

Aj v prípade asociácie genotypov s S-BMD (Obr. 20) boli najvyššie hodnoty namerané u žien s genotypom TT ($-2,732 \pm 0,07$). Najnižšie hodnoty T-skóre boli namerané pri genotype GT ($-2,883 \pm 0,039$). Ku štatistickej významnosti sa blížili rozdiely medzi genotypmi GG-TT ($-0,137 \pm 0,077$; $P = 0,078$) a genotypmi GT-TT ($-0,151 \pm 0,08$; $P = 0,062$). Je tým naznačený istý trend pre asociáciu genotypu TT s vyššími hodnotami S-BMD napríklad v prípade rozsiahlejšieho súboru alebo zahrnutím „zdravých“ jedincov do analýzy.



Obr. 20 Asociácie genotypov CYP1B1/Ala119Ser s F-BMD a S-BMD

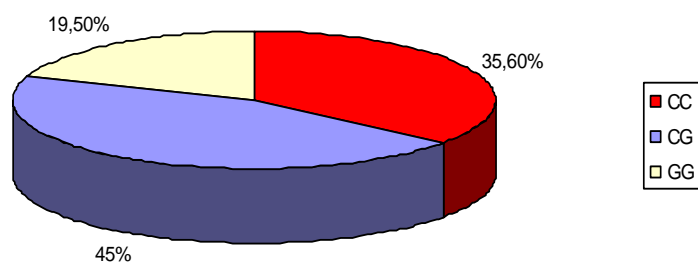
4.4 ZASTÚPENIE CYP1B1/LEU432VAL GENOTYPOV V ANALYZOVANEJ POPULÁCI

Ako dokumentuje tabuľka 12 s frekvenciami CYP1B1/Leu432Val genotypov a alel, najviac zastúpeným bol heterozygotný genotyp CG (45 %), menej sa vyskytoval genotyp CC (35,6 %) a najnižšie zastúpenie sme zaznamenali pri genotypy GG (19,5 %) (Obr. 21). Z alel mala vyššiu frekvenciu alela C (0,581) oproti alele G (0,419). Ako dokumentuje výsledok χ^2 testu, distribúcia genotypov v analyzovanej populácii bola v Hardyho-Weinbergovej rovnováhe.

Tabuľka 12 Frekvencie CYP1B1/Leu432Val genotypov a alel

| | Počet jedincov | Frekvencie genotypov | | | χ^2 | Frekvencie alel | |
|---|----------------|----------------------|------|------|------------------|-----------------|-------|
| | | CC | CG | GG | | C | G |
| A | 149 | 53 | 67 | 29 | 1,019 P=0,601 | 0,581 | 0,419 |
| S | | 35,6 | 45 | 19,5 | | | |
| T | | 33,8 | 48,7 | 17,5 | | | |

A – absolútny počet; S – skutočné frekvencie (%); T – teoretické frekvencie podľa Hardyho-Weinbergovho zákona (%).



Obr. 21 Percentuálne zastúpenie CYP1B1/Leu432Val genotypov v pozorovanej populácii

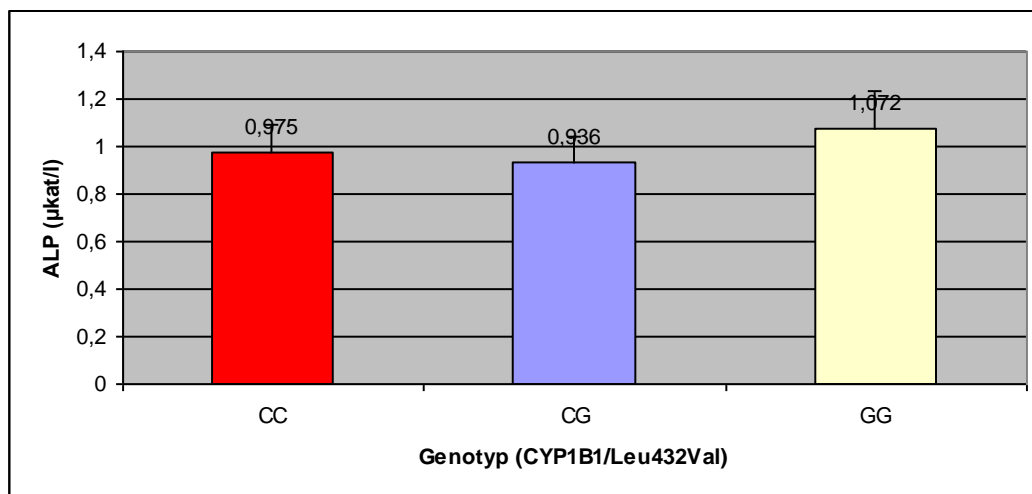
Analýzy Rylander-Rudqvist et al. (2004) s 2045 ženami preukázali podobné výsledky vo frekvencii genotypov. Najpočetnejšie bol zastúpený genotyp CG (49,5 %), menej sa vyskytoval genotyp CC (30,3 %). Najmenšiu frekvenciu vykazoval genotyp GG (20,2 %). Obdobné výsledky dosiahli aj Salinas-Sánchez et al. (2011) s 334 ženami: genotyp CC (38,3 %), genotyp CG (42,2 %) a genotyp GG (19,5 %).

V štúdií s 216 Americkými ženami, Napoli et al. (2009) dostali výsledky približne rovnaké našim. Zaznamenali najpočetnejší genotyp CG (52,3 %), menej genotyp CC (28,3 %) a v najmenšej miere genotyp GG (19,4 %).

Rozdielne zastúpenie genotypov dosiahli Wen et al. (2005) v skupine postmenopauzálnych aj premenopauzálnych žien. Najčastejšie sa vyskytujúci genotyp bol CC (75,5 %), menej genotyp CG (22,3 %) a najmenej sa vyskytoval genotyp GG (2,2 %).

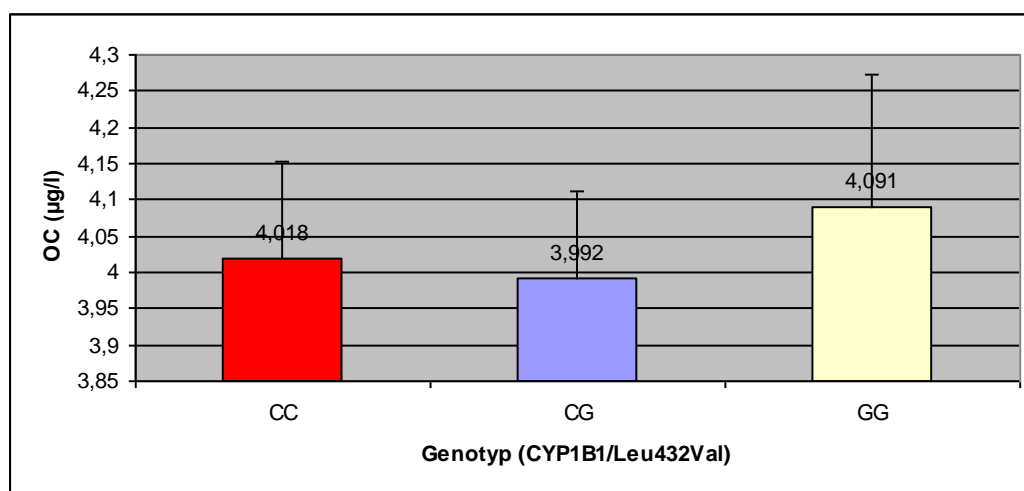
4.4.1 Asociácia genotypov CYP1B1/Leu432Val s koncentráciou sledovaných biochemických markerov kostnej remodelácie

Na obr. 22 je znázornená asociácia medzi genotypmi polymorfizmu Leu432Val génu CYP1B1 a koncentraciami markera kostnej formácie – ALP. Najvyššie koncentrácie alkalické fosfatázy sa vyskytovali u žien s genotypom GG ($1,072 \pm 0,158 \mu\text{kat/l}$), nižšie hodnoty mali nositeľky genotypu CC ($0,975 \pm 0,117 \mu\text{kat/l}$) a najnižšie sme zaznamenali v spojení s genotypom CG ($0,936 \pm 0,104 \mu\text{kat/l}$). Pri danej asociácii sme nezistili štatistický vplyv genotypov CYP1B1/Leu432Val na hladinu koncentrácie ALP ($P = 0,773$).

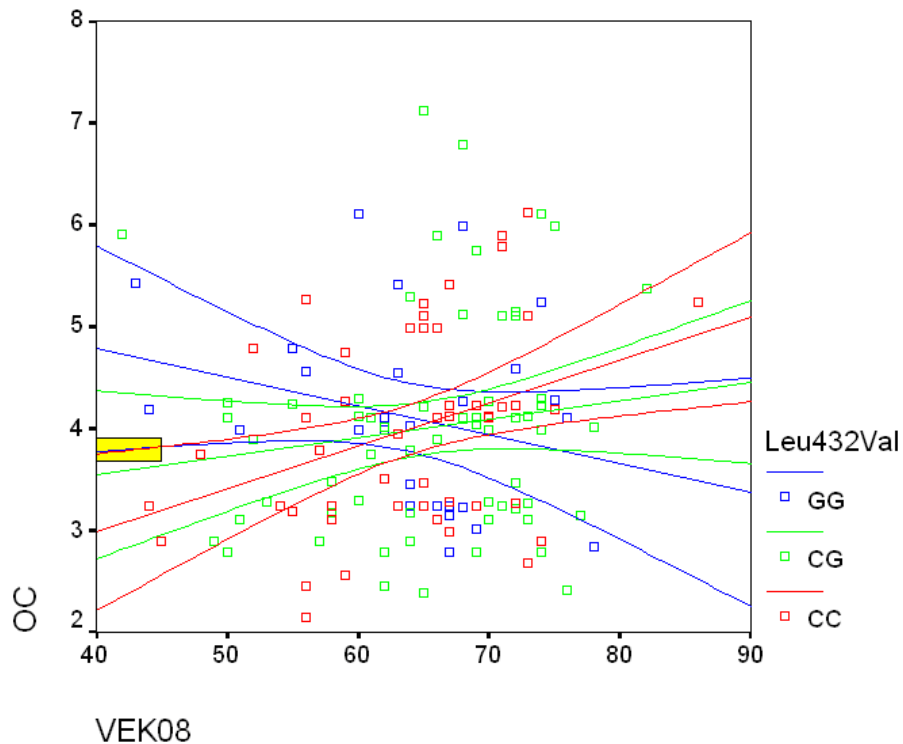


Obr. 22 Asociácie genotypov CYP1B1/Leu432Val s koncentráciou ALP

Asociácie genotypov CYP1B1/Leu432Val s koncentráciou osteokalcínu – OC sú uvedené na obr. 23. Najvyššia hladina markera kostnej formácie bola nameraná u žien s genotypom GG ($4,091 \pm 0,181$ µkat/l). O niečo nižšie hladiny OC boli pri genotype CC ($4,018 \pm 0,134$ µkat/l). Najnižšie hodnoty sme zistili pri heterozygotnom genotype CG ($3,992 \pm 0,119$ µkat/l). Pri sledovanej asociácii sme zaznamenali vplyv veku v interakcii s genotypom na koncentráciu osteokalcínu. Rozdiel genotypov CC – GG ($-0,131 \pm 0,228$ µg/l) bol štatisticky významný ($P = 0,04$) len u jedincov s vekom do 45,3 roka (Obr. 24). V danom prípade dochádza ku zvýšenej osteoformácii v kostnom tkanive u pacientov s genotypom GG. Vo väčšej časti nami skúmaného súboru sú teda rozdiely štatisticky nevýznamné. Na obrázku je oblasť významnosti zvýraznená žltou farbou.

