

A „Glukokortikoid receptor gén polimorfizmusok és a primer és szekunder osteoporosis összefüggéseinek vizsgálata” című OTKA pályázat (T46508, témavezető: Dr. Koó Éva) zárójelentése

Bevezetés

A csontok ásványianyag tartalmának meghatározásában a genetikai faktoroknak 50-80%-os szerepet tulajdonítanak (1,2). A glukokortikoidok a csontszövet működésének számos pontját befolyásolják (3,4). A glukokortikoid hormonoknak a csontanyagcserére kifejtett hatása az orvosi gyakorlatban jól ismert a glukokortikoid-indukált osteoporosis „személyében”, azonban kevésbé tudjuk, hogy a glukokortikoid érzékenység egyéni variabilitása milyen hatással van az egészséges személyek csontjára. A glukokortikoid hormonok hatását közvetítő receptornak számos, a normál populációban különböző gyakorisággal előforduló polimorfizmusát ismerjük, amelyek a receptor érzékenységét növelik illetve csökkentik (5,6). Az irodalomban néhány adat jelent meg ezen polimorfizmusoknak a csont ásványianyag tartalommal való összefüggéséről (7,8), azonban a csontanyagcsere intenzitását jelző szérumban markerekre gyakorolt hatásukat még nem vizsgálták. Munkánk célja az volt, hogy megvizsgáljuk a glukokortikoid receptor gén három polimorfizmusának (N363s, BcII, ER22/23EK) csontra kifejtett hatását a normál populációban, illetve ezek esetleges összefüggését a glukokortikoid indukált osteoporosis kialakulásával. Emellett új polimorfizmusok „in silico” keresését is terveztük a „blastn” program segítségével, a National Center for Biotechnology Information (NCBI) adatbázisának felhasználásával.

Az eredményeinket négy részbe foglaltuk:

1. Metodikai fejlesztések
2. In silico polimorfizmus keresés eredménye
3. A glukokortikoid receptor gén polimorfizmusok és a csontanyagcsere összefüggése a normál populációban
4. A glukokortikoid receptor gén polimorfizmusok és a csontanyagcsere összefüggése szteroid-indukált osteoporosisos betegekben

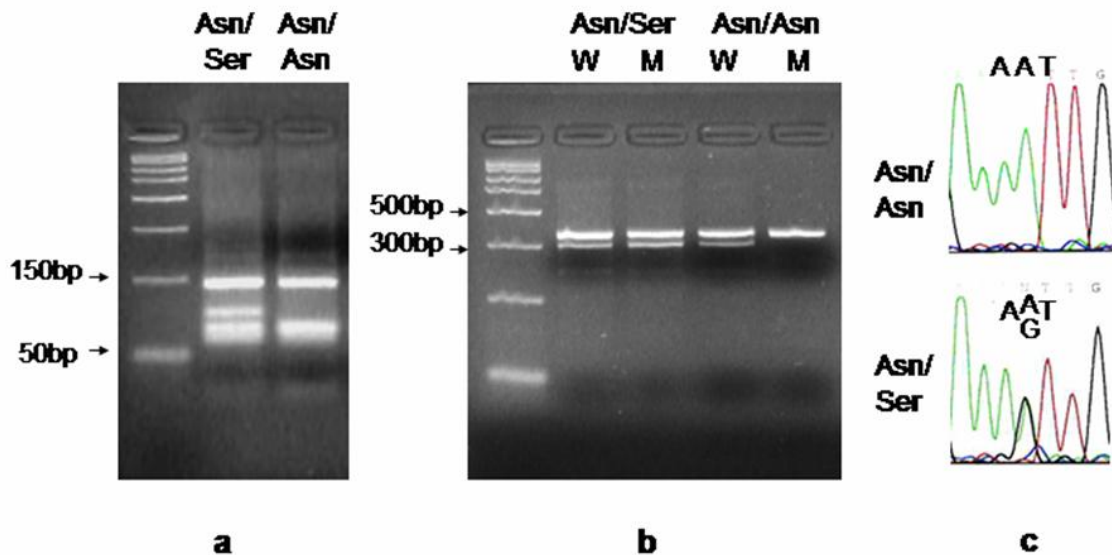
1. Metodikai fejlesztések

1./A Az N363S polimorfizmus vizsgálata

Kidolgoztunk egy gyors és egyszerű módszert a glukokortikoid receptor gén Asn363Ser polimorfizmusának szűrésére, melyet 300 DNS mintán validáltunk. A módszert nemzetközi folyóiratban publikáltuk.

