

Piotr Janusz

**Polimorfizmy genów receptorów estrogenowych u
chorych z postacią progresywną i nieprogresywną
skoliozy idiopatycznej**

Rozprawa doktorska

z Katedry i Kliniki Ortopedii i Traumatologii Dziecięcej

Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Kierownik: prof. dr hab. Andrzej Szulc

Promotor pracy: prof. dr hab. Tomasz Kotwicki

Poznań 2014

Panu prof. dr hab. Tomaszowi Kotwickiemu
składam serdeczne podziękowania za
umożliwienie pracy nad ciekawym zagad-
nieniem, wsparcie, cierpliwość i poświęco-
ny czas.

Pani dr hab. Małgorzacie Kotwickiej, profesor UM składam serdeczne podziękowania za wsparcie i umożliwienie realizacji pracy w Katedrze i Zakładzie Biologii Komórki.

Ukochanej żonie składam serdeczne podziękowania za ogromną cierpliwość, życzliwość i wsparcie.

Wykaz skrótów i terminów użytych w pracy

Wykaz skrótów

AIS	młodzieńcza skolioza idiopatyczna
BMD	gęstość mineralna kości
BMI	indeks masy ciała
CNV	zmienność liczby kopii
CSL	centralna linia krzyżowa
DNA	kwask deoksyrybonukleinowy
EDTA	kwask etylenodiaminotetraoctowy
EOIS	skolioza idiopatyczna o wczesnym początku
ESR1	receptor estrogenowy typu pierwszego
<i>ESR1</i>	gen receptora estrogenowego typu pierwszego
ESR2	receptor estrogenowy typu drugiego
<i>ESR2</i>	gen receptora estrogenowego typu drugiego
FIS	rodzinna skolioza idiopatyczna
GH	hormon wzrostu
IGF I	insulinopodobny czynnik wzrostu I
IL-6	interleukina 6
KRT	kąt rotacji tułowia
OR	iloraz szans
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy
PS	progresja skrzywienia
RFLP	polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych
SI	skolioza idiopatyczna
SNP	polimorfizm pojedynczego nukleotydu
SRS	Towarzystwo Badań nad Skoliozą
TPS	tempo progresji skoliozy
VNTR	zmienność liczby powtórzeń tandemowych

Wykaz terminów

polimorfizm <i>XbaI</i>	polimorfizm miejsca rozpoznawanego przez enzym restrykcyjny <i>XbaI</i>
polimorfizm <i>PvuII</i>	polimorfizm miejsca rozpoznawanego przez enzym restrykcyjny <i>PvuII</i>
polimorfizm <i>BstI</i>	polimorfizm miejsca rozpoznawanego przez enzym restrykcyjny <i>BstI</i>
polimorfizm <i>AlwNI</i>	polimorfizm miejsca rozpoznawanego przez enzym restrykcyjny <i>AlwNI</i>
polimorfizm <i>AluI</i>	polimorfizm miejsca rozpoznawanego przez enzym restrykcyjny <i>AluI</i>
polimorfizm <i>RsaI</i>	polimorfizm miejsca rozpoznawanego przez enzym restrykcyjny <i>RsaI</i>

Spis treści

1. Wstęp	1
1.1. Podłoże genetyczne chorób	1
1.1.1. Organizacja genomu	1
1.1.2. Rodzaje chorób uwarunkowanych genetycznie	2
1.1.3. Rodzaje badań genetycznych	3
1.2. Skolioza idiopatyczna	5
1.2.1. Definicja	5
1.2.2. Występowanie	5
1.2.3. Progresywność	5
1.2.4. Skolioza idiopatyczna jako choroba uwarunkowana genetycznie	7
1.2.4.1. Zarys ogólny	7
1.2.4.2. Badanie genu kandydującego	8
1.2.4.3. Geny receptorów estrogenowych w skoliozie idiopatycznej	11
1.2.4.4. Badania rodzinne całego genomu	12
1.2.4.5. Badania asocjacji w obrębie całego genomu (GWAS)	13
1.3. Estrogeny i receptory estrogenowe	14
1.3.1. Wpływ estrogenów na tkanki	14
1.3.2. Występowanie receptorów estrogenowych	15
2. Założenia i cele pracy	16
2.1. Założenia pracy	16
2.2. Cele pracy	16
2.2.1. Ogólne cele pracy	16
2.2.2. Szczegółowe cele pracy	16
3. Materiał	17
3.1. Kryteria kwalifikacji do badań	17
3.1.1. Kryteria włączenia do grupy badanej	17
3.1.2. Kryteria wyłączenia dla grupy badanej	18
3.1.3. Kryteria włączenia do grupy kontrolnej	19
3.1.4. Kryteria wyłączenia dla grupy kontrolnej	19
3.2. Podział pacjentów ze skoliozą na podgrupy	20
3.2.1. Wyodrębnienie trzech podgrup	20
3.2.2. Kryteria podziału badanych chorych na podgrupy	20

3.2.2.1. Kryteria włączenia do podgrupy chorych ze skoliozą idiopatyczną nieprogresywną	21
3.2.2.2. Kryteria włączenia do podgrupy chorych ze skoliozą idiopatyczną wolno progresującą	21
3.2.2.3. Kryteria włączenia do podgrupy chorych ze skoliozą idiopatyczną szybko progresującą	21
3.3. Zgoda na badanie	21
3.4. Finansowanie badań	22
3.5. Dotychczasowe publikacje	22
4. Metodyka	23
4.1. Badanie kliniczne	23
4.2. Badanie radiologiczne	25
4.3. Badanie genetyczne	28
4.3.1. Planowanie badania	28
4.3.1.1. Wybór genu kandydującego	28
4.3.1.2. Wybór polimorfizmów	28
4.3.1.2.1. Polimorfizmy w obrębie genu <i>ESR1</i>	29
4.3.1.2.2. Polimorfizmy w obrębie genu <i>ESR2</i>	31
4.3.2. Oszacowanie oczekiwanej liczebności grupy badanej i kontrolnej	32
4.3.3. Przygotowanie materiału do badania genetycznego	33
4.3.3.1. Pobranie krwi	33
4.3.3.2. Izolacja DNA	33
4.3.4. Amplifikacja wybranych fragmentów DNA	34
4.3.4.1. Startery zaprojektowane do badania	35
4.3.4.1.1. Startery do sekwencji DNA w obrębie genu <i>ESR1</i>	35
4.3.4.1.2. Startery do sekwencji DNA w obrębie genu <i>ESR2</i>	35
4.3.4.2. Łącuchowa reakcja polimerazy PCR	36
4.3.4.3. Ocena i oczyszczenie produktów PCR	37
4.3.5. Reakcja polimorfizmów długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP)	37
4.3.5.1. Wybór enzymów restrykcyjnych	37
4.3.5.1.1. Enzymy restrykcyjne w obrębie genu <i>ESR1</i>	38
4.3.5.1.2. Enzymy restrykcyjne w obrębie genu <i>ESR2</i>	38
4.3.5.2. Reakcja restrykcji enzymatycznej	39
4.3.5.3. Odczytywanie wyników badania metodą polimorfizmów długości fragmentów restrykcyjnych	40

4.3.5.4. Potwierdzenie wyników badania metodą RFLP sekwencjonowaniem	41
4.4. Sposób analizy wyników	41
4.4.1. Analiza wyników badania klinicznego	41
4.4.2. Analiza wyników badania radiologicznego	41
4.4.3. Analiza wyników badania genetycznego	42
4.4.3.1. Porównanie otrzymanych wyników u pacjentów ze skoliozą idiopatyczną z wynikami grupy kontrolnej	42
4.4.3.2. Porównanie otrzymanych wyników pacjentów ze skoliozą idiopatyczną w podgrupach wyodrębnionych w zależności od tempa progresji skrzywienia	42
4.4.3.3. Porównanie otrzymanych wyników pacjentów ze skoliozą idiopatyczną w podgrupach wyodrębnionych ze względu na zbliżoną postać kliniczną skoliozy	42
4.4.3.3.1. Podział ze względu na wartość kąta Cobba na trzy podgrupy	43
4.4.3.3.2. Podział ze względu na wartość kąta Cobba na dwie podgrupy	43
4.4.3.3.3. Podział ze względu na zastosowane leczenie	43
4.4.3.3.4. Podział ze względu na stopień wiotkości tkanki łącznej	43
4.4.3.4. Porównanie wartości wybranych parametrów klinicznych i radiologicznych dla poszczególnych genotypów	44
4.4.3.5. Analiza mocy testów statystycznych	44
4.4.3.6. Porównanie częstości występowania alleli w grupie kontrolnej z danymi populacyjnymi	44
4.5. Metody statystyczne	44
4.6. Udział własny doktoranta w badaniu	45
5. Wyniki	47
5.1. Wyniki badań klinicznych	47
5.1.1. Charakterystyka grupy badanej i kontrolnej	47
5.1.2. Charakterystyka chorych ze skoliozą idiopatyczną (grupa badana)	47
5.1.3. Charakterystyka chorych ze skoliozą w obrębie podgrup	48
5.2. Wyniki badań radiologicznych	48
5.2.1. Ocena radiologiczna chorych ze skoliozą idiopatyczną (grupa badana)	48
5.2.2. Ocena radiologiczna chorych ze skoliozą w obrębie podgrup	49
5.3. Wyniki badań genetycznych	50
5.3.1. Porównanie wyników grupy badanej i kontrolnej	50
5.3.1.1. Rozkład alleli w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR1</i> w	50

grupie badanej i grupie kontrolnej	
5.3.1.2. Rozkład alleli w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR2</i> w grupie badanej i grupie kontrolnej	50
5.3.1.3. Częstość występowania genotypów – zasada równowagi Hardy'ego-Weinberga	51
5.3.1.4. Rozkład genotypów w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR1</i> w grupie badanej i grupie kontrolnej	51
5.3.1.5. Rozkład genotypów w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR2</i> w grupie badanej i grupie kontrolnej	51
5.3.2. Wyniki w podgrupach pacjentów ze skoliozą idiopatyczną podzielonych w zależności od tempa progresji skrzywienia	52
5.3.2.1. Rozkład alleli w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR1</i>	52
5.3.2.2. Rozkład alleli w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR2</i>	53
5.3.2.3. Częstość występowania genotypów – zasada równowagi Hardy'ego-Weinberga	53
5.3.2.4. Rozkład genotypów w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR1</i>	53
5.3.2.5. Rozkład genotypów w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR2</i>	54
5.3.3. Wyniki w podgrupach pacjentów ze skoliozą idiopatyczną podzielonych ze względu na wartość kąta Cobb'a na skoliozy ze skrzywieniem poniżej 30°, pomiędzy 30° i 50° oraz 50° i więcej	55
5.3.3.1. Rozkład alleli w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR1</i>	55
5.3.3.2. Rozkład alleli w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR2</i>	55
5.3.3.3. Częstość występowania genotypów – zasada równowagi Hardy'ego-Weinberga	56
5.3.3.4. Rozkład genotypów w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR1</i>	56
5.3.3.5. Rozkład genotypów w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR2</i>	57
5.3.4. Wyniki w podgrupach pacjentów ze skoliozą idiopatyczną podzielonych ze względu na wartość kąta Cobb'a na skoliozy poniżej 40° oraz 40° i więcej	59
5.3.4.1. Rozkład alleli w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR1</i>	59
5.3.4.2. Rozkład alleli w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR2</i>	59
5.3.4.3. Częstość występowania genotypów – zasada równowagi Hardy'ego-Weinberga	60
5.3.4.4. Rozkład genotypów w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR1</i>	60

5.3.4.5. Rozkład genotypów w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR2</i>	60
5.3.5. Wyniki analizy polimorfizmów pomiędzy podgrupami pacjentów leczonych zachowawczo lub operacyjnie	61
5.3.5.1. Rozkład alleli w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR1</i>	61
5.3.5.2. Rozkład alleli w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR2</i>	62
5.3.5.3. Częstość występowania genotypów – zasada równowagi Hardy'ego-Weinberga	62
5.3.5.4. Rozkład genotypów w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR1</i>	62
5.3.5.5. Rozkład genotypów w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR2</i>	63
5.3.6. Wyniki analizy polimorfizmów pomiędzy podgrupami pacjentów bez wiotkości stawów i z wiotkością stawów wg skali Beightona	64
5.3.6.1. Rozkład alleli w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR1</i>	64
5.3.6.2. Rozkład alleli w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR2</i>	64
5.3.6.3. Częstość występowania genotypów – zasada równowagi Hardy'ego-Weinberga	65
5.3.6.4. Rozkład genotypów w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR1</i>	65
5.3.6.5. Rozkład genotypów w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR2</i>	65
5.3.7. Wyniki badania genetycznego ze względu na cechy fenotypowe skolioz idiopatycznych	66
5.3.7.1. Wyniki badania genetycznego ze względu na cechy fenotypowe skolioz idiopatycznych w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR1</i>	66
5.3.7.1.1. Wyniki badania genetycznego ze względu na cechy kliniczne w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR1</i>	66
5.3.7.1.2. Wyniki badania genetycznego ze względu na parametry radiologiczne w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR1</i>	67
5.3.7.2. Wyniki badania genetycznego ze względu na cechy fenotypowe skolioz idiopatycznych w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR2</i>	67
5.3.7.2.1. Wyniki badania genetycznego ze względu na cechy kliniczne w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR2</i>	67
5.3.7.2.2. Wyniki badania genetycznego ze względu na parametry radiologiczne w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR2</i>	67
5.4. Ocena mocy testów	71
5.4.1. Ocena otrzymanej mocy testu χ^2 w analizie częstości występowania alleli w grupie badanej i grupie kontrolnej	71

5.4.2. Ocena otrzymanej mocy testu χ^2 w analizie częstości występowania alleli	71
5.4.3. Ocena otrzymanej mocy testu dokładnego Fishera w analizie częstości występowania genotypów	72
5.5. Ocena częstości alleli w grupie kontrolnej	72
6. Omówienie wyników i dyskusja	73
6.1. Omówienie kryteriów włączenia	73
6.2. Omówienie wyników badania klinicznego i radiologicznego	74
6.3. Omówienie wyników w obrębie poszczególnych polimorfizmów	75
6.3.1. Polimorfizm <i>XbaI</i> (rs9340799)	75
6.3.2. Polimorfizm <i>PvuII</i> (rs2234693)	76
6.3.3. Polimorfizm <i>BspI</i> (rs7757956)	79
6.3.4. Polimorfizm <i>AlwNI</i> (rs1256120)	80
6.3.5. Polimorfizm <i>AluI</i> (rs4986938)	82
6.3.6. Polimorfizm <i>RasI</i> (rs1256049)	83
6.4. Omówienie otrzymanych mocy testów statystycznych	84
6.5. Kliniczne znaczenie badań genetycznych nad skoliozą idiopatyczną	85
6.6. Podsumowanie	85
7. Wnioski	87
8. Streszczenie	88
9. Abstract	92
10. Piśmiennictwo	96
11. Spis rycin	106
12. Spis tabel	107
Załącznik 1 – Zgoda Komisji Bioetycznej	111
Załącznik 2 – Uchwała Komisji Bioetycznej – rozszerzenie składu zespołu badawczego	112
Załącznik 3 – Informacja dla pacjenta	113
Załącznik 4 – Formularz świadomej zgody	114
Załącznik 5 – Karta badania	115

1. Wstęp

1.1. Podłoże genetyczne chorób

1.1.1. Organizacja genomu

Informacja genetyczna zapisana jest w łańcuchu DNA w postaci sekwencji nukleotydów, podstawowych elementów struktury DNA, składających się z deoksyrybozy, reszty kwasu fosforowego i zasady azotowej (adeniny, guaniny, tyminy lub cytozyny). Materiał genetyczny człowieka zlokalizowany jest głównie w jądrze komórkowym (DNA występuje również w mitochondriach) [1]. Dwie nici DNA tworzą strukturę podwójnej helisy, w której zasady skierowane do wewnątrz łączą się poprzez wiązania wodorowe w komplementarne pary (A:T oraz G:C) [1]. Ludzki genom składa się z około 3 100 000 000 par zasad [2]. Zawiera około 20 687 genów kodujących białka, 18 441 genów kodujących wyłącznie RNA oraz 11 224 pseudogenów [3], co stanowi około 3% materiału genetycznego. Geny najczęściej składają się z części kodujących kolejność aminokwasów (eksony), części niekodujących informacji (introny) oraz elementów flankujących głównie o znaczeniu regulującym 5'UTR i 3'UTR [4].

Zestaw posiadanych genów osobnika jest niezmienny w ciągu życia (wyłączając nowe mutacje) i stanowi genotyp, a cechy, które się u osobnika ujawniły stanowią fenotyp [5]. Pomimo iż w 99,9% DNA ludzi jest takie same, pozostała część stanowi zmienność genetyczną różnicującą jednostki między sobą. Jest ona wynikiem utrwalonych mutacji i rekombinacji. Z powodu takich różnic te same geny mogą występować w różnych postaciach, nazwanych allelami. Osoby, u których występują dwie takie same kopie każdego genu określa się jako homozygoty, a osoby posiadające w swoim genomie dwa różne allele tego samego genu jako heterozygoty [6]. Do mechanizmów wpływających na częstość występowania alleli w genomie należą: mutacje, dryf genetyczny, rekombinacje, migracje, mieszanie różnych populacji, preferencja wybranej cechy w doborze naturalnym oraz celowa selekcja populacji pod względem wybranej cechy [7].

Najczęstszym mechanizmem powstania zmienności genetycznej są mutacje, które można podzielić na mutacje zmiany długości i mutacje punktowe [8]. Wśród mutacji zmiany długości DNA wyróżnia się delecje, duplikacje, insercje i amplifikacje powtórzeń trójnukleotydowych [8]. Wśród mutacji punktowych wyróżnia się tranzycje oraz transwersje [8, 9].

Następstwem mutacji na poziomie pojedynczego nukleotydu może być:

- mutacje zmiany sensu – zmieniające kodon określonego aminokwasu i prowadzące do jego zamiany (substytucji) na inny,
- mutacje nonsensowne – prowadzą do zbyt wczesnego powstawania kodonu terminacyjnego, kończącego translację,
- zmiany ramki odczytu – powstające w wyniku insercji lub delecji jednej lub kilku par zasad,
- mutacje promotora – mogą wpływać na transkrypcję genu,
- mutacje miejsc splicingowych – zmieniają sekwencje sygnałne splicingu znajdujące się na końcach 3' i 5' eksonów oraz w niekodujących częściach genomu. Prowadzą one do powstawania nowych miejsc splicingowych [6].

Najczęstszą odmienność genetyczną DNA stanowią polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNP). Stanowią około 90% całego zróżnicowania [9]. Szacuje się, że mogą występować raz na 300 par zasad, a w całym genomie opisane zostało ponad 17 000 000 SNP [4,9]. Częstość występowania SNP powiązana jest z badaną populacją, w literaturze opisano wiele alleli występujących tylko w wybranej populacji [10].

Polimorfizmy położone niedaleko od siebie na jednym chromosomie są często dziedziczone wspólnie. Wzory współdziedziczenia grup polimorfizmów są charakterystyczne dla populacji oraz, w szczególnych przypadkach, dla pacjentów z chorobami genetycznymi [11]. Grupę takich alleli znajdujących się na tym samym chromosomie i dziedziczonych wspólnie nazywamy haplotypem [11]. Tworzą one stałe bloki, które mogą być rozpatrywane jako jeden fragment, co oznacza, że identyfikacja typowych dla haplotypu polimorfizmów pozwala określić jego wszystkie polimorfizmy w obrębie badanego haplotypu.

1.1.2. Rodzaje chorób uwarunkowanych genetycznie

Chorobami uwarunkowanymi genetycznie nazywa się zespół objawów spowodowanych zmianami w DNA [12].

Opisywane są cztery podstawowe rodzaje uwarunkowania genetycznego chorób [6]:

- 1) Aberracje chromosomowe – zmiany w liczbie bądź strukturze chromosomów. Ta grupa schorzeń obejmuje powstające w wyniku złamań, delecje, insercje, duplikacje i rearanżacje poszczególnych segmentów chromosomu [13].
- 2) Choroby jednogenowe – spowodowane mutacjami pojedynczych genów [14].

Zależności pomiędzy allelami (określane również sposobem dziedziczenia) mogą mieć charakter dominujący – w przypadku, gdy cecha bądź choroba ujawnia się u heterozygot lub recesywny – w przypadku, gdy cecha bądź choroba ujawnia się u homozygot, a heterozygoty są zdrowymi nosicielami [5].

Istnieją sytuacje utrudniające identyfikację konkretnego genu i sposobu dziedziczenia:

- stopień penetracji genu,
 - zmienna ekspresja genów,
 - epigenetyka,
 - kodominacja,
 - dziedziczenie pośrednie,
 - choroby autosomalne determinowane przez płęć [5].
- 3) Choroby mitochondrialne – spowodowane mutacjami w genomie mitochondrialnym, przekazywane wyłącznie przez matkę bez względu na płęć dziecka [15].
- 4) Choroby uwarunkowane wielogenowo – choroby, które są wynikiem zarówno predyspozycji genetycznych jak i czynników środowiskowych [16]. W chorobach wielogenowych relacja genotyp-fenotyp jest znacznie słabsza, a czynnik genetyczny odpowiada jedynie za predyspozycję do występienia choroby [17]. Ujawniają się one na pewnym etapie rozwoju lub w wieku dorosłym [18]. Stopień wpływu podłoża genetycznego na badaną cechę można ocenić dzięki badaniom na bliźniętach jedno i dwujajowych [19, 20]. Wśród chorób dziedziczonych wielogenowo najczęstsze to nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, wrodzone wady serca, schizofrenia, choroby alergiczne i reumatoidalne zapalenie stawów [21]. Wczesne wykrycie tego typu nieprawidłowości umożliwia wczesne wdrożenie leczenia i właściwą profilaktykę.

1.1.3. Rodzaje badań genetycznych

Badania genetyczne mają na celu identyfikację fragmentu DNA, który jest związany z powstaniem choroby. Badania możemy przeprowadzić w obrębie całego genomu lub wybranego odcinka DNA, najczęściej w obrębie genu kandydującego [22]. Badanie genu kandydującego (ang. *candidate gene* CG) polega na badaniu genu wytypowanego we wcześniejszych badaniach całego genomu (zarówno rodzinnych jak i populacyjnych), przeprowadzonych wcześniej badaniach asocjacyjnych, badaniach na zwierzętach lub na podstawie wybranej teorii etiopatogenetycznej choroby [22].

Badaniu genetycznemu można poddać osoby spokrewnione i niespokrewnione. Badania w obrębie rodzin opierają się o analizę wielu pokoleń rodzin obciążonych badaną chorobą lub ocenę osoby badanej, ojca i matki. Badania te bazują na podobieństwie materiału genetycznego w obrębie rodzin i na zjawisku nierównowagi sprzężeń. Pozwala to na użycie mniejszej liczby markerów genetycznych, najczęściej mikrosatelit, do poszukiwania odcinków DNA związanych z chorobą, które występują w sprzężeniu z markerem, a który przekazywany jest w obrębie rodziny osobom chorym. Natomiast u osób niespokrewnionych przeprowadza się głównie badanie powiązań, czyli asocjacji. Genetyczne badanie asocjacji polega na porównaniu częstości występowania markera genetycznego u osobników z danej populacji, u których występuje lub nie występuje badana cecha (np. choroba), celem oszacowania czy dany marker jest powiązany z badaną cechą [23]. Takim markerem może być polimorfizm jednego nukleotydu (SNP – ang. single nucleotide polymorphism), mogą nimi być większe fragmenty DNA w postaci minisatelit i mikrosatelit, jak również bardziej złożone modyfikacje sekwencji DNA jak inwersje, delecje, zmienności liczby kopii (CNV- z ang. copy number variations) [24].

Wybrany marker genetyczny może być bezpośrednio związany z przyczyną powstania cechy lub choroby, lub może w sposób pośredni wskazywać na chorobę poprzez sprzężenie z czynnikiem wpływającym na daną cechę, który znajduje się w niewielkiej odległości w obrębie tego samego fragmentu DNA. W takim przypadku marker tylko koreluje z wystąpieniem badanej cechy lub choroby [23].

Taką korelację lub nieprzypadkowe powiązanie (wynikające z niewielkiej odległości i wspólnego dziedziczenia) pomiędzy markerami nazywamy nierównowagą sprzężeń (LD – ang. linkage disequilibrium) [23]. Zjawisko LD wykorzystywane jest również przy ocenie haplotypów – grupie alleli znajdujących się na tym samym chromosomie, dziedziczonych wspólnie w określonych blokach [11].

Struktura genów w postaci wzoru bloków haplotypowych na bazie LD obejmuje większość ludzkiego genomu [11]. Badania sprzężeń w obrębie rodzin są bardziej efektywne w przypadku rzadkich chorób z wysoką penetracją i są bardziej typowe dla chorób jednogenowych. Natomiast badania asocjacji wykazują większą przydatność w badaniach nad chorobami wielogenowymi i predyspozycją do nich [25, 16].

1.2. Skolioza idiopatyczna

1.2.1. Definicja

Jako skoliozę idiopatyczną określa się trójwymiarową, rozwojową deformację kręgosłupa o nieznanej etiologii. Na zniekształcenie składają się: skrzywienie boczne w płaszczyźnie czołowej, rotacja w płaszczyźnie poprzecznej oraz zaburzenie naturalnych krzywizn kręgosłupa w płaszczyźnie strzałkowej. Rozpoznanie ustala się na podstawie radiogramów przednio-tylnych wykonanych w pozycji stojącej, na których według SRS (Scoliosis Research Society) kąt Cobba wynosi co najmniej 10° . Do ustalenia rozpoznania niezbędne jest wykluczenie innych przyczyn, które mogłyby stanowić przyczynę powstania skoliozy [26, 27].

1.2.2. Występowanie

Skolioza idiopatyczna jest najczęstszą deformacją kręgosłupa populacji młodzieńczej [28, 29]. Częstość występowania skoliozy idiopatycznej w ocenianej radiologicznie populacji dzieci szkolnych wg Lonsteina wynosi pomiędzy 1,5% a 3% dla skrzywień powyżej 10° [30]. W Polskiej populacji wartość ta wynosi według Tylmana 2-3% [31]. Odsetek dzieci ze skoliozami większymi jest znacznie mniejszy i wynosi odpowiednio dla skolioz powyżej 20° od 0,3% do 0,5%, a w przypadku wartości kąta Cobba powyżej 30° od 0,2% do 0,3% [32].

Opisywana jest różna częstość występowania skolioz idiopatycznych u chłopców i dziewcząt. O ile w skoliozach dziecięcych i wczesnodziecięcych jest on podobny, to w przypadku skolioz młodzieńczych występuje wyraźna przewaga występowania u kobiet i wynosi 3,6 : 1 [33]. Proporcja ta wzrasta wraz ze wzrostem kąta skrzywienia. Kiedy weźmie się pod uwagę skoliozy od 10° , przewaga występowania u kobiet wynosi 1,3 : 1, przy kącie Cobba od 20° wzrasta do 5,4 : 1, a powyżej 30° wynosi 7:1 [30, 33, 34, 35, 36, 37].

1.2.3. Progresywność

Skolioza idiopatyczna jest deformacją rozwojową ściśle związaną z rośnięciem pacjenta. Intensywność wzrostu ma duży wpływ na rozwój i powiększanie się skrzywienia [38]. Powoduje to, iż wielkość skoliozy może w trudny do przewidzenia sposób zwiększać się w czasie. Dynamika tych zmian (narastanie kąta skoliozy w czasie) może być określana jako progresywność skoliozy idiopatycznej i jest indywidualną cechą danego chorego.

Dimeglio wyróżnił skoliozy progresujące podczas fazy szybkiego wzrostu w sposób szybki lub w sposób powolny. Skoliozy progresujące szybko, to skrzywienia, w których kąt Cobba zwiększa się w fazie szybkiego wzrostu o 1° na miesiąc (lub $10^\circ/\text{rok}$). Skoliozy takie mają złe rokowanie; w badaniach Dimeglio 100% pacjentów z tej grupy było operowanych [38]. Skoliozy progresujące wolno to skrzywienia, w których kąt Cobba zwiększa się w fazie szybkiego wzrostu poniżej $0,5^\circ$ na miesiąc (lub poniżej $6^\circ/\text{rok}$). Skoliozy takie mają lepsze rokowanie i w badaniach Dimeglio 33% pacjentów z tej grupy było operowanych [38]. W badaniach tych rokowanie pogarszała duża wielkość kąta Cobba w momencie początku dojrzewania [38].

Zagadnieniem występowania w skoliozie idiopatycznej czynników, które można powiązać z progresją i możliwością ich wykorzystania zajmowali się Lonstein i Carlson, którzy w 1984 roku opracowali współczynnik ryzyka progresji skoliozy wyznaczonej ze wzoru matematycznego, na który składa się kąt Cobba, wartość testu Rissera i wiek kalendarzowy. Na tej podstawie autorzy oceniali ryzyko wystąpienia progresji skoliozy [39]. Obserwacje w tym kierunku prowadzili również Nachemson i wsp. [40, 41], którzy opisali zależność ryzyka progresji zależne od kąta Cobba i wieku, tabela 1.1.

Tabela 1.1. Ryzyko progresji skoliozy idiopatycznej w zależności od wartości kątowej i od wieku według Nachemsona i wsp. [40, 41]

kąt Cobba	10–12 lat	13–15 lat	16 lat
$<19^\circ$	25%	10%	0%
20–29°	60%	40%	10%
30–39°	90%	70%	30%
$>40^\circ$	100%	90%	70%

Jak dowodzą powyższe obserwacje, ryzyko progresji skolioz idiopatycznych zmniejsza się z wiekiem [35]. Potencjał skoliozy idiopatycznej do progresji jest związany z rośnięciem i wyczerpuje się po zakończeniu wzrastania [35, 38].

U osób dojrzałych kostnie skrzywienie może się powiększać na drodze narastających zniekształceń kostnych oraz zapadania się kręgosłupa [35, 42]. Jest to zjawisko obserwowane zwłaszcza w skoliozach z wielkością kątową przekraczającą 50° , mniejsze skoliozy idiopatyczne pozostają często stabilne, zwłaszcza gdy kąt Cobba nie przekroczył 30° [35, 36, 42, 43].

1.2.4. Skolioza idiopatyczna jako choroba uwarunkowana genetycznie

1.2.4.1. Zarys ogólny

Częstsze występowanie skoliozy idiopatycznej w obrębie rodzin, w których już jeden członek rodziny cierpi na tę chorobę, w porównaniu z resztą populacji jest zjawiskiem zauważonym niezależnie przez wielu badaczy. Opisy rodzinnego występowania skoliozy idiopatycznej pochodzą z prac Rutherforda oraz Garlandha z lat trzydziestych ubiegłego stulecia [44, 45].

Pierwszą osobą, która użyła sformułowania „rodzinna skolioza idiopatyczna” była Wynne-Davies w 1968 r. Przeanalizowała ona rodziny 114 pacjentów (w sumie 2000 osób) i ustaliła, że u 27,2% występuje przynajmniej jeden członek rodziny ze skoliozą idiopatyczną [46].

W 1973 r. Riseborough i Wynne-Davies przebadali w populacji bostońskiej 207 pacjentów oraz 2662 członków ich rodzin. Według ich obliczeń ryzyko wystąpienia skoliozy idiopatycznej u krewnych pierwszego stopnia wynosi 11%, u krewnych drugiego 2,4%, a u krewnych trzeciego stopnia 1,4% [47].

W 1977 r. Harrington opisał, iż u 27% córek kobiet ze skoliozą również występowała skolioza powyżej 15° kąta Cobba [48].

Badaniem, które wskazuje na podłoże genetyczne (głównie wielogenowe) i jego interakcje z czynnikami środowiskowymi, jest ocena występowania schorzenia u bliźniąt jedno i dwujajowych [19].

Dane o częstości występowania skoliozy idiopatycznej u bliźniąt różnią się w zależności od przeprowadzonego badania. W literaturze znaleźć można wiele prac opisujących małe grupy badanych bliźniąt. Carr w 1990 r. na małej grupie 6 par bliźniąt opisywał częstość występowania skoliozy idiopatycznej na 66,7% u bliźniąt monozygotycznych i brak współwystępowania u bliźniąt dizygotycznych [49]. Badania na większej grupie na ten temat opublikowali w 1997 r. Kesling i Reinker, którzy oprócz swoich 6 par bliźniąt przeprowadzili metaanalizę danych dostępnych w literaturze. Znaleźli 100 bliźniąt, z których 68 par posiadało wystarczające dane do kwalifikacji do badania. Wynikało z niego, że u bliźniąt jednojajowych choroba występowała u obojga w 73% przypadków, a u dwujajowych w 36% przypadków [50].

Badania populacyjne na ten temat pochodzą z rejestrów bliźniąt prowadzonych w Danii i Szwecji.

Andersen i wsp. w 2007 r. przeprowadzili badanie ankietowe u 4648 bliźniąt duńskich, wśród których zidentyfikowano 220 bliźniąt ze skoliozą, u których w przypadku bliźniąt jednojajowych skolioza idiopatyczna występowała w 13%, a w przypadku dwujajowych w 0% [19].

Podobne badanie u 64 578 szwedzkich bliźniąt przeprowadzili w 2012 r. Grauers i wsp. Na podstawie otrzymanych danych ocenili oni procentowy udział wpływu czynników genetycznych na skoliozę idiopatyczną w wysokości 38%, a czynników środowiskowych na 62%. W przypadku bliźniąt monozygotycznych ryzyko, że u drugiego bliźnięcia wystąpi skolioza, jeżeli jedna osoba ma skrzywienie, wynosiło 15%, a u dizygotycznych 0% [20].

Do końca 2013 roku w bazie Medline opublikowano 62 artykuły związane z badaniami genetycznymi nad skoliozą idiopatyczną. Z tego 9 nie było dostępnych w języku angielskim. Z pozostałych 37 było badaniami nad genami kandydującymi (6 analiz sprzężeń, 31 badań asocjacji) oraz 16 badań całego genomu (14 badań sprzężeń w obrębie rodzin i dwa badania populacyjne asocjacji GWAS).

1.2.4.2. Badanie genów kandydujących

Badaniu genetycznemu poddane zostało wiele genów, co do których istniało przypuszczenie, iż mogą mieć związek ze skoliozą idiopatyczną. Zostały one wybrane z pomiędzy genów, które wykazywały związek ze skoliozą w badaniach na zwierzętach, znajdowały się we fragmentach DNA wykazujących związek ze skoliozą w rodzinnych analizach sprzężeń, były oceniane przez innych naukowców lub wynikały z hipotez etiopatologicznych opartych na obserwacjach klinicznych [22]. W ramach opublikowanych badań nad genem kandydującym przeprowadzono zarówno analizę sprzężeń, jak i analizę asocjacji. Przeprowadzone badania można podzielić ze względu na układ, z którym miały związek badane geny.

Pierwszymi genami, nad którymi rozpoczęto badania, były geny związane z tkanką łączną. Ich wybór był podyktowany faktem, iż w zespołach genetycznych powiązanych z zaburzeniami tkanki łącznej często występują deformacje kręgosłupa w postaci skoliozy, np. w zespole Marfana skolioza występuje u 60% pacjentów [16]. Pierwsze badanie nad związkiem skoliozy idiopatycznej z genami kolagenu I i II opublikował Carr i wsp. w 1992 r. [51]. Przeprowadzili on analizę sprzężeń w obrębie czterech rodzin, jednakże nie znaleźli oni związku skoliozy idiopatycznej z mutacjami w obrębie kolagenu. Miller i wsp. w 1996 r. przedstawili badanie genu fibryliny, elastyny i kolagenu, które przeprowadzili w jedenastu rodzinach. Nie znaleźli związku tych genów ze skoliozą [52].

W badaniach genetycznych przeprowadzonych przez Zorkol'tseva i wsp. w 2002 r. oraz przez Marosy i wsp. w 2006 r. nie stwierdzono związku genu agrekanu (białka przestrzeni międzykomórkowej) ze skoliozą idiopatyczną [53, 54]. Z kolei badania nad genem matryliny (*MATN1*) (białka wchodzącego w skład macierzy chrząstki) przeprowadzone przez Montanaro i wsp. w 2006 r. wykazały istotny związek polimorfizmu tego genu ze skoliozą idiopatyczną [55]. Chen i wsp. w 2009 r. wykazali związek polimorfizmu w obrębie promotora tego genu ze skoliozą idiopatyczną w badaniu asocjacji u 419 pacjentów ze skoliozą idiopatyczną i 750 zdrowych kontroli w populacji chińskiej [56]. Związku tego nie potwierdzili Takahashi i wsp. w 2011 r. w badaniu replikacyjnym u 789 pacjentów ze skoliozą idiopatyczną i u 1239 kontroli w populacji japońskiej [57]. W badaniach nad polimorfizmami genu oksydazy lizylowej (*LOX*), enzymem związanym z modelowaniem struktury kolagenu i elastyny, którego powiązanie ze skoliozą sugerowały badania na zwierzętach, nie wykazano związku ze skoliozą idiopatyczną [58]. Polimorfizm genu enzymu peptydazy dipeptydylowej 9 (*DPP9*), który wytypowano na bazie locus otrzymanego w wyniku badań sprzężeń, nie wykazał powiązania ze skoliozą idiopatyczną [59].

Metaloproteinazy i ich inhibitory mają wpływ na rozpad i przebudowę macierzy tkanki łącznej [22]. Opisany został przez Jiang i wsp. w 2012 r. związek polimorfizmu promotora tkankowego inhibitora metaloproteinazy typu 2 (*TIMP2*) z cięższym przebiegiem skoliozy idiopatycznej piersiowej w chińskiej populacji [60]. Związek ten nie został potwierdzony przez Ogura i wsp. w 2013 r. w populacji japońskiej [61]. Podobnie polimorfizm metaloproteinazy 3 (*MMP3*) został opisany jako posiadający związek z ciężkością przebiegu skoliozy idiopatycznej w populacji włoskiej [62], jednakże związek ten nie został potwierdzony w większym badaniu w populacji chińskiej [63], ani węgierskiej [64]. W przypadku tej ostatniej wykazano związek ze skoliozą idiopatyczną, gdy uwzględniono interakcje z polimorfizmem genu *BMP4* [64].

U pacjentek ze skoliozą idiopatyczną często opisywane jest zjawisko osteopenii [65]. Na tej podstawie badaniu poddane zostały białka związane z metabolizmem tkanki kostnej, wśród nich białko morfogenetyczne kości 4 (*BMP4*), którego polimorfizm w ujęciu pojedynczym nie wykazywał związku ze skoliozą idiopatyczną [64]. Innym badanym białkiem była kalmodulina 1 (*CALM1*), która bierze udział w regulowaniu przemian tkanki kostnej, której poziom w płytkach krwi był podejrzewany o związek z postacią progresywną skoliozy idiopatycznej [66]. Związek polimorfizmów genu kalmoduliny 1 ze skoliozą idiopatyczną został wykazany w trzech pracach dotyczących populacji chiń-

skiej, jednakże wszystkie te badania przeprowadzone zostały na małych grupach [67, 68, 69].

Związek genu interleukiny 6 (*IL6*) ze skoliozą idiopatyczną we włoskiej populacji opisali Aulisa i wsp. w 2007 r. [62]. Podobnego związku nie znaleźli w chińskiej populacji Liu i wsp. [63], ani Morocz i wsp. w populacji węgierskiej [64]. Ta ostatnia grupa wykazała, iż koincydencja polimorfizmu *IL6* i genu leptyny jest związana z występowaniem skoliozy idiopatycznej, podczas gdy występowanie polimorfizmu genu leptyny samoistnie, podobnie jak i *IL6*, nie wykazuje takiego powiązania [64].

Badania nad genem receptora witaminy D wykazały powiązanie z ryzykiem wystąpienia skoliozy idiopatycznej w koreańskiej populacji [70], lecz nie z ryzykiem progresji skoliozy [71].

