Polimorfizmy *BsmI* i *FokI* genu dla receptora witaminy D a parametry gospodarki wapniowo-fosforowej u dzieci z regionu łódzkiego

Vitamin D receptor gene (*BsmI* and *FokI*) polymorphism and calcium-phosphorus indices in children from Lodz region

¹Elżbieta Jakubowska-Pietkiewicz, ²Wojciech Fendler, ¹Maciej Porczyński,
¹Danuta Chlebna-Sokół

¹Klinika Propedeutyki Pediatrii i Chorób Metabolicznych Kości

²Klinika Pediatrii, Onkologii, Hematologii i Diabetologii

¹Department of Paediatric Propedeutics and Bone Metabolism Diseases, Medical University, Lodz ²Department of Pediatrics, Oncology, Hematology and Diabetology Medical University of Lodz

Słowa kluczowe

BsmI, *FokI*, gen dla receptora witaminy D (VDR), dzieci, gospodarka wapniowo-fosforowa

Key words

BsmI, *FokI*, Vitamin D receptor gene (VDR), children, calcium-phosphorus indices

Streszczenie

Wstęp. Gospodarka wapniowo-fosforowa, w tym stężenie metabolitu wątrobowego i nerkowego witaminy D, podlega licznym regulacjom hormonalnym i genetycznym. Jednym z wielu czynników genetycznych może być gen dla receptora witaminy D (*VDR*). Celem pracy była ocena związku pomiędzy wskaźnikami gospodarki wapniowo-fosforowej a wybranymi polimorfizmami *VDR* u dzieci. **Pacjenci i metody.** Badania przeprowadzono u 395 dzieci w wieku od 6 do 18 lat. U wszystkich przeprowadzono metodą PCR-RFLP genotypowanie miejsc polimorficznych rs1544410 (*BsmI*) i rs2228570 (*FokI*) w obrębie genu *VDR*. 294 dzieci było grupą porównawczą w badaniu częstości poszczególnych genotypów, a u 161 oceniono parametry gospodarki wapniowo-fosforowej oraz markery obrotu kostnego (osteokalcyny i N-końcowego telopeptydu kolagenu typu I) zgodnie z przyjętymi metodami. W grupie badanej wykonano badanie densytometryczne kości metodą DXA w programie Total body i Spine. Analizy statystycznej związku pomiędzy ocenianymi wynikami badań dokonano przy pomocy pakietu Statistica 8.0 PL. **Wyniki.** Średnie wyniki badań gospodarki wapniowo-fosforowej w surowicy w całej badanej grupie dzieci ($n=161$) mieściły się w granicach wartości referencyjnych, tylko u 12/161 stwierdzono obniżenie stężenia 25OHD poniżej 20 ng/ml. Najniższe,

Abstract

Introduction. Maintenance of calcium-phosphorus indices, including liver and renal metabolites of vitamin D, is regulated extensively hormonally and genetically. One of many possible genetic factors is vitamin D receptor (*VDR*) gene. The study aimed at evaluating the relationship between calcium-phosphorus indices and selected *VDR* polymorphism in children. **Patients and methods.** The study group consisted of 395 children, aged 6 to 18. All of them underwent gene typing using the PCR-RFLP method within polymorphic loci *BsmI* (rs1544410) and *FokI* (rs2228570) of the *VDR* receptor gene. Comparative group for incidence of particular genotypes consisted of 294 children, while 161 patients were evaluated for calcium-phosphorus indices and bone turnover markers (osteocalcin and N-terminal telopeptide of type I collagen) using standard methods. Skeletal densitometry (Total body and Spine programmes) examination using DXA method was carried out within study group. Statistica 8.0 PL was used for statistical analysis of relationship between evaluated results. **Results.** Average test results of serum calcium-phosphorus indices within the whole study group ($n=161$) fell within reference limits, only 12/161 results with concentration of 25OHD fell under 20mg/ml. The lowest, but nevertheless within reference limits, concentration of osteocalcin was observed in

ale także w granicach normy, stężenie osteokalcyny stwierdzono u dzieci z osteoporozą. Nosicielstwo allele A polimorfizmu rs1544410 (*BsmI*) oraz allele T polimorfizmu rs10735810 (*FokI*) u dzieci z małą masą kostną związane było z wydalaniem jonów z moczem. Allel T u dzieci z osteoporozą łączył się także z wyższymi stężeniami wapnia ($p=0,0190$) i osteokalcyny ($p=0,0833$) w surowicy krwi. **Podsumowanie.** Polimorfizmy rs1544410 (enzym restrykcyjny *BsmI*) i rs10735810 (*FokI*) genu dla receptora witaminy D nie wpływają bezpośrednio na gospodarkę wapniowo-fosforanową i tempo obrotu kostnego w badanej grupie dzieci.