A módszer allélspecifikus PCR reakción alapul. A polimorf szekvenciához kötődő specifikus primer segítségével egy PCR reakcióból megállapítható, hogy a beteg hordozza-e a polimorf allélt. Az így kiszűrt (átlag 4%) hordozóknál egy következő, vad típusra specifikus primerrel

végzett PCR reakcióval megállapítható, hogy homo- vagy heterozigóta formában hordozza-e a beteg a polimorf allélt (1. ábra). Ez a módszer az eddig használt két lépéses restrikciós enzim emésztéshez képest gyorsabbnak és olcsóbbnak bizonyult.



1. ábra:

a: Agaróz gél elektroforézis a glukokortikoid receptor gén PCR-amplifikált 2-es exonjának restrikciós emésztése után. 1. oszlop: DNS marker, 2. oszlop: az Asn/Ser heterozigóta mintánál kapott három csík a polimorf allél jelenlétét mutatja, 3. oszlop: az Asn/Asn vad típusú homozigóta mintánál kapott két csík a polimorf allél hiányát mutatja.

b: Allél-specifikus PCR reakció agaróz elektroforézises képe. W: vad típusú allélspecifikus primerrel, M: a polimorf szekvenciára specifikus primerrel. Minden oszlopban egy 357 bp-os csík a PCR reakció működését ellenőrző kontroll termék. 2. és 3. oszlopban a heterozigóta mintánál mind a vad (W), mind a polimorf (M) primerrel keletkezett 306 bp-os allélspecifikus termék. 4. és 5. oszlopban a vad típusú homozigóta mintánál a vad primerrel (W) keletkezett allélspecifikus termék, azonban a polimorf primerrel (M) nem.

c: Direkt DNS szekvenálással kapott kép a vad típusú mintáról (felső kép) és a heterozigóta mintáról (alsó kép).

Megjegyzés: a polimorfizmus nagyon alacsony előfordulási gyakoriságának köszönhetően polimorf homozigóta beteget nem találtunk, így ennek elektroforézises képét nem tudjuk bemutatni.

A módszert nemzetközi folyóiratban publikáltuk (Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 92(5):465-468, 2004.)

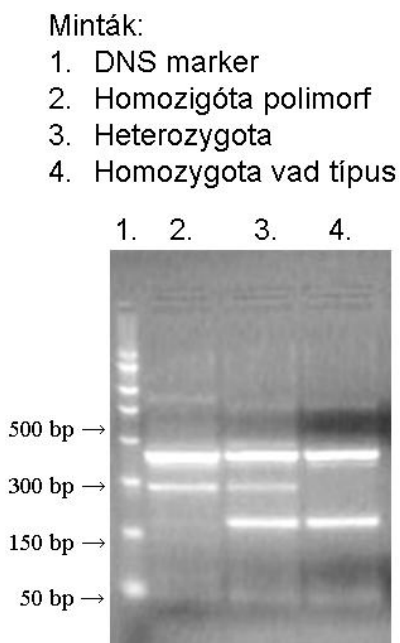
1./B A BclII polimorfizmus vizsgálata

Beállítottunk egy új vizsgálati módszert a glukokortikoid receptor gén második intronjában található, az eredetileg a kimutatáshoz használt restriktáz enzim alapján BclI polimorfizmusnak keresztelt SNP kimutatására.

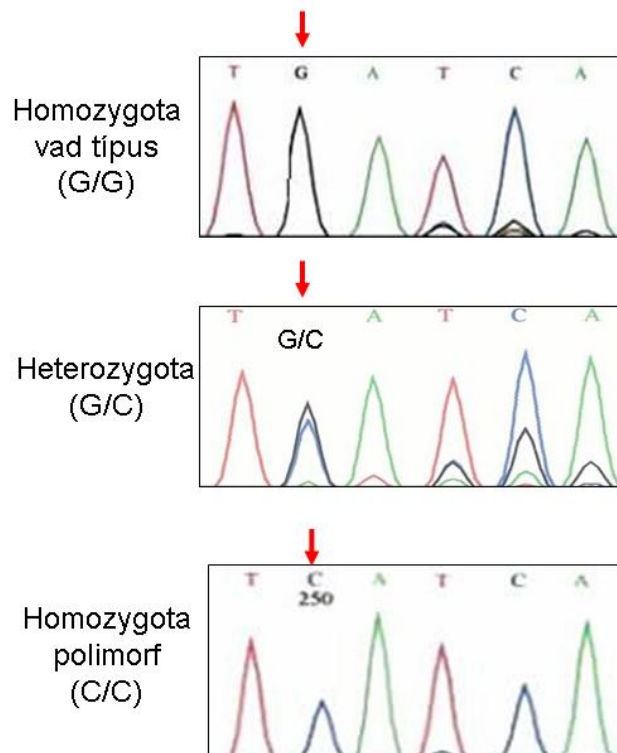
Ez egy multiallél-specifikus PCR módszer, amellyel lehetséges egyetlen reakcióval a vad és a polimorf allélek homozigóta vagy heterozigóta formában való jelenlétének detektálása. A módszer lényege, hogy négy (két forward és két reverz) primert teszünk egy reakcióba. Ennek eredményeként minden reakcióban keletkezik egy kontroll 418 bp nagyságú fragmens, valamint a vad szekvencia jelenléte esetén egy 177 bp nagyságú, a mutáns szekvencia jelenléte esetén pedig egy 284 bp nagyságú termék. Heterozigóta mintáknál a kontroll csík mellett mindkét kisebb méretű termék keletkezik, és gélelektroforézissel detektálható. Az új módszert ellenőriztük direkt szekvenálással.