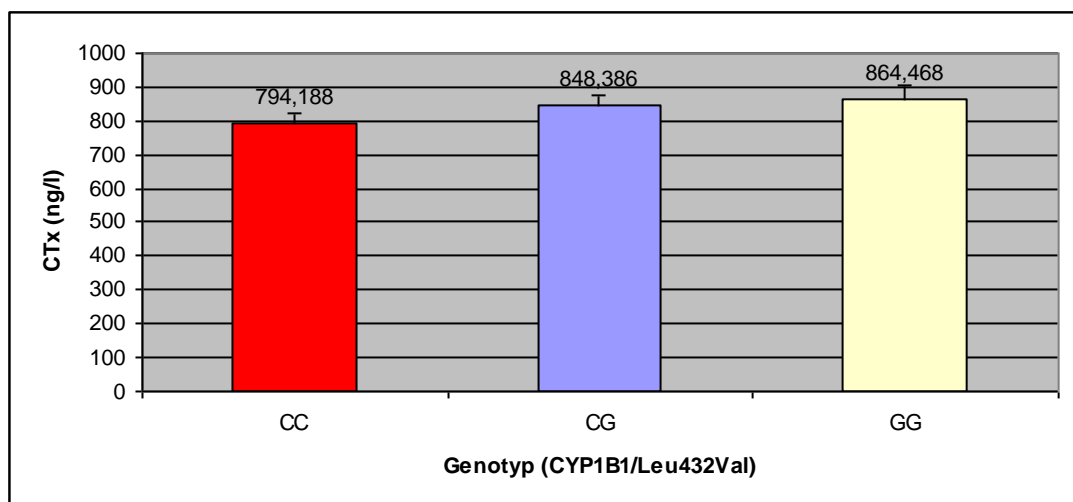


Obr. 23 Asociácie genotypov CYP1B1/Leu432Val s koncentráciou OC



Obr. 24 Interakcia genotypov CYP1B1 génu s vekom

Ako uvádza obr. 25, pri asociácii genotypov CYP1B1/Leu432Val s koncentraciami markera kostnej resorpcie – **CTx**, je o niečo vyššia hladina tohto markera pri genotype GG (864,468 ± 38,519 ng/l) oproti genotypu CG (848,386 ± 25,474 ng/l). Najnižšie hodnoty dosiahol CTx pri genotype CC (794,188 ± 28,615 ng/l). Genotypy CYP1B1/Leu432Val štatisticky významne neovplyvňujú CTx (P = 0,243).



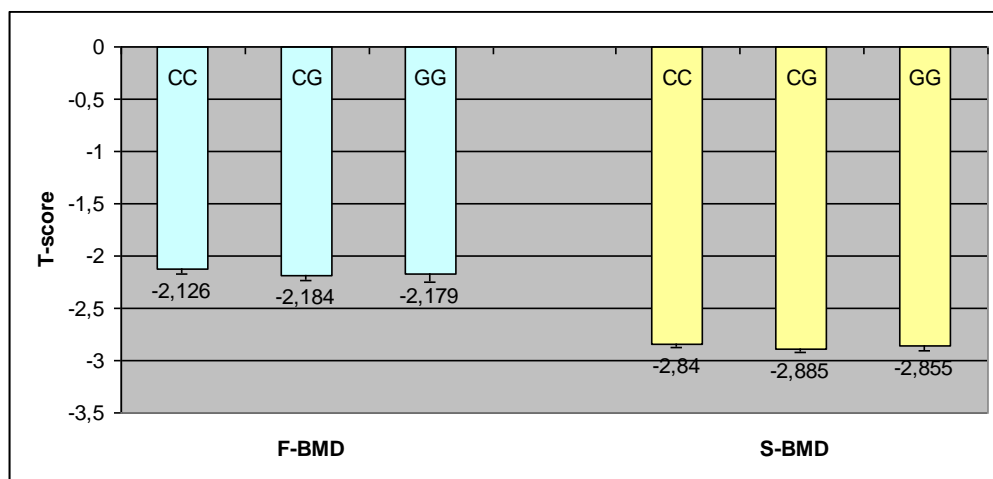
Obr. 25 Asociácie genotypov CYP1B1/Leu432Val s koncentráciou CTx

V prípade polymorfizmu CYP1B1/Leu432Val sme okrem interakcie genotypov CC-GG s vekom pri osteokalcíne, nezistili štatisticky významný vplyv genotypov s markermi kostnej formácie alebo resorpcie. Pri genotype GG sme však zaznamenali nesignifikantne najvyššie koncentrácie všetkých troch markerov kostnej remodelácie.

4.4.2 Asociácia genotypov CYP1B1/Leu432Val s BMD v oblasti femuru (F-BMD) a chrbtice (S-BMD)

Obr. 26 zobrazuje asociáciu genotypov CYP1B1/Leu432Val s hodnotami BMD nameranými v oblasti femuru. Ženy s genotypom CC mali najvyššie hodnoty F-BMD ($-2,126 \pm 0,05$). Najnižšie hodnoty boli namerané pri genotype CG ($-2,184 \pm 0,045$). Asociácia medzi genotypmi polymorfizmu Leu432Val génu CYP1B1 a hodnotami F-BMD sa nepotvrdila ($P = 0,663$).

Ako je možné vidieť na obr. 26, najvyššie S-BMD je spojené s genotypom CC ($-2,84 \pm 0,042$). Pri genotype CG boli namerané najnižšie hodnoty ($-2,885 \pm 0,037$). Ani pri tejto asociácii sme nezistili štatistickú významnosť ($P = 0,713$).



Obr. 26 Asociácie genotypov CYP1B1/Leu432Val s F-BMD a S-BMD

4.5 ZASTÚPENIE CYP1B1/ASN453SER GENOTYPOV V ANALYZOVANEJ POPULÁCIÍ

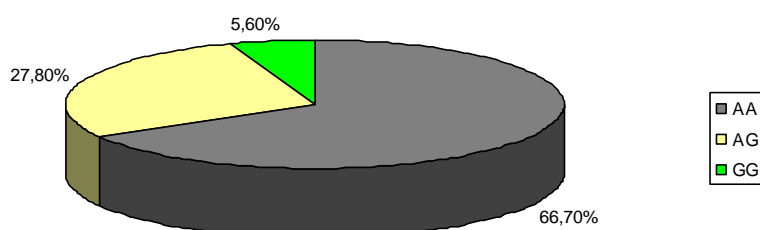
V rámci genotypov CYP1B1/Asn453Ser ako sú uvedené v tabuľke 13 je najpočetnejší genotyp AA (66,7 %). Nižšie zastúpenie sme zaznamenali pri genotype AG (27,8 %) a ako zobrazuje aj obr. 27, najmenej sa v populácii vyskytoval genotyp GG (5,6 %). Medzi alelami bola častejšia alela A (0,806) v porovnaní s alelou G (0,194). Distribúcia

genotypov analyzovanej populácie bola v Hardyho-Weinbergovej rovnováhe, ako dokumentuje výsledok χ^2 testu.

Tabuľka 13 Frekvencie CYP1B1/Asn453Ser genotypov a alel

| | Počet jedincov | Frekvencie genotypov | | | χ^2 | Frekvencie alel | |
|----------|----------------|----------------------|-------------|------------|------------------|-----------------|-------|
| | | AA | AG | GG | | A | G |
| A | 144 | 96 | 40 | 8 | 2,398 P=0,301 | 0,806 | 0,194 |
| S | | 66,7 | 27,8 | 5,6 | | | |
| T | | 64,9 | 31,3 | 3,8 | | | |

A – absolútny počet; S – skutočné frekvencie (%); T – teoretické frekvencie podľa Hardyho-Weinbergovho zákona (%).



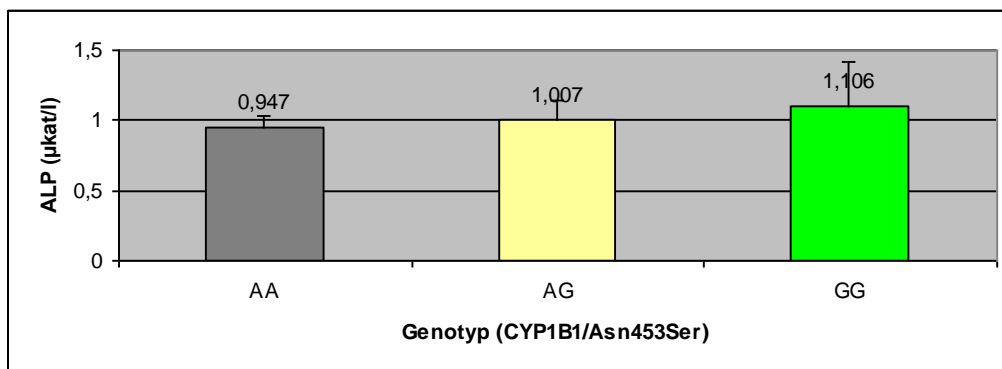
Obr. 27 Percentuálne zastúpenie CYP1B1/Asn453Ser genotypov v pozorovanej populácii

Približnú zhodu môžeme konštatovať s výsledkami práce Rylander-Rudqvist et al. (2004), ktorí určili genotyp 2046 ženám: genotyp AA (68,7 %), genotyp AG (28,7 %) a genotyp GG (3 %).

Salinas-Sánchez et al. (2011) vo svojich výsledkoch s početnosťou 344, dostali podobné hodnoty: najvyšší výskyt zaznamenali pri genotype AA (63,2 %), menej pri genotype AG (34,1 %). Najmenej sa vyskytoval genotyp GG (2,7 %).