Znaczącą grupą badanych genów, były geny związane ze szlakiem sygnalizacyjnym melatoniny. Zainteresowanie tymi genami wynikało z badań na modelu zwierzęcym [72]. W badaniach nad receptorem melatoniny 1A nie wykazano związku ze skoliozą idiopatyczną [73, 74, 75]. Natomiast w obrębie receptora melatoniny 1B Qiu i wsp. w 2007 r. w chińskiej populacji opisali związek polimorfizmu w regionie regulatorowym tego genu z występowaniem skoliozy idiopatycznej [76]. Jednakże w kolejnych badaniach nie potwierdzono związku tego genu ze skoliozą idiopatyczną [57, 64, 75, 77].

Hydroksylaza tryptofanu 1 (TPH1) jest enzymem szlaku metabolicznego melatoniny. Związek genu hydroksylazy tryptofanu 1 z predyspozycją do skoliozy idiopatycznej opisał Wang i wsp. w 2008 r. w chińskiej populacji [78], jednakże wynik ten nie został potwierdzony w populacjach japońskiej i amerykańskiej [57, 75]. Przeprowadzono również badania nad innymi genami białek szlaku metabolicznego melatoniny, takimi jak N-acetyltransferaza aralkilaminowa (*AANAT*) [74, 78], receptor GPR50 [77], kinaza proteinowa C (*PKCD*) [75] i metyltransferaza hydroksyindolowa (*HIOMT*) [75].

Następną grupą genów posiadających potencjalny związek ze skoliozą idiopatyczną były geny związane ze wzrostem i dojrzewaniem. W związku z faktem progresji skoliozy w okresie szybkiego rośnięcia gen receptora hormonu wzrostu (*GHR*) został zbadany w kierunku powiązania ze skoliozą idiopatyczną. Qui i wsp. w 2007 r. nie wykazali takiego związku dla polimorfizmów genu *GHR* w chińskiej populacji [79]. Natomiast w przypadku genu insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (*IGF1*) Yeung i wsp. w 2006 r. wykazali powiązanie z wielkością skrzywienia w SI [80]. W kolejnych badaniach wyniki te nie zostały potwierdzone w badaniach na populacji chińskiej i japońskiej [57, 81].

Wśród genów związanych z dojrzewaniem zbadano *CYP17*, gen enzymu związanego z powstawaniem hormonów sterydowych, jednakże nie wykazano jego powiązania ze skoliozą idiopatyczną [71].

1.2.4.3. Geny receptorów estrogenowych w skoliozie idiopatycznej

W obrębie genu receptora estrogenowego 1 (*ESR1*) opublikowane zostały wyniki badań nad związkiem dwóch polimorfizmów *PvuII* (rs2234693) i *XbaI* (rs9340799) ze skoliozą idiopatyczną.

Inoue i wsp. w 2002 r. w badaniu na 304 japońskich kobietach opisali związek polimorfizmu *XbaI* z kątem Cobba, który wynosił odpowiednio dla genotypów XX (GG) 34,9° i Xx (GA) 34,2°, a dla genotypu xx (AA) 29,3° $p=0,002$ [82]. Podobną zależność wykazali w przypadku wyselekcjonowanych skolioz idiopatycznych piersiowych, odpowiednio dla XX (GG) 48,3° i Xx (GA) 38,5°, a dla xx (AA) 33,3° $p=0,036$ oraz skolioz idiopatycznych z podwójnym skrzywieniem XX (GG) 34,2° i Xx (GA) 34,6°, a dla xx (AA) 28,8° $p=0,007$. Inoue i wsp. podali, że u pacjentów leczonych zachowawczo częściej występował genotyp xx (AA) niż w podgrupie pacjentów leczonych operacyjnie, $p < 0,0001$. W ich badaniach progresja skoliozy idiopatycznej, opisana jako zwiększenie skrzywienia o więcej niż 5°, wystąpiła częściej u pacjentów z genotypem Xx (AG) niż xx (AA) i XX (GG) $p=0,027$. Nie znaleźli oni natomiast związku skoliozy idiopatycznej z polimorfizmem *PvuII* [82].

Badania nad polimorfizmami *XbaI* i *PvuII* przeprowadził Wu i wsp. w 2006 r. na chińskiej populacji u 202 pacjentów ze skoliozą i 174 zdrowych kontroli [83]. Wykazali częstsze występowanie genotypu XX (GG) oraz allelu X (G) polimorfizmu *XbaI* u pacjentów ze skoliozą idiopatyczną niż w grupie kontrolnej, odpowiednio $p=0,005$ OR=2.17 i $p=0,001$ OR=1.68. Ponadto stwierdzili częstsze występowanie genotypu XX (GG) u pacjentek z kątem Cobba większym niż 40°, $p=0,001$ i OR=4.3 oraz u pacjentek o wzroście wyższym niż 160cm, $p=0,001$ i OR=2,98 [83]. Wykazali oni częstsze występowanie kombinacji genotypów PpXX u pacjentów niż u kontroli, $p=0,036$ i OR=2,41 oraz rzadsze występowanie kombinacji genotypów ppxx $p=0,038$ i OR=0,56 [83]. Badania na chińskiej populacji przeprowadzili również Zhao i wsp. Przebadali oni 67 pacjentek z podwójnymi skrzywieniami i 100 zdrowych kontroli [67]. Stwierdzili, że polimorfizm *PvuII* był związany z wystąpieniem skrzywienia, kątem Cobba powyżej 40° i z lokalizacją piersiową skrzywienia, odpowiednio $p=0,014$, $p=0,0128$ oraz $p=0,0184$ [67].

Tang i wsp. w 2006 r. przeprowadzili badanie polimorfizmów *XbaI* oraz *PvuII* u 540 chińskich pacjentek z ze skoliozą idiopatyczną i 260 chińskich kontroli, nie wykazując istotnego powiązania badanych polimorfizmów z predyspozycją do skoliozy, ani z wielkością kąta Cobba, ani z odsetkiem progresji [84].

Podobnie w japońskiej populacji Takahashi i wsp. w badaniu 798 pacjentek ze skoliozą idiopatyczną oraz 637 kontroli nie wykazali związku obu polimorfizmów, ani z wystąpieniem skoliozy, ani wielkością kąta Cobba, jednakże w przypadku *XbaI* różnica była bliska istotności statystycznej $p=0,0509$ [85].

Pacjenci leczeni gorsetem, posiadający w swoim genomie allel G lub genotyp AG polimorfizmu *XbaI*, wykazywali większe ryzyko niepowodzenia leczenia (opisanego jako progresja powyżej 5°) niż pacjenci z allelem A i pozostałymi genotypami [86].

W obrębie genu *ESR2* opisany został związek ze skoliozą idiopatyczną jednego polimorfizmu rs1256120 (*A/wNI*). Zhang i wsp. w 2009 r. opublikowali wyniki badania tego polimorfizmu w grupie 218 pacjentek ze skoliozą i 140 badaniach kontrolnych w chińskiej populacji. Wykazali częstsze występowanie genotypu CC i allelu C u pacjentów niż u kontroli, odpowiednio $p=0,004$ oraz $p=0,016$ i OR 2,09. Genotyp CC występował również częściej u pacjentów z kątem Cobba powyżej 30° i u pacjentek wyższych niż 160cm [87]. Takahashi i wsp. nie wykazali podobnych wyników w japońskiej populacji [85]. Xu i wsp. nie wykazali związku tego polimorfizmu z wynikami leczenia gorsetowego [86].

Opisany został również związek polimorfizmu genu błonowego receptora estrogenowego związanego z białkiem G (GPR30) z wielkością kąta Cobba, lecz nie z predyspozycją do skoliozy idiopatycznej [88]. Peng i wsp. przeprowadzili badania na chińskiej populacji u 389 pacjentów i 338 kontroli uzyskując trzy polimorfizmy związane z ciężkością przebiegu skoliozy (rs3808351, rs10269151 i rs426655s3) i p wynoszącym odpowiednio 0,004, 0,048 i 0,028.

1.2.4.4. Badania rodzinne sprzężeń w obrębie całego genomu

Badania rodzinne sprzężeń w obrębie całego genomu mają na celu identyfikację większych fragmentów DNA, w obrębie których znajduje się miejsce mające związek z chorobą. Opublikowano 14 badań nad podłożem genetycznym skolioz idiopatycznych, opisując w ten sposób 25 miejsc wykazujących istotne sprzężenie ze skoliozą idiopatyczną, tabela 1.2.

Tabela 1.2. Zestawienie danych opisanych w literaturze na temat rodzinnej analizy sprzężeń w obrębie całego genomu w rodzinach chorych ze skoliozą idiopatyczną

Locus	Artykuł	Model dziedziczenia	Materiał
3q12.1 5q13.3	Edery i wsp. [89]	AD	1 rodzina
5p13 13q13.3 13q32	Miller i wsp. [90]	BM	7 rodzin
6p 6q 17p 9q 16p	Miller i wsp. [91]	BM, AD	101 rodzin
6q15-q21 10q23-q25.3	Marosy i wsp. [92]	BM	5 rodzin
8q12	Gao i wsp. [93]	BM	53 rodziny
9q31.2-q34.2	Ocaka i wsp. [94]	AD, pen = 0.80	1 rodzina
17q25.3		AD, pen = 0.80	2 rodziny
12p	Raggio i wsp. [95]	AR AD	7 rodzin
17p11	Salehi i wsp. [96]	AD, pen = 1	1 rodzina
17q11.2 17q25.3	Clough i wsp. [97]	BM	17 rodzin
18q12.1-q12.2	Gurnett i wsp. [98]	AD, pen = 0.80	1 rodzina
19p13	Alden i wsp. [99]	AD	72 rodziny
19p13.3	Chan i wsp. [100]	AD, pen = 0.80	7 rodziny
Xq23, Xq22.3-q27.2	Justice i wsp. [101]	XLD	29 rodzin

AD - model dziedziczenia autosomalny dominujący, AR - model dziedziczenia autosomalny recesywny, XLD - model dziedziczenia sprzężony z X dominujący, BM - bez określonego modelu dziedziczenia, pen - penetracja

1.2.4.5. Badania asocjacji w obrębie całego genomu (GWAS)

Dotychczas zostały opublikowane dwa duże badania typu GWAS dotyczące skoliozy idiopatycznej. Sharma i wsp. w 2011 r. przebadali 1 122 osoby (419 rodzin) analizując 327 000 SNP. Otrzymali oni największe powiązanie z polimorfizmami rs1400180 i rs10510181 genu *CHL1*, który znajduje się na chromosomie 3p26.3 [29].

Drugie takie badanie opublikowali Takahashi i wsp. w 2011 r., którzy przeprowadzili GWAS u 1 376 japońskich kobiet ze skoliozą idiopatyczną i u 11 297 kontroli. Za pomocą zestawu 455 121 polimorfizmów wykazali powiązanie skoliozy idiopatycznej z genem *LBX1* znajdującym się na chromosomie 10q24.31. Największe powiązanie wykazały trzy SNP rs11190870, rs625039, rs11598564, a ich OR wahało się w granicach 1,36-1,75 [102].

1.3. Estrogeny i receptory estrogenowe

1.3.1. Wpływ estrogenów na tkanki

Estrogeny należą do grupy hormonów sterydowych. Powstają w przebiegu przemian cholesterolu w jajnikach, łożysku, jądrach i korze nadnerczy. Śladowe ilości tych hormonów powstają również w komórkach Leydiga, w komórkach nerwowych mózgu i tkance tłuszczowej na drodze aromatyzacji androgenów [103].

Estrogeny odpowiadają za rozwój drugorzędowych cech płciowych kobiet, wpływają na cykl płciowy oraz modulują zachowanie seksualne [104].

Estrogeny oddziałują na liczne tkanki i układy:

- wpływają na gospodarkę lipidową podwyższając poziom HDL i obniżając LDL,
- wpływają na krzepliwość zwiększając stężenie czynników II, VII, IX i X, a obniżając stężenie antytrombiny II i fibrynogenu,
- zwiększają wytwarzanie i uwalnianie tlenu azotu i redukują stężenie endoteliny,
- zwiększają przepuszczalność błon komórkowych,
- regulują syntezę tłuszczów, białek oraz zasad purynowych i pirymidynowych,
- są związane z regulacją wzrostu, proliferacją, migracją i apoptozą komórek,
- wpływają na funkcjonowanie mitochondriów [105].

Działanie hormonów estrogenowych dzieli się na genomowe, związane z modulacją transkrypcji genów oraz niegenomowe, polegające głównie na posttranslacyjnej modyfikacji białek sygnałowych [104].

Genomowy mechanizm działania polega na połączeniu estrogenów z receptorem i przeniesienie takiego kompleksu do jądra komórkowego. Aktywowane receptory tworzą dimery (α - α , β - β i α - β) i wiążą się ze swoistym odcinkiem DNA. Najczęściej umiejscowione są one w promotorach genów, jednakże nie wszystkie geny regulowane przez estrogeny zawierają takie sekwencje i modulowanie ich ekspresji może zachodzić poprzez interakcję z innymi czynnikami transkrypcyjnymi. Nie wszystkie mechanizmy oddziaływania hormonów estrogenowych zostały poznane [106].

Niegenomowe oddziaływanie estrogenów odbywa się poprzez receptor błonowy, którego aktywacja prowadzi do regulacji receptorów związanych z białkiem G, cykazy adenylowej, błonowych kanałów jonowych, kinaz tyrozynowych, białkowych kinaz aktywowanych miogienem oraz fosfolipazy C [107]. Estrogeny poprzez receptory błonowe

wpływają na wewnątrzkomórkowe stężenie wapnia oraz potasu, regulując otwieranie kanałów aktywowanych napięciem poprzez fosforylację zależną od cGMP [108].

1.3.2. Występowanie receptorów estrogenowych

Opisywane są dwa rodzaje jądrowych receptorów estrogenowych: typu pierwszego nazywane α (ESR1) oraz typu drugiego nazywane β (ESR2) [108].

ESR1 jest białkiem kodowanym przez gen (*ESR1*) znajdujący się na 6 chromosomie w locus na ramieniu długim q24-q27. Gen zbudowany jest z około 488 300 par zasad, w którym część kodującą stanowi osiem eksonów [109].

ESR2 jest białkiem kodowanym przez gen (*ESR2*) znajdujący się na 14 chromosomie w locus na ramieniu długim q23.2. Gen zbudowany jest z około 121 200 par zasad, w którym część kodującą stanowi dziewięć eksonów [108].

W obu przypadkach istnieje kilka izoform otrzymanego białka, co wynika z różnych możliwości składania nowo powstającego receptora zwanych splicingiem [108].

Receptory estrogenowe są szeroko rozpowszechnione w ciele człowieka. Obie formy mogą występować jednocześnie lub wykazywać częstszą ekspresję jednego z typów receptorów w danej tkance niż drugiego. Receptor estrogenowy 1 występuje częściej w komórkach ziarnistych jajnika, komórkach nabłonkowych i mięśniowych macicy, gruczole piersiowym, najądrzu, kardiomiocytach, aortalnej, komórkach kostnych, zarówno osteoblastach jak i osteoklastach, podwzgórzu, przysadce mózgowej, tkance tłuszczowej i wątrobie [110].

Receptor estrogenowy 2 wykazywany jest częściej w komórkach tekalnych i ziarnistych jajnika, kardiomiocytach, prostaty, płucach i w komórkach hipokampa.

Oba receptory występują w gonadach, nadnerczach, komórkach układu immunologicznego (limfocyty, komórki dendrytyczne śledziony), układzie krwionośnym, najądrzu, tarczycy czy w komórkach mięśni szkieletowych [110].

2. Założenia i cele pracy

2.1. Założenia pracy

Zakłada się, że u chorych ze skoliozą idiopatyczną w obrębie genów receptorów estrogenowych występują polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (SNP). Ponadto zakłada się, że wystąpienie pojedynczego polimorfizmu lub współistnienie kilku określonych polimorfizmów może mieć związek z postacią kliniczną choroby (skrzywienie progresywne lub skrzywienie nieprogresywne).

2.2. Cele pracy

2.2.1. Ogólne cele pracy

Celem pracy jest stwierdzenie czy w obrębie genów receptorów estrogenowych chorych ze skoliozą idiopatyczną występuje genetyczna odmiennność powiązana z postacią kliniczną skoliozy (progresywna lub nieprogresywna). Dalszym celem jest możliwość przewidywania rozwoju skoliozy na wczesnym jej etapie.

2.2.2. Szczegółowe cele pracy

1. Wyodrębnienie grup o odmiennym przebiegu u dzieci ze skoliozą idiopatyczną (szybko progresująca, wolno progresująca lub nieprogresywna) na podstawie badania klinicznego i radiologicznego.
2. Wyznaczenie częstości występowania ocenianych polimorfizmów genów receptorów estrogenowych typu 1 i typu 2 u wszystkich badanych.
3. Określenie różnic genetycznych pomiędzy grupami badanymi i grupą kontrolną.
4. Powiązanie postaci klinicznej skoliozy (szybko progresująca, wolno progresująca lub nieprogresywna) z występowaniem określonych polimorfizmów genów receptorów estrogenowych typu 1 i typu 2.

3. Materiał

Przebadano 144 osoby ze skoliozą idiopatyczną (grupa badana) oraz 48 osób bez skoliozy (grupa kontrolna), które wyraziły zgodę na udział w badaniu i spełniły kryteria kwalifikacji do badania. Badania przeprowadzono w latach 2010 - 2013. Grupa osób ze skoliozami idiopatycznymi rekrutowana była spośród pacjentów leczonych w Klinice Ortopedii i Traumatologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, Pracowni Chorób Kręgosłupa Katedry Ortopedii i Traumatologii Dziecięcej oraz Poradni Rehasport Clinic w Poznaniu. Grupę kontrolną stanowiły pacjentki leczone z innych powodów niż kręgosłup w Poradni Rehasport Clinic w Poznaniu oraz w Klinice Ortopedii i Traumatologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, a także zdrowe osoby, które wyraziły zgodę na udział w badaniu.

Kryteria udziału w badaniach oraz charakterystykę badanych grup przedstawiono poniżej.

3.1. Kryteria kwalifikacji do badań

3.1.1. Kryteria włączenia do grupy badanej

- 1) Świadoma zgoda na udział w badaniu wyrażona na piśmie, po uprzednim zapoznaniu się z informacją o badaniu zawartą w druku pt. „Informacja dla pacjenta” (zał.1). W przypadku osób niepełnoletnich poniżej 16. roku życia wymagana była zgoda rodzica lub opiekuna prawnego, a w przypadku osób powyżej 16. roku życia wymagana była zgoda zarówno osoby niepełnoletniej jak i rodzica lub opiekuna prawnego.
- 2) Płeć żeńska.
- 3) Rozpoznanie skoliozy idiopatycznej w badaniu klinicznym i radiologicznym.
- 4) Skolioza jednołukowa piersiowa prawostronna – typ 1 według klasyfikacji Lenke i wsp. [111] lub skolioza dwułukowa z przewagą skrzywienia piersiowego – typ 3 według klasyfikacji Lenke i wsp. [111].
- 5) Kąt Cobba skrzywienia piersiowego 10° i więcej.
- 6) Obecność rotacji tułowia w badaniu klinicznym (występowanie garbu żebrowego w skłonie) oraz rotacji osiowej kręgów piersiowych w badaniu radiologicznym.
- 7) Ukończone lub bliskie ukończenia wzrastanie kręgosłupa, o czym świadczyły trzy kryteria, które musiały być jednocześnie spełnione:
 - wiek kalendarzowy powyżej 15 lat,
 - co najmniej 2 lata po pierwszej miesiączce,

- wartość testu Rissera wynosząca 4 lub 5.

Kryterium 7 nie zastosowano do podgrupy skolioz o szybkiej progresji, gdyż z uwagi na szybkie pogarszanie się skoliozy pacjenci zostali poddani leczeniu operacyjnemu, zanim można było zastosować przyjęte wyżej kryteria zakończenia rośnięcia kręgosłupa.

3.1.2. Kryteria wyłączenia dla grupy badanej

- 1) Brak zgody na udział w badaniu.
- 2) Płeć męska.
- 3) Przebyte operacje klatki piersiowej i kręgosłupa.
- 4) Rozpoznanie lub podejrzenie innych przyczyn skrzywienia kręgosłupa, takich jak:
 - skoliozy wrodzone,
 - choroby nerwowo-mięśniowe (przepuklina oponowo-rdzeniowa, rdzeniowy zanik mięśni),
 - choroby mięśniowe (artrogrypoza, dystrofie mięśniowe, miotonia),
 - zaburzenia tkanki łącznej (zespół Marfana, zespół Ehlersa-Danlosa),
 - zaburzenia metaboliczne,
 - zaburzenia hormonalne,
 - nerwiakowłókniakowatość,
 - skoliozy pourazowe (złamania),
 - przykurcze tkanek miękkich (blizny, oparzenia),
 - dysplazje kostne,
 - nowotwory,
 - osteogenesis imperfecta,
 - kręgoszczelina,
 - skolioza neurogenna (mózgowe porażenie dziecięce, choroba Charcot-Marie-Tooth, syringomielia, poliomyelitis),
 - skolioza torakogenna,
 - skolioza histeryczna.
- 5) Lokalizacja lędźwiowa w przypadku skrzywień jednołukowych – typ 5 według klasyfikacji Lenke i wsp. [111] lub przewaga skrzywienia lędźwiowego w przypadku skrzywień dwułukowych piersiowych i lędźwiowych – typ 6 według klasyfikacji Lenke i wsp. [111].
- 6) Skolioza piersiowa lewostronna.

- 7) Kąt Cobba poniżej 10°.
- 8) Brak rotacji tułowia w badaniu klinicznym (brak garbu żeberowego w skłonie) oraz brak rotacji osiowej kręgów piersiowych w badaniu radiologicznym.
- 9) Nieukończone wzrastanie kręgosłupa, o czym świadczą:
 - wiek poniżej 15 lat,
 - mniej niż 2 lata po pierwszej miesiączce,
 - wartość testu Rissera wynosząca 0, 1, 2 lub 3.

Dodatni wywiad rodzinny w kierunku skoliozy idiopatycznej nie stanowił kryterium wyłączenia.

3.1.3. Kryteria włączenia do grupy kontrolnej

- 1) Świadoma zgoda na udział w badaniu wyrażona na piśmie, po uprzednim zapoznaniu się z informacją o badaniu zawartą w druku pt. „Informacja dla pacjenta”. W przypadku osób niepełnoletnich poniżej 16. roku życia wymagana była zgoda rodzica lub opiekuna prawnego, a w przypadku osób powyżej 16. roku życia, zgoda zarówno osoby niepełnoletniej jak i rodzica lub opiekuna prawnego.
- 2) Płeć żeńska.
- 3) Ukończone lub bliskie ukończenia wzrastanie kręgosłupa, o czym świadczą:
 - wiek powyżej 15 lat,
 - co najmniej 2 lata po pierwszej miesiączce.
- 4) Kąt rotacji tułowia badany skoliometrem Bunella poniżej 4° na wszystkich poziomach tułowia.
- 5) Ujemny wywiad chorobowy w kierunku deformacji kręgosłupa oraz w kierunku leczenia fizjoterapeutycznego, gorsetowego lub operacyjnego z tego powodu.
- 6) Ujemny wywiad rodzinny w kierunku deformacji kręgosłupa oraz leczenia fizjoterapeutycznego, gorsetowego lub operacyjnego z tego powodu.

3.1.4. Kryteria wyłączenia dla grupy kontrolnej

- 1) Brak zgody na udział w badaniu.
- 2) Płeć męska.
- 3) Przebyte operacje klatki piersiowej i kręgosłupa.
- 4) Nieukończone wzrastanie kręgosłupa, o czym świadczą:
 - wiek poniżej 15 lat,
 - mniej niż 2 lata po pierwszej miesiączce.

- 5) Kąt rotacji tułowia badany skoliometrem Bunella powyżej 3° na dowolnym zbadanym poziomie tułowia.
- 6) Dodatni wywiad chorobowy w kierunku deformacji kręgosłupa lub w kierunku leczenia fizjoterapeutycznego, gorsetowego lub operacyjnego z tego powodu.
- 7) Dodatni wywiad rodzinny w kierunku deformacji kręgosłupa oraz leczenia fizjoterapeutycznego, gorsetowego lub operacyjnego z tego powodu.

3.2. Podział pacjentów ze skoliozą na podgrupy

3.2.1. Wyodrębnienie trzech podgrup

W grupie pacjentek ze skoliozą idiopatyczną wyróżniono podgrupy odpowiadające jednolitym fenotypom o zbliżonym znaczeniu klinicznym. Za najistotniejszą cechę z punktu widzenia klinicznego uznano szybkość progresji skoliozy i z uwagi na nią pacjentki podzielono na trzy podgrupy: skoliozy idiopatyczne nieprogresywne (NP-IS z ang. non progressive idiopathic scoliosis), skoliozy idiopatyczne o powolnej progresji (SP-IS z ang. slowly progressive idiopathic scoliosis) oraz skoliozy idiopatyczne o szybkiej progresji (RP-IS z ang. rapidly progressive idiopathic scoliosis), tabela 3.1.

Tabela 3.1. Podział chorych ze skoliozą idiopatyczną na trzy podgrupy w zależności od tempa progresji skrzywienia: NP-IS, SP-IS, RP-IS

	NP-IS	SP-IS	RP-IS
Wiek	> 15 lat	> 15 lat	ND
Osiągnięta dojrzałość kostna	tak	tak	ND
Rodzaj deformacji	skolioza idiopatyczna	skolioza idiopatyczna	skolioza idiopatyczna
Typ skrzywienia	piersiowe lub dwułukowe z przewagą piersiowego	piersiowe lub dwułukowe z przewagą piersiowego	piersiowe lub dwułukowe z przewagą piersiowego
Kąt Cobba	10°-30°	>30°	>30°
Risser	4 lub 5	4 lub 5	wszystkie stopnie
Tempo progresji w stopniach na miesiąc	ND	<1,0°	>1,0°

NP-IS – skolioza idiopatyczna nieprogresywna, SP-IS – skolioza idiopatyczna o powolnej progresji, RP-IS – skolioza idiopatyczna o szybkiej progresji; ND – nie dotyczy

3.2.2. Kryteria podziału badanych chorych na podgrupy

Każdorazowo spełnione musiały być wszystkie kryteria kwalifikacji do grupy badanej.

3.2.2.1. Kryteria włączenia do podgrupy chorych ze skoliozą idiopatyczną nie-progresywną

- Udokumentowany radiologicznie brak progresji kąta Cobba lub tempo progresji kąta Cobba mniejsze niż 1° na miesiąc obserwowane przez okres co najmniej 6 miesięcy,
- Kąt Cobba poniżej 30° .

3.2.2.2. Kryteria włączenia do podgrupy chorych ze skoliozą idiopatyczną wolno progresującą

- Udokumentowane radiologicznie tempo progresji kąta Cobba mniejsze niż 1° na miesiąc przez okres co najmniej 6 miesięcy,
- Kąt Cobba powyżej 30° .

3.2.2.3. Kryteria włączenia do podgrupy chorych ze skoliozą idiopatyczną szybko progresującą

- Udokumentowane radiologicznie tempo progresji kąta Cobba o 1° lub więcej na miesiąc przez okres co najmniej 6 miesięcy,
- Kąt Cobba powyżej 30° .

3.3. Zgoda na badanie

Na badanie uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu numer 87/09 (załącznik 1). Uchwałą Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu numer 454/11 w skład zespołu badawczego włączono doktoranta (załącznik 2).

Przed przystąpieniem do badań każdy pacjent otrzymał informację na temat prowadzonych badań, opracowaną w postaci karty informacyjnej, zgodnie ze wzorem zatwierdzonym przez Komisję Bioetyczną (załącznik 3). Dodatkowo pacjent oraz jego opiekunowie mieli możliwość zadawania pytań, na które wszelkich wyjaśnień udzielał lekarz badający (doktorant).

Po otrzymaniu pełnych wyjaśnień każdy pacjent podpisał formularz świadomej zgody (załącznik 4). W przypadku osób poniżej 16. roku życia podpis składali rodzice lub opiekunowie prawni. U pacjentów w wieku między 16 a 18 lat wymagany był podpis

zarówno pacjenta jak i rodzica lub opiekuna prawnego. W przypadku osób niepełnoletnich opiekunowie pozostawali przy dziecku w trakcie badania.

Wszystkie zebrane informacje zostały utajnione zgodnie z ustawą z dnia 6 listopada 2008 r. „O prawach pacjenta i Rzeczniku Praw Pacjenta” (Dz. U. z dnia 31 marca 2009 r.).

Materiał biologiczny przechowywany jest w formie zakodowanej w zamrażarkach Zakładu Biologii Komórki Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, w temperaturze -20°C, do momentu zakończenia badania.

3.4. Finansowanie badań

Badania były częścią większego projektu badawczego pt: Badania nad polimorfizmem i ekspresją receptora estrogenowego i genu CHD7 w celu prognozowania rozwoju skoliozy idiopatycznej u dzieci (wykrywanie skolioz zagrożonych progresją). Dofinansowane były z grantu Narodowego Centrum Nauki numer N N403 584038.

3.5. Dotychczasowe publikacje

Na podstawie otrzymanych wyników dotychczas opublikowano pracę pt. „*XbaI* and *PvuII* Polymorphisms of Estrogen Receptor 1 Gene in Females with Idiopathic Scoliosis: No Association with Occurrence or Clinical Form”[112].

4. Metodyka

Badanie składało się z części klinicznej, radiologicznej i genetycznej. Badaniu klinicznemu i genetycznemu zostały poddane wszystkie uczestniczki. Badanie radiologiczne dotyczyło wyłącznie pacjentek ze skoliozą idiopatyczną.

Badania kliniczne i radiologiczne przeprowadzone zostały w Klinice Ortopedii i Traumatologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, Pracowni Chorób Kręgosłupa Katedry Ortopedii i Traumatologii Dziecięcej oraz Poradni Rehasport Clinic w Poznaniu. Badania genetyczne wykonane zostały w Katedrze i Zakładzie Biologii Komórki Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

4.1. Badanie kliniczne

Badanie kliniczne przeprowadzone zostało w oparciu o jednolity formularz (załącznik 5). Składało się ono z badania podmiotowego i przedmiotowego.

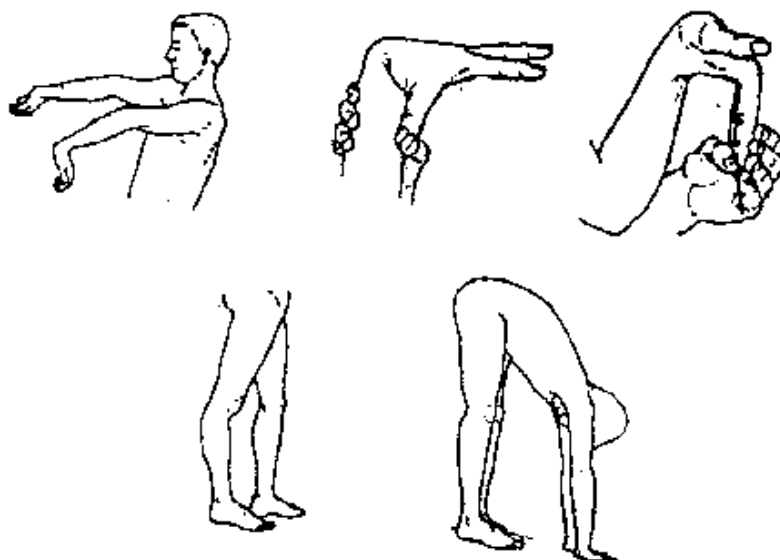
Badanie podmiotowe obejmowało:

- dane personalne,
- datę urodzenia,
- wiek rozpoznania skoliozy,
- wywiad rodzinny w kierunku występowania skoliozy,
- datę pierwszej miesiączki,
- towarzyszące choroby,
- przebyte operacje.

Badanie przedmiotowe obejmowało następujące pomiary:

- wzrost na stojąco – w centymetrach,
- wzrost na siedząco – w centymetrach, w pozycji siedzącej swobodnej, na krześle,
- ciężar ciała w kilogramach,
- nadruchość (wiotkość) stawów oceniana według skali Beightona [113], rycina 4.1.,
- kąt rotacji tułowia (KRT) – mierzony za pomocą skoliometru Bunnella w teście Adamsa na czterech poziomach:
 - piersiowym proksymalnym - na wysokości górnego kąta łopatki
 - piersiowym głównym - na wysokości dolnego kąta łopatki
 - lędźwiowym - na wysokości największego wału lędźwiowego
 - kolców biodrowych tylnych górnych; rycina 4.2., rycina 4.3. [114],

- kompensacja skoliozy - oceniona poprzez pomiar odchylenia pionu rzutowanego z wyrostka kolczystego C7 w stosunku do szpary pośladkowej, pomiar w centymetrach.



Rycina 4.1. Schematyczne przedstawienie testów stosowanych w skali Beightona do oceny hipermobilności (wiotkości) stawów [115].



Rycina 4.2. Schemat sposobu wykonywania pomiaru kąta rotacji tułowia na czterech poziomach.



Rycina 4.3. Sposób przyłożenia skoliometru Bunella do tułowia poprzecznie do osi długiej kręgosłupa, w miejscu największej rotacji tułowia.

4.2. Badanie radiologiczne

U wszystkich pacjentek ze skoliozą idiopatyczną na podstawie radiogramów przednio-tylnych wykonanych w pozycji stojącej, wykorzystywanych w trakcie leczenia ambulatoryjnego lub szpitalnego, zostały wykonane pomiary radiologiczne. Dla celów tej pracy nie zostały wykonane żadne dodatkowe badania radiologiczne. Grupa kontrolna nie miała wykonywanych zdjęć rtg.

Na radiogramach wyznaczone zostały:

- kręgi krańcowe – kręgi określające końce skrzywienia w płaszczyźnie czołowej. Krańcowy krąg proksymalny: krąg w kierunku dogłowym od kręgu szczytowego, którego górna powierzchnia jest maksymalnie pochylona w stronę wklęsłości skrzywienia. Krańcowy krąg dystalny: krąg w kierunku doogonowym od kręgu szczytowego, którego dolna powierzchnia jest maksymalnie pochylona w stronę wklęsłości skrzywienia [116], rycina 4.4.,
- centralna linia krzyżowa (CSL – ang. central sacra line) – pionowa linia, prostopadła do podłoża, wykreślona przez środek kości krzyżowej na radiogramach przednio-tylnych [116], rycina 4.4.,
- krąg szczytowy – krąg najbardziej wysunięty bocznie od centralnej linii krzyżowej [116], rycina 4.4.,
- kąt Cobba – kąt zawarty pomiędzy prostymi wykreślonymi wzdłuż górnej powierzchni górnego kręgu krańcowego i dolnej powierzchni dolnego kręgu krańcowego danego łuku skrzywienia [26], rycina 4.4.,
- wskaźnik Rissera – test umożliwiający ocenę stopnia dojrzałości kostnej kręgosłupa i jego potencjału wzrostu na podstawie rozwoju jądra kostnienia chrząstki grzebienia biodrowego, na radiogramie przednio-tylnym. Brak jądra kostnienia oznacza stopień testu Rissera 0, a całkowite połączenie jądra kostnienia z talerzem biodrowym stopień testu Rissera 5. Wartości od 1 do 4 stanowią kolejne fazy liniowego pojawiania się jądra kostnienia [117], rycina 4.5.,
- klasyfikacja skoliozy według Lenke [111] – podział oparty na liczbie i lokalizacji skrzywień i ich korektywności oraz ocenie kifozy piersiowej.

Na podstawie danych otrzymanych z kolejnych radiogramów wykonanych w trakcie leczenia pacjentek wyznaczone zostały:

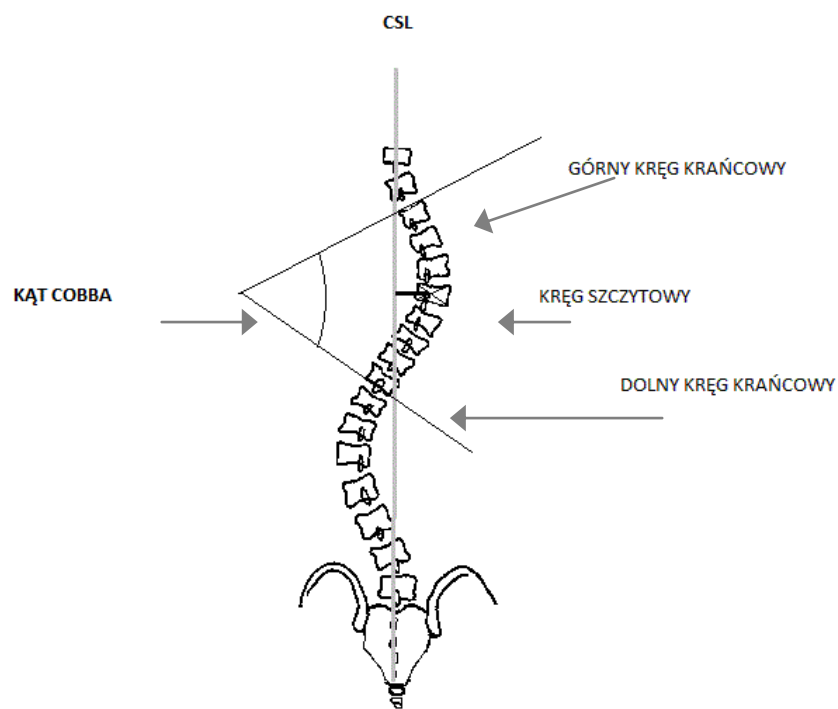
- kąt Cobba początkowy (Cobb pocz) – wartość kąta Cobba zmierzona na pierwszym wykonanym radiogramie,
- kąt Cobba maksymalny (Cobb max) – największa wartość kąta Cobba odnotowana u danej osoby w trakcie leczenia,
- kąt Cobba ostateczny (Cobb ost) – wartość kąta Cobba obliczona na radiogramie wykonanym w momencie zakończenia leczenia, tj. w momencie osiągnięcia dojrzałości kostnej lub leczenia operacyjnego,
- progresja skrzywienia (PS) – różnica pomiędzy kątem Cobba maksymalnym a początkowym wyrażona w stopniach,

$$PS = Cobb\ max - Cobb\ pocz$$

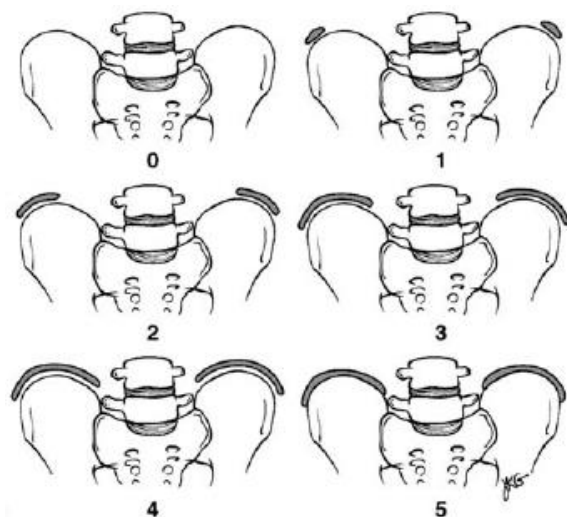
- tempo progresji skoliozy (TPS) – różnica wartości kąta Cobba skrzywienia głównego pomiędzy pomiarami na dwóch kolejnych radiogramach wyrażona w stopniach na miesiąc. Obliczenia wykonywane były zgodnie ze wzorem:

$$TPS = \frac{Cobb_x - Cobb_y}{x - y}$$

gdzie x i y oznaczają daty kolejnych radiogramów wyrażone w miesiącach, Cobb_x i Cobb_y oznaczają wartości kąta Cobba w kolejnych pomiarach wyrażone w stopniach, przy założeniu x-y > 6 miesięcy.



Rycina 4.4. Pomiary radiologiczne wykonywane na radiogramie przednio-tylnym w pozycji stojącej. CSL - centralna linia krzyżowa.



Rycina 4.5. Test Rissera [118].

4.3. Badanie genetyczne

Pierwszym elementem poprzedzającym właściwe badanie genetyczne był wybór genu kandydującego i polimorfizmów zakwalifikowanych do badania (rozdział 4.3.1.), czego konsekwencją było następnie zaprojektowanie starterów do odcinków DNA zawierających analizowane SNP oraz wybór enzymów restrykcyjnych rozpoznających poszukiwane miejsca.

