
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Studiul polimorfismelor genetice implicate în etiologia, evoluția și complicațiile osteoporozei

Doctorand **Alina Deniza Popa (căs. Ciubean)**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Anca Dana Buzoianu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Aspecte generale în osteoporoză	17
1.1. Definiție	17
1.2. Date epidemiologice	17
1.3. Etiopatogeneză	18
1.4. Aspecte clinice și paraclinice	20
1.4.1. Tablou clinic	20
1.4.2. Tablou paraclinic	21
1.4.3. Diagnostic pozitiv	23
1.4.4. Evaluarea riscului de fractură	24
1.5. Opțiuni terapeutice	24
1.6. Evoluție, prognostic și implicații psiho-sociale	25
2. Rolul factorilor genetici în osteoporoză	27
2.1. Genetica osteoporozei	27
2.2. Aplicații ale farmacogeneticii în osteoporoză	32
2.2.1. Importanța farmacogeneticii	32
2.2.2. Rolul actual al farmacogeneticii în osteoporoză	32
2.2.3. Farmacogenetica și bisfosfonații	33
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	39
2. Metodologie generală	41
3. Studiul 1 - Analiza polimorfismelor genelor <i>FDPS</i>, <i>GGPS1</i>, <i>LRP5</i>, <i>SOST</i>, <i>RANKL</i> și <i>VKORC1</i> în relația lor cu osteoporoza	45
3.1. Introducere	45
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	46
3.3. Material și metodă	47
3.4. Rezultate	48
3.5. Discuții	67
3.6. Concluzii	70
4. Studiul 2 - Rolul polimorfismelor genetice în modularea răspunsului terapeutic la alendronat	71

4.1. Introducere	71
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	72
4.3. Material și metodă	73
4.4. Rezultate	75
4.5. Discuții	83
4.6. Concluzii	85
5. Studiul 3 - Aspecte ale calității vieții la femeile cu osteoporoză și fracturi de fragilitate	87
5.1. Introducere	87
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	88
5.3. Material și metodă	88
5.4. Rezultate	89
5.5. Discuții	95
5.6. Concluzii	98
6. Concluzii generale	101
7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	103
REFERINȚE	105

Cuvinte cheie: osteoporoză, polimorfism genetic, alendronat, calitatea vieții, densitate minerală osoasă

Introducere

Osteoporoza a devenit la sfârșitul secolului XX una din principalele cauze mondiale de morbiditate și mortalitate. În România, prevalența osteoporozei postmenopauză este estimată la 11.5%, ceea ce înseamnă că 1 din 3 femei vor prezenta valori reduse ale densității minerale osoase după vârsta de 55 ani. Cercetarea mea din cadrul tezei de doctorat și-a propus analiza prin metode specifice de genetică moleculară a unui grup de polimorfisme genetice posibil implicate în etiopatogenia osteoporozei postmenopauză. Ținând cont de amploarea studiilor din literatura de specialitate am considerat tema aleasă ca fiind necesară și oportună pentru aprofundarea și validarea cunoștințelor legate de etiopatogenia osteoporozei. Intenția mea a fost de la bun început aceea de a aduce o contribuție, deși relativ mică la nivel global, cunoașterii și înțelegerii diferitelor mecanisme etiopatogenetice posibil implicate în această patologie. Osteoporoza nu este în general privită ca fiind o afecțiune genetică, dar dovezile existente în literatura de specialitate au evidențiat o serie de modificări genetice, dintre care o parte ar putea fi transmise și familial. De asemenea, date științifice noi susțin rolul determinantilor genetici în riscul apariției

osteoporozei și a fracturilor de fragilitate. Identificarea unor markeri genetici cu valoare predictibilă ar putea avea o importanță deosebită în screeningul populațional, prin identificarea indivizilor cu genotipuri mutante. Alături de investigațiile clinice și imagistice prevăzute în protocoalele de screening al osteoporozei, asocierea unui panel de biomarkeri genetici ar crește semnificativ rata identificării femeilor aflate în perioada menopauzală cu risc crescut de a dezvolta osteoporoză și secundar, fracturi de fragilitate. Farmacoterapia în osteoporoză are ca scop principal prevenirea apariției și reaparității fracturilor de fragilitate prin reducerea ratei resorbției osoase, sau stimularea formării osului nou. Tratamentul de primă linie cu agenții farmacologici din clasa amino-bisfosfonaților prezintă uneori efecte terapeutice nesatisfăcătoare, respectiv valorile densității minerale osoase nu se îmbunătățesc, iar complicațiile osteoporozei, respectiv fracturile de fragilitate, survin, uneori repetitiv. Diversitatea genică este probabil răspunsul, motiv pentru care am pornit de la ipoteza că un anumit profil genetic ar putea determina un răspuns nesatisfăcător la amino-bisfosfonați, respectiv la alendronat, care este cel mai utilizat preparat din această clasă farmacologică. Obținerea unor date farmacogenetice de calitate ar putea asista clinicienii în selectarea celui mai eficient medicament disponibil și în proiectarea unei terapii individualizate în funcție de profilul genetic al fiecărui pacient. Osteoporoza ar putea fi prevenită, diagnosticată și tratată înainte de apariția fracturilor de fragilitate, iar o atitudine terapeutică corectă și promptă este de dorit pentru a stopa magnitudinea complicațiilor patologiei. Și nu în ultimul rând, un aspect extrem de important pentru orice patologie cronică este impactul acesteia asupra calității vieții individului. Osteoporoza, din punct de vedere al modificărilor clinice, al fracturilor de fragilitate și al urmărilor acestora, poate modifica semnificativ aspecte ale calității vieții. Ultimul studiu din cercetarea doctorală și-a propus să evalueze aspecte ale calității vieții legate de sănătate la femei cu osteoporoză cu sau fără fracturi de fragilitate. Cercetarea de față este prima de acest tip din România, iar datele epidemiologice obținute privind frecvența și distribuția unor variante alelice și genotipuri în populația de femei aflate la menopauză, ar putea aduce o contribuție, chiar dacă modestă, referitoare la caracteristicile polimorfismelor genetice implicate în etiopatogenia osteoporozei în țara noastră și implicit pe "harta genetică" a Europei.