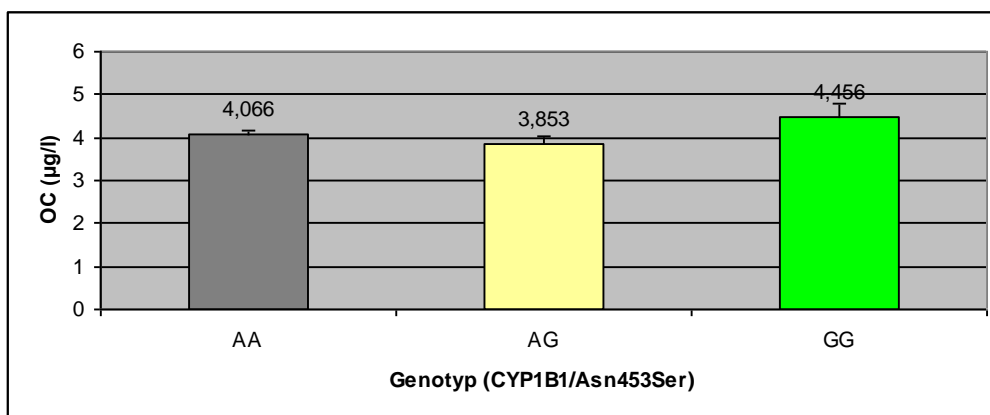
4.5.1 Asociácia genotypov CYP1B1/Asn453Ser s koncentráciou sledovaných biochemických markerov kostnej remodelácie

Asociácie genotypov CYP1B1/Asn453Ser s koncentráciou **ALP** sú uvedené na obr. 28. U markera kostnej formácie sa dokázala najvyššia hladina pri genotype GG ($1,106 \pm 0,308$ $\mu\text{kat/l}$). Vyššie koncentrácie sme zaznamenali pri genotype AG ($1,007 \pm 0,136$ $\mu\text{kat/l}$) v porovnaní s genotypom AA ($0,947 \pm 0,088$ $\mu\text{kat/l}$). Samotné genotypy CYP1B1/Asn453Ser štatisticky významný vplyv na ALP nemali ($P = 0,844$).



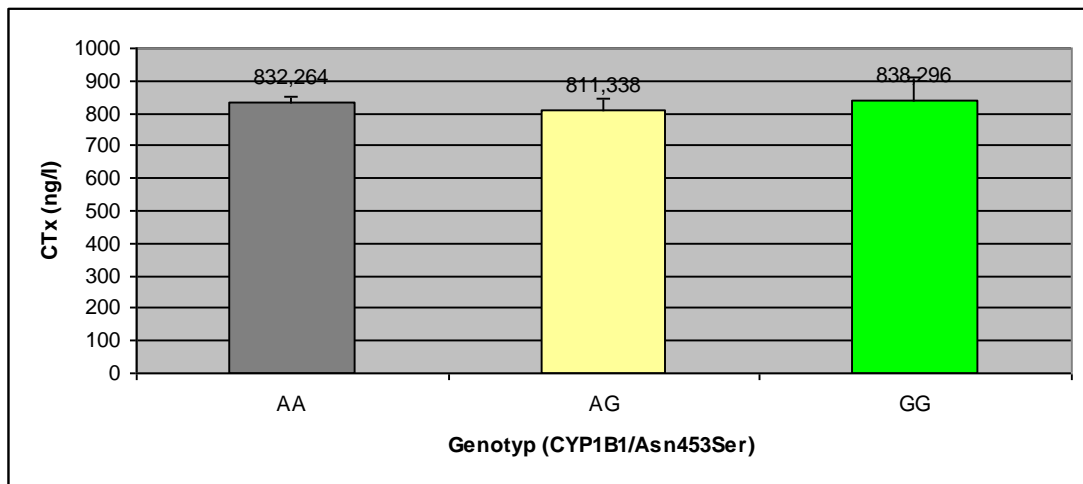
Obr. 28 Asociácie genotypov CYP1B1/Asn453Ser s koncentráciou ALP

Na obr. 29 je znázornená asociácia genotypov CYP1B1/Asn453Ser s koncentráciou markera osteoformácie – OC. Jeho najvyššiu koncentráciu sme namerali pri genotype GG (4,456 ± 0,349 µg/l), nižšiu koncentráciu pri genotype AA (4,066 ± 0,100 µg/l) a najnižšou hladinou markera OC je charakteristický heterozygotný genotyp AG (3,853 ± 0,155 µg/l). Nezistili sme štatisticky významný vplyv genotypov CYP1B1/Asn453Ser na koncentrácie osteokalcínu (P = 0,239).



Obr. 29 Asociácie genotypov CYP1B1/Asn453Ser s koncentráciou OC

Obr. 30 zobrazuje asociáciu medzi genotypmi CYP1B1/Asn453Ser a koncentraciami CTx. Najvyššie koncentrácie markera osteoresorpcie sme zaznamenali pri genotype GG (838,296 ± 75,262 ng/l). Mal o niečo vyššie koncentrácie v porovnaní s genotypom AA (832,264 ± 21,477 ng/l). Najnižšie hodnoty patria ku genotypu AG (811,338 ± 33,363 ng/l). Ani v prípade tejto asociácie medzi genotypmi CYP1B1/Asn453Ser a markerom kostnej resorpcie sme nezistili štatistickú významnosť (P = 0,860).



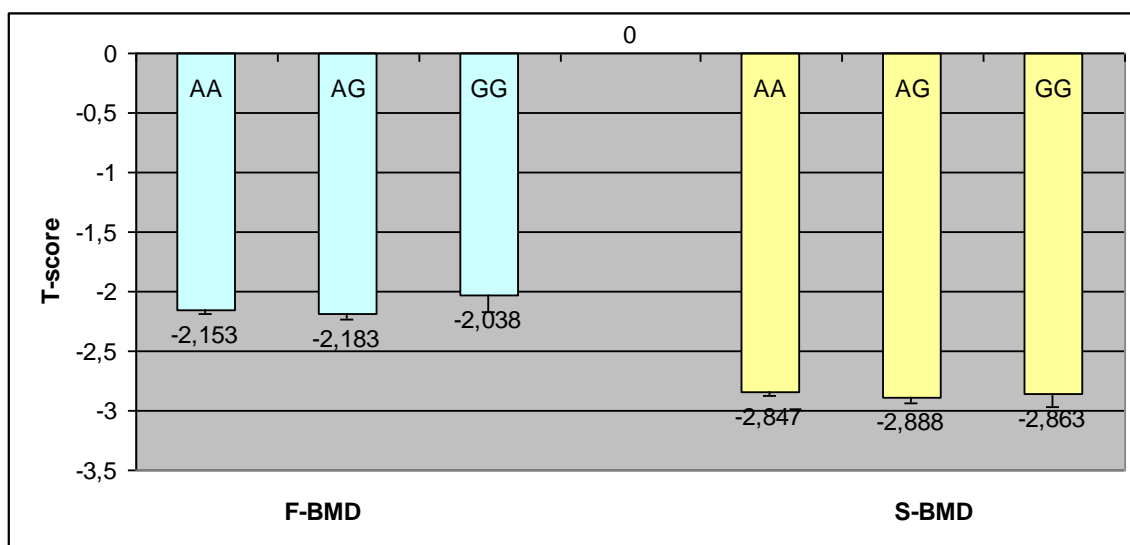
Obr. 30 Asociácie genotypov CYP1B1/Asn453Ser s koncentráciou CTx

Genotyp GG sme zaznamenali pri najvyšších hladinách markerov kostnej formácie – ALP, OC, aj u markera kostnej resorpcie – CTx. V prípade signifikantných rozdielov by u žien s genotypom GG prebiehala kostná prestavba intenzívnejšie oproti nositeľkám ostatných genotypov. Vzhľadom na nevýznamnosť výsledkov je možné sa len domnievať o vplyve daného genotypu v prípade analýzy väčšieho súboru.

4.5.2 Asociácia genotypov CYP1B1/Asn453Ser s BMD v oblasti femuru (F-BMD) a chrbtice (S-BMD)

Na obr. 31 je možné vidieť, že nositeľky GG genotypu majú najvyššie namerané hodnoty BMD v oblasti femuru ($-2,038 \pm 0,131$). Najnižšie hodnoty F-BMD sa vyskytujú u žien s genotypom AG ($-2,183 \pm 0,058$). V prípade asociácie uvedených genotypov s F-BMD sme nezistili štatistický vplyv ($P = 0,600$).

Najvyššie S-BMD mali ženy s genotypom AA ($-2,847 \pm 0,031$), ako uvádza obr. 30. Najnižšie hodnoty BMD meranej v oblasti chrbtice patrili genotypu AG ($-2,888 \pm 0,048$). V tomto prípade sme tiež nepreukázali štatistickú významnosť medzi genotypmi CYP1B1/Asn453Ser a S-BMD ($P = 0,775$).



Obr. 31 Asociácie genotypov CYP1B1/Asn453Ser s F-BMD a S-BMD

4.6 APLIKÁCIA VÝSLEDKOV V PRAXI A V ĎALŠOM VÝSKUME

Gén CYP1B1 je dôležitým génom, ktorého produkt významne zasahuje do metabolizmu estrogénov. Ako je známe, v prípade postmenopauzálnych žien je produkcia estrogénov vaječníkmi minimálna, väčšina cirkulujúceho estrogénu u žien po menopauze pochádza z konverzie androstendiónu na estrón. Táto konverzia sa uskutočňuje aj v osteoblastoch (Nawata et al., 1995), čím sa vytvára miestny zdroj aktívneho estrogénu pre kosť. Estrón sa následne metabolizuje pomocou CYP1A1, CYP1A2, CYP3A4 a tiež CYP1B1 na produkty s rôznou metabolickou aktivitou. Preto zmeny v štruktúre uvedených molekúl (polymorfizmus v génoch) môžu ovplyvniť ich aktivitu, následne intenzitu metabolizmu estrogénu a tým môžu mať v konečnom dôsledku vplyv na kostné tkanivo. Na druhej strane je aktuálny stav väčšiny kostného tkaniva, predovšetkým u žien krátko po menopauze, výsledkom dejov, prebiehajúcich v predchádzajúcich rokoch (kostné tkanivo sa obnoví približne za 10 rokov), teda často ešte v premenopauzálnom období. V našom prípade ide predovšetkým o prvý prípad, keďže analyzovaný súbor pozostával najmä zo žien s vekom viac ako 10 rokov po menopauze (ženy do 5 rokov po menopauze tvorili asi 10 % súboru).

Celkovým zhodnotením našich výsledkov, dosiahnutých detekciou, spracovaním a štatistickým vyhodnotením môžeme konštatovať, že sme nezistili štatisticky významný vplyv polymorfizmov Arg48Gly, Ala119Ser, Leu432Val a Asn453Ser v géne CYP1B1 na ukazovatele kostného metabolizmu – BMD a markery kostnej remodelácie. Z dostupnej literatúry je známy významný vplyv niektorých polymorfizmov na ukazovatele

osteoporózy v niektorých populáciách (Napoli et al., 2009; Quan, 2007). Dôvodom štatisticky nevýznamných zistení v našej práci môže byť napríklad limitovaný rozsah analyzovaného súboru, štruktúra analyzovaného súboru (súbor obsahoval ženy – pacientky s priemerným T-skóre v F-BMD $(-2,15 \pm 0,031)$ a v S-BMD $(-2,85 \pm 0,025)$, odlišné väzbové pomery polymorfizmov (v prípade, že polymorfizmus má okrem kauzálneho vplyvu zámény aminokyselín aj funkciu väzbového markera k analyzovanému znaku), alebo reálna neexistencia vplyvu analyzovaných polymorfizmov na ukazovatele spojené s osteoporózou v našej populácii.