Przed przystąpieniem do właściwych badań dokonano obliczenia oczekiwanej liczebności grupy badanej i grupy kontrolnej, która zapewniłaby oczekiwaną moc testów statystycznych (rozdział 4.3.2.).

Badanie genetyczne składało się z trzech etapów. W pierwszym etapie pobierano krew od uczestniczek badania oraz izolowano z niej DNA. W drugim etapie wykonywana była amplifikacja fragmentów DNA badanych pod kątem występowania SNP. W ostatnim etapie wykonywana była reakcja cięcia otrzymanych fragmentów z zastosowaniem enzymów restrykcyjnych, a następnie elektroforeza uzyskanych produktów na żelu agarowym, wykonanie zdjęć żeli i odczytanie wyników.

4.3.1. Planowanie badania

4.3.1.1. Wybór genu kandydującego

Na etapie planowania badania przeanalizowano piśmiennictwo i przebieg historii naturalnej skoliozy idiopatycznej [43]. Na tej podstawie zdecydowano, iż fenomeny progresji skrzywienia w okresie okołopokwitaniowym i częstszego występowania IS, zwłaszcza ciężkich postaci, u nastoletnich dziewcząt (zjawiska szerzej opisane we wstępie), uzasadniają przeprowadzenia badań w obrębie genów receptorów estrogenowych.

4.3.1.2. Wybór polimorfizmów

Na podstawie piśmiennictwa zawartego w bazie MEDLINE z lat 1900 – 2010 i danych zgromadzonych w bazie genetycznej Genomatrix (www.genomatrix.de) do badania wytypowano sześć polimorfizmów: trzy w genie receptora estrogenowego typu 1 i trzy w genie receptora estrogenowego typu 2.

W pierwszej kolejności do badania wybrane zostały SNP, których związek ze skoliozą idiopatyczną został opisany do 2010 roku. W genie *ESR1* polimorfizmy *XbaI* rs9340799 oraz *PvuII* rs2234693 [82, 83] i w genie *ESR2* polimorfizm *AlwNI* rs1256120 [87].

Pozostałe polimorfizmy zostały wybrane na podstawie ich powiązania, opisywanego w piśmiennictwie z cechami fenotypowymi, które były również opisywane w skoliozach idiopatycznych.

W skoliozach idiopatycznych postulowane było późniejsze występowanie pierwszej miesiączki [119,120], obniżona gęstość kostna [121, 122] oraz niższy ciężar ciała [123, 124].

W obrębie genu *ESR1* polimorfizm *BspI* rs7757956 był opisywany w piśmiennictwie jako posiadający związek z mniejszą gęstością kostną [125, 126] oraz z ilością tkanki tłuszczowej w populacji młodzieńczej [127].

W obrębie genu *ESR2* polimorfizmy *AluI* rs4986938 i *RsaI* rs1256049 opisywano jako posiadające związek z gęstością kości [128, 129], opóźnieniem wieku pierwszej miesiączki [130] oraz zaburzeniami ciężaru ciała u kobiet [131] .

4.3.1.2.1. Polimorfizmy w obrębie genu *ESR1*

Do badania wybrano trzy SNP w obrębie genu receptora estrogenowego pierwszego (*ESR1*):

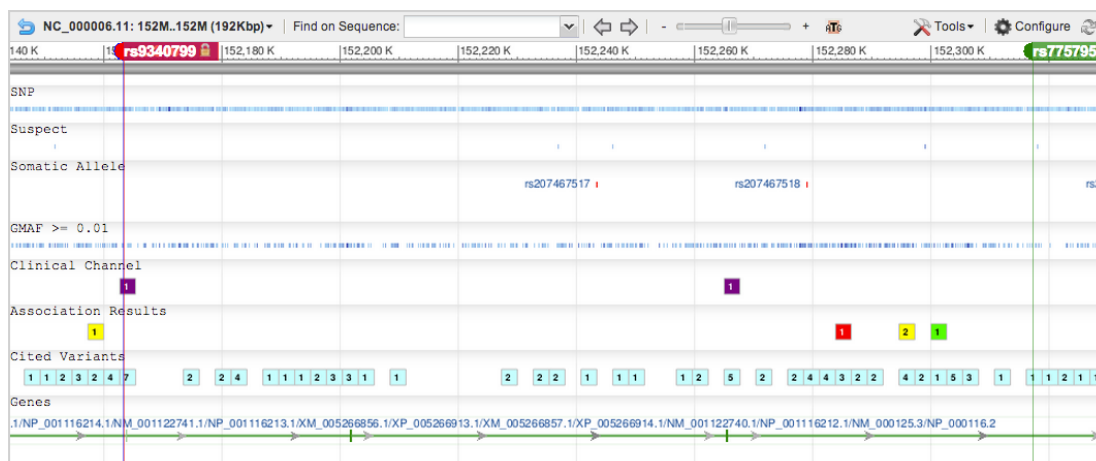
1. rs9340799 A/G
2. rs2234693 C/T
3. rs7757956 A/T

Dane identyfikacyjne SNP, ich lokalizację w obrębie genu i chromosomu, otaczającą sekwencję oraz allele składowe opisano w tabeli 4.1.

Tabela 4.1. Polimorfizmy wybrane do zbadania w obrębie *ESR1*

SNP ID	Lokalizacja na chromosomie 6	Lokalizacja w genie <i>ESR1</i>	Miejsce w genie	Allele	Sekwencja otaczająca
rs9340799	152163381 GRCh37.p10 contig: NT_025741.15	156751 RefSeqGene: NG_008493.1	Intron 1 351A>G	A/G	TTTCCCAGAGACCCT- GAGTGTGGTCT[A/G]GAG TTGGGATGAGCATT- GGTCTCTA
rs2234693	152163335 GRCh37.p10 contig: NT_025741.15	156705 RefSeqGene: NG_008493.1	Intron 1 397C>T	C/T	TTCATCTGAGTTCCAAAT GTCCCAGC[C/T]GTTTAA TGCTTTGTCTCTGTTTCC C
rs7757956	152317140 GRCh37.p10 contig: NT_025741.15	310510 RefSeqGene: NG_008493.1	Intron 4 1097T>A	A/T	AGCTGAGATCTCACCCAA GGCCCTGC[A/T]GGGTTC AGGCCACACTCTTAAGTA C

Wzajemne położenie wybranych SNP w formie prezentowanej na stronie internetowej Międzynarodowego Projektu HapMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>) przedstawiono na rycinie 4.6. [132].



Rycina 4.6. Umiejscowienie wybranych SNP w genie *ESR1*
(źródło: <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>) [132].

4.3.1.2.2 Polimorfizmy w obrębie genu *ESR2*

Do badania wybrano trzy SNP w obrębie genu receptora estrogenowego drugiego:

1. rs1256120 C/T
2. rs4986938 A/G
3. rs1256049 A/G

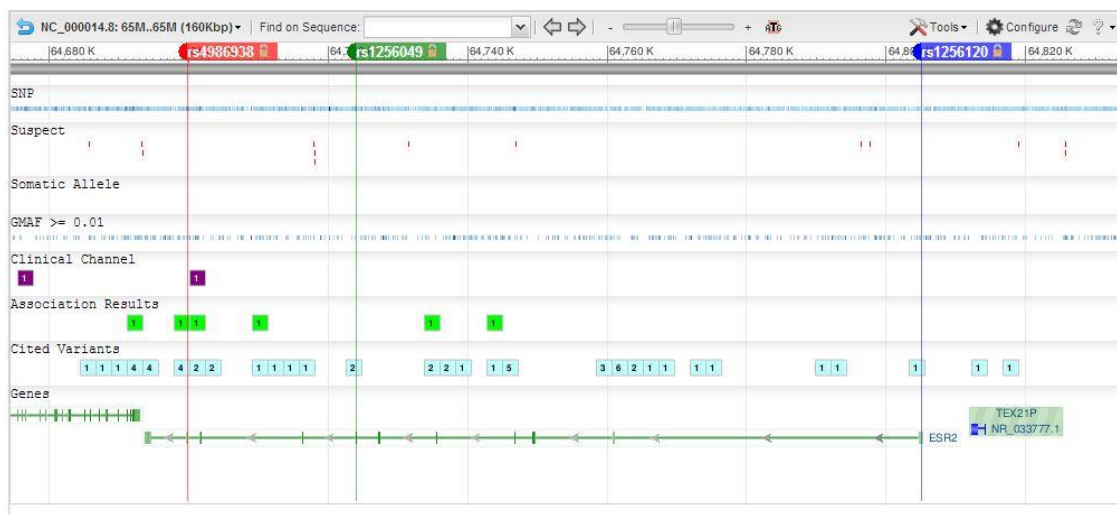
Dane identyfikacyjne SNP, ich lokalizację w obrębie genu i chromosomu, otaczającą sekwencję oraz allele składowe opisano w tabeli 4.2.

Tabela 4.2. Polimorfizmy wybrane do zbadania w obrębie *ESR2*

SNP ID	Lokalizacja na chromosomie 14	Lokalizacja w genie <i>ESR2</i>	Miejsce w genie	Allele	Sekwencja otaczająca
rs1256120	64805001 GRCh37.p10 contig: NT_026437.12	5268 RefSeqGene:NG_011535.1	Region UTR5` 268T>C	C/T	GAAGCGCAGCCCCCTGTTTCA CA- GGCCC[C/T]GCCGAGCTGGAA GGAGTGTCAGAGC
rs4986938	64699816 GRCh37.p10 contig: NT_026437.12	110453 RefSeqGene:NG_011535.1	Region UTR3` 1730G>A	A/G	AGGTGAACTGGCCACAGAG- GGTCA- CA[A/G]GCTGAAGCGTGAAGT CCAGTGTGTC
rs1256049	64724051 GRCh37.p10 contig: NT_026437.12	86218 RefSeqGene:NG_011535.1	Ekson 5 1082G>A	A/G	GTGGAGCTCAGCCTGTTTCGAC CAGCCTGTTTCGAC- CAAGT[A/G]CGGCTCTTGGAG AGCTGTTGGATGG

URT – obszary mRNA nieulegające translacji, związane z jej kontrolą

Wzajemne położenie wybranych SNP w formie prezentowanej na stronie internetowej Międzynarodowego Projektu HapMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>) przedstawiono na rycinie 4.7.[132].



Rycina 4.7. Umiejscowienie wybranych SNP w genie *ESR2* (źródło: <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>) [132].

4.3.2 Oszacowanie oczekiwanej liczebności grupy badanej i kontrolnej

Na etapie planowania badania ustalono wymaganą minimalną liczebność grup dla uzyskania mocy statystycznej testu wynoszącej 80% przy założonym ilorazie szans (ang. odds ratio, OR) około $OR=2$. Do obliczeń wykorzystano częstość występowania alleli opisanego w piśmiennictwie i projekcie HapMap, przy założeniu poziomu istotności statystycznej $\alpha=0,05$.

Uzyskano liczbę 150 pacjentek w grupie badanej i 50 osób w grupie kontrolnej. Następnie przeprowadzono symulację wartości ilorazu szans przy założeniu grupy badanej na $N=144$ i grupy kontrolnej $N=48$ dla mocy testu 80% i istotności statystycznej $\alpha=0,05$, tabela 4.3.

Tabela 4.3. Ocena ilorazu szans możliwego do wykrycia dla założonej mocy testu 80%, przy założeniu $N=144$ w grupie badanej i $N=48$ w grupie kontrolnej oraz poziomie istotności $\alpha=0,05$

SNP	Artykuł	Allel	Częstość występowania alleli na podstawie piśmiennictwa (%)	iloraz szans OR możliwy do wykrycia
<i>XbaI</i>	Roszkowska-Gancarz i wsp. [133]	A	61,4%	1,94
		G	38,6%	0,51
<i>PvuII</i>	Roszkowska-Gancarz i wsp. [133]	C	52,5%	1,92
		T	47,5%	0,52
<i>Bsyt</i>	HapMap [132]	A	18,0%	2,14
		T	82,0%	0,47
<i>AlwNI</i>	HapMap [132]	C	81,7%	2,14
		T	18,3%	0,47
<i>AluI</i>	Dziedziejko i wsp. [154]	A	39,6%	1,91
		G	60,4%	0,52
<i>RsaI</i>	Pawlik i wsp. [155]	A	6,7%	2,9
		G	93,3%	0,34

Obliczono OR dla oddziaływania pozytywnego i negatywnego; OR – iloraz szans

Wyniki uznano za wystarczające do przeprowadzenia analizy.

Dane dotyczące ilorazu szans zaczerpnięto z piśmiennictwa, którego wartość, w przypadku badania predyspozycji do wystąpienia skoliozy pomiędzy grupą chorych ze skoliozą idiopatyczną a grupą kontrolną, opisywana była od 1,68 do 2,17 [71, 83, 87]. W przypadku porównania pomiędzy podgrupami pacjentów podzielonych ze względu na wielkość kąta Cobba iloraz szans wynosił nawet 4,3 [82, 83].

4.3.3. Przygotowanie materiału do badania genetycznego

Do badań wykorzystywane było genomowe DNA (gDNA) uczestniczek badania, wyizolowane z krwi żyłnej.

4.3.3.1. Pobranie krwi

Od każdej uczestniczki badania pobrana została próbka obwodowej krwi żyłnej. Skóra przed pobraniem odkażona została jednorazowym gazikiem nasączonym 70% alkoholem izopropylowym (Leko®). Krew pobierana była w jednorazowych rękawiczkach lateksowych, przy użyciu jednorazowej igły średnicy 0,8 mm do jednorazowej probówki Monovette® zawierającej EDTA firmy SARSTEDT AG & Co. Na miejsce pobrania założony został jednorazowy jałowy opatrunek plastrowy. Krew pobierał lekarz badający (doktorant). U 190 osób nie wystąpiły żadne powikłania. Dwukrotnie nastąpiło omdlenie.

4.3.3.2. Izolacja DNA

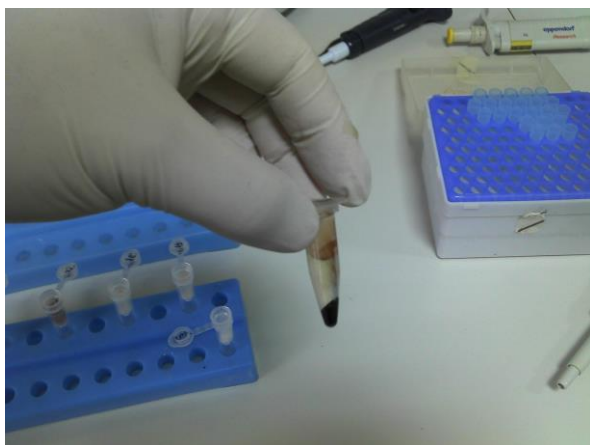
Po pobraniu próbki krwi transportowane były w lodówce do Katedry i Zakładu Biologii Komórki Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, gdzie wykonywana była izolacja DNA przy użyciu zestawu do izolacji DNA z krwi obwodowej Axygen Prep Blood Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen Scientific, Inc., Union City, CA, USA), zgodnie z procedurą dostarczoną przez producenta, rycina 4.8.

Do izolacji DNA wykorzystano 200 µl krwi obwodowej, do której dodano 500 µl buforu AP1 celem uzyskania lizy błony komórkowej leukocytów oraz 100 µl buforu AP2 celem uzyskania strątu. Następnie mieszaninę odwirowano przez 10 minut w przyspieszeniu 12000 x g. Otrzymany supernatant przeniesiono do probówki filtrującej i odwirowano przez 1 minutę w przyspieszeniu 6000 x g. Następnie usunięto uzyskany przesącz i dodano 700 µl buforu W1A. Po odczekaniu 2 minut w temp. pokojowej ponownie

odwirowano przez 1 min. w przyśpieszeniu 6000 x g. Kolejnym krokiem było usunięcie otrzymanego przesączu, dodanie 800 µl buforu W2 i odwirowanie przez 1 minutę w przyśpieszeniu 12000 x g celem oczyszczenia. Ten krok powtórzono z zastosowaniem 500 µl buforu W2. Na koniec dodano 200 µl podgrzanego do 65°C buforu TE i po odczekaniu 1 min. odwirowano przez 1 min. w 12000 x g. Tak przygotowany materiał był gotowy do dalszych badań.

Stężenie i czystość gDNA zostały ocenione spektrofotometrycznie. Stężenie DNA oceniono z użyciem długości fali świetlnej 260 nm. Czystość DNA oceniono porównując absorpcję 260 nm / 280 nm. Do dalszej analizy wykorzystano próbki, w których stosunek ten wynosił 1,8-2,0. Pomiarów dokonano z wykorzystaniem spektrofotometru NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). Do reakcji PCR wykorzystano od 50 do 200 ng DNA na każdą reakcję. Jakość DNA i stopień degradacji oceniany był elektroforetycznie poprzez rozdział 100 ng DNA w 1% żelu agarowym (Seakem).

Dane pacjentów zakodowano w systemie numerycznym, w którym uczestnikom badania przypisywane były liczby. Wszystkie próbki oraz wyniki badań opisywane były jako liczby (ochrona danych osobowych).



Rycina 4.8. Próbkę krwi podczas izolacji DNA.

4.3.4. Amplifikacja wybranych fragmentów DNA

Po otrzymaniu oczyszczonego DNA, następnym etapem badania było namnożenie fragmentów DNA w obrębie genów receptorów estrogenowych, zawierających badane polimorfizmy. W tym celu wykonano na badanych próbkach reakcję polimerazy łańcuchowej (PCR), z zastosowaniem specjalnie dobranych starterów.

4.3.4.1. Startery zaprojektowane do badania

Na potrzeby badania zaprojektowane zostały startery oskrzydlające sekwencje DNA badane pod kątem występowania wybranych SNP. Startery zostały wyznaczone na etapie projektowania badania przy użyciu algorytmu oprogramowania Primer3Plus dostępnego w Internecie (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/primer3plus/About.cgi>). Zostały one dodatkowo poddane kontroli poprzez porównanie zgodności i lokalizacji oprogramowaniem BLAST. Startery użyte w badaniu zsyntetyzowano w firmie Genomed.

4.3.4.1.1. Startery do sekwencji DNA w obrębie genu *ESR1*

Startery użyte do reakcji PCR wraz z długością ampliconu i temperaturą przyłączenia zamieszczono w tabeli 4.4.

Tabela 4.4. Zestawienie starterów wykorzystanych w reakcji PCR dla genu *ESR1*

	sekwencja 5' -> 3'	temp. przyłączenia	długość otrzymanego fragmentu
<i>ESR1</i> _rs9340799_ <i>XbaI</i> _F	CTGCCACCCTATCTGTATCTTTTCCTATTCTCC	71°C	1300 pz
<i>ESR1</i> _rs9340799_ <i>XbaI</i> _R	TCTTTCTCTGCCACCCTGGCGTCGATTATCTGA		
<i>ESR1</i> _rs2234693_ <i>PvuII</i> _F	AGGCTGGGCTCAAACCTACAG	60°C	759 pz
<i>ESR1</i> _rs2234693_ <i>PvuII</i> _R	TCCTTGGCAGATTCCATAGC		
<i>ESR1</i> _rs7757956_ <i>Bsyl</i> _F	TAATGACCAGGCACCAGACA	71°C	628 pz
<i>ESR1</i> _rs7757956_ <i>Bsyl</i> _R	CAAGAGGAGCCTCATTCCAG		

4.3.4.1.2. Startery do sekwencji DNA w obrębie genu *ESR2*

Startery użyte do reakcji PCR wraz z długością ampliconu i temperaturą przyłączenia zamieszczono w tabeli 4.5.

Tabela 4.5. Zestawienie starterów wykorzystanych w reakcji PCR dla genu *ESR2*

	sekwencja 5' -> 3'	temp. przyłączenia	długość otrzymanego fragmentu
<i>ESR2</i> _rs1256120_ <i>AlwNI</i> _F	CTGAATCTGACGCTCAGCAG	61°C	482 pz
<i>ESR2</i> _rs1256120_ <i>AlwNI</i> _R	GAAACCCGGTATCTGGTCAA		
<i>ESR2</i> _rs4986938_ <i>AluI</i> _F	GTGTGTGGTGGGACACAGAG	65°C	646 pz
<i>ESR2</i> _rs4986938_ <i>AluI</i> _R	AGGCCATTGAGTGTGGAAC		
<i>ESR2</i> _rs1256049_ <i>RsaI</i> _F	TTCTGAGCCGAGGTCGTAGT	66°C	582 pz
<i>ESR2</i> _rs1256049_ <i>RsaI</i> _R	TGAATCCTTGGACCCAACTC		

4.3.4.2. Łańcuchowa reakcja polimerazy PCR

Reakcja PCR była przeprowadzona w objętości 25 µl, przy użyciu zaprojektowanych starterów opisanych w tabelach 4.4. i 4.5. Długość każdego badanego fragmentu opisana jest w tabelach 4.4. i 4.5.

Mieszanina reakcyjna PCR zawierała od 50 do 200 ng badanego gDNA, 1x OptiBuffer, 3,5 nmol/l roztworu MgCl₂, 300 nmol/l każdego z zaprojektowanych starterów, 400 nM każdego z dNTP, 0,5% DMSO i 1U polimerazy BIO-X-ACT DNA.

Warunki termiczne oraz liczbę cykli zawierają tabele 4.6. i 4.7. odpowiednio dla *ESR1* i *ESR2*.

Tabela 4.6. Warunki termiczne dla reakcji PCR w obrębie genu *ESR1*

Etap	<i>ESR1</i> rs9340799 <i>XbaI</i>		<i>ESR1</i> rs7757956 <i>BstI</i>		<i>ESR1</i> rs2234693 <i>PvuII</i>	
	czas	cykle	czas	cykle	czas	cykle
wstępna denaturacja	95°C, 5 min	1	95°C, 5 min	1	95°C, 5 min	1
denaturacja	95°C, 20 s	30	95°C, 20 s	30	95°C, 30 s	40
przyłączanie	71°C, 15 s		71°C, 15 s		60°C, 30 s	
wydłużanie	72°C, 15 s		72°C, 15 s		70°C, 20 s	
ostateczne wydłużanie	72°C, 3 min	1	72°C, 3 min	1	70°C, 5 min	1

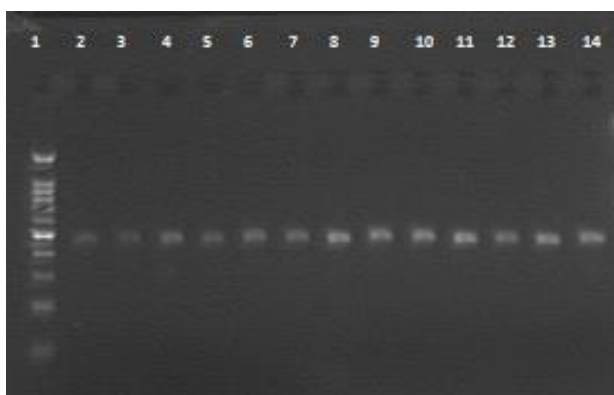
Tabela 4.7. Warunki termiczne dla reakcji PCR w obrębie genu *ESR2*

Etap	<i>ESR2</i> rs1256120 <i>AlwNI</i>		<i>ESR2</i> rs4986938 <i>AluI</i>		<i>ESR2</i> rs1256049 <i>RsaI</i>	
	czas	cykle	czas	cykle	czas	cykle
wstępna denaturacja	95°C, 5 min	1	95°C, 5 min	1	95°C, 5 min	1
denaturacja	98°C, 20 s		98°C, 20 s		98°C, 20 s	
przyłączanie	61°C, 15 s	30	65°C, 15 s	30	66°C, 15 s	30
wydłużanie	72°C, 15 s		72°C, 15 s		72°C, 15 s	
ostateczne wydłużanie	72°C, 1 min	1	72°C, 1 min	1	72°C, 1 min	1

4.3.4.3. Ocena i oczyszczenie produktów PCR

2 µl produktów reakcji PCR poddane zostało elektroforezie w 2% żelu agarowym (FMC BioProducts, Rockland, ME, USA) w obecności bromku etydyny w celu porównania ich wielkości z wzorcem (Nova 100 Novazym), rycina 4.9. Następnie produkty były oczyszczane za pomocą zestawu AxyPrepPCR Clean-up Kit zgodnie z procedurą załączoną przez producenta.

Do 20 µl produktów reakcji PCR dodano 100 µl buforu PCR-A i odwirowano przez jedną minutę, w temperaturze pokojowej, w przyspieszeniu 12 000 x g, w kolumnie AxyPrep PCR umieszczonej w probówce 2 ml. Następnie usunięto przesącz i dodano 700 µl buforu W2 i ponownie odwirowano przez jedną minutę, w temperaturze pokojowej, w przyspieszeniu 12 000 x g. Po usunięciu przesączu dodano 400 µl buforu W2 i ponownie odwirowano przez jedną minutę, w temperaturze pokojowej, w przyspieszeniu 12 000 x g. Następnie usunięto przesącz i przeniesiono kolumnę AxyPrep PCR do probówki 1,5 ml i inkubowanie przez 1 minutę, w temperaturze pokojowej po dodaniu 30 µl wody dejonizowanej o temperaturze 65°C. Na koniec odwirowano przez jedną minutę, w temperaturze pokojowej, w przyspieszeniu 12 000 x g otrzymując oczyszczone DNA.



Rycina 4.9. Przykładowe zdjęcie elektroforezy produktów PCR dla *ESR1* rs9340799
1- wzorzec ciężkości (Nova 100 Novazym), 2-14 – badane próbki DNA.

4.3.5. Reakcja polimorfizmów długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP)

Otrzymane fragmenty DNA zawierające wybrane SNP zostały poddane działaniu enzymów restrykcyjnych, które przecinają nić DNA w określonych miejscach. W ten sposób wykazana została obecność konkretnych alleli polimorfizmów.

4.3.5.1. Wybór enzymów restrykcyjnych

Na etapie planowania badania wybrane zostały enzymy restrykcyjne, których miejsca cięcia odpowiadają wybranym polimorfizmom. W tym celu użyto programu NEBcutter V2.0 firmy New England Biolabsinc. (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) . Zastosowano enzymy FastDigest (Bioline GmbH, Germany).

4.3.5.1.1. Enzymy restrykcyjne w obrębie genu *ESR1*

Do każdego z wybranych SNP dobrano enzymy restrykcyjne.

1. rs9340799 – *XbaI*
2. rs2234693 – *PvuII*
3. rs7757956 – *BspI*

Dokładny opis miejsc restrykcyjnych oraz długości otrzymanych fragmentów w zależności od obecnego allelu zawarto w tabeli 4.8.

Tabela 4.8. Zastosowane enzymy, z uwzględnieniem miejsca restrykcyjnego oraz długości otrzymanych fragmentów dla *ESR1*

Polimorfizm	Enzym	Miejsce restrykcyjne	Allele	Długość fragmentów restrykcyjnych	
rs9340799	<i>XbaI</i>	T*CTAGA	T*CT <u>A</u> GA	A	910 pz + 390 pz
			TCT <u>G</u> GA	G	1300 pz
rs2234693	<i>PvuII</i>	CAG*CTG	CAG*CT <u>G</u>	T	271 pz + 488 pz
			CAGC <u>C</u> G	C	759 pz
rs7757956	<i>BspI</i>	CCC*AGC	CCC* <u>A</u> GC	A	201pz + 427 pz
			CCCT <u>G</u> C	T	628 pz

*oznacza miejsce restrykcyjne; wykrywany polimorfizm został podkreślony

Dla enzymu *XbaI* obecność cięcia restrykcyjnego oznaczało allel A, a jego brak allel G.

Dla enzymu *PvuII* obecność cięcia restrykcyjnego oznaczało allel T, a jego brak allel C.

Dla enzymu *BspI* obecność cięcia restrykcyjnego oznaczało allel A, a jego brak allel T.

4.3.5.1.2. Enzymy restrykcyjne w obrębie genu *ESR2*

Do każdego z wybranych SNP dobrano enzymy restrykcyjne.

1. rs1256120 – *AlwNI*
2. rs4986938 – *AluI*
3. rs1256049 – *RsaI*

Dokładny opis miejsc restrykcyjnych oraz długości otrzymanych fragmentów w zależności od obecnego allelu zawarte są w tabeli 9.

Tabela 4.9. Zastosowane enzymy, z uwzględnieniem miejsca restrykcyjnego oraz długości otrzymanych fragmentów dla *ESR2*

Polimorfizm	Enzym	Miejsce restrykcyjne		Allele	Długość fragmentów restrykcyjnych
rs1256120	<i>AlwNI</i>	CAGNNN*CTG	CAGNNN* <u>C</u> TG	C	50 pz + 432pz
			CAGNNN <u>T</u> TG	T	482pz
rs4986938	<i>AluI</i>	AG*CT	<u>A</u> G*CT	A	445 pz + 201 pz
			<u>G</u> GCT	G	646 pz
rs1256049	<i>RsaI</i>	GT*AC	GT* <u>A</u> C	A	293 pz + 289 pz
			GT <u>G</u> C	G	582 pz

*oznacza miejsce restrykcyjne; wykrywany polimorfizm został podkreślony

Dla enzymu *AlwNI* obecność cięcia restrykcyjnego oznaczało allel C, a jego brak allel T.

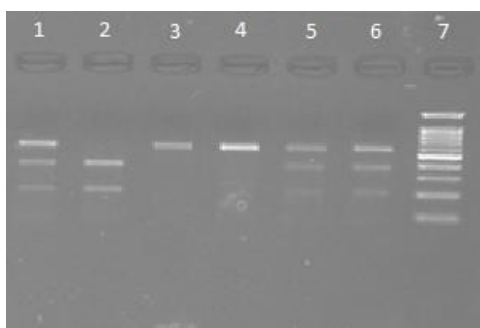
Dla enzymu *AluI* obecność cięcia restrykcyjnego oznaczało allel A, a jego brak allel G.

Dla enzymu *RsaI* obecność cięcia restrykcyjnego oznaczało allel A, a jego brak allel G.

4.3.5.2. Reakcja restrykcji enzymatycznej

Trawienie przeprowadzone zostało w objętości 15 µl roztworu zawierającego: 1,5µl produktu PCR, 1µl FastDigest Green Buffer, 1FDU FastDigest Enzyme (odpowiednio *XbaI*, *PvuII*, *BspI*, *AlwNI*, *AluI*, *RsaI*) i wody DNase free.

Reakcja cięcia enzymatycznego była inkubowana w termocyklerze przez jedną godzinę w temperaturze 37°C, następnie enzym restrykcyjny był dezaktywowany w temperaturze 85°C przez 10 min. Kolejnym krokiem było poddanie 10 µl produktu reakcji elektroforezie w 2% żelu agarowym z zastosowaniem bromku etydydny celem odczytania konkretnych alleli. Każdy żel miał wykonane zdjęcie fotograficzne, rycina 4.10.



Rycina 4.10. Przykładowe zdjęcie elektroforezy produktów RFLP dla polimorfizmu rs4986938 w obrębie genu *ESR1* przy zastosowaniu enzymu *AluI*. 1-6 – badane próbki DNA.

(3 i 4 próbki homozygotyczne GG – w obu allelach nie nastąpiła restrykcja enzymatyczna; 2 - próbka homozygotyczna AA – w obu allelach wystąpiła restrykcja enzymatyczna; 1,5 i 6 - próbki heterozygotyczna AG – w jednym allelu wystąpiła reakcja cięcia enzymatycznego, a w drugim nie;) 7 – marker - wzorzec ciężkości (Nova 100 Novazym).

4.3.5.3. Odczytywanie wyników badania metodą polimorfizmów długości fragmentów restrykcyjnych

Zdjęcia żeli zostały odczytane przez jedną osobę (doświadczonego pracownika Katedry i Zakładu Biologii Komórki). Wyniki zostały opisane w postaci genotypów w zależności od obecności lub braku cięcia enzymu restrykcyjnego i otrzymaniu fragmentów odpowiedniej długości opisanych w tabelach 4.7. i 4.8. Dla poszczególnych enzymów, w przypadku wystąpienia cięcia w obu niciach, w elektroforezie otrzymywano wyłącznie dwa paski odpowiadające dwóm krótszym fragmentom. Obraz taki był charakterystyczny dla homozygoty allelu wywołujących reakcję restrykcji. Występowanie wyłącznie jednego paska w elektroforezie o długości typowej dla całego, nieprzeciętego fragmentu było obrazem typowym dla homozygoty allelu niepowodującego reakcji restrykcyjnej. Wystąpienie w elektroforezie trzech pasków odpowiadających długością fragmentom zarówno przeciętym jak i fragmentowi nieprzeciętemu było charakterystyczne dla heterozygot, rycina 4.10.

Dla poszczególnych enzymów ocena wyników reakcji cięcia restrykcyjnego wyglądała następująco:

- 1) dla enzymów *XbaI*, *AluI* i *RsaI*
 - homozygoty wykazujące obecność restrykcji – AA,
 - homozygoty nie wykazujące obecności restrykcji – GG,
 - heterozygoty – AG,
- 2) dla enzymu *PvuII*
 - homozygoty wykazujące obecność restrykcji – TT,
 - homozygoty nie wykazujące obecności restrykcji – CC,
 - heterozygoty – CT,
- 3) dla enzymu *AlwNI*
 - homozygoty wykazujące obecność restrykcji – CC,
 - homozygoty nie wykazujące obecności restrykcji – TT,
 - heterozygoty – CT,
- 4) dla enzymu *BspI*
 - homozygoty wykazujące obecność restrykcji – AA,
 - homozygoty nie wykazujące obecności restrykcji – TT,
 - heterozygoty – AT.

4.3.5.4. Potwierdzenie wyników badania metodą RFLP sekwencjonowaniem

W celu potwierdzenia wyników uzyskanych metodą RFLP część badanych próbek poddano dodatkowo badaniu metodą sekwencjonowania.

W przypadku 46 losowo wybranych próbek DNA badanych pacjentów (co stanowi 24% badanego materiału genetycznego) przeprowadzono 138 reakcji sekwencjonowania (co stanowiło 12% wyników). Sekwencjonowanie wykonano w Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej UAM w Poznaniu. Do sekwencjonowania użyto tych samych starterów co w przypadku reakcji RFLP. We wszystkich przypadkach uzyskano wyniki zgodne z badaniami metodą RFLP.

4.4. Sposób analizy wyników

4.4.1. Analiza wyników badania klinicznego

W badanych grupach i podgrupach określone zostały wartości minimalne, maksymalne, średnie oraz odchylenia standardowe dla:

- wieku,
- wzrostu,
- ciężaru ciała,
- BMI,
- wieku pierwszej miesiączki,
- wieku rozpoznania skoliozy.

Odsetek operacji podany został w procentach.

4.4.2. Analiza wyników badania radiologicznego

W badaniu radiologicznym pacjentów ze skoliozą idiopatyczną określone zostały wartości minimalne, maksymalne, średnie oraz odchylenia standardowe dla:

- kąta Cobba – początkowy,
- kąta Cobba – maksymalny,
- kąta Cobba – ostateczny,
- stopnia progresji,
- tempa progresji.

W przypadku kręgu szczytowego i testu Rissera podana została wartość mediany.

4.4.3. Analiza wyników badania genetycznego

Analizę wyników badania genetycznego przeprowadzono w czterech etapach.

W pierwszym przeprowadzono badanie związku wybranych SNP w obrębie receptorów estrogenowych z występowaniem skoliozy idiopatycznej, porównując wyniki otrzymane u pacjentów ze skoliozą idiopatyczną z wynikami grupy kontrolnej (4.4.3.1.).

W drugim przeprowadzono analizę otrzymanych wyników genetycznych w podgrupach pacjentów ze skoliozą, poszukując ich związku z tempem progresji skoliozy idiopatycznej (4.4.3.2.).

W trzecim etapie dokonano porównania otrzymanych wyników genetycznych w podgrupach pacjentów ze skoliozą podzielonych ze względu na zbliżoną postać kliniczną skoliozy (4.4.3.3.).

W ostatnim etapie dla poszczególnych genotypów obliczono wartości średnie parametrów klinicznych i radiologicznych, i porównano je ze sobą (4.4.3.4.).

4.4.3.1. Porównanie otrzymanych wyników u pacjentów ze skoliozą idiopatyczną z wynikami grupy kontrolnej

Wykonano obliczenie rozkładu procentowego alleli, genotypów oraz kombinacji genotypów dla ocenianych polimorfizmów w grupie pacjentów ze skoliozą i w grupie kontrolnej. Wyniki otrzymane w grupie badanej i grupie kontrolnej porównano ze sobą z zastosowaniem właściwych testów statystycznych.

4.4.3.2. Porównanie otrzymanych wyników pacjentów ze skoliozą idiopatyczną w podgrupach wyodrębnionych w zależności od tempa progresji skrzywienia

Wykonano obliczenie rozkładu procentowego alleli, genotypów oraz kombinacji genotypów dla ocenianych polimorfizmów w podgrupach NP-IS, SP-IS oraz RP-IS. Otrzymane wyniki porównano pomiędzy podgrupami z zastosowaniem właściwych testów statystycznych.

4.4.3.3. Porównanie otrzymanych wyników pacjentów ze skoliozą idiopatyczną w podgrupach wyodrębnionych ze względu na zbliżoną postać kliniczną skoliozy

Celem dokładniejszego przeanalizowania związku badanych polimorfizmów z postacią kliniczną skoliozy idiopatycznej podzielono pacjentki na podgrupy podobne klinicznie.

Dla wszystkich uzyskanych w ten sposób podgrup wykonano obliczenie rozkładu procentowego alleli, genotypów oraz kombinacji genotypów. Otrzymane wyniki porównano między podgrupami z zastosowaniem właściwych testów statystycznych.

4.4.3.3.1. Podział ze względu na wartość kąta Cobba na trzy podgrupy

Pacjentki ze skoliozą idiopatyczną podzielono na trzy podgrupy w zależności od wielkości skrzywienia na:

1. skoliozy idiopatyczne z kątem Cobba poniżej 30°,
2. skoliozy idiopatyczne z kątem Cobba pomiędzy 30°-49°,
3. skoliozy idiopatyczne z kątem Cobba 50° i więcej.

4.4.3.3.2. Podział ze względu na wartość kąta Cobba na dwie podgrupy

Pacjentki ze skoliozą idiopatyczną podzielono na dwie podgrupy w zależności od wielkości skrzywienia na:

1. skoliozy idiopatyczne z kątem Cobba poniżej 40°,
2. skoliozy idiopatyczne z kątem Cobba 40° i więcej.

4.4.3.3.3. Podział ze względu na zastosowane leczenie

Pacjentki ze skoliozą idiopatyczną podzielono na dwie podgrupy w zależności od rodzaju zastosowanego leczenia na:

1. skoliozy idiopatyczne leczone zachowawczo,
2. skoliozy idiopatyczne leczone operacyjnie.

4.4.3.3.4. Podział ze względu na stopień wiotkości tkanki łącznej

Pacjentki ze skoliozą idiopatyczną podzielono na dwie podgrupy w zależności od stopnia wiotkości tkanki łącznej ocenianej wg skali Beightona [113] na:

1. pacjentki bez nadmiernej wiotkości stawowej 0-3 punkty wg skali Beightona,
2. pacjentki z nadmierną wiotkością stawową 4-9 punkty wg skali Beightona.

4.4.3.4. Porównanie wartości wybranych parametrów klinicznych i radiologicznych dla poszczególnych genotypów

Dla pacjentów z poszczególnymi genotypami zostały obliczone i porównane za pomocą właściwych testów statystycznych średnie wartości:

- kąta Cobba – początkowy,
- kąta Cobba – maksymalny,
- kąta Cobba – ostateczny,
- wieku rozpoznania,
- wieku pierwszej miesiączki,
- BMI,
- wzrostu na stojąco,
- ciężaru ciała w kilogramach,
- kąta rotacji tułowia (KRT),
- średniej wartości parametru progresji kąta Cobba.

4.4.3.5. Analiza mocy testów statystycznych

Analizując otrzymaną moc testów statystycznych, przeprowadzono symulację możliwego do wykrycia ilorazu szans dla wyników powyższego badania, przy założeniu poziomu istotności $\alpha=0,05$ oraz pożądanej mocy 80%.

