

## Skuteczność kliniczna rizedronianu w rocznej obserwacji pacjentek z osteoporozą pomenopauzalną w zależności od polimorfizmu genu dla osteoprotegeryny

*Efficacy of 1-year treatment of risedronian in postmenopausal women in connection with polymorphism of OPG gene*

Wanda Horst-Sikorska<sup>1</sup>, Anna Wawrzyniak<sup>1</sup>, Liliana Celczyńska-Bajew<sup>1</sup>,  
Michalina Marcinkowska<sup>1</sup>, Ryszard Słomski<sup>2</sup>, Robert Kalak<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Medycyny Rodzinnej Akademii Medycznej w Poznaniu, kierownik prof. AM dr hab. med. Wanda Horst-Sikorska

<sup>2</sup>Instytut Genetyki Człowieka PAN, dyrektor prof. dr hab. Jerzy Nowak

**Słowa kluczowe:** rizedronian, osteoporoza, gen dla osteoprotegeryny.

**Key words:** risedronian, osteoporosis, osteoprotegerin gene.

### Streszczenie

W badaniu oceniano skuteczność rizedronianu w leczeniu osteoporozy pomenopauzalnej w zależności od polimorfizmu genu dla osteoprotegeryny (OPG). Obserwacja kliniczna była prowadzona wśród 49 pacjentek z rozpoznaną osteoporozą pomenopauzalną. Wszystkie pacjentki miały wykonany pomiar gęstości mineralnej kości w obrębie szyjki kości udowej przed rozpoczęciem leczenia oraz po roku terapii. Oprócz rizedronianu (preparat Actonel) badane pacjentki stosowały również wapń i witaminę D<sub>3</sub>, w dawkach zalecanych przez IOF. Skuteczność terapii oceniano klinicznie jako obecność lub brak złamania kości. Badanie polimorfizmu genu osteoprotegeryny 9G/C w eksonie 1 było prowadzone w oparciu o metody PCR i SSCP oraz sekwencjonowanie fragmentów DNA. Na podstawie badań genetycznych pacjentki podzielono na 3 grupy, w zależności od polimorfizmu genu dla OPG – pacjentki z allelem CC, z allelem CG, z allelem GG. Na podstawie rocznej obserwacji można stwierdzić, że w badanej grupie pacjentek największy przyrost BMD podczas leczenia rizedronianem zaobserwowano w grupie z allelem CG genu osteoprotegeryny, a najmniejszy przyrost w grupie chorych z allelem CC genu. Stwierdzono, że sekwencja GG genu dla osteoprotegeryny wiąże się z występowaniem najwyższej gęstości mineralnej kości w badanej grupie chorych. W naszej obserwacji złamanie kości wystąpiło u 2 osób, jednej pacjentki z genotypem CG i drugiej z genotypem GG. Na podstawie rocznej obserwacji nie udało się wykazać statystycznie istotnej przewagi efektów leczenia rizedronianem w zależności od wariantów genotypu genu dla osteoprotegeryny.

### Summary

Efficacy of risedronian in osteoporosis therapy in connection with polymorphism of osteoprotegerin gene (OPG) was observed in our study. We assessed 49 women with postmenopausal osteoporosis on basis of measurement of femoral neck bone density before treatment of risedronian and after 12 months of therapy. Our study population used calcium and vit. D therapy as well. Efficacy of osteoporosis treatment was assessed as presence or lack of bone fractures. Investigation of polymorphism of OPG gene in exon 1 was provided with PCR, SSCP. Other polymorphisms were genotyped by RFLP. On the basis of genetic investigation our study population was divided on 3 groups: group with CC-allele, CG-allele, GG-allele. After one year observation of risedronian therapy we noticed the highest increase of bone density only in CG-allele group and the smallest increase in CC-allele group. During our study bone fractures was observed in 2 patients – 1 from CG-allele group, 1 from GG-allele group. In our study no statistically significance of risedronian therapy in connection with polymorphism of OPG gene in postmenopausal osteoporosis was found.

