

Vliv kalcitriolu na kostní denzitu u osteopenických žen ve vztahu ke genu pro receptor vitaminu D

K. ZAJÍČKOVÁ, I. ŽOFKOVÁ, M. HILL

Endokrinologický ústav, Praha

SOUHRN

Zajíčková K., Žofková I., Hill M.: **Vliv kalcitriolu na kostní denzitu u osteopenických žen ve vztahu ke genu pro receptor vitaminu D**

Cílem probíhající prospektivní studie je ověření léčebného efektu kalcitriolu na kostní hmotu u žen s osteopenií a jeho možného farmakogenetického vztahu k polymorfismům v genu pro receptor vitaminu D (VDR).

Metoda: Soubor tvoří 35 normálních žen, z nichž 27 bylo postmenopauzálních (věk $68,96 \pm 8,85$ let). Vstupním kritériem byla osteopenie v L páteři (T-score $-1,24 \pm 0,90$) a/nebo proximálním femoru (T-score $-1,39 \pm 0,75$) verifikovaná DXA měřením. Probandkám byl podáván aktivní analog vitaminu D (kalcitriol) v dávce 0,25–0,50 μg denně spolu s 500 mg iontů kalcia. Denzita kostního minerálu (BMD, g/cm^2) byla stanovena před zahájením a během druhého roku léčby. Restrikční analýzou PCR produktu byly stanoveny čtyři polymorfní místa ve VDR genu – FokI, BsmI, ApaI a TaqI.

Výsledky: Kalcitriol signifikantně zvýšil BMD v bederní páteři (ΔBMD , $p < 0,002$) i v proximálním femoru (ΔBMD , $p < 0,02$). Nárůst denzity v bederní páteři závisel na TaqI polymorfismu (VDR). Ženy nesoucí alespoň jednu alelu malé t (tt + Tt genotypy) dosáhly významně nižšího nárůstu BMD, než ženy které tuto alelu nenesou (TT genotyp) ($p < 0,03$, ANCOVA). Vztah mezi ostatními VDR genotypy a změnou BMD jsme neprokázali.

Závěr: Výsledky pilotní studie potvrzují pozitivní vliv kalcitriolu na kostní hmotu u osteopenických žen a jeho souvislost s TaqI genotypy. Zda je TaqI polymorfismus ukazatelem senzitivity na kalcitriol ukáží konečné výsledky třileté studie.

Klíčová slova: kalcitriol – osteopenie – VDR gen – TaqI polymorfismus – farmakogenetika.

SUMMARY

Zajíčková K., Žofková I., Hill M.: **The role of calcitriol on bone mineral density in osteopenic women and its relationship to vitamin D receptor gene polymorphism**

The aim of the current prospective study was to evaluate the effect of calcitriol on bone mass in osteopenic women and whether this effect depends on the vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms.

Method: The study cohort consists of 35 women (27 of them were postmenopausal, age 68.96 ± 8.85 years) who underwent DXA measurement and were found osteopenic at the lumbar spine (T-score -1.24 ± 0.90) and/or at the hip (T-score -1.39 ± 0.75). All probands received calcitriol (0.25–0.50 μg per day) with calcium (500 mg). Bone mineral density (BMD) was measured at the baseline and during the second year of the treatment. Four single nucleotide polymorphisms (FokI, BsmI, ApaI a TaqI) in the VDR gene were assessed by a restriction analysis of PCR product.

Results: Calcitriol significantly increased BMD both at the lumbar spine (ΔBMD , $p < 0.002$) and at the hip (ΔBMD , $p < 0.02$). The gain of bone mass at the lumbar spine was associated with TaqI polymorphism in the VDR gene. Women with at least one t allele (tt+Tt genotypes) reached significantly lower BMD than women without this allele (TT genotype) ($p < 0.03$, ANCOVA). The relationship between the remaining VDR genotypes and the BMD change was not found.

Conclusion: Our pilot results confirm calcitriol to be an effective treatment for osteopenia. The pharmacological response is modified by TaqI genotypes. Whether TaqI polymorphism is responsible for the variance in response to calcitriol needs to be confirmed at the end of the 3-year treatment.

Key words: calcitriol – osteopenia – VDR gene – TaqI polymorphism – pharmacogenetics.