Endokrynol. Ped. 2016.15.3.56.31-40.
© Copyright by PTEIDD 2016

Wstęp

Gospodarka mineralna organizmu podlega silnej regulacji hormonalnej z udziałem kalcytoniny, parathormonu oraz kalcytriolu – aktywnego biologicznie metabolitu nerkowego witaminy D. Receptorowy mechanizm działania $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ umożliwia tę regulację poprzez klasyczne narządy: jelito, kości, nerki i przytarczycę (działanie endokrynne). Kalcytriol po związaniu z jądrowym receptorem VDR, a następnie bezpośrednim wiązaniem z DNA reguluje także aktywność wielu innych genów (działanie pleiotropowe), m.in. w tkance mięśniowej, tłuszczowej, skórze, komórkach nowotworowych, limfocytach B i T oraz gruczołach dokrewnych [1,2]. Synteza kalcytriolu jest ograniczona dostępnością kalcydiolu (25OHD) – metabolitu syntetyzowanego w wątrobie, dlatego jego stężenie jest uważane za najlepszy wykładnik zaopatrzenia organizmu w witaminę D [1,3]. Zgodnie z aktualną wiedzą stężenie optymalne 25OHD wynosi $>30\text{--}50\text{ ng/ml}$ ($>75\text{--}125\text{ nmol/l}$), a deficyt rozpoznawany jest poniżej 20 ng/ml [3,4].

Gen dla receptora dla witaminy D jest łączy z osteoporozą i niską masą kostną właśnie poprzez jego wpływ na gospodarkę wapniowo-fosforanową, mineralizację szkieletu i podatność kości na złamania. W tym aspekcie endokrynnym analizowane są m.in. takie polimorfizmy VDR, jak rs1544410 rozpoznawany przez enzym restrykcyjny *BsmI* oraz rs2228570 identyfikowany przez enzym *FokI* [5,6,7].

W niniejszej pracy przedstawiono tylko część wyników badań projektu badawczego, którego podstawowym celem była ocena znaczenia zmienności VDR w etiologii niskiej masy kostnej

children with osteoporosis. 'A' allele of the rs1544410 (*BsmI*) and 'T' allele of the rs10735810 (*FokI*) polymorphisms in children with low bone mass were related to ions presence in urine. The 'T' allele in children suffering from osteoporosis was also associated with higher calcium ($p=0,0190$) as well as osteocalcin ($p=0,0833$) concentration in blood serum. **Conclusion.** The rs1544410 (restriction enzyme *BsmI*) and rs10735810 (*FokI*) polymorphisms of Vitamin D receptor do not affect calcium-phosphorus indices and rapidity of bone turnover in the study group.

Pediatr. Endocrinol. 2016.15.3.56.31-40.
© Copyright by PTEIDD 2016

u dzieci i młodzieży. Utrzymano w niej podział pacjentów na grupy: odniesienia, z niską masą kostną i osteoporozą oraz zwrócono uwagę na relacje pomiędzy wskaźnikami gospodarki wapniowo-fosforanowej i markerami obrotu kostnego a polimorfizmami genu dla receptora witaminy D, rozpoznawanymi przez enzymy restrykcyjne *FokI* i *BsmI*.

Pacjenci i metody

Grupę badaną stanowiło 395 dzieci w wieku od 6 do 18 lat. U wszystkich przeprowadzono metodą PCR-RFLP genotypowanie miejsc polimorficznych *BsmI* (rs1544410), *FokI* (rs2228570) w obrębie genu VDR. Badania przeprowadzono w Pracowni Immunopatologii i Genetyki Kliniki Pediatrii, Onkologii, Hematologii i Diabetologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Grupę porównawczą w badaniu częstości poszczególnych genotypów stanowiło 294 dzieci wyselekcjonowanych z komputerowej bazy danych Pracowni Immunopatologii i Genetyki. W tabeli I przedstawiono sekwencje primerów oligonukleotydowych wykorzystanych do amplifikacji DNA fragmentów genomu otaczających badane miejsca polimorficzne.

U 161 pacjentów oceniono stężenie wapnia, fosforu i magnezu w surowicy krwi oraz ich dobowe wydalanie z moczem zgodnie z ogólnie przyjętymi metodami.

Metabolit wątrobowy witaminy D: 25OHD był oznaczony metodą radioimmunoenzymatyczną, $25(\text{OH})_2\text{D}$ oznaczano metodą ELISA a jej zakres referencyjny dla dzieci do 12 lat: $23\text{--}74\text{ pg/ml}$, powyżej 12 lat: $17\text{--}53\text{ pg/ml}$.

Tabela I. Sekwencje starterowe dla polimorfizmów genu dla receptora witaminy D**Table I.** Primer pairs and PCR product conditions used for amplification of DNA regions spanning the analyzed polymorphic loci

Enzymy restrykcyjne	Numer polimorfizmu w bazie NCBI	Sekwencje starterowe
<i>FokI</i>	rs10735810	5' CCC TGG CAC TGA CTC TGG CTC TG 3' 5' GAA ACA CCT TGC TTC TTC TCC CTC C 3'
<i>BsmI</i>	rs1544410	5' GCG ATT CGT AGG GGG GAT TCT G 3' 5' TCT CCA TTC CTT GAG CCT CCA GTC C 3'