A módszert nemzetközi folyóiratban publikáltuk.

A. Multi-allélspecifikus PCR



B. Automata szekvenálás



2. ábra

A: Agaróz gél elektroforézis a glukokortikoid receptor gén BclI polimorfizmusának multiallél-specifikus PCR reakciója után. Mindhárom mintában (2. 3. és 4. oszlopok) megtalálható egy 418 bp méretű kontroll fragmens, melyet a BclI-forward és BclI-reverz primerek adnak. A homozigóta vad mintában (4. oszlop) a kontroll csík mellett megjelenő 177 bp méretű fragmens a vad szekvenciára specifikus BclI-vad-forward primer tapadását jelzi, a homozigóta polimorf mintában (2. oszlop) megjelenő 284 bp méretű fragmens a polimorf szekvenciára specifikus BclI mutáns reverz primer tapadását jelzi, a heterozigóta mintában (3. oszlop) a kontroll csík mellett megjelenő két specifikus csík pedig mindkét specifikus primer tapadását jelzi.

B: Direkt DNS szekvenálással kapott képek egy homozigóta vad típusú (felső kép), egy heterozigóta (középső kép) és egy homozigóta polimorf mintáról.

A módszert nemzetközi folyóiratban publikáltuk (*J Steroid Biochem Mol Biol.*, 100:161-6, 2006.)

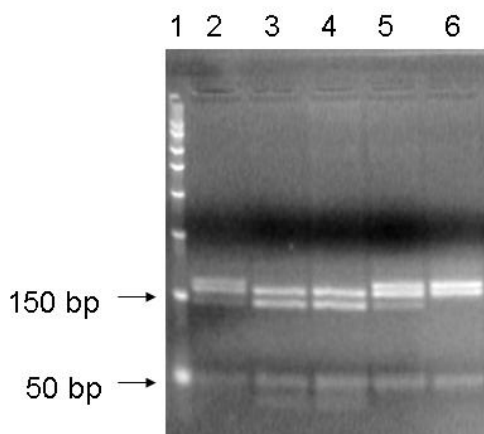
1./C AZ ER22/23EK polimorfizmus vizsgálata

Az ER22/23EK polimorfizmus vizsgálatához a szakirodalomban leírt restriktív enzim emésztést alkalmaztuk kis módosítással. A vizsgálandó kodonokat tartalmazó szakaszt PCR módszerrel amplifikáljuk, majd az MnlI restriktív enzimmel való emésztés után 3,5%-os agaróz gélen a restriktív termékeket szétválasztjuk. Vad típusú szekvencia esetén 149 bp, 163 bp, valamint több 50 bp-nál kisebb méretű termék keletkezik. Polimorfizmus jelenléte esetén az enzim egyik vágási helye megszűnik, és így a 149 bp-as termék helyett egy 184 bp hosszú termék keletkezik. Heterozygota esetben mindhárom (149, 163 és 184 bp) terméknek megfelelő csík megjelenik az elektroforézisen. A restriktív emésztés módszerét direkt szekvenálással is ellenőriztük.

A. Restriktív emésztést követő gélelektroforézis:

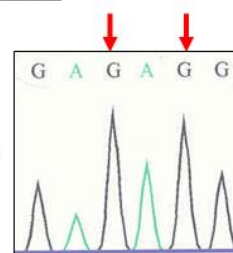
Minták:

1. DNS marker
2. Heterozygota
3. Homozygota vad típus
4. Homozygota vad típus
5. Heterozygota
6. Homozygota polimorf

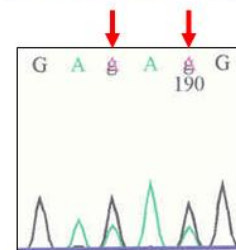


B. Automata szekvenálás:

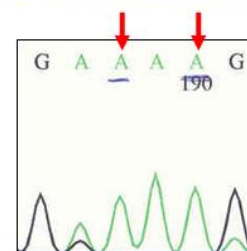
Homozygota vad típus
(GAGAGG/GAGAGG, azaz ER22/23ER)



Heterozygota
(GAGAGG/GAAAAG, azaz ER22/23EK)



Homozygota polimorf
(GAAAAG/GAAAAG, azaz EK22/23EK)



3.ábra

A: Agaróz gél elektroforézis a glukokortikoid receptor gén PCR-amplifikált 2-es exon részletének restriktív emésztése után. 1. oszlop: DNS marker, 2.és 4. oszlop: az ER22/23EK heterozygota mintánál a három csík (149, 163 és 184 bp méretű) a vad és a polimorf allél együttes jelenlétét mutatja, 3. és 4. oszlop: az ER22/23ER vad típusú homozygota mintánál kapott két kisebb méretű csík (149 és 163 bp) a vad allél egyedüli jelenlétét mutatja, 6. oszlop: az EK22/23EK homozygota polimorf mintánál a két nagyobb méretű csík (163 és 184 bp) a polimorf allél egyedüli jelenlétét mutatja .