Obiectivele lucrării

Osteoporoza este o patologie cronică, cu etiologie multifactorială, iar rolul factorilor genetici în etiologia acestei patologii și modularea răspunsului terapeutic la agenții farmacologici nu este pe deplin elucidată. De asemenea, impactul unei patologii cronice cum este osteoporoza asupra QoL pacienților este semnificativ, și nu trebuie neglijat. Astfel, studiile din cercetarea de față urmează trei direcții și obiective principale:

- evaluarea variantelor genice ale *FPDS* (rs2297480), *GGPS1* (rs10925503), *LRP5* (rs3736228), *SOST* (rs1234612), *RANKL* (rs2277439) și *VKORC1* (rs9934438) ca și posibili factori de risc în etiopatogenia osteoporozei

-
- evaluarea rolului variantelor genice ale *FPDS* (rs2297480), *GGPS1* (rs10925503), *LRP5* (rs3736228), *SOST* (rs1234612), *RANKL* (rs2277439) și *VKORC1* (rs9934438) în modularea răspunsului terapeutic la ALN la femei cu OP, în termeni de valori ale densității minerale osoase și modificările markerilor osoși
 - evaluarea HRQoL la femeile cu OP cu sau fără fracturi de fragilitate folosind două chestionare validate, unul generic și unul specific pentru osteoporoză

Metodologie generală

Lucrarea actuală a fost construită sub forma a două studii de tip caz-control și unul de tip observațional și prospectiv. În cadrul primului și celui de-al treilea studiu am analizat 364 de subiecți distribuiți pe două loturi: 228 de pacienți cu osteoporoză care au alcătuit lotul de studiu și 136 pacienți cu densitate mineral osoasă normală care au reprezentat lotul de control. În cadrul celui de-al doilea studiu, am selectat și analizat 25 de paciente diagnosticate cu osteoporoză, la care medicul curant le-a recomandat ca și tratament alendronat pentru prima dată. Toți pacienții incluși în studiu au fost recrutați din cadrul Secțiilor Clinice Recuperare I și II și a Ambulatoriului Integrat de Recuperare din cadrul Spitalului de Recuperare, Cluj-Napoca, România, în perioada 2016-2018 și au semnat un consimțământ scris și informat vizând studiul, testarea genetică și folosirea datelor obținute. Analizele moleculare s-au realizat în cadrul Disciplinei de Genetică Medicală din cadrul Departamentului de Științe Moleculare nr.3 al UMF "Iuliu Hațieganu", Cluj-Napoca, folosind tehnica Real-Time PCR și sonde TaqMan prefabricate standard, pentru fiecare polimorfism genetic. Analizele biochimice s-au realizat în cadrul Laboratorului Spitalului Județean, Cluj-Napoca, România, prin tehnica ELISA.

Studiul 1

Analiza polimorfismelor genelor *FDPS*, *GGPS1*, *LRP5*, *SOST*, *RANKL* și *VKORC1* în relația lor cu osteoporoză

Introducere. Este un fapt confirmat că osteoporoză este o patologie complexă și multifactorială, a cărei patogeneză se datorează interacțiunii variantelor genetice implicate în metabolismul osos și/sau mineral cu factorii de risc non-scheletici care ar putea influența riscul de cădere (forță musculară, echilibru static și dinamic, acuitate vizuală), precum și influențele stilului de viață și al mediului înconjurător. În ciuda multiplelor studii publicate în ultimele două decenii pe diverse populații etnice, identificarea genei sau a genelor implicate în etiologia osteoporozei și/sau a fracturilor asociate cu aceasta rămâne încă necunoscută. Obiectivul principal al studiului a fost de a evalua relația între densitatea minerală osoasă și riscul de fractură de fragilitate cu polimorfismele genelor *FDPS*, *GGPS1*, *LRP5*, *SOST*, *VKORC1* și *RANKL* la femei din România diagnosticate cu osteoporoză. Obiectivele secundare ale studiului au fost de a aduce informații calitative privind aspecte ale geneticii osteoporozei la o populație de

femei aflate la menopauză din România, și de a aduce un aport, chiar dacă modest, în cadrul cercetărilor existente în domeniu la nivel mondial. De asemenea, este important de menționat faptul că populația din România este extrem de puțin studiată din punct de vedere genetic, iar 5 din cele 6 polimorfisme genetice sunt pentru prima dată determinate pe o populație din țara noastră.

