

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A csontvázra ható genetikai és
környezeti tényezők klinikai
vizsgálata**

Dr. Takács István

Semmelweis Egyetem Budapest

I. sz. Belgyógyászati Klinika



Budapest

2016

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3. oldal
1. Bevezetés	4. oldal
2. Célkitűzések	5. oldal
A csontvázra ható genetikai tényezők vizsgálata	
Az osteoporosisal összefüggésbe hozható kandidáns gének vizsgálata	
Az osteopetrosis génjét hordozó, de klinikailag tünetmentes beteg vizsgálata	
A csontvázra ható környezeti tényezők vizsgálata	
Az osteoporosis kezelésének hatása a törésekre és a kiadásokra	
A D-vitamin értékekre ható környezeti tényezők	
A D-vitamin-pótlás hatékonysága a dózis és az adagolás függvényében	
Fibrogenesis imperfecta ossium (FIO) kezelési lehetőségei	
Von Gierke betegségben májtranszplantáció után a csontanyagcsere változása	
3. Módszerek	7. oldal
A vizsgált populáció, a vizsgálat felépítése	
Mérési módszerek	
Statisztikai módszerek	
4. Eredmények	12. oldal
A csontvázra ható genetikai tényezők vizsgálata	
Az osteoporosisal összefüggésbe hozható kandidáns gének vizsgálata	
Az osteopetrosis génjét hordozó, de klinikailag tünetmentes beteg vizsgálata	
A csontvázra ható környezeti tényezők vizsgálata	
Az osteoporosis kezelésének hatása a törésekre és a kiadásokra	
A D-vitamin értékekre ható környezeti tényezők	
A D-vitamin-pótlás hatékonysága a dózis és az adagolás függvényében	
Fibrogenesis imperfecta ossium (FIO) kezelési lehetőségei	
Von Gierke betegségben májtranszplantáció után a csontanyagcsere változása	
5. Új megállapítások	19. oldal
6. Közlemények	21. oldal
A dolgozat alapját képező eredeti közlemények	
Scientometriai adatok	

Rövidítések jegyzéke

25OHD -	25-hidroxi-D-vitamin
ADO2 -	autoszomális domináns osteopetrosis 2-es típusa
ANOVA modell -	egyszempontú varianciaanalízis
b-25OHD -	biológiailag elérhető 25-hidroxi-D-vitamin
BMD -	bone mineral density
BMI -	body mass index- (testtömeg index)
BNO -	betegségek nemzetközi osztályozására szolgáló rendszer
CaSR -	kalcium-sensing receptor
CK-BB -	creatine kinase brain type
DBP -	vitamin D binding protein- (D-vitamin-kötő fehérje)
DNS -	dezoxiribonukleinsav
f-25OHD -	szabad 25-hidroxi-D-vitamin
FIO -	Fibrogenesis Imperfecta Ossium
GAPDH -	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GLM -	generalizált lineáris modell
GPR177 -	G protein-coupled receptor 177
GSD -	glykogen storage disease- glikogéntárolási betegség
ICER -	incremental cost effectiveness ratio
IGF-1 -	insulin-like growth factor 1- (inzulinszerű növekedési faktor 1)
IL-6 -	interleukin 6
IL-1ra -	interleukin 1 receptor antagonist
LD-	linkage disequilibrium
LRP5 -	low-density lipoprotein receptor-related protein 5
MPR -	medication possession ratio
MR -	microsatellit repeat
ODM -	osteodensitometria
OEP -	Országos Egészségbiztosítási Pénztár
OPG -	osteoprotegerin
PBS -	phosphate-buffered saline
PCR -	polymerase chain reaction - (polimeráz-lánreakció)
PTH -	parathyroid hormon - (parathormon)
QALY-	quality-adjusted life years - (életminőséggel korrigált életevek)
RANK -	Receptor activator of nuclear factor kappa-B
RANKL -	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
SD -	standard deviáció
SNP -	single nucleotide polymorphism-(egyponos polimorfizmus)
SP7 -	SP7 transzkripciós faktor (más néven osterix)
t-25OHD -	teljes 25-hidroxi-D-vitamin
T-score -	mért csontdenzitás csúcs-csonttömegtől való eltérése szórásban
TRAP -	tartarát rezisztens acidfoszfátáz
TSH -	thyroid-stimulating hormone
USD -	United States dollar
UV-B -	ultraviolet B
VDR -	vitamin D receptor- (D-vitamin receptor)
VNTR -	variable number tandem repeat
Wnt -	Wingless-related integration site gene family

1. Bevezetés

Az emberi csontváz sok szempontból különleges szerepet tölt be a szervezetben. A változó külső tényezőknek megfelelően biztosítja a szervezet szilárd vázát, lehetővé teszi a mozgást, védelmet nyújt a belső szerveknek és nem utolsósorban hatalmas kalciumraktárt képez. Magyarországon - Európában az elsők között - Holló István Professor kezdett foglalkozni a csontanyagcsere kutatásával az 1950-es években. Az ő kutatócsoportjának munkájába kapcsolódtam be, immár 28 évvel ezelőtt. Céлом a kezdetektől a gyakori csontbetegségek okainak vizsgálata volt.

A leggyakoribb csontbetegség az osteoporosis esetében, kutatásaim döntően a genetikai okok meghatározására irányultak. Első vizsgálataim - az akkori tudásunknak megfelelően - a csontanyagcsere ható citokinek, növekedési faktorok genetikai vizsgálatával foglalkoztak. Ebben az időben valamennyi vizsgálatom negatív eredményt adott. Ezen negatív eredményeinket azóta egyértelműen igazolták. Később a csontanyagcsere legfontosabb regulátorainak, a RANK-RANKL-OPG rendszernek és a Wnt szignálút csontanyagcsereben betöltött szerepének a megismerésével genetikai vizsgálataink is új irányt kaptak. A csontanyagcsereben központi szerepet játszó szabályozó mechanizmusok szereplőinek genetikai hatását az elsők között igazoltuk.

Gyakorló klinikusként az osteoporosisal kapcsolatban a másik fontos tudományos kérdés, a környezeti tényezők hatása volt. Ezen belül is a legfontosabb kérdésnek azt tartottam, hogy az általunk alkalmazott gyógyszeres kezelésnek milyen hatása van betegeink csonttörési kockázatára, a kórházi észlelések számára, a halálozási kockázatokra és nem utolsósorban kezeléseink ára megtérül-e az egészségügyi kiadásokban. A nagy ásványianyag-tartalommal és fokozott csonttörékenységgel járó osteopetrosis genetikai és klinikai kutatására az USA-ban nyílt alkalom. Magyarországon - úgy tűnik - ritkábban fordul elő a kórkép, mint azt feltételeztük.

Az elmúlt negyedszázadban a D-vitamin-hiány megítélése változott meg legjobban. Az irodalomban nem egységes a normál érték, a szükséges pótlás adagja és időtartalma sem. Az egységes hazai gyakorlat kialakítása miatt három alkalommal Konszenzus Konferenciát szerveztem, ahol egységes magyarországi ajánlást fogalmaztunk meg. A véleményem szerint legfontosabb két gyakorlati kérdés megválaszolására klinikai vizsgálatokat végeztünk. A D-vitamin-hiány legnagyobb gyakoriságát és az ezt befolyásoló tényezőket egy országos reprezentatív vizsgálattal mértük fel. A szükséges D-vitamin-pótlás adagját és idejét egy kontrollált, kettős vak, multicentrikus vizsgálattal határoztuk meg.

Szakrendelésemen sok ritka betegséget diagnosztizáltam. Ezek döntő többsége szakmai kihívás volt, de tudományos érdekességet nem jelentett. Két esetben azonban olyan kezelési módszert alkalmaztunk, ami a beteg sorsát befolyásolta és tudományos érdeklődésre tarthatott számot. Értekezésem ezt a két esetet is bemutatja.

2. Célkitűzések

A csontvázra ható genetikai tényezők vizsgálata

Az elmúlt huszonöt évben a csontvázra ható genetikai tényezőkkel kapcsolatos munkám során, az irodalmi adatok alapján legvalószínűbb kandidáns gének osteoporosis kialakulásában betöltött szerepét kívántam meghatározni. Vizsgálataim részben egészséges felnőtteken, részben osteoporosisban szenvedő nőknél végeztem, a csúcs-csonttömeggel és az osteoporosis kialakulásával való kapcsolatot kutatva. Célkitűzésem volt a *VDR*, az *IL-1ra*, az *IL-6*, az *IGF-1*, a *CaSR*, a *RANK-RANKL-OPG*, az *LRP5*, a *GPR177* és az *SP7* gének polimorfizmusainak csontanyagcserére gyakorolt hatásának vizsgálata.

