

BsmI polymorfismus genu pro vitamín D receptor a kostní fenotypy v regionu Střední Morava

P. HRDÝ¹, P. NOVOSAD¹, P. FOJTÍK², P. HORÁK³, R. RICHTEROVÁ⁴

¹MEDIEKOS Labor, s. r. o., Osteocentrum, Zlín, ²Centrum péče o zažívací trakt, Vítkovická nemocnice, a. s., Ostrava-Vítkovice,

³III. interní klinika, Osteocentrum, Fakultní nemocnice Olomouc, ⁴P&R LAB, a. s., Nový Jičín, laboratoř molekulární biologie

SOUHRN

Hrdý P., Novosad P., Fojtík P., Horák P., Richterová R.: **BsmI polymorfismus genu pro vitamín D receptor a kostní fenotypy v regionu Střední Morava**

V posledních letech dokládají výsledky studií v exponovaných rodinách a v asociačních projektech významnou roli dědičnosti v etiologii osteoporózy. V popisu klinické manifestace osteoporózy se využívá mimo jiné také tzv. kostních fenotypů, mezi které řadíme kostní densitu bederní páteře a femuru, geometrii kyčle, mikroarchitekturu, markery kostního obratu a fraktury skeletu. Jedním ze sledovaných vztahů mezi dědičností a klinickou manifestací osteoporózy je vztah polymorfismu BsmI genu pro vitamín D receptor a kostních fenotypů, což bylo cílem také naší práce.

Klíčová slova: kostní fenotyp, vitamín D receptor, genetický polymorfismus

SUMMARY

Hrdý P., Novosad P., Fojtík P., Horák P., Richterová R.: **Vitamin D receptor gene BsmI polymorphism and bone phenotypes in the region of Central Moravia**

In recent years, results of studies in exposed families or association projects have supported the significant role of heredity in the etiology of osteoporosis. In the description of clinical manifestations of osteoporosis, various surrogate bone phenotypes have been used, including bone mineral density of the lumbar spine and femur, hip geometry, microarchitecture, bone turnover markers and skeletal fractures. The relationship between BsmI polymorphism of the vitamin D receptor gene and bone phenotypes has been analyzed to track one of possible link between heredity and clinical manifestations of osteoporosis. This was another aim of the present study.

Keywords: bone phenotype, vitamin D receptor, genetic polymorphism

Osteologický bulletin 2012;17(1):3–7

Adresa: MUDr. Petr Hrdý, Mediekos Labor, s. r. o., Zlín, Osteologické centrum, Tř. Tomáše Bati 3910, 760 01 Zlín, e-mail: hrady@mediekoslabor.cz

Došlo do redakce: 16. 1. 2012

Přijato k tisku: 27. 4. 2012

Úvod

Osteoporóza je systémové onemocnění skeletu, charakterizované malým množstvím kostní hmoty a poruchou mikroarchitektury kostní tkáně, vedoucí ke zvýšené lomivosti a riziku vzniku zlomenin [1]. Významnou roli v manifestaci a míře závažnosti klinických projevů osteoporózy hraje dědičnost. Výsledky studií v exponovaných rodinách dokládají významnou roli dědičnosti v etiologii osteoporózy. Dcery matek s nízkou hustotou kostního minerálu (BMD) jsou osteoporózou ohroženy více než dcery matek s normální BMD. V mexické populaci byla popsána asociace i mezi BMD bederní páteře babiček a jejich vnouček [2].

V popisu klinické manifestace osteoporózy se využívá mimo jiné také tzv. kostních fenotypů, které popisují jednotlivé modality skeletu právě ve vztahu k projevům a závažnosti osteoporózy. Mezi ně patří BMD bederní páteře a femuru, geometrie kyčle, markery kostního obratu (BTM), kostní mikroarchitektura a fraktury skeletu s důrazem na tzv. hlavní osteoporotické fraktury (obratel, proximální fe-

mur, distální předloktí a proximální humerus). Dědivost, resp. heritabilita jednotlivých kostních fenotypů je různá. Např. heritabilita BMD je udávána v rozmezí 50–80 %, což lze interpretovat jako až 80% podíl genetické závislosti na výsledné úrovni BMD (tabulka 1).