N-końcowy usieczony telopeptyd łańcucha alfa kolagenu typu I oznaczano metodą chemiluminescencji w moczu porannym z drugiej porcji, w której jednocześnie określano stężenie kreatyniny. Uzyskany wynik przeliczono na nM BCE/mmol kreatyniny. Jego wartość porównywano z normami opracowanymi przez Bollen i Eyre [8]. Osteokalcyna była oznaczana metodą Elisa, a wyniki odnoszono do norm opracowanych przez Ambroszkiewicz i wsp., które uwzględniają płeć i wiek dzieci [9]. W tym samym dniu przeprowadzono u wszystkich dzieci badanie densytometryczne kośćca metodą absorpcjometrii promieniowania X o podwójnej energii (DXA) aparatem Lunar Prodigy Advance (firmy GE Healthcare, Madison, USA) z zastosowaniem opcji pediatrycznej. Korzystano z dwóch programów: *Total body* i *L2-L4 Spine*. Oceniono BMD (g/cm², Z-score) w obu projekcjach densytometrycznych. Na podstawie wyniku badania densytometrycznego ocenianych pacjentów podzielono na trzy grupy: I – odniesienia, gdy wartość Z-score mieściła się w granicach od +1,0 do -1,0, II – z niską masą kostną (obniżoną gęstością mineralną kości), Z-score od -1,0 do -2,0, oraz III (osteoporoza) – gdy Z-score < -2,1. Badania przeprowadzono w Regionalnym Ośrodku Menopauzy i Osteoporozy Szpitala Klinicznego Nr 3 Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Analizy statystycznej dokonano przy pomocy pakietu Statistica 9.0 PL (StatSoft, Tulsa, USA). Za poziom istotny statystycznie przyjęto wartość $p < 0,05$.

Na prowadzenie badań uzyskano zgodę lokalnej komisji bioetycznej Nr RNN/72/05/KE.

Wyniki

W tabeli II zamieszczono średnie wartości stężeń podstawowych jonów gospodarki wapniowo-

-fosforanowej w surowicy krwi i moczu w ocenianych grupach dzieci. Jak z niej wynika, średnie wyniki badań gospodarki wapniowo-fosforanowej w surowicy krwi mieściły się w zakresie wartości referencyjnych. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy stężeniem ocenianych jonów pomiędzy trzema grupami dzieci, z wyjątkiem stężenia wapnia w surowicy krwi, które było najwyższe, ale w granicach wartości referencyjnych, u dzieci z grupy II (obniżona gęstość mineralna kości). Dobowe wydalanie jonów z moczem u wszystkich dzieci mieściło się także w granicach wartości referencyjnych i nie różniło się pomiędzy grupami.

Tabela III zawiera wartości średnie stężeń metabolitów witaminy D: 25(OH)D i 1,25(OH)₂ oraz markerów obrotu kostnego w trzech grupach dzieci. Średnie stężenia obu metabolitów witaminy D we wszystkich grupach dzieci były podobne, mimo iż w grupie II (obniżona gęstość mineralna kości) u 12 dzieci stężenie 25OHD znajdowało się poniżej 20 nmol/l (deficyt/niedobór witaminy D). W zakresie markerów obrotu kostnego stwierdzono statystycznie istotną różnicę pomiędzy ocenianymi grupami pacjentów w stężeniu osteokalcyny. Najniższe wartości wykazano w III grupie dzieci – z osteoporozą, co może wskazywać na wolniejszy przebieg procesów kościotworzenia u tych pacjentów.

Średnie wartości wyników badań biochemicznych zależne od nosicielstwa allele A polimorfizmu rs1544410 (enzym restrykcyjny *BsmI*) w II (n=91) i III (n=40) grupie dzieci są podane w tabeli IV. Nosicielstwo allele A w grupie dzieci z obniżoną gęstością mineralną kości łączyło się z większym wydalaniem fosforu i magnezu z moczem.

W tabeli V przedstawiono wpływ nosicielstwa allele T polimorfizmu rs10735810 rozpoznawanego przez enzym restrykcyjny *FokI* na wartości wyników badań biochemicznych u dzieci z obniżoną

Tabela II. Stężenie (wartość średnia, mediana, 25 i 75 kwartyli) podstawowych jonów gospodarki wapniowo-fosforanowej w surowicy krwi i moczu w ocenianych grupach dzieci

Table II. Concentration (mean, median, 25 and quartile) basic ions of calcium-phosphorus indices in serum and urine in the study groups

Parametr biochemiczny		Grupa I	Grupa II	Grupa III	p
Stężenia jonów w surowicy krwi (mg%)					
Ca	X	9,83	10,00*	9,82	0,0324
	Mediana	9,82	10,02	9,88	
	25%	9,48	9,79	9,51	
	75%	9,99	10,25	10,17	
Pi	X	4,69	4,56	4,35	0,1295
	Mediana	4,73	4,65	4,30	
	25%	4,22	4,13	3,97	
	75%	5,02	4,91	4,63	
Mg	X	2,02	2,06	2,00	0,1767
	Mediana	2,05	2,06	1,99	
	25%	1,89	1,94	1,85	
	75%	2,13	2,18	2,12	
Wydalanie jonów z moczem (mg/kg c.c./dobę)					
Ca	X	2,00	2,34	2,62	0,3337
	Mediana	1,56	2,17	2,60	
	25%	0,95	0,85	0,99	
	75%	2,50	3,24	4,11	
Pi	X	13,48	13,79	12,42	0,5737
	Mediana	12,78	12,50	12,50	
	25%	9,05	9,20	6,90	
	75%	16,80	17,07	15,60	
Mg	X	2,20	2,34	2,00	0,2581
	Mediana	1,99	2,34	1,74	
	25%	1,34	1,66	1,10	
	75%	2,91	2,82	2,48	