Az osteopetrosis különböző típusainak genetikai háttere napjainkra pontosan ismert, tizenöt évvel korábban azonban számos részlet még tisztázatlan volt. Az ADO2 egy autoszomális domináns módon öröklődő felnőttkori forma, melynek klinikai penetranciája 75 %-os. Nem volt ismert, hogy a nem penetrálódó, klinikai tüneteket nem okozó betegségben az osteoclastok működése sérül-e valamilyen mértékben.

Célkitűzésem volt, hogy ADO2 hordozó tünetmentes személyben megvizsgáljam, hogy az autoszomális domináns módon öröklődő kórkép enyhe, klinikailag nem manifesztálódó eltérései jelen vannak-e.

A csontvázra ható környezeti tényezők vizsgálata

Az osteoporosis kezelésében alkalmazott készítmények hosszútávú hatásáról is számos adat áll rendelkezésünkre. Ezek az adatok azonban döntő részben gyógyszervizsgálatok részeként születtek, ezért nem mindenben tükrözik a mindennapi életet. A modern osteoporosis gyógyszerek egy ország teljes népességén mért töréscsökkentő hatékonyságáról, a kezelés gazdasági hatásairól nem állt adat rendelkezésünkre.

Célkitűzésem volt a magyarországi adatok alapján felmérni, hogy a modern osteoporosis kezelése bevezetése milyen hatással volt a törések gyakoriságának változására és az egészségügyi kiadásokra Magyarországon. Valamint, hogy a terápiás compliance és adherencia hogyan befolyásolja a terápia hatékonyságát.

A D-vitamin ellátottságot alapvetően az UV-B sugárzás mennyisége befolyásolja. Magyarországon a legalacsonyabb D-vitamin értékek a tél legvégére alakulnak ki. Nem volt ismert, hogy a teljes népességben milyen alacsony lesz a D-vitamin-szint tél végére. Az sem volt ismert, hogy a szabadhormonok mennyisége arányosan csökken-e a teljes 25OHD-hez képest. Kérdés volt, hogy a leghosszabb UV-B sugárzásmentes periódus végén a D-vitamin szintet befolyásoló ismert környezeti tényezőknek van-e szerepük és a D-vitamin-hiánnyal összefüggésbe hozható betegségek gyakoriságára hatással van-e az ebben az időszakban mért hormonérték.

Célkitűzésem volt a D-vitamin szintek meghatározása a magyarországi népességre, korra, nemre és lakhelyre reprezentatív mintán történő vizsgálata a leghosszabb UV-B sugárzásmentes periódus után, a tél legvégén. Továbbá vizsgálni kívántam, hogy milyen környezeti tényezők befolyásolják a tél végi D-vitamin-hiányt és a hiányállapot legmélyebb pontja mutat-e összefüggést a D-vitamin-hiánnyal összefüggésbe hozható betegségek gyakoriságával.

A D₃-vitamin adása mellett észlelt szérumban 25OHD-vitamin-emelkedést számos vizsgálatban mérték és meglehetősen eltérő eredményeket kaptak. Azonban nem volt ismert, hogy a téli UV-B sugárzásmentes periódus három hónapja alatt mennyi az ideális D-vitamin ellátottsághoz szükséges D-vitamin-pótlás adagja. Nem ismert az sem, hogy a napi, a heti és a havi rendszerességgel adott - napi dózisirra ekvivalens - adagolási módok egyformán hatásosak és biztonságosak-e.

Célkitűzésem volt a napi, heti és havi gyakorisággal alkalmazott napi 1000 NE dózis ekvivalens D₃-vitamin szérumban 25OHD-vitamin értékére gyakorolt hatásának vizsgálata három hónapos kezelési időszak alatt.

A FIO rendkívül ritka, szerzett csontbetegség. A kórkép kezelési kísérletei ez ideig jórészt sikertelenek voltak. Csúppán melphalan adásával tudtak néhány esetben eredményt elérni. Kemoterápiás készítmény adása az alapbetegség miatt már súlyos általános állapotban lévő betegeknek az esetek többségében önmagában kontraindikált. Célkitűzésem volt olyan kevésbé kockázatos kezelési eljárást alkalmazni FIO-ban, ami súlyos betegnél is a klinikai kép javulását okozza.

GSD-ben, annak I-es típusában is a növekedés elmaradása, a csontanyagcsere zavara komplex anyagcserezavar és hormonális eltérések következménye. Nem ismert olyan kezelés, amely a betegséget meggyógyítaná. A kialakuló májadenoma miatt gyakran szükségessé váló májtranszplantáció sem gyógyítja a betegséget – pl. az izmokban a glikogenezis zavara fennmarad -, de transzplantáció után a hypoglycaemiahajlam, az acidózis szűnik, a máj IGF-I termelő kapacitása rendeződik. Nem ismert, hogy ebben a kórképben a csontanyagcserére a májtranszplantáció hogyan hat. Nem ismert továbbá, hogy májtranszplantáció után milyen terápia szükséges és lehetséges a csontanyagcsere rendezéséhez.

Célkitűzésem volt von Gierke betegségben szenvedő beteg májtranszplantációja után a csontanyagcsere változások követése, a szükséges ideális terápia meghatározása.

3. Módszerek

A vizsgált populáció, a vizsgálat felépítése

A *VDR* gén, az *IL-6* gén és az *IGF-1* vizsgálata során asszociációs és kötődéses módszerrel is tanulmányoztuk a csúcs-csonttömeg és a gének kiválasztott polimorfizmusainak kapcsolatát. Az Indiana University School of Medicine "Sister study" vizsgálatába vont személyek mintáit használtuk fel. A vizsgálatba ötszáznegyvenkét testvérpár került be.

Az *IL1-ra* gén, a *CaSR* gén, a RANK-RANKL-OPG jelátviteli út és a Wnt jelátviteli út génjeinek vizsgálata során asszociációs módszerrel a menopauza utáni csontdenzitás és/vagy az osteoporosis gyakoriság összefüggését tanulmányoztuk a gének kiválasztott polimorfizmusaival. A vizsgálatok során a Semmelweis Egyetem I.sz. Belgyógyászati Klinikáján, ambuláns vizsgálaton megjelent felnőtt, kaukázusi rasszhoz tartozó nők mintáit, adatait használtuk fel.

ADO2 hordozó tünetmentes személy vizsgálata során egy ADO2-ben szenvedő család adatait dolgoztam fel. Az 57 éves nagymama (1. generáció) édesanyja és testvére is ebben a betegségben szenvedett, mutatva annak klinikai tünetei. A nagymamánál 12 éves korát követően egyértelmű radiológiai tünetek mellett többszöri csipő, felkar és tibia törés alakult ki. Az ő harmincnégy éves lánya (2. generáció) tünetmentes volt a vizsgálat kezdetéig. Feltételezték, hogy a betegségért felelős gént nem örökölte. Azonban a két unokánál 3 éves és 5 éves (3. generáció) korukban a betegség egyértelmű radiológiai tünetei jelentek meg. A vizsgálat során a tünetmentes anyánál kerestem a betegség esetleges radiológiai, laboratóriumi jeleit.

Az osteoporosis hosszú távú gyógyszeres kezelésének hatékonyságának vizsgálata során az OEP adatbázisban 2004 és 2010 között osteoporosis BNO-kóddal fekvő- vagy járóbeteg-ellátás során azonosított, vagy osteoporosis terápiát kiváltott női betegek osteoporosis szempontjából releváns ellátási tételüket megvizsgálva, több modellben tanulmányoztuk az osteoporosis kezelés hatékonyságát a terápiás együttműködés és a terápiás hűség függvényében. Vizsgáltuk a törésszámra, az egészségügyi kiadásokra és halálzásra gyakorolt hatást is. A terápiás perzisztencia és compliance során a gyógyszerellátási adatok elemzését végeztük el, míg a törési kockázat vizsgálatánál a fekvő- és járóbeteg-ellátás BNO-kóddal azonosított tételüket is vizsgáltuk. Az ellátási adatok mellett a beteg kora és neme is elérhető volt. Az egyes elemzésekbe a teljes női betegkörből különböző feltételek mentén szelektáltuk a betegeket.