B: Direkt DNS szekvenálással kapott képek egy homozygota vad típusú (felső kép), egy heterozigóta (középső kép) és egy homozygota polimorf mintáról.

2. In silico vizsgálatok

Munkánk célja a glukokortikoid receptorok eddig leírásra nem került szekenciavariánsainak azonosítása egy új technika, a számítógépes adatbáziselemzés „in silico” megközelítés alkalmazása révén. A szekenciapolimorfizmusok vizsgálata a jelenkor orvostudományának egyik fő kutatási irányát képezi, mely által a betegségek iránti hajlam predikciója és a személyre szabott kezelési protokollok felállítása is lehetővé válhat a jövőben. Tekintettel arra, hogy a glukokortikoidok a homeosztázis szabályozásában és számos betegség pathogenezisében központi szerepet játszanak, e hormonok receptoraiban felismert polimorfizmusok nagy jelentőséggel bírhatnak.

Vizsgálataink során az NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov) adatbázisait a BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programmal vizsgáltuk. A glukokortikoid receptor α és β mRNS szekvenciákat keresőként használva több szekenciavariánst sikerült azonosítanunk, melyek között eddig még nem leírt variánsok is találhatóak.

A vizsgálataink során azonosított valamennyi szekenciavariáns a glukokortikoidreceptor hormonkötő régiójában található. Ezek között vannak aminosavcserével nem járó variánsok, pl. az eddig nem leírt Gly679Gly variáns, emellett azonban aminosavcserét eredményező, a receptor struktúráját ill. működését befolyásolni képes változatokat is találtunk. A Met646Thr variáns drámai változást eredményezhet a protein működésében. E variáns jelentőségét in vitro mutagenézis eredmények is alátámasztják, amennyiben az ezen variánst hordozó receptor ligandkötő képessége jelentősen megváltozik.

Két már leírt polimorfizmust is sikerült megtalálnunk (His588His, Asp678Asp), ami módszerünk hatékonyságát jelzi. Az „in silico” módszer legfőbb hátrányát mindazonáltal a kísérleti megerősítés szüksége képezi, lévén a számítógépes analízis során műtermékek (pl. PCR hibák) szekenciavariánsként jelennek meg.

A jövőben további szekvenciákat tervezünk vizsgálni újabb adatbázisok bevonásával, eddig még nem leírt további variánsok azonosítása céljából.

3. A glükokortikoid receptor gén polimorfizmusok és a csontanyagcsere összefüggése a normál populációban

A vizsgálatba bevont 250 beteg közül 241 adatait tudtuk feldolgozni. A betegek mindegyikénél kizártuk a csontanyagcserét esetleg befolyásoló betegségeket vagy kezeléseket (pajzsmirigy betegség, mellékpajzsmirigy betegség, mellékvese betegség, autoimmun ízületi betegség, inzulinnal kezelt cukorbetegség, veseelégtelenség, malignus betegség, szteroid kezelés, syncumar kezelés, antiprotikus kezelés, hormonpótló kezelés). A betegek demográfiai és klinikai adatait az 1. táblázat tartalmazza.

	<i>Összes beteg</i>	<i>Nők</i>	<i>Férfiak</i>
<i>Betegek száma</i>	241	206	35
<i>Életkor (év)</i>	62 (24-86)	64 (24-86)	57 (29-83)

<i>BMI (kg/m²)</i>	25,5 (15,8-39,2)	25,5 (15,8-39,2)	26,0 (19,1-36,4)
<i>Szérum kalcium (mmol/liter)</i>	2,38 (2,10-2,70)	2,38 (2,10-2,70)	2,40 (2,22-2,54)
<i>Szérum foszfát (mmol/liter)</i>	1,17 (0,76-1,68)	1,20 (0,76-1,68)	1,06 (0,76-1,48)
<i>ALP (U/Liter)</i>	172,0 (64,0-387,0)	172,5 (64,0-387,0)	172,0 (107,0-253,0)
<i>Dohányzás</i>	66/217 (30,4%)	52/183 (28,4%)	14/34 (41,2%)
<i>Postmenopausás nők száma</i>	-	178/206 (86,4%)	-
<i>Menopausa óta eltelt évek</i>	-	17,5 (0-35)	-