Następnie przeprowadzono ocenę mocy testów dla wyników, które przekroczyły poziom istotności $\alpha=0,05$

4.4.3.6. Porównanie częstości występowania alleli w grupie kontrolnej z danymi populacyjnymi

Otrzymaną częstość występowania alleli w grupie kontrolnej porównano z danymi zawartymi w piśmiennictwie dla populacji polskiej oraz zmagazynowanymi w bazie danych HapMap dla populacji kaukaskiej [132].

4.5. Metody statystyczne

W badanych grupach określone zostały wartości minimalne, maksymalne, średnie oraz odchylenia standardowe dla wieku, wzrostu, ciężaru ciała, BMI, wieku pierwszej miesiączki, wieku rozpoznania skoliozy, kąta Cobba, tempa progresji.

Testem Komogorova-Smirnova oceniono normalność rozkładu danych.

Porównanie średnich wykonane zostało za pomocą testów t-Studenta i ANOVA w przypadku danych z rozkładem normalnym, oraz testów Manna-Whitney'a i Kruskala-Wallisa dla danych nie spełniających rozkładu normalnego. W przypadku danych ocenianych w skali nominalnej testu dokładnego Fishera, testu χ^2 oraz testu χ^2 z poprawką Yatesa w zależności od otrzymanych liczebności grup. Przy każdym wyniku zaznaczono jakiego testu użyto.

Porównanie odmienności rozkładu częstości występowania alleli, genotypów w poszczególnych grupach wykonane zostały za pomocą testu dokładnego Fishera, testu χ^2 oraz testu χ^2 z poprawką Yatesa w zależności od otrzymanych liczebności grup.

Powyższe obliczenia wykonano za pomocą programu GraphPad InStat firmy GraphPad Software Inc.

We wszystkich otrzymanych wynikach rozkład genotypów i alleli poddany został ocenie zgodności z testem równowagi Hardy'ego-Weinberga z zastosowaniem CobeX web tool za pomocą testu χ^2 [136].

Moc testów oceniona została za pomocą programu G*power 3.14. [137]. Dla otrzymanych wyników obliczona została otrzymana moc statystyczna dla testu dokładnego Fishera i testu χ^2 za pomocą programu G*power 3.14. przy zastosowaniu obliczeń post hoc. Liczebność grupy została obliczona za pomocą testu Z. Poziom istotności p przyjęto na 0,05 oraz przedział ufności CI 95%.

4.6. Udział własny doktoranta w badaniu

W związku z charakterem badań wymagającym wykonywania oznaczeń przy użyciu specjalistycznej aparatury część badań wykonana została przez pracowników naukowych i technicznych Katedry i Zakładu Biologii Komórki Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

Udział doktoranta obejmował:

- współudział w planowaniu badania,
- wyszukiwanie piśmiennictwa,
- współudział w selekcji polimorfizmów,
- oznaczenie liczebności grup,
- pobieranie zgody na badanie i odpowiedzi na wszystkie pytania,
- badanie podmiotowe,

- badanie przedmiotowe,
- pobieranie krwi,
- pomoc przy izolacji DNA,
- analiza wyników badania klinicznego, radiologicznego i genetycznego,
- tworzenie bazy danych,
- wykonywanie obliczeń statystycznych,
- wnioskowanie na podstawie badania,
- napisanie pracy.

Doktorant nie wykonywał:

- izolacji DNA,
- reakcji PCR,
- badań metodą RFLP.

5. Wyniki

5.1. Wyniki badań klinicznych

5.1.1. Charakterystyka grupy badanej i kontrolnej

Dane dotyczące wieku, wzrostu, ciężaru ciała, BMI oraz wieku wystąpienia pierwszej miesiączki dla wszystkich przebadanych 192 osób zawarto w tabeli 5.1.1.

Tabela 5.1.1. Dane antropometryczne grupy badanej i grupy kontrolnej

	Grupa badana N= 144	Grupa kontrolna N = 48	Istotność różnicy p
Wiek (miesiące)	207,9±66,1 (156-648)	360,5±104,4 (180-625)	0,0001 ^b
Wzrost w momencie badania (cm)	164,7±6,5 (149-181)	167,0±6,4 (154-178)	0,0222 ^a
Ciężar ciała (kg)	51,9±9,2 (32-79)	57,6±8,9 (42-80)	0,0004 ^b
BMI (kg/m ²)	19,1±2,8 (14,3-27,5)	20,9±3,1 (16,3-29,7)	0,0008 ^b
Wiek pierwszej miesiączki (miesiące)	153,7±14,3 (120-194)	151,1±12,9 (120-180)	0,2638 ^b

W tabeli podano wartości średnie i odchylenie standardowe, w nawiasach wartość minimalną i maksymalną;

^a test t – Studenta; ^b test Manna-Whitneya

5.1.2. Charakterystyka chorych ze skoliozą idiopatyczną (grupa badana)

Dane kliniczne dotyczące chorych ze skoliozą idiopatyczną umieszczono w tabeli 5.1.2. W przypadku skolioz dwułukowych podano wartości KRT jedynie dla skrzywienia głównego (piersiowego).

Tabela 5.1.2. Wyniki badania klinicznego u chorych ze skoliozą idiopatyczną (grupa badana)

Grupa badana N=148	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wartość minimalna	Wartość maksymalna
Wiek rozpoznania (lata)	10,5	2,3	5	15
KRT początkowy (°)	9,3	3,4	3	19
KRT maksymalny (°)	11,5	4,4	4	25
KRT ostateczny (°)	10,8	4,603	3	25
Odsetek chorych poddanych lecze- niu operacyjnemu (%)	33,3%			

KRT – kąt rotacji tułowia

5.1.3. Charakterystyka chorych ze skoliozą w obrębie podgrup

144 zakwalifikowane pacjentki zostały podzielone na trzy podgrupy pod względem tempa progresji zgodnie z kryteriami włączenia dla poszczególnych podgrup. Wyniki badania klinicznego dla podgrup oraz ich porównanie znajduje się w tabeli 5.1.3.

Tabela 5.1.3. Wyniki badania klinicznego podgrup pacjentów ze skoliozami idiopatycznymi nieprogresywnymi (NP-IS), wolno progresującymi (NP-IS) oraz szybko progresującymi (RP-IS)

	NP-IS n=48	SP-IS n=48	RP-IS n=48	Istotność różnicy p
Wiek (miesiące)	198,2±25,5 (180-316)	204,5±30,0 (173-296)	220,2±106,9 (156-648)	0,1238 ^a
Wzrost (cm)	166,4±6,9 (151-181)	165,1±5,8 (154-175)	161,9±5,9 (149-173)	0,0067 ^b
Wzrost na siedząco (cm)	85,8±4,1 (75-96)	84,4±5,7 (62-92)	81,8±4,6 (68-89)	0,0032 ^a
Ciężar ciała (kg)	51,5±7,9 (35-79)	54,3±9,9 (40-76)	48,2±9,7 (31-72)11	0,0313 ^a
BMI (kg/m ²)	18,5±2,3 (14,7-24,1)	19,9±3,3 (14,3-27,5)	18,5±2,8 (13,8-26,8)	0,0972 ^a
Wiek pierwszej miesiączki (miesiące)	150,5±14,3 (120-185)	156,6±15 (120-194)	153,8±12,5 (125-174)	0,1085 ^b
Wiek rozpoznania (lata)	11,4±2,2 (5-15)	10,9±2,1 (5-14)	9,3±2,3 (5-13)	0,0001 ^a
KRT początkowy (°)	8,2±3,1 (5-16)	9,9±3,2 (4-19)	11±3,4 (5-17)	0,00291 ^a
KRT maksymalny (°)	9,0±2,9 (5-16)	10,8±2,8 (4-19)	15,8±4,8 (10-25)	<0,0001 ^a
KRT ostateczny (°)	8,5±3,0 (3-16)	9,9±3,0 (3-15)	15,3±5,2 (10-25)	<0,0001 ^a
Odsetek operacji (%)	0	12,5%	89,6%	<0,0001 ^c

w tabeli podano wartości średnie i odchylenie standardowe, w nawiasach wartość minimalną i maksymalną

^a Test Kruskala-Wallisa; ^b Test ANOVA; ^c Test Chi²; KRT – kąt rotacji tułowia

5.2. Wyniki badań radiologicznych

5.2.1. Ocena radiologiczna chorych ze skoliozą idiopatyczną (grupa badana)

Dane radiologiczne chorych ze skoliozą idiopatyczną umieszczono w tabeli 5.2.1. W przypadku skolioz dwułukowych podano wartości jedynie dla skrzywienia głównego (piersiowego).

Tabela 5.2.1. Wyniki badania radiologicznego u chorych ze skoliozami idiopatycznymi (grupa badana)

Grupa badana N=148	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Wartość minimalna	Wartość maksymalna
Kąt Cobba początkowy (°)	27,7	8,8	10	48
Kąt Cobba maksymalny (°)	43,7	20,1	12	114
Kąt Cobba ostateczny (°)	42,5	21,4	10	114
Risser (mediana)*	4		0	5
Kręgosłupowy (mediana) ^a	Th8		Th5	Th11/12
Progresja (°)	12,1	15,5	0	93
Tempo progresji (°/miesiąc)	0,61	0,7	0	4,7

^a w przypadku kręgosłupa szczytowego i testu Rissera podano wartość mediany zamiast średniej

5.2.2. Ocena radiologiczna chorych ze skoliozą w obrębie podgrup

Wyniki badania radiologicznego dla podgrup wyodrębnionych pod względem tempa progresji skoliozy oraz ich porównanie znajduje się w tabeli 5.2.2.

Tabela 5.2.2. Wyniki badania radiologicznego podgrup pacjentów ze skoliozami idiopatycznymi nieprogresywnymi (NP-IS), wolno progresującymi (NP-IS) oraz szybko progresującymi (RP-IS)

	NP-IS n=48	SP-IS n=48	RP-IS n=48	Istotność różnicy p
Kąt Cobba początkowy (°)	22,7±5,6 (11-30)	30,7,2±7,9 (10-42)	29,3±9,1 (12-46)	0,0001 ^a
Kąt Cobba maksymalny (°)	25,2±4,7 (13-30)	40,2±7,9 (27-65)	65,7±17,2 (37-114)	<0,0001 ^a
Kąt Cobba ostateczny (°)	23,6±5,3 (11-30)	38,1±8,9 (19-65)	65,6±17,4 (37-114)	<0,0001 ^a
Risser (mediana) ^b	4 (4-5)	4,5 (4-5)	4 (0-5)	0,0012 ^a
Kręgosłupowy (mediana) ^b	Th8 (Th5-Th11/12)	Th8 (Th6-Th11)	Th8 (Th6-Th10/11)	0,4473 ^a
Progresja (°)	2,5±3,9 (0-15)	8,9±5,6 (3-28)	30,7±17,4 (11-93)	<0,0001 ^a
Tempo progresji (°/miesiąc)	0,2±0,2 (0-0,9)	0,4±0,2 (0-0,91)	1,5±0,8 (1-4,7)	<0,0001 ^a

w tabeli podano wartości średnie i odchylenie standardowe, w nawiasach wartości minimalną i maksymalną

^a Test Kruskala-Wallis; ^b w przypadku kręgosłupa szczytowego i testu Rissera podano wartość mediany zamiast średniej

5.3. Wyniki badań genetycznych

Analiza miejsca restrykcyjnego przy użyciu enzymu nie była skuteczna w przypadku trzech próbek, skuteczność oznaczania genotypów dla tego polimorfizmu wyniosła 98,4%. W pozostałych przypadkach uzyskano 100% wyników.

5.3.1. Porównanie wyników grupy badanej i kontrolnej

5.3.1.1. Rozkład alleli w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR1* w grupie badanej i grupie kontrolnej

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w rozkładzie alleli w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR1*, tabela 5.3.1.

Tabela 5.3.1. Rozkład alleli genu *ESR1* w grupie badanej i grupie kontrolnej

SNP	Allel	Grupa badana N (%)	Grupa kontrolna N (%)	Istotność różnicy p	OR CI 95%
<i>XbaI</i>	A	163 (56,6%)	64 (66,7%)	0,0822 ^a	1,53 (0,95-2,49)
	G	125 (43,4%)	32 (33,3%)		
<i>PvuII</i>	C	141 (49,0%)	47 (49,0%)	1 ^a	1 (0,63-1,59)
	T	147 (51,0%)	49 (51,0%)		
<i>BstI</i>	T	232 (83,4%)	80 (83,3%)	0,9783 ^a	0,99 (0,51-1,85)
	A	46 (16,6%)	16 (16,7%)		

^a test Chi², OR – iloraz szans, CI 95% - przedział ufności 95%

5.3.1.2. Rozkład alleli w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR2* w grupie badanej i grupie kontrolnej

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w rozkładzie alleli w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR2*, tabela 5.3.2.

Tabela 5.3.2. Rozkład alleli genu *ESR2* w grupie badanej i grupie kontrolnej

SNP	Allel	Grupa badana N (%)	Grupa kontrolna N (%)	Istotność różnicy p	OR CI 95%
<i>AlwNI</i>	C	232 (80,6%)	78 (81,3%)	0,8812 ^a	0,95 (0,53-1,73)
	T	56 (19,4%)	18 (18,7%)		
<i>AluI</i>	A	98 (34,0%)	42 (43,7%)	0,0865 ^a	1,51 (0,94-2,42)
	G	190 (66,0%)	54 (56,3%)		
<i>RsaI</i>	A	15 (5,2%)	5 (5,2%)	1 ^b	1,0 (0,35-2,83)
	G	273 (94,8%)	91 (94,8%)		

^a test Chi², ^b test Chi² z poprawką Yatesa, OR – iloraz szans, CI 95% - przedział ufności 95%

5.3.1.3. Częstość występowania genotypów – zasada równowagi Hardy'ego-Weinberga

Częstość występowania genotypów została sprawdzona pod względem spełnienia warunków równowagi Hardy'ego-Weinberga (HWE). Rozkład genotypów w grupie badanej i w grupie kontrolnej był zgodny z HWE, tabele 5.3.3. i 5.3.4.

5.3.1.4. Rozkład genotypów w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR1* w grupie badanej i grupie kontrolnej

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w rozkładzie genotypów w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR1*, tabela 5.3.3.

Tabela 5.3.3. Rozkład genotypów genu *ESR1* w grupie badanej i grupie kontrolnej

SNP	Genotyp	Grupa badana N (%)	HWE ^a	Grupa kontrolna N (%)	HWE ^a	Istotność różnicy p niezależne	Istotność różnicy p dominujące ^c	OR CI 95%	Istotność różnicy p recesywne ^d	OR CI 95%
<i>XbaI</i>	AA	46 (31,9%)	0,9657	21 (43,8%)	0,8286	0,2201 ^a	0,2636 ^b	0,50 (0,18-1,39)	0,1373 ^a	0,60 (0,31-1,18)
	AG	71 (49,3%)		22 (45,8%)						
	GG	27 (18,8%)		5 (10,4%)						
<i>PvuII</i>	CC	35 (24,3%)	0,8717	12 (25,0%)	0,775	0,9862 ^a	0,9248 ^a	1,04 (0,450-2,17)	0,9228 ^a	0,96 (0,45-2,05)
	CT	71 (49,3%)		23 (47,9%)						
	TT	38 (26,4%)		13 (27,1%)						
<i>BspI</i>	TT	97 (69,8%)	0,905	35 (72,9%)	0,0833	0,4941 ^a	0,5351 ^b	2,15 (0,46-9,98)	0,6813 ^a	0,85 (0,43-1,87)
	AT	38 (27,3%)		10 (20,8%)						
	AA	4 (2,9%)		3 (6,3%)						

OR – iloraz szans, CI 95% – przedział ufności 95%, HWE – równowaga Hardy'ego-Weinberga

^a test Chi², ^b test Chi² z poprawką Yatesa

^c model dziedziczenia dominujący: dla polimorfizmu *XbaI* genotypy AA i AG łącznie, w stosunku do genotypu GG; dla polimorfizmu *PvuII* genotypy CC i CT łącznie, w stosunku do TT; dla polimorfizmu *BspI* genotypy AA i AT łącznie, w stosunku do TT

^d model dziedziczenia recesywny: dla polimorfizmu *XbaI* genotyp AA, w stosunku do genotypów AG i GG łącznie; dla polimorfizmu *PvuII* genotyp CC, w stosunku do genotypów CT i TT łącznie; dla polimorfizmu *BspI* genotyp AA, w stosunku do genotypów AT i TT łącznie

5.3.1.5. Rozkład genotypów w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR2* w grupie badanej i grupie kontrolnej

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w rozkładzie genotypów w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR2*, tabela 5.3.4.

Tabela 5.3.4. Rozkład genotypów genu *ESR2* w grupie badanej i grupie kontrolnej

SNP	Genotyp	Grupa badana N (%)	HWE ^a	Grupa kontrolna N (%)	HWE ^a	Istotność różnicy p niezależne	Istotność różnicy p dominujące ^c	OR CI 95%	Istotność różnicy p recesywne ^d	OR CI 95%
<i>AlwNI</i>	CC	95 (66,0%)	0,4079	31 (64,6%)	0,5148	0,6427 ^a	0,6767 ^b	0,42 (0,05-3,48)	0,8607 ^a	1,07 (0,54-2,11)
	CT	42 (29,2%)		16 (33,3%)						
	TT	7 (4,9%)		1 (2,1%)						
<i>AluI</i>	AA	16 (11,1%)	0,8025	8 (16,7%)	0,4861	0,2055 ^a	0,0884 ^a	0,54 (0,27-1,10)	0,4497 ^b	0,63 (0,25-1,57)
	AG	66 (45,8%)		26 (54,2%)						
	GG	62 (43,1%)		14 (29,2%)						
	AA	0		0			1 ^b			
<i>RsaI</i>	AG	15 (10,4%)	0,5097	5 (10,4%)	0,7034					
	GG	129 (89,6%)		43 (89,6%)						

OR – iloraz szans, CI 95% – przedział ufności 95%, HWE – równowaga Hardy'ego-Weinberga

^a test Chi², ^b test Chi² z poprawką Yatesa,

^c model oddziaływania dominujący: dla polimorfizmów *AluI* i *RsaI* genotypy AA i AG łącznie w stosunku do genotypu GG; dla polimorfizmu *AlwNI* genotypy CC i CT łącznie, w stosunku do genotypu TT

^d model oddziaływania recesywny: dla polimorfizmów *AluI* i *RsaI* genotyp AA, w stosunku do AG i GG łącznie; dla polimorfizmu *AlwNI* genotyp CC, w stosunku do CT i TT łącznie

5.3.2. Wyniki w podgrupach pacjentów ze skoliozą idiopatyczną podzielonych w zależności od tempa progresji skrzywienia

5.3.2.1. Rozkład alleli w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR1*

W obrębie polimorfizmu *PvuII* w podgrupach pacjentów ze skoliozą podzielonych ze względu na tempo progresji, wykazano różnice w częstości alleli C i T pomiędzy podgrupami, tabela 5.13. Różnica pomiędzy podgrupami pacjentów ze skoliozą nieprogresywną (NP-IS) i wolno progresującą (SP-IS) $p=0.0093$ z OR 2.14 (1.2-3.8).

W obrębie pozostałych badanych polimorfizmów nie wykazano statystycznie istotnych różnic w rozkładzie alleli w obrębie genu *ESR1*, tabela 5.3.5.

Tabela 5.3.5. Rozkład alleli genu *ESR1* w podgrupach pacjentów ze skoliozami idiopatycznymi nieprogresywnymi (NP-IS), wolno progresującymi (NP-IS) oraz szybko progresującymi (RP-IS)

SNP	Allel	NP-IS N (%)	SP-IS N (%)	RP-IS N (%)	Istotność różnicy p
<i>XbaI</i>	A	48 (50,0%)	61 (63,5%)	54 (56,3%)	0,1438 ^a
	G	48 (50,0%)	35 (36,5%)	42 (43,7%)	
<i>PvuII</i>	C	55 (57,3%)	37 (38,5%)	49 (51,0%)	0,0302 ^a
	T	41 (42,7%)	59 (61,5%)	47 (49,0%)	
<i>BstI</i>	T	80 (83,3%)	82 (85,4%)	72 (80,0%)	0,6133 ^a
	A	16 (16,7%)	14 (14,6%)	18 (20,0%)	

NP-IS – skolioza idiopatyczna nie progresująca, SP-IS – skolioza idiopatyczna o powolnej progresji, RP-IS – skolioza idiopatyczna o szybkiej progresji,

^a test Chi²

5.3.2.2. Rozkład alleli w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR2*

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w rozkładzie alleli w podgrupach pacjentów ze skoliozą podzielonych ze względu na tempo progresji w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR2*, tabela 5.3.6

Tabela 5.3.6. Częstość występowania alleli genu *ESR2* w podgrupach pacjentów ze skoliozami idiopatycznymi nieprogresywnymi (NP-IS), wolno progresującymi (NP-IS) oraz szybko progresującymi (RP-IS)

SNP	Allel	NP-IS N (%)	SP-IS N (%)	RP-IS N (%)	Istotność różnicy p
<i>AlwNI</i>	C	32 (33,3%)	29 (30,2%)	32 (33,3%)	0,8668 ^a
	T	64 (66,7%)	67 (69,8%)	64 (66,7%)	
<i>AluI</i>	A	32 (33,3%)	31 (32,3%)	35 (36,4%)	0,8179 ^a
	G	64 (66,7%)	65 (67,7%)	61 (63,5%)	
<i>RsaI</i>	A	4 (4,2%)	7 (7,3%)	4 (4,2%)	0,5310 ^a
	G	92 (95,8%)	89 (92,7%)	92 (95,8%)	

NP-IS – skolioza idiopatyczna nie progresująca, SP-IS – skolioza idiopatyczna o powolnej progresji, RP-IS – skolioza idiopatyczna o szybkiej progresji

^a test Chi²

5.3.2.3. Częstość występowania genotypów – zasada równowagi Hardy'ego-Weinberga

Częstość występowania genotypów została sprawdzona pod względem spełnienia warunków równowagi Hardy'ego-Weinberga (HWE). Rozkład genotypów w podgrupach pacjentów podzielonych ze względu na tempo progresji skoliozy był zgodny z HWE, tabele 5.3.7. i 5.3.8.

5.3.2.4. Rozkład genotypów w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR1*

W obrębie polimorfizmu *PvuII* u pacjentów ze skoliozą idiopatyczną w podgrupach podzielonych ze względu na tempo progresji skoliozy, wykazano różnice w rozkładzie genotypów pomiędzy podgrupami, przy założeniu niezależnego wpływu genotypów. Różnica taka nie występowała przy założeniu dominującego lub recesywnego sposobu dziedziczenia, tabela 5.15.

W obrębie pozostałych badanych polimorfizmów nie wykazano statystycznie istotnych różnic w rozkładzie genotypów obrębie genu *ESR1*, niezależnie od badanego sposobu dziedziczenia, tabela 5.15.

Tabela 5.3.7. Częstość występowania genotypów genu *ESR1* w podgrupach pacjentów ze skoliozami niepostępującymi (NP-IS), wolno postępującymi (NP-IS) oraz szybko postępującymi (RP-IS)

SNP	Genotypy	NP-IS N (%)	HWE ^a	SP-IS N (%)	HWE ^a	RP-IS N (%)	HWE ^a	Istotność różnicy p niezależne	Istotność różnicy p dominujące ^b	Istotność różnicy p recesywne ^c
<i>XbaI</i>	AA	12 (25,0%)	1,0	18 (37,5%)	0,3898	16 (33,3%)	0,6337	0,3665 ^a	0,1690 ^a	0,4088 ^a
	AG	24 (50,0%)		25 (52,1%)		22 (45,8%)				
	GG	12 (25,0%)		5 (10,4%)		10 (20,8%)				
<i>PvuII</i>	CC	14 (29,2%)	0,3005	6 (12,5%)	0,491	15 (31,3%)	0,1496	0,0440^a	0,0594 ^a	0,0636 ^a
	CT	27 (56,2%)		25 (52,1%)		19 (39,6%)				
	TT	7 (14,6%)		17 (35,4%)		14 (29,2%)				
<i>BstI</i>	TT	34 (70,8%)	0,4884	34 (70,8%)	0,2369	29 (64,4%)	0,8522	0,6313 ^a	0,3445 ^a	0,7473 ^a
	AT	12 (25,0%)		14 (29,2%)		14 (31,1%)				
	AA	2 (4,2%)		0 (0%)		2 (4,4%)				

HWE – równowaga Hardy'ego-Weinberga

^a test Chi²

^b model dziedziczenia dominujący: dla polimorfizmu *XbaI* genotypy AA i AG łącznie, w stosunku do genotypu GG; dla polimorfizmu *PvuII* genotypy CC i CT łącznie, w stosunku do TT; dla polimorfizmu *BstI* genotypy AA i AT łącznie, w stosunku do TT

^c model dziedziczenia recesywny: dla polimorfizmu *XbaI* genotyp AA, w stosunku do genotypów AG i GG łącznie; dla polimorfizmu *PvuII* genotyp CC, w stosunku do genotypów CT i TT łącznie; dla polimorfizmu *BstI* genotyp AA, w stosunku do genotypów AT i TT łącznie

5.3.2.5. Rozkład genotypów w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR2*

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w rozkładzie genotypów w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR2* w podgrupach pacjentów ze skoliozą podzielonych ze względu na tempo progresji, niezależnie od badanego sposobu dziedziczenia, tabela 5.3.8.

Tabela 5.3.8. Częstość występowania genotypów genu *ESR2* w podgrupach pacjentów ze skoliozami niepostępującymi (NP-IS), wolno postępującymi (NP-IS) oraz szybko postępującymi (RP-IS)

SNP	Genotypy	NP-IS N (%)	HWE ^a	SP-IS N (%)	HWE ^a	RP-IS N (%)	HWE ^a	Istotność różnicy p niezależne	Istotność różnicy p dominujące ^b	Istotność różnicy p recesywne ^c
<i>AlwNI</i>	CC	33 (68,7%)	0,2137	28 (58,3%)	0,8462	34 (70,8%)	0,8507	0,5936 ^a	0,3126 ^a	0,3833 ^a
	CT	12 (25,0%)		17 (35,4%)		13 (27,1%)				
	TT	3 (6,3%)		3 (6,3%)		1 (2,1%)				
<i>AluI</i>	AA	7 (14,6%)	0,3898	4 (8,3%)	0,5069	5 (10,4%)	0,279	0,6145 ^a	0,5838 ^a	0,6113 ^a
	AG	18 (37,5%)		23 (47,9%)		25 (52,1%)				
	GG	23 (47,9%)		21 (43,8%)		18 (37,5%)				
<i>RsaI</i>	AA	0	0,7632	0	0,5858	0	0,7632	0,5118 ^a		
	AG	4 (8,3%)		7 (14,6%)		4 (8,3%)				
	GG	44 (91,7%)		41 (85,4%)		44 (91,7%)				

HWE – równowaga Hardy'ego-Weinberga

^a test Chi²

^b model dziedziczenia dominujący: dla polimorfizmów *AluI* i *RsaI* genotypy AA i AG łącznie, w stosunku do genotypu GG; dla polimorfizmu *AlwNI* genotypy CC i CT łącznie, w stosunku do genotypu TT

^c model dziedziczenia recesywny: dla polimorfizmów *AluI* i *RsaI* genotyp AA, w stosunku do AG i GG łącznie; dla polimorfizmu *AlwNI* genotyp CC, w stosunku do CT i TT łącznie

5.3.3. Wyniki w podgrupach pacjentów ze skoliozą idiopatyczną podzielonych ze względu na wartość kąta Cobb'a na skoliozy ze skrzywieniem poniżej 30°, pomiędzy 30° i 50° oraz 50° i więcej

5.3.3.1. Rozkład alleli w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR1*

W obrębie polimorfizmu *PvuII* w podgrupach pacjentów ze skoliozą idiopatyczną podzielonych ze względu na wartość kąta Cobb'a na skoliozy ze skrzywieniem poniżej 30°, pomiędzy 30° i 50° oraz 50° i więcej wykazano różnice w częstości alleli C i T pomiędzy podgrupą pacjentów ze skoliozami idiopatycznymi z kątem Cobb'a poniżej 30° a skoliozami z kątem Cobb'a 50° i więcej, tabela 5.3.9.

W obrębie pozostałych badanych polimorfizmów genu *ESR1* nie wykazano statystycznie istotnych różnic w rozkładzie alleli, tabela 5.3.9.

Tabela 5.3.9. Rozkład alleli w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR1* w podgrupach pacjentów ze skoliozą idiopatyczną podzielonych ze względu na wartość kąta Cobb'a na skoliozy ze skrzywieniem poniżej 30°, pomiędzy 30° i 50° oraz 50° i więcej

SNP	Allel	30° N (%)	30°-49° N (%)	>50° N (%)	Istotność różnicy p	Istotność różnicy p ^b	OR
<i>XbaI</i>	A	35 (47,3%)	74 (58,7%)	54 (61,4%)	0,1610 ^a	0,0731 ^a	0,57 (0,30-1,06)
	G	39 (52,7%)	52 (41,3%)	34 (38,6%)			
<i>PvuII</i>	C	45 (60,8%)	57 (45,2%)	39 (44,3%)	0,0603 ^a	0,0364^a	1,95 (1,04-3,65)
	T	29 (39,2%)	69 (54,8%)	49 (55,7%)			
<i>BstI</i>	T	61 (82,4%)	108 (85,7%)	65 (79,3%)	0,4765 ^a	0,6166 ^a	1,23 (0,55-2,74)
	A	13 (17,6%)	18 (14,3%)	17 (20,7%)			

^a test Ch², OR – iloraz szans, CI 95% - przedział ufności 95%

^b porównanie podgrupy pacjentów z kątem Cobb'a poniżej 30° z podgrupą pacjentów z kątem Cobb'a 50° i więcej

5.3.3.2. Rozkład alleli w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR2*

W obrębie polimorfizmu *RsaI* w podgrupach pacjentów ze skoliozą idiopatyczną podzielonych ze względu na wartość kąta Cobb'a na skoliozy ze skrzywieniem poniżej 30°, pomiędzy 30° i 50° oraz 50° i więcej wykazano różnice w częstości alleli A i G pomiędzy podgrupami, tabela 5.20. Różnica ta nie występowała przy porównaniu podgrup pacjentów ze skoliozą idiopatyczną podzielonych ze względu na wartość kąta Cobb'a na skoliozy poniżej 30° oraz 50° i więcej, tabela 5.3.10.

W obrębie pozostałych badanych polimorfizmów genu *ESR2* nie wykazano statystycznie istotnych różnic w rozkładzie alleli, tabela 5.3.10.

Tabela 5.3.10. Rozkład alleli w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR2* w podgrupach pacjentów ze skoliozą idiopatyczną podzielonych ze względu na wartość kąta Cobba na skoliozy ze skrzywieniem poniżej 30°, pomiędzy 30° i 50° oraz 50° i więcej

SNP	Allel	30° N (%)	30°-49° N (%)	>50° N (%)	Istotność różnicy p	Istotność różnicy p ^c	OR
<i>AlwNI</i>	C	60 (81,1%)	97 (77,0%)	75 (85,2%)	0,3222 ^a	0,4806 ^a	0,74 (0,32-1,70)
	T	14 (18,9%)	29 (23,0%)	13 (14,8%)			
<i>AluI</i>	A	25 (33,8%)	47 (37,3%)	26 (29,6%)	0,4988 ^a	0,5629 ^a	1,22 (0,63-2,37)
	G	49 (66,2%)	79 (62,7%)	62 (70,4%)			
<i>RsaI</i>	A	3 (4,1%)	11 (8,7%)	1 (1,2%)	0,0424^a	0,4941 ^b	3,68 (0,37-36,14)
	G	71 (95,9%)	115 (91,3%)	87 (98,8%)			

^a test Ch², ^b test Chi² z poprawką Yatesa, OR – iloraz szans, CI 95% - przedział ufności 95%

^c porównanie podgrupy pacjentów z kątem Cobba poniżej 30° z podgrupą pacjentów z kątem Cobba 50° i więcej

5.3.3.3. Częstość występowania genotypów – zasada równowagi Hardy'ego-Weinberga

U pacjentów podzielonych ze względu na kąt Cobba, w przypadku podgrupy pacjentów ze skoliozą ze skrzywieniem 50° i więcej, wystąpiło odstępstwo od HWE w rozkładzie genotypów polimorfizmów *PvuII* oraz *AluI*, tabela 5.21. Rozkład pozostałych genotypów w badanych podgrupach był zgodny z HWE, tabele 5.3.11. i 5.3.13.

5.3.3.4. Rozkład genotypów w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR1*

W przypadku polimorfizmu *PvuII* w grupie badanej stwierdzono różnice w rozkładzie genotypów przy założeniu niezależnego i dominującego wpływu genotypów pomiędzy podgrupami pacjentów podzielonych ze względu na wartość kąta Cobba na skoliozy ze skrzywieniem poniżej 30°, pomiędzy 30° i 50° oraz 50° i więcej, tabela 5.3.11., jak i pomiędzy podgrupami pacjentów podzielonych ze względu na wartość kąta Cobba na skoliozy poniżej 30° oraz 50° i więcej, tabela 5.3.12.

W obrębie pozostałych badanych polimorfizmów genu *ESR1* nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w rozkładzie genotypów niezależnie od badanego sposobu dziedziczenia, tabele 5.3.11. i 5.3.12.

Tabela 5.3.11. Częstość występowania genotypów w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR1* w podgrupach pacjentów ze skoliozą idiopatyczną podzielonych ze względu na wartość kąta Cobb'a na skoliozy ze skrzywieniem poniżej 30°, pomiędzy 30° i 50° oraz 50° i więcej

SNP	Geno- typy	<30° N (%)	HWE ^a	30°-49° N (%)	HWE ^a	≥50° N (%)	HWE ^a	Istotność różnicy p niezależne	Istotność różnicy p dominujące ^b	Istotność różnicy p recesywne ^c
<i>Xbal</i>	AA	8 (21,6%)	0,8550	20 (31,7%)	0,3685	18 (40,9%)	0,3626	0,2570 ^a	0,2869 ^a	0,1790 ^a
	AG	19 (51,4%)		34 (54,0%)		18 (40,9%)				
	GG	10 (27,0%)		9 (14,3%)		8 (18,2%)				
<i>PvuII</i>	CC	11 (29,7%)	0,0642	12 (19,0%)	0,6498	12 (27,3%)	0,0402	0,0170 ^a	0,0070 ^a	0,3901 ^a
	CT	23 (62,2%)		33 (53,4%)		15 (34,1%)				
	TT	3 (8,1%)		18 (28,6%)		17 (38,6%)				
<i>Bsyt</i>	TT	25 (67,6%)	0,8720	46 (73,0%)	0,7688	26 (63,4%)	0,8212	0,7950 ^a	0,5765 ^a	0,9790 ^a
	AT	11 (29,7%)		16 (25,4%)		13 (31,7%)				
	AA	1 (2,7%)		1 (1,6%)		2 (4,9%)				

HWE –równowaga Hardy'ego-Weinberga

^a test Chi²

^b model dziedziczenia dominujący: dla polimorfizmu *Xbal* genotypy AA i AG łącznie, w stosunku do genotypu GG; dla polimorfizmu *PvuII* genotypy CC i CT łącznie, w stosunku do TT; dla polimorfizmu *Bsyt* genotypy AA i AT łącznie, w stosunku do TT

^c model dziedziczenia recesywny: dla polimorfizmu *Xbal* genotyp AA, w stosunku do genotypów AG i GG łącznie; dla polimorfizmu *PvuII* genotyp CC, w stosunku do genotypów CT i TT łącznie; dla polimorfizmu *Bsyt* genotyp AA, w stosunku do genotypów AT i TT łącznie

Tabela 5.3.12. Częstość występowania genotypów w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR1* w podgrupach pacjentów ze skoliozą idiopatyczną podzielonych ze względu na wartość kąta Cobb'a na skoliozy ze skrzywieniem poniżej 30°, pomiędzy 30° i 50° oraz 50° i więcej

SNP	Geno- typy	<30° N (%)	≥50° N (%)	Istotność różnicy p niezależne	Istotność różnicy p dominujące ^d	OR CI 95%	Istotność różnicy p recesywne ^e	OR CI 95%
<i>Xbal</i>	AA	8 (21,6%)	18 (40,9%)	0,2570 ^a	0,4930 ^b	0,6 (0,21-1,7)	0,1067 ^b	0,40 (0,15-1,07)
	AG	19 (51,4%)	18 (40,9%)					
	GG	10 (27,0%)	8 (18,2%)					
<i>PvuII</i>	CC	11 (29,7%)	12 (27,3%)	0,0041 ^a	0,0017 ^c	7,14 (1,89-26,92)	0,8070 ^b	1,13 (0,43-2,97)
	CT	23 (62,2%)	15 (34,1%)					
	TT	3 (8,1%)	17 (38,6%)					
<i>Bsyt</i>	TT	25 (67,6%)	26 (63,4%)	0,3153 ^a	1,0 ^c	1,8 (0,16-21,25)	0,8834 ^b	1,20 (0,47-3,07)
	AT	11 (29,7%)	13 (31,7%)					
	AA	1 (2,7%)	2 (4,9%)					

OR – iloraz szans, CI 95% - przedział ufności 95%, HWE –równowaga Hardy'ego-Weinberga

^a test Chi², ^b test Chi² z poprawką Yatesa, ^c test dokładny Fishera

^d model oddziaływania dominujący: dla polimorfizmu *Xbal* genotypy AA i AG łącznie, w stosunku do genotypu GG; dla polimorfizmu *PvuII* genotypy CC i CT łącznie, w stosunku do TT; dla polimorfizmu *Bsyt* genotypy AA i AT łącznie, w stosunku do TT

^e model oddziaływania recesywny: dla polimorfizmu *Xbal* genotyp AA, w stosunku do genotypów AG i GG łącznie; dla polimorfizmu *PvuII* genotyp CC, w stosunku do genotypów CT i TT łącznie; dla polimorfizmu *Bsyt* genotyp AA, w stosunku do genotypów AT i TT łącznie

5.3.3.5. Rozkład genotypów w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR2*

W przypadku polimorfizmu *RsaI* w grupie badanej stwierdzono różnice w rozkładzie genotypów przy założeniu dominującego wpływu genotypów pomiędzy podgru-

pami pacjentów podzielonych na wartość kąta Cobba na skoliozy ze skrzywieniem poniżej 30°, pomiędzy 30° i 50° oraz 50° i więcej, tabela 5.3.13.

W przypadku polimorfizmu *AluI* w grupie badanej stwierdzono różnice w rozkładzie genotypów przy założenia recesywnego wpływu genotypów pomiędzy podgrupami pacjentów podzielonych na wartość kąta Cobba na skoliozy ze skrzywieniem poniżej 30° oraz 50° i więcej, tabela 5.3.14.

W obrębie pozostałych badanych polimorfizmów genu *ESR2* nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w rozkładzie genotypów niezależnie od badanego sposobu dziedziczenia, tabele 5.3.13. i 5.3.14.