A tél végi D-vitamin értékekre ható környezeti tényezők azonosítása során vizsgált populáció korra, nemre és lakhelyre reprezentatív mintán zajlott. Vizsgálatunkba 831 személyt vontunk be, akik életkor, lakhely és nem szerinti eloszlásban tükrözték a 2012-es népszámláláskor nyert magyarországi felnőtt populáció adatait. A vizsgálatban kizáró tényező nem volt. A résztvevőket a földrajzi eloszlás alapján kiválasztott háziorvosok hívták be. A háziorvosok a tőlük nem és kor

szerint kért felnőttest az egészségügyi kártyák alapján hívták be. Az vizsgált csoportban az első behívott családi nevének kezdőbetűje megegyezett a háziorvos családi nevének kezdőbetűjével. Ettől kezdve a megfelelő alanyokat abc sorrendben hívták be, egészen addig, amíg a kért vizsgálati számot el nem érték. Rendelőben egészségügyi probléma miatt jelentkező betegek a vizsgálatban nem vehettek részt.

A D-vitamin-pótlás hatékonyságának meghatározására randomizált, kettősvak, kontrollált, multicentrikus vizsgálatba 2013. február és október között összesen 140 személyt szűrtünk. Közülük 67-et vontunk be a vizsgálatba (55 nő, 12 férfit). Beválasztási feltétel volt a legalább 18 éves életkor és az 50 nmol/l alatti szérumszint 25OHD-vitamin-szint. Kizáró ok volt a szűréskor észlelt vagy egy éven belüli hypercalcaemia (se Ca >2,60 mmol/l), a szűrés előtti két évben igazolt hypercalciuria, vesekövesség az anamnézisben, súlyos veseelégtelenség (≥3. stádium) osteoporosison kívül más csontanyagcsere betegség és a malabszorpció. Kizáró ok volt még a jelentős elhízás, a pangásos szívelégtelenség, az angina pectoris, valamint a két hónapon belüli D-vitamin-szedés napi 1000 NE-nél nagyobb adagban.

Randomizációt követően a vizsgált személyeket három kezelési csoportba osztottuk. Az "A" csoportban napi 1000 NE, a "B" csoportban heti 7000 NE, a "C" csoportban havi 30 000 NE D₃-vitamin kezelést kaptak. A vizsgálat 90 napja alatt 5 vizit történt.

FIO ossium új típusú kezelésével gyógyított személy anamnézise a következő volt: Az 1951-ben született férfi családjában nem fordult elő csontanyagcsere betegség. Jobb lába egyéves korban járványos gyermekbénulás miatt lebénult. Betegségének első tünetei 1997-ben jelentkeztek. Háti és deréktáji fájdalom kapcsán a háti illetve a lumbális csigolyák kompresszióját mutatták ki. A részletes kivizsgálás során epehólyagtumor gyanúja merült fel és az elektroforézissel kimutatott M komponens felvetette myeloma multiplex gyanúját is. Az epehólyagot eltávolították, de malignitás nem igazolódott. Ismételt hematológiai kivizsgálás kizárta myeloma lehetőségét, MGUS igazolódott. Ekkor a crista biopszia még normál csontszerkezetet mutatott. 1998-ban patológiai borda- és metatarsus törést szenvedett. 2002-ben bal, 2005-ben jobb combnyaktörés alakult ki, avascularis nekrosis talaján. 2005-ben kétoldali csípőprotézis műtét történt. A műtétet követően a beteg mankóval járt. Ekkor mindkét ulna, majd humerus súlyosan deformálódott és ismételten eltört. 2008-után a végtagok és a gerinc súlyos deformációja miatt tolokocsival tudott csak közlekedni. Testmagassága több mint 30 cm-rel csökkent.

Von Gierke betegség miatti májtranszplantáción átesett beteg anamnézise a következő volt: A betegnél kisgyermekkorában óta észlelték a von Gierke betegség tüneteit. Fejlődése elmaradt kortársaitól, magassága 23 éves korára 128 cm volt. Gyakoriak voltak a hypoglycaemias roszullétek, hepatomegalia, neutropenia alakult ki. Tizennégy éves korában köszvényt, hypogonadizmust és hypothyreosist diagnosztizáltak. Húsz éves korában a májban kifejlődő adenomák, malignus transzformáció veszélye miatt májtranszplantációt végeztek. A beteg ezután került rendelkezésre, extrém alacsony csontdenzitás értékekkel, hyogonadizmusra és hypothyreosissra utaló laboratóriumi paraméterekkel, a csont röntgen alapján nyitott epifízis fugákkal.

Mérési módszerek

A *VDR* FOKI polimorfizmus, az *IGF-1* MR és az *IL-6* VNTR polimorfizmusának vizsgálata során az egészséges résztvevők szűrő vizsgálataihoz az Indiana University Medical School központi laboratóriumának automatáit használtuk fel (Cobas Mira, Roche Diagnostic System, Branchburg, NJ). A *CaSR*, a RANK-RANKL-OPG és a Wnt jelátviteli út génjeinek vizsgálata során a postmenopausás, részben osteoporotikus populáció laboratóriumi vizsgálatait a Semmelweis Egyetem Központi Laboratóriumának automatáival végeztük el. A tél végén végeztünk, reprezentatív D-vitamin felmérést, a D-vitamin-pótlás hatékonyságának vizsgálata és a FIO-ban szenvedő beteg vizsgálata során a 25OHD-vitamint és a PTH-t automatizált immunoassay-vel mértük.

A *VDR*, az *IL-6* és az *IGF-1* gének és a csúcs-csonttömeg vizsgálata során a csontmérést a lumbális gerincen (L_{2-4}) és a femurnyakon DEXA-val, Lunar DPX-L készülékkel (Lunar Corp., Madison, WI) végeztük el. Minden testvérpárt ugyanazon a készüléken mértünk. Az *IL-1ra*, a *CaSR*, a RANK-RANKL-OPG és a Wnt jelátviteli út génjeinek vizsgálata során a csontméréseket az Semmelweis Egyetem I.sz. Belgyógyászati Klinika Osteodensitometriai Laborjában Lunar Prodigy DXA készülékkel végeztük el. Mértük a lumbális gerinc L_{2-4} régióját, a csípőtájat (teljes femur) és a combnyakat. A vizsgálatok során minden vizsgálatba vont személy esetében ugyanazt a denzitómétert használtuk.

A genomiális DNS-t a perifériás mononukleáris sejtekből etanol precipitációval izoláltuk a meghatározott protokoll szerint. A *VDR*, az *IL-6*, az *IGF-1*, az *IL-1ra*, a *CaSR*, a RANK-RANKL-OPG és a Wnt jelátviteli út génjeinek vizsgált polimorfizmusait részben a korábbi irodalomban megadott, részben magunk által kifejlesztett PCR módszerekkel amplifikáltuk és mutattuk ki. Génexpressziós vizsgálatokban az eltávolított csontmintákat átmostuk majd a mintákat folyékony nitrogénben tároltuk. A folyékony nitrogénben tárolt csontmintákat porlasztottuk. A direkt polyA-RNS-t Dynebeads Oligo dT paramagnetikus részecskékkel izoláltuk. Az mRNS-ek mennyiségét és minőségét spektrofotométerrel 260 és 280 nm-en vizsgáltuk. A TNFRSF11B and TNFSF11 gének cDNS-eit kvantitatív real time PCR-ral amplifikáltuk. Endogén kontrollnak a *GAPDH* housekeeping gént használtuk. A Wnt jelátviteli út génjeinek vizsgálata során a DNS-eket High Pure PCR Template Purifying kittel nyertük ki. A genotipizálást Sequenom MassARRAY Analyzer 4-en végeztük el.

Statistikai módszerek

A *VDR*, az *IGF-1* és az *IL-6* csonthatásának genetikai vizsgálatok a kétpontos, nonparametricus, kvantitatív linkage analízist SIBPAL program segítségével végeztük el. Az *IL-6* polimorfizmusok és BMD értékek közötti összefüggés vizsgálata érdekében véletlenszerűen választottunk ki egy lány testvért minden családból. Minden állél jelen volt az átlagos populációban minimum 5%-os frekvenciával, a különbözőségek analízisét ANOVA modell segítségével végeztük.

Az *IL-1ra* és a *CaSR* polimorfizmusainak csonthatását t-tesztellett és ANOVA módszerrel vizsgáltuk. GLM ANOVA analízist használtunk a BMD és az allélek jelenléte közötti lehetséges kapcsolat megbecslésére, figyelembe véve a kor, BMI és dohányzási szokások hatásait.