Material și metodă. Studiul de față este analitic, prospectiv, transversal, observațional și caz-control și a inclus un număr de 364 de femei aflate în perioada menopauzală. Datele clinice au fost obținute prin anamneză și din documentele medicale și utilizând algoritmul FRAX®, s-a calculat probabilitatea de fractură la 10 ani la nivelul șoldului sau la alte sedii de elecție. S-a colectat de la fiecare participant la studiu un flacon de 2 ml de sânge periferic pentru testarea genetică, urmat de extracția ADN și genotipare cu teste TaqMan specific fiecărui polimorfism ((*FDPS* rs2297480, *LRP5* rs3736228, *SOST* rs1234612, *VKORC1* rs9934438, *GGPS1* rs10925503, *RANKL* rs2277439).

Rezultate. Genotipul homozigot TT și prezența alelei T al *FDPS* rs2297480 a fost corelat semnificativ la analiza modelului codominant și dominant cu valori reduse ale DMO la nivelul coloanei vertebrale lombare și a șoldului total, dar nu și cu riscul de fractură osteoporotică. Genotipul TT al *FDPS* rs2297480 prezintă un risc crescut de asociere cu fenotipul osteoporozei iar heterozigoții GT prezintă riscul cel mai redus. Genotipul TT al *FDPS* rs2297480 a fost corelat cu un istoric pozitiv de fractură de fragilitate. Heterozigoții CT ai *GGPS1* rs10925503 au prezentat la analiza modelului codominant și recesiv valori semnificativ mai mici ale DMO la nivelul coloanei lombare și a colului femural și un risc crescut de a dezvolta o fractură osteoporotică majoră și de șold. Cel mai scăzut risc de asociere cu osteoporoza l-a prezentat genotipul TT al *GGPS1* rs10925503. Genotipul homozigot CC al *LRP5* rs3736228 a prezentat valori ale densității minerale osoase semnificativ mai scăzute la nivelul colului femural și al șoldului total, dar la analiza modelului dominant, această asociere continuă să atingă semnificație statistică numai la nivelul șoldului total. Cel mai scăzut risc de asociere cu osteoporoza l-au prezentat heterozigoții CT ai *LRP5* rs3736228. Homozigoții CC ai *LRP5* rs3736228 au prezentat un istoric mai încărcat ca număr de fracturi la nivelul corpilor vertebrali. Genotipul TT al *SOST* rs1234612 a prezentat o valori ale densității minerale osoase mai reduse în regiunea coloanei vertebrale lombare, dar nu a atins pragul de semnificație statistică. Homozigoții CC ai *SOST* rs1234612 ai au prezentat cel mai redus risc de osteoporoză, dar cu semnificație statistică la limită. Heterozigoții AG ai *VKORC1* rs9934438 prezintă valori ale densității minerale osoase mai reduse la nivelul coloanei lombare, dar fără semnificație statistică, precum și un istoric mai marcat de fracturi de fragilitate și de fracturi la nivelul corpilor vertebrali. Genotipurile SNP-ului *RANKL* rs2277439 nu s-au asociat semnificativ cu densitatea mineral osoasă sau riscul de fractură. Genotipul homozigot GG al *RANKL* rs2277439 prezintă cel mai ridicat grad de asociere cu fenotipul osteoporozei dar nu a atins semnificație statistică.

Concluzii

1. S-a decelat o asociere puternică între valorile reduse ale densității minerale osoase și prezența fracturilor de fragilitate cu genotipul TT și alela T al *FDPS* rs2297480 și cu genotipul heterozigot CT al *GGPS1* rs10925503

2. S-a evidențiat o asociere la limită a valorilor densității minerale osoase cu genotipul CC al *LRP5* rs3736228 și genotipul TT al *SOST* rs1234612.

3. Nu s-a constatat nici o corelație semnificativă statistic între genotipurile polimorfismelor *VKORC1* rs9934438 și *RANKL* rs2277439 cu densitatea mineral osoasă sau fracturile de fragilitate la femeile din România cu osteoporoză postmenopauză.

Studiul 2

Rolul polimorfismelor genetice în modularea răspunsului terapeutic la alendronat

Introducere. Deoarece este cunoscut faptul că răspunsul unui individ la un agent farmacologic se află sub controlul genelor, profilurile genetice ar putea ajuta clinicienii să prezică răspunsul individual și să prescrie medicamentul și doza potrivită. Răspunsul terapeutic la agenții antiosteoporotici se poate împărți în bun, moderat sau fără efect. În ceea ce privește densitatea mineral osoasă, aproximativ 26-53% dintre pacienți nu răspund satisfăcător la terapia cu amino-bisfosonați. Dintre aceștia, alendronatul este cel mai frecvent utilizat și acționează prin inhibarea farnesil pirofosfat sintetazei la nivelul osteoclastelor. În prezent, există puține studii în legătură cu farmacogenetica OP, în care polimorfismele genelor *VDR*, *ER*, *DKK1*, *LRP5*, *SOST*, *OPG/RANK/RANKL*, *FDPS* sau *GGPS1* au fost cercetate cu privire la influența lor asupra răspunsului terapeutic la ALN. Cu toate acestea, genele sau variantele genice care pot influența răspunsul la ALN nu au fost încă definite cu exactitate, deoarece studiile existente prezintă putere statistică redusă și nu oferă informații din diferitele populații etnice. Prin urmare, obiectivul principal al acestui studiu este de a evalua posibila relație între șase polimorfisme genetice (*FDPS* rs2297480, *LRP5* rs3736228, *SOST* rs1234612, *VKORC1* rs9934438, *GGPS1* rs10925503 și *RANKL* rs2277439) cu răspunsul la ALN în termeni de DMO și BTM la femeile din România cu OP postmenopauză.