Jednotlivé geny, které v průběhu mnoha let výzkumu byly uznány jako související s osteoporózou, označujeme jako „kandidátní geny“. Mezi prvními byly zkoumány ty, které kódují receptory, hormony a enzymy, jejichž funkce v kostním metabolismu je známá. Další kandidátní geny byly zjištěny z chromozomových lokusů ve vazebných analýzách.

V současné době vstupují do popředí tzv. asociační studie, které studují vztah kandidátních genů k variabilitě kostních fenotypů, přičemž prediktivní význam má především variabilita v exonech, které determinují sekvenci aminokyselin v příslušné bílkovině [4]. Postupně se podařilo identifikovat jednotlivé nukleotidové polymorfismy (single nukleotid polymorphism, SNP) kandidátních genů projevující se alelickými variantami. Klinický význam jednotlivých SNP bývá

stanoven populačními studiemi, které porovnávají frekvence alel a jejich vztah k určitému fenotypu u skupiny osteoporotické a kontrolní („case-control study“) nebo u dvou různých populací („cross-sectional study“). Klinický význam v diferenciaci jednotlivých fenotypů může mít také mutace genu. Je znám příklad aktivační mutace v genu pro lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5), která v důsledku vede k „nadbytečné“ kostní formaci s vysokou BMD, popisované jako syndrom „high bone mass“ [5]. Naopak inaktivační mutace v tomto genu vede k nízké BMD, klinicky známé jako osteoporosis pseudoglioma syndrom [6].

Na našem pracovišti se v současnosti věnujeme práci na sledování vztahu mezi SNP BsmI genu pro vitamín D receptor (VDR) a jeho roli v manifestaci kostních fenotypů osteoporózy. První zprávy o vztahu VDR a jeho polymorfismů a osteoporózy se objevují v devadesátých letech ve studii na dvojčatech [7]. Gen pro VDR je lokalizován na chromozomu 12q13-14. Jednotlivé polymorfismy tohoto genu byly identifikovány pomocí restrikčních enzymů (restriction fragment length polymorphisms, RFLPs). Řadíme mezi ně např. SNP TaqI, BsmI, ApaI a FokI, z toho první tři jsou lokalizovány mezi exony 8 a 9, SNP FokI je lokalizován na exonu 2 [8]. Ačkoliv bylo provedeno množství asocičních studií, přínos jednotlivých polymorfismů k objasnění patogeneze osteoporózy zůstává stále předmětem výzkumu. U polymorfismů genu pro VDR byla v některých studiích potvrzena signifikantní asociace s BMD [9,10]. Několik asocičních studií prokázalo protichůdné výsledky vztahu mezi VDR polymorfismy a rizikem fraktury. Cílem naší práce byl výzkum vztahu mezi SNP BsmI genu pro VDR a kostními fenotypy v regionu Střední Morava ve skupině žen s postmenopauzální osteoporózou.

Materiál a metodika

Studovaná populace

Vyšetřili jsme celkem 596 pacientek s postmenopauzální osteoporózou, průměrný věk 63,1 roku, věkové rozmezí 47–79 let.

Měření BMD

BMD (g/cm²) bylo měřeno v regionech bederní páteře v anteroposteriorní projekci (L₁–L₄) a v oblasti krčku proximálního femuru. Měření probíhalo metodou dvouenergií rentgenové absorpciometrie (dual energy X-ray absorptiometry, DXA) na přístroji LUNAR (model iDXA, Lunar Corp., Madison, WI, USA) podle standardního protokolu.

Tabulka 1
Heritabilita kostních fenotypů (podle [3])

Kostní fenotyp	Heritabilita
Hustota kostního minerálu	50–80 %
Geometrie kyčle	70–85 %
Kostní obrat (biochemické markery)	40–70 %
Kostní mikro-architektura	50–60 %
Dispozice k frakturám	25–48 %

Osteoporóza byla diagnostikována dle kritérií World Health Organization (WHO) [11].

Měření BTM

Markery kostního obratu jsme stanovovali na analyzátoru ETI-MAX 3000 (DiaSorin Inc, Stillwater, MN, USA) metodou ELISA. Jako marker osteoresorpce jsme vyšetřovali C-terminální telopeptid kolagenu typu I (CTX). Za marker osteoformace jsme zvolili osteocalcin (OC). Odběry krve probíhaly za standardních podmínek.