Tabela 5.3.13. Częstość występowania genotypów w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR2* w podgrupach pacjentów ze skoliozą idiopatyczną podzielonych ze względu na wartość kąta Cobba na skoliozy ze skrzywieniem poniżej 30°, pomiędzy 30° i 50° oraz 50° i więcej

SNP	Genotypy	<30° N (%)	HWE ^a	30°-49° N (%)	HWE ^a	≥50° N (%)	HWE ^a	Istotność różnicy p niezależne	Istotność różnicy p dominujące ^b	Istotność różnicy p recesywne ^c
<i>AlwNI</i>	CC	25 (67,6%)	0,4690	39 (61,9%)	0,2371	31 (70,4%)	0,2502	0,4373 ^a	0,1686 ^a	0,6376 ^a
	CT	10 (27,0%)		19 (30,2%)		13 (29,6%)				
	TT	2 (5,4%)		5 (7,9%)		0				
<i>AluI</i>	AA	6 (16,2%)	0,1916	9 (14,3%)	0,8996	1 (2,3%)	0,0396	0,1573 ^a	0,6822 ^a	0,0781 ^a
	AG	13 (35,1%)		29 (46,0%)		24 (54,5%)				
	GG	18 (48,7%)		25 (39,7%)		19 (43,2%)				
<i>RsaI</i>	AA	0	0,7972	0	0,4477	0	0,9392	0,0353^a		
	AG	3 (8,1%)		11 (17,5%)		1 (2,3%)				
	GG	34 (91,9%)		52 (82,5%)		43 (97,7%)				

HWE –równowaga Hardy’ego-Weinberga

^a test Chi²

^b model dziedziczenia dominujący: dla polimorfizmów *AluI* i *RsaI* genotypy AA i AG łącznie, w stosunku do genotypu GG; dla polimorfizmu *AlwNI* genotypy CC i CT łącznie, w stosunku do genotypu TT

^c model dziedziczenia recesywny: dla polimorfizmów *AluI* i *RsaI* genotyp AA, w stosunku do AG i GG łącznie; dla polimorfizmu *AlwNI* genotyp CC, w stosunku do CT i TT łącznie

Tabela 5.3.14. Częstość występowania genotypów w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR2* w podgrupach pacjentów ze skoliozą idiopatyczną podzielonych ze względu na wartość kąta Cobba na skoliozy ze skrzywieniem poniżej 30°, pomiędzy 30° i 50° oraz 50° i więcej

SNP	Genotyp	<30° N (%)	≥50° N (%)	Istotność różnicy p ^a niezależne	Istotność różnicy p ^d dominujące	OR CI 95%	Istotność różnicy p recesywne ^e	OR CI 95%
<i>AlwNI</i>	CC	25 (67,6%)	31 (70,4%)	0,2941	0,2056 ^c	0,1596 (0,0074-3,434)	0,9691 ^b	0,87 (0,34-2,24)
	CT	10 (27,0%)	13 (29,6%)					
	TT	2 (5,4%)	0					
<i>AluI</i>	AA	6 (16,2%)	1 (2,3%)	0,0426	0,7886 ^b	0,80 (0,33-1,93)	0,0434^c	8,32 (0,95-72,70)
	AG	13 (35,1%)	24 (54,5%)					
	GG	18 (48,7%)	19 (43,2%)					
<i>RsaI</i>	AA	0	0	0,3268 ^c	3,79	(0,38-38,15)		
	AG	3 (8,1%)	1 (2,3%)					
	GG	34 (91,9%)	43 (97,7%)					

OR – iloraz szans, CI 95% - przedział ufności 95%, HWE – równowaga Hardy'ego-Weinberga

^a test Chi², ^b test Chi² z poprawką Yatesa, ^c test dokładny Fishera

^d model dziedziczenia dominujący: dla polimorfizmów *AluI* i *RsaI* genotypy AA i AG łącznie, w stosunku do genotypu GG; dla polimorfizmu *AlwNI* genotypy CC i CT łącznie, w stosunku do genotypu TT

^e model dziedziczenia recesywny: dla polimorfizmów *AluI* i *RsaI* genotyp AA, w stosunku do AG i GG łącznie; dla polimorfizmu *AlwNI* genotyp CC, w stosunku do CT i TT łącznie

5.3.4. Wyniki w podgrupach pacjentów ze skoliozą idiopatyczną podzielonych ze względu na wartość kąta Cobb'a na skoliozy poniżej 40°, oraz 40° i więcej

5.3.4.1. Rozkład alleli w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR1*

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w rozkładzie alleli w podgrupach pacjentów z kątem Cobb'a poniżej 40° oraz z kątem Cobb'a 40° i więcej w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR1*, tabela 5.3.15.

Tabela 5.3.15. Rozkład alleli badanych polimorfizmów genu *ESR1* w podgrupach pacjentów z kątem Cobb'a poniżej 40° oraz z kątem Cobb'a 40° i więcej

SNP	Allel	<40° N (%)	≥40° N (%)	Istotność różnicy p	OR CI 95%
<i>XbaI</i>	A	81 (54,7%)	82 (58,6%)	0,5109 ^a	0,86 (0,54-1,36)
	G	67 (45,3%)	58 (41,4%)		
<i>PvuII</i>	C	76 (51,4%)	65 (46,4%)	0,4036 ^a	1,20 (0,76-1,91)
	T	72 (48,6%)	75 (53,6%)		
<i>BstI</i>	T	125 (84,5%)	109 (81,3%)	0,4868 ^a	1,25 (0,67-2,32)
	A	23 (15,5%)	25 (18,7%)		

^a test Chi², OR – iloraz szans, CI 95% - przedział ufności 95%

5.3.4.2. Rozkład alleli w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR2*

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w rozkładzie alleli w podgrupach pacjentów z kątem Cobb'a poniżej 40° oraz z kątem Cobb'a 40° i więcej w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR2*, tabela 5.3.16.

Tabela 5.3.16. Rozkład alleli badanych polimorfizmów genu *ESR2* w podgrupach pacjentów z kątem Cobb'a poniżej 40° oraz z kątem Cobb'a 40° i więcej

SNP	Allel	<40° N (%)	≥40° N (%)	Istotność różnicy p	OR CI 95%
<i>AlwNI</i>	C	115 (77,7%)	117 (83,6%)	0,2085 ^a	0,68 (0,38-1,24)
	T	33 (22,3%)	23 (16,4%)		
<i>AluI</i>	A	48 (32,4%)	50 (35,7%)	0,5569 ^a	0,86 (0,53-1,41)
	G	100 (67,6%)	90 (64,3%)		
<i>RsaI</i>	A	10 (6,8%)	5 (3,6%)	0,3418 ^b	1,96 (0,65-5,88)
	G	138 (93,2%)	135 (96,4%)		

^a test Chi², ^b test Chi² z poprawką Yatesa, OR – iloraz szans, CI 95% - przedział ufności 95%

5.3.4.3. Częstość występowania genotypów – zasada równowagi Hardy'ego-Weinberga

Wszystkie wyniki zostały sprawdzone pod względem spełnienia warunków równowagi Hardy'ego-Weinberga (HWE). Rozkład genotypu *AluI* u pacjentów z kątem Cobba 40° i więcej wykazał odchylenie od HWE, tabela 5.3.18.

W pozostałych przypadkach w podgrupach pacjentów z kątem Cobba poniżej 40° oraz z kątem Cobba 40° i więcej rozkład genotypów był zgodny z HWE, tabele 5.3.17. i 5.3.18.

5.3.4.4. Rozkład genotypów w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR1*

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w rozkładzie genotypów w podgrupach pacjentów z kątem Cobba poniżej 40° oraz z kątem Cobba 40° i więcej w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR1*, tabela 5.3.17.

Tabela 5.3.17. Rozkład genotypów w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR1* w podgrupach pacjentów z kątem Cobba poniżej 40° oraz z kątem Cobba 40° i więcej

SNP	genotypy	<40° N (%)	HWE ^a	≥40° N (%)	HWE ^a	Istotność różnicy p niezależne	Istotność różnicy p dominujące ^c	OR CI 95%	Istotność różnicy p recesywne ^d	OR CI 95%
<i>XbaI</i>	AA	23 (31,1%)	0,6954	23 (32,9%)	0,6174	0,6605 ^a	0,3640 ^a	0,68 (0,29- 1,58)	0,8193 ^a	0,92 (0,46- 1,86)
	AG	35 (47,3%)		36 (51,4%)						
	GG	16 (21,6%)		11 (15,7%)						
<i>PvuII</i>	CC	19 (25,7%)	0,8111	16 (22,9%)	0,6616	0,6313 ^a	0,3389 ^a	1,44 (0,68- 3,03)	0,6935 ^a	1,17 (0,54- 2,50)
	CT	38 (51,3%)		33 (47,1%)						
	TT	17 (23,0%)		21 (30,0%)						
<i>BspI</i>	TT	53 (71,6%)	0,8505	44 (65,7%)	0,7892	0,7449 ^a	0,9197 ^b	1,11 (0,15- 8,09)	0,4464 ^a	1,32 (0,65- 2,69)
	AT	19 (25,7%)		21 (31,3%)						
	AA	2 (2,7%)		2 (3,0%)						

OR – iloraz szans, CI 95% – przedział ufności 95%, HWE – równowaga Hardy'ego-Weinberga

^a test Chi², ^b test Chi² z poprawką Yatesa,

^c model dziedziczenia dominujący: dla polimorfizmu *XbaI* genotypy AA i AG łącznie, w stosunku do genotypu GG; dla polimorfizmu *PvuII* genotypy CC i CT łącznie, w stosunku do TT; dla polimorfizmu *BspI* genotypy AA i AT łącznie, w stosunku do TT

^d model dziedziczenia recesywny: dla polimorfizmu *XbaI* genotyp AA, w stosunku do genotypów AG i GG łącznie; dla polimorfizmu *PvuII* genotyp CC, w stosunku do genotypów CT i TT łącznie; dla polimorfizmu *BspI* genotyp AA, w stosunku do genotypów AT i TT łącznie

5.3.4.5. Rozkład genotypów w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR2*

W przypadku polimorfizmu *AluI* w genie *ESR2* wykazano statystycznie istotną różnicę w częstości występowania poszczególnych genotypów pomiędzy pacjentami ze

skoliozą idiopatyczną z kątem Cobba poniżej 40° a pacjentami ze skoliozą idiopatyczną z kątem Cobba 40° i więcej, tabela 5.3.18.

W przypadku pozostałych polimorfizmów genu *ESR2* nie wykazano statystycznie istotnych różnic w rozkładzie genotypów, tabela 5.3.18.

Tabela 5.3.18. Rozkład genotypów w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR2* w podgrupach pacjentów z kątem Cobba poniżej 40° oraz z kątem Cobba 40° i więcej

SNP	genotypy	<40° N (%)	HWE ^a	≥40° N (%)	HWE ^a	Istotność różnicy p niezależne	Istotność różnicy p dominujące ^c	OR CI 95%	Istotność różnicy p recesywne ^d	OR CI 95%
<i>AlwNI</i>	CC	46 (62,2%)	0,3755	49 (70,0%)	0,9232	0,4379 ^a	0,4840 ^b	0,41 (0,08- 2,16)	0,3211 ^a	0,70 (0,35- 1,41)
	CT	23 (31,1%)		19 (27,1%)						
	TT	5 (6,7%)		2 (2,9%)						
<i>AluI</i>	AA	11 (14,9%)	0,0880	5 (7,2%)	0,0408	0,0243 ^a	0,0836 ^a	0,56 (0,28- 1,08)	0,2269 ^b	2,27 (0,75- 6,91)
	AG	26 (35,1%)		40 (57,1%)						
	GG	37 (50,0%)		25 (35,7%)						
<i>RsaI</i>	AA	0	0,5331	0	0,7567	0,3281 ^b	2,03 (0,66- 6,27)			
	AG	10 (13,5%)		5 (7,1%)						
	GG	64 (86,5%)		65 (92,9%)						

OR – iloraz szans, CI 95% - przedział ufności 95%, HWE – równowaga Hardy'ego-Weinberga

^a test Chi², ^b test Chi² z poprawką Yatesa,

^c model dziedziczenia dominujący: dla polimorfizmów *AluI* i *RsaI* genotypy AA i AG łącznie, w stosunku do genotypu GG; dla polimorfizmu *AlwNI* genotypy CC i CT łącznie, w stosunku do genotypu TT

^d model dziedziczenia recesywny: dla polimorfizmów *AluI* i *RsaI* genotyp AA, w stosunku do AG i GG łącznie; dla polimorfizmu *AlwNI* genotyp CC, w stosunku do CT i TT łącznie

5.3.5. Wyniki analizy polimorfizmów pomiędzy podgrupami pacjentów leczonych zachowawczo lub operacyjnie.

5.3.5.1. Rozkład alleli w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR1*

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w rozkładzie alleli pomiędzy podgrupami pacjentów leczonych zachowawczo i operacyjnie w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR1*, tabela 5.3.19.

Tabela 5.3.19. Rozkład alleli w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR1* w podgrupach pacjentów leczonych zachowawczo i operacyjnie

SNP	Allel	Pacjenci leczeni zachowawczo N (%)	Pacjenci leczeni operacyjnie N (%)	Istotność różnicy p	OR CI 95%
<i>XbaI</i>	A	107 (55,7%)	56 (58,3%)	0,6742 ^a	0,90 (0,55-1,48)
	G	85 (44,3%)	40 (41,7%)		
<i>PvuII</i>	C	94 (49,0%)	47 (49,0%)	1,0 ^a	1,01 (0,62-1,65)
	T	98 (51,0%)	49 (51,0%)		
<i>BspI</i>	T	162 (84,4%)	72 (80,0%)	0,3622 ^a	1,35 (0,71-2,58)
	A	30 (15,6%)	18 (20,0%)		

^a test Chi², OR – iloraz szans, CI 95% - przedział ufności 95%

5.3.5.2. Rozkład alleli w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR2*

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w rozkładzie alleli pomiędzy podgrupami pacjentów leczonych zachowawczo i operacyjnie w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR2*, tabela 5.3.20.

Tabela 5.3.20. Rozkład alleli w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR2* w podgrupach pacjentów leczonych zachowawczo i operacyjnie

SNP	Allel	Pacjenci leczeni zachowawczo N (%)	Pacjenci leczeni operacyjnie N (%)	Istotność różnicy p	OR CI 95%
<i>AlwNI</i>	C	149 (77,6%)	83 (86,5%)	0,0735 ^a	0,54
	T	43 (22,4%)	13 (13,5%)		(0,28-1,07)
<i>AluI</i>	A	64 (33,3%)	34 (35,4%)	0,7250 ^a	0,91
	G	128 (66,7%)	62 (64,6%)		(0,54-1,53)
<i>RsaI</i>	A	13 (6,8%)	2 (2,1%)	0,1596 ^b	3,41
	G	179 (93,2%)	94 (97,9%)		(0,75-15,45)

^a test Chi², ^b test Chi² z poprawką Yatesa, OR – iloraz szans, CI 95% - przedział ufności 95%

5.3.5.3. Częstość występowania genotypów – zasada równowagi Hardy'ego-Weinberga

Wszystkie wyniki zostały sprawdzone pod względem spełnienia warunków równowagi Hardy'ego-Weinberga. Rozkład genotypów polimorfizmu *PvuII* u pacjentów leczonych operacyjnie wykazał niewielkie odchylenie od HWE, tabela 5.3.21.

W obrębie pozostałych polimorfizmów rozkład genotypów w podgrupach pacjentów leczonych zachowawczo i operacyjnie był zgodny z HWE, tabele 5.3.22. i 5.3.22.

5.3.5.4. Rozkład genotypów w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR1*

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w rozkładzie genotypów w podgrupach pacjentów leczonych zachowawczo i operacyjnie w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR1*, tabela 5.3.21.

Tabela 5.3.21. Rozkład genotypów badanych polimorfizmów genu *ESR1* w podgrupach pacjentów leczonych zachowawczo i operacyjnie

SNP	Genotypy	Pacjenci leczenia zachowawczo	HWE ^a	Pacjenci leczenia operacyjnie	HWE ^a	Istotność różnicy p niezależne	Istotność różnicy p dominujące ^c	OR CI 95%	Istotność różnicy p recesywne ^d	OR CI 95%
<i>XbaI</i>	AA	28 (29,2%)	0,4527	18 (37,5%)	0,3223	0,4243 ^a	0,6506 ^s	1,22 (0,51-2,92)	0,3120 ^s	0,69 (0,33-1,43)
	AG	51 (53,1%)		20 (41,7%)						
	GG	17 (17,7%)		10 (20,8%)						
<i>PvuII</i>	CC	20 (20,8%)	0,2189	15 (31,2%)	0,0435	0,0620 ^a	0,1812 ^a	1,68 (0,78-3,62)	0,1695 ^a	0,58 (0,26-1,27)
	CT	54 (56,3%)		17 (35,4%)						
	TT	22 (22,9%)		16 (33,3%)						
<i>BspI</i>	TT	68 (70,8%)	0,7901	29 (64,5%)	0,7522	0,6191 ^a	0,8079 ^b	2,186 (0,30-16,05)	0,5698 ^a	1,34 (0,63-2,84)
	AT	26 (27,1%)		14 (31,1%)						
	AA	2 (2,1%)		2 (4,4%)						

OR – iloraz szans, CI 95% - przedział ufności 95%, HWE –równowaga Hardy'ego-Weinberga

^a test Chi², ^b test Chi² z poprawką Yatesa,

^c model dziedziczenia dominujący: dla polimorfizmu *XbaI* genotypy AA i AG łącznie, w stosunku do genotypu GG; dla polimorfizmu *PvuII* genotypy CC i CT łącznie, w stosunku do TT; dla polimorfizmu *BspI* genotypy AA i AT łącznie, w stosunku do TT

^d model dziedziczenia recesywny: dla polimorfizmu *XbaI* genotyp AA, w stosunku do genotypów AG i GG łącznie; dla polimorfizmu *PvuII* genotyp CC, w stosunku do genotypów CT i TT łącznie; dla polimorfizmu *BspI* genotyp AA, w stosunku do genotypów AT i TT łącznie

5.3.5.5. Rozkład genotypów w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR2*

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w rozkładzie genotypów w podgrupach pacjentów leczonych zachowawczo i operacyjnie w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR2*, tabela 5.3.22.

Tabela 5.3.22. Rozkład genotypów badanych polimorfizmów genu *ESR2* w podgrupach pacjentów leczonych zachowawczo i operacyjnie

SNP	Genotypy	Pacjenci leczenia zachowawczo	HWE ^a	Pacjenci leczenia operacyjnie	HWE ^a	Istotność różnicy p niezależne	Istotność różnicy p dominujące ^c	OR CI 95%	Istotność różnicy p recesywne ^d	OR CI 95%
<i>AlwNI</i>	CC	59 (61,5%)	0,4865	36 (75,0%)	0,8826	0,2235 ^a	0,4933 ^b	0,32 (0,04-2,73)	0,1527 ^a	0,53 (0,25-1,15)
	CT	31 (32,3%)		11 (22,9%)						
	TT	6 (6,2%)		1 (2,1%)						
<i>AluI</i>	AA	12 (12,5%)	0,5403	4 (8,3%)	0,2022	0,3487 ^a	0,3411 ^a	0,71 (0,35-1,44)	0,6392 ^b	1,57 (0,48-5,16)
	AG	40 (41,7%)		26 (54,2%)						
	GG	44 (45,3%)		18 (37,5%)						
<i>RsaI</i>	AA	0	0,4767	0	0,8828		0,1480 ^b	3,60 (0,78-16,67)		
	AG	13 (13,5%)		2 (4,2%)						
	GG	83 (86,5%)		46 (95,8%)						

OR – iloraz szans, CI 95% - przedział ufności 95%, HWE –równowaga Hardy'ego-Weinberga

^a test Chi², ^b test Chi² z poprawką Yatesa,

^c model dziedziczenia dominujący: dla polimorfizmów *AluI* i *RsaI* genotypy AA i AG łącznie, w stosunku do genotypu GG; dla polimorfizmu *AlwNI* genotypy CC i CT łącznie, w stosunku do genotypu TT

^d model dziedziczenia recesywny: dla polimorfizmów *AluI* i *RsaI* genotyp AA, w stosunku do AG i GG łącznie; dla polimorfizmu *AlwNI* genotyp CC, w stosunku do CT i TT łącznie

5.3.6. Wyniki analizy polimorfizmów pomiędzy podgrupami pacjentów bez wiotkości stawów i z wiotkością stawów wg skali Beightona

5.3.6.1. Rozkład alleli w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR1*

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w rozkładzie alleli pomiędzy podgrupami pacjentów bez wiotkości stawów i z wiotkością stawów wg skali Beightona w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR1*, tabela 5.3.23.

Tabela 5.3.23. Rozkład alleli w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR1* w podgrupach bez wiotkości stawów i z wiotkością stawów wg skali Beightona

SNP	Allel	Pacjenci z 0-3 wg skali Beightona N (%)	Pacjenci z 4-9 wg skali Beightona N (%)	Istotność różnicy p	OR CI 95%
<i>XbaI</i>	A	116 (57,4%)	47 (54,7%)	0,6637 ^a	1,12 (0,67-1,86)
	G	86 (42,6%)	39 (45,3%)		
<i>PvuII</i>	C	99 (49,0%)	42 (48,8%)	0,9786 ^a	1,01 (0,61-1,67)
	T	103 (51,0%)	44 (51,2%)		
<i>BstI</i>	T	159 (80,3%)	75 (89,3%)	0,0964 ^b	0,49 (0,23-1,06)
	A	39 (19,7%)	9 (10,7%)		

^a test Chi², ^b test Chi² z poprawką Yatesa, OR – iloraz szans, CI 95% - przedział ufności 95%

Suma punktów 0-3 wg skali Beightona – wiotkość stawowa nie występuje

Suma punktów 4-9 wg skali Beightona – wiotkość stawowa

5.3.6.2. Rozkład alleli w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR2*

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w rozkładzie alleli pomiędzy podgrupami pacjentów bez wiotkości stawów i z wiotkością stawów wg skali Beightona w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR2*, tabela 5.3.24.

Tabela 5.3.24. Rozkład alleli w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR2* w podgrupach pacjentów bez wiotkości stawów i z wiotkością stawów wg skali Beightona

SNP	Allel	Pacjenci z 0-3 wg skali Beightona N (%)	Pacjenci z 4-9 wg skali Beightona N (%)	Istotność różnicy p	OR CI 95%
<i>AlwNI</i>	C	163 (80,7%)	69 (80,2%)	0,9280 ^a	1,03 (0,54-1,94)
	T	39 (19,3%)	17 (19,8%)		
<i>AluI</i>	A	67 (33,2%)	31 (36,1%)	0,6371 ^a	0,88 (0,52-1,49)
	G	135 (66,8%)	55 (63,9%)		
<i>RsaI</i>	A	8 (4,0%)	7 (8,1%)	0,2416 ^b	2,149 (0,75-6,13)
	G	194 (96,0%)	79 (91,9%)		

^a test Chi², ^b test Chi² z poprawką Yatesa, OR – iloraz szans, CI 95% - przedział ufności 95%

Suma punktów 0-3 wg skali Beightona – wiotkość stawowa nie występuje

Suma punktów 4-9 wg skali Beightona – wiotkość stawowa

5.3.6.3. Częstość występowania genotypów – zasada równowagi Hardy'ego-Weinberga

Wszystkie wyniki zostały sprawdzone pod względem spełnienia warunków równowagi Hardy'ego-Weinberga.

W obrębie badanych polimorfizmów rozkład genotypów w podgrupach pacjentów leczonych bez wiotkości stawów i z wiotkością stawów wg skali Beightona był zgodny z HWE, tabele 5.3.25. i 5.3.26.

5.3.6.4. Rozkład genotypów w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR1*

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w rozkładzie genotypów w podgrupach pacjentów bez wiotkości stawów i z wiotkością stawów wg skali Beightona w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR1*, tabela 5.3.25.

Tabela 5.3.25. Rozkład genotypów badanych polimorfizmów genu *ESR1* w podgrupach bez wiotkości stawów i z wiotkością stawów wg skali Beightona

SNP	Genotypy	Pacjenci z 0-3 wg skali Beightona N (%)	HWE ^a	Pacjenci z 4-9 wg skali Beightona N (%)	HWE ^a	Istotność różnicy p niezależne	Istotność różnicy p dominujące ^c	OR CI 95%	Istotność różnicy p recesywne ^d	OR CI 95%
<i>XbaI</i>	AA	32 (31,7%)	0,5948	14 (32,6%)	0,4765	0,5807 ^a	0,3661 ^a	1,50 (0,62-3,61)	0,9179 ^a	0,96 (0,45-2,06)
	AG	52 (51,5%)		19 (44,2%)						
	GG	17 (16,8%)		10 (23,2%)						
<i>PvuII</i>	CC	25 (24,8%)	0,7682	10 (23,2%)	0,8759	0,9580 ^a	0,8859 ^a	0,94 (0,42-2,13)	0,8480 ^a	1,09 (0,47-2,51)
	CT	49 (48,5%)		22 (51,2%)						
	TT	27 (26,7%)		11 (25,6%)						
<i>BspI</i>	TT	64 (64,7%)	0,9195	33 (78,6%)	0,4368	0,17 ^a	0,4431 ^b	0,32 (0,02-6,05)	0,1518 ^b	0,50 (0,21-1,16)
	AT	31 (31,3%)		9 (21,4%)						
	AA	4 (4,0%)		0						

OR – iloraz szans, CI 95% – przedział ufności 95%, HWE – równowaga Hardy'ego-Weinberga

^a test Chi², ^b test Chi² z poprawką Yatesa,

^c model dziedziczenia dominujący: dla polimorfizmu *XbaI* genotypy AA i AG łącznie, w stosunku do genotypu GG; dla polimorfizmu *PvuII* genotypy CC i CT łącznie, w stosunku do TT; dla polimorfizmu *BspI* genotypy AA i AT łącznie, w stosunku do TT,

^d model dziedziczenia recesywny: dla polimorfizmu *XbaI* genotyp AA, w stosunku do genotypów AG i GG łącznie; dla polimorfizmu *PvuII* genotyp CC, w stosunku do genotypów CT i TT łącznie; dla polimorfizmu *BspI* genotyp AA, w stosunku do genotypów AT i TT łącznie

Suma punktów 0-3 wg skali Beightona – wiotkość stawowa nie występuje

Suma punktów 4-9 wg skali Beightona – wiotkość stawowa

5.3.6.5. Rozkład genotypów w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR2*

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w rozkładzie genotypów w podgrupach pacjentów bez wiotkości stawów i z wiotkością stawów wg skali Beightona w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR2*, tabela 5.3.26.

Tabela 5.3.26. Rozkład genotypów badanych polimorfizmów genu *ESR2* w podgrupach pacjentów bez wiotkości stawów i z wiotkością stawów wg skali Beightona

SNP	Genotyp	Pacjenci z 0-3 wg skali Beightona N (%)	HWE ^a	Pacjenci z 4-9 wg skali Beightona N (%)	HWE ^a	Istotność różnicy p niezależne	Istotność różnicy p dominujące ^c	OR CI 95%	Istotność różnicy p recesywne ^d	OR CI 95%
<i>AlwNI</i>	CC	68 (67,33%)	0,1534	27 (62,79%)	0,5131	0,4512 ^a	0,5989 ^b	0,37 (0,04-3,23)	0,5991 ^a	1,221 (0,58-2,57)
	CT	27 (26,73%)		15 (34,88%)						
	TT	6 (5,94%)		1 (2,33%)						
<i>AluI</i>	AA	11 (10,89%)	0,9601	5 (11,63%)	0,6977	0,8556 ^a	0,5777 ^a	0,81 (0,39-1,68)	0,8975 ^b	0,93 (0,30-2,86)
	AG	45 (44,55%)		21 (48,84%)						
	GG	45 (44,55%)		17 (39,53%)						
<i>RsaI</i>	AA	0	0,6786	0	0,5612		0,2284 ^b	0,44 (0,15-1,31)		
	AG	8 (7,92%)		7 (16,28%)						
	GG	93 (92,08%)		36 (83,72%)						

OR – iloraz szans, CI 95% – przedział ufności 95%, HWE – równowaga Hardy'ego-Weinberga

^a test Chi², ^b test Chi² z poprawką Yatesa,

^c model dziedziczenia dominujący: dla polimorfizmów *AluI* i *RsaI* genotypy AA i AG łącznie, w stosunku do genotypu GG; dla polimorfizmu *AlwNI* genotypy CC i CT łącznie, w stosunku do genotypu TT,

^d model dziedziczenia recesywny: dla polimorfizmów *AluI* i *RsaI* genotyp AA, w stosunku do AG i GG łącznie; dla polimorfizmu *AlwNI* genotyp CC, w stosunku do CT i TT łącznie

Suma punktów 0-3 wg skali Beightona – wiotkość stawowa nie występuje

Suma punktów 4-9 wg skali Beightona – wiotkość stawowa

5.3.7. Wyniki badania genetycznego ze względu na cechy fenotypowe skolioz idiopatycznych

5.3.7.1. Wyniki badania genetycznego ze względu na cechy fenotypowe skolioz idiopatycznych w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR1*

W obrębie genotypów badanych polimorfizmów genu *ESR1* obliczono wartości średnie dla wybranych cech charakterystycznych dla skoliozy idiopatycznej. Z powodu niewielkiej liczby pacjentów z genotypem TT w polimorfizmie *BspI* genu *ESR1* średnie wyniki nie były brane pod uwagę w obliczeniach istotności statystycznej.

5.3.7.1.1. Wyniki badania genetycznego ze względu na cechy kliniczne w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR1*

Nie wykazano statystycznie istotnych różnic pomiędzy średnimi wartościami wieku, wzrostu, ciężaru ciała, BMI oraz wieku wystąpienia pierwszej miesiączki w obrębie genotypów badanych polimorfizmów genu *ESR1*, tabela 6.3.27. Różnica ciężaru ciała i BMI pacjentek była na granicy istotności w przypadku polimorfizmu *BspI*, odpowiednio $p=0,0580$ i $p=0,0782$, tabela 5.3.27.

Nie wykazano statystycznie istotnych różnic pomiędzy średnim wiekiem rozpoznania ani początkowymi, maksymalnymi i ostatecznymi wartościami kąta rotacji tułowia w obrębie genotypów badanych polimorfizmów genu *ESR1*, tabela 5.3.27.

5.3.7.1.2. Wyniki badania genetycznego ze względu na parametry radiologiczne w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR1*

Nie wykazano statystycznie istotnych różnic wśród początkowych, maksymalnych i ostatecznych wartości kąta Cobba pomiędzy genotypami badanych polimorfizmów genu *ESR1*, tabela 6.3.27.

5.3.7.2. Wyniki badania genetycznego ze względu na cechy fenotypowe skolioz idiopatycznych w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR2*

W obrębie genotypów badanych polimorfizmów genu *ESR2* obliczono wartości średnie, dla wybranych cech charakterystycznych dla skoliozy idiopatycznej.

5.3.7.2.1. Wyniki badania genetycznego ze względu na cechy kliniczne w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR2*

Nie wykazano statystycznie istotnych różnic pomiędzy średnimi wartościami wieku, wzrostu, ciężaru ciała, BMI w obrębie genotypów badanych polimorfizmów genu *ESR2*, tabela 6.3.28.

W obrębie genotypów polimorfizmu *RsaI* wystąpiła statystycznie istotna różnica pomiędzy wartościami wieku wystąpienia pierwszej miesiączki odpowiednio dla genotypu AG 145,8 miesięcy, a dla genotypu GG 154,4 miesięcy, $p=0,0356$, tabela 6.3.28. Różnica taka nie wystąpiła w przypadku innych polimorfizmów.

Nie wykazano statystycznie istotnych różnic pomiędzy średnim wiekiem rozpoznania ani początkowymi, maksymalnymi i ostatecznymi wartościami kąta rotacji tułowia w obrębie genotypów badanych polimorfizmów genu *ESR2*, tabela 6.3.28.

5.3.7.2.2. Wyniki badania genetycznego ze względu na parametry radiologiczne w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR2*

Nie wykazano statystycznie istotnych różnic wśród początkowych, maksymalnych i ostatecznych wartości kąta Cobba pomiędzy genotypami badanych polimorfizmów genu *ESR2*, tabela 5.3.28.

W obrębie genotypów polimorfizmu *AluI* różnica pomiędzy średnimi wartościami maksymalnego kąta Cobba AA 37,1°, AG 46,8°, GG 42,2° oraz średnimi wartościami ostatecznego kąta Cobba AA 36,3°, AG 45,9°, GG 40,5° wykazywała tendencje do występowania mniejszego kąta Cobba w przypadku genotypu AA, jednakże różnice te nie wykazały istotności statystycznej, wartości p wynosiły odpowiednio $p=0,1028$ i $p=0,0831$, tabela 5.3.28.

Tabela 5.3.27. Wyniki badania klinicznego i radiologicznego w obrębie badanych polimorfizmów genu *ESR1*

	Xbal			Istotność różnicy			Pvall			Istotność różnicy			Bsył			Istotność różnicy			Xbal- Pvall- Bsył
	AA n=46	AG n=71	GG n=27	p	CC n=35	CT n=71	TT n=38	p	AA n=97	AT n=38	TT n=4 ^a	p	AA n=97	AT n=38	TT n=4 ^a	p			
wzrost na stojąco (cm)	163,8±6,9 (149-181)	164,7±6,8 (149-178)	166,5±4,8 (159-174)	0,2769 ^d	167,0±4,6 (158-174)	164,2±6,8 (149-178)	163,8±7,1 (149-181)	0,0948 ^e	164,8±6,8 (149-181)	164,1±6,2 (151-178)	170,3±1,5 (169-172)	0,5413 ^b	0,3610 ^d						
ciężar ciała (kg)	50,6±9,7 (35-79)	52,7±9,5 (31-76)	51,4±8,3 (41-72)	0,5342 ^d	54,3±9,5 (41-72)	51,5±8,7 (31-76)	50,4±10,3 (35-79)	0,3022 ^d	50,5±8,5 (31-79)	54,2±10,6 (39-65)	58±11,3 (45-65)	0,0580 ^b	0,3727 ^d						
BMI (kg/m ²)	18,9±2,4 (15,0-24,1)	19,5±3,1 (13,8-27,6)	18,4±2,6 (14,7-24,9)	0,3077 ^e	19,3±3,1 (14,7-26,8)	19,1±2,8 (13,8-27,6)	18,8±2,6 (14,3-24,1)	0,9197 ^e	18,6±2,2 (13,8-24,1)	20,2±3,6 (14,3-27,6)	20,0±4,2 (15,2-22,5)	0,0782 ^c	0,5714 ^e						
wiek (lata)	10,2±2,4 (5-14)	10,9±2,0 (6-14)	10,4±3,1 (5-15)	0,3101 ^e	10,7±2,6 (5-15)	10,6±2,3 (5-14)	10,5±2,3 (5-14)	0,9 ^e	10,5±2,4 (5-15)	10,9±2,0 (5-14)	9,3±3,8 (5-12)	0,3928 ^c	0,8538 ^e						
rozpoznanie (lata)	153,4±12,2 (129-176)	153,3±16,3 (120-194)	154,7±11,0 (135-174)	0,9154 ^d	151,7±11,5 (135-174)	154,5±15,6 (120-194)	154,2±13,5 (129-180)	0,5026 ^d	154,6±14,8 (120-194)	152,0±13,0 (120-180)	145,5±12,1 (132-160)	0,3440 ^b	0,9277 ^d						
pierwszej miesiączki (miesiące)	9,3±3,4 (4-19)	9,6±3,1 (3-15)	9,0±4,0 (5-17)	0,7950 ^d	9,5±3,8 (5-17)	9,0±3,2 (3-15)	10,1±3,3 (5-19)	0,4644 ^e	9,4±3,3 (4-19)	9,5±3,5 (3-16)	6,5±2,1 (5-8)	0,8619 ^c	0,9021 ^e						
KRT początkowy (°)	12,1±4,9 (4-25)	11,2±4,0 (5-25)	11,3±4,8 (5-25)	0,7824 ^e	11,6±4,8 (5-25)	11,1±4,25 (4-25)	12,2±4,5 (5-25)	0,4770 ^e	11,7±4,7 (4-25)	11,2±3,9 (5-21)	11,7±2,9 (10-15)	0,8130 ^c	0,9578 ^e						
KRT maksymalny (°)	11,4±5,1 (3-25)	10,6±4,2 (4-25)	10,3±5,0 (3-25)	0,8182 ^e	10,7±4,8 (3-25)	10,6±4,5 (3-25)	11,4±4,7 (5-25)	0,7720 ^e	10,9±4,7 (3-25)	10,6±4,5 (3-21)	11,0±3,6 (8-15)	0,9360 ^c	0,9958 ^e						
KRT ostateczny (°)	27,9±8,3 (11-48)	27,5±8,3 (12-44)	27,1±10,5 (10-46)	0,9432 ^d	26,6±9,8 (10-46)	26,8±8,4 (11-44)	30,0±1,9 (18-48)	0,1947 ^d	27,3±8,7 (10-48)	28,5±8,9 (12-45)	22±11,3 (14-30)	0,4935 ^b	0,7943 ^d						
kąt Cobb – początkowy (°)	46,2±22,4 (13-114)	42,0±18,4 (13-90)	41,6±20,7 (15-90)	0,5327 ^e	44,2±22,9 (13-90)	41,2±19,9 (13-110)	47,9±19,3 (22-140)	0,1276 ^e	42±20,6 (13-114)	42,8±16,5 (22-76)	51,5±29,8 (06-90)	0,7421 ^c	0,5785 ^e						
kąt Cobb – maksymalny (°)	45±23,4 (11-114)	41,7±19,1 (13-90)	40,5±21,6 (15-90)	0,6275 ^e	43,5±21,6 (15-90)	39,6±19,9 (11-110)	46,8±20,4 (18-114)	0,1660 ^e	41,6±21,4 (11-114)	41,5±17,4 (15-76)	51,5±29,8 (26-90)	0,7421 ^c	0,6814 ^e						

^aNiewystarczająca liczba; ^bTest t-studenta; ^cTest Manna-Whitney'a; ^dTest ANOVA; ^eTest Kruskala-Wallis; KRT – kąt rotacji tułowia

Tabela 5.3.28. Wyniki badania klinicznego i radiologicznego w obrębie badanych polimorfizmów genu ESR2