Material și metodă. Studiul actual este prospectiv și observațional. Au fost incluse 25 de femei cu diagnostic pozitiv de OP postmenopauză și recomandare de tratament cu alendronat de către medical curant. Pacientele au fost recrutate pe parcursul unei internări pe secțiile de Recuperare, Medicină fizică și Balneologie I și II din cadrul Spitalului Clinic de Recuperare din Cluj-Napoca, sau în urma unei vizite de rutină în ambulatoriul integrat al aceleiași spital. S-a recoltat prin puncție venoasă periferică o eprubetă cu 2 ml sânge, pentru dozarea markerilor osoși, respectiv CTX, ca marker de resorbție osoasă și P1NP, ca marker de formare a osului, la începutul tratamentului cu alendronat și după 12 luni de tratament. S-a recoltat prin puncție venoasă periferică încă o eprubetă cu 2ml sânge pe EDTA, din care s-a extras ADN

genomic și s-a genotipat câte un polimorfism în șase gene candidat la toți pacienții (*FDPS* rs2297480, *LRP5* rs3736228, *SOST* rs1234612, *VKORC1* rs9934438, *GGPS1* rs10925503 și *RANKL* rs2277439).

Rezultate. După 1 an de tratament cu alendronat, valorile densității minerale osoase s-au îmbunătățit la toate sediile șoldului, dar nu și la nivelul coloanei lombare. Riscul de fractură și valorile CTX și P1NP au fost semnificativ mai mici după 1 an de tratament. Heterozigoții CT *FDPS* rs2297480 au prezentat creșteri mai modice ale valorilor densității minerale osoase în regiunea coloanei lombare. Homozigoții CC ai *GGPS1* rs10925503 au prezentat creșteri mai reduse în ceea ce privește densitatea minerală osoasă la nivelul șoldului total. Genotipurile SNP-urilor *LRP5* rs3736228, *SOST* rs1234612, *VKORC1* rs9934438 și *RANKL* rs2277439 nu au prezentat diferențe semnificative în ceea ce privește răspunsul la tratamentul cu alendronat, evaluat prin creșteri procentuale ale densității minerale osoase și scăderi procentuale ale markerilor osoși.

Concluzii

1. Heterozigoții CT *FDPS* rs2297480 au prezentat creșteri mai modice ale valorilor densității minerale osoase în regiunea coloanei lombare sub tratament cu alendronat.

2. Homozigoții CC ai *GGPS1* rs10925503 au prezentat creșteri mai reduse în ceea ce privește densitatea minerală osoasă la nivelul șoldului total după 1 an de tratament cu alendronat.

3. Variantele genice ale *LRP5* rs3736228, *SOST* rs1234612, *VKORC1* rs9934438 și *RANKL* rs2277439 nu au prezentat influență semnificativă asupra răspunsului terapeutic la alendronat.

Studiul 3

Aspecte ale calității vieții la femeile cu osteoporoză și fracturi de fragilitate

Introducere. Osteoporoza, alături de artroză, sarcopenie și fragilitate, este considerată a fi parte din așa-numitul fenotip de “îmbătrânire musculo-scheletală”. Toate aceste entități sunt asociate cu diverse complicații, cum ar fi căderi, fracturi, declin funcțional și mortalitate crescută, care afectează nivelul de independență și calitatea vieții unui individ, ceea ce determină un impact semnificativ pentru sănătatea publică. Scopul studiului a fost de a evalua impactul osteoporozei asupra calității vieții la femeile din România, utilizând un instrument generic și unul specific de. Mai mult, am examinat și impactul prezenței fracturilor de fragilitate (vertebrale, șold, încheietura mâinii și humerus) asupra calității vieții la femeile cu OP, măsurate prin instrumentul specific QUALEFFO-41 și cel generic SF-36.

Material și metodă. Studiul de față este transversal, analitic și a inclus un număr de 364 de femei aflate în perioada menopauzală, dintre care 228 de femei au

fost diagnosticate anterior cu osteoporoză iar de 136 de femei sunt femei aflate la menopauză cu densitate osoasă normală. S-au colectat date clinice prin anamneză și din documentele medicale și s-a calculat probabilitatea de apariție a unei fracturi în următorii 10 ani utilizând algoritmul FRAX®. Toți pacienții incluși în studiu au fost rugați să completeze versiunea română a chestionarului generic SF-36. În plus, femeile diagnosticate cu osteoporoză au fost rugate să completeze și versiunea română a chestionarului QUALEFFO-41.

Rezultate. Femeile cu osteoporoză prezintă o calitate a vieții legată de sănătate mai redusă. Domeniul durerii inclus în SF-36 a evidențiat scoruri mai mari în grupul de osteoporoză cu antecedente de fractură, în timp ce domeniul durerii QUALEFFO-41 nu a arătat nicio diferență între grupuri. Au fost găsite scoruri mai mari QUALEFFO-41 la femeile cu osteoporoză și istoric de fractură în domeniul activităților de agrement/activități sociale. Femeile diagnosticate cu osteoporoză, dar care nu au prezentat o fractură de fragilitate, au prezentat scoruri QUALEFFO-41 mai mici în domeniul funcției mentale.

Concluzii

1. Femeile din România cu osteoporoză prezintă o calitate a vieții legată de sănătate mai redusă decât controalele sănătoase, măsurată prin domeniile instrumentului generic SF-36 și scorul total al instrumentului specific QUALEFFO-41.