Osteologický bulletin 2003;8(4):119–122

Adresa: MUDr. Kateřina Zajíčková, PhD., Endokrinologický ústav, Praha, Národní 8, 116 94 Praha 1, e-mail: kzajickova@endo.cz

Došlo do redakce: 31. 10. 2003

Předneseno na 6. kongresu českých a slovenských osteologů v Českých Budějovicích (19.–21. 10. 2003).

Úvod

Aktivní analogy vitaminu D – alfadiol a kalcitriol – jsou v některých zemích, jako např. Japonsko, Austrálie, Nový Zéland, Itálie a Velká Británie, běžnou součástí antiosteoporotické léčby [1,2]. Jejich pozitivní účinek na kostní metabolismus potvrdila řada klinických studií, nicméně existují i práce popírající tento příznivý efekt [2–8]. V odpovědi kostí na analogy vitaminu D mohou hrát roli i genetické faktory vzhledem k tomu, že se úspěšnost léčby liší mezi různými etniky. V Japonsku patří alfadiol (Alpharol®) k populárním lékům u postmenopauzální osteoporózy, zatímco v naší, kavkazské, populaci se jako léčebný prostředek připouští pouze u osteoporózy senilní, kde se předpokládá snížená schopnost organismu vytvářet aktivní metabolity D vitaminu [2,9]. Některé klinické i laboratorní studie přitom zdůrazňují mnohostranné příznivé účinky D analog v organismu [2–4,7,8]. Kalcitriol zvyšuje absorpci vápníku v tenkém střevě, tlumí sekreci PTH a přispívá k mine-

ralizaci skeletu [1]. Vedle těchto systémových účinků ovlivňuje pravděpodobně kostní obrat také přímo. Supresí RANKL v osteoblastech inhibuje osteoklastogenezi a snižuje počet prekuzorů osteoklastů v kostní dřeni [2,3]. Současně zvyšuje lokální produkci TGF β a IGF-1, které stimulují v osteoblastech tvorbu neminerálních komponent kostní matrix – ALP, osteokalcin, alfa1 řetězec kolagenu I apod. [10]. Uvedené práce tedy naznačují možný osteoformační efekt aktivního vitaminu D [2,3,8].

Léčebnou odpověď na různá farmaka modifikují genetické faktory nejen mezi různými etniky, ale také interindividuálně. Sekvenční variability v genu pro VDR (SNP-single nucleotide polymorphism) jsou předmětem zájmu již delší dobu a to ve vztahu ke kostní denzitě, riziku zlomenin, ale i možného ovlivnění odpovědi na antiosteoporotickou léčbu [11,12]. Gen pro VDR, kódující cílovou strukturu pro farmakum, představuje z farmakogenetického hlediska klasického kandidáta.

Probíhající prospektivní studie si klade dva cíle. Za prvé, zda je kalcitriol efektivním prostředkem v léčbě osteopenie. Za druhé, zda se na variabilitě jeho účinku podílejí genetické faktory – polymorfizmy ve VDR genu.

Materiál a metodika

Soubor tvoří 35 žen s osteopenií, jinak zdravých. 27 probandek bylo postmenopauzálních ($68,96 \pm 8,85$ let), 8 premenopauzálních ($39,63 \pm 10,54$ let). Probandky měly srovnatelný body mass index (BMI) ($25,0 \pm 4,6$). Vstupním kritériem byla osteopenie v oblasti bederní páteře (T-score $-1,24 \pm 0,90$) a/nebo v proximálním femoru (T-score $-1,39 \pm 0,75$). Hodnoty ionizovaného kalcia ($1,24 \pm 0,05$ mmol/l), parathormonu (PTH) ($53,3 \pm 24,2$ ng/l) a kreatininu (neuváděno) byly v rámci referenčních mezí. Hodnoty 25-hydroxycholecalciferolu

(25OHD3) ($17,51 \pm 6,8$ ng/ml) měřené během zimního období byly na hranici insuficience vitaminu D (norma 20–60 ng/ml). Vylučovací kritériem byla přítomnost závažného interního onemocnění, endokrinní patologie nebo předchozí léčba ovlivňující kalciofosfátový metabolismus (kortikoidy, estrogeny, bisfosfonáty atd.).

Všechny probandky dostávají kalcitriol (Rocaltrol®, Roche) v dávce od 0,25 µg do 0,50 µg denně za pravidelných kontrol kalcémie a kalcie, společně se suplementací vápníku 500 mg denně.