	AlwNI				Istotność różnicy				Alul				Istotność różnicy				Rsal				Istotność różnicy				AlwNI- Alul- Rsal												
	CC	CT	TT	p	AA	AG	N=66	GG	N=62	AA	AG	N=15	GG	N=129	AA	AG	N=15	GG	N=129	AA	AG	N=15	GG	N=129	AA	AG	N=15	GG	N=129	AA	AG	N=15	GG	N=129	Istotność różnicy p	Istotność różnicy p	
wzrost na stojąco (cm)	165,1±6,2 (149-175)	163,8±7,2 (149-181)	164,6±7,0 (158-178)	0,5804 ^d	165,9±7,1 (158-181)	163,3±7,1 (149-175)	165,7±5,7 (151-178)	165,7±5,7 (151-178)	165,7±5,7 (151-178)	165,9±7,1 (158-181)	163,3±7,1 (149-175)	165,7±5,7 (151-178)	165,7±5,7 (151-178)	165,7±5,7 (151-178)	165,9±7,1 (158-181)	163,3±7,1 (149-175)	165,7±5,7 (151-178)	165,7±5,7 (151-178)	165,7±5,7 (151-178)	165,9±7,1 (158-181)	163,3±7,1 (149-175)	165,7±5,7 (151-178)	165,7±5,7 (151-178)	165,7±5,7 (151-178)	165,9±7,1 (158-181)	163,3±7,1 (149-175)	165,7±5,7 (151-178)	165,7±5,7 (151-178)	165,9±7,1 (158-181)	163,3±7,1 (149-175)	165,7±5,7 (151-178)	165,7±5,7 (151-178)	165,7±5,7 (151-178)	165,7±5,7 (151-178)	0,0573 ^b	0,2636 ^d	
ciężar ciała (kg)	51,9±8,8 (35-76)	51,7±10,6 (31-79)	51,1±9,3 (42-70)	0,9162 ^e	54,4±12,5 (40-79)	49,8±8,5 (31-69)	52,9±8,9 (37-72)	52,9±8,9 (37-72)	52,9±8,9 (37-72)	54,4±12,5 (40-79)	49,8±8,5 (31-69)	52,9±8,9 (37-72)	52,9±8,9 (37-72)	52,9±8,9 (37-72)	54,4±12,5 (40-79)	49,8±8,5 (31-69)	52,9±8,9 (37-72)	52,9±8,9 (37-72)	52,9±8,9 (37-72)	54,4±12,5 (40-79)	49,8±8,5 (31-69)	52,9±8,9 (37-72)	52,9±8,9 (37-72)	52,9±8,9 (37-72)	54,4±12,5 (40-79)	49,8±8,5 (31-69)	52,9±8,9 (37-72)	52,9±8,9 (37-72)	54,4±12,5 (40-79)	49,8±8,5 (31-69)	52,9±8,9 (37-72)	52,9±8,9 (37-72)	52,9±8,9 (37-72)	52,9±8,9 (37-72)	0,3654 ^c	0,8338 ^e	
BMI (kg/m ²)	19,3±2,9 (14,3-27,6)	19,1±3,1 (13,8-25,4)	18,7±2,2 (15,6-22,1)	0,9159 ^e	19,6±3,8 (15,0-27,6)	18,7±2,7 (13,8-26,0)	19,2±2,6 (14,7-25,4)	19,2±2,6 (14,7-25,4)	19,2±2,6 (14,7-25,4)	19,6±3,8 (15,0-27,6)	18,7±2,7 (13,8-26,0)	19,2±2,6 (14,7-25,4)	19,2±2,6 (14,7-25,4)	19,2±2,6 (14,7-25,4)	19,6±3,8 (15,0-27,6)	18,7±2,7 (13,8-26,0)	19,2±2,6 (14,7-25,4)	19,2±2,6 (14,7-25,4)	19,2±2,6 (14,7-25,4)	19,6±3,8 (15,0-27,6)	18,7±2,7 (13,8-26,0)	19,2±2,6 (14,7-25,4)	19,2±2,6 (14,7-25,4)	19,2±2,6 (14,7-25,4)	19,6±3,8 (15,0-27,6)	18,7±2,7 (13,8-26,0)	19,2±2,6 (14,7-25,4)	19,2±2,6 (14,7-25,4)	19,6±3,8 (15,0-27,6)	18,7±2,7 (13,8-26,0)	19,2±2,6 (14,7-25,4)	19,2±2,6 (14,7-25,4)	19,2±2,6 (14,7-25,4)	19,2±2,6 (14,7-25,4)	0,6936 ^b	0,9898 ^e	
wiek	10,7±2,1 (5-15)	10,2±2,58 (5-14)	10,4±2,4 (5-14)	0,7962 ^e	11,1±2,4 (7-15)	10,2±2,5 (5-14)	10,8±2,2 (5-14)	10,8±2,2 (5-14)	10,8±2,2 (5-14)	11,1±2,4 (7-15)	10,2±2,5 (5-14)	10,8±2,2 (5-14)	10,8±2,2 (5-14)	10,8±2,2 (5-14)	11,1±2,4 (7-15)	10,2±2,5 (5-14)	10,8±2,2 (5-14)	10,8±2,2 (5-14)	10,8±2,2 (5-14)	11,1±2,4 (7-15)	10,2±2,5 (5-14)	10,8±2,2 (5-14)	10,8±2,2 (5-14)	10,8±2,2 (5-14)	11,1±2,4 (7-15)	10,2±2,5 (5-14)	10,8±2,2 (5-14)	10,8±2,2 (5-14)	11,1±2,4 (7-15)	10,2±2,5 (5-14)	10,8±2,2 (5-14)	10,8±2,2 (5-14)	10,8±2,2 (5-14)	10,8±2,2 (5-14)	0,6289 ^c	0,9768 ^e	
rozpoznanie (lata)	154,3±14,7 (120-194)	152,7±13,4 (120-178)	150,3±12,8 (132-167)	0,7105 ^d	155,8±16,5 (132-194)	153,9±13,7 (129-192)	152,7±14,1 (120-181)	152,7±14,1 (120-181)	152,7±14,1 (120-181)	155,8±16,5 (132-194)	153,9±13,7 (129-192)	152,7±14,1 (120-181)	152,7±14,1 (120-181)	152,7±14,1 (120-181)	155,8±16,5 (132-194)	153,9±13,7 (129-192)	152,7±14,1 (120-181)	152,7±14,1 (120-181)	152,7±14,1 (120-181)	155,8±16,5 (132-194)	153,9±13,7 (129-192)	152,7±14,1 (120-181)	152,7±14,1 (120-181)	152,7±14,1 (120-181)	155,8±16,5 (132-194)	153,9±13,7 (129-192)	152,7±14,1 (120-181)	152,7±14,1 (120-181)	155,8±16,5 (132-194)	153,9±13,7 (129-192)	152,7±14,1 (120-181)	152,7±14,1 (120-181)	152,7±14,1 (120-181)	152,7±14,1 (120-181)	152,7±14,1 (120-181)	0,0356 ^b	0,5501 ^a
kąt Cobba – początkowy (°)	9,6±3,2 (4-17)	9,4±3,8 (3-19)	7,4±2,5 (4-11)	0,2576 ^e	9,3±3,6 (4-15)	9,6±3,5 (3-17)	9,2±3,2 (5-19)	9,2±3,2 (5-19)	9,2±3,2 (5-19)	9,3±3,6 (4-15)	9,6±3,5 (3-17)	9,2±3,2 (5-19)	9,2±3,2 (5-19)	9,2±3,2 (5-19)	9,3±3,6 (4-15)	9,6±3,5 (3-17)	9,2±3,2 (5-19)	9,2±3,2 (5-19)	9,2±3,2 (5-19)	9,3±3,6 (4-15)	9,6±3,5 (3-17)	9,2±3,2 (5-19)	9,2±3,2 (5-19)	9,2±3,2 (5-19)	9,3±3,6 (4-15)	9,6±3,5 (3-17)	9,2±3,2 (5-19)	9,2±3,2 (5-19)	9,3±3,6 (4-15)	9,6±3,5 (3-17)	9,2±3,2 (5-19)	9,2±3,2 (5-19)	9,2±3,2 (5-19)	9,2±3,2 (5-19)	0,6089 ^c	0,8484 ^e	
kąt Cobba – maksymalny (°)	11,4±4,4 (4-25)	12,1±4,7 (5-25)	9,4±1,5 (7-11)	0,3361 ^e	9,9±3,7 (4-15)	12,0±4,2 (5-25)	11,5±4,7 (5-25)	11,5±4,7 (5-25)	11,5±4,7 (5-25)	9,9±3,7 (4-15)	12,0±4,2 (5-25)	11,5±4,7 (5-25)	11,5±4,7 (5-25)	11,5±4,7 (5-25)	9,9±3,7 (4-15)	12,0±4,2 (5-25)	11,5±4,7 (5-25)	11,5±4,7 (5-25)	11,5±4,7 (5-25)	9,9±3,7 (4-15)	12,0±4,2 (5-25)	11,5±4,7 (5-25)	11,5±4,7 (5-25)	11,5±4,7 (5-25)	9,9±3,7 (4-15)	12,0±4,2 (5-25)	11,5±4,7 (5-25)	11,5±4,7 (5-25)	9,9±3,7 (4-15)	12,0±4,2 (5-25)	11,5±4,7 (5-25)	11,5±4,7 (5-25)	11,5±4,7 (5-25)	11,5±4,7 (5-25)	11,5±4,7 (5-25)	0,3078 ^c	0,5513 ^e
kąt Cobba – ostatyczny (°)	10,7±4,7 (3-25)	11,3±4,7 (5-25)	9,4±1,5 (7-11)	0,7303 ^e	9,5±3,6 (3-15)	11,2±4,5 (4-25)	10,8±5,0 (3-25)	10,8±5,0 (3-25)	10,8±5,0 (3-25)	9,5±3,6 (3-15)	11,2±4,5 (4-25)	10,8±5,0 (3-25)	10,8±5,0 (3-25)	10,8±5,0 (3-25)	9,5±3,6 (3-15)	11,2±4,5 (4-25)	10,8±5,0 (3-25)	10,8±5,0 (3-25)	10,8±5,0 (3-25)	9,5±3,6 (3-15)	11,2±4,5 (4-25)	10,8±5,0 (3-25)	10,8±5,0 (3-25)	10,8±5,0 (3-25)	9,5±3,6 (3-15)	11,2±4,5 (4-25)	10,8±5,0 (3-25)	10,8±5,0 (3-25)	9,5±3,6 (3-15)	11,2±4,5 (4-25)	10,8±5,0 (3-25)	10,8±5,0 (3-25)	10,8±5,0 (3-25)	10,8±5,0 (3-25)	10,8±5,0 (3-25)	0,1739 ^c	0,7545 ^e
kąt Cobba – początkowy (°)	28,2±9,2 (11-48)	26,0±8,3 (10-42)	28,6±4,2 (22-35)	0,5053 ^e	26,6±6,8 (13-38)	28,6±9,7 (10-48)	26,9±8,3 (11-46)	26,9±8,3 (11-46)	26,9±8,3 (11-46)	26,6±6,8 (13-38)	28,6±9,7 (10-48)	26,9±8,3 (11-46)	26,9±8,3 (11-46)	26,9±8,3 (11-46)	26,6±6,8 (13-38)	28,6±9,7 (10-48)	26,9±8,3 (11-46)	26,9±8,3 (11-46)	26,9±8,3 (11-46)	26,6±6,8 (13-38)	28,6±9,7 (10-48)	26,9±8,3 (11-46)	26,9±8,3 (11-46)	26,9±8,3 (11-46)	26,6±6,8 (13-38)	28,6±9,7 (10-48)	26,9±8,3 (11-46)	26,9±8,3 (11-46)	26,6±6,8 (13-38)	28,6±9,7 (10-48)	26,9±8,3 (11-46)	26,9±8,3 (11-46)	26,9±8,3 (11-46)	26,9±8,3 (11-46)	26,9±8,3 (11-46)	0,3960 ^b	0,8387 ^e
kąt Cobba – maksymalny (°)	45,3±21,3 (13-110)	41,8±18,3 (13-114)	34,3±8,3 (22-47)	0,4574 ^e	37,1±16,9 (15-90)	46,8±19,6 (13-110)	42,2±21,1 (13-114)	42,2±21,1 (13-114)	42,2±21,1 (13-114)	37,1±16,9 (15-90)	46,8±19,6 (13-110)	42,2±21,1 (13-114)	42,2±21,1 (13-114)	42,2±21,1 (13-114)	37,1±16,9 (15-90)	46,8±19,6 (13-110)	42,2±21,1 (13-114)	42,2±21,1 (13-114)	42,2±21,1 (13-114)	37,1±16,9 (15-90)	46,8±19,6 (13-110)	42,2±21,1 (13-114)	42,2±21,1 (13-114)	42,2±21,1 (13-114)	37,1±16,9 (15-90)	46,8±19,6 (13-110)	42,2±21,1 (13-114)	42,2±21,1 (13-114)	37,1±16,9 (15-90)	46,8±19,6 (13-110)	42,2±21,1 (13-114)	42,2±21,1 (13-114)	42,2±21,1 (13-114)	42,2±21,1 (13-114)	42,2±21,1 (13-114)	0,5627 ^c	0,4847 ^e
kąt Cobba – ostatyczny (°)	44,2±22,2 (11-110)	40,3±48,9 (12-114)	33,0±9,7 (21-47)	0,4464 ^e	36,3±17,2 (15-90)	45,9±20,5 (12-110)	40,5±22,0 (11-114)	40,5±22,0 (11-114)	40,5±22,0 (11-114)	36,3±17,2 (15-90)	45,9±20,5 (12-110)	40,5±22,0 (11-114)	40,5±22,0 (11-114)	40,5±22,0 (11-114)	36,3±17,2 (15-90)	45,9±20,5 (12-110)	40,5±22,0 (11-114)	40,5±22,0 (11-114)	40,5±22,0 (11-114)	36,3±17,2 (15-90)	45,9±20,5 (12-110)	40,5±22,0 (11-114)	40,5±22,0 (11-114)	40,5±22,0 (11-114)	36,3±17,2 (15-90)	45,9±20,5 (12-110)	40,5±22,0 (11-114)	40,5±22,0 (11-114)	36,3±17,2 (15-90)	45,9±20,5 (12-110)	40,5±22,0 (11-114)	40,5±22,0 (11-114)	40,5±22,0 (11-114)	40,5±22,0 (11-114)	40,5±22,0 (11-114)	0,5089 ^c	0,4223 ^e

^aNiewystarczająca liczba; ^bTest t-studenta; ^cTest Manna-Whitney'a; ^dTest ANOVA; ^eTest Kruskala-Wallis; KRT – kąt rotacji tułowia

5.4. Ocena mocy testów

5.4.1. Ocena otrzymanej mocy stystycznej testu χ^2 w analizie częstości występowania alleli w grupie badanej i grupie kontrolnej

W przeprowadzonym badaniu grupa badana składała się ze 144 wyselekcjonowanych pod względem klinicznym pacjentek ze skoliozą idiopatyczną, a grupa kontrolna składała się z 48 zdrowych kobiet. Na podstawie otrzymanych wyników częstości występowania alleli w grupie kontrolnej, z uwzględnieniem liczebności grup, poziomu istotności $\alpha = 0,05$ i założonej mocy $1-\beta = 80\%$, obliczono możliwy w tych warunkach do wykrycia OR, tabela 5.4.1.

Tabela 5.4.1. Możliwy do wykrycia iloraz szans OR w odniesieniu do częstości występowania alleli w grupie kontrolnej, dla mocy 80% testu χ^2 , przy założeniu poziomu istotności statystycznej $\alpha = 0,05$

SNP	Allel	Grupa kontrolna N (%)	możliwy do otrzymania iloraz szans OR
<i>XbaI</i>	A	64 (66,7%)	1,95
	G	32 (33,3%)	0,51
<i>PvuII</i>	C	47 (49,0%)	1,93
	T	49 (51,0%)	0,51
<i>BstI</i>	T	80 (83,3%)	2,2
	A	16 (16,7%)	0,46
<i>AlwNI</i>	C	78 (81,3%)	2,19
	T	18 (18,7%)	0,45
<i>AluI</i>	A	42 (43,7%)	1,83
	G	54 (56,3%)	0,54
<i>RsaI</i>	A	5 (5,2%)	3,3
	G	91 (94,8%)	0,3

OR – iloraz szans obliczono dla oddziaływania pozytywnego i negatywnego

5.4.2. Ocena otrzymanej mocy testu χ^2 w analizie częstości występowania alleli

W przeprowadzonym powyżej badaniu stwierdzono istotną różnicę w częstości występowania alleli C i T polimorfizmu *PvuII* pomiędzy podgrupą pacjentów z kątem Cobba poniżej 30° a podgrupą pacjentów z kątem Cobba 50° i więcej. W powyższej analizie otrzymano wartość ilorazu szans OR 1,95, tabela 5.3.9. Po przeanalizowaniu częstości alleli i ilorazu szans oraz przeprowadzeniu testu post hoc otrzymano moc testu 58%.

5.4.3. Ocena otrzymanej mocy testu dokładnego Fishera w analizie częstości występowania genotypów

W przeprowadzonym powyżej badaniu stwierdzono istotną różnicę w częstości występowania genotypów polimorfizmu *PvuII* pomiędzy podgrupą pacjentów z kątem Cobba poniżej 30° a podgrupą pacjentów z kątem Cobba 50° i więcej. Przy założeniu dominującego sposobu dziedziczenia, w powyższej analizie otrzymano wartość ilorazu szans OR 7,14, tabela 5.3.11. Po przeanalizowaniu częstości alleli i ilorazu szans oraz przeprowadzeniu testu post hoc otrzymano moc testu 90%.

W przeprowadzonym powyżej badaniu stwierdzono istotną różnicę w częstości występowania genotypów polimorfizmu *AluI* pomiędzy podgrupą pacjentów z kątem Cobba poniżej 30° a podgrupą pacjentów z kątem Cobba 50° i więcej. Przy założeniu recesywnego sposobu dziedziczenia, w powyższej analizie otrzymano wartość ilorazu szans OR 8,32, tabela 5.3.14. Po przeanalizowaniu częstości alleli i ilorazu szans oraz przeprowadzeniu testu post hoc otrzymano moc testu 61,5%.

5.5. Ocena częstości alleli w grupie kontrolnej

W porównaniu otrzymanej w powyższym badaniu częstości występowania alleli badanych polimorfizmów nie wykazała różnicy w porównaniu z opisywaną częstością badanych alleli sła populacji kaukaskiej.

Tabela 5.5.1. Porównanie częstości występowania alleli w grupie kontrolnej w powyższym badaniu z danymi z piśmiennictwa

SNP	Artykuł	Allel	Grupa kontrolna N (%)	Częstość występowania alleli na podstawie piśmiennictwa N (%)	Istotność różnicy p
<i>XbaI</i>	Roszkowska-Gancarz i wsp [133]	A	64 (66,7%)	508 (61,4%)	0,3101 ^a
		G	32 (33,3%)	320 (38,6%)	
<i>PvuII</i>	Roszkowska-Gancarz i wsp [133]	C	47 (49,0%)	435 (52,5%)	0,5065 ^a
		T	49 (51,0%)	393 (47,5%)	
<i>BsyI</i>	HapMap [132]	T	80 (83,3%)	105 (82,0%)	0,7992 ^a
		A	16 (16,7%)	23 (18,0%)	
<i>AlwNI</i>	HapMap [132]	C	78 (81,3%)	98 (81,7%)	0,9376 ^a
		T	18 (18,7%)	22 (18,3%)	
<i>AluI</i>	Dziedziejko i wsp. [134]	A	42 (43,7%)	198 (39,6%)	0,4476 ^a
		G	54 (56,3%)	302 (60,4%)	
<i>RsaI</i>	Pawlik i wsp. [135]	A	5 (5,2%)	22 (6,7%)	0,7910 ^b
		G	91 (94,8%)	310 (93,3%)	

^a test Chi², ^b test Chi² z poprawką Yatesa; CEU – populacja kaukaska z Utah w USA, która składa się z potomków osadników z Europy; tabela zawiera porównanie rozkładu genotypów uzyskanych w grupie kontrolnej powyższego badania (dane zawarte w pierwszym wierszu) z danymi z piśmiennictwa

6. Omówienie wyników i dyskusja

6.1. Omówienie kryteriów włączenia

Do badania włączono wyłącznie kobiety. Było to związane z potrzebą ujednolicenia grup oraz ze zjawiskiem częstszego występowania dużych skolioz idiopatycznych u dziewcząt niż u chłopców [30 ,33, 35]. Wybór jedynie płci żeńskiej wydaje się być również zasadny ze względu na badanie polimorfizmów w obrębie genów receptorów estrogenowych.

Do grupy badanej zakwalifikowano jedynie pacjentki ze skoliozami idiopatycznymi piersiowymi prawostronnymi (typ 1 wg Lenke [111]) lub dwułukowymi piersiowymi prawostronnymi i lędźwiowymi lewostronnymi z przewagą skrzywienia piersiowego (typ 3 wg Lenke [111]). Wybór zbliżonych morfologicznie typów skolioz idiopatycznych miał na celu zdefiniowanie precyzyjnych fenotypów, a przez to zwiększenie mocy badania.

Podział grupy badanej na podgrupy ze względu na tempo progresji był bezpośrednio związany z obrazem klinicznym i koniecznością planowania dalszego leczenia.

Pierwszą grupę stanowiły pacjentki z idiopatycznymi skoliozami szybko progresującymi RP-IS. Była to grupa pacjentek ze złym rokowaniem i dużym ryzykiem operacji. Taki typ skoliozy idiopatycznej ma duże znaczenie kliniczne ze względu na potrzebę szybkiej ich identyfikacji, intensywnego leczenia zachowawczego i ewentualnie wczesnej interwencji chirurgicznej.

Drugą grupę stanowiły pacjentki z postacią wolno progresującą skoliozy idiopatycznej SP-IS. Była to grupa pacjentek wymagająca leczenia zachowawczego i w niektórych przypadkach interwencji operacyjnej, jednakże tempo zmian było umiarkowane i ryzyko powstania dużych i bardzo dużych skolioz było małe.

Trzecią grupę stanowiły pacjentki z postacią nieprogresywną skoliozy idiopatycznej NP-IS. Były to pacjentki, u których progresja skoliozy zatrzymała się samoistnie na niewielkim skrzywieniu. Były to pacjentki rokujące dobrze, u których skrzywienie nie wymaga leczenia. Do tej grupy zakwalifikowano pacjentki ze skoliozą idiopatyczną z kątem Cobba od 10° do 30°. Granicę 30° ustalono na podstawie prac Weinstein i wsp., którzy w pięćdziesięcioletniej obserwacji pacjentów ze skoliozą idiopatyczną wykazali, że tego typu skrzywienia nie mają tendencji do dalszej progresji i nie mają wpływu na życie pacjenta [43].

Poziom graniczny tempa progresji rozdzielający RP-IS i SP-IS, wynoszący 1° na miesiąc, był ustalony na podstawie prac Dimeglio i wsp., którzy sugerowali, że skoliozy szybko progresujące mają bardzo wysokie ryzyko konieczności leczenia operacyjnego [38].

Podział na podgrupy związany z oceną ciężkości przebiegu skoliozy w zależności od wielkości kąta Cobba był opisywany przez Wu i wsp. [83], Zhanga i wsp. [87] oraz Zhao i wsp. [67]. Również podział ze względu na zastosowane leczenie jest istotny rokowniczo i stosowany był w innych badaniach [82, 83, 84].

Zastosowanie podziału grupy badanej na podgrupy w sposób opisany w piśmiennictwie ułatwiło porównanie otrzymanych wyników z opublikowanymi badaniami.

Podział pacjentów według występowania wiotkości wielostawowej jest podziałem nowym, nieopisywanym dotychczas w badaniach genetycznych. Jednakże związek wiotkości ze skoliozą idiopatyczną jest zjawiskiem opisywanym w literaturze [138, 139].

6.2. Omówienie wyników badania klinicznego i radiologicznego

Pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną w badaniu klinicznym wystąpiły statystycznie istotne różnice, które wynikają z poczynionych na etapie planowania założeń i nie miały wpływu na wynik badania genetycznego.

Pomiędzy grupą badaną i kontrolną istnieje istotna różnica wieku, który wynosił średnio 17,3 lat w grupie badanej i 30 lat w grupie kontrolnej. Wybór kobiet dojrzałych do grupy kontrolnej był zaplanowany, celem uniknięcia skrzywień, które mogłyby pojawić się w wieku młodzieńczym. Pomimo, iż z czasem zmienia się poziom metylacji DNA, sama informacja genetyczna nie zmienia się z wiekiem. W przypadku badania genetycznego wiek nie wpływa na jego wynik [140]. Nie było założeniem badania otrzymanie grup o podobnym wieku.

Większy ciężar ciała jest następstwem różnicy wieku, gdyż średni ciężar ciała i BMI w populacji polskiej zwiększa się z wiekiem [141].

Różnica w wysokości może wynikać z faktu, iż w obliczeniach uwzględniono wzrost zmierzony, bez uwzględnienia wpływu kąta skrzywienia. W przypadku, gdy

30,5% pacjentek miało kąt skrzywienia 50° i więcej, wpływ ten mógł być istotny. Istniała tendencja do późniejszego wystąpienia miesiączki u pacjentek ze skoliozą idiopatyczną w porównaniu z grupą kontrolną, nie była ona jednak istotna statystycznie.

Różnice pomiędzy podgrupami pacjentów ze skoliozami idiopatycznymi nieprogressywnymi (NP-IS), wolno progresującymi (NP-IS) oraz szybko progresującymi (RP-IS) dotyczące KRT, kąta Cobba, progresji, tempa progresji i testu Rissera są następstwem założeń i są zgodne z przewidywaniami.

Wcześniejszy wiek rozpoznania w skoliozach szybko progresujących jest zjawiskiem, które może być związane z szybszym osiągnięciem wartości zauważalnych przez rodziców i na badaniach przesiewowych, o czym może również świadczyć większy początkowy kąt Cobba.

Niższy wzrost w podgrupie skolioz szybko progresujących, w której 94% pacjentek ma kąt Cobba powyżej 45°, jest prawdopodobnie związany z faktem uwzględnienia w obliczeniach wzrostu zmierzonego, bez zmodyfikowania go o kąt Cobba.

6.3. Omówienie wyników w obrębie poszczególnych polimorfizmów

6.3.1. Polimorfizm *XbaI* (rs9340799)

Polimorfizm *XbaI* znajduje się w intronie 1 i zmiana A/G nie powoduje bezpośredniej zmiany w sekwencji aminokwasów receptora estrogenowego typu 1. Jednakże może on mieć wpływ modulujący ekspresję genu lub być sprzężony z polimorfizmem odpowiedzialnym za patomechaniczne podłoże badanej choroby [142, 143].

Rozkład genotypów w grupie kontrolnej był zbliżony do opisywanego w literaturze rozkładu dla rasy kaukaskiej oraz dla danych z bazy HapMap, tabela 6.1.

Tabela 6.1. Częstość występowania polimorfizmu *XbaI* w populacji kaukaskiej w odniesieniu do grupy kontrolnej powyższego badania

	Populacja	N	Polimorfizm <i>XbaI</i> (rs9340799)			Istotność różnicy p ^a
			AA	AG	GG	
Bieżące badanie;	polska	48	43,8%	45,8%	10,4%	
Grupa kontrolna						
HapMap	CEU	59	49,1%	42,4%	8,5%	0,8419
[132]						
Roszkowska-Gancarz i	polska	414	37,9%	46,9%	15,2%	0,5879
wsp. [133]						
Ignaszak-Szczepaniak i	polska	163	39,9%	51,5%	8,6%	0,7734
wsp. [144]						
Becherini i wsp. [145]	włoska	610	34,9%	45,9%	19,2%	0,2442

^a test Chi²; CEU –populacja kaukaska z Utah w USA, która składa się z potomków osadników z Europy; tabela zawiera porównanie rozkładu genotypów uzyskanych w grupie kontrolnej powyższego badania (dane zawarte w pierwszym werście) z danymi z piśmiennictwa

W rozkładzie alleli i genotypów nie wykazano istotnych różnic między grupą badaną a grupą kontrolną, co oznacza, że postulowany uprzednio przez Wu i wsp. [83]

związek polimorfizmu *XbaI* nie został potwierdzony w powyższym badaniu. Wyniki własne były zgodne z badaniami Takahashiego i wsp. [85] oraz Tanga i wsp. [84].

Nie potwierdzono występowania różnicy w rozkładzie genotypów pomiędzy pacjentami z kątem Cobba mniejszym niż 40° i większym lub równym 40°, podczas gdy postulowana przez Wu i wsp. różnica była znacząca dla genotypu XX, a OR wynosiło 4,31 [83]. Nie wykazano różnic w wartości kąta Cobba dla różnych genotypów tego polimorfizmu co postulował Inoue i wsp. [82]. Nie wykazano związku genotypu AA (xx) z rzadszym leczeniem operacyjnym [82].

W analizie ciężkości przebiegu skoliozy idiopatycznej wyrażonej jako wielkość skrzywienia (ocena wartości średnich kąta Cobba dla poszczególnych genotypów oraz podział na podgrupy podzielone ze względu na wartość kąta Cobba) nie wykazano istotnego związku z polimorfizmem *XbaI*. Wyniki te są zgodne z doniesieniami Takahashiego i wsp. [85] oraz Tanga i wsp. [84].

Nie wykazano związku polimorfizmu *XbaI* z postacią nieprogresywną, wolno progresującą ani szybko progresującą skoliozy idiopatycznej.

W porównaniu pacjentów ze skoliozą idiopatyczną podzielonych na podgrupy podobne klinicznie nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w zakresie częstości występowania alleli i genotypów polimorfizmu *XbaI*, niezależnie od badanego sposobu dziedziczenia.

Nie stwierdzono istotnych różnic w wartościach średnich wyników badania klinicznego i radiologicznego dla poszczególnych genotypów polimorfizmu *XbaI*, tabela 5.3.27.

Nie wykazano postulowanego wcześniej związku genotypów tego polimorfizmu z wiekiem pierwszej miesiączki, opisanego przez Stavrou i wsp. [146] oraz Silva i wsp. [147], co jest zgodne z badaniami Mitchell i wsp. [148] i Manuck i wsp. [149].

6.3.2. Polimorfizm *PvuII* (rs2234693)

Polimorfizm *PvuII* znajduje się w intronie 1 i zmiana C/T nie powoduje bezpośredniej zmiany w sekwencji aminokwasów receptora estrogenowego typu 1. Jednakże może on mieć wpływ modulujący ekspresję genu lub być sprzężony z polimorfizmem odpowiedzialnym za patomechaniczne podłoże badanej choroby [142, 143].

Rozkład genotypów w grupie kontrolnej był zbliżony do opisywanego w literaturze rozkładu dla rasy kaukaskiej oraz dla danych z bazy HapMap, tabela 6.2.

Tabela 6.2. Częstość występowania polimorfizmu *PvuII* w populacji kaukaskiej w odniesieniu do grupy kontrolnej powyższego badania

	Populacja	N	Polimorfizm <i>PvuII</i> (rs2234693)			Istotność różnicy p ^a
			CC	CT	TT	
Bieżące badanie; Grupa kontrolna	polska	48	25,0%	47,9%	27,1%	
HapMap [132]	CEU	103	27,2%	56,3%	16,5%	0,3114
Roszkowska-Gancarz i wsp. [133]	polska	414	28,5%	38,1%	23,4%	0,8070
Ignaszak-Szczepaniak i wsp. [144]	polska	163	25,8%	47,8%	26,4%	0,9923
Becherini i wsp. [145]	włoska	610	29,0%	49,0%	22,0%	0,6763

^a test Chi²; CEU – populacja kaukaska z Utah w USA, która składa się z potomków osadników z Europy; tabela zawiera porównanie rozkładu genotypów uzyskanych w grupie kontrolnej powyższego badania (dane zawarte w pierwszym wierszu) z danymi z piśmiennictwa

W rozkładzie alleli i genotypów polimorfizmu *PvuII* nie wykazano istotnych różnic między grupą badaną a grupą kontrolną. Jest to zgodne z uprzednio publikowanymi badaniami Wu i wsp. [83], Tanga i wsp. [84] i Takahashiego i wsp. [85]. Nie potwierdzono natomiast doniesień Zhao i wsp., którzy opisywali różnice w częstości występowania alleli polimorfizmu *PvuII* pomiędzy pacjentkami ze skoliozą piersiową i skoliozą dwułukową a grupą kontrolną [67].

Stwierdzono różnicę w rozkładzie częstości alleli polimorfizmu *PvuII* pomiędzy pacjentami z postacią nieprogresywną, wolno progresującą i szybko progresującą skoliozy idiopatycznej. Istotnie rzadziej w podgrupie skolioz wolno progresujących niż w pozostałych podgrupach występował allel C. W analizie częstości występowania genotypów wśród pacjentów z postacią nieprogresywną, wolno progresującą i szybko progresującą skoliozy idiopatycznej wykazano statystycznie istotną różnicę rozkładu genotypów niezależną od modelu dziedziczenia. Po uwzględnieniu modeli dziedziczenia dominującego i recesywnego wciąż istniała tendencja do różnicy w rozkładzie genotypów, jednakże nie przekraczała ona wartości istotności statystycznej $p=0,0594$ i $p=0,0636$. W przypadku dziedziczenia dominującego w grupie skolioz wolno progresujących częściej niż w pozostałych grupach występował genotyp TT, natomiast w przypadku dziedziczenia recesywnego w grupie skolioz wolno progresujących rzadziej niż w pozostałych grupach występował genotyp CC. Tego typu analiza nie została przeprowadzona przez innych badaczy.

Zhao i wsp. opisali związek polimorfizmu *PvuII* ze skoliozą idiopatyczną z kątem Cobba powyżej 40° [67]. Ich porównanie opierało się na wykazaniu różnicy w częstości występowania alleli pomiędzy pacjentami ze skoliozą z kątem Cobba powyżej 40° a gru-

pą kontrolną. U pozostałych badaczy nie wykazano związku polimorfizmu *PvuII* z wielkością kąta Cobba [82, 83, 84, 85].

W powyższym badaniu stwierdzono statystycznie istotną różnicę w częstości występowania alleli polimorfizmu *PvuII* pomiędzy pacjentami ze skoliozą idiopatyczną z kątem Cobba $<30^\circ$ a pacjentami ze skoliozą idiopatyczną z kątem Cobba $\geq 50^\circ$. W skoliozach z mniejszym kątem Cobba częściej występował allel C z OR 1,95 przy $p=0,0364$.

Zastosowanie porównania częstości występowania alleli i genotypów w podgrupach skolioz idiopatycznych z kątem Cobba $<30^\circ$ z podgrupą skolioz idiopatycznych z kątem Cobba 50° i więcej miało na celu wykluczenie postaci pośrednich, które mogły zacierać obraz kliniczny.

Stwierdzono statystycznie istotną różnicę w rozkładzie genotypów powyższego polimorfizmu zarówno w porównaniu trzech podgrup pacjentów ze skoliozą idiopatyczną podzielonych ze względu na wartość kąta Cobba na skoliozy poniżej 30° , pomiędzy 30° i 50° oraz 50° i więcej.

Statystycznie istotną różnicę w rozkładzie genotypów stwierdzono również w porównaniu pacjentów ze skoliozą idiopatyczną z kątem Cobba poniżej 30° oraz pacjentów ze skoliozą idiopatyczną z kątem Cobba 50° i więcej. Zjawisko to występowało w przypadku dziedziczenia dominującego jak i oceny genotypów bez uwzględnienia rodzaju dziedziczenia. Przy założeniu dziedziczenia dominującego uzyskano OR=7,14 przy $p=0,0017$, co świadczy o znacznie częstszym występowaniu genotypu TT w grupie pacjentów ze skoliozą idiopatyczną z kątem Cobba 50° i więcej, niż u pacjentów z kątem Cobba poniżej 30° .

Należy zaznaczyć fakt, że w przypadku podgrupy pacjentów ze skoliozą idiopatyczną z kątem Cobba $\geq 50^\circ$ wystąpiło odstępstwo od równowagi HWE. Zjawisko takie może się pojawić gdy w populacji występują migracje, istnieje dryft genetyczny promujący jedną cechę, w badanej grupie występują populacje mieszane, wystąpił błąd w badaniach laboratoryjnych lub nastąpił nieprzypadkowy podział genotypów pod względem badanej cechy [84]. W powyższej pracy utrata równowagi HWE wydaje się mieć związek z podziałem pod względem kąta Cobba, czyli sugeruje związek genotypu TT z większymi wartościami kąta Cobba.

Podobna sytuacja wystąpiła w przypadku pacjentów leczonych operacyjnie. Jednakże w przypadku porównania częstości występowania genotypów u pacjentów leczonych zachowawczo i operacyjnie, różnica ta nie była istotna statystycznie.

W opublikowanych badaniach nie wykazano związku polimorfizmu *PvuII* z zastosowaniem leczenia operacyjnego, co jest zgodne z wynikami powyższego badania [82].

Nie wystąpiło odstępstwo od równowagi HWE w obrębie polimorfizmu *PvuII* w przypadku innych podziałów i analiz.

Nie wykazano różnicy w częstości występowania alleli i genotypów w obrębie polimorfizmu *PvuII* w podgrupie pacjentów z kątem Cobba poniżej 40° oraz pacjentów z kątem Cobba 40° i więcej.

Nie stwierdzono istotnych różnic w wartościach średnich wyników badania klinicznego i radiologicznego dla poszczególnych genotypów polimorfizmu *PvuII*, tabela 5.3.27.

Nie wykazano postulowanego wcześniej związku genotypów tego polimorfizmu z wiekiem pierwszej miesiączki opisanego przez Silva i wsp. [147], co było zgodne z badaniami Mitchell i wsp [148], Stavrou i wsp. [146] i Manuck i wsp. [149].

6.3.3. Polimorfizm *BsyI* (rs7757956)

Polimorfizm *BsyI* znajduje się w intronie 4 i zmiana A/T nie powoduje bezpośredniej zmiany w sekwencji aminokwasów receptora estrogenowego typu 1. Jednakże może on mieć wpływ modulujący ekspresję genu lub być sprzężony z polimorfizmem odpowiedzialnym za patomechaniczne podłoże badanej choroby [142, 143].

Rozkład genotypów w grupie kontrolnej był zbliżony do opisywanego w literaturze rozkładzie dla rasy kaukaskiej oraz dla danych z bazy HapMap, tabela 6.3. Nie znaleziono badań nad tym polimorfizmem w populacji polskiej.

Tabela 6.3. Częstość występowania polimorfizmu *BsyI* w populacji kaukaskiej w odniesieniu do grupy kontrolnej powyższego badania

	Populacja	N	Polimorfizm <i>BsyI</i> (rs7757956)			Istotność różnicy p ^a
			TT	AT	AA	
Bieżące badanie; Grupa kontrolna	polska	48	72,9%	20,8%	6,3%	
HapMap [132]	CEU	64	70,3%	23,4%	6,2%	0,9468
Tobias i wsp. [127]	kaukaska; angielska	9514	74,4%	23,6%	2,0%	0,989

^a test Chi²; CEU – populacja kaukaska z Utah w USA, która składa się z potomków osadników z Europy; tabela zawiera porównanie rozkładu genotypów uzyskanych w grupie kontrolnej powyższego badania (dane zawarte w pierwszym werście) z danymi z piśmiennictwa

W rozkładzie alleli i genotypów polimorfizmu *BsyI* nie wykazano istotnych różnic między grupą badaną a grupą kontrolną.

Nie wykazano związku polimorfizmu *Bsyl* z postacią nieprogresywną, wolno progresującą ani szybko progresującą skoliozy idiopatycznej.

W porównaniu pacjentów podzielonych na podgrupy ze względu na podobną klinicznie postać skoliozy idiopatycznej nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w zakresie częstości występowania alleli i genotypów polimorfizmu *Bsyl* niezależnie od badanego sposobu dziedziczenia.

Nie stwierdzono istotnych różnic w wartościach średnich wyników badania klinicznego i radiologicznego dla poszczególnych genotypów polimorfizmu *Bsyl*, tabela 5.3.27.

Nie wykazano postulowanego wcześniej związku genotypów tego polimorfizmu z masą ciała [127].

Wystąpiła tendencja do powiązania genotypów polimorfizmu *Bsyl* z ciężarem ciała i BMI, w sposób opisany przez Tobiasa i wsp. [127]. Genotypy TT i AT były związane z niższą masą. Wartości p były bliskie granicy istotności statystycznej, jednakże jej nie przekroczyły, odpowiednio $p=0,058$ i $p=0,0782$, tabela 5.3.27.

6.3.4. Polimorfizm *AlwNI* (rs1256120)

Polimorfizm *AlwNI* znajduje się w regionie 5' UTR genu, czyli w obszarze mRNA nieulegającym translacji, którego funkcja związana jest kontrolą translacji. 5'UTR jest sekwencją regulatorową położoną przed sekwencją kodującą [142]. W tym przypadku zmiana C/T nie powoduje bezpośredniej zmiany w sekwencji aminokwasów receptora estrogenowego typu 1, może jednak mieć wpływ modulujący ekspresję genu lub być sprzężony z polimorfizmem odpowiedzialnym za patomechaniczne podłoże badanej choroby [142, 143].

Rozkład genotypów w grupie kontrolnej był zbliżony do opisywanego dla danych z bazy HapMap, tabela 6.4. Nie znaleziono badań nad powyższym polimorfizmem w populacji polskiej oraz kaukaskiej. Porównanie grupy kontrolnej bieżącego badania z opisywaną w literaturze częstością występowania genotypów rasy chińskiej i japońskiej zamieszczono w tabeli 6.4.

Tabela 6.4. Częstość występowania polimorfizmu *AlwNI* w populacji kaukaskiej w odniesieniu do grupy kontrolnej powyższego badania

	Populacja	N	Polimorfizm <i>AlwNI</i> (rs1256120)			Istotność różnicy p ^a
			CC	CT	TT	
Bieżące badanie; Grupa kontrolna	polska	48	64,6%	33,3%	2,1%	
HapMap[132]	CEU	120	66,7%	30,0%	3,3%	0,8498
Zhang i wsp. [87]	chińska	140	53,6%	39,3%	7,1%	0,2634
Takahashi i wsp. [85]	japońska	637	39,6%	48,0%	12,4%	0.0016

^a test Chi²; CEU – populacja kaukaska z Utah w USA, która składa się z potomków osadników z Europy; tabela zawiera porównanie rozkładu genotypów uzyskanych w grupie kontrolnej powyższego badania (dane zawarte w pierwszym wiersie) z danymi z piśmiennictwa

W rozkładzie alleli i genotypów nie wykazano istotnych różnic między grupą badaną a grupą kontrolną, co oznacza, że postulowany uprzednio przez Zhanga i wsp. [87] związek polimorfizmu *AlwNI* nie został stwierdzony w powyższym badaniu. Według Zhanga i wsp. allel C i genotyp CC powinny istotnie częściej występować w grupie badanej niż kontrolnej, odpowiednio $p=0,016$ i OR 2,09 oraz $p=0,004$ [87]. Wyniki powyższego badania były zgodne z badaniami Takahashiego i wsp. [85].