2. Domeniul durerii inclus în SF-36 a evidențiat scoruri mai mari în grupul de osteoporoză cu antecedente de fractură, reflectând o mai bună calitate a vieții, în timp ce domeniul durerii QUALEFFO-41 nu a arătat nicio diferență între grupuri.

3. Au fost găsite scoruri mai mari QUALEFFO-41 la femeile cu osteoporoză și fractură în domeniul activităților de agrement/activități sociale, indicând o calitate a vieții mai redusă privind participarea socială decât femeile osteoporotice fără antecedente de fractură.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Consider că teza mea este originală, pornind de la însăși tema de cercetare abordată. În contextul evoluției geneticii moleculare din ultimele două decenii și a implicațiilor acesteia în etiopatogenia afecțiunilor cronice, consider că tema aleasă reprezintă un subiect de actualitate și de interes major, osteoporoza fiind considerată actualmente una dintre afecțiunile care determină un impact individual și social negativ major. Pe de altă parte, chiar dacă în prezent există o preocupare crescută la nivel european cât și mondial pentru identificarea și studierea factorilor de risc genetici în osteoporoză și explicarea mecanismelor care stau la baza etiopatogeniei, evoluției și terapiei specifice, în România nu există date genetice și farmacogenetice relevante. Astfel, evaluarea asocierii unor variante genice individuale cu osteoporoza constituie un subiect de cercetare de interes major, mai ales din perspectiva obținerii unor cunoștințe utile în practica medicală, respectiv privind investigarea și

tratamentul, dar mai ales a identificării populației aflate la risc, pentru implementarea metodelor de profilaxie primară.

Informațiile prezentate în cercetarea mea doctorală reprezintă primele date de acest fel din România, doar unul dintre polimorfismele luate în studiu fiind anterior analizate în asocierie cu densitatea minerală osoasă și osteoporoza, respectiv *VKORC1* rs9934438. Privind celelalte 5 variante genice, acestea au fost pentru prima dată determinate și investigate pe o populație din țara noastră în legătură cu etiopatogenia OP și riscul de fractură.

Rezultatele studiului oferă informații legate de frecvența genotipurilor și a alelelor celor șase polimorfisme investigate, cât și legătura lor cu densitatea minerală osoasă, riscul de fractură osteoporotică și implicațiile lor în modularea răspunsului terapeutic la alendronat.

Teza de față vine ca răspuns la probleme existente astăzi în osteoporoză: informații insuficiente legate de factorii genetici posibil implicați în etiologie, puține date în ceea ce privește mecanismele care stau la baza răspunsului terapeutic la agenții farmacologici și nu în ultimul rând perspectiva elaborării unor protocoale clinice și paraclinice care să îmbunătățească prognosticul și să scadă morbiditatea asociată acestei afecțiuni.

PhD Thesis - ABSTRACT

Study of genetic polymorphisms involved in the etiopathogenesis, evolution and complications of osteoporosis

PhD candidate **Alina Deniza Popa (căs. Ciubean)**

PhD Advisor Prof.dr. **Anca Dana Buzoianu**



UMF

UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	13
ACTUAL STATE OF KNOWLEDGE	
1. General concepts in osteoporosis	17
1.1. Definition	17
1.2. Epidemiology	17
1.3. Etiopathogenesis	18
1.4. Clinical and paraclinical aspects	20
1.4.1. Clinical presentation	20
1.4.2. Paraclinical presentation	21
1.4.3. Positive diagnosis	23
1.4.4. Evaluation of fracture risk	24
1.5. Therapeutic options	24
1.6. Evolution, prognosis and psychosocial aspects	25
2. Role of genetic factors in osteoporosis	27
2.1. Genetics of osteoporosis	27
2.2. Pharmacogenetics in osteoporosis	32
2.2.1. The importance of pharmacogenetics	32
2.2.2. The actual role of pharmacogenetics in osteoporosis	32
2.2.3. Pharmacogenetics and bisphosphonates	33
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Background/objectives	39
2. General methodology	41
3. Study 1 - Analysis of the relation between genetic polymorphisms in <i>FDPS</i>, <i>GGPS1</i>, <i>LRP5</i>, <i>SOST</i>, <i>RANKL</i> and <i>VKORC1</i> genes with osteoporosis	45
3.1. Introduction	45
3.2. Background/objectives	46
3.3. Material and method	47
3.4. Results	48
3.5. Discussion	67
3.6. Conclusions	70
4. Study 2 - The role of genetic polymorphisms in the modulation	71

of treatment response to alendronate

4.1. Introduction	71
4.2. Background/objectives	72
4.3. Material and method	73
4.4. Results	75
4.5. Discussion	83
4.6. Conclusions	85
5. Study 3 – Quality of life in patients with osteoporosis and fragility fractures	87
5.1. Introduction	87
5.2. Background/objectives	88
5.3. Material and method	88
5.4. Results	89
5.5. Discussion	95
5.6. Conclusions	98
6. General conclusions	101
7. Originality and innovative contributions of the thesis	103
REFERENCES	105

Keywords: osteoporosis, genetic polymorphism, alendronate, quality of life, bone mineral density