Denzita kostního minerálu byla stanovena metodou DXA (g/cm², Hologic QDR-2000) v bederní páteři (L₁–L₄) a v proximálním femoru před zahájením léčby a v průběhu druhého roku podávání kalcitriolu. Koeficient variace byl 1 %.

Sérový PTH byl stanoven elektrochemiluminiscenční metodou (Roche analyzátor),

25OHD3 kitem DiaSorin (USA), vápník analyzátozem ionizovaného kalcia (ICA 2-Radiometr, Denmark). Koeficienty variace byly 5,3 % pro PTH, 3,5 % pro 25OHD3 a 5,4 % pro ionizovaný vápník.

DNA byla izolována z periferních leukocytů [13]. FokI, BsmI, ApaI a TaqI polymorfizmy byly stanoveny restričním štěpením po předchozí PCR amplifikaci, jak jsme dříve popsali [14].

Při statistické analýze nárůstu denzity (ΔBMD) byl použit T-test, při korelaci změny BMD, PTH a kalcia Spearmanův test. Vztah mezi genotypy a nárůstem BMD byl hodnocen analýzou kovariance (ANCOVA) s adjustací na známé kovariáty – BMI a roky po menopauze (YSM). Vzhledem k různé době podávání kalcitriolu byla provedena adjustace také na dobu jeho podávání v měsících.

Výsledky

Podle kontrolního měření BMD v průběhu druhého roku podávání kalcitriolu došlo k významnému nárůstu kostní denzity (ΔBMD) jak v oblasti proximálního femoru ($p < 0,02$, T-test), tak zejména v oblasti bederní páteře ($p < 0,002$, T-test) (graf 1). Současně došlo, v rámci referenčních mezí, k významnému poklesu sérového PTH ($p < 0,005$, T-test) a ke vzestupu sérového kalcia ($p < 0,04$, T-test) (graf 2). Spearmanův test ukázal, že změna těchto sérových ukazatelů koreluje navzájem ($p < 0,001$), zatímco s nárůstem BMD přímo nesouvisí.

Podle hodnot sérového PTH pod 50 ng/l a nad 50 ng/l jsme rozdělili soubor do dvou skupin ($n = 19$, respektive $n = 16$). U žen s PTH nad 50 ng/l došlo k většímu nárůstu BMD jak v bederní páteři (ΔBMD 4,1 %), tak v proximálním femoru (ΔBMD 3,4 %) než u žen ve skupině s nižší hodnotou PTH (ΔBMD 0,7 %, respektive 1,3 %).