RANK-RANKL-OPG szabályozási rendszervizsgálata során stepwise regressziós analízist használtunk a genetikai változóknak valamint a csigolyák és a teljes csípő BMD értékeinek (lineáris regresszió), a nem vertebrális osteoporotikus törések (logisztikai regresszió) kapcsolatainak vizsgálatához. A kor, a menopauza ideje, a BMI, a dohányzás és az alkoholfogyasztás esetében logisztikus regresszióval határoztuk meg a fenotípusra szignifikánsan ható kovariánsokat. Ugyancsak logisztikai regressziós modellel vizsgáltuk a gerinc és a teljes csípő BMD értékek törési rizikóra gyakorolt hatását. Genotípus-fenotípus asszociációt három gyakori genetikai modellel (additív, domináns és recesszív) határoztuk meg non-parametrikus tesztekkel (Jonckheere-Terpstra trend teszt az additív modell, Mann-Whitney U teszt a domináns és recesszív modellre). Az eredmények megbízhatóságának becslésére a 10000 Monte Carlo permutációt végeztük el, pontos P értékeket generálva.

A *wnt* jelátviteli út génjeinek vizsgálatok genotipizált adatok és csontparaméterek vizsgálata során a betegeket különböző csoportokba soroltuk a genotipizált adatok eredménye alapján. Három csoportot (homozigóta recesszív, homozigóta domináns és heterozigóta) alkottunk az SNP-k alapján. A három csoport szabályszerűségét Shapiro-Wilk teszttel, a variancia homogenitást Levene teszttel elemeztük. A különböző genotípusok összehasonlítását kovariancia analízissel és Bonferroni teszttel végeztük. A BMD értékeket korhoz és BMI-hez igazítottuk. Minden tesztet az SSPS 21-gyel végeztünk el. A vizsgálati adataink alapján a linkage disequilibrium plottokat Haplo View 4.0 programmal alkottuk meg. A fenotípusban megjelenő gének közötti interakciókat az SNPacc segítségével számoltuk ki, a haplotípus analízisét a haplo.stats programmal végeztük.

Az osteoporosis hosszú távú gyógyszeres kezelésének törésekre gyakorolt hatásának vizsgálata során a statisztikai összehasonlítást a nyers adatok alapján - és a vizsgálati karok közötti oki különbségek azonosítása érdekében - propensity analízissel is elvégeztük. A propensity score-okat nagyságuk alapján öt egyenlő csoportba osztottuk. Elegendő számú beteg volt minden egyes csoportban. A kezdő periódus előtti kovariancia elemzés érdekében megvizsgáltuk a propensity score-hoz igazított különbségeket a jó compliance-ű és a rossz compliance-ű csoport átlagai

között ANOVA segítségével. A propensity score kiegyenlítéséért a propensity score alapján felállított öt csoportot, mint addicionális faktort bevontuk az ANOVA modellbe. A különböző törések előfordulását és a kórházi ápolást Cox arányos kockázati modellel vizsgáltuk.

A D-vitamin értékekre ható környezeti tényezők vizsgálata során a hiányzó adatok és a nem válaszoló házi orvosok miatt kialakult mintavételi hibák kompenzálására a mintákat súlyoztuk. Minden állandó változóra elvégeztük a normalitás tesztelését, és a D-vitamin és DBP értékek eloszlását vizuálisan ábrázoltuk hisztogramokon. A különböző D-vitamin értékek és DBP szintek közötti összefüggést lineáris regressziós analízis segítségével vizsgáltuk, a t-25OHD vitamin értéket használva független változóként. A non-linearitás vizsgálatának modelljében a t-25OHD-vitamin értékek négyzetét használtuk. Lineáris regressziós modellben egyenként vizsgáltuk meg a D-vitamin-szint lehetséges befolyásoló faktorait, a D-vitamint és a DBP-t mint független változókat alkalmazva. Azokat a paramétereket, amelyek univariáns asszociációt mutattak ($p < 0,1$) a D-vitamin értékekkel és/vagy a DBP szintekkel, egy többszörös lineáris modellbe helyeztük, hogy meghatározzuk a befolyásoló tényezők független hatását. Végül logisztikai regressziós modellel vizsgáltuk a potenciális összefüggést a feltételezeten D-vitamin-függő betegségek (állapotok) és a D-vitamin értékek között. Ebben a modellben a D-vitamin értékek voltak a független változók és a betegségállapotok voltak a következményes változók.

A D-vitamin-pótlás hatékonyságának meghatározása során a kezelési csoportok közötti különbség kimutatásának statisztikai erejét egyirányú ANCOVA modell és a Dunnett post hoc teszt segítségével számítottuk ki. A leíró demográfiai adatokat, a biztonsági paramétereket és a mellékhatások eloszlását Kolmogorov-Szmirnov és Levene statisztikai tesztekkel értékeltük ki. A D₃-vitamin-pótlás hatékonyságát kovariancia analízissel hasonlítottuk össze a vizsgálat különböző csoportjaiban.

4. Eredmények

A csontvázra ható genetikai tényezők vizsgálata

Az „F” és az „F” allél eloszlása Hardy – Weinberg egyensúlyban volt a teljes vizsgált populációban és külön-külön mindkét rasszban is. Az rs2228570 (FOK I.) polimorfizmusnak asszociációs vizsgálattal nem igazolódott semmilyen hatása a fiatalfelnőttkori BMD értékre. A vizsgálat statisztikai erejét figyelembe véve a genetikai hatás biztosan 3 % alatti lehet csupán. A vizsgált genetikai polimorfizmust, mint genetikai markert használva a *VDR* gén 1 cM környezetében tudtuk meghatározni azt, hogy a fiatalfelnőttkori csonttömeg örökítésében szerepet játszik-e a vizsgált régió. Eredményeink alapján a *VDR* gén rs2228570 polimorfizmusa nincs hatással a fiatalfelnőttkori csonttömeg nagyságára.

Az *IL-1ra* gén 2. intronjában elhelyezkedő VNTR (variable number tandem repeat) polimorfizmusnak öt típusát igazoltunk. Nem találtunk összefüggést a vizsgált személyek e polimorfizmusának genotípusa és a menopauza utáni csontdenzitás között sem az osteoporoticus, sem a kontroll csoportban, sem a lumbális gerincen, sem a femurnyakon. Eredményeink alapján az *IL-1ra* gén 2. intronjában elhelyezkedő VNTR polimorfizmusa nincs hatással a menopauza utáni csonttömeg nagyságára sem az osteoporoticus, sem a kontroll populációban.

Az *IL-6* gén fiatalfelnőttkori csontdenzitásra gyakorolt hatásának vizsgálata során a gén 3' végéhez közeli, át nem íródó régióban elhelyezkedő VNTR polimorfizmust vizsgáltuk. A korábbi vizsgálókhoz képest több, 17 különböző variánst találtunk az 530 és 774 bázispár közötti tartományban. A korábbi vizsgálókkal szemben mi el tudtuk különíteni a 642 bp hosszúságú fragmentumokat is - ahová a két leggyakoribb allél is tartozik -, ami részben magyarázhatja a vizsgálatok eredményének különbségeit. A vizsgált populációban a BMD értékek a normál tartományban voltak. A kaukázusi rasszhoz tartozó személyek BMD értéke alacsonyabb volt mint az afro-amerikaiaké, idősebbek voltak, hosszabb ideig szedtek orális fogamzásgátlót és testsúlyuk is kisebb volt. Ezért a számításokban korra és nemre súlyozott BMD értékekkel számoltunk. Az asszociációs vizsgálatban az 5%-os gyakoriságot meghaladó négy leggyakoribb allél esetében számítottuk ki, hogy az allélek hiánya, egy vagy kétszeres jelenléte összefüggést mutat-e a BMD értékekkel. Ezzel a módszerrel nem találtunk összefüggést az *IL-6* gén vizsgált polimorfizmusa és a fiatalfelnőttkori BMD között. Az *IL-6* gén fiatalfelnőttkori csontdenzitásra gyakorolt hatásának vizsgálata során a gén 3' végéhez közeli, át nem íródó régióban elhelyezkedő VNTR polimorfizmust, mint genetikai markert is felhasználtuk. Kétpontos, nem parametrikus linkage analízissel (SIBPAL program használatával) nem találtunk kötődést az *IL-6* gén (és annak közvetlen környezete) valamint a fiatalfelnőttkori BMD érték öröklődése között. Kaukázusi populációban a LOD score mind a gerincen, mind a femuron 0,00 volt. Az afro-amerikai populációban a gerincen 0,253, a femuron 0,00 volt ez az érték. Mapmaker/Sibs program használatával hasonló

eredményeket kaptunk. Eredményeink alapján az *IL-6* gén nem játszik szerepet a fiatalfelnőttkori csontdenzitás öröklődésében.