Introduction

Osteoporosis has become at the end of the 20th century one of the main causes of morbidity and mortality. In Romania, the prevalence of post-menopausal osteoporosis is estimated at 11.5%, which means that 1 in 3 women will have low bone mineral density values after the age of 55 years. My research within the doctoral thesis aimed to analyze through specific molecular genetic methods a group of genetic polymorphisms possibly involved in the etiopathogenesis of postmenopausal osteoporosis. Considering the numerous studies in the specialized literature, I considered the chosen topic as necessary and opportune for deepening and validating the knowledge related to the etiopathogenesis of osteoporosis. My intention was from the start to make a contribution, although relatively globally small, to the knowledge and understanding of the different etiopathogenetic mechanisms possibly involved in this pathology. Osteoporosis is not generally viewed as a genetic condition, but the evidence in the literature has revealed a number of genetic mutations, some of which could be transmitted and family. Also, new scientific data support the role of genetic

determinants in the risk of osteoporosis and fragility fractures. Identifying the genetic markers with predictable value could be of particular importance in population screening, by identifying individuals with mutant genotypes. In addition to the clinical and imaging investigations provided in the osteoporosis screening protocols, the combination of a panel of genetic biomarkers would significantly increase the rate of identification of menopausal women at increased risk of developing osteoporosis and, secondarily, fragility fractures. Pharmacotherapy in osteoporosis is primarily aimed at preventing the occurrence and recurrence of fragility fractures by reducing the rate of bone resorption, or by stimulating the formation of new bone. First-line treatment with pharmacological agents from the amino bisphosphonate class sometimes has unsatisfactory therapeutic effects, respectively the values of bone mineral density do not improve, and the complications of osteoporosis, respectively fragility fractures, occur, sometimes repetitively. Gene diversity is probably the answer, which is why I started from the hypothesis that a certain genetic profile might cause an unsatisfactory response to amino-bisphosphonates, respectively alendronate, which is the most widely used from this pharmacological class. Obtaining pharmacogenetic data of good quality could assist clinicians in selecting the most effective drug available and in designing an individualized therapy according to the genetic profile of each patient. Osteoporosis could be prevented, diagnosed and treated prior to the occurrence of fragility fractures, and a correct and prompt therapeutic attitude is desirable to stop the magnitude of the complications of the pathology. And last but not least, an extremely important aspect for any chronic pathology is its impact on the quality of life of the individual. Osteoporosis, from the point of view of its clinical presentation, fragility fractures and their consequences, can significantly alter aspects of quality of life. The latest study from my doctoral research aimed to evaluate aspects of the quality of life related to health in women with osteoporosis with or without fragility fractures. The present research is the first of its kind from Romania, and the epidemiological data obtained regarding the frequency and distribution of allelic variants and genotypes in the population of menopausal women, could make a contribution, even if modest, regarding the characteristics of the genetic polymorphisms involved in the etiopathogeny of osteoporosis in our country, and implicitly, on the "genetic map" of Europe.

Objectives of the thesis

Osteoporosis is a chronic pathology, with multifactorial etiology, and the role of genetic factors in its etiology and the modulation of the therapeutic response to pharmacological agents is not fully elucidated. Also, the impact of a chronic pathology such as osteoporosis on patients' quality of life is significant, and should not be neglected. Thus, the studies in the present research follow three main directions and objectives:

-
- Evaluation of genetic variants of *FPDS* (rs2297480), *GGPS1* (rs10925503), *LRP5* (rs3736228), *SOST* (rs1234612), *RANKL* (rs2277439) and *VKORC1* (rs9934438) as possible risk factors for osteoporosis
 - Assessing the role of genetic variants of *FPDS* (rs2297480), *GGPS1* (rs10925503), *LRP5* (rs3736228), *SOST* (rs1234612), *RANKL* (rs2277439) and *VKORC1* (rs9934438) in modulating the therapeutic response to alendronate in women with osteoporosis, based on changes in bone mineral density values and bone turnover markers
 - Health-related quality of life assessment in women with osteoporosis with or without fragility fractures using two validated questionnaires, one generic and one specific for osteoporosis

General methodology

The present work was constructed in the form of two case-control studies and one of observational and prospective type. In the first and third studies, I analyzed 364 subjects divided into two groups: 228 patients with osteoporosis who made up the study group and 136 patients with normal bone mineral density who represented the control group. In the second study, we selected and analyzed 25 patients diagnosed with osteoporosis, whom the current doctor recommended treatment with alendronate for the first time. All patients included in the study were recruited from the inpatient Department of Rehabilitation I and II and from the Integrated Rehabilitation outpatient clinic within the Clinical Rehabilitation Hospital, Cluj-Napoca, Romania, between 2016-2018. All patients signed a written and informed consent regarding the study, genetic testing and use of the data obtained.

Molecular analyzes were performed within the Department of Medical Genetics, Department of Molecular Sciences no.3 of the UMF "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca, using the Real-Time PCR technique and standard prefabricated TaqMan probes, for each genetic polymorphism. The biochemical analyzes were performed in the County Hospital Laboratory from Cluj-Napoca, Romania, using the ELISA technique.

Study 1

Analysis of the relation between genetic polymorphisms in *FDPS*, *GGPS1*, *LRP5*, *SOST*, *RANKL* and *VKORC1* genes with osteoporosis

Introduction. It is a known fact that osteoporosis is a complex and multifactorial pathology, the pathogenesis of which is due to the interaction of the genetic variants involved in bone and/or mineral metabolism with non-skeletal risk factors that could influence the risk of falling (muscle strength, static and dynamic balance, visual acuity), as well as the influences of lifestyle and environment. Despite multiple studies published in the last two decades on different ethnic populations, the

identification of the gene or genes involved in the etiology of osteoporosis and/or the fractures associated with it remains unknown.