Różnica istotna statystycznie w porównaniu *post-hoc* w porównaniu do pozostałych grup

Tabela III. Stężenie (wartość średnia, mediana, 25 i 75 kwartyli) metabolitów witaminy D: 25(OH)D i 1,25 (OH)₂ D oraz markerów obrotu kostnego w ocenianych grupach dzieci

Table III. Concentration (mean, median, 25 and quartile) of Vitamin D metabolites: 25(OH)D and 1,25(OH)₂D and markers of bone turnover in the study groups

Parametr biochemiczny		Grupa I	Grupa II	Grupa III	p
25OHD (ng/ml)	X	31,91	31,35	30,77	0,9632
	Mediana	26,00	27,90	29,25	
	25%	18,80	20,50	19,50	
	75%	40,30	38,70	41,90	
1,25(OH) ₂ D (pg/ml)	X	46,57	47,41	46,31	0,9471
	Mediana	49,38	47,30	41,90	
	25%	34,25	32,90	33,23	
	75%	56,35	59,70	58,10	
OC** (ng/ml)	X	109,40	103,66	80,94	0,0048*
	Mediana	105,90	101,90	71,70	
	25%	83,70	76,30	46,00	
	75%	143,10	137,70	119,50	
Ntx** (nM BCE/ mmol Kr)	X	693,92	774,03	707,41	0,9289
	Mediana	514,35	557,65	376,25	
	25%	381,40	292,20	210,15	
	75%	850,60	863,10	708,90	

* Różnica istotna statystycznie w porównaniu post-hoc pomiędzy grupami

** W okresie rozwojowym zakres wartości referencyjnych jest zależny od wieku i płci dzieci

gęstością mineralną kości oraz u tych z osteoporozą – grupa III. Wynika z niej, iż nosicielstwo allele T polimorfizmu rs10735810 u dzieci z osteoporozą związane jest z wyższym (w granicach wartości referencyjnych) stężeniem wapnia w surowicy krwi oraz mniejszym jego wydalaniem. Łączy się także z wyższym stężeniem osteoklacy, co oznacza bardziej aktywny proces kościotworzenia, a to z kolei może sprzyjać mniejszemu ubytkowi masy kostnej.

Dyskusja

Wartość parametrów gospodarki wapniowo-fosforanowej i obrotu kostnego jest jednym z elementów świadczących o aktywności metabolicznej tkanki kostnej, a brak równowagi pomiędzy

procesami kościotworzenia i resorpcji kości może prowadzić do osteoporozy lub/i obniżonej gęstości mineralnej kości [10,11].

Rozpoznanie osteoporozy w wieku rozwojowym oparte jest obecnie na wyniku badania densytometrycznego i obecności klinicznie istotnych złamań kości. Wynik badania densytometrycznego w programie całego ciała (TBLH, *total body less head*) lub/i opcji spine (odcinek lędźwiowy kręgosłupa) wyrażany jest jako wartość Z-score (odniesienie do płci i wieku), a jego wartość -2,0 lub mniejsza świadczy o obniżonej gęstości mineralnej kości (*low bone mass*). Jeśli u zdrowego dziecka wystąpiło złamanie kręgu lub dwu i więcej złamań kości długich do 10 roku życia, a u pacjentów do 19 roku życia – trzy lub więcej złamań, to przy wartościach Z-score równych lub mniejszych od -2,0 rozpoznajemy osteoporozę [12–14]. Ocena

Tabela IV. Średnie wartości wyników badań biochemicznych zależne od nosicielstwa allele A polimorfizmu rs1544410 (BsmI) w II (n=91) i III (n=40) grupie dzieci

Table IV. Average biochemical tests results related to carriage of the allele A of polymorphism rs1544410 (BsmI) in the 2nd (n=91) and the 3rd (n=40) group of children

Grupa II (n=91)					
Parametry badań	AA lub AG		GG		p
	X	SD	X	SD	
Biochemiczne surowicy					
Ca (mg%)	9,95	0,47	10,08	0,47	0,1989
Pi (mg%)	4,60	0,72	4,46	0,72	0,2061
Mg (mg%)	2,07	0,19	2,05	0,19	0,5422
25OHD (ng/ml)	32,05	20,33	30,60	20,33	0,8821
1,25(OH) ₂ D (pg/ml)	46,94	18,26	48,45	18,26	0,9961
OC (ng/ml)	100,91	39,31	108,27	39,31	0,5442
Dobowe wydalanie jonów z moczem i wydalanie Ntx					
Ca (mg/kg c.c/dobę)	2,33	1,94	2,39	1,94	0,5205
Pi (mg/kg c.c/dobę)	14,59	6,75	12,53	6,75	0,0792
Mg(mg/kg c.c/dobę)	2,51	1,05	2,10	1,05	0,0851
Ntx (nM BCE/mmol Kr)	692,05	577,36	895,53	577,36	0,7369
Grupa III (n=40)					
Parametry badań	AA lub AG		GG		p
	X	SD	X	SD	
Biochemiczne surowicy					
Ca (mg%)	9,74	0,45	9,96	0,40	0,1439
Pi (mg%)	4,32	0,72	4,38	0,41	0,5692
Mg (mg%)	1,94	0,14	2,11	0,28	0,0278
25OHD (ng/ml)	30,40	15,28	32,47	12,74	0,5383
1,25(OH) ₂ D (pg/ml)	49,79	21,15	41,95	15,73	0,3676
OC (ng/ml)	75,43	40,61	88,58	51,02	0,5868
Dobowe wydalanie jonów z moczem i wydalanie NTX					
Ca (mg/kg c.c/dobę)	2,62	1,58	2,38	2,17	0,5455
Pi (mg/kg c.c/dobę)	12,04	6,67	12,84	6,33	0,6560
Mg (mg/kg c.c/dobę)	1,97	1,13	1,95	1,46	0,7264
Ntx (nM BCE/mmol Kr)	642,42	822,29	874,11	1760,46	0,5083