---

### Adres do korespondencji:

prof. AM dr hab. med. Wanda Horst-Sikorska, Zakład Medycyny Rodzinnej, Akademia Medyczna, ul. Dąbrowskiego 79, 60-529 Poznań

Praca wpłynęła: 30.06.2004 r.

## Wstęp

Według definicji WHO osteoporoza jest układową chorobą szkieletu, charakteryzującą się niską masą kostną, upośledzoną mikroarchitekturą, a w konsekwencji zwiększoną łamliwością kości. W etiologii osteoporozy podkreśla się rolę czynników dziedzicznych i środowiskowych. Liczne badania kliniczne zajmują się określaniem zależności pomiędzy polimorfizmem genów a gęstością mineralną kości, podatnością na złamania oraz skutecznością w leczeniu osteoporozy. Analizy genetyczne u pacjentów z osteoporozą dotyczą m.in. polimorfizmu genów dla receptorów: witaminy D<sub>3</sub>, estrogenów; kalcytoniny, parathormonu (PTH), kolagenu (*Coll 1 α*), czynnika martwicy nowotworów (TNF), interleukin IL-6 i IL-1, transformującego czynnika wzrostowego (TGF2α) oraz osteoprotegeryny (OPG). Stan kości zależy od intensywności i jakości procesów syntezy i resorpcji. Aktywność procesów resorpcji kości jest determinowana m.in. przez aktywność genu dla osteoprotegeryny (OPG). Działanie tego białka polega na hamowaniu procesów proliferacji i dojrzewania osteoklastów. W przypadku obniżenia ekspresji genu OPG dochodzi do niehamowanej stymulacji wzrostu i dojrzewania komórek linii osteoklastów, co doprowadza do nasilenia procesów niszczenia kości [6, 9–11].

W leczeniu osteoporozy wykorzystuje się wiele leków działających jako inhibitory resorpcji. Należą do nich: bisfosfoniany, estrogeny, leki z grupy SERM oraz kalcytonina. Środki działające jako stymulatory kościotworzenia nie są jeszcze tak rozpowszechnione. W tej grupie znajduje się stosowany pulsacyjnie parathormon oraz sole strontu. Niekiedy były i nadal są w tym celu podawane steroidy anaboliczne.

W pracy podjęto badanie efektywności terapii preparatem należącym do III generacji bisfosfonianów – rizedronianem. Mechanizm działania leków z tej grupy stosowanych w leczeniu osteoporozy polega na hamowaniu wielkości i tempa resorpcji. Wykazano, że w czasie ich stosowania ulega redukcji aktywność metaloproteinaz w macierzy kostnej oraz obniża się stężenie integryn [4, 5, 11]. Z uwagi na kierunek terapeutycznego działania rizedronianu założono możliwość powiązania wyników terapii lekami z tej grupy z polimorfizmem wariantów genu dla OPG. Na poziomie molekularnym w warunkach fizjologicznych procesy resorpcji są hamowane poprzez zwiększenie syntezy OPG.

## Cel pracy

Celem pracy była ocena skuteczności klinicznej preparatu rizedronian (Actonel) w rocznej obserwacji pacjentek z osteoporozą pomenopauzalną, w zależności od polimorfizmu genu dla osteoprotegeryny.