Detekce polymorfismu genu pro VDR

Jako sledovaný SNP genu pro VDR jsme zvolili BsmI. DNA byla izolována z 200 ul nesrážlivé krve kitem Mag-Attract DNA Blood Mini M48 na automatickém izolátoru Biorobot M48 (Qiagen, Germany). Princip izolace je založen na separaci magnetickými kuličkami. Detekce polymorfismu BsmI (A > G, rs 1544410) byla provedena metodou Real-Time PCR za použití FRET sond a přímým sekvenováním na sekvenátoru ABI 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Statistika

Asociace jednotlivých genotypů s kostními fenotypy (BMD, BTM a fraktury) byla vyhodnocena metodou deskriptivní statistiky, analýzou rozptylu (stanovení rozdílu středních hodnot, ANOVA) v programu Excel.

Výsledky

Vyšetřili jsme celkem 596 pacientek. Jejich demografická charakteristika je uvedena v *tabulce 2*, která je již rozčleněna dle diagnostikovaných genotypů polymorfismu BsmI.

Sledované skupiny pacientek s uvedenými genotypy jsou dle uvedených charakteristik prakticky homogenní, bez signifikantních odlišností v jednotlivých parametrech. Údaje o věku menopauzy a zlomeninách byly získávány úvodním anamnestickým rozhovorem, byly preferovány hlavní osteoporotické zlomeniny, nicméně analyzovány byly všechny lokality zlomenin, mimo lebku a drobné kosti rukou a nohou. BMI bylo vypočítáno dle obvyklého algoritmu na základě hodnot výšky a váhy při první densitometrii.

Hodnoty sledovaných kostních fenotypů ve vztahu k detekovaným genotypům polymorfismu BsmI shrnuje *tabulka 3*.

Z prezentovaných výsledků se nám podařilo prokázat mírnou ale statisticky signifikantní souvislost mezi genotypem BB a sníženou densitou kostního minerálu ve sledovaném regionu krčku proximálního femuru a bederní páteře, stejně tak i souvislost mezi zvýšeným výskytem fraktur u tohoto genotypu v populaci žen s postmenopauzální osteoporózou.

Frekvence jednotlivých genotypů sledovaného polymorfismu BsmI jsou uvedeny v *tabulce 2*. Největší četnost výskytu byla u heterozygotního genotypu Bb (51,7 %), dále homozygotní genotyp BB (12,8 %) a varianta „wild type“ bb (35,5 %) se vyskytovaly s distribucí, která byla srovnatelná s jinými sledovanými kavkazskými populacemi [12]. Distribuce SNP BsmI genu pro VDR u našich pacientek sledovala Hardy-Weinbergovu rovnováhu ($p = 0,90$).

V námi studované populaci jsme prokázali signifikantně nižší BMD v oblasti krčku proximálního femuru u pacientek s genotypem BB ($0,740 \pm 0,107$) g/cm² v porovnání s jedinci s genotypem bb ($0,770 \pm 0,102$) g/cm² ($p < 0,05$). Dále jsme sledovali nižší BMD v oblasti bederní páteře u pacientek s genotypem BB ($0,864 \pm 0,135$) g/cm² oproti pacientkám s genotypem bb ($0,896 \pm 0,116$) g/cm² s hraniční statistickou významností ($p = 0,05$). Neprokázali jsme statisticky významnou asociaci genotypů SNP BsmI a hodnot biochemických BTM. Podařilo se nám dokumentovat statisticky signifikantní vyšší výskyt fraktur u nemocných s postmenopauzální osteoporózou s přítomným genotypem BB (60,5 %) oproti pacientkám s genotypem bb (44,6 %) ($p < 0,05$).