Tabela V. Średnie wartości wyników badań biochemicznych zależne od nosicielstwa allele T polimorfizmu rs10735810 (FokI) w II i III grupie dzieci

Table V. Average biochemical tests results related to carriage of allele T of polymorphism rs10735810 (FokI) in the 2nd and the 3rd group of children

Grupa II (n=91)					
Parametry badań	TT lub TC		CC		p
	X	SD	X	SD	
Biochemiczne surowicy					
Ca (mg%)	9,97	0,43	10,05	0,43	0,2773
Pi (mg%)	4,53	0,76	4,58	0,70	0,6833
Mg (mg%)	2,07	0,19	2,06	0,19	0,5770
25OHD (ng/ml)	31,81	19,60	29,95	14,74	0,8743
1,25(OH) ₂ D (pg/ml)	43,84	19,46	52,42	18,18	0,0573
OC (ng/ml)	105,09	40,17	102,31	35,05	0,6202
Dobowe wydalanie jonów z moczem i wydalanie Ntx					
Ca (mg/kg c.c./dobę)	2,08	1,74	2,77	1,77	0,0335
Pi (mg/kg c.c./dobę)	13,89	6,27	13,82	7,78	0,4829
Mg (mg/kg c.c./dobę)	2,28	1,06	2,48	1,05	0,2888
Ntx (nM BCE/mmol Kr)	833,15	1512,95	726,89	644,19	0,8786
Grupa III (n=40)					
Parametry badań	TT lub TC		CC		p
	X	SD	X	SD	
Biochemiczne surowicy					
Ca (m%)	10,00	0,40	9,60	0,40	0,0041
Pi (mg%)	4,25	0,62	4,49	0,66	0,3994
Mg (mg%)	2,04	0,25	1,96	0,17	0,2676
25OHD (ng/ml)	32,09	12,54	29,11	16,06	0,5250
1,25(OH) ₂ D (pg/ml)	47,62	20,04	43,71	19,99	0,4274
OC (ng/ml)	92,21	43,56	67,15	43,87	0,0833
Dobowe wydalanie jonów z moczem i wydalanie Ntx					
Ca (mg/kg c.c./dobę)	1,88	1,46	3,21	1,64	0,0190
Pi (mg/kgc.c./dobę)	11,87	5,83	12,41	7,38	0,7826
Mg (mg/kg c.c./dobę)	2,00	1,41	1,93	1,02	0,8541
Ntx (nM BCE/ mmol Kr)	861,35	1520,87	378,79	275,39	0,2612

jej aktywności oraz efekty leczenia oparte są na wskaźnikach gospodarki wapniowo-fosforanowej, a w etiologii obniżonej gęstości mineralnej kości dużą rolę odgrywają czynniki genetyczne, w tym gen dla receptora witaminy D [15–17]. Dlatego przedmiotem pracy jest analiza związku pomiędzy wskaźnikami gospodarki wapniowo-fosforanowej i markerami obrotu kostnego a polimorfizmami VDR u dzieci i młodzieży łódzkiej.

A zatem w ocenianej grupie 161 dzieci i młodzieży polimorfizm rs1544410 VDR rozpoznawany przez enzym restrykcyjny *BsmI* wiązał się ze stężeniem magnezu w surowicy krwi u dzieci z niską masą kostną (osteoporoza, obniżona gęstość mineralna kości, czyli III i II grupa), lecz zmiany te mieściły się w zakresie wartości referencyjnych metody. U pacjentów z grupy II wykazano także zwiększone wydalanie magnezu z moczem, związane z tym polimorfizmem.

Stosunkowo liczniejsze zależności pomiędzy wynikami badań biochemicznych a zmiennością VDR wykazano dla polimorfizmu rs10735810 rozpoznawanego przez enzym *FokI*. Nosicielstwo allele C wiązało się z większym, ale w granicach wartości referencyjnych, wydalaniem wapnia z moczem zarówno u dzieci z osteoporozą jak i z obniżoną gęstością mineralną kości. U dzieci z osteoporozą, wykazano wyższą medianę oraz większy zakres poziomów wydalania wapnia z moczem. Oznacza to, że u części z nich była stwierdzona hiperkalciuria.