Az *IGF-1* gén és a fiatalfelnőttkori csontdenzitás kapcsolatának vizsgálata során a gén át nem íródó részében elhelyezkedő microsatellita ismétlődést használtuk fel, mint genetikai markert. Az allélek mérete 176-202 bp között mozgott. Asszociációs vizsgálatban az 5%-os gyakoriságot meghaladó négy leggyakoribb allél esetében számítottuk ki, hogy az allélek hiánya, egy vagy kétszeres jelenléte összefüggést mutat-e a BMD értékekkel. Ezzel a módszerrel nem találtunk összefüggést az *IGF-1* gén vizsgált polimorfizmusa és a fiatalfelnőttkori BMD között. Habár nem találtunk összefüggést az *IGF-1* gén átíródó részétől 1 kb távolra elhelyezkedő microsatellita ismétlődés és a fiatalfelnőttkori csontdenzitás között, ezt a polimorfizmust, mint genetikai markert is felhasználtuk annak vizsgálatára, hogy akár az *IGF-1* gén, akár annak közvetlen környezetében elhelyezkedő gének szerepet játszanak-e a fiatalfelnőttkori csontdenzitás öröklődésében. Kétpontos, nem parametrikus linkage analízissel nem találtunk kötődést az *IGF-1* gén (és annak közvetlen környezete) valamint a fiatalfelnőttkori BMD érték öröklődése között. Kaukázusi populációban a LOD score a gerincen 0,17 (0,24), a femuron 0,01 ($p=0,43$) volt. Az afro-amerikai populációban a gerincen 0,00 a combnyakon 0,00 volt ez az érték. Mapmaker/Sibs program használatával hasonló eredményeket kaptunk. Eredményeink alapján az *IGF-1* gén nem játszik szerepet a fiatalfelnőttkori csontdenzitás öröklődésében.

A *CaSR* gén vizsgált "A986S" polimorfizmusa Hardy-Weinberg egyensúlyban volt a vizsgált populációban. Nem találtunk eltérést az osteoporoticus és a nem osteoporoticus csoport allél eloszlása között ($p=0,762$). A polimorfizmus és a BMD érték közötti kapcsolatot "t" teszttel értékeltük, a vizsgált személyeket az "S" allél jelenléte (25,2%) vagy hiánya (74,8%) alapján két csoportba osztottuk. Nem találtunk összefüggést a *CaSR* gén vizsgált genotípusai és a mért BMD értékek között sem a teljes populációban, sem a csoportokon belül. Összefüggést GLM ANOVA számítással sem tudtunk igazolni, ahol a test tömeg index-et és életkort, mint kovariáns vettük figyelembe. Eredményeink alapján a *CaSR* gén "A986S" polimorfizmusa nincs hatással a postmenopausában mért csontdenzitására.

RANK-RANKL-OPG szabályozási rendszer vizsgálata során az összes vizsgált SNP Hardy-Weinberg egyensúlyban volt, az allélek frekvenciája minden esetben meghaladta az 5%-ot. A *RANKL* gén három vizsgált SNP-je (rs9533156, rs9525641, rs3742257) haploblokkot alkotott, míg a *OPG* gén két SNP-je nem kapcsolódott egymáshoz. Regressziós modellben a BMD-t szignifikánsan befolyásolta a kor, a menopauza ideje és a BMI. A törési rizikóra a kor, a BMI és a BMD érték volt hatással. A vizsgálat statisztikai ereje 75% volt a csípőn legalább 0,054 g/cm² BMD változás kimutatásra domináns modellen. A lumbalis gerincen 65%, a legalább 0,053 g/cm² BMD változás kimutatásra recesszív modellen. Asszociáció analízisben a polimorfizmusok és a BMD értékek összefüggését három különböző modellel vizsgáltuk. *OPG* gén polimorfizmusai szoros összefüggést mutattak a gerincen és a csípőtájon mért BMD értékekkel. Domináns modellel számolva az rs1564858 SNP-ben 'A' allélt hordozó személyek csípőtáji BMD értéke szignifikánsan kisebb volt.

Kovariánsokra történt illesztést követően a csípőtáji BMD-ben a különbségek a következők voltak: $-0,040 \pm 0,133$ g/cm² az 'A/A+A/G' genotípusban és $0,013 \pm 0,155$ g/cm² a 'G/G' genotípusban $p=0,0001$. Recesszív modellel számolva az rs3102735 polimorfizmus mutatott összefüggést a csípőtáji BMD-vel. Kovariánsokra történt illesztést követően a csípőtáji BMD-ben a különbségek a következők voltak: $-0,129 \pm 0,083$ a 'C/C' és $0,003 \pm 0,151$ g/cm² a 'C/T+T/T' genotípusokban $p=0,004$. A *RANL* gén két SNP-je mutatott szoros összefüggést a gerinc BMD értékekkel az rs9533156 és az rs9525641. Kovariánsokra történt illesztést követően a csípőtáji BMD-ben a különbségek a következők voltak: $-0,010 \pm 0,163$ a 'C/C+C/T' és $0,040 \pm 0,154$ g/cm² a 'T/T' genotípusokban. A vizsgált SNP-k közül egyik sem mutatott összefüggést a nem vertebrális törésekkel. A két gén vizsgált SNP-i között nem lehetett szignifikáns interakciót kimutatni.

A *RANKL* gén vizsgált haplotípusai szoros összefüggést mutattak a gerinc BMD-vel (permutált $p=0,022$). A 'CCT' haplotípus alacsony BMD értékekkel, míg a 'TTC' haplotípus nagyobb gerinc BMD-vel társult.

A *OPG* gén vizsgált haplotípusaival nem lehetett kimutatni összefüggést egyik vizsgált klinikai paraméterrel sem (permutált $p=0,065$), habár két haplotípusnak is volt egyéni hatása a csípőtáji BMD-re. A leggyakoribb 'GT' haplotípus nagyobb, a legritkább 'AC' haplotípus alacsonyabb BMD értékkel társult. Nem találtunk összefüggést a haplotípusok és a nem vertebrális törések között.

A haplotípusok génexpresszióra gyakorolt hatását 16 csontmintából, kvantitatív valós idejű PCR-al vizsgáltuk. A *RANKL* specifikus mRNA mennyisége a 'CCT' haplotípussal mutatott szoros összefüggést, az összefüggés permutált p értéke $0,007$ volt.

A Wnt jelátviteli út génjeinek a csontdenzitás értékekre és a csonttörékenységre gyakorolt hatásának vizsgálata során a vizsgálatba bevont személyeket három csoportba osztottuk a csont ásványianyag-tartalom alapján. Valmennyi vizsgált SNP Hardy-Weinberg egyensúlyban volt. A SNP-k azonosítási pontossága $98,54\%$ volt. Az *SP7* gén rs191240606 SNP-je monomorfának bizonyult a vizsgált populációban, habár az 1000 genom projektben ez polimorfának adódott. A *GPR177* gén vizsgált SNP-i két haplotípus blokkot alkottak, míg az *LRP5* SNP-i egy haplotípus blokkban voltak. Az *LRP5* gén két vizsgált SNP-je az rs4988300 és az rs634008 esetében tudtunk összefüggést kimutatni a teljes femur BMD-vel. Bonferroni korrekció után az rs4988300 estében maradt meg az összefüggés ($p=0,004$). Erre az SNP-re heterozigóta egyének teljes femur BMD-je szignifikánsan nagyobb volt, mint a homozigótáknak. A gerinc BMD értékekkel egyik vizsgált SNP sem mutatott összefüggést. Továbbá nem találtunk összefüggést a vizsgált genotípusok és az osteoporoticus törések között. A *GRE177* és az *SP7* gének SNP-i nem mutattak semmilyen összefüggést a vizsgálati alanyok csont ásványianyag-tartalmával és a csonttörések számával egyik vizsgált lokalizációban sem.

Az autoszomális domináns osteopetrosis génjét hordozó, de klinikailag tünetmentes beteg vizsgálata során a betegségre jellemző nagy csont ásványianyagtartalmat, CK-BB és TRAP eltérést a mérések nem igazolták.