## Materiał i metody

Badanie oceniające skuteczność terapii bisfosfonianem w leczeniu osteoporozy pomenopauzalnej, w zależności od wariantu genotypu genu dla osteoprotegeryny, zostało przeprowadzone w grupie 49 kobiet – pacjentek Poradni Endokrynologii i Osteoporozy SPSK2 w Poznaniu. Do badania zakwalifikowano chore w wieku 51–75 lat (średnia wieku 67,1 roku), u których na podstawie densytometrycznego badania gęstości mineralnej kości, mierzonej w szyjce kości udowej, rozpoznano osteoporozę. Wszystkie zakwalifikowane pacjentki miały wykonane oznaczenia LH i E<sub>2</sub> w celu wykluczenia innych niż menopauza przyczyn braku miesiączki (ostatnia miesiączka wystąpiła przynajmniej 6 mies. przed rozpoczęciem badań). Ostatnie miesiączkowanie chore deklarowały w czasie od 2 do 26 lat temu. W okresie co najmniej 6 mies. przed badaniem oprócz preparatów witaminy D<sub>3</sub> i wapnia kobiety nie przyjmowały innych leków wpływających na stan kości. Po rozpoznaniu osteoporozy i wykluczeniu przeciwwskazań do stosowania bisfosfonianów podano pacjentkom rizedronian w dawce raz dziennie 1 tabletkę 5 mg (preparat Actonel). Przez cały czas kontynuowano podawanie witaminy D<sub>3</sub> w dawce 400–800 j.m. oraz 1 000–1 200 mg wapnia, wg schematu leczenia zgodnego z wytycznymi przyjętymi przez Polską Fundację Osteoporozy.

Badanie polimorfizmu genu osteoprotegeryny 9G/C w eksonie 1 było prowadzone na podstawie metod PCR i SSCP oraz sekwencjonowania fragmentów DNA. Badania te wykonywano w laboratorium Zakładu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu. U badanych DNA izolowano z leukocytów krwi obwodowej metodą z izotocyjaniem guanidyny (GTC). Startery do reakcji PCR dla genu OPG zaprojektowano na podstawie sekwencji z Banku Genów (GenBank). Reakcję PCR wykonywano w objętości 20 µl z użyciem 100 ng DNA genomowego. Warunki reakcji: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mM dNTP, 30 ng każdego ze starterów i 0,6 jednostki polimerazy Taq DNA. Temperatura denaturacji 94°C przez 40 s; przyłączanie starterów przez 40 s; wydłużanie 72°C przez 90 s, 35 cykli.

Polimorfizm 9G/C genu osteoprotegeryny (OPG) oceniano metodą SSCP (*single strand conformation polymorphism*). W tym celu produkt PCR denaturowano z 60% formamidem, a następnie rozdzielano w małym (20x20 cm), natywnym 8% żelu poliakryloamidowym o stosunku akryloamidu do bisakryloamidu 49:1, przy napięciu 65 V przez noc i 0,5 x TBE. Produkt wybarwiano przez srebrzenie. Trawienie enzymami restrykcyjnymi prowadzono w warunkach zgodnych z zaleceniami producenta.

Skuteczność terapii była oceniana w ciągu 12 mies. stosowania rizedronianu. Wynik leczenia oceniano kli-

**Tabela I.** Średnie wartości gęstości mineralnej kości przed i po leczeniu w badanej grupie pacjentek

Badane parametry	Badana grupa	Allel CC	Allel CG	Allel GG
liczba pacjentek	49	17	22	10
średnia wartość gęstości mineralnej kości przed leczeniem	0,669 g/cm <sup>2</sup>	0,647 g/cm <sup>2</sup>	0,662 g/cm <sup>2</sup>	0,709 g/cm <sup>2</sup>
średnia wartość gęstości mineralnej kości po leczeniu	0,671 g/cm <sup>2</sup>	0,623 g/cm <sup>2</sup>	0,687 g/cm <sup>2</sup>	0,716 g/cm <sup>2</sup>

nicznie jako wystąpienie lub brak złamania (końcowy punkt obserwacji). Po zakończeniu 12-miesięcznej terapii u wszystkich pacjentek wykonano ponowne kontrolne badanie densytometryczne.

Ocenę statystyczną wyników przeprowadzono na podstawie testu Kruskala-Wallisa, testu Willcoxon, występowanie korelacji oceniano testem Diuna.

## Wyniki

Badanie genotypu pacjentek wykazało występowanie allelu CC genu osteoprotegeryny u 17 osób, allelu CG u 22, a allelu GG u 10 chorych.

Wśród pacjentek z allelem CC średnie wartości *T-score* przed rozpoczęciem leczenia rizedronianem wynosiły -2,79 SD, a po zakończeniu 12-miesięcznej obserwacji średni *T-score* wynosił -2,93 SD ( $\Delta$  -0,13 SD).