Výsledky rigorózneho práce poukazujú na nevhodnosť využitia analyzovaných polymorfizmov v géne CYP1B1 na predikciu rizika vzniku osteoporózy. Na potvrdenie tohto záveru bude potrebné otestovať vzorku s vyšším počtom jedincov, zahŕňajúcich aj z pohľadu osteoporózy zdravých jedincov. Naše výsledky však môžu doplniť informácie o vplyve polymorfizmov v géne CYP1B1 na ukazovatele osteoporózy v z tohto pohľadu doposiaľ neanalyzovanej populácii a tak prispieť ku komplexnému pohľadu na genetickú podmienenosť osteoporózy.

ZÁVER

Osteoporóza je ochorenie podmienené geneticky, charakterizované zníženou hustotou kostnej hmoty a zvýšeným rizikom vzniku zlomeniny. Aj keď moderné alternatívy v liečbe osteoporózy poskytujú ochranu pred jej ďalším rozvojom, je dôležité poznať aj genetické pozadie tohto ochorenia, čo pomôže hľadať príčiny osteoporózy a v budúcnosti mohlo prispieť ku skorej diagnostike a pohotovému zavedeniu adekvátnych preventívnych opatrení.

V rigoróznejšej práci sme sa zamerali na analyzovanie vplyvu polymorfizmov Arg48Gly, Ala119Ser, Leu432Val a Asn453Ser v kandidátskom géne osteoporózy CYP1B1 na ukazovatele kostného metabolizmu, predovšetkým BMD v oblasti femuru a chrbtice a markery kostnej remodelácie.

Dosiahnuté výsledky môžeme zhrnúť do nasledovných záverov:

1. Detegovali sme jednotlivé polymorfizmy metódou PCR-RFLP, t.j. optimalizovali sme PCR reakciu, uskutočnili sme restričnú analýzu PCR produktov (RFLP), restričné fragmenty sme separovali elektroforeticky a vyhodnotili sme elektroforeogramy;
2. Vyhodnotili sme výskyt polymorfizmov v analyzovanej populácii, t.j. vyhodnotili sme zastúpenie genotypov pre CYP1B1/Arg48Gly: CC = 58 %, CG = 33 %, GG = 9 %; CYP1B1/Ala119Ser: GG = 51,3 %, GT = 37 %, TT = 11,7 %; CYP1B1/Leu432Val: CC = 35,6 %, CG = 45 %, GG = 19,5 %; CYP1B1/Asn453Ser: AA = 66,7 %, AG = 27,8 %, GG = 5,6 %; frekvencie alel uvedeného génu boli nasledovné: pre CYP1B1/Arg48Gly: alela C = 0,745, G = 0,255; CYP1B1/Ala119Ser: G = 0,698, T = 0,302; CYP1B1/Leu432Val: C = 0,581, G = 0,419; CYP1B1/Asn453Ser: A = 0,806, G = 0,194. Distribúcia genotypov v analyzovanej populácii bola v Hardyho-Weinbergovej rovnováhe. Upravili sme výstupné dáta biochemických markerov kostnej remodelácie, ako aj anamnestické údaje pre účely štatistického hodnotenia;
3. Štatisticky sme vyhodnotili vplyv polymorfizmov Arg48Gly, Ala119Ser, Leu432Val a Asn453Ser v géne CYP1B1 na hladinu vybraných biochemických markerov kostnej remodelácie a hustotu kostného minerálu pomocou procedúry GLM a analýzy kovariancie. Genotyp GG polymorfizmu Leu432Val génu CYP1B1 bol spojený so zvýšenou kostnou formáciou, ale len do 45,3 roka. Nebola zistená žiadna ďalšia významná asociácia medzi

CYP1B1 polymorfizmami a markermi kostného obratu alebo hustotou kostného minerálu (F-BMD, S-BMD).

Výsledky našej asociačnej štúdie môžu pomôcť pri spresnení poznatkov o genetickej podmienenosti osteoporózy u človeka a poukazujú na nevhodnosť využitia analyzovaných polymorfizmov v géne CYP1B1 na predikciu rizika vzniku osteoporózy. Poznanie mechanizmov pôsobenia genetických a negenetických faktorov je nevyhnutné, aby v budúcnosti mohlo dôjsť ku zníženiu rizika vzniku tohto metabolického ochorenia kostí a k zlepšeniu možnosti jeho liečby.

ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- ADACHI, K. – CHOLE, R.A.** 1990. Inhibition of osteoclast recruitment at a local site by 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate (HEBP). In: *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 99, 1990, s. 738 – 741.
- AKLILLU, E. – OSCARSON, M. – HIDESTRAND, M. – LEIDVIK, B. – OTTER, C. – INGELMAN-SUNDBERG, M.** 2002. Functional analysis of six different polymorphic CYP1B1 enzyme variants found in an Ethiopian population. In: *Mol. Pharmacol.*, 61, 2002, s. 586 – 594.
- ARDEN, N.K. – SPECTOR, T.D.** 1997. Genetic influence on muscle strength, lean body mass, and bone mineral density: A twin study. In: *J. Bone Miner. Res.*, 12, 1997, s. 2076 – 2081.
- ARDEN, N.K. – BAKER, J. – HOGG, C. – BAAN, K. – SPECTOR, T.D.** 1996. The heritability of bone mineral density, ultrasound of the calcaneus and hip axis length: A study of postmenopausal twins. In: *J. Bone Miner. Res.*, 11, 1996, s. 530 – 534.
- BANDIERA, S. – WEIDLICH, S. – HARTH, V. – BROEDE, P. – KO, Y. – FRIEDBERG T.** 2005. Proteasomal degradation of human CYP1B1: effect of the Asn453Ser polymorphism on the post-translational regulation of CYP1B1 expression. In: *Mol. Pharmacol.*, 67, 2005, s. 435 – 443.
- BARON, R.** 1993. Anatomy and ultrastructure of bone. In: Favus MJ, Ed. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism* (2nd edition). New York: Raven Press, 1993, s. 3 – 9.
- BIDLINGMAIER, F. – DORR, H.G. – EISENMENGER, W. – KUHNLE, U. – KNORR, D.** 1986. Contribution of the adrenal gland to the production of androstendione and testosterone during the first two years of life. In: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 62, 1986, s. 331 – 335.
- BLAHOŠ, J. – PALIČKA, V. – BÝMA, S.** 2006. Osteoporóza. Doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné a praktické lékaře. Praha: Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, 2006, 6 s. ISBN 80-86998-01-0
- BONE REMODELING.** 2011. [cit. 20. decembra, 2011]
<<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/684133/bone-remodeling>>
- BONEWALD, L.F.** 2008. Osteocytes. In: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, 2008, s. 22 – 27. ISBN 978-0-9778882-1-4
- BONNICK, S.L. – SHULMAN, L.** 2006. Monitoring osteoporosis therapy: Bone mineral density, Bone turnover markers, or both? In: *The American Journal of Medicine*, 119, 2006, s. 25 – 31.
- BOONEN, S. – BISCHOFF-FERRARI, A. – COOPER, C. – LIPS, P. – LJUNGGREN, O. – MEUNIER, P.J. – REGINSTER, J.Y.** 2006. Addressing the musculoskeletal components of fracture risk with calcium and vitamin D: a review of the evidence. In: *Calcif. Tissue Int.*, 78, 2006, s. 257 – 270.
- BOSKEY, A.L.** 1996. Matrix proteins and mineralization: an overview. In: *Connect. Tissue Res.*, 35, 1996, s. 357 – 363.
- BOSKEY, A.L.** 1998. Biomineralization: conflicts, challenges, and opportunities. In: *J. Cell Biochem.*, Suppl. 30-31, 1998, s. 83 – 91.

- BOSKEY, A.L.** 2007. Osteoporosis and Osteopetrosis. In: *Biom mineralization in Medicine*, 3, 2007, s. 59 – 75.
- BROULÍK, P.** 1999. Osteoporóza: Osteoporóza, osteomalacie, osteodystrofi e. Praha: MAXDORF, 1999. 172 s. ISBN 80-858000-93-4
- CLARKE, B.L. – KHOSLA, S.** 2010. Female reproductive system and bone. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 503, 2010, s. 118 – 128.
- COLVARD, D.S. – ERIKSEN, E.F. – KEETING, P.E. – WILSON, E.M. – LUBAHN, D.B. – FRENCH, F.S. – RIGGS, B.L. – SPELSBERG, T.C.** 1989. Identification of androgen receptors in normal human osteoblast-like cells. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 1989, s. 854 – 857.
- COOPER, C. – CAMPION, G. – MELTON III, L.J.** 1992a. Hip fractures in the elderly: A worldwide projection. In: *Osteoporosis Int.*, 2, 1992, s. 285 – 289.
- COOPER, C. – ATKINSON, E.J. – O'FALLON, W.M. – MELTON III, L.J.** 1992b. Incidence of clinically diagnosed vertebral fractures: a population-based study in Rochester, Minnesota, 1985–1989. In: *J. Bone Miner. Res.*, 7, 1992, s. 221 – 227.
- CUMMINGS, S.R. – MELTON III, L.J.** 2002. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. In: *Lancet*, 359, 2002, s. 1761 – 1767.
- ČECH, S. – HORKÝ, D.** 2004. Histologie a mikroskopická anatomie pro bakaláře. Brno: Masarykova Univerzita, 2004. 138 s. ISBN 80-210-3513-7
- ČIHÁK, R.** 2001. Anatomie. 2.vydanie. Praha: Grada Publishing, 2001. 516 s. ISBN 80-7169-970-5
- DAWSON-HUGHES, B. – HARRIS, S.S. – KRALL, E.A. – DALLAL, G.E.** 1997. Effect of calcium and vitamin D supplementation on bone density in men and women 65years of age or older. In: *N. Engl. J. Med.*, 337, 1997, s. 670 – 676.
- DE LAET, C. – KANIS, J.A. – ODEN, A. – JOHANSSON, H. – JOHNELL, O. – DELMAS, P.** 2005. Body mass index as a predictor of fracture risk: a meta analysis. In: *Osteoporos. Int.*, 16, 2005, s. 1330 – 1338.
- DE VIVO, I. – HANKINSON, S.E. – LI, L. – COLDITZ, G.A. – HUNTER, D.J.** 2002. Association of CYP1B1 polymorphisms and breast cancer risk. In: *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 11, 2002, s. 489 – 492.
- DELMAS, P.D.** 2000. The use of biochemical markers of bone turnover in the management of post-menopausal osteoporosis. In: *Osteoporosis Int.*, 11, 2000, s. 1 – 76.
- DELMAS, P.D.** 2002. Treatment of postmenopausal osteoporosis. In: *Lancet*, 359, 2002, s. 2018 – 2026.
- DELMAS, P.D. – EASTELL, R. – GARNERO, P. – SEIBEL, M.J. – STEPAN, J.** 2000. The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. In: *Osteoporosis Int.*, 6, 2000, s. 2 – 17.
- DIVER, M.J. – IMTIAZ, K.E. – AHMAD, A.M. – VORA, J.P. – FRASER, W.D.** 2003. Diurnal rhythms of serum total, free and bioavailable testosterone and of SHBG in middle-aged men compared with those in young men. In: *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, 58, 2003, s. 710 – 717.
- DUCY, P. – DESBOIS, CH. – BOYCE, B. – PINERO, G. – STORY, B. – DUNSTAN, C. – SMITH, E. – BONADIO, J. – GOLDSTEIN, S. – GUNDBERG, C. – BRADLEY,**