1. Táblázat: A vizsgált normál populáció demográfiai és klinikai adatai /medián (range)/

A csontanyagcsere jellemzésére minden beteget kikérdeztünk az anamnézisben előforduló csonttörésekről, a családban előforduló osteoporosisról, és rögzítettük a gerinc és femur DEXA vizsgálat valamint a csontépítést jelző szérum osteocalcin és csontbontást jelző szérum β -Crosslaps mérések eredményeit. Az osteoporosis diagnózisát a WHO kritériumok alapján a bármely vizsgált régióban mért T-score < -2,5 érték esetén állapítottuk meg. A betegek csontanyagcserejét jellemző paramétereket a 2. táblázat tartalmazza.

	<i>Összes beteg</i>	<i>Nők</i>	<i>Férfiak</i>
<i>L2-4 BMD (g/cm²)</i>	0,882 (0,554-1,910)	0,843 (0,554-1,910)	1,044 (0,650-1,553)
<i>L2-4 Z-score</i>	-0,51 (-3,00 to 3,10)	-0,50 (-2,95 to 3,10)	-0,85 (-3,00 to 2,31)
<i>Femur nyak BMD (g/cm²)</i>	0,720 (0,307-1,150)	0,690 (0,307-1,112)	0,826(0,512-1,150)
<i>Femur nyak Z-score</i>	-0,37 (-3,46 to 2,85)	-0,33 (-3,46 to 2,85)	-0,52 (-2,50 to 2,15)
<i>Osteocalcin (ng/ml)</i>	25,9 (9,22-56,60)	26,5 (9,22-56,60)	23,8 (12,1-52,0)
<i>B-crosslaps (pg/ml)</i>	455,0 (122,7-1130,0)	451,2 (122,7-1130,0)	483,9 (181,6-1111,0)
<i>Osteoporosis prevalenciája</i>	124/241 (51,0%)	112/206 (54,4%)	12/35 (34,3%)
<i>Csonttörések</i>	51/233 (21,9%)	49/199 (24,6%)	2/34 (5,9%)
<i>Családban osteoporosis</i>	50/183 (27,3%)	46/157 (29,3%)	4/26 (15,4%)

2. táblázat: A vizsgált normál populáció csontanyagcserejére jellemző adatai /medián (range)/.

A betegeknél elvégeztük a glükokortikoid receptor gén három polimorfizmusának szűrését. Mindhárom polimorfizmus esetében az átlag magyar populációnak megfelelő allélfrekvenciát találtunk, a genotípus eloszlás megfelelt a Hardy-Weinberg egyensúlynak. A betegek genotípus eloszlását a 3. táblázat tartalmazza.

<i>Genotípus eloszlás</i>						
<i>BclI</i>		<i>N363S</i>		<i>ER22/23EK</i>		
<i>CC</i>	101	<i>AA</i>	225	<i>GG</i>	239	
<i>CG</i>	117	<i>AG</i>	16	<i>GA</i>	2	0,004
<i>GG</i>	23	<i>GG</i>	0	<i>AA</i>	0	

3. Táblázat: A glükokortikoid receptor gén polimorfizmusainak genotípus megoszlása a vizsgált normál populációban.

A polimorfizmusok hatását a csontanyagcsere paraméterekre „backward stepwise” lineáris regresszió számításal vizsgáltuk (SPSS 12.0 szoftver). Az ER22/23EK polimorfizmust a

nagyon alacsony hordozószám miatt nem vettük be a statisztikai feldolgozásba. A regressziós modellben az N363S és BclI genotípusokon kívül a nem, életkor, menopausa óta eltelt évek száma, BMI, dohányzás és kávéfogyasztás szerepeltek lehetséges prediktív faktorokként. A gerinc és femur nyak BMD, T- és Z-score értékekkel egyik polimorfizmus jelenléte sem mutatott szignifikáns összefüggést (4. táblázat). Ugyanígy nem találtunk összefüggést a vizsgált polimorfizmusok és az osteoporosis, családi osteoporosis, csonttörés előfordulása között.

Ezzel szemben a csontanyagcserét jellemző szérumszintű markerek esetében összefüggést találtunk a glükokortikoid receptor gén variánsával (4. táblázat). A többlépcsős lineáris regressziós modellben a szérumszintű β -Crosslaps koncentráció legerősebb lineáris prediktorának a szérumszintű osteocalcin koncentráció bizonyult, és az N363S polimorfizmus ($p=0.042$) és a BMI ($p=0.046$) is szignifikáns meghatározónak bizonyult. A nők alcsoportját külön vizsgálva ugyanezen modellel, a szérumszintű β -Crosslaps és a glükokortikoid receptor gén N363S polimorfizmus közötti összefüggés szintén szignifikáns volt ($p=0,012$). A férfiak viszonylag kis száma miatt ezt az alcsoportot külön nem vizsgáltuk. A szérumszintű osteocalcin koncentráció prediktorait hasonló modellben vizsgálva a legerősebb összefüggést a szérumszintű β -Crosslaps koncentrációval találtunk ($p<0,01$), az N363S polimorfizmus hordozása esetén tendencia volt megfigyelhető alacsonyabb szérumszintű osteocalcin koncentrációra ($p=0,08$). A BclI polimorfizmus jelenléte az N363S variánsal ellentétben nem mutatott összefüggést a csontanyagcsere markerekkel (4. táblázat).