A csontvázra ható környezeti tényezők vizsgálata

Az osteoporosis hosszú távú gyógyszeres kezelésének a törésekre, a kórházi kezelésekre, az egészségügyi kiadásokra és a halálozásra gyakorolt hatásának vizsgálatok biztosan osteoporosisban szenvedő betegek két csoportját hasonlítottuk össze. A megfelelően kezelt betegeket MPR 80 % felett (aktív kar) hasonlítottuk össze az elégtelenül vagy nem kezelték csoportjával (MPR kisebb, mint 20%) (kontroll kar). A 20 %-nál kisebb MPR-el bíró csoportba 17 084 nő került, akik 50 %-a 70 év feletti volt. A 80%-nál nagyobb MPR-ű csoportba 8636 beteg került, akik 53 %-a volt idősebb 70 évnél. Ezeket a kiindulási tényezőket a megfigyelés periódus előtti fél évben bekövetkezett események alapján határoztuk meg. Ezeket a későbbi számítások során, mint meglévő hajlamosító tényezőket (propensity score) vettük figyelembe. Az OEP adatbázisának alapján a 2004-től 2010-ig terjedő időszakban jelentősen csökkent az osteoporosis BNO-kóddal regisztrált betegek csonttöréseinek száma. A törésszám 88 290-ről 47 747-re, a csípőtáji törések száma 17 992-ről 11 242-re csökkent a vizsgált hét évben. A megfigyelés periódus kockázati tényezőinek figyelembe vétele után, - a klinikai tünetekkel csak az esetek harmadában járó csigolyatörés kivételével - valamennyi töréstípusnál és a törések miatti kórházi kezeléseknél is szignifikáns különbség volt a gyógyszert megfelelően szedő és a gyógyszert rosszul szedő csoport között. A teljes követéses periódus három éve alatt bármilyen első törés bekövetkeztének kockázata 21 %-al csökkent az aktívan kezelt csoportban a kontroll csoporthoz képest. Legnagyobb különbség a csípőtáji törések számában volt, ennek a töréstípusnak a kockázata 52 %-al csökkent megfelelő kezelés esetén. Annak megítélésére, hogy az osteoporosis kezelés milyen gyorsan fejt ki hatását, az osteoporosis miatti kezelés megkezdését követően félévente mértük fel az újonnan bekövetkezett törések számát. Az aktív és a kontroll csoportokat kétféle "t" teszttel hasonlítottuk össze. A kezdettől fennálló jelentős különbségek ellenére a két csoport közötti különbség csak a vizsgálat harmadik évére vált szignifikánssá. Azonban a két csoport között a vizsgálat kezdetekor fennálló hajlamosító tényezők (propensity score) figyelembe vétele után a kezelés hatását már jóval korábbi időpontban, fél év után ki lehetett mutatni. A vizsgálat teljes három éve alatt 37%-al csökkent a töréssel kapcsolatos kórházi kezelések száma az aktívan kezelt csoportban a kontrollokhoz képest. A csonttrikulással kapcsolatos egészségügyi kiadásokat az első gyógyszer felírását követően félévente értékeltük. A betegekre eső átlagos kiadásokat USD-ben (United States dollar) fejeztük ki. Az aktívan kezelt csoport csonttrikulással kapcsolatos egészségügyi kiadásai már a második félévtől szignifikánsan kisebbek voltak, mint a kontroll csoportnak. Adataink alapján

folyamatos kezelés mellett egységnyi QALY nyereség inkrementális 28,128 USD, azaz a költség-hatékonysági arányszám (ICER) bőven a WHO által javasolt határérték alá esik. Összességében a folyamatos osteoporotikus terápia ($MPR > 0,8$) Magyarországon rendkívül költség-hatékonynak tekinthető.

A D-vitamin tél végi ellátottság vizsgálata során a populáció 94%-ának t-25OHD értéke nem érte el a Magyarországon a normál tartomány alsó határának elfogadott 75 nmol/l-t, 71 % 50 nmol/l és 30% pedig 30 nmol/l alatt volt. Kizárva az értékelésből a D-vitamint szedőket ($n=99$) a hiány százalékos előfordulása 97%, 77% és 34% volt, hasonló határértékekre. A DBP átlaga 308.9 ± 92.1 mg/l volt és közel normál eloszlást mutatott. Habár a DBP és a t-25OHD értékek szoros pozitív korrelációt mutattak ($r=0.188$; $p < 0.0001$), a DBP csupán a t-25OHD érték változásának 3%-át magyarázta. Az átlag b-25OHD érték 4.4 ± 2.5 nmol/l, az átlag f-25OHD érték 10.8 ± 6.2 pmol/l volt. Mind a b-25OHD, mind a f-25OHD értékek szorosan korreláltak a t-25OHD szintekkel ($r=0.704$ and $r=0.710$, $p < 0.0001$), de a korreláció nem volt lineáris. Progresszíven kisebb f-25OHD emelkedés volt nagyobb t-25OHD értékeknél. A mért t-25OHD érték magyarázta az f-25OHD varianciájának 64%-át. Az f-25OHD és a b-25OHD közötti korreláció rendkívül szorosnak bizonyult ($r=0,98$, $p < 0.0001$). Ezért a f-25OHD és a b-25OHD értékeket közel egyenlőnek vehetjük. Ennek megfelelően a továbbiakban csak az egyikkel, az f-25OHD-vel kapcsolatos számítások eredményét mutatjuk be, mivel az mindkét értékre vonatkozatható.

Sem a t-25OHD, sem az f-25OHD értékek nem mutattak összefüggést a korral, habár a DBP szint csökkent az életkor előrehaladtával ($r=0.165$; $p < 0.0001$). Nőkben a DBP érték szignifikánsan nagyobb ($p < 0.0001$), az f-25OHD pedig kisebb volt, mint a férfiakban (27. ábra), míg a t-25OHD értékek nem mutattak különbséget a nemek között. (36. táblázat) A lakhely, a télen szabadban töltött órák száma, és a munka típusa nem mutatott összefüggést egyik D-vitamin értékkel sem. A BMI korrelált a t-25OHD értékekkel ($r=0.115$; $p=0.004$) és a DBP-vel ($r=0.283$; $p < 0.0001$), de nem mutatott összefüggést a f-25OHD szintekkel (36. táblázat). A vizsgált népesség csupán kis hányada járt rendszeresen szoláriumba (6.6%) vagy utazott tőlünk délre fekvő országokba vagy magas hegységbe (5.2%), ahol a téli UV-B sugárzás jelentős lehet. Mind a szolárium használat, mind az utazás jelentős hatással volt a t-25OHD értékekre ($p < 0.0001$ a szolárium használat és $p=0.002$ az utazás esetében). Nem meglepő módon a D₃-vitamin-pótlás hatással volt mind a t-25OHD, mind az f-25OHD értékekre ($p < 0.0001$). A vizsgált betegségek (osteoporosis, tuberkulózis, diabetes mellitus, rosszindulatú tumorok, autoimmun- és kardiovaszkuláris betegségek) gyakorisága megegyezett a magyar lakosságban korábban leírtakkal. A megbetegedések közül csupán a kardiovaszkuláris betegségek gyakorisága mutatott összefüggést az alacsonyabb D-vitamin értékekkel ($p=0.012$). Osteoporosis gyakorisága 7.9% volt a vizsgált populációban. Az ismerten osteoporosisban szenvedő betegek t-25OHD értéke nagyobb volt ($p=0.02$), mivel Magyarországon a betegség kezelésének kötelező eleme a D₃-vitamin-pótlás. Az általunk vizsgált népességben is az osteoporosisban szenvedő betegek 48%-a szedett rendszeresen D₃-vitamint.

Ugyanakkor nem találtunk összefüggést az osteoporosis szövődményei, a csonttörések száma és a D-vitamin szintek között.

A mért t-25OHD érték összefüggést mutatott a szérumban P ($p=0,015$) és PTH értékekkel, de nem függött össze a szérumban kalcium szinttel. PTH esetében ez az összefüggés nem volt lineáris ($p_{\text{square term}}=0,004$), nagyobb t-25OHD értékeknél kisebb volt a PTH csökkenés. Azonban sem a PTH, sem a szérumban P érték nem alkalmas az egyes egyénnél a D-vitamin-hiány kimutatására, mert a ROC analízisben a görbe alatti terület (AUC) értéke 0,421 illetve 0,633 volt.

A D-vitamin-pótlás hatékonyságának vizsgálatába 140 egyént szűrtünk, közülük 67 került a vizsgálatba a beválasztási és kizárási kritériumoknak megfelelően. A beválasztott személyek kilencven százaléka teljesítette a vizsgálatot a protokollnak megfelelően. A hat kiesett beteg közül három visszavonta a bejegyzését, három pedig nem jelent meg a viziteken. A fennmaradt hatvanegy személy együttműködése jó vagy kiváló volt. A fel nem használt gyógyszerek kilencvenhat százalékát visszahozták. Mindhárom kezelési csoport adatai normál eloszlást mutattak és homogénnek bizonyultak. A különböző adagolási módjai a napi 1000 NE-nek megfelelő D₃-vitaminnak (A csoport napi 1000 NE; B csoport heti 7000 NE; C csoport havi 30 000 NE) egyformán emelték a t-25OHD értéket. Az "A" csoportban $30,6\pm 3,5$, a "B" csoportban $35,3\pm 3,3$ és a "C" csoportban $37,2\pm 2,7$ nmol/l volt az emelkedés. Mindhárom kezelési csoportban mértük a valójában bevitt D₃-vitamin mennyiségét. Az "A" csoportban 949 ± 20 IU, a "B" csoportban 1157 ± 55 IU és a "C" csoportban 1175 ± 62 IU volt az egy napra eső D₃-vitamin bevitel. Ezekre az értékekre számítva a terápiás választ gyakorlatilag azonos értékeket kaptunk a három csoportban. Az "A" csoportban $32,6\pm 3,7$ nmol/l/1000 NE napi dózis; "B" csoportban $31,6\pm 2,8$ nmol/l/1000 NE napi dózis és a "C" csoportban $32,3\pm 2,3$ nmol/l/1000 NE napi dózis t-25OHD növekedést mértünk. A vizsgálatba bevont D-vitamin-hiányos populáció három hónapos kezelése napi 1000 NE napi dózis ekvivalens adagban minden vizsgálati alany t-25OHD értékét 50 nmol/l fölé emelte, de a szérumszint nem érte el a Magyarországon a normál tartomány alsó határának tekintett (152) 75 nmol/l-es értéket. A vizsgálatba nem fordult elő súlyos nem kívánatos mellékhatás. A mellékhatások száma nem különbözött a vizsgálati csoportok között.