- A. – KARSENTY, G.** 1996. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. In: *Nature*, 382, 1996, s. 448 – 452.
- DVORNYK, V. – LIU, X.H. – SHEN, H. – LEI, S.F. – ZHAO, L.J. – HUANG, Q.R. – QIN, Y.J. – JIANG, D.K. – LONG, J.R. – ZHANG, Y.Y. – GONG, G. – RECKER, R.R. – DENG, H.W.** 2003. Differentiation of Caucasians and Chinese at bone mass candidate genes: implication for ethnic difference of bone mass. In: *Annals of Human Genetics*, 67, 2003, s. 216 – 227.
- ĎURIŠOVÁ, E.** 2004. Osteoporóza – tichý zlodej kostí: Cvičenia pri bolestiach chrbtice. Košice-Myslava: Elena Ďurišová-AKU-HOMEO, 2004. 151 s. ISBN 80-969240-2-8
- EISMA, J.A.** 1999. Genetics of osteoporosis. In: *Endocr. Rev.*, 20, 1999, s. 788 – 804.
- ENSRUD, K.E. – THOMPSON, D.E. – CAULEY, J.A. – NEVITT, M.C. – KADO, D.M. – HOCHBERG, M.C. – SANTORA, A.C. – BLACK, D.M.** 2000. Prevalent vertebral deformities predict mortality and hospitalization in older women with low bone mass. In: *J. Am. Geriatr. Soc.*, 48, 2000, s. 241 – 249.
- ESTABROOK, R.W.** 2003. A passion for P450s (remembrances of the early history of research on cytochrome P450). In: *Drug. Metab. Dispos.*, 31, 2003, s. 1461 – 1473.
- FOROUD, T. – ICHIKAWA, S. – KOLLER, D. – LAI, D. – CURRY, L. – XUEI, X. – EDENBERG, H.J. – HUI, S. – PEACOCK, M. – ECONS, M.J.** 2007. Association studies of ALOX5 and bone mineral density in healthy adults. In: *Osteoporosis International*, 19, 2007, s. 637 – 643.
- FORWOOD, M.R. – OWAN, I. – TAKANO, Y. – TURNER, C.H.** 1996. Increased bone formation in rat tibiae after a single short period of dynamic loading in vivo. In: *Am. J. Physiol.*, 270, 1996, s. 419 – 423.
- FRACTURE PREVENTION IN ADULTS: Osteoporosis and fall prevention.** 2011. [cit. 20. decembra, 2011]
<<http://www.livewelllivelong.com/Fracture%20prevention.html>>
- FUJIWARA, S.** 2005. Epidemiology of osteoporosis. In: *Clin. Calcium.*, 15, 2005, s. 577 – 582.
- GENECARDS – CYP1B1 GC02M038206** [cit. 20. decembra, 2011]
<<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CYP1B1&rf=/home/genecards/current/website/carddisp.pl>>
- GENNARI, L. – MERLOTTI, D. – NUTI, R.** 2011. Aromatase activity and bone loss. In: *Adv. Clin. Chem.*, 54, 2011, s. 129 – 164.
- GONG, G. – HAYNATZKI, G.** 2002. Association between bone mineral density and candidate genes in different ethnic populations and its implications. In: *Calcif. Tissue Int.*, 72, 2002, s. 113 – 123.
- GREGORY, P. – KRAEMER, E. – ZURCHER, G. – GENTINETTA, R. – ROHRBACH, V. – BRODBECK, U. – ANDRES, A.C. – ZIEMIECKI, A. – BUTIKOFER, P.** 2005. GPI-specific phospholipase D (GPI-PLD) is expressed during mouse development and is localized to the extracellular matrix of the developing mouse skeleton. In: *Bone*, 37, 2005, s. 139 – 147.
- GUEGUEN, R. – JOUANNY, P. – GUILLEMIN, F. – KUNTZ, C. – POUREL, J. – SIEST, G.** 1995. Segregation analysis and variance components analysis of bone mineral density in healthy families. In: *J. Bone Miner. Res.*, 12, 1995, s. 2017 – 2022.

- GUNDBERG, C.M. – NISHIMOTO, S.K.** 1999. Vitamin K-dependent proteins of bone and cartilage. In: Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP, eds. *Dynamics of bone and cartilage metabolism*. San Diego: Academic Press.1999. s. 43 – 57.
- HANNA, I.H. – DAWLING, S. – ROODI, N. – GUENGERICH, F.P. – PARL, F.F.** 2000. Cytochrome P4501B1 (CYP1B1) pharmacogenetics: association of polymorphisms with functional differences in estrogen hydroxylation activity. In: *Cancer Res.*, 60, 2000, s. 3440 – 3444.
- HARADA, S. – RODAN, G.A.** 2003. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. In: *Nature*, 423, 2003, s. 349 – 355.
- HARRIS, S.T. – WATTS, N.B. – GENANT, H.K. – MCKEEVER, C.D. – HANGARTNER, T. – KELLER, M. – CHESNUT, C.H. – BROWN, J. – ERIKSEN, E.F. – HOSEYNI, M.S. – AXELROD, D.W. – MILLER, P.D.** 1999. Effects of risedronate treatment on vertebral and nonvertebral fractures in women with postmenopausal osteoporosis: a randomized controlled trial. In: *JAMA*, 282, 1999, s. 1344 – 1352.
- HAYES, C.L. – SPINK, D.C. – SPINK, B.C. – CAO, J.Q. – WALKER, N.J. – SUTTER, T.R.** 1996. 17 β -Estradiol hydroxylation catalyzed by human cytochrome P450 1B1. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 1996, s. 9776 – 9781.
- HERMANN, A.P. – BROT, C. – GRAM, J. – KOLTHOFF, N. – MOSEKILDE, L.** 2000. Premenopausal smoking and bone density in 2015 perimenopausal women. In: *J. Bone Miner. Res.*, 15, 2000, s. 780 – 787.
- HERRMANN, M. – SEIBEL, M.** 2008. The amino- and carboxyterminal crosslinked telopeptides of collagen type I, NTX-I and CTX-I: A comparative review. In: *Clinica Chimica Acta*, 393, 2008, s. 57 – 75.
- HILL, P.A. – ORTH, M.** 1998. Bone remodelling. In: *Br. J. Orthod.*, 25, 1998, s. 101 – 107.
- HIRSCHHORN, J.N. – DALY, M.J.** 2005. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. In: *Nat. Rev. Genet.*, 6, 2005, s. 95 – 108.
- HOLICK, M.F.** 1996. Vitamin D and bone health. In: *J. Nutr.*, 126, 1996, s. 1159 – 1164.
- HOONPONGSIMANON, S. – SANTIPAPMONTHON, M. – CHUNTANA, M.** 2005. Spinal Bone Mineral Density by Quantitative Computed Tomography in Thais Compared with Westerners. In: *J. Med. Assoc. Thai.*, 88, 2005, s. 1666 – 1673.
- HUANG, Q.Y. – RECKER, R.R. – DENG, H.W.** 2003. Searching for osteoporosis genes in the post-genoma era: progress and challenges. In: *Osteoporosis International*, 14, 2003, s. 701 – 715.
- HUGHES, D.E. – DAI, A. – TIFFEE, J.C. – LI, H.H. – MUNDY, G.R. – BOYCE, B.F.** 1996. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF- β . In: *Nat. Med.*, 2, 1996, s. 1132 – 1136.
- HUNTER, D. – DE LANGE, M. – SNIEDER, H. – MACGREGOR, A.J. – SWAMINATHAN, R. – THAKKER, R.V. – SPECTOR, T.D.** 2001. Genetic contribution to bone metabolism, calcium excretion, and vitamin D and parathyroid hormone regulation. In: *J. Bone Miner. Res.*, 16, 2001, s. 371 – 378.