Diskuze

Metaanalýza studií z let 1994–2001 ukázala významnou asociaci alely B v polymorfismu BsmI s kostní densitou v lumbální páteři; jedinci s genotypem BB měli nižší hodnoty BMD než nositelé alely b [9]. Toto se prakticky podařilo prokázat i v námi sledovaném souboru pacientek. Dle předpokladu o možných vazebných nerovnováhách v rámci různých etnických skupin v další metaanalytické studii autoři upozornili na etnické rozdíly v asociaci polymorfismu BsmI ke kostní denzitě [10]. Naproti tomu se nepodařilo prokázat asociaci kostní denzity femuru a polymorfismů genu pro VDR BsmI, ApaI a TaqI (mimo FokI, u tohoto byl potvrzen vztah ke kostní denzitě v kyčli) v populaci normálních nesubstituovaných žen středoevropské populace [13]. Mimo vazebnou nerovnováhu se může na kontroverzních výsledcích uplatňovat dále interakce genu pro VDR s jinými geny, např. s genem pro estrogenový receptor (ESR), což prokazuje i práce dokumentující významně nižší kostní denzitu u pacientů s homozygotními genotypy SNP BsmI genu pro VDR a SNP PvuII genu pro ESR, přestože asociace mezi BMD a jednotlivými genotypy prokázána nebyla [14].

Z hlediska moderních, tzv. „genome-wide association studies“ v projektu GENOMOS, autoři hodnotili vztah polymorfismů v genu pro VDR ke kostnímu metabolismu a kostním fenotypům. V souboru cca 26 000 probandů byly vyšetřeny SNP Cdx-2, FokI, BsmI, ApaI a TaqI. Studie ukázala, že v regulaci BMD nehrají tyto polymorfismy pravděpodobně významnější roli. Podařilo se však prokázat asociace Cdx-2 s rizikem vertebrálních zlomenin. SNP Cdx-2 je lokalizován v promotoru genu pro VDR [15]. Tento vztah ukazuje, že SNP Cdx-2 může ovlivňovat jiný parametr rizika fraktury obratle, než je všeobecně známý ukazatel BMD. Toto koresponduje s myšlenkou obecně akceptovanou v moderní osteologii, že BMD není jediným ukazatelem rizika fraktury, uplatňují se i tzv. extraskeletální faktory jako svalová síla, svalová hmota (moderní téma frailty syndrom [16]) a body mass index (BMI), u kterých je genetický základ také jistě velmi významný.

Riziko fraktury je tedy jistě komplexní, z pohledu procenta heritability je riziko fraktury minimálně z 50 % závislé na vnějších podmínkách, jak bylo uvedeno v tab. 1 v úvodu. Přesto lze studovat i souvislost s genetickými predispozicemi. Mimo výše uvedený SNP Cdx-2 genu pro VDR byla prokázána souvislost i právě s námi sledovaným SNP BsmI. V prospektivní studii z roku 2005 byla prokázána asociace mezi BsmI a rizikem fraktur u postmenopauzálních žen [17]. Hlavně ve skupině nevertebrálních fraktur převažoval genotyp BB. Přítomnost genotypu BB znamenala stejně velké riziko pro další frakturu, jako přítomnost zlomeniny v anamnéze nebo nízká BMD. Rotterdamská studie prokázala ve stejné době jako práce autorů projektu GENOMOS souvislost mezi SNP BsmI a rizikem fraktury. Opět další potvrzení teorie, že v otázce rizika fraktury hrají polymorfismy genu pro VDR svou roli nezávisle na vztahu k BMD. V projektu autorů rotterdamské studie se v početné kohortě pacientů podařilo prokázat, že osoby s kombinací rizikových alel v obou lokusech Cdx-2 a BsmI měly zvýšené riziko fraktur o 48 % oproti kontrolám [18]. Je také velmi zajímavý fakt vztahu různě lokalizovaných polymorfismů na funkci genu pro VDR. Cdx-2 ovlivňoval expresi VDR proteinu, naproti tomu variability na 3'-konci genu (BsmI, ApaI, TaqI) ovlivňovaly stabilitu mRNA-VDR. Lze tedy zkoumat a sledovat vztahy i mezi nekódujícími částmi genu, které mají spíše regulační funkci. Mezi tyto SNP právě BsmI patří. Jedna z nejnovějších prací na téma metaanalýz vztahu polymorfismů VDR a fraktur byla publikována v polovině r. 2010 v časopisu BONE. Autoři uvádějí data ze své rozsáhlé metaanalýzy, které zahrnovala celkem 17 studií, ve kterých bylo 2 112 jedinců s frakturou a 4 521 kontrol. Byla prokázána signifikantně nižší frekvence všech fraktur u jedinců s genotypem bb SNP BsmI genu pro VDR. Pokud byly fraktury rozděleny dle typu, podařilo se prokázat, že pacienti s genotypem bb měli opět signifikantně nižší frekvenci fraktury proximálního femuru. Podobnou signifikaci zaznamenali také u genotypu Tt SNP TaqI. Naopak vyšší frekvence fraktur femuru byla u genotypů tt SNP TaqI a vyšší frekvence fraktur obratlů byla u genotypu Aa SNP ApaI genu pro VDR. Autoři tedy uzavírají, že se jedná o mírnou, ale statisticky signifikantní asociaci mezi bb genotypem BsmI a frakturami [19]. Tuto asociaci jsme měli možnost pozorovat i v našem souboru pacientek. Výskyt fraktur ve skupině jedinců s genotypem bb byl signifikant-