W grupie pacjentek z allelem CG średnie wartości *T-score* wynosiły -2,68 SD, a po zakończeniu badań -2,39 SD ( $\Delta$  +0,29 SD).

Średnie wartości *T-score* w grupie pacjentek – nosicielek allelu GG genu osteoprotegeryny przed rozpoczęciem leczenia rizedronianem wynosiły -2,24 SD, a po zakończeniu obserwacji -2,20 SD ( $\Delta$  +0,04 SD).

Złamania kości wystąpiły u 2 chorych – jedno u pacjentki z allelem CG genu osteoprotegeryny (po upadku złamanie kompresyjne kręgu L1), drugie u pacjentki z allelem GG (złamanie w miejscu typowym).

W tab. I przedstawiono średnie wartości gęstości mineralnej kości mierzone w badanej grupie w obrębie przynasady bliższej kości udowej, przed podaniem rizedronianu i po 12-miesięcznym leczeniu.

Średnie wartości *T-score* w badanej grupie przed i po 12-miesięcznym leczeniu rizedronianem zostały przedstawione w tab. II.

Po 12-miesięcznej terapii rizedronianem stwierdzono następujące zmiany BMD wg wartości *T-score*: w grupie pacjentek z allelami CG genu dla osteoprotegeryny odpowiednio +0,29 SD i w grupie z allelem GG +0,04 SD.

Z kolei u chorych z allelem CC genu OPG, mimo stosowania takiej samej terapii, wykazano zmniejszenie wartości BMD ( $\Delta$ *T-score* -0,13 SD).

## Dyskusja

Badania z zakresu biologii molekularnej otwierają możliwości bardzo wczesnej oceny indywidualnego zagrożenia występowania chorób. Wykorzystując techniki badań stosowane w tej dziedzinie, wprowadzono czułe i precyzyjne testy diagnostyczne dla wczesnego rozpoznawania i różnicowania wielu jednostek chorobowych. Jeszcze innym kierunkiem, gdzie zastosowanie ma powyższa analiza, są badania wykazujące różnice skuteczności wybranych leków w zależności od wariantów genotypu.

Badania wpływu różnic genetycznych na skuteczność leczenia osteoporozy określoną grupą leków antyresorpcyjnych stanowią podstawę poszukiwań terapii *na miarę*. Dzięki temu zostanie stworzona możliwość doboru najbardziej efektywnego leczenia, w zależności od genotypu chorego.

W niniejszej pracy badania dotyczyły wykazania możliwego znaczenia polimorfizmu genu dla OPG na re-

**Tabela II.** Średnie wartości *T-score* przed i po leczeniu rizedronianem w badanej grupie pacjentek

Badane parametry	Badana grupa	Allel CC	Allel CG	Allel GG
liczba pacjentek	49	17	22	10
średni <i>T-score</i> przed leczeniem	68% -2,64 SD	66% -2,79 SD	68% -2,68 SD	72% -2,24 SD
średni <i>T-score</i> po leczeniu	68% -2,56 SD	63% -2,93 SD	70% -2,39 SD	73% -2,20 SD

zultat terapii rizedronianem sodu (preparat Actonel). Wybierając lek z grupy inhibitorów procesu resorpcji (rizedronian), oczekiwano efektu zależnego od wyjściowej aktywności OPG. Wiadomo bowiem, że im tempo resorpcji jest większe, tym jego blokowanie daje wyraźniejszy korzystny efekt kliniczny. Punktem wyjścia było założenie, że w ustroju aktywność procesów syntezy OPG jest zależna od polimorficznych wariantów genu dla OPG. Przy zaburzeniach efektywności ekspresji genu dla OPG można oczekiwać zwiększenia tempa procesu resorpcji, co klinicznie manifestuje się nasileniem szybkości i wielkości ubytku mineralnej masy kości. Wyniki uzyskane w pracy porównano do rezultatów przedstawionych przez innych autorów.