- CHOW, J.W. – CHAMBERS, T.J.** 1994. Indomethacin has distinct early and late actions on bone formation induced by mechanical stimulation. In: *Am. J. Physiol.*, 267, 1994, s. 287 – 292.
- INSTITUTE OF MEDICINE.** 1997. “Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride”, National Academy Press, 1997, s. 151 – 152.
- JENŠOVSKÝ, J.** 2004. Osteoporóza 1994 – 2004, In: *JAMA-CS*, 2, 2004, s. 12.
- JIANG, S.Y. – SHU, R. – XIE, Y.F. – ZHANG, S.Y.** 2010. Age-related changes in biological characteristics of human alveolar osteoblasts. In: *Cell Proliferation*, 43, 2010, s. 464 – 470.
- JOHNELL, O. – KANIS, J.A. – ODEN, A. – JOHANSSON, H. – DE LAET, C. – DELMAS, P. – EISMAN, J.A. – FUJIWARA, S. – KROGER, H.** 2005. Predictive value of BMD for hip and other fractures. In: *J. Bone Miner. Res.*, 20, 2005, s. 1185 – 1194.
- JUNQUEIRA, L.C.X. – CARNEIRO, J. – KELLEY, R.O.** 2002. *Základy histologie*. Praha: H&H, 2002. 502 s. ISBN 80-85787-37-7
- KALENDER W.A.** 1992. Klinik und Methodik der Knochenmineraldichtemessung. S. 78.99. In: Schild H.H., Heller M. (Eds.): *Osteoporose*. Stuttgart. New York, 1992, 236 s.
- KANIS, J.A. – MELTON III, L.J. – CHRISTIANSEN, C. – JOHNSTON, C.C. – KHALTAEV, N.** 1994. The diagnosis of osteoporosis. In: *J. Bone Miner. Res.*, 9, 1994, s. 1137 – 1141.
- KANIS, J.A. – BORGSTROM, F. – DE LAET, C. – JOHANSSON, H. – JOHNELL, O. – JONSSON, B. – ODEN, A. – ZETHRAUES, N. – PFLEGER, B. – KHALTAEV, N.** 2005. Assessment of fracture risk. In: *Osteoporos. Int.*, 16, 2005, s. 581 – 589.
- KAPRIO, J. – RIMPELA, A. – WINTER, T. – VIKEN, R.J. – RIMPELA, M. – ROSE, R.J.** 1995. Common genetic influences on BMI and age at menarche. In: *Hum. Biol.*, 67, 1995, s. 739 – 753.
- KARLSSON, M.K.** 2004. Physical activity, skeletal health and fractures in a long term perspective. In: *J. Musculoskelet. Neuronal. Interact.*, 4, 2004, s. 12 – 21.
- KAUFMAN, J.M. – OSTERTAG, A. – SAINT-PIERRE, A. – COHEN-SOLAL, M. – BOLAND, A. – VAN POTTELBERGH, I. – TOYE, K. – DE VERNEJOU, M.C. – MARTINEZ, M.** 2008. Genome-wide linkage screen of bone mineral density (BMD) in European pedigrees ascertained through a male relative with low BMD values: evidence for quantitative trait loci on 17q21–23, 11q12–13, 13q12–14, and 22q11. In: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 93, 2008, s. 3755 – 3762.
- KILLINGER, Z. – PAYER, J. – BAQI, L. – HRÚZIKOVÁ, P.** 2005. Diagnostika osteoporózy. In: *Via Practica*, 2, 2005, s. 442 – 445.
- KITAMURA, I. – ANDO, F. – KODA, M. – OKURA, T. – SHIMOKATA, H.** 2007. Effects of the interaction between lean tissue mass and estrogen receptor alpha gene polymorphism on bone mineral density in middle-aged and elderly Japanese. In: *Bone*, 40, 2007, s. 1623 – 1629.
- KLABNÍK, A.** 2007. Liečba osteoporózy u žien. In: *Lekárnické listy*, 10, 2007, s. 24 – 29.
- KMEČOVÁ, Z.** 2008. Sekundárna osteoporóza pri zápalových chorobách čreva. In: *Via Practica*, 5, 2008, s. 469 – 471.

- KRISTENSEN, V.N. – BORRESEN-DALE, A.L.** 2000. Molecular epidemiology of breast cancer: genetic variation in steroid hormone metabolism. In: *Mutat. Res.*, 462, 2000, s. 323 – 333.
- KRISTENSEN, V.N. – TSALENKO, A. – GEISLER, J. – FALDAAS, A. – GRENAKER, G.I. – LINGJAERDE, O.C. – FJELDSTAD, S. – YAKHINI, Z. – LØNNING, P.E. – BØRRESEN-DALE, A.L.** 2006. Multilocus analysis of SNP and metabolite data within a given pathway. In: *BMC Genomics*, 7, 2006, s. 5.
- KUIPER, G.G. – ENMARK, E. – PELTO-HUIKKO, M. – NILSSON, S. – GUSTAFSSON, J.A.** 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 1996, s. 5925 – 5930.
- KULAK, C.A.M. – DEMPSTER, D.W.** 2010. Bone histomorphometry: a concise review for endocrinologists and clinicians. In: *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, 54, 2010, s. 87 – 98.
- KUMAR, V. – GREEN, S. – STACK, G. – BERRY, M. – JIN, J.R. – CHAMBON, P.** 1987. Functional domains of the human estrogen receptor. In: *Cell*, 51, 1987, s. 941 – 951.
- KUNG, A.W. – LAI, B.M. – NG, M.Y. – CHAN, V. – SHAM, P.C.** 2006. T-1213C polymorphism of estrogen receptor beta is associated with low bone mineral density and osteoporotic fractures. In: *Bone*, 39, 2006, s. 1097 – 1106.
- LANDI, M.T. – BERGEN, A.W. – BACCARELLI, A. – PATTERSON, D.G. – GRASSMAN, J. – TER-MINASSIAN, M. – MOCARELLI, P. – CAPORASO, N. – MASTEN, S.A. – PESATORI, A.C. – PITTMAN, G.S. – BELL, D.A.** 2005. CYP1A1 and CYP1B1 genotypes, haplotypes, and TCDD-induced gene expression in subjects from Seveso, Italy. In: *Toxicology*, 207, 2005, s. 191 – 202.
- LEAN, J.M. – JAGGER, C.J. – CHAMBERS, T.J. – CHOW, J.W.** 1995. Increased insulin-like growth factor I mRNA expression in rat osteocytes in response to mechanical stimulation. In: *Am. J. Physiol.*, 268, 1995, s. 318 – 327.
- LEE, A.J. – CAI, M.X. – THOMAS, P.E. – CONNEY, A.H. – ZHU, B.T.** 2003. Characterization of the oxidative metabolites of 17 β -estradiol and estrone formed by 15 selectively expressed human cytochrome p450 isoforms. In: *Endocrinology*, 144, 2003, s. 3382 – 3398.
- LEES, S.** 2003. Mineralization of type I collagen. In: *Biophys.*, 85, 2003, s. 204 – 207.
- LERNER, U.H.** 2006. Bone Remodeling in Post-menopausal Osteoporosis. In: *J. Dent. Res.*, 85, 2006, s. 584 – 595.
- LI, J.J. – LI, S.A. – OBERLEY, T.D. – PARSONS, J.A.** 1995. Carcinogenic activities of various steroidal and nonsteroidal estrogens in the hamster kidney: relation to hormonal activity and cell proliferation. In: *Cancer Res.*, 55, 1995, s. 4347 – 4351.
- LIAN, J. – STEIN, G.** 2001. Osteoblast biology. In: Marcus, R. – Feldman, D. – Kelsey, J. *Osteoporosis*. 2. vyd. San Diego, California : Academic Press, 2001. s. 21 – 71.
- LIU, Y.Z. – LIU, Y.J. – RECKER, R.R. – DENG, H.W.** 2003. Molecular studies of identification of genes for osteoporosis: the 2002 update. In: *Journal of Endocrinology*, 177, 2003, s. 147 – 196.
- LIU, Y.J. – SHEN, H. – XIAO, P. – XIONG, D.H. – LI, L.H. – RECKER, R.R. – DENG, H.W.** 2006. Molecular genetic studies of gene identification for osteoporosis: a 2004 update. In: *Journal of Bone and Mineral Research*, 21, 2006, s. 1511 – 1535.

- LONG, J.R. – SHU, X.O. – CAI, Q. – CAI, H – GAO, Y.T. – JIN, F. – ZHENG, W.** 2006. Polymorphisms of the CYP1B1 gene may be associated with the onset of natural menopause in Chinese women. In: *Maturitas*, 55, 2006, s. 238 – 246.
- MAILLEFERT, J.F. – SIBILIA, J. – MICHEL, F. – SAUSSINE, C. – JAVIER, R.M. – TAVERNIER, C.** 1999. Bone mineral density in men treated with synthetic gonadotropin-releasing hormone agonists for prostatic carcinoma. In: *J. Urol.*, 161, 1999, s. 1219 – 1222.
- MARKS, S.C. – ODGREN, P.R.** 2002. Structure and Development of the Skeleton. In: *Principles of Bone Biology*, 1, 2002, s. 1 – 13.
- MASARYK, P.** 2005. Epidemiológia osteoporózy. In: *Via Practica*, 11, 2005, s. 439 – 441.
- MCLELLAN, R.A. – OSCARSON, M. – HIDESTRAND, M. – LEIDVIK, B. – JONSSON, E. – OTTER, C. – INGELMAN-SUNDBERG, M.** 2000. Characterization and functional analysis of two common human cytochrome P450 1B1 variants. In: *Arch. Biochem. Biophys.*, 378, 2000, s. 175 – 181.
- MEIER, D.E. – LUCKEY, M.M. – WALLENSTEIN, S. – LAPINSKI, R.H. – CATHERWOOD, B.** 1992. Racial differences in pre- and postmenopausal bone homeostasis: association with bone density. In: *J. Bone Miner. Res.*, 7, 1992, 1181 – 1189.
- MELTON III, L.J. – CHRISCHILLES, E.A. – COOPER, C. – LANE, A.W. – RIGGS, B.L.** 1992. How Many Women Have Osteoporosis. In: *J. Bone Miner. Res.*, 7, 1992, s. 1005 – 1010.
- MELTON III, L.J. – LANE, A.W. – COOPER, C. – EASTELL, R. – O’FALLON, W.M. – RIGGS, B.I.** 1993. Prevalence and incidence of vertebral deformities. In: *Osteoporosis Int.*, 3, 1993, s. 113 – 119.
- MIKI, Y. – NAKATA, T. – SUZUKI, T. – DARNEL, A.D. – MORIYA, T. – KANEKO, C. – HIDAKA, K. – SHIOTSU, Y. – KUSAKA, H. – SASANO, H.** 2002. Systemic distribution of steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase an human adult and fetal tissues. In: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 87, 2002, s. 5760 – 5768.
- MITHAL, A. – MALHOTRA, N.** 2006. Osteoporosis: Key Issues in Management. In: *Apollo. Medicine.*, 3, 2006, s. 189 – 196.
- MORTON, N.E. – COLLINS, A.** 1998. Tests and estimates of allelic association in complex inheritance. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 1998, s. 11389 – 11393.
- MYERS, E.R. – WILSON, S.E.** 1997. Biomechanics of osteoporosis and vertebral fracture. In: *Spine*, 22, 1997, s. 25 – 31.
- NAPOLI, N. – RINI, G.B. – SERBER, D. – GIRI, T. – YARRAMANENI, J. – BUCCHIERI, S. – CAMARDA, L. – DI FEDE, G. – CAMARDA, M.R. – JAIN, S. – MUMM, S. – ARMAMENTO-VILLAREAL, R.** 2009. The Val432Leu polymorphism of the CYP1B1 gene is associated with differences in estrogen metabolism and bone density. In: *Bone*, 44, 2009, s. 442 – 448.
- NAWATA, H. – TANAKA, S. – TAKAYANAGI, R. – SAKAI, Y. – YANASE, T. – IKUYAMA, S. – HAJI, M.** 1995. Aromatase in bone cell: Association with osteoporosis in postmenopausal women. In: *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 53, 1995, s. 165 – 174.
- NEER, R.M. – ARNAUD, C.D. – ZANCHETTA, J.R. – PRINCE, R. – GAICH, G.A. – REGINSTER, J.Y. – HODSMAN, A.B. – ERIKSEN, E.F. – ISH-SHALOM, S. –**