A fibrogenesis imperfecta ossium új kezelési lehetőségének elméleti hátterét az jelentette, hogy FIO-ban gyakran jelen van - a mi betegünkénél is megfigyelt - monoclonalis gammopathia, korábban a melphalan terápia néhány esetben hatásosnak bizonyult és nem találtak mások sem amiloid lerakódást a csontokban, feltételeztük, hogy a betegség hátterében a kollagén szintézisre ható antitestek állnak. Ennek a patogenetikai faktornak az eltávolítása volt a 2012 októberében megkezdett, kéthetente alkalmazott plazmaferézis célja. A plazmaferézis kezelés mellett csontturnover markerek csökkentek, a beteg klinikai állapota javult, fájdalomcsillapító igénye csökkent. Sajnos a tartós terápia hatását nem tudtuk felmérni, mert 2013 májusában vastagbél perforáció miatt sebészeti osztályra került és a sikeres műtétet követően két nappal tüdőembóliában elhunyt.

Von Gierke betegségben kialakult máj adenomák miatt a beteg 23 éves korában végzett májtranszplantáció után gyors növekedés kezdődött. Az extrém alacsony 128 cm-es, informatikusként dolgozó fiatal férfinél a gyors csontanyagcsere és kis BMD értékek miatt más intézményben osteoporosist diagnosztizáltak. A tervezett biszfoszfonát kezelés előtt segítségünket kérték a beteg ellátásában. Kivizsgálása során szubsztituált hypothyreosist, jelentős D-vitamin-hiányt, hypogonadismust és nyitott epifízis fugákat találtunk. A beteg életkora ellenére a kórosnak gondolt csontanyagcsere paramétereit nem osteoporosis, hanem a gyors növekedés okozta. Ennek megfelelően a kezelés célja nem a csontanyagcsere lassítása, hanem a további növekedés feltételeinek megfelelő biztosítása volt. Kalciumot és D-vitamint pótolunk, a levothyroxine adagját az ideális TSH érték eléréséhez módosítottuk. Véleményünk szerint az alacsony tesztoszteron érték döntően a műtét előtti IGF-1-hiány következménye volt. A műtétet követően - változatlan növekedési hormon értékek mellett - az IGF-1 szint normalizálódott, ezért a tesztoszteron értékek fokozatos növekedését vártuk. Tesztoszteronpótlást a nyitott epifízis fugák miatt is kontraindikálnak gondoltuk. Gondozásunk mellett a 23 évesen májtranszplantált beteg a transzplantációt követő négy évben 32 cm-t nőtt, így elérte a 160 cm-es magasságot. Ezzel együtt csontdensitása is jelentősen, a gerincen -5,4 T-ről +1,4 T-re, a combnyakon -3,9 T-ről -0,7 T-re javult.

5. Új megállapítások

1, Elsőként zártuk ki annak lehetőségét, hogy a *VDR*, az *IL-6* vagy az *IGF-1* gén (vagy azok közvetlen környezetében elhelyezkedő gének) szerepet játszhatnának a fiatalfelnőttkori csonttömeg genetikai meghatározásában.

2, A korábbi vizsgálokkal ellentétben, mi nem találtunk összefüggést az *IL-1ra* gén 2. intronjában elhelyezkedő VNTR polimorfizmus, valamint a *CaSR* gén "A986S" polimorfizmus genotípusa és a menopauza utáni csontdenzitás között sem az osteoporotikus, sem a kontroll csoportban, sem a lumbalis gerincen, sem a femurnyakon.

3, Vizsgálatai eredményeink is megerősítették a *TNFSF11* gén két polimorfizmusának (*rs9533156* és az *rs9525641*) az összefüggését a gerincen és a csípőtájon mért BMD értékekkel. Emellett mi egy harmadik SNP, az *rs3742257* és a gerinc BMD szoros korrelációját is leírtuk. Elsőként igazoltuk, hogy ennek a három SNP-nek a 'CCT' haplotípusa kisebb BMD értékekkel társul és humán csontmintákban fokozott *TNFSF11* mRNS expresszióval jár. Ez volt a világon az első vizsgálat, ahol sikerült igazolni a csontban, hogy a *TNFSF11* gén genetikai variációjának hatása megjelenik az átíródás szintjén is.

Szignifikáns összefüggést igazoltunk a *TNFSF11B* gén *rs3102735* és *rs1564858* polimorfizmusai és a postmenopausás BMD értékek között. Ugyanakkor ez a két SNP nem befolyásolta a csontban az in vivo génexpresszió nagyságát. Ez alapján az *rs3102735* és az *rs1564858* inkább markere, mint hordozója a *TNFSF11B* gén csontokra gyakorolt hatásának.

4, Korábbiaknál nagyobb, postmenopausás populáción igazoltuk az *LRP5* gén *rs4983300* polimorfizmusának hatását a csípőtáji BMD-re. Ugyanakkor nem tudtuk megerősíteni a más vizsgálok által talált összefüggést az *rs599083* és az *rs634008* polimorfizmusok valamint a postmenopausában mért BMD értékek között.

Mi nagy, homogén, postmenopausás populációban nem találtunk összefüggést a *GPR177* és az *SP7* gén korábban vizsgált polimorfizmusai (*rs2566755*, *rs1430742*, *rs1430742*; *rs2016266*, *rs191240606*) és a BMD értékek, valamint a csonttörési kockázat között. Ez alapján a *GPR 177* és az *SP7* gén nem játszik szerepet a menopauza utáni csontmenyiség kialakításában.

5, Elsőként igazoltuk, hogy az *ADO2* génjét hordozó, azt örökítő személyben, nem változnak sem a csont ásványanyag-tartalom, sem az *ADO2*-re jellemző laboratóriumi értékek a TRAP és CK-BB.

6, Igazoltuk, hogy minden előzetes várakozással szemben, Magyarországon hét éves időszakban a csonttrikulálás talaján kialakult csonttörések száma nem nőtt, de jelentősen, 46 %-al csökkent. Az évi 88 290 törésszám 47 747-re, ezen belül a csípőtáji törések száma 37,5 %-al, 17 992-ről 11 242-re csökkent. Igazoltuk, hogy a három éven át megfelelően kezelt betegek (MPR>80%) 23 %-al kevesebb törést - köztük 55 %-al kevesebb csípőtáji törést - szenvednek el, és 38 %-al ritkábban kerülnek kórházba, azokhoz képest, akiket nem kezeltek hatékonyan (MPR<20%).

7, Vizsgálatunkban korra, nemre és lakhelyre reprezentatív populáción igazoltuk, hogy tél legvégén a D-vitamin értékek minden korábban mértnél alacsonyabbak. A D-vitamin értékek - sem a 25OHD, sem a szabadhormon értékek - nem követik a normál eloszlást. A népesség 94%-ának t-25OHD értéke nem érte el ekkor Magyarországon a normál tartomány alsó határának elfogadott 75 nmol/l-t, 71 % 50 nmol/l-t és 30% pedig 30 nmol/l alatt volt. Vizsgálati eredményeink felvetik annak lehetőségét, hogy nőkben a hasonló t-25OHD érték mellett mért alacsonyabb f-25OHD szintek miatt a D-vitamin-hiány súlyosabb klinikai következményekkel járhat, mint férfiakban. Vizsgálatunkban nem találtunk összefüggést a kor, a nem, a lakhely, a munka típusa, a szabadban töltött idő és a t-25OHD értékek között. Csak a D-vitamin-pótlásnak, a rendszeres szoláriumozásnak és a meleg éghajlatra történő utazásnak volt hatása a tél végi t-25OHD értékekre. A nagyobb BMI érték kisebb DBP-vel társult és nem befolyásolta az f-25OHD értékeket. Ez alapján kérdéses a nagyobb BMI mellett mért kisebb t-25OHD biológiai jelentősége. A t-25OHD és f-25OHD értékek csak a kardiovaszkuláris kockázattal mutattak összefüggést.