Obserwacje prowadzone w populacji chińskiej wykazały, że polimorfizm genu dla OPG wywiera wpływ na BMD. Badanie to zostało przeprowadzone u kobiet w wieku poniżej 65 lat [3, 6]. Przeprowadzona przez autorów ocena dotyczyła kobiet starszych w porównaniu z badaniem chińskim. Mimo to uzyskano podobne wyniki największego przyrostu BMD u nosicieli allelu G genu dla OPG.

Publikowane w piśmiennictwie wnioski dotyczące wpływu polimorfizmu genu dla OPG na mineralną masę kostną wg różnych autorów są często rozbieżne. Istnieją doniesienia wykazujące całkowity brak korelacji pomiędzy obecnością alleli genu dla OPG a gęstością mineralną kości (BMD). Inne wykazują, że masa kostna koreluje, np. z występowaniem allelu T genu dla OPG [2, 8, 9, 12]. Uzyskany na podstawie badań własnych wynik, chociaż wymaga ostrożnej interpretacji, wskazuje na rolę allelu G genu dla OPG w determinacji BMD.

Wiele spośród prac zajmujących się rolą OPG w metabolizmie kostnym koncentrowało się na ocenie innych nukleotydów niż badane w niniejszej pracy. Dotyczyły one m.in. sekwencji promotorowych lub intronowych genu, a nie, jak w przedstawianej pracy, zmian w obrębie eksonu 1 OPG. Badania słoweńskie potwierdziły obecność statystycznie istotnych różnic wartości BMD w zależności od genotypu OPG, ale jedynie mierzonych w obrębie kręgosłupa, a nie przynasady bliższej kości udowej. Haplotyp GATG promotora genu OPG był, jak wykazano, związany z niższą BMD niż haplotyp GGTT [1]. Odmienne wyniki uzyskali autorzy japońscy, wykazując, że wartości BMD, mierzone w obrębie szyjki kości udowej, są mniejsze u kobiet o allelu G dla genu OPG [12].

Ocenę skuteczności terapii przeprowadzono na podstawie kryterium klinicznego – wystąpienia złamania kości oraz badania densytometrycznego (BMD w obrębie szyjki kości udowej).

Na podstawie rocznej obserwacji nie udało się wykazać statystycznie istotnej przewagi efektów leczenia ri-

zedronianem w zależności od wariantów genotypu genu dla osteoprotegeryny. Wykazano natomiast istotną różnicę ocenianej gęstości mineralnej kości mierzonej w obrębie nasady bliższej kości udowej u chorych z genotypem CC i GG (test Diuna).

Ocenę tego samego polimorfizmu OPG w eksonie 1, wśród 50 pacjentów z osteoporozą, przeprowadzili Langdahl i wsp. Autorzy stwierdzili, że genotyp CC w eksonie 1 genu dla OPG występuje rzadziej u pacjentów ze złamaniami kości [7].

Zasadniczym celem leczenia osteoporozy jest uniknięcie złamania kości. Wartość BMD nie jest jedynym parametrem odpowiedzialnym za to powikłanie. Jednak wciąż uważa się, że gęstość mineralna kości jest kluczowym wskaźnikiem ryzyka tego zdarzenia [13]. Ocena, jak wpływa polimorfizm genu OPG na BMD, a przede wszystkim na ryzyko złamania, może w przyszłości okazać się ważnym elementem w wyodrębnieniu grupy pacjentów *genetycznie predysponowanych* nie tyle do rozwoju osteoporozy, co do ryzyka złamania. Taka identyfikacja stworzy czas i możliwość dla podjęcia wczesnych i korzystnych decyzji terapeutycznych [1, 9].