- GENANT, H.K.** 2001. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. In: *N. Engl. J. Med.*, 344, 2001, s. 1434 – 1441.
- NELSON, D.R. – KOYAMANS, L. – KAMATAKI, T. – STEGEMAN, J.J. – FREYEREISEN, R. – WAXMAN, D.J. – WATERMAN, M.R. – GOTOH, O. – COON, M.J. – ESTABROOK, R.W. – GUNSALUS, I. – NEBERT, D.W.** 1996. P450 superfamily: update on new sequence, genemapping, accession numbers and nomenclature. In: *Pharmacogenetics*, 6, 1996, s. 1 – 42.
- NEVITT, M.C. – CUMMINGS, S.R. – THE STUDY OF OSTEOPOROTIC FRACTURES RESEARCH GROUP.** 1993. Type of fall and risk of hip and wrist fractures. In: *J. Am. Geriatr. Soc.*, 41, 1993, s. 163 – 171.
- NIMNI, B.S. – BERNICK, S. – PAULE, W. – NIMNI, M.E.** 1993. Changes in the ratio of non-calcified collagen to calcied collagen in human vertebrae with advancing age. In: *Conn. Tissue Res.*, 29, 1993, s. 133 – 140.
- ORWOLL, E.S.** 1996. Androgens. In: Bilezikian, J.P. – Raisz, L.G. – Rodan, G.A. *Principles of Bone Biology*, Academic Press: JP San Diego, CA. s. 563 – 580.
- ORWOLL, E.S.** 2001. Androgens: Basic Biology and Clinical Implication. In: *Calcif. Tissue Int.*, 69, 2001, s. 185 – 188.
- OSTEOPOROSIS.** 2011. [cit. 30. novembra 2011]
< <http://medicalphase.com/?p=567> >
- OTSUKA, E. – KATO, Y. – HIROSE, S. – HAGIWARA, H.** 2000. Role of ascorbic acid in the osteoclast formation: Induction of osteoclast differentiation factor with formation of the extracellular collagen matrix. In: *Endocrinology*, 141, 2000, s. 3006 – 3011.
- OWEN, R.A. – MELTON III, L.J. – JOHNSON, K.A. – ILSTRUP, D.M. – RIGGS, B.L.** 1982. Incidence of Colles fracture in a North American community. In: *Am. J. Public Health*, 72, 1982, s. 605 – 607.
- PARFITT, A.M. – MATHEWS, C.H.E. – VILLANUEVA, A.R. – KLEEREKOPER, M.** 1983. Relationships between Surface, Volume, and Thickness of Iliac Trabecular Bone in Aging and in Osteoporosis. In: *J. Clin. Invest.*, 72, 1983, s. 1396 – 1409.
- PASTINA, I., GIOVANNETTI, E., CHIONI, A., SISSUNG, T.M., CREA, F., ORLANDINI, C., PRICE, D.K., CIANCI, C., FIGG, W.D., RICCI, S., DANESI, R.** 2010. Cytochrome 450 1B1 (CYP1B1) polymorphisms associated with response to docetaxel in Castration-Resistant Prostate Cancer (CRPC) patients. In: *BMC Cancer*, 10, 2010, s. 511.
- PAYER, J. – BAQI, L. – KILLINGER, Z.** 2006. Klimaktérium a kost': Hormonálna substitučná liečba v prevencii a liečbe osteoporózy. In: *Via Practica*, 6, 2006, s. 290 – 292.
- PAZ, J. – WADE, K. – KIYOSHIMA, T. – SODEK, J. – TANG, J. – TU, Q. – YAMAUCHI, M. – CHEN, J.** 2005. Tissue- and bone cell-specific expression of bone sialoprotein is directed by a 9.0 kb promoter in transgenic mice. In: *Matrix. Biol.*, 24, 2005, s. 341 – 352.
- PORTER, T.D. – COON, M.J.** 1991. Cytochrome P450: multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. In: *J. Biol. Chem.*, 266, 1991, s. 13469 – 13472.

- QUAN, J.** 2007. Relationship between Single Nucleotide Polymorphisms in CYP1A1 and CYP1B1 Genes and Bone Mineral Density in Postmenopausal Japanese Women on Hormone Replacement Therapy. In: *Acta Medica et Biologica*, 55, 2007, s. 17 – 22.
- QUARTO, R. – THOMAS, D. – LIANG, C.T.** 1995. Bone progenitor cell deficits and the age associated decline in bone repair capacity. In: *Calcif. Tissue Int.*, 56, 1995, s. 123 – 129.
- RAISZ, L.** 1990. Recent Advances in Bone Cell Biology: Inter-action of Vitamin D with other Local and Systemic Factors. In: *Bone Mineral.*, 9, 1990, s. 191 – 197.
- RALSTON, S.H.** 1997. The genetics of osteoporosis. In: *QJM*, 90, 1997, s. 247 – 251.
- RALSTON, S.H.** 2002. Genetic control of susceptibility of osteoporosis. In: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 87, 2002, s. 2460 – 2466.
- RASMUSSEN, H.M. – DAWSON-HUGHES, B. – HARRIS, S. – KRAMICH, C. – DALLAL, G.** 1993. Calcium retention and hormone levels in black and white woman on high and low calcium diets. In: *J. Bone Miner. Res.*, 8, 1993, s. 779 – 786.
- RHO, J. – TAKAMI, M. – CHOI, Y.** 2005. Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeletal Systems. In: *Mol. Cells*, 17, 2005, s. 1 – 9.
- RIGGS, B.L. – KHOSLA, S. – MELTON, L.J.** 2002. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. In: *Endocr. Rev.*, 23, 2002, s. 279 – 302.
- RISCH, N. – MERIKANGAS, K.** 1996. The future of genetic studies of complex human diseases. In: *Science*, 273, 1996, s. 1516 – 1517.
- RITTWEGER, J.** 2006. Can exercise prevent osteoporosis? In: *J. Musculoskelet. Neuronal. Interact.*, 6, 2006, s. 162 – 166.
- ROBEY, P.G. – BOSKEY, A.L.** 2008. The Composition of Bone. In: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, 2008, s. 22 – 27. ISBN 978-0-9778882-1-4
- ROODMAN, G.D.** 1996. Advances in bone biology, the osteolast. In: *Endocr. Rev.*, 17, 1996, s. 308 – 332.
- ROSEN, C.J. – HOCHBERG, M.C. – BONNICK, S.L. – MCCLUNG, M. – MILLER, P. – BROY, S. – KAGAN, R. – CHEN, E. – PETRUSCHKE, R.A. – THOMPSON, D.E. – DE PAPP, A.E. – FOSAMAX ACTONEL COMPARISON TRIAL INVESTIGATORS.** 2005. Treatment with once-weekly alendronate 70 mg compared with once-weekly risedronate 35 mg in women with postmenopausal osteoporosis: a randomized double-blind study. In: *J. Bone Miner. Res.*, 20, 2005, s. 141 – 151.
- ROSSERT, J. – DE CROMBRUGGHE, B.** 2002. Type I collagen: Structure, synthesis and regulation. In: *Principles of Bone Biology*, 1, 2002, s. 189 – 210.
- RUDE, R.K. – GRUBER, H.E.** 2004. Magnesium deficiency and osteoporosis: animal and human observations. In: *J. Nutrit. Biochem.*, 15, 2004, s. 710 – 716.
- RYLANDER-RUDQVIST, T. – WEDRÉN, S. – JONASDOTTIR, G. – AHLBERG, S. – WEIDERPASS, E. – PERSSON, I. – INGELMAN-SUNDBERG, M.** 2004. Cytochrome P450 1B1 Gene Polymorphisms and Postmenopausal Endometrial Cancer Risk. In: *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 13, 2004, s. 1515 – 1520.
- SALINAS-SÁNCHEZ, A.S. – SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, F. – DONATE-MORENO, M.J. – RUBIO-DEL-CAMPO, A. – SERRANO-OVIEDO, L. BIOL, B.A. –**

- GIMENEZ-BACHS, J.M. – MARTÍNEZ-SANCHIZ, C. – SEGURA-MARTÍN, M – ESCRIBANO, J.** 2011. *GSTT1, GSTM1, and CYP1B1* gene polymorphisms and susceptibility to sporadic renal cell cancer. In: *Urologic Oncology*, Article in press. [cit. 9. januára 2012]
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21458313>>
- SAMBROOK, J. – FRITSCH, E.F. – MANIATIS, T.** 1989. *Molecular cloning: A laboratory Manual*. 2nd ed. Cold-Spring Harbor Lab., New York, 1989, s. 315 – 321.
- SHIMADA, T. – WATANABE, J. – KAWAJIRI, K. – SUTTER, T.R. – GUENGERICH, F.P. – GILLAM, E.M. – INOUE, K.** 1999. Catalytic properties of polymorphic human cytochrome P450 1B1 variants. In: *Carcinogenesis*, 20, 1999, s. 1607 – 1613.
- SCHOLZ-AHRENS, K.E. – SCHREZENMEIR, J.** 2004. Ernährung und Osteoporoseprävention. In: *Ernährungs-Umschau*, 51, 2004, s. 22 – 26.
- SCHRAGER, S.** 2003. Osteoporosis Prevention in Primary Care. In: *Wisconsin Medical Journal*, 102, 2003, s. 52 – 55.
- SIITERI, P.K.** 1987. Adipose tissue as a source of hormones. In: *Am. J. Clin. Nutr.*, 45, 1987, s. 277 – 282.
- SIKAVITSAS, V.I. – TEMENOFF, J.S. – MIKOS, A.G.** 2001. Biomaterials and bone mechanotransduction. In: *Biomaterials*, 19, 2001, s. 2581 – 2593.
- SIMON, J.A. – HUDES, E.S.** 2001. Relation of Ascorbic Acid to Bone Mineral Density and Self-reported Fractures among US Adults. In: *American Journal of Epidemiology*, 154, 2001, s. 427 – 433.
- SINGER, F.R. – EYRE, D.R.** 2008. Using biochemical markers of bone turnover in clinical practice. In: *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 75, 2008, s. 739 – 750.
- SMITH, M.R.** 2002. Osteoporosis during androgen deprivation therapy for prostate cancer. In: *Urology*, 60, 2002, s. 79 – 85.
- SNIEDER, H. – MACGREGOR, A.J. – SPECTOR, T.D.** 1998. Genes control the cessation of a woman's reproductive life: A twin study of hysterectomy and age at menopause. In: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 83, 1998, s. 1875 – 1880.
- SOJKA, J.E. – WEAVER, C.M.** 1995. Brief critical reviews: magnesium supplementation and osteoporosis. In: *Nutr. Rev.*, 53, 1995, s. 71 – 74.
- SPATZENEGGER, M. – JAEGER, W.** 1995. Clinical importance of hepatic cytochrome P450 in drug metabolism. In: *Drug Metab. Rev.*, 27, 1995, s. 397 – 417.
- STANČÍKOVÁ, M. – IŠTOK, R. – MASARYK, P. – LETKOVSKÁ, A. – ROVENSKÝ, J.** 1997. Laboratórne vyšetrovacie metódy kostného metabolizmu. In: *Časopis pre otázky pohybového ústrojenstva a spojiva*, 11, 1997, s. 1 – 10.
- STAVNÝ, J.** 2011. Kostné markery: N- MID Osteokalcín, beta-CrossLaps a total P1NP. In: *Klinická biochémia*, [cit. 29. decembra 2011]
<<http://klinickabiochemia.sk/download/infolisty/pp/20080214.pdf>>
- STEPAN, J. J. – LACHMAN, M. – ZVERINA, J. – PACOVSKY, V. – BAYLINK, D. J.** 1989. Castrated men exhibit bone loss: effect of calcitonin treatment on biochemical indices of bone remodeling. In: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 69, 1989, s. 523 – 527.