Zwiększone wydalanie wapnia z moczem może wynikać z chorób przewodu pokarmowego, układu kostnego lub nerek oraz niewłaściwej diety [18]. We wcześniejszej pracy zespołu łódzkiego opisywano hiperkalciurię u dzieci z zespołem nerczycowym i niską masą kostną oraz u zgłaszających wielokrotne złamania kości [19,20]. W prezentowanej grupie był tylko jeden chłopiec chory na zespół nerczycowy steroidozależny, co nie mogło mieć istotnego wpływu na otrzymane wyniki. Być może natomiast hiperkalciuria była związana ze złamaniami kości, które zgłosiło 73 spośród 161 badanych dzieci [21]. Hiperkalciuria jako wykładnik zwiększonej resorpcji kości w idiopatycznej osteoporozie młodzieńczej jest opisywana przez Chlebną-Sokół i wsp. [23]. Wśród pacjentów ocenianej grupy było 51/131 dzieci z pierwotnym obniżeniem gęstości mineralnej kości, w tym dwoje z idiopatyczną osteoporozą młodzieńczą. Peris u dorosłych pacjentów, mężczyzn i kobiet, z osteoporozą idiopatyczną wykazał także wzrost wydalania wapnia z moczem (u 88 spośród 232 i u 10/28 odpowiednio) [24,25].

Związek hiperkalciurii z osteoporozą jest opisany także w bardzo licznej grupie mężczyzn (ponad 62 tysiące) powyżej 50 roku życia, u których oceniano czynniki ryzyka złamań kości [26]. Innym możliwym tłumaczeniem są zaburzenia przewodu pokarmowego u pacjentów ze zwiększonym wydalaniem wapnia, w prezentowanej grupie było troje dzieci z ciężką postacią osteoporozy w przebiegu choroby Leśniowskiego-Crohna (ze złamaniami kręgów i bólami kostnymi) [27].

Zwiększone wydalanie wapnia z moczem u dzieci posiadających allele C, w porównaniu do nosicieli allele T polimorfizmu rs10735810, to jedynie wskaźnik nasilonej resorpcji kości w ocenianej grupie pacjentów. Nie zanotowano statystycznie istotnych zmian w wydalaniu N-końcowego usiecowanego telopeptydu łańcucha alfa kolagenu typu I (NTx) z moczem ani pomiędzy grupami, ani w relacji do polimorfizmów VDR. Może to wynikać z tego, że zmiany w wydalaniu Ntx są obserwowane przede wszystkim podczas leczenia dorosłych pacjentów z osteoporozą i świadczą o skuteczności stosowanej terapii [28,29].

Wyjaśnieniem powyższych obserwacji mogą być również odrębności rozwojowe dzieci i młodzieży, u których procesem dominującym jest kościotworzenie i ono ulega upośledzeniu jako pierwsze, czego konsekwencją jest względna przewaga kościogubienia. Ponadto gen dla receptora witaminy D jest kojarzony z adsorpcją (budową i odbudową) kości, a nie jej resorpcją.

Zależności pomiędzy VDR a Ntx nie zanotował Baroncelli, który przedstawił bodaj najbardziej wszechstronną analizę gospodarki mineralnej kości u dzieci. W badanej przez siebie grupie dzieci nie wykazał też związku pomiędzy polimorfizmami genu dla receptora witaminy D a stężeniem osteokalcyny [7].

Z naszych obserwacji wynika natomiast, że allele T polimorfizmu rs10735810 rozpoznawanego przez enzym restrykcyjny *FokI* łączy się z wyższym stężeniem osteokalcyny u pacjentów z osteoporozą. Jednocześnie wykazano statystycznie istotne różnice w poziomie osteokalcyny pomiędzy badanymi grupami. W III grupie stężenie OC w surowicy było najniższe (stwierdzono najniższą medianę oraz największe różnice indywidualne). Istotna ujemna zależność została zanotowana także pomiędzy osteokalcyną a wydalaniem wapnia z moczem w całej 161-osobowej populacji. W surowicy krwi wyższym stężeniom osteokalcyny odpowiadały wyższe poziomy wapnia, oczywiście w granicach norm referencyjnych. Jest to praw-

dopodobnie związane z rolą osteokalcyny, która polega między innymi na precypitacji soli wapnia, co oznacza, że bardziej aktywne białko potrzebuje więcej substratu do realizacji swoich zadań.

Osteokalcyna jako najlepszy marker procesu budowy kości jest przedmiotem dość licznych analiz, w tym genetycznych. Zatem genotyp ff polimorfizmu VDR określanego jako *FokI* wiązał się z wyższymi wartościami osteokalcyny w populacji zdrowych kobiet Lampeduzy [30].

Cytowane wyniki i badania własne dowodzą wpływu polimorfizmów genu dla receptora witaminy D na marker kościotworzenia – osteokalcynę [21]. Uitterlinden analizując wyniki 17 badań także podkreślił związek polimorfizmu VDR z osteokalcyną, natomiast dane dotyczące metabolitów witaminy D: 25OHD i kalcytriolu nie są tak jednoznaczne [31]. Część spośród cytowanych badań wskazywała na możliwy związek pomiędzy polimorfizmem określanym jako *BsmI* a kacytriolem, a tylko pojedyncze – ze stężeniem 25OHD. W większości badań zależności nie miały charakteru istotnego statystycznie [31]. Odmienne dane prezentują Tanabe i wsp., którzy w grupie młodych dorosłych wykazali statystycznie istotną dodatnią korelację pomiędzy stężeniem 25OHD a genotypem FF polimorfizmu rs2228570 [32]. Z kolei u dzieci z Amazonki wykazano związek pomiędzy polimorfizmem rozpoznawanym przez enzym restrykcyjny *BsmI* a stężeniem metabolitu wątrobowego witaminy D [33].