W obserwacji przeprowadzonej w naszym badaniu złamanie kości stwierdzono u 2 osób, po jednej z genotypem CG i GG. Na podkreślenie zasługuje fakt, że BMD w grupie chorych z allelem G było wyższe niż w grupie z allelem C. Potwierdza to fakt, że masa mineralna kości nie jest równoznaczna z określeniem ryzyka złamania, pomimo że im jest ona niższa, tym prawdopodobieństwo zdarzenia jest większe. Może to wskazywać, że – podobnie jak we wspomnianym badaniu Langdahla – nosiciele allelu C genu dla OPG mają mniejszą skłonność do złamań.

W pracy badano stosunkowo nieliczną grupę pacjentek, a czas obserwacji (12 mies.) pozwala na razie na wyciągnięcie bardzo ostrożnych klinicznych wniosków co do doboru leków na podstawie obecności alleli C lub G genu dla osteoprotegeryny. Uzyskane rezultaty wskazują na kierunek dalszych badań. Za celowe uważamy sygnalizowanie uzyskanych wyników, ponieważ, jak wspomniano, nowoczesna farmakoterapia, w miarę możliwości, zakłada stosowanie leków w zależności od wariantów genotypu. Stwarza to szansę na lepsze prognozowanie wyników terapii, co ma duże znaczenie, zwłaszcza wobec tych preparatów, których stosowanie jest obciążające dla pacjenta.

## Wnioski

1. Allel G genu dla OPG determinuje genetyczną predyspozycję do wyższej mineralnej gęstości kości.
2. Obecność allelu C wiąże się z mniejszą podatnością na złamania kości.

## Piśmiennictwo

1. Arko B, Prezelj J, Komel R. et al.: Sequence variations in the osteoprotegerin gene promotor in patients with postmenopausal osteoporosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2002, 87, 4078.
2. Brandstorm H, Gerdhem P, Stiger F. et al.: Single nucleotide polymorphisms in the human gene for osteoprotegerin are not related to bone mineral density or fracture in elderly women. *Calcif. Tissue Int.*, 2004, 74, 18. Epub 2003 Sep 29.
3. Cheng Q, Zhu H.M., Miao Y.X. et al.: Effect of osteoprotegerin gene polymorphism on bone mass in postmenopausal women. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2004, 84, 274.
4. Croucher PJ, Shipman C.M., Van Camp B. et al.: Bisphosphonates and osteoprotegerin as inhibitors of myeloma bone disease. *Cancer*, 2003, 97 (3 suppl.), 818.
5. Green J.R., Clezardin P.: Mechanisms of bisphosphonate effects on osteoblasts, tumor cell growth, and metastasis. *Am. J. Clin. Oncol.*, 2002, 25 (6 suppl. 1), S3.
6. Kim Y.H., Kim G.S., Jeong-Hwa B.: Inhibitory action of bisphosphonates on bone resorption does not involve the regulation of RANKL and OPG expression. *Ex. Mol. Med.*, 2002, 34, 145.
7. Langdahl B.L., Carstens M., Stenkjaer L. et al.: Polymorphisms in the osteoprotegerin gene are associated with osteoporotic fractures. *J. Bone. Miner. Res.* 2002, 17, 1245.
8. Masi L, Simonini G, Piscitelli E. et al.: Osteoprotegerin (OPG)/RANK-L system in juvenile idiopathic arthritis: is there a potential modulating role for OPG/RANK-L in bone injury? *J. Rheumatol.*, 2004, 31, 986.
9. Ohmori H, Makita Y, Funamizu M. et al.: Linkage and association analyses of the osteoprotegerin gene locus with human osteoporosis. *J. Hum. Genet.*, 2002, 47, 400.
10. Varga F, Spitzer S, Klaushofer K.: Triiodothyronine (T3) and 1,25-dihydroxyvitamin D3 (1,25D (3)) Inversely regulate OPG gene Expression in Dependence of the Osteoblastic Phenotype. *Calcif. Tissue Int.*, 2003 [pub. ahead of print].
11. Viereck V, Emons G, Lauck V. et al.: Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, 291, 680.
12. Yamada Y, Ando F, Niino N.: Association of polymorphisms of the osteoprotegerin gene with bone mineral density in Japanese women but no men. *Mol. Genet. Metab.*, 2003, 80, 344.