W analizie ciężkości przebiegu skoliozy idiopatycznej wyrażonej jako wielkość skrzywienia (ocena wartości średnich kąta Cobba dla poszczególnych genotypów oraz podział na podgrupy podzielone ze względu na wartość kąta Cobba), nie wykazano istotnego związku z polimorfizmem *AlwNI*. Wyniki te były zgodne z doniesieniami Takahashiego i wsp. [85]. Nie potwierdzono natomiast opisanego przez Zhanga i wsp. częstszego występowania genotypu CC u pacjentów z kątem Cobba większym niż 30° w porównaniu z pacjentami z kątem Cobba mniejszym niż 30° [87].

Nie wykazano związku polimorfizmu *AlwNI* z postacią nieprogresywną, wolno progresującą ani szybko progresującą skoliozy idiopatycznej.

W porównaniu pacjentów podzielonych na podgrupy ze względu na podobną klinicznie postać skoliozy idiopatycznej, nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w zakresie częstości występowania alleli i genotypów polimorfizmu *AlwNI*, niezależnie od badanego sposobu dziedziczenia.

Nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w częstości występowania alleli i genotypów polimorfizmu *AlwNI* pomiędzy pacjentami leczonymi zachowawczo a operacyjne, jednakże istniała wyraźna tendencja do częstszego występowania allelu T w podgrupie leczonej zachowawczo w porównaniu z podgrupą leczoną operacyjnie przy $p=0,0735$ i przewidywanym OR 0,54 (co odpowiada OR 1,84 dla allelu C).

Nie stwierdzono istotnych różnic w wartościach średnich wyników badania klinicznego i radiologicznego dla poszczególnych genotypów polimorfizmu *AluNI*, tabela 5.3.28.

Nie wykazano również postulowanego przez Zhanga i wsp. związku tego polimorfizmu z wysokością ciała [87].

6.3.5. Polimorfizm *AluI* (rs4986938)

Polimorfizm *AluI* znajduje się w regionie 3' UTR genu, czyli w obszarze mRNA nieulegającym translacji, którego funkcja związana jest z kontrolą translacji [142]. W tym przypadku zmiana A/G nie powoduje bezpośredniej zmiany w sekwencji aminokwasów receptora estrogenowego typu 1, polimorfizm może mieć wpływ modulujący ekspresję genu lub być sprzężony z polimorfizmem odpowiedzialnym za patomechaniczne podłoże badanej choroby [143].

Rozkład genotypów w grupie kontrolnej był zbliżony do opisywanego w literaturze dla rasy kaukaskiej oraz dla danych z bazy HapMap, tabela 6.5.

Tabela 6.5. Częstość występowania polimorfizmu *AluI* w populacji kaukaskiej w odniesieniu do grupy kontrolnej powyższego badania

	Populacja	N	Polimorfizm <i>AluI</i> (rs4986938)			Istotność różnicy p ^a
			AA	AG	GG	
Bieżące badanie;	polska	48	16,7%	54,2%	29,2%	
Grupa kontrolna						
HapMap[132]	CEU	113	14,2%	47,8%	38,0%	0,5573
Pawlik i wsp. [135]	polska	156	8,3%	47,4%	44,3%	0,0879
Estwood i wsp. [150]	brytyjska	158	13,9%	47,5%	38,6%	0,4896
Dziedziejko i wsp. [134]	polska	250	16,4%	46,4%	37,2%	0,5392

^a test Chi²; CEU – populacja kaukaska z Utah w USA, która składa się z potomków osadników z Europy; tabela zawiera porównanie rozkładu genotypów uzyskanych w grupie kontrolnej powyższego badania (dane zawarte w pierwszym wierszu) z danymi z piśmiennictwa

W rozkładzie alleli i genotypów polimorfizmu *AluI* nie wykazano istotnych różnic między grupą badaną a grupą kontrolną.

Nie wykazano związku polimorfizmu *AluI* z postacią nieprogresywną, wolno progresującą ani szybko progresującą skoliozą idiopatyczną.

W obrębie polimorfizmu *AluI* wystąpiło odstępstwo od równowagi HWE w przypadku podgrupy pacjentów ze skoliozą idiopatyczną z kątem Cobba 50° i więcej. Zjawisko to wystąpiło również w podgrupie pacjentów ze skoliozami idiopatycznymi z kątem Cobba 40° i więcej. W pozostałych podgrupach nie zaistniała podobna sytuacja, co może świadczyć o nielosowym rozkładzie genotypów i rzadszym występowaniem genotypu AA w przypadku dużych skolioz.

W porównaniu częstości występowania genotypów polimorfizmu *AluI* pomiędzy podgrupą pacjentów ze skoliozą idiopatyczną z kątem Cobba poniżej 30° a podgrupą pacjentów ze skoliozą idiopatyczną z kątem Cobba 50° i więcej wykazano statystycznie istotną różnicę. Zarówno w przypadku porównania niezależnego od sposobu dziedziczenia jak i przy założeniu dziedziczenia recesywnego, wówczas OR wynosiło 8,32, przy wartości $p=0,0434$.

W porównaniu częstości występowania genotypów polimorfizmu *AluI* pomiędzy podgrupą pacjentów ze skoliozą idiopatyczną z kątem Cobba poniżej 40° a podgrupą pacjentów ze skoliozą idiopatyczną z kątem Cobba 40° i więcej genotyp AA występował ponad dwukrotnie częściej w podgrupie skolioz idiopatycznych z kątem Cobba poniżej 40° niż w podgrupie skolioz idiopatycznych z kątem Cobba 40° i więcej. Powyższa różnica okazała się statystycznie istotna przy porównaniu częstości występowania genotypów niezależnie od sposobu dziedziczenia $p=0,0243$.

Nie stwierdzono istotnych różnic w wartościach średnich wyników badania klinicznego i radiologicznego dla poszczególnych genotypów polimorfizmu *AluI*, tabela 5.3.28.

Nie wykazano postulowanego wcześniej związku genotypów tego polimorfizmu z wiekiem pierwszej miesiączki opisanego przez Stavrou i wsp. [130].

6.3.6. Polimorfizm *RsaI* (rs1256049)

Polimorfizm *RsaI* znajduje się w regionie kodującym eksonu 5 i jest związany z kodowaniem 328 aminokwasu receptora estrogenowego typu 2. Jednakże zmiana polimorfizmu A/G w tym miejscu nie wpływa na zmianę kodowanego aminokwasu i w obu przypadkach informacją zawartą w tym kodonie jest walina (328 Val > Val). Polimorfizm ten może być sprzężony z polimorfizmem odpowiedzialnym za patomechaniczne podłoże badanej choroby [142, 143].

Rozkład genotypów w grupie kontrolnej był zbliżony do opisywanego w literaturze rozkładzie dla rasy kaukaskiej oraz dla danych z bazy HapMap, tabela 6.6.

Tabela 6.6. Częstość występowania polimorfizmu *RsaI* w populacji kaukaskiej w odniesieniu do grupy kontrolnej powyższego badania

			Polimorfizm <i>RsaI</i> (rs1256049)			Istotność różnicy p^a
	Populacja		AA	AG	GG	
Bieżące badanie;	Polska	48	0	10,4%	89,6%	
Grupa kontrolna						
HapMap[132]	CEU	226	0	4,9%	95,1%	0,2501
Pawlik i wsp. [135]	polska	166	0,6%	12,3%	87,1%	0,8070
Estwood i wsp. [150]	brytyjska	158	0,6%	5,1%	94,3%	0,3563
Dziedziejko i wsp. [134]	polska	250	0,4%	12%	87,6%	0,8624

^a test Chi²; CEU – populacja kaukaska z Utah w USA, która składa się z potomków osadników z Europy; tabela zawiera porównanie rozkładu genotypów uzyskanych w grupie kontrolnej powyższego badania (dane zawarte w pierwszym wierszu) z danymi z piśmiennictwa

W rozkładzie alleli i genotypów polimorfizmu *RsaI* nie wykazano istotnych różnic między grupą badaną a grupą kontrolną.

Nie wykazano związku polimorfizmu *RsaI* z postacią nieprogresywną, wolno progresującą ani szybko progresującą skoliozy idiopatycznej.

W analizie ciężkości przebiegu skoliozy idiopatycznej wyrażonej jako wielkość kąta Cobba, w podziale na podgrupy skolioz poniżej 30°, pomiędzy 30° i 50° oraz 50° i więcej, wystąpiła istotna różnica w rozkładzie alleli $p=0,0424$ i genotypów, przy założeniu dziedziczenia dominującego $p=0,0353$. Różnica ta polegała na przewadze allelu A i genotypu AA w podgrupie pacjentów z kątem Cobba pomiędzy 30° i 50°.

Zależność ta nie wystąpiła w podgrupach pacjentów podzielonych ze względu na kąt Cobba na skrzywienia poniżej 40° oraz powyżej i równe 40°. Nie było różnicy w średniej wartości kąta Cobba dla poszczególnych genotypów powyższego polimorfizmu.

W analizie porównawczej wartości średnich wyników badania klinicznego i radiologicznego pomiędzy genotypami powyższego polimorfizmu wykazano istotną różnicę w obrębie wieku wystąpienia pierwszej miesiączki $p=0,0356$. Osoby z genotypem AG zaczynały miesiączkować o 9 miesięcy wcześniej niż z genotypem GG, tabela 5.3.28. Polimorfizm ten był analizowany pod kątem powiązania z wiekiem pierwszej miesiączki w greckiej populacji, jednakże w badanej wówczas grupie nie stwierdzono występowania polimorfizmu *RsaI*, wszystkie osoby miały genotyp GG [130].

W tej samej analizie pomiędzy genotypami AG i GG wystąpiła różnica wzrostu 3,5cm, która była bliska poziomowi istotności statystycznej $p=0,0573$, tabela 5.3.28.

6.4. Omówienie otrzymanych mocy testów statystycznych

Wyniki otrzymanych mocy dla badania pomiędzy grupą badaną i grupą kontrolną były zbliżone do zakładanych.

W przypadku analizy alleli polimorfizmu *PvuII* pomiędzy podgrupą pacjentów z kątem Cobba poniżej 30° a podgrupą pacjentów z kątem Cobba 50° i więcej stwierdzono moc ($\beta-1$) rzędu 90%, co znacznie przekracza próg 80%.

W analizie genotypów *PvuII* i *AluI* pomiędzy podgrupą pacjentów z kątem Cobba poniżej 30° a podgrupą pacjentów z kątem Cobba 50° i więcej moc była w granicach 60%, co określane jest jako moc wystarczająca do przeprowadzenia badania.

6.5. Kliniczne znaczenie badań genetycznych nad skoliozą idiopatyczną

Podłoże genetyczne skoliozy jako choroby wieloczynnikowej wydaje się być udowodnione poprzez liczne publikacje. Stopień wpływu genetycznego w stosunku do czynników środowiskowych jest niejednoznaczny, jednakże prace na bliźniętach sugerują wielkość tego wpływu na 38% [20]. Wśród polimorfizmów genów związanych ze skoliozą możemy wyróżnić geny związane z predyspozycją do skoliozy oraz geny modulujące jej przebieg. W powyższym badaniu nie uzyskano związku badanych polimorfizmów z predyspozycją do skoliozy.

Otrzymane wyniki nie są zgodne z początkowymi doniesieniami na temat związku polimorfizmów genów receptorów estrogenowych opublikowanymi przez Wu i wsp. [83] oraz Zhanga i wsp. [87], jednakże są podobne do wyników badań replikacyjnych [84, 85] przeprowadzonych na większych populacjach.

W powyższym badaniu dwa polimorfizmy wykazały potencjalny przebieg modulujący przebieg choroby. W obrębie genu receptora estrogenowego typu 1 polimorfizm miejsca restrykcyjnego enzymu *PvuII* oraz w obrębie genu receptora estrogenowego typu 1 polimorfizm miejsca restrykcyjnego enzymu *AluI*. Sytuacja, w której geny nie są związane z przyczyną powstania skoliozy, lecz predysponują do innego jej przebiegu, jest zjawiskiem, które może występować w chorobach wielogenowych. Biorąc pod uwagę opisane wcześniej częstsze występowanie i częstszą progresję SI u dziewcząt w okresie okołopokwitaniowym niż u chłopców, prawdopodobny wydaje się być fakt, iż receptory estrogenowe mają wpływ modulujący przebieg choroby niż stanowią jej podłoże. Taka sytuacja jest istotna klinicznie, gdyż może stanowić dodatkowe narzędzie pomagające przewidzieć przebieg skoliozy, co może mieć wpływ na intensywność leczenia zachowawczego, wyrażoną w długości noszenia gorsetu oraz wcześniejszej decyzji o leczeniu operacyjnym.

6.6. Podsumowanie

1. Nie wykazano różnicy w częstości występowania alleli i genotypów pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną.

2. Stwierdzono potencjalny związek allelu T i genotypu TT polimorfizmu *PvuII* genu *ESR1* z postacią wolno progresującą skoliozy idiopatycznej (SP-IS). W podgrupie pacjentów ze skoliozami idiopatycznymi wolno progresującymi (SP-IS) allel T i genotyp TT występował statystycznie istotnie częściej niż w podgrupach pacjentów ze skoliozami idiopatycznymi nieprogresywnymi (NP-IS) oraz szybko progresującymi (RP-IS).
3. Stwierdzono częstsze występowanie genotypu AA polimorfizmu *AluI* genu *ESR2* w skoliozach idiopatycznych z kątem Cobba poniżej 30° w porównaniu ze skoliozami idiopatycznymi z kątem Cobba 50° i więcej. Polimorfizm ten może wykazywać potencjalną wartość predykcyjną.
4. Stwierdzono częstsze występowanie genotypu AA polimorfizmu *AluI* genu *ESR2* w skoliozach idiopatycznych z kątem Cobba poniżej 40° w porównaniu ze skoliozami idiopatycznymi z kątem Cobba 40° i więcej. Polimorfizm ten może wykazywać potencjalną wartość predykcyjną.
5. Stwierdzono częstsze występowanie allelu C i genotypu CC polimorfizmu *PvuII* genu *ESR1* u pacjentów ze skoliozą idiopatyczną z kątem Cobba pomiędzy 30° i 50° oraz z kątem Cobba 50° i więcej w porównaniu z pacjentami ze skoliozą idiopatyczną z kątem Cobba poniżej 30°. Polimorfizm ten może wykazać potencjalną wartość predykcyjną.
6. Nie wykazano związku ze skoliozą idiopatyczną polimorfizmów *XbaI* w genie *ESR1* i *AlwNI* w genie *ESR2*, opisywanych we wcześniejszych badaniach.

7. Wnioski

1. Na podstawie badania klinicznego i radiologicznego zaistniała możliwość wyodrębnienia grup skolioz idiopatycznych o odmiennym przebiegu (skolioz idiopatycznych nieprogresywnych, wolno progresujących oraz szybko progresujących).
2. Częstość występowania polimorfizmów w obrębie genów receptorów estrogenowych u chorych ze skoliozą idiopatyczną oraz u zdrowych ochotników była porównywalna z częstością podawaną dla populacji kaukaskiej w publikacjach nie dotyczących skoliozy idiopatycznej.
3. Częstość występowania badanych polimorfizmów receptorów estrogenowych u osób zdrowych nie różniła się istotnie od częstości występowania badanych polimorfizmów receptorów estrogenowych u chorych ze skoliozą idiopatyczną. Oznacza to, że badane polimorfizmy nie są związane z predyspozycją do wystąpienia skoliozy.
4. Nie było możliwe jednoznaczne powiązanie postaci klinicznej skoliozy idiopatycznej (skoliozy idiopatycznej nieprogresywnej, wolno progresującej oraz szybko progresującej) z występowaniem określonych polimorfizmów receptorów estrogenowych, jednakże dwa z badanych polimorfizmów *AluI* oraz *PvuII* mogą wykazywać znaczenie prognostyczne.

8. Streszczenie

Wstęp

Skolioza idiopatyczna (SI) jest najczęstszą deformacją kręgosłupa populacji młodzieńczej. Może ona przebiegać w sposób stabilny albo wykazywać szybką progresję skrzywienia.

Opisywane jest częstsze występowanie skoliozy idiopatycznej w obrębie rodzin, w których już jeden członek rodziny cierpi na tę chorobę, w porównaniu z resztą populacji. Według piśmiennictwa ryzyko wystąpienia skoliozy idiopatycznej u krewnych zależy wprost proporcjonalnie od stopnia pokrewieństwa. Badania bliźniąt opisują, że u bliźniąt jednojajowych choroba występowała u obojga w 73% przypadków, a w przypadku dwujajowych u 36% przypadków.

Badania nad etiologią sugerują podłoże wieloczynnikowe SI z silną komponentą genetyczną. Wśród badanych genów opisywane były geny receptorów estrogenowych typu 1 i typu 2 (*ESR1*, *ESR2*). W obrębie genu *ESR1* opisany został związek polimorfizmu *XbaI* (rs9340799) z predyspozycją do SI, z wielkością skrzywienia, progresją skrzywienia oraz ryzykiem leczenia operacyjnego. Drugim opisywanym polimorfizmem był *PvuII* (rs2234693). Opisano jego związek z predyspozycją do SI i z wielkością skrzywienia. W obrębie genu *ESR2* opisany został związek polimorfizmu *AlwNI* (rs1256120) z predyspozycją do SI i z wielkością skrzywienia. Badania nad tymi polimorfizmami są rozbieżne. Nie było wykonanych badań nad powyższymi polimorfizmami w populacji kaukaskiej.

Cel pracy

Celem pracy było zbadanie czy w obrębie genów receptorów estrogenowych chorych ze skoliozą idiopatyczną występuje genetyczna odmienność powiązana z postacią kliniczną skoliozy (progresywna lub nieprogresywna).

Szczegółowe cele pracy:

- 1) Wyodrębnienie grup o odmiennym przebiegu u dzieci ze skoliozą idiopatyczną (szybko progresująca, wolno progresująca lub nieprogresywna) na podstawie badania klinicznego i radiologicznego.
- 2) Wyznaczenie częstości występowania ocenianych polimorfizmów genów receptorów estrogenowych typu 1 i typu 2 u wszystkich badanych.
- 3) Określenie różnic genetycznych pomiędzy grupami badanymi i grupą kontrolną.

- 4) Powiązanie postaci klinicznej skoliozy (szybko progresująca, wolno progresująca lub nieprogresywna) z występowaniem określonych polimorfizmów genów receptorów estrogenowych typu 1 i typu 2.

Materiał

Materiał stanowiły 144 pacjentki ze skoliozą idiopatyczną piersiową prawostronną lub dwułukową z przewagą piersiowej prawostronnej (grupa badana) oraz 48 kobiet bez skoliozy z ujemnym wywiadem rodzinnym w kierunku SI (grupa kontrolna).

Pacjentki podzielono na trzy grupy ze względu na obraz kliniczny.

- 1) Chore ze skoliozą idiopatyczną nieprogresywną (NP-IS), które miały udokumentowany radiologicznie brak progresji lub tempo progresji kąta Cobba mniejsze niż 1° na miesiąc obserwowane przez okres co najmniej 6 miesięcy oraz kąt Cobba poniżej 30° .
- 2) Chore ze skoliozą idiopatyczną wolno progresującą (SP-IS), które miały udokumentowane radiologicznie tempo progresji kąta Cobba mniejsze niż 1° na miesiąc przez okres co najmniej 6 miesięcy oraz kąt Cobba powyżej 30° .
- 3) Chore ze skoliozą idiopatyczną szybko progresującą (RP-IS), które miały udokumentowane radiologicznie tempo progresji kąta Cobba o 1° lub więcej na miesiąc przez okres co najmniej 6 miesięcy oraz kąt Cobba powyżej 30° .

Metodyka

Badanie składało się z części klinicznej, radiologicznej i genetycznej. Badaniu klinicznemu i genetycznemu zostały poddane wszystkie uczestniczki. Badanie radiologiczne dotyczyło wyłącznie pacjentek ze skoliozą idiopatyczną. Na jego podstawie określono typ skrzywienia, kąt Cobba, wynik testu Rissera, udokumentowaną progresję oraz tempo progresji.

W badaniu genetycznym przy zastosowaniu reakcji polimorfizmów długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) przeanalizowano 6 polimorfizmów.

W obrębie genu *ESR1*:

- 1) rs9340799 – *XbaI*,
- 2) rs2234693 – *PvuII*,
- 3) rs7757956 – *BstI*.

W obrębie genu *ESR2*:

- 1) rs1256120 – *AlwNI*,
- 2) rs4986938 – *AluI*,
- 3) rs1256049 – *RsaI*.

Analizę wyników badania genetycznego przeprowadzono w czterech etapach.

W pierwszym porównano wyniki otrzymane u pacjentów ze skoliozą idiopatyczną z wynikami grupy kontrolnej.

W drugim przeprowadzono analizę otrzymanych wyników genetycznych w podgrupach pacjentów ze skoliozą, poszukując ich związku z tempem progresji skoliozy idiopatycznej.

W trzecim etapie dokonano porównania otrzymanych wyników genetycznych w podgrupach pacjentów ze skoliozą podzielonych ze względu na zbliżoną postać kliniczną skoliozy.

W ostatnim etapie dla poszczególnych genotypów obliczono wartości średnie parametrów klinicznych i radiologicznych, i porównano je ze sobą.

Porównanie odmienności rozkładu częstości występowania alleli oraz genotypów w poszczególnych grupach wykonane zostały za pomocą testów χ^2 oraz testu dokładnego Fishera. Poziom istotności p przyjęto na 0,05, oraz przedział ufności CI 95%.

Wyniki

Nie wykazano różnicy w częstości występowania alleli i genotypów pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną.

Stwierdzono potencjalny związek allelu T i genotypu TT polimorfizmu *PvuII* genu *ESR1* z postacią wolno progresującą skoliozy idiopatycznej (SP-IS). W podgrupie pacjentów ze skoliozami idiopatycznymi wolno progresującymi (SP-IS) allel T i genotyp TT występował statystycznie istotnie częściej niż w podgrupach pacjentów ze skoliozami idiopatycznymi nieprogresywnymi (NP-IS) oraz szybko progresującymi (RP-IS). Dla alleli oraz genotypów poziom istotności wynosił odpowiednio $p=0,0302$ oraz $p=0,0440$.

Stwierdzono częstsze występowanie genotypu AA polimorfizmu *AluI* genu *ESR2* w skoliozach idiopatycznych z kątem Cobba poniżej 30° i z kątem Cobba poniżej 40° w porównaniu ze skoliozami idiopatycznymi z kątem Cobba 50° i więcej oraz z kątem Cobba 40° i więcej. Poziom istotności wynosił dla skolioz idiopatycznych z kątem Cobba poniżej 30° $p=0,0434$ oraz z kątem Cobba poniżej 40° $p=0,0243$.

Stwierdzono częstsze występowanie genotypu AA polimorfizmu *AluI* genu *ESR2* w skoliozach idiopatycznych z kątem Cobba poniżej 30° w porównaniu ze skoliozami idiopatycznymi z kątem Cobba 50° i więcej $p=0,0434$. Polimorfizm ten może wykazać potencjalną wartość predykcyjną.

Stwierdzono częstsze występowanie genotypu AA polimorfizmu *AluI* genu *ESR2* w skoliozach idiopatycznych z kątem Cobba poniżej 40° w porównaniu ze skoliozami idiopatycznymi z kątem Cobba 40° i więcej $p=0,0243$. Polimorfizm ten może wykazać potencjalną wartość predykcyjną.

Nie wykazano związku polimorfizmów *XbaI* w genie *ESR1* oraz *AlwNI* w genie *ESR2* ze skoliozą idiopatyczną opisywanego we wcześniejszych badaniach.

Wnioski

1. Na podstawie badania klinicznego i radiologicznego zaistniała możliwość wyodrębnienia grup skolioz idiopatycznych o odmiennym przebiegu (skolioz idiopatycznych nieprogresywnych, wolno progresujących oraz szybko progresujących).
2. Częstość występowania polimorfizmów w obrębie genów receptorów estrogenowych u chorych ze skoliozą idiopatyczną oraz u zdrowych ochotników była porównywalna z częstością podawaną dla populacji kaukaskiej w publikacjach nie dotyczących skoliozy idiopatycznej.
3. Częstość występowania badanych polimorfizmów receptorów estrogenowych u osób zdrowych nie różniła się istotnie od częstości występowania badanych polimorfizmów receptorów estrogenowych u chorych ze skoliozą idiopatyczną. Oznacza to, że badane polimorfizmy nie są związane z predyspozycją do wystąpienia skoliozy.
4. Nie było możliwe jednoznaczne powiązanie postaci klinicznej skoliozy idiopatycznej (skoliozy idiopatycznej nieprogresywnej, wolno progresującej oraz szybko progresującej) z występowaniem określonych polimorfizmów receptorów estrogenowych, jednakże dwa z badanych polimorfizmów *AluI* oraz *PvuII* mogą wykazywać znaczenie prognostyczne.

9. Abstract

Estrogen receptors genes polymorphisms in patients with progressive and non-progressive form of idiopathic scoliosis

Introduction

Idiopathic scoliosis (IS) is the most common spine deformation in adolescents. IS can occur as a stable form or show rapid curve progression.

Higher prevalence of IS in family with one affected member was described. The family risk of IS depends on the degree of relationship and it is higher in closer family. The twins studies showed 73% IS prevalence in monozygotic twins and 36% IS prevalence dizygotic twins.

The etiology studies suggest multifactorial background with strong genetic influence. Among evaluated genes, estrogen receptors of type 1 and 2 (*ESR1* and *ESR2*) were described. In the *ESR1* association of the *XbaI* polymorphism (rs9340799) with predisposition to IS, severity of IS, curve progression and risk of the operative treatment were described. The other described polymorphism in *ESR1* was *PvuII* (rs2234693). Its association with predisposition to IS and severity of IS were described. In *ESR2* association of the *AlwNI* polymorphism (rs1256120) with predisposition to IS and severity of IS were described. The association study of IS and *ESR1* and *ESR2* has never been performed in Caucasian population.

Aim

The aim of this study was to investigate if the presence of the genetic polymorphisms in estrogen receptors genes, in patients with IS, is associated with clinical form of idiopathic scoliosis (progressive and non-progressive form).

Detailed aims:

- 1) To perform clinical and radiological examination of patients with idiopathic scoliosis and to distinguish subgroups with separate forms (rapidly progressive, slowly progressive and non-progressive)
- 2) To investigate estrogen receptors genes' polymorphisms.
- 3) To assess genetic differences between the cases and controls.

- 4) To associate idiopathic scoliosis clinical form (rapidly progressive, slowly progressive and non-progressive) with occurrence of estrogen receptors' genes polymorphisms.

Material

The material consisted of 144 female patients with idiopathic scoliosis with right thoracic curve or double curve with prevalence of thoracic curve (cases) and 48 healthy females with negative family history of IS (controls).

The patients were divided into three groups according to the clinical form.

- 1) Patients with non-progressive idiopathic scoliosis (NP-IS), with lack of documented progression or progression $<1^\circ$ Cobb angle per month and Cobb angle below 30° .
- 2) Patients with slowly progressive idiopathic scoliosis (SP-IS), with documented progression $<1^\circ$ Cobb angle per month and Cobb angle above 30° .
- 3) Patients with rapidly progressive idiopathic scoliosis (RP-IS), with documented progression $\geq 1^\circ$ Cobb angle per month and Cobb angle above 30° .

Methods

The study consisted of clinical, radiological and genetic part. All the cases and controls underwent the clinical and genetic examination. The cases with idiopathic scoliosis underwent only the radiological examination. On the basis of X-rays scoliosis type, Cobb angle, Risser sign, progression and progression rate were established.

In the genetic study 6 polymorphisms were evaluated with restriction fragment length polymorphism (RFLP).

In ESR1 gene:

- 1) rs9340799 – *XbaI*
- 2) rs2234693 – *PvuII*
- 3) rs7757956 – *BstI*

In ESR2 gene:

1) rs1256120 – AlwNI

2) rs4986938 – *AluI*

3) rs1256049 – *RsaI*

The analysis of the genetic results was performed in four parts.

In the first part the genetic results of the cases and controls were compared.

In the second part the genetic results analysis in patients subgroups according to progression rate were performed.

In the third part the genetic results analysis in patients subgroups according to similar clinical form were performed.

In the last part for each genotype mean values of the clinical and radiological examinations were performed and compared between polymorphisms.

The comparison of the alleles and genotypes frequencies in subsequent subgroups with χ^2 and exact Fisher tests were performed. Statistical significant level of the p value was 0.05 and the confidence interval CI was 95%.

Results

There were no statistically significant differences in allele and genotypes frequencies between the cases and controls. There was no association of the investigated polymorphisms with predisposition to IS.

In the *PvuII* polymorphism of the *ESR1* gene there was a potential association of the allele T and genotype TT slowly progressive idiopathic scoliosis (SP-IS). The difference in allele and genotype distribution between non-progressive idiopathic scoliosis (NP-IS), slowly progressive idiopathic scoliosis (SP-IS) and rapidly progressive idiopathic scoliosis (RP-IS) were $p=0,0302$ and $p=0,0440$, respectively.

The AA genotype of the *AluI* polymorphism was more frequent in patients with idiopathic scoliosis with Cobb angle below 30° than in patients with Cobb angle above 50°, the p value was 0,0434.

The AA genotype of the *AluI* polymorphism was more frequent in patients with idiopathic scoliosis with Cobb angle below 40° than in patients with Cobb angle above 40°, the p value was 0,0243. More frequent occurrence of the allele C and CC genotype

of *PvuII* polymorphism of *ESR1* gene was found in IS patients having the curve between 30° and 50° or above 50° of the Cobb angle than in patients with curve below 30° of the Cobb angle.

Neither previously reported associations of the *XbaI* polymorphism in *ESR1* gene nor *AlwNI* polymorphism in *ESR2* gene were confirmed.

Conclusions

1. On the basis of the clinical and radiological examination, there was a possibility to distinguish the patients' subgroups (rapidly progressive, slowly progressive and non-progressive).
2. In the genetic evaluation, the frequency of the estrogen receptors genes' polymorphisms were comparable in both the cases and controls with published data.
3. There was no significant statistical difference among the evaluated polymorphisms between the cases and controls, thus no association of the investigated polymorphism with predisposition with idiopathic scoliosis was established.
4. There was no unequivocal association of the presence of the specified polymorphisms of the estrogen receptors' genes with the clinical form of idiopathic scoliosis, however two of investigated polymorphism *AluI* and *PvuII* may reveal potential influence on the clinical form of idiopathic scoliosis.

10. Piśmiennictwo

1. Pray L.: Discovery of DNA structure and function: Watson and Crick. *Nat Edu* 2008; 1: 100.
2. Little P.: Structure and function of the human genome. *Genome Res* 2005; 15: 1759-1766.
3. ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 2012; 489: 57-74.
4. Makołowski W.: The human genome structure and organization. *Acta Biochem Pol* 2001; 48: 587-98.
5. Miko I.: Genetic dominance: genotype-phenotype relationships. *Nat Edu* 2008; 1: 140.
6. Bardley J.R., Johnson D.R., Pober B.R.: *Genetyka medyczna*. PZWL 2008.
7. Conrad D.F., Hurler M.E.: The population genetics of structural variation. *Nat Genet* 2007; 39: 30-36.
8. Tobias E., Connor M., Ferguson-Smith M.: *Mutacje [w:] Genetyka medyczna*. pod red. Latos-Bieleńska A., PZWL, Warszawa 2013: 32-37.
9. Collins F.S., Brooks L.D., Chakravarti A.: A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome research* 1998; 8: 1229-1231.
10. Carlson C.S., Eberle M.A., Rieder M.J., Smith J.D.: Additional SNPs and linkage-disequilibrium analyses are necessary for whole-genome association studies in humans. *Nat Genet* 2003; 33: 518-521.
11. Gabriel S.B., Schaffner S.F., Nguyen H., Moore J.M., i wsp.: The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 2002; 296: 2225-2229.
12. Carter C.O.: Monogenic disorders. *J Med Genet* 1977; 14: 316-320.
13. Lupski J.R., Stankiewicz P.: Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS Genet* 2005; 1:e49.
14. Chial H.: Rare genetic disorders: Learning about genetic disease through gene mapping, SNPs, and microarray data. *Nat Edu* 2008; 1: 192.
15. Chial H., Craig J.: mtDNA and mitochondrial diseases. *Nat Edu* 2008; 1: 217.
16. Cheng J.C., Tang N.L., Yeung H.Y., Miller N.: Genetic association of complex traits: using idiopathic scoliosis as an example. *Clin Orthop Relat Res* 2007; 462: 38-44.
17. Kopp J.B., Smith M.W., Nelson G.W., Johnson R.C. i wsp.: MYH9 is a major-effect risk gene for focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet* 2008; 40: 1175-84.
18. Jaenisch R., Bird A.: Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 2003; 33: 245-254.
19. Andersen M.O., Thomsen K., Kyvik K.O.: Adolescent idiopathic scoliosis in twins: a population-based survey. *Spine* 2007; 32: 927-30.
20. Grauers A., Rahman I., Gerdhem P.: Heritability of scoliosis. *Eur Spine J* 2012; 21: 1069-1074.

21. Friedmann T.: Approaches to gene therapy of complex multigenic diseases: cancer as a model and implications for cardiovascular disease and diabetes. *Ann Med.* 1992; 24: 411-417.
22. Gorman K.F., Julien C., Moreau A.: The genetic epidemiology of idiopathic scoliosis. *Eur Spine J* 2012; 21: 1905–1919.
23. Clarke G.M., Anderson C.A., Pettersson F.H., Cardon L.R. i wsp.: Basic statistical analysis in genetic case-control studies. *Nat Protoc* 2011; 6: 121-33.
24. Scherer S.W., Lee C., Birney E., Altshuler D.M. i wsp.: Challenges and standards in integrating surveys of structural variation. *Nat Genet* 2007; 39:7–15.
25. Smith A.V.: Genetic analysis: moving between linkage and association. *Cold Spring Harb Protoc* 2012; 2: 174-82.
26. Cobb, J. R.: Outline for the study of scoliosis. [in] *Instructional Course Lectures. AAOS* 1948; 5: 261-75.
27. Głowacki M., Kotwicki T., Pucher A.: Skrzywienie kręgosłupa [w:] Wiktora Degi Ortopedia i Rehabilitacja. pod red. Marciniak W., Szulc A., PZWL, Warszawa 2003: 68-111.
28. Wise C.A., Gao X., Shoemaker S., Gordon D., Herring J.A.: Understanding genetic factors in idiopathic scoliosis, a complex disease of childhood. *Curr Genomics.* 2008; 9: 51-59.
29. Sharma S., Gao X., Londono D., Devroy S.E. i wsp.: Genome-wide association studies of adolescent idiopathic scoliosis suggest candidate susceptibility genes. *Hum Mol Genet* 2011; 20: 1456–1466.
30. Lonstein J.E.: Adolescent idiopathic scoliosis. *Lancet.* 1994; 344: 1407-12.
31. Tylman D.: Patomechanika bocznych skrzywień kręgosłupa. Severus, Warszawa 1997.
32. Kane W.J.: Scoliosis Prevalence: A call for a statement of terms. *Clin Orthop* 1977; 126: 43-46.
33. Weinstein S.I.: Natural history. *Spine* 1999; 24: 2592-600.
34. Ponseti I.V., Friedman B.: Prognosis in idiopathic scoliosis. *J Bone Joint Surg Am.* 1950; 32A: 381-95.
35. Kotwicki T., Durmała J., Czaprowski D., Głowacki M. i wsp.: Zasady leczenia nieoperacyjnego skolioz idiopatycznych Wskazówki oparte o zalecenia SOSORT 2006. *Ortop Traumat Rehabil* 2009; 4: 235-237.
36. Asher M.A., Burton D.C.: Adolescent idiopathic scoliosis: natural history and long term treatment effects. *Scoliosis.* 2006; 1: 2.
37. Rogala E.J., Drummond D.S., Gurr J.: Scoliosis: Incidence and natural history. *J Bone Joint Surg Am* 1978; 60: 173-176.
38. Dimeglio A., Canavese F., Charles Y.P.: Growth and adolescent idiopathic scoliosis: when and how much? *J Pediatr Orthop* 2011; 31: 28-36.
39. Lonstein J.E., Carlson J.M.: The prediction of curve progression in untreated idiopathic scoliosis during growth. *J Bone Joint Surg Am* 1984; 66: 1061-71.

40. Nachemson A.L., Lonstein J.E., Weinstein S.L. Report of the prevalence and natural history committee of the Scoliosis Research Society. Denver: Scoliosis Research Society, 1982.
41. Weinstein S.L., Dolan L.A., Cheng J.C., Danielsson A., Morcuende J.A.: Adolescent idiopathic scoliosis. *Lancet* 2008; 371: 1527-37.
42. Poumarat C.M., Scattin L., Marpeau M.: Natural history of progressive adult scoliosis. *Spine* 2007; 32: 1227-34.
43. Weinstein S.L., Dolan L.A., Spratt K.F., Peterson K.K. i wsp.: Health and function of patients with untreated idiopathic scoliosis: a 50-year natural history study. *JAMA* 2003; 289: 559-67.
44. Garland H. G.: Hereditary Scoliosis. *British Med. J* 1934; 1: 328.
45. Rutherford J. W.: Hereditary Scoliosis. *British Med. J* 1934; 2: 87.
46. Wynne-Davies R.: Familial (idiopathic) scoliosis. A family survey. *J Bone and Joint Surg Br* 1968; 50: 24-30.
47. Riseborough E.J., Wynne-Davies R.: A genetic survey of idiopathic scoliosis in Boston, Massachusetts. *J. Bone and Joint Surg Am* 1973; 55: 974-982.
48. Harrington P.R.: The etiology of idiopathic scoliosis. *Clin Orthop* 1977; 126: 17-25.
49. Carr A.J.: Adolescent AIS in identical twins. *J Bone Joint Surg Br* 1990; 72: 1077.
50. Kesling K.L., Reinker K.A.: Scoliosis in twins. A meta-analysis of the literature and report of six cases. *Spine* 1997; 22: 2009-2014.
51. Carr A.J., Ogilvie D.J., Wordsworth B.P., Priestly L.M. i wsp.: Segregation of structural collagen genes in adolescent idiopathic scoliosis. *Clin Orthop Relat Res* 1992; 274: 305-310.
52. Miller N.H., Mims B., Child A., Milewicz D.M. i wsp.: Genetic analysis of structural elastic fiber and collagen genes in familial adolescent idiopathic scoliosis. *J Orthop Res* 1996; 14: 994-999.
53. Zorkol'tseva I.V., Liubinskiĭ O.A., Sharipov R.N., Zai'dman A.M. i wsp.: Analysis of polymorphism of the number of tandem repeats in the aggrecan gene exon G3 in the families with idiopathic scoliosis. *Russ J Genet* 2002; 38: 196-200.
54. Marosy B., Justice C.M., Nzegwu N., Kumar G. i wsp.: Lack of association between the aggrecan gene and familial idiopathic scoliosis. *Spine* 2006; 31: 1420-1425.
55. Montanaro L., Parisini P., Gregg T., Di Silvestre M. i wsp.: Evidence of a linkage between matrilin-1 gene (MATN1) and idiopathic scoliosis. *Scoliosis* 2006; 1: 21.
56. Chen Z., Tang N.L., Cao X., Qiao D. i wsp.: Promoter polymorphism of matrilin-1 gene predisposesto adolescent idiopathic scoliosis in a Chinese population. *Eur J Hum Genet* 2009; 17: 525-532.
57. Takahashi Y., Matsumoto M., Karasugi T., Watanabe K. i wsp.: Lack of association between adolescent idiopathic scoliosis and previously reported single nucleotide polymorphisms in MATN1, MTNR1B, TPH1, and IGF1 in a Japanese population. *J Orthop Res* 2011; 29: 1055-1058.