	<i>N363S</i>		<i>BclI</i>	
	<i>B</i>	<i>p-value</i>	<i>B</i>	<i>p-value</i>
<i>L2-4 BMD</i> ^a	-0,18	0,72	0,047	0,322
<i>L2-4 Z-score</i> ^b	-0,01	0,861	0,02	0,713
<i>Femur nyak BMD</i> ^c	-0,032	0,433	0,033	0,421
<i>Femur nyak Z-score</i> ^d	-0,032	0,557	0,043	0,414
<i>Szérumszintű osteocalcin</i> ^e	-0,094	0,08	0,025	0,642
<i>Szérumszintű β-Crosslaps</i> ^f	0,109	0,042	0,024	0,655

4. Táblázat. A BclI és N363S polimorfizmusok csontsűrűsítésre és csontmarkerekre kifejtett hatásának vizsgálata többszörös lineáris regresszió analízissel.

Minden vizsgált paraméter esetében korrigáltunk a következőkre: BclI genotípus, N363S genotípus, ER22/23EK genotípus, életkor, menopausa óta eltelt évek száma, BMI, nem, dohányzás és kávéfogyasztás.

Emellett az egyes paramétereknél a következőkre történt még korrigálás:

^a Femur nyak BMD

^b Femur nyak Z-score

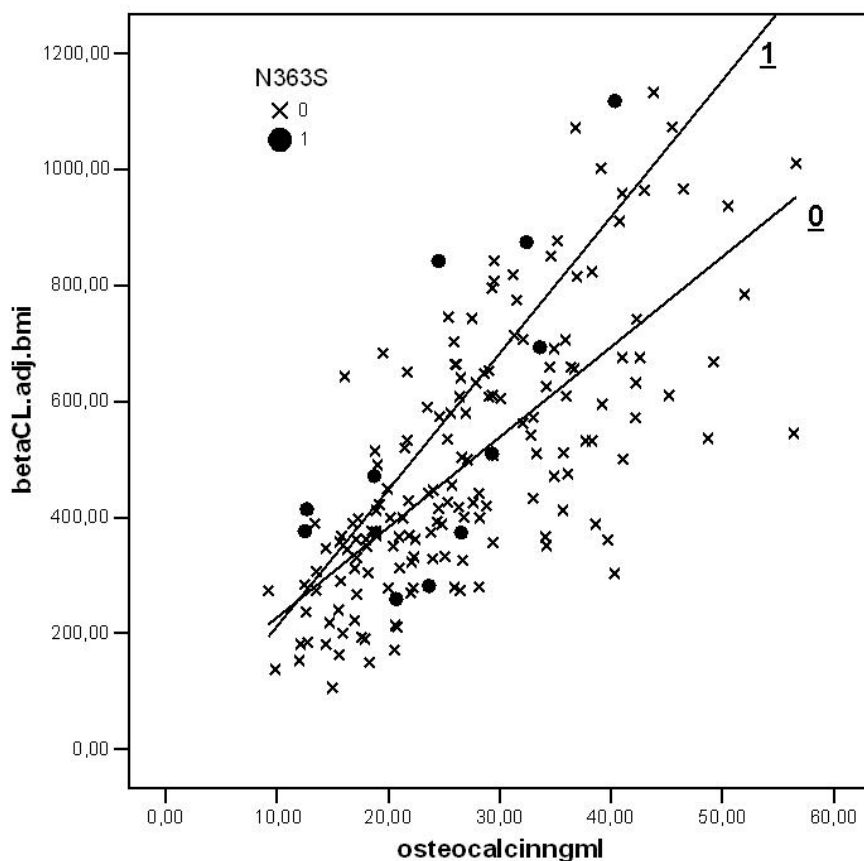
^c L2-4 BMD

^d L2-4Z-score

^e Szérumszintű β -Crosslaps

^f Szérumszintű osteocalcin

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy hasonló osteocalcin koncentráció mellett az **N363S polimorfizmust hordozó személyekben magasabb szérumszintű β -Crosslaps koncentráció** figyelhető meg, mint a polimorfizmust nem hordozókban (4. ábra).