The main objective of the study was to evaluate the relationship between bone mineral density and the risk of fragility fracture with *FDPS*, *GGPS1*, *LRP5*, *SOST*, *VKORC1* and *RANKL* genetic polymorphisms in Romanian women diagnosed with osteoporosis.

The secondary objectives of the study were to bring qualitative information on aspects of genetics of osteoporosis to a population of menopausal women in Romania, and to contribute, albeit modestly, to the existing research in the field worldwide. Also, it is important to mention that the population in Romania is extremely understudied from a genetic point of view, and 5 of the 6 genetic polymorphisms are for the first determined on a population in our country.

Material and method. The present study is analytical, prospective, transversal, observational and case-control and included a number of 364 menopausal women. Clinical data were obtained by medical history and from medical documents and the 10 year probability of fracture in the hip or at other election sites was calculated. A 2 ml vial of peripheral blood for genetic testing was collected from each study participant, followed by DNA extraction and TaqMan assay genotyping specific to each polymorphism ((*FDPS* rs2297480, *LRP5* rs3736228, *SOST* rs1234612, *VKORC1* rs99504s, rs9934438, rs9934438 rs2277439).

Results.

The homozygous TT genotype and the presence of the T allele of *FDPS* rs2297480 were significantly correlated within the analysis of the co-dominant and dominant model with reduced bone mineral density values in the lumbar spine and total hip, but not with the risk of osteoporotic fracture. The TT genotype of *FDPS* rs2297480 has an increased risk of association with the osteoporosis phenotype and GT heterozygotes have the lowest risk. The TT genotype of *FDPS* rs2297480 was correlated with a positive history of fragility fracture. CT heterozygotes of *GGPS1* rs10925503 showed significantly lower bone mineral density values in the lumbar spine and femoral neck at the analysis of the co-dominant and recessive model and an increased risk of developing a major osteoporotic fracture or hip fracture. The lowest risk of association with osteoporosis was presented by the TT genotype of *GGPS1* rs10925503. The CC homozygous genotype of *LRP5* rs3736228 showed significantly lower bone mineral density values in the femoral neck and total hip, but in the analysis of the dominant model, this association continues to reach statistical significance only in the total hip. The lowest risk of association with osteoporosis was presented by CT heterozygotes of *LRP5* rs3736228. The CC homozygotes of *LRP5* rs3736228 showed a more important history of fractures in the vertebral bodies. The TT genotype of *SOST* rs1234612 showed lower bone mineral density values in the lumbar spine region, but did not reach the statistical significance threshold. The homozygous CC of *SOST* rs1234612 presented the lowest risk of osteoporosis, but with statistical significance at the limit. The heterozygotes AG of *VKORC1* rs9934438 showed lower bone mineral density values in the lumbar spine, but without statistical significance, as well as a

more marked history of fragility fractures and fractures in the vertebral bodies. RANKL rs2277439 SNP genotypes were not significantly associated with bone mineral density or fracture risk. The GG homozygous genotype of RANKL rs2277439 has the highest degree of association with the osteoporosis phenotype but it did not reach statistical significance.

Conclusions

1. There was a strong association between low values of bone mineral density and the presence of fragility fractures with the TT genotype and T allele of FDPS rs2297480 and with the heterozygous CT genotype of GGPS1 rs10925503

2. A boundary association of bone mineral density values with the CC genotype of LRP5 rs3736228 and the TT genotype of SOST rs1234612 was shown.

3. There was no statistically significant correlation between the genotypes of the VKORC1 rs9934438 and RANKL rs2277439 with bone mineral density or fragility fractures in women in Romania with postmenopausal osteoporosis.

Study 2

The role of genetic polymorphisms in the modulation of treatment response to alendronate

Introduction. Because it is known fact that an individual's response to a pharmacological agent is under the control of the genes, genetic profiling could help clinicians predict the individual response and prescribe the appropriate drug and dose. The therapeutic response to antiosteoporotic agents can be divided into good, moderate or no effect. Regarding bone mineral density, approximately 26-53% of patients do not respond satisfactorily to amino-bisphosphonate therapy. Of these, alendronate is the most commonly used and acts by inhibiting farnesyl pyrophosphate synthetase in osteoclasts. Currently, there are few studies regarding pharmacogenetics of osteoporosis, in which polymorphisms of VDR, ER, DKK1, LRP5, SOST, OPG / RANK / RANKL, FDPS or GGPS1 genes have been investigated regarding their influence on the therapeutic response to alendronate. However, the genes or gene variants that may influence the response to alendronate have not yet been precisely defined, because the existing studies have low statistical power and do not provide information from different ethnic populations. Therefore, the main objective of this study is to evaluate the possible influence of six genetic polymorphisms (FDPS rs2297480, LRP5 rs3736228, SOST rs1234612, VKORC1 rs9934438, GGPS1 rs10925503 and RANKL rs2277439) in alendronate treatment in terms of bone mineral density and bone turnover markers in Romanian women with postmenopausal osteoporosis.

Material and method. The current study is prospective and observational. It included 25 women with a positive diagnosis of postmenopausal osteoporosis and a recommendation for treatment with alendronate by the attending physician. Patients were recruited during an admission to the Rehabilitation Departments I and II of the Cluj-Napoca Clinical Rehabilitation Hospital, or following a routine visit to the

hospital's integrated ambulatory. A tube with 2 ml of blood was collected by peripheral venous puncture, for dosing of bone markers, respectively CTX, as a marker of bone resorption and P1NP, as a marker of bone formation, at the beginning of treatment with ALN and after 12 months of treatment. A further 2 ml blood sample was collected by peripheral venous puncture on EDTA, from which genomic DNA was extracted and a polymorphism was genotyped in six candidate genes for all patients (FDPS rs2297480, LRP5 rs3736228, SOST rs1234612, VKORC1 rs9934438 and RANKL rs2277439).