W niniejszej pracy nie stwierdzono wpływu badanych polimorfizmów rs1544410 i rs10735810 na

stężenie metabolitów witaminy D u dzieci i młodzieży, co jest zgodne z innymi obserwacjami [7,34,35].

Natomiast Santos i wsp. w grupie zdrowych dziewcząt w wieku 7–18 lat wskazał na związek haplotypu GGT polimorfizmów określanych jako *BsmI*, *ApaI* i *TaqI* z niskimi poziomami metabolitu wątrobowego witaminy D [36]. Podobne spostrzeżenia dotyczą dzieci japońskich [37]. Z kolei suplementacja witaminą D u 11–12-letnich dziewczynek z genotypem FF (*FokI*) prowadziła do wyższych stężeń 25OHD i wyższej gęstości mineralnej kości w porównaniu do dzieci posiadających allel f. Wymieniony polimorfizm jest łączony z poziomem 25OHD także przez McGrath [38].

Analiza piśmiennictwa i wyniki własne wskazują na liczne asocjacje pomiędzy szeroko rozumianym metabolizmem kostnym i jego kliniczną manifestacją a zmiennością genu kodującego receptor dla witaminy D. Jednoznaczna interpretacja prowadzonych badań jest trudna z powodu odmienności etnicznej populacji i wpływu licznych czynników środowiskowych.

Podsumowanie

Polimorfizmy rs1544410 (enzym restrykcyjny *BsmI*) i rs10735810 (*FokI*) genu dla receptora witaminy D nie wpływają bezpośrednio na gospodarkę wapniowo-fosforanową i tempo obrotu kostnego w badanej grupie dzieci.

Piśmiennictwo / References

1. Lorenc R.S., Karczmarewicz E., Kryśkiewicz E. et al.: Zasady suplementacji i standardy oceny zaopatrzenia organizmu w witaminę D w świetle jej działania plejotropowego. Standardy Medyczne-Pediatrica, 2012;9, 595-604.
2. Holick M.F., Chen T.C.: Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. Am. J. Clin. Nutr., 2008;87(suppl), 1080S-1086S.
3. Jones G.: Biomarkers of vitamin D metabolism: current state of knowledge. Standardy Medyczne-Pediatrica (Konferencja EVIDAS), 2015;12, 587-592.
4. Płudowski P., Karczmarewicz E., Chlebna-Sokół D. et al.: Witamina D: Rekomendacje dawkowania w populacji osób zdrowych oraz w grupach ryzyka deficytów- wytyczne dla Europy Środkowej 2013. Standardy Medyczne-Pediatrica, 2013;10, 573-578.
5. Kelly P.J., Morrison N.A., Sambrook P.N. et al.: Genetic influences on bone turnover, bone density and fracture. European J of Endocrinology, 1995;133(3), 265-271.
6. Uitterlinden A.G., Pols H.A., Burger H. et al.: A large-scale population-based study of the association of vitamin D receptor gene polymorphism with bone mineral density. J. Bone Miner. Res., 1996;11(9), 1241-1248.
7. Baroncelli G.I., Federico G., Bertolloni S. et al.: Vitamin D-receptor genotype does not predict bone mineral density, bone turnover, and growth in prepubertal children. Horm. Res., 1995;51, 150-156.
8. Bollen A.M., Eyre D.R.: Bone resorption rate in children monitored by urinary assay of collagen type I cross-linked peptides. Bone, 1994;15, 31-33.
9. Ambroszkiewicz J., Gajewska J., Laszkowska-Klita T.: Serum osteocalcin and bone alkaline phosphatase in healthy children in relation to age and gender. Med. Wieku Rozwoj., 2002;6(3), 257-265.
10. Baroncelli G.I., Bertolloni S., Sodini F. et al.: Osteoporosis in children and adolescents: etiology and management. Paediatr. Drugs., 2005;7, 295-323.
11. Nowak-Bednarek M., Jakubowska-Pietkiewicz E.: Osteoporoza – problem populacji wieku rozwojowego. Klinika Pediatryczna, 2008;16(4), 482-486.
12. Baim S., Leonard M.B., Bianchi M.L. et al.: Official Positions of the Interna-