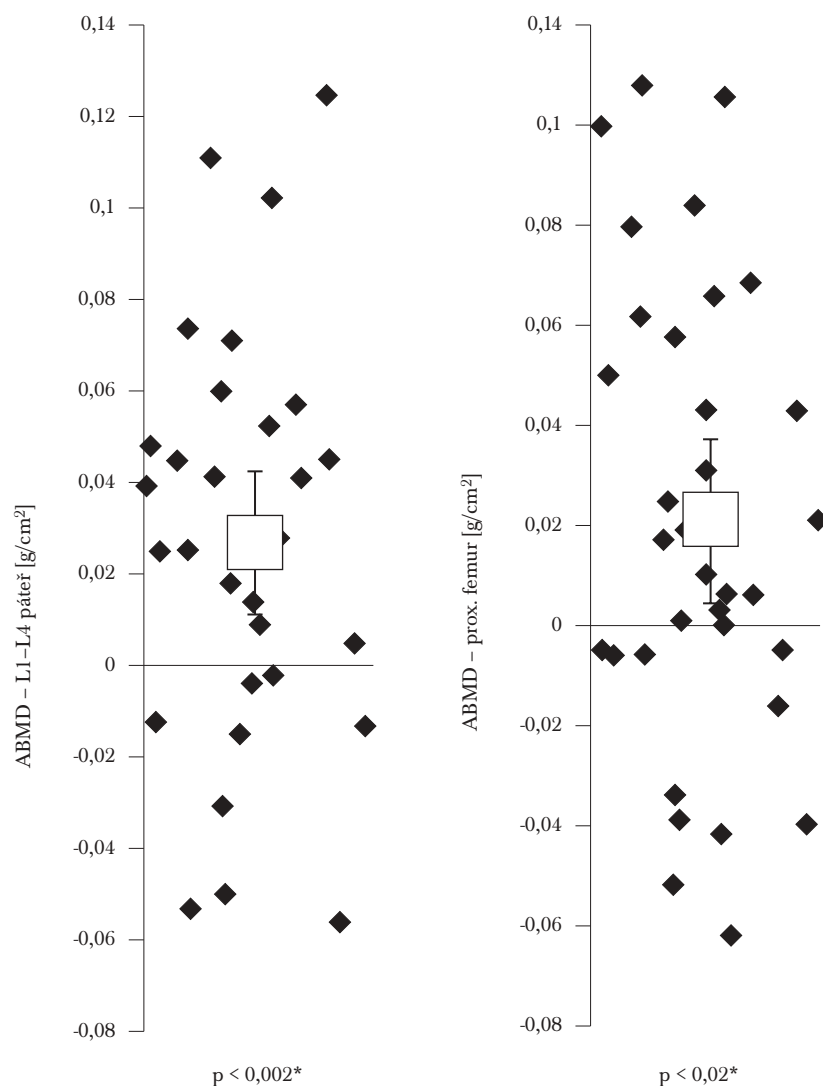
Distribuce TaqI genotypů v souboru osteopenických žen byla v Hardy-Weinbergově rovnováze ($\chi^2 0,0079$, $p \leq 0,90$): TT 13 (37 %), Tt 16 (46 %) a tt 6 (17 %), s frekvencí alel $\bar{t}$ 0,4 a $\bar{T}$ 0,6. Vzhledem k limitovanému počtu probandek jsme soubor rozdělili do dvou skupin podle TaqI genotypů – na TT homozygoty a skupinu s alespoň jednou $\bar{t}$ alelou (tt+Tt). Vstupní charakteristiku obou genotypových skupin ukazuje tabulka 1. Až na ionizovaný kalcium, které se v rámci referenčních hodnot lišilo ($p < 0,03$, ANCOVA), byly obě skupiny srovnatelné. K signifikantně většímu nárůstu denzity v bederní páteři došlo u probandek s TT genotypem než ve druhé skupině (tt+Tt) ($p < 0,03$, ANCOVA), jak ukazuje graf 3.

Vztah mezi zbývajících VDR genotypy a změnou kostní denzity jsme neprokázali.

Diskuze

Pilotní výsledky z probíhající prospektivní studie ukazují, že kalcitriol zvyšuje den-

Graf 1
Změna denzity kostního minerálu (ΔBMD) v bederní páteři a proximálním femoru při podávání kalcitriolu – 2. rok léčby, * p (T-test)



Tabulka 1
Vstupní charakteristika souboru podle *TaqI* genotypů ve VDR genu

	VDR genotypy		p
	TT	Tt+tt	
n (%)	13 (37 %)	22 (63 %)	NS
věk	67,8 ± 8,8	58,9 ± 17,6	NS
YSM	17,4 ± 9,9	18,8 ± 8,8	NS
BMI (kg/m ²)	26,6 ± 5,6	24,2 ± 3,8	NS
BMD – L (g/cm ²)	0,914 ± 0,10	0,907 ± 0,08	NS
BMD – F (g/cm ²)	0,799 ± 0,08	0,811 ± 0,09	NS
Ca ²⁺ (mmol/l)	1,21 ± 0,05	1,23 ± 0,05	0,03
PTH (ng/l)	49,9 ± 16,4	55,3 ± 27,9	NS
25-OHD ₃ (ng/ml)	16,2 ± 6,6	24,0 ± 21,4	NS
Roc (měs)	16,1 ± 6,8	18,6 ± 9,4	NS

YSM – roky po menopauze, BMI – body mass index, BMD – L denzita kostního minerálu v bederní páteři (L₁-L₄), BMD – F denzita v proximálním femoru, Roc – podávání Rocaltrolu v měsících, 25-OHD₃ – 25-hydroxycholecalciferol