Tabulka 2
Demografická charakteristika souboru pacientek
(BB, Bb a bb jsou jednotlivé genotypy polymorfismu BsmI)

	BB	Bb	bb
Počet pacientek	76	308	212
Procento z celkového počtu	12,80 %	51,70 %	35,50 %
Věk	62,8 (±8,3)	63,6 (±8,6)	62,4 (±8,5)
BMI (kg/m ²)	26,5 (±4,8)	26,8 (±4,5)	26,0 (±4,9)
Menopauza	49,0 (±2,5)	49,4 (±2,3)	49,7 (±2,7)
Roky po menopauze	13,3 (±7,8)	14,0 (±8,2)	12,7 (±8,0)

Tabulka 3
Kostní fenotypy a jednotlivé genotypy polymorfismu BsmI

	BB	Bb	bb	p(ANOVA)
Denzita kostního minerálu v krčku femuru (g/cm ²)	0,740 (±0,107)*	0,782 (±0,101)	0,770 (±0,102)	0,031
Denzita kostního minerálu v bederní páteři (g/cm ²)	0,864 (±0,135)*	0,904 (±0,141)	0,896 (±0,116)	0,050
OC (µg/l)	23,6 (±14,1)	22,4 (±13,0)	21,5 (±11,2)	0,112
CTx (µg/l)	0,590 (±0,280)	0,561 (±0,316)	0,541 (±0,300)	0,22
Fraktury (%)	60,5*	53,4	44,6	0,049

OC – osteocalcin, CTx – C-terminální telopeptid kolagenu typu I, BB – homozygot, Bb – heterozygot, bb – „wild type“ bez přítomnosti alely B, *statisticky signifikantní rozdíl výskytu u genotypu BB oproti bb, p < 0,05 (ANOVA)

ně nižší oproti skupině s genotypem BB (44,6 %, resp. 60,5 %, p < 0,05). Nicméně si jsme vědomi limitací dat pro tuto analýzu, údaje o frakturách jsme získávali na základě anamnestických dat doplněných z dokumentace praktického lékaře.

Mimo predikci rizikových jedinců ohrožených manifestací osteoporózy v podobě fraktury lze uvažovat o využití detekce SNP v oblasti farmakogenomiky. V minulém desetiletí začaly vznikat erudované práce na téma ovlivnění terapeutické odpovědi osteoporotické kosti na bázi genetického pozadí jedince. V populaci italských postmenopauzálních žen prokázala multicentrická studie souvislost mezi typem antiresorpční terapie a polymorfismu BsmI genu pro VDR. Ženy s „normálním“ genotypem bb reagovaly nejlépe na hormonální substituční terapii, došlo u nich k signifikantně vyššímu nárůstu BMD. Naproti tomu ženy s „patologickým“ BB genotypem reagovaly nejhůře na antikatabolickou terapii bisfosfonáty, příznivý obrat zaznamenaly pacientky s BB genotypem, pokud se k bisfosfonátu doplnil do léčby raloxifen [20]. Podobnou souvislost z hlediska farmakogenomiky se podařilo prokázat také u polymorfismu TaqI, tentokrát ve vztahu k 2-leté terapii kalcitriolem u pacientek s osteopenií – signifikantní nárůst BMD v bederní páteři u pacientek s genotypem TT [21]. Tento genotyp TT měl podobně příznivou odpověď také v populaci japonských žen po podání alfa-kalcidolu [22].