4. ábra: A Szérum β -Crosslaps BMI-re korrigált értéke a szérum Osteocalcin koncentráció függvényében ábrázolva, az N363S polimorfizmust hordozó (1) és nem hordozó (0) személyekben. (A β -Crosslaps koncentrációt azért BMI-re korrigáltuk, mert az összes vizsgált paraméter közül a BMI, szérum Osteocalcin koncentráció és az N363S genotípus volt szignifikáns meghatározója a β -Crosslaps koncentrációnak.) A két egyenes mutatja, hogy ugyanazon osteocalcin koncentrációhoz a hordozó személyekben magasabb β -Crosslaps koncentráció tartozik.

Összefoglalva tehát a glükokortikoid receptor gén N363S polimorfizmusáról kimutattuk, hogy a normál (a csontanyagcserét befolyásoló betegségben nem szenvedő, és ilyen kezelésben nem részesülő) populációban összefügg a csontanyagcsere egyensúlyának a csontbontás irányába történő eltolódásával. Erről a polimorfizmusról *in vitro* kimutatták, hogy a receptor érzékenységét növeli (5), ami magyarázata lehet az általunk talált összefüggésnek. Az N363S polimorfizmus és a csont ásványianyag tartalom között nem találtunk összefüggést, aminek magyarázata lehet a viszonylag kis esetszám, és a fiatal betegek nagy száma. Egy korábbi közleményben tendenciát figyeltek meg N363S polimorfizmus hordozás esetén alacsonyabb lumbális gerinc ásványianyag tartalomra (7), ami alátámasztja a mi eredményeinket, miszerint a polimorfizmus hordozása fokozott csontbontással jár.

Eredményünk közelebb vihetnek a glükokortikoid receptor variánsok és a csontszövet rendellenességei közötti összefüggések megismeréséhez, valamint segítséget nyújthat a csonttrikulás szempontjából fokozottabb rizikójú betegek szűrésében.

Az eredményeink nemzetközi publikációját két éven belül tervezzük, jelenleg a kézirat előkészítés alatt van. Ezért tisztelettel kérjük, hogy a jelentésben foglaltak alapján született minősítést az OTKA kiegészítő eljárásban később módosítsa, figyelembe véve a később megjelenő közleményünket.

4. A glükokortikoid receptor gén polimorfizmusok és a csontanyagcsere összefüggése szteroid-indukált osteoporosisos betegekben

A vizsgálatba bevont 50 beteg közül 47 beteg adatait tudtuk feldolgozni. Közülük 23 Cushing szindrómás, 26 szteroid kezelés okozta osteoporosisos beteg volt. A betegek adatait az 5. táblázat mutatja be.

<i>Paraméter</i>	<i>Összes beteg</i>	<i>Cushing szindróma</i>	<i>Szteroid kezelt</i>
<i>Betegek száma</i>	49	23	24
<i>Életkor (év)</i>	49,9 (21-80)	43,7 (21-74)	58,3 (23-80)
<i>Férfi:Nő arány</i>	10:37	4:19	6:18
<i>BMI (kg/m²)</i>	27,7 ± 4,9	28,9 ± 4,9	24,7 ± 3,6
<i>Szérum kalcium (mmol/liter)</i>	2,38 ± 0,1	2,39 ± 0,1	2,3 ± 0,12
<i>Szérum foszfát (mmol/liter)</i>	1,05 ± 0,2	1,05 ± 0,2	1,1 ± 0,2
<i>ALP (U/Liter)</i>	201,1 ± 92	207,5 ± 101,9	180,6 ± 58,5
<i>Szérum osteocalcin (ng/ml)</i>	16,9 ± 15,4	14,87 ± 11,2	20,4 ± 21,4
<i>Szérum β-Crosslaps (pg/ml)</i>	406 ± 268,5	486,7 ± 285,8	264,8 ± 169,8
<i>L2-4 BMD (g/cm²)</i>	0,82 ± 0,13	0,8 ± 0,1	0,88 ± 0,2
<i>L2-4 T-score</i>	-2,23 ± 0,87	-2,37 ± 0,87	-1,78 ± 0,85
<i>L 2-4 Z-score</i>	-1,59 ± 1, 02	-1,75 ± 0,96	-1,04 ± 1,13
<i>Femur nyak BMD (g/cm²)</i>	0,67 ± 0,09	0,68 ± 0,09	0,66 ± 0,09
<i>Femur nyak T-score</i>	-2,01 ± 0,93	-1,7 ± 0,78	-3,03, ± 0,6
<i>Femur nyak Z-score</i>	-1,05 ± 1	-0,9 ± 0,99	-1,5 ± 0,97
<i>Osteoporosis prevalencia</i>	72% (34/47)	43% (10/23)	100%

5. táblázat

Átlag (range) vagy átlag ± SD.