- tional Society for Clinical Densitometry and executive summary of the 2007 ISCD Pediatric Position Development Conference. *J. Clin. Densitom.*, 2008;11(1), 6-21.
13. Rauch F., Plotkin H., Di Meglio L. et al.: Fracture prediction and the definition of osteoporosis in children and adolescents: the ISCD 2007 Pediatric Official Positions. *J. Clin. Densitom.*, 2008;11(1), 22-28.
14. Gordon C.M., Leonard M.B., Zemel B.S.: 2013 Pediatric Position Development Conference: Executive Summary and Reflections. *J. Clin. Densitom.*, 2014;17, 219-224.
15. Kelly P.J., Morrison N.A., Sambrook P.N. et al.: Genetic influences on bone turnover, bone density and fracture. *European J of Endocrinology*, 1995;133(3), 265-271.
16. The Genetic Factors for Osteoporosis (GEFOS) Consortium. Twenty bone mineral density loci identified by large scale meta-analysis of genome-wide association studies. *Nat. Genet.*, 2009;41(11), 1199-1206.
17. Richrds J.B., Kavoura F.K., Rivadeneira F. et al.: Collaborative Meta-analysis: Associations of 150 Candidate Genes with osteoporosis and osteoporotic fracture. *Ann. Intern. Med.*, 2009;151, 528-537.
18. Strivastava T., Alon U.S.: Pathophysiology of hypercalciuria in children. *Pediatr. Nephrol.*, 2007;22(10), 1659-1673.
19. Michalus I., Chlebna-Sokół D., Rusińska A. et al.: Ocena gęstości mineralnej i metabolizmu kostnego u dzieci z wielokrotnymi złamaniami kości. *Ortopedia Rehabilitacja Traumatologia*, 2008;10(6), 602-612.
20. Chlebna-Sokół D., Kozłowski J., Jakubowska E. et al.: Bone mineralization and calcium-phosphate metabolism in children with nephrotic syndrome. *Pol. Merkur. Lekarski*, 2000;8(46), 228-230.
21. Jakubowska-Pietkiewicz E., Fendler W., Młynarski W. et al.: Selected risk factors of fractures in children – own observation. *Centr. Eur. J. Med.*, 2012;7, 635-641.
22. Chlebna-Sokół D., Loba-Jakubowska E., Rusińska A. et al.: Diagnostyka i leczenie osteoporozy i osteopenii w wieku rozwojowym. Wyd. Anka, Łódź 2002, 9-46.
23. Chlebna-Sokół D., Loba-Jakubowska E., Sikora A.: Clinical evaluation of patients with idiopathic juvenile osteoporosis. *Journal of Pediatric Orthopaedics. Part B*, 2001;10, 259-263.
24. Peris P., Riuz-Esquide V., Monegal A. et al.: Idiopathic osteoporosis in premenopausal women. Clinical characteristics and bone remodelling abnormalities. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 2008;26(6), 986-991.
25. Peris P., Martinez-Ferrer A., Monegal A. et al.: Aetiology and clinical characteristics of male osteoporosis. Have they changed in the last few years? *Clin. Exp. Rheumatol.*, 2008;26(4), 582-588.
26. Abrahamsen B., Brixen K.: Mapping the prescription to fractures in men – a national analysis of prescription history and fracture risk. *Osteoporos Int.*, 2009;20(4), 585-597.
27. Chlebna-Sokół D., Jakubowska-Pietkiewicz E., Kilińska A. et al.: Osteoporoza wtórna o ciężkim przebiegu u dwojga dzieci z chorobą Leśniowskiego-Crohna. *Przegląd Pediatryczny*, 2007;4(37), 408-412.
28. Rogers A., Glover S.J., Eastell R.: A randomized, double-blinded, placebo-controlled, trial to determinate the individual response in bone turnover markers to lasofoxifene therapy. *Bone*, 2009;45(6), 1044-1052.
29. Ohtori S., Azakawa T., Murata Y. et al.: Residronate decreased bone resorption and improves low back pain in postmenopausal osteoporosis patients without vertebral fractures. *J. Clin. Neurosci.*, 2010;17(2), 209-213.
30. Falchetti A., Sferrazza C., Cepollaro C. et al.: Fokl polymorphism of the vitamin D receptor gene correlates with parameters of bone mass and turnover in a female population of the Italian island of Lampedusa. *Calcif Tissue*, 2007;80(1), 15-20.
31. Uitterlinden A.G., Fang Y., van Meurs J.B.J. et al.: Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene*, 2004;338, 143-156.
32. Tanabe R., Kawamura Y., Tsugawa N. et al.: Effects of *FokI* polymorphism in vitamin D receptor gene on serum 25-hydroxyvitamin D, bone-specific alkaline phosphatase and calcaneal quantitative ultrasound parameters in young adults. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, 2015;24, 329-35.
33. Cobayashi F., Lourenco B.H., Cardoso M.A.: 25-Hydroxyvitamin D levels, *BsmI* polymorphism and insulin resistance in Brazilian Amazonian children. *Int. J. Mol. Sci.*, 2015;3, 12531-46.
34. Cusack S., Melgaard C., Michaelis K.F. et al.: Vitamin D and estrogen receptor alpha genotype and indices of bone mass and bone turnover in Danish girls. *J. Bone Miner. Metab.*, 2006;24(4), 329-336.
35. Garnero P., Borel O., Sornay-Rendu E. et al.: Vitamin D receptor gene polymorphism are not related to bone turnover, rate of bone loss, and bone mass in postmenopausal women: the OFELY study. *J. Bone Miner. Res.*, 1996;11(6), 827-834.
36. Santos B.R., Mascarenhas L.P., Satler F. et al.: Vitamin D deficiency in girls from South Brasil: a cross-sectional study on prevalence and association with vitamin D receptor gene variants. *BMC Pediatr.*, 2012;8, 62 doi:10.1186/1471-2431-12-62.
37. Kitanaka S., Isojima T., Takaki M. et al.: Association of vitamin D-related gene polymorphisms with manifestation of vitamin D deficiency in children. *Endocr. J.*, 2012;59(11), 1007-1014, doi.org/10.1507/endocrj.EJ12-0143.
38. Mc Grath J.J., Saha S., Burne T.H. et al.: A systemic review of the association between common single nucleotide polymorphisms and 25-hydroxyvitamin D concentrations. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 2010;121(1-2), 471-477.