Jistě stojí za zmínku i nepřímé ovlivnění kostních fenotypů variabilitou 3'-konce genu pro VDR. Bylo dokumentováno ovlivnění rizika nástupu tzv. chirurgické menopauzy v kavkazské populaci ve vztahu k přítomnosti polymorfismů BsmI a TaqI [23]. Homozygoti s rizikovou alelou BB vedli k 2,5x vyššímu riziku hysterektomie s případnou adnexektomií oproti negativní populaci. Navíc kombinace alel Bt byla spojena s časnějším nástupem menopauzy takřka o 3 roky.

Gen kódující VDR může obsahovat rozmanité polymorfismy, vyskytují se v 5'-iniciační a 3'-nekódující oblasti genu. Některé z těchto alel samostatně nebo v kombinaci (haplotypy) mohou modifikovat stabilitu nebo úroveň exprese mRNA. Asociace VDR a BMD byla a je hodně kontroverzní, tuto souvislost potvrzuje a zároveň vyvrací mnoho studií. Zatímco množství dříve provedených studií včetně „rotter-

damské studie“ realizované dle pravidel EBM, ukazuje asociaci mezi VDR genotypy/haplotypy s BMD a frakturami, následná práce tuto souvislost nepotvrdila [24].

Tato rozporuplnost nicméně paradoxně vedla k dalšímu úsilí autorů z různých koutů světa o samostatný výzkum a statistiku zkoumající lokální souvislost polymorfismů genu pro VDR a manifestací kostních fenotypů. Polymorfismy genu pro VDR nebyly definitivně vyloučeny z úvah o souvislosti osteoporózy a manifestací kostních fenotypů, jak mimo jiné vyplývá ze závěru a konsenzu 3. summitu o osteoporóze v Budapešti [25].

Důkazem stále probíhajícího výzkumu na poli polymorfismů genu pro VDR jsou i dále uvedené práce. V bulharské populaci byla potvrzena asociace mezi BB genotypem SNP BsmI genu pro VDR a sníženou hodnotou BMD v oblasti distálního předloktí a lumbální páteře [26]. Autoři však přiznávají relativně malý populační vzorek 219 probandů. V populaci libanonských žen byla prokázána signifikantní asociace mezi polymorfismy ApaI a TaqI genu pro VDR a BMD v oblasti distálního předloktí a lumbální páteře [27]. V populaci saúdskoarabských žen byl genotyp BB SNP BsmI genu pro VDR v signifikantně častějším výskytu ve skupině pacientek s diagnostikovanou osteoporózou [28].

Závěr

Naše výsledky tedy potvrdily mírnou ale statisticky významnou asociaci mezi genotypem BB SNP BsmI genu pro VDR a vybranými kostními fenotypy, konkrétně se nám podařilo prokázat statisticky signifikantní souvislost s BMD v oblasti krčku femuru a lumbální páteře a dále souvislost s vyšším výskytem fraktur u tohoto genotypu v populaci pacientek s postmenopauzální osteoporózou v regionu Střední Morava. Identifikace genetických variant, které jsou asociovány s osteoporózou a jednotlivými kostními fenotypy nebo s individuální odpovědí na terapii, může přispět k individualizaci prognózy, léčby a prevence nízkotraumatických zlomenin a jejich následků ve smyslu stále více skloňované „personalizované medicíny“. Kombinace genomiky s klasickým přístupem k pacientovi může tvořit základ nových terapeutických přístupů na základě propojení kliniky a bazálního výzkumu.

Literatura:

- Consensus Development Conference. Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis. *Am J Med* 1993;94:646–650.
- Lazcano-Ponce E, Tamayo J, Díaz R et al. Correlation trends for bone mineral density in Mexican women: evidence of familial predisposition. *Salud Publica Mex* 2009;51 Suppl 1:s93–99.
- Ferrari S. Human genetics of osteoporosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008;22(5):723–735.
- Žofková I. Význam genetiky v predikci rizika osteoporózy. *Vnitř Lék* 2011;57(1):78–84.
- Boyden LM, Mao J, Belsky J et al. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med* 2002;346(20):1513–1521.
- Laine CM, Chung BD, Susic M et al. Novel mutations affecting LRP5 splicing in patients with osteoporosis-pseudoglioma syndrome (OPPG). *Eur J Hum Genet* 2011;19(8):875–881.
- Morrison NA, Qi JC, Tokita A et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 1994;367:284–287.
- Zmuda JM, Cauley JA, Ferrell RE. Molecular epidemiology of vitamin D receptor gene variants. *Epidemiol Rev* 2000;22:203–217.
- Thakkeestian A, D'Este C, Eisman J et al. Meta-analysis of molecular association studies: vitamin D receptor polymorphisms and BMD as a case study. *J Bone Miner Res* 2004;19:419–428.
- Cooper GS, Umbach DM. Are vitamin D receptor polymorphisms associated with bone mineral density? *J Bone Miner Res* 1996;11:1841–1849.
- Roux C. Can practitioners use the WHO definition for osteoporosis? *Joint Bone Spine* 2001;68:10–11.
- Lei SF, Chen Y, Xiong DH et al. Ethnic difference in osteoporosis-related phenotypes and its potential underlying genetic determination. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2006;6(1):36–46.
- Zajickova K, Zofkova I, Bahbouh R et al. Vitamin D receptor polymorphisms, bone mineral density and bone turnover: FokI genotype is related to postmenopausal bone mass. *Physiol Res* 2002;51:501–509.
- Willing M, Sowers M, Aron D et al. Bone mineral density and its change in white women: estrogen and vitamin D receptor and their interaction. *J Bone Miner Res* 1998;13:695–705.
- Uitterlinden AG et al. The association between common receptor vitamin D gene variations and osteoporosis: a participant-level meta-analysis. *Ann Int Med* 2006;145:255–264.
- Heuberger RA. The frailty syndrome: a comprehensive review. *J Nutr Gerontol Geriatr* 2011;30:315–368.
- Garnero P, Munoz F, Borel O et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with the risk of fractures in postmenopausal women, independently of bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4829–4835.
- Fang Y, van Meurs JB, d'Alesio A et al. Promoter and 3'-untranslated-region haplotypes in the vitamin D receptor gene predispose to osteoporotic fracture: the rotterdam study. *Am J Hum Genet* 2005;77:807–823.
- Ji GR, Yao M, Sun CY et al. BsmI, TaqI, ApaI and FokI polymorphisms in the vitamin D receptor (VDR) gene and risk of fracture in Caucasians: a meta-analysis. *Bone* 2010;47:681–686.
- Palomba S, Orio F Jr, Russo T et al. BsmI vitamin D receptor genotypes influence the efficacy of antiresorptive treatments in postmenopausal osteoporotic women. A 1-year multicenter, randomized and controlled trial. *Osteoporos Int* 2005;16:943–952.
- Zajicková K, Žofková I, Hill M. Vliv kalcitriolu na kostní denzitu u osteopenických žen ve vztahu ke genu pro receptor vitaminu D. *Osteologický bulletin* 2003;4:119–122.
- Matsuyama T, Ishii S, Tokita A et al. Vitamin D receptor genotypes and bone mineral density. *Lancet*. 1995;345:1238–1239.
- Dvornyk V, Long JR, Liu PY et al. Polymorphisms of the vitamin D receptor gene predict the onset of surgical menopause in Caucasian females. *Gynecol Endocrinol* 2006;22:552–556.
- Uitterlinden AG, Ralston SH, Brandi ML et al. The association between common vitamin D receptor gene variations and osteoporosis: a participant-level meta-analysis. *Ann Intern Med* 2006;145(4):255–264.
- Lakatos P, Balogh A, Czerwinski E et al. New considerations on the management of osteoporosis in Central and Eastern Europe (CEE): summary of the „3rd Summit on Osteoporosis-CEE“, November 2009, Budapest, Hungary. *Arch Osteoporos* 2011.
- Ivanova J, Doukova P, Boyanov M et al. FokI and BsmI polymorphisms of the vitamin D receptor gene and bone mineral density in a random bulgarian population sample. *Endocrine* 2006;29(3):413–418.
- Arabi A, Mahfoud Z, Zahed L et al. Effect of age, gender and calcitropic hormones on the relationship between vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density. *Europ J Clin Nutr* 2010;64:383–391.
- Ardawi MM-S PP211 – Vitamin-D receptor gene polymorphisms and bone mineral density. Presented at the 37th Annual Meeting of the European Society for Calcified Tissue, 26–30 June 2010, Glasgow, UK.