A Cushing szindrómás betegek egy részénél a DEXA vizsgálat csak osteopéniát mutatott, ezért a feldolgozás során kétféle csoportot vizsgáltunk: egyrészt az összes 47 beteget együtt, másrészt külön kiemelve a 34 osteoporosisos beteget.

Az összes vizsgált beteg között a genotípus eloszlást a 6. táblázat mutatja. A genotípus eloszlás megfelelt a Hardy-Weinberg egyensúlynak. Az allélfrekvenciák nem tértek el szignifikánsan a normál populációban megfigyelt allélfrekvenciától egyik polimorfizmus esetében sem.

<i>Genotípus eloszlás</i>		
<i>BclI</i>	<i>N363S</i>	<i>ER22/23EK</i>

<i>CC</i>	17		<i>AA</i>	42		<i>GG</i>	46
<i>CG</i>	28	0,34	<i>AG</i>	4	0,06	<i>GA</i>	1
<i>GG</i>	2		<i>GG</i>	1		<i>AA</i>	0

6. Táblázat: A glükokortikoid receptor gén polimorfizmusainak genotípus megoszlása az összes vizsgált Cushing szindrómás és glükokortikoid-kezelt betegen.

Az osteoporosisos betegek között a genotípus eloszlást a 7. táblázat mutatja. A genotípus eloszlás megfelelt a Hardy-Weinberg egyensúlynak. Az allélfrekvenciák nem tértek el szignifikánsan a normál populációban megfigyelt allélfrekvenciától egyik polimorfizmus esetében sem.

<i>Genotípus eloszlás</i>								
<i>BclI</i>			<i>N363S</i>			<i>ER22/23EK</i>		
<i>CC</i>	14		<i>AA</i>	29		<i>GG</i>	34	
<i>CG</i>	19	0,31	<i>AG</i>	4	0,09	<i>GA</i>	0	
<i>GG</i>	1		<i>GG</i>	1		<i>AA</i>	0	

7. Táblázat: A glükokortikoid receptor gén polimorfizmusainak genotípus megoszlása az osteoporotikus Cushing szindrómás és glükokortikoid-kezelt betegeknél.

Tehát ezen viszonylag kis esetszámú betegcsoportot vizsgálva nem találtunk összefüggést a glükokortikoid receptor gén három vizsgált polimorfizmusa és a glükokortikoid indukált osteoporosis között. Mindazonáltal érdemes megjegyezni, hogy az **N363S** polimorfizmus allélfrekvenciája a szteroid-indukált osteoporosisos betegek között **háromszorosa volt a normál populációban megfigyelt allélfrekvenciának** (0,09 vs. 0,03, $p=0,097$). Bár ez a különbség a vizsgált betegcsoportban nem szignifikáns, azonban a szignifikancia hiánya lehet, hogy csak az alacsony esetszámnak róható fel. Figyelembe véve, hogy a normál populáció vizsgálatakor kapott eredményünk is az N363S polimorfizmusnak fokozott csontbontással, és így végsősoron osteoporosisos hajlammal való összefüggését támasztotta alá, a szteroid indukált osteoporosisos betegek vizsgálatakor talált nem szignifikáns különbség is feltétlenül figyelmet érdemel. Ezért tervezzük további kutatásaink során ennek vizsgálatát.

1. Smith DM, Nance WE, Kang KW et al. Genetic factors in determining bone mass. *J Clin Invest* 1973;52:2800-2808.
2. Pocock NA, Eisman JA, Hopper I et al. Genetic determinants of bone mass in adults. *J Clin Invest* 1987;80:706-710.
3. Nakashima T, Sasaki H, Tsuboi M et al. Inhibitory effect of glucocorticoid for osteoblast apoptosis induced by activated peripheral blood mononuclear cells. *Endocrinology* 1998;139:2032-240.
4. Cooper MS, Hewison M, Stewart PM et al. Glucocorticoid activity, inactivity and the osteoblast. *J Endocrinol* 1999;81:3441-3447.
5. Russcher H, Smit P, van den Akker EL, van Rossum EF, Brinkmann AO, de Jong FH, Lamberts SW, Koper JW. Two polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene directly affect glucocorticoid-regulated gene expression. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Oct;90(10):5804-10. Epub 2005 Jul 19.

6. van Rossum EF, Lamberts SW. Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and their associations with metabolic parameters and body composition. *Recent Prog.Horm.Res.* 2004;59:333-357.
7. Huizenga NA, Koper JW, De Lange P, Pols HA, Stolk RP, Burger H, et al. A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene may be associated with and increased sensitivity to glucocorticoids in vivo. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 1998 Jan;83(1):144-151.
8. van Schoor NM, Dennison E, Lips P, Uitterlinden AG, Cooper C. Serum fasting cortisol in relation to bone, and the role of genetic variations in the glucocorticoid receptor. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007 Dec;67(6):871-8. Epub 2007 Aug 6.