Results. After 1 year of treatment with alendronate, bone mineral density values improved at all hip locations, but not at the lumbar spine. Fracture risk and CTX and P1NP values were significantly lower after 1 year of treatment. Heterozygous CT FDPS rs2297480 showed more modest increases in bone mineral density values in the lumbar spine region. CC homozygotes of GGPS1 rs10925503 showed lower increases in bone mineral density in the total hip. Genotypes of LRP5 rs3736228, SOST rs1234612, VKORC1 rs9934438 and RANKL rs2277439 showed no significant differences in response to alendronate treatment, evaluated by percentage increases in bone mineral density and percentage decreases of bone turnover markers.

Conclusions

1. CT heterozygous of FDPS rs2297480 showed more modest increases in bone mineral density values in the lumbar spine region under alendronate treatment.
2. CC homozygotes of GGPS1 rs10925503 showed lower increases in bone mineral density in total hip region after 1 year of treatment with alendronate.
3. Genetic variants of LRP5 rs3736228, SOST rs1234612, VKORC1 rs9934438 and RANKL rs2277439 did not show significant influence on the therapeutic response to alendronate.

Study 3.

Quality of life in patients with osteoporosis and fragility fractures

Introduction. Osteoporosis, together with osteoarthritis, sarcopenia and fragility, is considered to be part of the so-called "musculoskeletal aging" phenotype. All of these entities are associated with various complications, such as falls, fractures, functional decline and increased mortality, which affect an individual's level of independence and quality of life, which causes a significant impact on public health. The aim of the study was to evaluate the impact of osteoporosis on the quality of life in women in Romania, using a generic and a specific instrument. Moreover, we examined the impact of the presence of fragility fractures (vertebral, hip, wrist and humerus) on the quality of life in women with osteoporosis, measured by the specific instrument QUALEFFO-41 and the generic SF-36.

Material and method.

The present study is cross-sectional, analytical and included a number of 364 menopausal women, of whom 228 were previously diagnosed with osteoporosis and 136 women are menopausal women with normal bone mineral density. Clinical data were collected by medical history and from medical documents and the probability of a fracture occurring over the next 10 years was calculated using the FRAX® algorithm. All patients included in the study were asked to complete the Romanian version of the generic SF-36 questionnaire. In addition, women diagnosed with osteoporosis were also asked to complete the Romanian version of the QUALEFFO-41 questionnaire.

Results. Women with osteoporosis have a lower quality of life. The pain domain included in the SF-36 showed higher scores in the osteoporosis group with a history of fracture, while the pain field included in QUALEFFO-41 showed no difference between the groups. Higher QUALEFFO-41 scores were found in women with osteoporosis and a history of fracture in the field of leisure/social activities. Women diagnosed with osteoporosis, but who did not had a fragility fracture, had lower QUALEFFO-41 scores in the area of mental function.

Conclusions

1. Romanian women with osteoporosis have a lower health-related quality of life related than healthy controls, as measured by the domains of the generic instrument SF-36 and the total score of the specific instrument QUALEFFO-41.

2. The pain domain included in the SF-36 showed higher scores in the osteoporosis group with a history of fracture, reflecting a better quality of life, while the pain field QUALEFFO-41 showed no difference between the groups.

3. Higher QUALEFFO-41 scores were found in women with osteoporosis and a positive history of fracture in the field of leisure/social activities, indicating a lower quality of life regarding social participation than osteoporotic women without a history of fracture.

Originality and innovative contributions of the thesis

I consider my thesis to be original, starting from the very topic of the research addressed. In the context of the evolution of molecular genetics in the last two decades and its implications in the etiopathogeny of chronic diseases, I consider that the chosen topic is of major interest, as osteoporosis is currently considered one of the conditions that determine a major negative individual and social impact. On the other hand, even though there is an increased concern at a European and worldwide level for identifying and studying genetic risk factors in osteoporosis and explaining the mechanisms underlying its etiopathogenesis, evolution and specific therapy, in Romania there is no relevant genetic and pharmacogenetic data. Thus, the evaluation of the association of individual gene variants with OP is a research topic of major interest, especially from the perspective of obtaining useful knowledge in medical practice, respectively regarding investigation and treatment, but especially of identifying the population at risk, for the implementation of the methods of primary prophylaxis.

The information presented in my doctoral research represents the first data of this kind in Romania, only one of the polymorphisms studied in the study was previously analyzed in association with bone mineral density and osteoporosis, respectively VKORC1 rs9934438. Looking at the other 5 gene variants, these were for the first time determined and investigated in a population of our country in relation to the etiopathogenesis of OP and the risk of fracture.

The results of the study provide information regarding the frequency of genotypes and alleles of the six investigated polymorphisms, as well as their connection with bone mineral density, the risk of osteoporotic fracture and their implications in modulating the therapeutic response to alendronate.

The present thesis comes in response to problems existing in osteoporosis today: insufficient information regarding the genetic factors possibly involved in its etiology, scarce data regarding the mechanisms underlying the therapeutic response to pharmacological agents and last but not least the prospect of developing clinical protocols that improve the prognosis and decrease the morbidity associated with this condition.