8, Prospektív, randomizált, kontrollált, multicentrikus vizsgálattal elsőként igazoltuk, hogy a napi 1000 NE-nek megfelelő D₃-vitamin naponta, vagy hetente, vagy havonta egyszer történő adásának (napi 1000 NE, havi 7000 NE vagy havi 30 000 NE) 25OHD szérumszint emelő hatása és a kezelés biztonságossága azonos.

9, A FIO kezelésében elsőként általunk alkalmazott plazmaferezis 6 hónap alatt jelentősen csökkentette a beteg panaszait és mérsékelte a csontbiokémiai markereket, párhuzamosan az M-komponens szérumszintjének csökkenésével.

10, Elsőként igazoltuk, hogy von Gierke betegségben májátültetést követően, az azt megelőzően extrém alacsony IGF-1 érték normalizálódásával párhuzamosan a növekedés is megindul. Ez a növekedés, ebben az életkorban korábban soha nem tapasztalt mértékű volt, 23 éves kortól indulóan, 32 cm négy és fél év alatt. Igazoltuk továbbá, hogy von Gierke betegségben májátültetést követően, gyógyszeres kezelés nélkül, kalcium és D-vitamin-pótlás mellett a BMD rendeződik.

6. Közlemények

A dolgozat alapját képező eredeti közlemények

Econs MJ, Koller DL, Considine EL, Takacs I, Christian JC, Conneally PM, Peacock M, Johnston CC, Foroud T. Bone Mineral Density and laboratory evaluation of a type II autosomal dominant osteopetrosis carrier. *Journal of Bone & Mineral Research*. 1998;S 271
IF: Kongresszusi abstract

Bajnok E, Takacs I, Vargha P, Speer G, Nagy Z, Lakatos P. Lack of association between interleukin-1 receptor antagonist protein gene polymorphism and bone mineral density in Hungarian postmenopausal women. *Bone*. 2000;27:559-562
IF: 3,998

Takacs I, Koller DL, Peacock M, Christian JC, Evans WE, Hui SL, Conneally PM, Johnston CC, Jr., Foroud T, Econs MJ. Sib pair linkage and association studies between bone mineral density and the interleukin-6 gene locus. *Bone*. 2000;27:169-173
IF: 3,998

Takacs I, Koller DL, Peacock M, Christian JC, Hui SL, Conneally PM, Johnston CC, Jr., Foroud T, Econs MJ. Sibling pair linkage and association studies between bone mineral density and the insulin-like growth factor I gene locus. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1999;84:4467-4471
IF: 5,805

Takacs I, Speer G, Bajnok E, Tabak A, Nagy Z, Horvath C, Kovacs K, Lakatos P. Lack of association between calcium-sensing receptor gene "A986S" polymorphism and bone mineral density in Hungarian postmenopausal women. *Bone*. 2002;30:849-852
IF: 3,755

Takacs I, Lazary A, Kosa JP, Kiss J, Balla B, Nagy Z, Bacsi K, Speer G, Lakatos P. Allelic variations of RANKL/OPG signaling system are related to bone mineral density and in vivo gene expression. *European journal of endocrinology*. 2010;162:423-431
IF: 3,482

Horvath P, Balla B, Kosa JP, Tobias B, Szili B, Kirschner G, Gyori G, Kato K, Lakatos P, Takacs I. Strong effect of SNP rs4988300 of the LRP5 gene on bone phenotype of Caucasian postmenopausal women. *Journal of bone and mineral metabolism.* 2016;34:79-85
IF: 2,460

Takacs I, Cooper H, Weaver DD, Econs MJ. Bone mineral density and laboratory evaluation of a type II autosomal dominant osteopetrosis carrier. *American journal of medical genetics.* 1999;85:9-12
IF: 2,479

Lakatos P, Toth E, Szekeres L, Poor G, Hejj G, Marton I, Takacs I. Comparative statistical analysis of osteoporosis treatment based on Hungarian claims data and interpretation of the results in respect to cost-effectiveness. *Osteoporosis international.* 2014;25:2077-2087
IF: 4,179

Lakatos P, Takacs I, Marton I, Toth E, Zoltan C, Lang Z, Psachoulia E, Intorcica M. A Retrospective Longitudinal Database Study of Persistence and Compliance with Treatment of Osteoporosis in Hungary. *Calcified tissue international.* 2016;98:215-225
IF: 3,272

Lakatos P, Tóth E, Nagy B, Szekeres L, Takacs I. Adherencia a magyar posztmenopauzális osteoporotikus női betegek körében. *LAM KID.* 2012;2:5-17
IF: 0

Szabo B, Tabak AG, Toldy E, Szekeres L, Szili B, Bakos B, Balla B, Kosa JP, Lakatos P, Takacs I. The role of serum total and free 25-hydroxyvitamin D and PTH values in defining vitamin D status at the end of winter: a representative survey. *Journal of bone and mineral metabolism.* 2015; DOI 10.1007/s00774-015-0729-4
IF: 2,460

Takacs I, Benko I, Toldy E, Wikonkál N, Szekeres L, Bodolay E, Kiss E, Szabó B, Valkusz Z, Kovács T, Szabó A, Bittner N, Várбірó S, Sziller I, Császár A, Kiss R, Lakatos P. Hungarian Consensus about the vitamin D effects on prevention and treatment of diseases. *Magyar Orvos.* 2014;Suppl 2014/1
IF: 0

Takacs I, Tóth E B, Szekeres I, Szabó B, Bence B, Lakatos P. Randomized clinical trial to comparing efficacy of daily, weekly and monthly administration of vitamin D₃. *Endocrine Practice*. Under review

Balla B, Tobias B, Kosa JP, Podani J, Horvath P, Nagy Z, Horanyi J, Jaray B, Szekely E, Krenacs L, Arvai K, Dank M, Putz Z, Szabo B, Szili B, Valkusz Z, Vasas B, Gyori G, Lakatos P, Takacs I. Vitamin D-neutralizing CYP24A1 expression, oncogenic mutation states and histological findings of human papillary thyroid cancer. *Journal of endocrinological investigation*. 2015;38:313-321

IF: 1,448

Bakos B, Lukats A, Lakatos P, Gyori G, Tremmel A, Takacs I. Report on a case of fibrogenesis imperfecta ossium and a possible new treatment option. *Osteoporosis international*. 2014;25:1643-1646

IF: 4,169

Szili B, Gorog D, Gerlei Z, Gyori G, Lakatos P, Takacs I. Rapid height growth after liver transplantation in adulthood. *Growth hormone & IGF research*. 2016;29:1-3

IF: 1,407

Az értekezésben szereplő közlemények összesített impaktfaktora 42,912.

Scientometriai adatok

Takács István tudományos és oktatási munkásságának összefoglalása
MTA V. Orvostudományi Osztály (2016.08.10.)

Tudományos és oktatási közlemények	Száma		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Folyóiratcikkek²	94	---	---	---
szakcikk, összefoglaló nemzetközi folyóiratban	---	44	710	771
szakcikk, összefoglaló, hazai idegen nyelvű	---	1	0	0
szakcikk, összefoglaló, magyar nyelvű	---	47	35	40
rövid közlemény	---	2	13	15
II. Könyv	4	---	---	---
a) Szakkönyv, kézikönyv	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
Felsőoktatási tankönyv	---	0	0	0
b) Szakkönyv, tankönyv szerkesztőként	4	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	---	---
magyar nyelvű	---	3	---	---
Felsőoktatási tankönyv	---	1	---	---
III. Könyvrészlet	28	---	---	---
idegen nyelvű	---	1	0	0
magyar nyelvű	---	21	0	0
Felsőoktatási tankönyvrészlet	---	6	0	0
IV. Konferenciaközlemény³	1	---	0	0
Oktatási közlemények összesen (II.-III.)		7	0	0
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)⁴	127	---	758	826
V. További tudományos művek	21	---	---	---
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikket és a nem ismert lektorátságu folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikket is	---	13	6	9
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok	---	2	0	0
Jelentés, guideline	---	6	9	18
VI. Idézett absztraktok⁵	8	---	9	15
Összesített impakt faktor⁴	133,4	---	---	---
Idézettség száma^{1,4}	---	---	782	868
Hirsch index¹	15	---	---	---