- STIBOROVÁ, M. – HUDEČEK, J. – HODEK, P. – FREI, E.** 1999. Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. In: *Chem. Listy*, 93, 1999, s. 229 – 237.
- STOILOV, I. – AKARSU, A.N. – ALOZIE, I. – CHILD, A. – BARSOUM-HOMSY, M. – TURACLI, M.E. – OR, M. – LEWIS, R.A. – OZDEMIR, N. – BRICE, G. – AKTAN, S.G. – CHEVRETTE, L. – COCA-PRADOS, M. – SARFARAZI, M.** 1998. Sequence analysis and homology modeling suggest that primary congenital glaucoma on 2p21 results from mutations disrupting either the hinge region or the conserved core structures of cytochrome P4501B1. In: *Am. J. Hum. Genet.*, 62, 1998, s. 573 – 584.
- SUDA, T. – UENO, Y. – FUJII, K. – SHINKI, T.** 2003. Vitamin D and bone. In: *J. Cell Biochem.*, 88, 2003, s. 259 – 266.
- SWERDLOFF, R.S. – WANG, C.** 1993. Androgen and aging in men. In: *Experimental Gerontology*, 28, 1993, s. 435 – 446.
- ŠTEŇOVÁ, E. – ŠTEŇO, B. – BAQI, L.** 2008a. Možnosti prevencie a liečby primárnej osteoporózy v ambulancii lekára prvého kontaktu. In: *Ambulantná terapia*, 6, 2008, s. 19 – 22.
- ŠTEŇOVÁ, E. – ŠTEŇO, B. – BRNKA, R.** 2008b. Diagnostika a liečba sekundárnej osteoporózy. In: *Súč. Klin. Pr.*, 2, 2008, s. 46 – 51.
- TANG, Y.M. – WO, Y.Y. – STEWART, J. – HAWKINS, A.L. – GRIFFIN, C.A. – SUTTER, T.R. – GREENLEE, W.F.** 1996. Isolation and characterization of the human cytochrome P450 CYP1B1 gene. In: *J. Biol. Chem.*, 271, 1996, s. 28324 – 28330.
- TANG, Y.M. – CHEN, G.F. – THOMPSON, P.A. – LIN, D.X. – LANG, N.P. – KADLUBAR, F.F.** 1999. Development of an antipeptide antibody that binds to the C-terminal region of human CYP1B1. In: *Drug Metab. Dispos.*, 27, 1999, s. 274 – 280.
- TENOVER, J.L.** 1999. Testosterone replacement therapy in older adult men. In: *Int. J. Androl.*, 22, 1999, s.300 – 306.
- TOMKOVÁ, S. – TELEPKOVÁ, D.** 2005. Sekundárna osteoporóza. In: *Via practica*, 2, 2005, 11, s. 446 – 449.
- TOPIĆ, E. – PRIMORAC, D. – JANKOVIĆ, S.** 2004. Medicinsko-biokemijska dijagnostika u kliničkoj praksi. Zagreb: Medicinska Naklada, Hrvatska, 2004, s. 288 – 303.
- UDAGAWA, N. – TAKAHASHI, N. – AKATSU, H. – SASAKI, T. – NISHIHARA, T. – KOGA, T. – MARTIN, T.J. – SUDA, T.** 1990. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 1990, s. 7260 – 7264.
- VAANANEN, H.K. – HORTON, M.** 1995. The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure. In: *J. Cell Sci.*, 108, 1995, s. 2729 – 2732.
- VANDERSCHUEREN, D. – VANDENPUT, L. – BOONEN, S. – LINDBERG, M.K. – BOUILLON, R. – OHLSSON, C.** 2004. Androgens and Bone. In: *Endocrine Reviews*, 25, 2004, s. 389 – 425.
- VESPER, H. – COSMAN, F. – ENDRES, D.B. – GARNERO, P. – HOYLE, N.R. – KLEEREKOPER, M. – MALLINAK, N.J.S.** 2004. Application of Biochemical Markers of Bone Turnover in the Assessment and Monitoring of Bone Diseases; Approved Guideline. In: *NCCLS*, 24, 2004, s. 4 – 9.

- WATSON, J.D.** 2002. Osteoprotegerin gene polymorphism and the risk of osteoporosis and vascular disease. In: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 87, 2002, s. 4078 – 4079.
- WATSON, R.R. – HULS, A. – ARAGHINIQUAM, M. – CHUNG, S.** 1996. Dehydroepiandrosterone and diseases of aging. In: *Drugs and Aging*, 9, 1996, s. 274 – 291.
- WATTS, B.N.** 1999. Clinical Utility of Biochemical Markers of Bone Remodeling. In: *Clin. Chem.*, 45, 1999, s. 1359 – 1368.
- WEAVER, C.M.** 1992. Calcium bioavailability and its relation to osteoporosis. In: *Soc. Exp. Biol. Med.*, 200, 1992, s. 157 – 160.
- WEHREN, L.E. – MAGAZINER, J.** 2003. Hip fracture: risk factors and outcomes. In: *Curr. Osteoporosis Rep.*, 2, 2003, s. 78 – 85.
- WEISZ, J. – BUI, Q.D. – ROY, D. – LIEHR, J.G.** 1992. Elevated 4-hydroxylation of estradiol by hamster kidney microsomes: a potential pathway of metabolic activation of estrogens. In: *Endocrinology*, 131, 1992, s. 655 – 661.
- WEN, W. – CAI, Q. – SHU, X.O. – CHENG, J.R. – PARL, F. – PIERCE, L. – GAO, Y.T. – ZHENG, W.** 2005. Cytochrome P450 1B1 and Catechol-O-Methyltransferase Genetic Polymorphisms and Breast Cancer Risk in Chinese Women: Results from the Shanghai Breast Cancer Study and a Meta-analysis. In: *Epidemiol. Biomarkers. Prev.*, 14, 2005, s. 329 – 335.
- WHO.** 2003. Prevention and management of osteoporosis. In: *WHO Technical Report Series 921*. Geneva, 2003.
- WILLAERT, A. – VAN POTTELBERGH, I. – ZMIERCZAK, H. – GOEMAERE, S. – KAUFMAN, J.M. – DE PAEPE, A. – COUCKE, P.** 2008. A genome-wide linkage scan for low spinal bone mineral density in a single extended family confirms linkage to 1p36.3. In: *Eur. J. Hum. Genet.*, 16, 2008, s. 970 – 976.
- WILLIAMS, F.M.K. – SPECTOR, T.D.** 2007. The genetics of osteoporosis. In: *Acta Reum. Port.*, 32, 2007, s. 231 – 240.
- XIONG, D.H. – SHEN, H. – ZHAO, L.J. – XIAO, P. – YANG T.L. – GUO, Y. – WANG, W. – GUO, Y.F. – LIU, Y.J. – RECKER, R.R. – DENG, H.W.** 2006. Robust and comprehensive analysis of 20 osteoporosis candidate genes by very high-density single nucleotide polymorphism screen among 405 white nuclear families identified significant association and gene-gene interaction. In: *Journal of Bone and Mineral Research*, 21, 2006, s. 1678 – 1695.
- XU, X.H. – DONG, S.S. – GUO, Y. – YANG, T.L. – LEI, S.F. – PAPASIAN, C.J. – ZHAO, M. – H.W. DENG.** 2010. Molecular Genetic Studies of Gene Identification for Osteoporosis: The 2009 Update. In: *Endocrine Reviews*, 31, 2010, s. 447 – 505.
- YAN, H. – LIU, Y.J. – ZHOU, Q. – XIAO, P. – RECKER, R.R. – DENG, H.W.** 2009. Comparison of whole genome linkage scans in premenopausal and postmenopausal women: no bone-loss specific QTLs were implicated. In: *Osteoporos. Int.*, 20, 2009, s. 771 – 777.
- YANG, Z. – GRIFFITH, J.F. – LEUNG, P.C. – LEE, R.** 2011. Effect of Osteoporosis on Morphology and Mobility of the Lumbar Spine: Results. [cit. 30. novembra 2011] <http://www.medscape.com/viewarticle/587904_3>

- YANASE, T. – SIMPSON, E.R. – WATERMAN, M.R.** 1991. 17 α -hydroxylase/17,20-lyase deficiency: from clinical investigation to molecular definition. In: *Endocr. Rev.*, 12, 1991, s. 91 – 108.
- YOUM, T. – KOVAL, K.J. – KUMMER, F.J. – ZUCKERMAN, J.D.** 1999. Do all hip fractures result from a fall? In: *Am. J. Orthop.*, 28, 1999, s. 190 – 194.
- YOUNG, M.F. – BI, Y. – AMEYE, L. – XU, T. – WADHWA, S. – HEEGAARD, A. – KILTS, T. – CHEN, X.D.** 2006. Small leucine-rich proteoglycans in the aging skeleton. In: *J. Musculoskelet. Neuronal. Interact.*, 6, 2006, s. 364 – 365.
- ZAFEIRAKIS, A.** 2010. Collagenous and non-collagenous biochemical markers of bone metastases from prostate cancer. In: *Hippokratia*, 14, 2010, s. 164 – 169.
- ZHANG, F. – XIAO, P. – YANG, F. – SHEN, H. – XIONG, D.H. – DENG, H.Y. – PAPASIAN, C.J. – DREES, B.M. – HAMILTON, J.J. – RECKER, R.R. – DENG, H.W.** 2008. A whole genome linkage scan for QTLs underlying peak bone mineral density. In: *Osteoporos. Int.*, 19, 2008, s. 303 – 310.
- ZHENG, W. – XIE, D.W. – JIN, F. – CHENG, J.R. – DAI, Q. – WEN, W.Q. – SHU, X.O. – GAO, Y.T.** 2000. Genetic polymorphism of cytochrome P450-1B1 and risk of breast cancer. In: *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 9, 2000, s. 147 – 150.
- ZHU, W. – ROBEY, P.G. – BOSKEY, A.L.** 2007. The regulatory role of matrix proteins in mineralization of bone. In: *Osteoporosis*, 1, 2007, s. 191 – 240.
- ZITTERMANN, A.** 2007. Osteoporose. In: *Ernährungs-Umschau*, 54, 2007, s. 33 – 38.