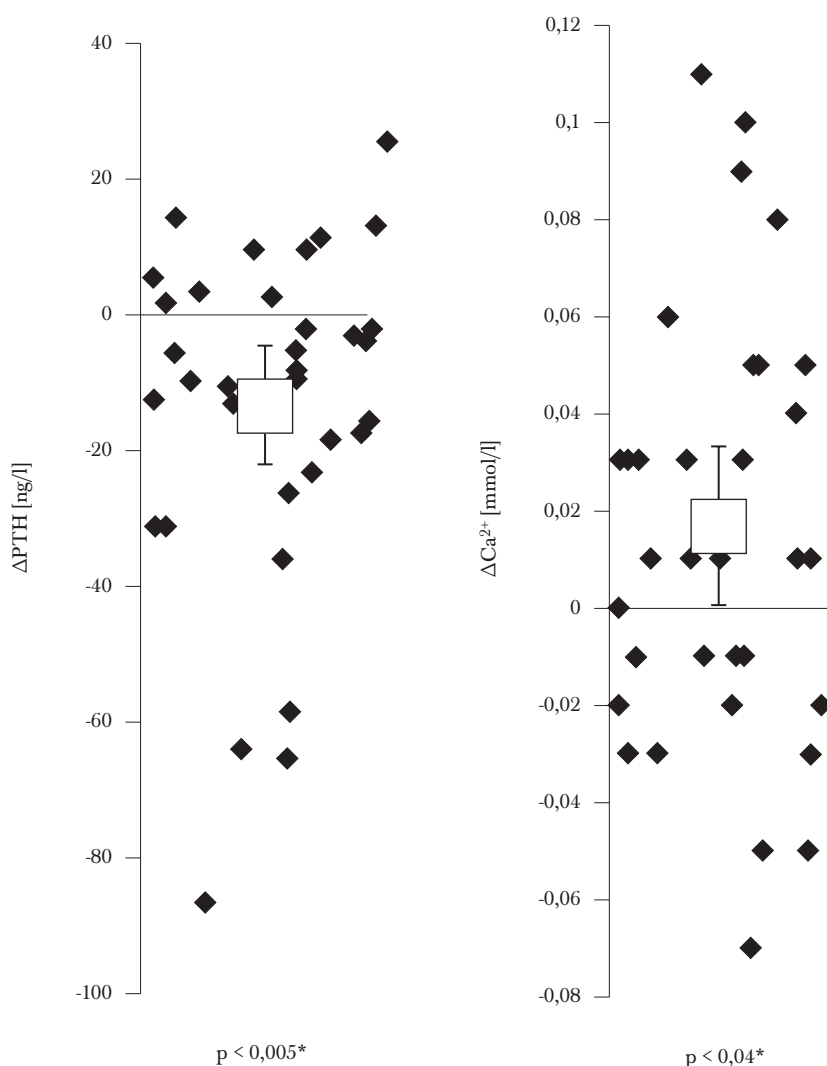
zitu kostního minerálu v proximálním femoru a zejména v bederní páteři u osteopenických pacientek. Pozitivní efekt aktivních analogů na kostní hmotu u postmenopauzálních žen byl popsán v řadě studií [4,6–8]. Studie Dambachera prokázala, že léčba kalcitriolem významně snižuje úbytek trabekulární kosti u žen s osteopenií a osteoporózou [15]. Na druhé straně existují i práce, které příznivý vliv aktivních analogů vitamínu D na kostní denzitu neprokázaly [5,8].

Farmakologický efekt aktivních analogů vitamínu D na kost modifikuje pravděpodobně řada faktorů, z nichž mnohé ani neznáme. Úspěšnost léčby alfadiolem v Japonsku se připisuje také např. stravě bohaté na vitamin D (ryby) a naopak chudší na vápník [2]. To je pravděpodobně důvodem, proč se nežádoucí účinky léčby, zejména hyperkalcémie, vyskytují zřídka. Při vyrovnané homeostáze vitamínu D se v této populaci může více uplatnit vlastní farmakologický efekt alfadiolu na kost [2,3]. V naší, kavkazské populaci, deficitní na vitamin D, je na prvním místě jeho suplementace. Na druhé straně ale některé práce ukázaly, že u starších osob s vyrovnanou hladinou 25(OH)D₃ podávání cholecalciferolu kostní denzitu nezvyšuje, ani neovlivňuje riziko osteoporotických zlomenin [8,16–18].

Sérový PTH je nepřímým ukazatelem biologicky aktivní formy vitamínu D (1,25OH₂D₃) v organismu. U žen s vyšším PTH došlo v našem souboru k většímu nárůstu BMD. Je otázkou, zda se tak děje v důsledku deficitu prekurzoru aktivního vitamínu D (25OHD₃), z důvodu jeho snížené aktivace 1- α -hydroxylázou nebo sníženou periferní účinností kalcitriolu.

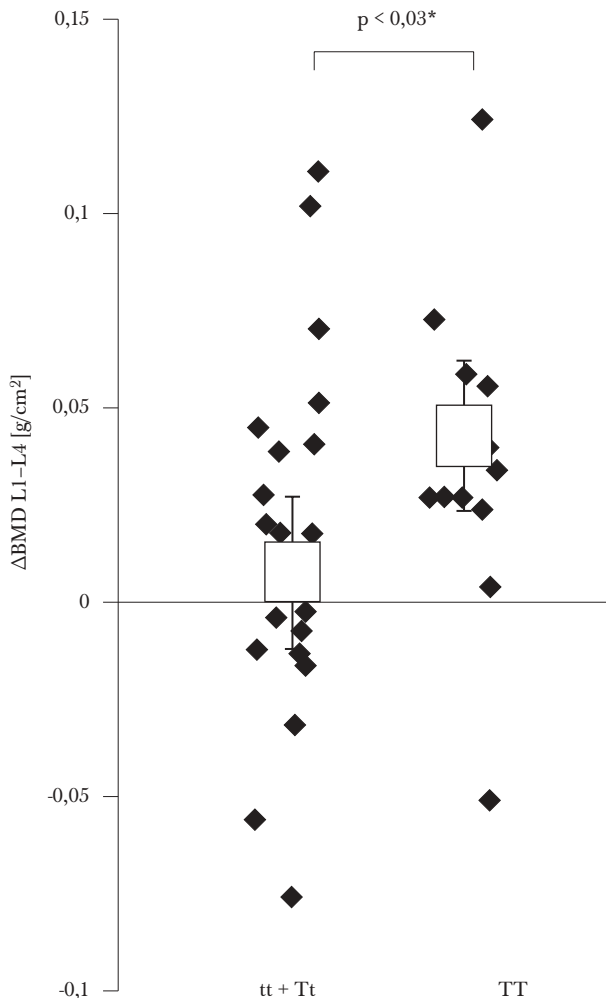
Vedle nárůstu BMD podávání kalcitriolu v naší kohortě významně snížilo sérový PTH a zvýšilo ionizovaný vápník. Změna

Graf 2
Změna sérového parathormonu (Δ PTH) a ionizovaného kalcia (Δ Ca²⁺) při podávání kalcitriolu – 2. rok léčby, * p (T-test)



Graf 3

Změna denzity kostního minerálu v bederní páteři (Δ BMD L_1-L_4) při podávání kalcitriolu v závislosti na *TaqI* genotypu ve VDR genu * p (ANCOVA)



obou parametrů korelovala navzájem. Nicméně nárůst BMD s nimi přímo nesouvisel. Na zvýšení BMD se kromě suprese PTH a pozitivní kalciové bilance pravděpodobně také podílí přímý anabolický efekt kalcitriolu na kost.

Účinnost léčby může vedle zmíněných nutričních faktorů mezi různými etniky, ale i interindividuálně, ovlivňovat i genetické pozadí [11]. Práce Matsuyamy ukázala, že k největšímu nárůstu BMD v bederní páteři po ročním podávání alfacalcidolu došlo u postmenopauzálních žen s genotypy bbAaTT a bbAaTT v BsmI, ApaI a *TaqI* polymorfismech ve VDR genu [4]. Tyto kombinace genotypů patří v asijské populaci mezi nejčastější (75 %), zatímco v kavkazské rase převažují heterozygotní genotypy Bb a Tt [11,12,19].

Naše výsledky ukazují, že právě u žen homozygotních pro alelu T (TT genotyp) došlo k největšímu nárůstu kostní denzity. Naopak přítomnost alely t (tt+Tt genotypy) identifikovala jedince s horší odpovědí BMD na podávání kalcitriolu.

Vedle příznivého efektu na denzitu kostního minerálu může podávání aktivních analogů vitamínu D zlepšovat svalovou sílu a koordinaci a na centrální úrovni také udržování rovnováhy [20]. Zmíněné faktory snižují riziko pádů a s pády spojených zlomenin [21].

Naše prospektivní studie má několik omezení. Především jde o početně limitovaný soubor žen s osteopenií. Tento fakt znemožňuje hodnocení také dalšího parametru, jaký představují osteopo-

rotické zlomeniny. Zajímavé by bylo srovnání výsledků s kontrolní skupinou na suplementaci vápníkem (500 mg) a vitamínu D (800 IU/denně).

Závěr

Pilotní výsledky prospektivní studie ukazují, že kalcitriol je efektivním lékem u osteopenie. Zda je *TaqI* polymorfismus ukazatelem senzitivity na kalcitriol ukáží konečné výsledky třileté studie.

Použité zkratky:

VDR	receptor pro vitamin D
BMD	denzita kostního minerálu
DXA	dual-energy X ray absorptiometry
BMI	body mass index
PTH	parathormon
RANKL	receptor aktivátor nukleárního faktoru kB
TGFb	transforming growth factor b
IGF-1	insulin-like growth factor 1
ALP	alkalická fosfatáza
PCR	polymerase chain reaction

Poděkování: Studie byla podpořena Výzkumným záměrem MZ č.: 000000023761 a firmou Hoffmann La-Roche Ltd.

Literatura

- Feldman D, Glorieux FH, Pike JW. Vitamin D. San Diego; Academic Press, 1997:695.
- Nishii Y. Rationale for Active Vitamin D and Analogs in the Treatment of Osteoporosis. J Cell. Biochem 2003; 88:381–386.
- Suda T, Ueno Y, Fujii K, et al. Vitamin D and Bone. J Cell. Biochem 2003;88:259–266.
- Matsuyama T, Ishii S, Tokita A, et al. Vitamin D receptor genotypes and bone mineral density. Lancet 1995;345:1238–1239.
- Ott SM, Chesnut CH. Calcitriol treatment is not effective in postmenopausal women. Ann Intern Med 1989;110:267–74.
- Tilyard MW, Spears GF, Thompson J, et al. Treatment of postmenopausal women with calcitriol or calcium. N Engl J Med 1992;326:357–62.
- Sairanen SE, Karkkainen M, Tahtela R, et al. Bone mass and markers of bone and calcium metabolism in postmenopausal women treated with 1,25-dihydroxy-vitamin D (Calcitriol) for four years. Calcif Tissue Int 2000;67:122–7.
- Lau KHW, Baylink DJ. Vitamin D Therapy of Osteoporosis: Plain Vitamin D Therapy Versus Active Vitamin D Analog (D-hormone) Therapy. Calcif Tissue Int 1999;65:295–306.
- Bayer M, Blahoš J, Broulík P, et al. Doporučené postupy pro diagnostiku a terapii postmenopauzální osteoporózy. Osteol Bulletin 2003;1:8–13.
- Žofková I, Kancheva RL, Bendlová B. Effect of 1,25(OH)₂ Vitamin D₃ on Circulating Insulin-like growth Factor-I and β_2 microglobulin in patients with osteoporosis. Calcif Tissue Int 1997;60:236–239.
- Peacock M, Turner Ch, Econs M, et al. Genetics of Osteoporosis. Endocrine Reviews 2002;23:303–326.
- Langdahl BL, Lokke E, Carstens M, et al. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and bone mass, bone turnover and osteoporotic fractures. Eur J Clin Invest. 2000;30:608–17.
- Miler SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucl. Acid Res 1988;16:1215.
- Zajíčková K, Žofková I, Hill M. Vitamin D receptor gene polymorphisms, bone mineral density and bone turnover: FokI genotype is related to postmenopausal bone mass. Physiol Res 2002;51:501–9.
- Dambacher MA, Kranich M, Schacht E, et al. Can the fast bone loss in osteoporotic patients be stopped with active vitamin D metabolites? Calcif Tissue Int 1997;60:115–8.
- Lipps P, Graafmans WC, Ooms ME, et al. Vitamin D supplementation and fracture incidence in elderly persons. A randomized, placebo-controlled clinical trial. Ann Intern Med 1996;124:400–6.
- Meyer HE, Smedshaug GB, Kvaavik E, et al. Can vitamin D supplementation reduce the risk of fracture in the elderly? A randomized controlled trial. J Bone Miner Res 2002;14:709–15.
- Ringe JD, Dorst A, Fater H, et al. Superiority of alfacalcidol over plain vitamin D in the treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. Rheumatol Int. 2003 [Epub ahead of print].
- Yanagi H, Tomura S, Kawanami K, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with osteoporosis in Japanese women. J Clin Endocrinol Metab. 1996;81:4179–81.
- Pfeifer M, Begerow B, Minne HW. Vitamin D and Muscle Function. Osteoporos Int 2002;13:187–194.
- Gallagher JC. The effect of Vitamin D and metabolites on falls and fracture in elderly women. Bone 2003;32:11.