58. McGregor T.L., Gurnett C.A., Dobbs M.B., Wise C.A. i wsp.: Common polymorphisms in human lysyl oxidase genes are not associated with the adolescent idiopathic scoliosis phenotype. *BMC Med Genet* 2011; 12: 92.
59. Qiu X.S., Tang N.L., Yeung H.Y., Qiu Y., Cheng J.C. Association study between adolescent idiopathic scoliosis and the DPP9 gene which is located in the candidate region identified by linkage analysis. *Postgrad Med J* 2008; 84: 498–501.
60. Jiang J., Qian B., Mao S., Zhao Q. i wsp.: A Promoter Polymorphism of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase- 2 (TIMP-2) Gene Is Associated With Severity of Thoracic Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Spine* 2012;37: 41-47.
61. Ogura Y., Takahashi Y., Kou I., Nakajima M. i wsp.: A replication study for association of 5 single nucleotide polymorphisms with curve progression of adolescent idiopathic scoliosis in Japanese patients. *Spine* 2013; 38: 571-575.
62. Aulisa L., Papaleo P., Pola E., Angelini F. i wsp.: Association between IL-6 and MMP-3 gene polymorphisms and adolescent idiopathic scoliosis: a case-control study. *Spine* 2007; 32: 2700–2702.
63. Liu Z., Tang N.L., Cao X.B., Liu W.J. i wsp.: Lack of association between the promoter polymorphisms of MMP-3 and IL-6 genes and adolescent idiopathic scoliosis: a case-control study in a Chinese Han population. *Spine* 2010; 35: 1701–1705.
64. Mo'rocz M., Czibula A., Gro'zer Z.B., Sze'cse'nyi A. i wsp.: Association study of BMP4, IL6, Leptin, MMP3, and MTNR1B gene promoter polymorphisms and adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 2011; 36: 123-30.
65. Li XF, Li H, Liu ZD, Dai LY.: Low bone mineral status in adolescent idiopathic scoliosis. *Eur Spine J*. 2008; 17: 1431-40.
66. Kindsfater K., Lowe T., Lawellin D., Weinstein D., Akmakjian J.: Levels of platelet calmodulin for the prediction of progression and severity of adolescent idiopathic scoliosis. *J Bone Joint Surg Am* 1994; 76: 1186–1192.
67. Zhao D., Qiu G.X., Wang Y.P., Zhang J.G. i wsp.: Association between adolescent idiopathic scoliosis with double curve and polymorphisms of calmodulin1 gene/estrogen receptor- a gene. *Orthop Surg* 2009; 1: 222–230.
68. Zhao D., Qiu G.X., Wang Y.P., Zhang J.G. i wsp.: Association of calmodulin1 gene polymorphisms with susceptibility to adolescent idiopathic scoliosis. *Orthop Surg* 2009; 1: 58-65.
69. Zhang Y., Gu Z., Qiu G.: The association study of calmodulin 1 gene polymorphisms with susceptibility to adolescent idiopathic scoliosis. *Med Res Int* 2014; 2014:168106.
70. Suh K.T., Eun I.S., Lee J.S.: Polymorphism in vitamin D receptor is associated with bone mineral density in patients with adolescent idiopathic scoliosis. *Eur Spine J* 2010; 19: 1545–1550.
71. Inoue M., Minami S., Nakata Y., Takaso M. i wsp.: Prediction of curve progression in idiopathic scoliosis from gene polymorphic analysis. *Stud Health Technol Inform* 2002; 91: 90–96.

72. Machida M., Dubousset J., Imamura Y., Iwaya T. i wsp.: Role of melatonin deficiency in the development of scoliosis in pinealectomized chickens. *J Bone Joint Surg Br* 1995; 77: 134–138.
73. Morcuende J.A., Minhas R., Dolan L., Stevens J. i wsp.: Allelic variants of human melatonin 1A receptor in patients with familial adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 2003; 28: 2025–2028.
74. Qiu X.S., Tang N.L., Yeung H.Y., Cheng J.C., Qiu Y.: Lack of association between the promoter polymorphism of the MTNR1A gene and adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 2008; 33: 2204–2207.
75. Nelson L.M., Ward K., Ogilvie J.W.: Genetic variants In melatonin synthesis and signaling pathway are not associated with adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 2011; 36: 37–40.
76. Qiu X.S., Tang N.L., Yeung H.Y., Lee K.M., i wsp.: Melatonin receptor 1B (MTNR1B) gene polymorphism is associated with the occurrence of adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 2007; 32: 1748–1753.
77. Shyy W., Wang K. Gurnett C.A., Dobbs M.B. i wsp.: Evaluation of GPR50, hMel-1B, and ROR-alpha melatonin-related receptors and the etiology of adolescent idiopathic scoliosis. *J Pediatr Orthop* 2010; 30: 539–543.
78. Wang H., Wu Z., Zhuang Q., Fei Q. i wsp.: Association study of tryptophan hydroxylase 1 and arylalkylamine N-acetyltransferase polymorphisms with adolescent idiopathic scoliosis in Han Chinese. *Spine* 2008; 33: 2199–2203.
79. Qiu X.S., Tang N.L., Yeung H.Y., Qiu Y., Cheng J.C.: Genetic association study of growth hormone receptor and idiopathic scoliosis. *Clin Orthop Relat Res* 2007; 462: 53–58.
80. Yeung H.Y., Tang N.L., Lee K.M., Ng B.K. i wsp.: Genetic association study of insulin-like growth factor-I (IGF-I) gene with curve severity and osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis. *Stud Health Technol Inform* 2006; 123: 18–24.
81. Yang Y., Wu Z., Zhao T., Wang H. i wsp.: Adolescent idiopathic scoliosis and the single-nucleotide polymorphism of the growth hormone receptor and IGF-1 genes. *Orthopedics* 2009; 32: 411.
82. Inoue M., Minami S., Nakata Y., Kitahara H. i wsp.: Association between estrogen receptor gene polymorphisms and curve severity of idiopathic scoliosis. *Spine* 2002; 27: 2357–2362.
83. Wu J., Qiu Y., Zhang L., Sun Q. i wsp.: Association of estrogen receptor gene polymorphisms with susceptibility to adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 2006; 31: 1131–1136.
84. Tang N.L., Yeung H.Y., Lee K.M., Hung V.W. i wsp.: A relook into the association of the estrogen receptor [alpha] gene (PvuII, XbaI) and adolescent idiopathic scoliosis: a study of 540 Chinese cases. *Spine* 2006; 31: 2463–2468.
85. Takahashi Y., Matsumoto M., Karasugi T., Watanabe K. i wsp.: Replication study of the association between adolescent idiopathic scoliosis and two estrogen receptor genes. *J Orthop Res* 2010; 29: 834–837.

86. Xu L., Qiu X., Sun X., Mao S. i wsp.: Potential genetic markers predicting the outcome of brace treatment in patients with adolescent idiopathic scoliosis. *Eur Spine J* 2011; 20: 1757–1764.
87. Zhang H.Q., Lu S.J., Tang M.X., Chen L.Q. i wsp.: Association of estrogen receptor beta gene polymorphisms with susceptibility to adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 2009; 34: 760–764.
88. Peng Y., Liang G., Pei Y., Ye W. i wsp.: Genomic polymorphisms of G-Protein Estrogen Receptor 1 are associated with severity of adolescent idiopathic scoliosis. *Int Orthop* 2012; 3: 671–677.
89. Edery P., Margaritte-Jeannin P., Biot B., Labalme A. i wsp.: New disease gene location and high genetic heterogeneity in idiopathic scoliosis. *Eur J Hum Genet* 2011; 19: 865–869.
90. Miller N.H., Marosy B., Justice C.M., Novak S.M. i wsp.: Linkage analysis of genetic loci for kyphoscoliosis on chromosomes 5p13, 13q13.3, and 13q32. *Am J Med Genet* 2006; 040: 1059–1068.
91. Miller N.H., Justice C.M., Marosy B., Doheny K.F. i wsp.: Identification of candidate regions for familial idiopathic scoliosis. *Spine* 2005; 30: 1181–1187.
92. Marosy B., Justice C.M., Vu C., Zorn A. i wsp.: Identification of susceptibility loci for scoliosis in FIS families with triple curves. *Am J Hum Genet* 2010; 152: 846–855.
93. Gao X., Gordon D., Zhang D., Browne R. i wsp.: CHD7 gene polymorphisms are associated with susceptibility to idiopathic scoliosis. *Am J Hum Genet* 2011; 80: 957–965.
94. Ocaka L., Zhao C., Reed J.A., Ebenezer N.D. i wsp.: Assignment of two loci for autosomal dominant adolescent idiopathic scoliosis to chromosomes 9q31.2-q34.2 and 17q25.3-qtel. *J Med Genet* 2008; 45: 87–92.
95. Raggio C.L., Giampietro P.F., Dobrin S., Zhao C. i wsp.: A novel locus for adolescent idiopathic scoliosis on chromosome 12p. *J Orthop Res* 2009; 27: 1366–1372.
96. Salehi L.B., Mangino M., De Serio S., De Cicco D. i wsp.: Assignment of a locus for autosomal dominant idiopathic scoliosis (IS) to human chromosome 17p11. *Hum Genet* 2002; 111: 401–404.
97. Clough M., Justice C.M., Marosy B., Miller N.H.: Males with familial idiopathic scoliosis: a distinct phenotypic subgroup. *Spine* 2010; 35: 162–168.
98. Gurnett C.A., Alaei F., Bowcock A., Kruse L. i wsp.: Genetic linkage localizes an adolescent idiopathic scoliosis and pectus excavatum gene to chromosome 18 q. *Spine* 2009; 34: E94–E100.
99. Alden K.J., Marosy B., Nzegwu N., Justice C.M., i wsp.: Idiopathic scoliosis: identification of candidate regions on chromosome 19p13. *Spine* 2006; 31: 1815–1819.
100. Chan V., Fong G.C., Luk K.D., Yip B. i wsp.: A genetic locus for adolescent idiopathic scoliosis linked to chromosome 19p13.3. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 401–406.
101. Justice C.M., Miller N.H., Marosy B., Zhang J., Wilson A.F. Familial idiopathic scoliosis: evidence of an X-linked susceptibility locus. *Spine* 2003; 28: 589–594.

102. Takahashi Y., Kou I., Takahashi A., Johnson T.A. i wsp.: A genome-wide association study identifies common variants near LBX1 associated with adolescent idiopathic scoliosis. *Nat Genet* 2011; 43: 1237-1240.
103. Carreau S., Bourguiba S., Lambard S., Galeraud-Denis I. i wsp.: Reproductive system: aromatase and estrogens. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 193: 137-143.
104. Świtalska M., Strządała L.: Niegenomowe działanie estrogenów. *Postępy Hig Med Dośw* 2007; 61: 541-547.
105. Kalita K., Lewandowski S., Skrzypczak M., Szymczak S. i wsp.: Receptory estrogenowe. Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału, red.: Nowak J.Z., Zawilska J.B. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2004; 604-616.
106. Björnström L., Sjöberg M.: Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic action on target genes. *Mol Endocrinol* 2005; 19: 833-842.
107. Simoncini T., Genazzani A.R.: Non-genomic action of sex steroids hormones. *Eur J Endocrinol* 2003; 148: 281-292.
108. Enmark E., Peltö-Huikko M., Grandien K., Lagercrantz S. i wsp.: Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 4258-65.
109. Hewitt S.C., Korach K.S.: Estrogen receptors: structure, mechanisms and function. *Rev Endocr Metab Disord* 2002; 3: 193-200.
110. Taylor A.H., Al-Azzawi F.: Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissue. *J Mol Endocrinol* 2000; 24: 145-55.
111. Lenke L.G., Betz R.R., Haras J., Bridwell K.H. i wsp.: Adolescent idiopathic scoliosis: a new classification to determine extent of spinal arthrodesis. *J Bone Joint Surg [Am]* 2001; 83: 1169-81.
112. Janusz P., Kotwicki T., Andrusiewicz M., Kotwicka M.: XbaI and PvuII polymorphisms of estrogen receptor 1 gene in females with idiopathic scoliosis: no association with occurrence or clinical form. *PLoS One* 2013; 8:e76806.
113. Beighton P., Solomon L., Soskolne C.L.: Articular mobility in an African population. *Ann Rheum Dis* 1973; 32: 413-418.
114. Kotwicki T., Frydryk K., Lorkowska M., Krawczyński A., Szulc A.: Powtarzalność i zgodność pomiaru rotacji tułowia skoliometrem Bunnella u dzieci ze skoliozą idiopatyczną. *Fizjot Pol* 2006; 6: 111-116.
115. Clinch J., Deere K., Sayers A., Palmer S. i wsp.: Epidemiology of generalized joint laxity (hypermobility) in fourteen-year-old children from the UK: a population-based evaluation. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 2819-2827.
116. Scoliosis Research Society Educational Materials. Dokument elektroniczny: SRS słownik http://www.srs.org/professionals/glossary/SRS_revised_glossary_of_terms.htm, dostęp 04.02.2014.
117. Risser J.C.: The iliac apophysis: an invaluable sign in the management of scoliosis. *Clin Orthop* 1958; 11: 111-20.

118. Manring M., Calhoun L: Biographical sketch: Joseph C. Risser Sr. 1892–1982 Clin Orthop Relat Res 2010; 468: 643–645.
119. Grivas T.B., Vasiliadis E., Mouzakis V., Mihas C., Koufopoulos G.: Association between adolescent idiopathic scoliosis prevalence and age at menarche indifferent geographic latitudes. Scoliosis 2006; 23: 9.
120. Mao S.H., Jiang J., Sun X., Zhao Q. i wsp.: Timing of menarche in Chinese girls with and without adolescent idiopathic scoliosis: current results and review of the literature. Eur Spine J 2011; 20: 260-265.
121. Cheung C.S., Lee W.T., Tse Y.K., Lee K.M. i wsp.: Generalized osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis—association with abnormal pubertal growth, bone turnover and calcium intake? Spine 2006; 31: 330-338.
122. Lee W.T., Cheung C.S., Tse Y.K., Guo X. i wsp.: Association of osteopenia with curve severity in adolescent idiopathic scoliosis: a study of 919 girls. Osteoporos Int 2005; 16: 1924–1932.
123. Normelli H. , Sevastik J. , Ljung G. , Aaro S. i wsp.:Anthropometric data relating to normal and scoliotic Scandinavian girls . Spine 1985; 10: 123 – 126.
124. Ramírez M., Martínez-Llorens J., Sanchez J.F., Bagó J. i wsp: Body composition in adolescent idiopathic scoliosis. Eur Spine J 2013; 22: 324 – 329.
125. Tobias J.H., Steer C.D., Vilarino-Güell C., Brown M.A.: Estrogen receptor alpha regulates area-adjusted bone mineral content in late pubertal girls. J Clin Endocrinol Metab 2007; 92: 641-647.
126. Kitamura I., Ando F., Koda M., Okura T., Shimokata H.: Effects of the interaction between lean tissue mass and estrogen receptor alpha gene polymorphism on bone mineral density in middle-aged and elderly Japanese. Bone 2007; 40: 1623-9.
127. Tobias J.H., Steer C.D., Vilariño-Güell C., Brown M.A.: Effect of an Estrogen Receptor- α Intron 4 Polymorphism on Fat Mass in 11-Year-Old Children' Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2007; 92: 2286 - 2291.
128. Ichikawa S., Koller D.L., Peacock M., Johnson M.L. i wsp.: Polymorphisms in the estrogen receptor beta (ESR2) gene are associated with bone mineral density in Caucasian men and women. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90: 5921-5927.
129. Currò M., Marini H., Alibrandi A., Ferlazzo N. i wsp.: The ESR2 AluI gene polymorphism is associated with bone mineral density in postmenopausal women. J Steroid Biochem Mol Biol 2011; 127: 413-417.
130. Stavrou I., Zois C., Chatzikyriakidou A., Georgiou I., Tsatsoulis A.: Combined estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta genotypes influence the age of menarche. Hum Reprod 2006; 21: 554-7.
131. Goulart A.C., Zee R.Y., Rexrode K.M.: Association of estrogen receptor 2 gene polymorphisms with obesity in women (obesity and estrogen receptor 2 gene). Maturitas 2009; 62: 179-183.
132. The International HapMap Consortium: A haplotype map of the human genome. Nature 2005; 437: 1299–1320.

133. Roszkowska-Gancarz M., Kurylowicz A., Polosak J., Ambroziak M., Puzianowska-Kuznicka M.: The -351A/G polymorphism of ESR1 is associated with risk of myocardial infarction but not with extreme longevity. *Clin Chim Acta* 2010; 411: 1883-1887.
134. Dziedziejko V., Kurzawski M., Safranow K., Drozdziak M. i wsp.: Oestrogen receptor polymorphisms in female patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2011; 40: 329-333.
135. Pawlik A., Dziedziejko V., Kurzawski M., Safranow K. i wsp.: Effect of ESR1 and ESR2 gene polymorphisms on rheumatoid arthritis treatment with methotrexate. *Pharmacol Rep* 2012; 64: 185-190.
136. Gaunt T.R., Rodríguez S., Day I.N.: Cubic exact solutions for the estimation of pairwise haplotype frequencies: implications for linkage disequilibrium analyses and a web tool 'CubeX'. *BMC Bioinformatics* 2007; 8: 428.
137. Faul F., Erdfelder E., Lang A.G., Buchner A.: G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods* 2007; 39: 175-191.
138. Binns M.: Joint laxity in idiopathic adolescent scoliosis. *J Bone Joint Surg [Br]* 1988; 70: 420-422.
139. Czaprowski D., Kotwicki T., Pawłowska P., Stoliński L.: Joint hypermobility in children with idiopathic scoliosis: SOSORT award 2011 winner. *Scoliosis* 2011; 6:22.
140. Florath I., Butterbach K., Müller H., Bewerunge-Hudler M., Brenner H.: Cross-sectional and longitudinal changes in DNA methylation with age: an epigenome-wide analysis revealing over 60 novel age-associated CpG sites. *Hum Mol Genet* 2014; 23: 1186-201.
141. Raport GUS „Stan zdrowia ludności w 2009 r.” ISBN 83-7027-399-8.
142. Shen L.X., Basilion J.P., Stanton V.P.: Single-nucleotide polymorphisms can cause different structural folds of mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 7871-7876.
143. Pettersson F.H., Anderson C.A., Clarke G.M., Barrett J.C. i wsp.: Marker selection for genetic case-control association studies. *Nat Protoc* 2009; 4: 743-752.
144. Ignaszak-Szczepaniak M., Horst-Sikorska W., Dytfeld J., Gowin E. i wsp.: Association between estrogen receptor alpha gene polymorphisms and bone mineral density in Polish female patients with Graves' disease. *Acta Biochim Pol* 2011; 58: 101-109.
145. Becherini L., Gennari L., Masi L., Mansani R. i wsp.: Evidence of a linkage disequilibrium between polymorphisms in the human estrogen receptor alpha gene and their relationship to bone mass variation in postmenopausal Italian women. *Hum Mol Genet* 2000; 12: 2043-2050.
146. Stavrou I., Zois C., Ioannidis J.P., Tsatsoulis A.: Association of polymorphisms of the oestrogen receptor alpha gene with the age of menarche. *Hum Reprod* 2002 17:1101-1105.
147. Silva I.V., Rezende L.C., Lanes S.P., Souza L.S. i wsp.: Evaluation of PvuII and XbaI polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene (*ESR1*) in relation to menstrual cycle

timing and reproductive parameters in post-menopausal women. *Maturitas* 2010; 67: 363–367.

148. Manuck S.B., Craig A.E., Flory J.D., Halder I., Ferrell R.E.: Reported early family environment covaries with menarcheal age as a function of polymorphic variation in estrogen receptor. *Dev Psychopathol* 2011; 23: 69–83.

149. Mitchell E.S., Farin F.M., Stapleton P.L., Tsai J.M. i wsp.: Association of estrogen-related polymorphisms with age at menarche, age at final menstrual period, and stages of the menopausal transition. *Menopause* 2008; 15: 105–111.

150. Estwood H., Brown K.M., Markovic D., Pieri L.F.: Variation in the ESR1 and ESR2 genes and genetic susceptibility to anorexia nervosa. *Mol Psychiatry* 2002; 7: 86–89.

11. Spis rycin

- Rycina 4.1. Schematyczne przedstawienie testów stosowanych w skali Beigntona do oceny hipermobilności (wiotkości) stawów [115].
- Rycina 4.2. Schemat sposobu wykonywania pomiaru kąta rotacji tułowia na czterech poziomach.
- Rycina 4.3. Sposób przyłożenia skoliometru Bunella do tułowia poprzecznie do osi długiej kręgosłupa, w miejscu największej rotacji tułowia.
- Rycina 4.4. Pomiary radiologiczne wykonywane na radiogramie przednio-tylnym w pozycji stojącej. CSL - centralna linia krzyżowa.
- Rycina 4.5. Test Rissera [118].
- Rycina 4.6. Umieszczenie wybranych SNP w genie *ESR1* (źródło: <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>) [132].
- Rycina 4.7. Umieszczenie wybranych SNP w genie *ESR2* (źródło: <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>) [132].
- Rycina 4.8. Próbkę krwi podczas izolacji DNA.
- Rycina 4.9. Przykładowe zdjęcie elektroforezy produktów PCR dla *ESR1* rs9340799.
- Rycina 4.10. Przykładowe zdjęcie elektroforezy produktów RFLP dla polimorfizmu rs4986938 w obrębie genu *ESR1* przy zastosowaniu enzymu *AluI*.

12. Spis tabel

Tabela 1.1.	Ryzyko progresji skoliozy idiopatycznej w zależności od wartości kątowej i od wieku według Nachemsona i wsp. [40, 41]
Tabela 1.2.	Zestawienie danych opisanych w literaturze na temat rodzinnej analizy sprzężeń w obrębie całego genomu w rodzinach chorych ze skoliozą idiopatyczną
Tabela 3.1.	Podział chorych ze skoliozą idiopatyczną na trzy podgrupy w zależności od tempa progresji skrzywienia: NP-IS, SP-IS, RP-IS
Tabela 4.1.	Polimorfizmy wybrane do zbadania w obrębie <i>ESR1</i>
Tabela 4.2.	Polimorfizmy wybrane do zbadania w obrębie <i>ESR2</i>
Tabela 4.3.	Ocena ilorazu szans możliwego do wykrycia dla założonej mocy testu 80%, przy założeniu N=144 w grupie badanej i N=48 w grupie kontrolnej oraz poziomie istotności $\alpha = 0,05$
Tabela 4.4.	Zestawienie starterów wykorzystanych w reakcji PCR dla genu <i>ESR1</i>
Tabela 4.5.	Zestawienie starterów wykorzystanych w reakcji PCR dla genu <i>ESR2</i>
Tabela 4.6.	Warunki termiczne dla reakcji PCR w obrębie genu <i>ESR1</i>
Tabela 4.7.	Warunki termiczne dla reakcji PCR w obrębie genu <i>ESR2</i>
Tabela 4.8.	Zastosowane enzymy, z uwzględnieniem miejsca restrykcyjnego oraz długości otrzymanych fragmentów dla <i>ESR1</i>
Tabela 4.9.	Zastosowane enzymy, z uwzględnieniem miejsca restrykcyjnego oraz długości otrzymanych fragmentów dla <i>ESR2</i>
Tabela 5.1.1.	Dane antropometryczne grupy badanej i grupy kontrolnej
Tabela 5.1.2.	Wyniki badania klinicznego u chorych ze skoliozą idiopatyczną (grupa badana)
Tabela 5.1.3.	Wyniki badania klinicznego podgrup pacjentów ze skoliozami idiopatycznymi nieprogresywnymi (NP-IS), wolno progresującymi (NP-IS) oraz szybko progresującymi (RP-IS)
Tabela 5.2.1.	Wyniki badania radiologicznego u chorych ze skoliozami idiopatycznymi (grupa badana)
Tabela 5.2.2.	Wyniki badania radiologicznego podgrup pacjentów ze skoliozami idiopatycznymi nieprogresywnymi (NP-IS), wolno progresującymi (NP-IS) oraz szybko progresującymi (RP-IS)
Tabela 5.3.1.	Rozkład alleli genu <i>ESR1</i> w grupie badanej i grupie kontrolnej

Tabela 5.3.2.	Rozkład alleli genu <i>ESR2</i> w grupie badanej i grupie kontrolnej
Tabela 5.3.3.	Rozkład genotypów genu <i>ESR1</i> w grupie badanej i grupie kontrolnej
Tabela 5.3.4.	Rozkład genotypów genu <i>ESR2</i> w grupie badanej i grupie kontrolnej
Tabela 5.3.5.	Rozkład alleli genu <i>ESR1</i> w podgrupach pacjentów ze skoliozami idiopatycznymi nieprogresywnymi (NP-IS), wolno progresującymi (NP-IS) oraz szybko progresującymi (RP-IS)
Tabela 5.3.6.	Częstość występowania alleli genu <i>ESR1</i> w podgrupach pacjentów ze skoliozami idiopatycznymi nieprogresywnymi (NP-IS), wolno progresującymi (NP-IS) oraz szybko progresującymi (RP-IS)
Tabela 5.3.7.	Częstość występowania genotypów genu <i>ESR1</i> w podgrupach pacjentów ze skoliozami nieprogresywnymi (NP-IS), wolno progresującymi (NP-IS) oraz szybko progresującymi (RP-IS)
Tabela 5.3.8.	Częstość występowania genotypów genu <i>ESR2</i> w podgrupach pacjentów ze skoliozami nieprogresywnymi (NP-IS), wolno progresującymi (NP-IS) oraz szybko progresującymi (RP-IS)
Tabela 5.3.9.	Rozkład alleli w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR1</i> w podgrupach pacjentów ze skoliozą idiopatyczną podzielonych ze względu na wartość kąta Cobba na skoliozy ze skrzywieniem poniżej 30°, pomiędzy 30° i 50° oraz 50° i więcej
Tabela 5.3.10.	Rozkład alleli w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR2</i> w podgrupach pacjentów ze skoliozą idiopatyczną podzielonych ze względu na wartość kąta Cobba na skoliozy ze skrzywieniem poniżej 30°, pomiędzy 30° i 50° oraz 50° i więcej
Tabela 5.3.11.	Częstość występowania genotypów w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR1</i> w podgrupach pacjentów ze skoliozą idiopatyczną podzielonych ze względu na wartość kąta Cobba na skoliozy ze skrzywieniem poniżej 30°, pomiędzy 30° i 50° oraz 50° i więcej
Tabela 5.3.12.	Częstość występowania genotypów w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR1</i> w podgrupach pacjentów ze skoliozą idiopatyczną podzielonych ze względu na wartość kąta Cobba na skoliozy ze skrzywieniem poniżej 30°, pomiędzy 30° i 50° oraz 50° i więcej
Tabela 5.3.13.	Częstość występowania genotypów w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR2</i> w podgrupach pacjentów ze skoliozą idiopatyczną podzielonych ze względu na wartość kąta Cobba na skoliozy ze skrzywieniem poniżej 30°, pomiędzy 30° i 50° oraz 50° i więcej
Tabela 5.3.14.	Częstość występowania genotypów w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR2</i> w podgrupach pacjentów ze skoliozą idiopatyczną podzielonych ze względu na wartość kąta Cobba na skolio-

zy ze skrzywieniem poniżej 30°, pomiędzy 30° i 50° oraz 50° i więcej

Tabela 5.3.15.	Rozkład alleli badanych polimorfizmów genu <i>ESR1</i> w podgrupach pacjentów z kątem Cobba poniżej 40° oraz z kątem Cobba 40° i więcej
Tabela 5.3.16.	Rozkład alleli badanych polimorfizmów genu <i>ESR2</i> w podgrupach pacjentów z kątem Cobba poniżej 40° oraz z kątem Cobba 40° i więcej
Tabela 5.3.17.	Rozkład genotypów w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR1</i> w podgrupach pacjentów z kątem Cobba poniżej 40° oraz z kątem Cobba 40° i więcej
Tabela 5.3.18.	Rozkład genotypów w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR1</i> w podgrupach pacjentów z kątem Cobba poniżej 40° oraz z kątem Cobba 40° i więcej
Tabela 5.3.19.	Rozkład alleli w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR1</i> w podgrupach pacjentów leczonych zachowawczo i operacyjnie
Tabela 5.3.20.	Rozkład alleli w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR2</i> w podgrupach pacjentów leczonych zachowawczo i operacyjnie
Tabela 5.3.21.	Rozkład genotypów badanych polimorfizmów genu <i>ESR1</i> w podgrupach pacjentów leczonych zachowawczo i operacyjnie
Tabela 5.3.22.	Rozkład genotypów badanych polimorfizmów genu <i>ESR2</i> w podgrupach pacjentów leczonych zachowawczo i operacyjnie
Tabela 5.3.23.	Rozkład alleli w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR1</i> w podgrupach bez wiotkości stawów i z wiotkością stawów wg skali Beightona
Tabela 5.3.24.	Rozkład alleli w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR2</i> w podgrupach pacjentów bez wiotkości stawów i z wiotkością stawów wg skali Beightona
Tabela 5.3.25.	Rozkład genotypów badanych polimorfizmów genu <i>ESR1</i> w podgrupach bez wiotkości stawów i z wiotkością stawów wg skali Beightona
Tabela 5.3.26.	Rozkład genotypów badanych polimorfizmów genu <i>ESR2</i> w podgrupach pacjentów bez wiotkości stawów i z wiotkością stawów wg skali Beightona
Tabela 5.3.27.	Wyniki badania klinicznego i radiologicznego w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR1</i>
Tabela 5.3.28.	Wyniki badania klinicznego i radiologicznego w obrębie badanych polimorfizmów genu <i>ESR2</i>
Tabela 5.4.1.	Możliwy do wykrycia iloraz szans OR w odniesieniu do częstości występowania alleli w grupie kontrolnej, dla mocy 80% testu Chi ² ,

przy założeniu poziomu istotności statystycznej $\alpha=0,05$

Tabela 5.5.1.	Porównanie częstości występowania alleli w grupie kontrolnej w powyższym badaniu z danymi z piśmiennictwa
Tabela 6.1.	Częstość występowania polimorfizmu <i>XbaI</i> w populacji kaukaskiej w odniesieniu do grupy kontrolnej powyższego badania
Tabela 6.2.	Częstość występowania polimorfizmu <i>PvuII</i> w populacji kaukaskiej w odniesieniu do grupy kontrolnej powyższego badania
Tabela 6.3.	Częstość występowania polimorfizmu <i>BstI</i> w populacji kaukaskiej w odniesieniu do grupy kontrolnej powyższego badania
Tabela 6.4.	Częstość występowania polimorfizmu <i>AlwNI</i> w populacji kaukaskiej w odniesieniu do grupy kontrolnej powyższego badania
Tabela 6.5.	Częstość występowania polimorfizmu <i>AluI</i> w populacji kaukaskiej w odniesieniu do grupy kontrolnej powyższego badania
Tabela 6.6.	Częstość występowania polimorfizmu <i>RsaI</i> w populacji kaukaskiej w odniesieniu do grupy kontrolnej powyższego badania

Załącznik 1 – Zgoda Komisji Bioetycznej



UNIwersytet Medyczny Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym
Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Collegium Maius
ul. Fredry 10
61-701 Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
fax. (+48 61) 854 61 07
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 87/09

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (Dz. U. 1997, Nr 28, poz. 152); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 11 marca 2005 r. w sprawie szczegółowych wymagań Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2005, Nr 57, poz. 500); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. z 2004r. Nr 53, poz. 535 ze zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 4 listopada 2008r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. Nr 201, poz. 1247), kierując się Zasadami Prawidłowego Prowadzenia Badań Klinicznych – GCP – opracowanymi w oparciu o Deklarację Helsińską.

Komisja, na posiedzeniu w dniu: 05 marca 2009 r.

rozpatrzyła wniosek, który przedstawił Pan:

dr hab. med. Tomasz Kotwicki

w sprawie prowadzenia badań w

Katedrze i Klinice Ortopedii i Traumatologii Dziecięcej

UM w Poznaniu

Główny badacz: dr hab. med. Tomasz Kotwicki

Członkowie zespołu

badawczego: dr hab. med. Anna Jankowska

Temat

badan: "Badania nad polimorfizmem i ekspresją genu receptora estrogenowego oraz genu CHD7 w celu prognozowania rozwoju skoliozy idiopatycznej u dzieci (wykrywania skolioz zagrożonych progresją)".

Komisja wyraża zgodę na prowadzenie badań

Przewodniczący Komisji

Prof. zw. dr hab. med. Zygmunt Przybylski

Załącznik 2 – Uchwała Komisji Bioetycznej – rozszerzenie składu zespołu badawczego



UNIwersytet Medyczny Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym
Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Collegium Maius
ul. Fredry 10
61-701 Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
fax. (+48 61) 854 61 07
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 454/11

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (Dz. U. 1997, Nr 28, poz. 152); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 11 marca 2005 r. w sprawie szczegółowych wymagań Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2005, Nr 57, poz. 500); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. z 2004r. Nr 53, poz. 533 z zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 Nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małych dzieci (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłoszenia niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 4 listopada 2008r. w sprawie wzorów dokumentów przekładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. Nr 201, poz. 1247), kierując się Zasadami Prawidłowego Prowadzenia Badań Klinicznych – GCP – opracowanymi w oparciu o Deklarację Helsińską.

Komisja, na posiedzeniu w dniu: 12 maja 2011 r.

rozpatrzyła wniosek, który przedstawił Pan:

dr hab. med. Tomasz Kotwicki

w sprawie prowadzenia badań w

**Katedrze i Klinice Ortopedii i Traumatologii Dziecięcej
UM w Poznaniu**

Główny badacz: dr hab. med. Tomasz Kotwicki

Członkowie zespołu

badawczego: dr hab. med. Anna Jankowska

Temat badań: "Badania nad polimorfizmem i ekspresją genu receptora estrogenowego oraz genu CHD7 w celu prognozowania rozwoju skoliozy idiopatycznej u dzieci (wykrywania skolioz zagrożonych progresją)".

Uchwała Komisji Bioetycznej nr 87/09 z dnia 05.03.2009r.

Komisja wyraziła zgodę na rozszerzenie składu zespołu badawczego o następujące osoby: dr hab. Małgorzata Kotwicka – Zakład Biologii Komórki UM w Poznaniu; dr n. med. Mirosław Andrusiewicz - Zakład Biologii Komórki UM w Poznaniu; lek. med. Piotr Janusz – Klinika Ortopedii Dziecięcej UM w Poznaniu.

Przewodniczący Komisji

Prof. zw. dr hab. med. Zygmunt Przybylski

INFORMACJA DLA PACJENTA

Badania nad polimorfizmem i ekspresją genu receptora estrogenowego oraz *CHD7* w celu prognozowania rozwoju skoliozy idiopatycznej u dzieci - wykrywanie skolioz zagrożonych progresją

Niniejszy formularz dostarcza informacji o badaniach, o ich celach, stosowanych procedurach a także zagrożeniach i korzyściach związanych z udziałem w badaniach

Proszę uważnie przeczytać poniższe informacje i w razie jakichkolwiek pytań zwracać się do lekarza prowadzącego.

1) Dlaczego te badania są prowadzone?

Obecnie nie istnieją pewne sposoby przewidywania, czy dana skolioza w okresie dojrzewania ulegnie raptownemu pogorszeniu czy też pozostanie stabilna. W ostatnich latach przeprowadzono badania wskazujące na rolę czynników genetycznych w powstawaniu i rozwoju skoliozy. Badacze oczekują, że przeprowadzone badania umożliwią ustalenie polimorfizmów genów powiązanych z wystąpieniem i progresją skoliozy idiopatycznej.

2) Jaki jest cel tego badania?

Celem badań jest wyodrębnienie spośród dzieci i młodzieży z małymi skoliozami i niedokończonym dojrzewaniem grupy dzieci o zwiększonym ryzyku progresji skoliozy, dokonane w oparciu o badanie polimorfizmu i ekspresji genów powiązanych z występowaniem skoliozy.

3) Jakie procedury obejmuje projekt badawczy?

- Pobranie krwi obwodowej pacjenta w celu izolacji DNA.

- Izolacja DNA z krwi obwodowej. Wyizolowane DNA będzie przechowywane w Katedrze i Zakładzie Biologii Komórki Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego, ul. Rokietnicka 5D, 60-806 Poznań.

- Wyizolowane DNA posłuży do badania polimorfizmów następujących genów: gen receptora estrogenowego typu alfa i beta oraz genu *CDH7*.

- Wyizolowane DNA nie będzie wykorzystywane do żadnych innych celów.

Żaden dodatkowy materiał tkankowy nie będzie pobierany od pacjenta na potrzeby prowadzonych badań.

4) Pacjent/ka nie może uczestniczyć w tych badaniach, jeśli nie wyraził/a świadomej zgody.

5) Jakie możliwe zagrożenia wiążą się z udziałem w tych badaniach?

Badania te nie wiążą się z żadnymi dodatkowymi niedogodnościami dla Pacjenta/ki. Lekarz wyśle krótką informację na temat Pani/Pana stanu zdrowia do koordynatora badań. Informacja ta będzie wykorzystana w warunkach pełnej poufności przez osoby pracujące przy tych badaniach i w żadnych okolicznościach nie zostanie ujawniona.

Z prowadzonymi badaniami nie wiążą się żadne zagrożenia dla zdrowia Pacjenta/ki.

6) Jakie możliwe korzyści wiążą się z udziałem w tych badaniach?

Zakłada się, że prowadzone badania umożliwią ocenę stopnia ryzyka pogorszenia skoliozy, a przez to szybkie wdrożenie właściwego leczenia. W końcowym efekcie pozwoli to na skoncentrowaniu wysiłków diagnostycznych i terapeutycznych na docelowej grupie chorych, zaoszczędzenie dzieciom o nikłym zagrożeniu progresją uciążliwej terapii, zmniejszenie kosztów ochrony zdrowia a także spowoduje wprowadzenie wczesnego mało inwazyjnego leczenia operacyjnego dzieci ze skrzywieniami o dużym potencjale progresji.

7) Do kogo możesz zatelefonować, jeśli będziesz miał/a jakiekolwiek pytania lub problemy?

Jeśli ma Pan/Pani jakiegokolwiek pytania Proszę skontaktować się z dr hab. med. Tomaszem Kotwickim telefonując pod nr tel.: 602 61 30 54 lub z dr Piotrem Januszem tel. 692 41 47 40.

8) Jakie informacje traktujemy jako poufne?

Wszystkie informacje o Pani/Pana stanie zdrowia będą traktowane jako poufne. Jedynymi, którzy będą mieli wgląd do tych informacji będą lekarze kierujący badaniami oraz personel Katedry i Zakładu Biologii Komórki UM uczestniczący w badaniach. Wyniki tych badań mają być opublikowane w czasopiśmie medycznym, dzięki czemu inni lekarze będą mogli skorzystać z tej wiedzy, jednak informacje osobiste nie będą tam umieszczone i nie będzie mogła być Pan/Pani zidentyfikowana w żaden sposób.

9) Co jeszcze powinien Pan/Pani wiedzieć?

Badania te są finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego

Badania koordynuje:

dr hab. med. Tomasz Kotwicki

Klinika Ortopedii i Traumatologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego, 61-545 Poznań, ul 28 Czerwca 1956 r. 135/147; tel. 602 61 30 54, fax 061 831 01 73, kotwicki@ump.edu.pl

Załącznik 4 – formularz świadomej zgody

Klinika Ortopedii i Traumatologii Dziecięcej
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego,
61-545 Poznań, ul 28 Czerwca 1956 r. 135/147

Poznań

FORMULARZ ŚWIADOMEJ ZGODY NA UDZIAŁ W PROJEKCIE BADAWCZYM

Wyrażam zgodę, aby moje dziecko uczestniczyło w badaniach zatytułowanych:

**Badania nad polimorfizmem i ekspresją genu receptora estrogenowego oraz *CHD7* w celu
prognozowania rozwoju skoliozy idiopatycznej u dzieci - wykrywanie skolioz zagrożonych progresją**

1. Potwierdzam, że przeczytałem/am i zrozumiałem/am arkusz informacyjny zamieszczony na odwrocie formularza dotyczący powyższych badań i miałem możliwość zadawania pytań.
 2. Rozumiem, że mój udział jest dobrowolny i że mogę się wycofać w każdej chwili, bez podawania przyczyny, przy czym nie będzie to miało wpływu na opiekę medyczną nad moim dzieckiem.
 3. W ramach powyższego badania wszelkie dane dotyczące mojej rodziny będą podawane anonimowo (bez podawania nazwiska). Dane powyższe będą wykorzystywane przez badaczy wyłącznie do celów naukowych.
 4. Aby zapewnić poprawne prowadzenie badania wyrażam zgodę na udostępnienie danych mojej rodziny upoważnionemu przedstawicielowi organu nadzorującego badanie. Pozwolenie jest wiążące wyłącznie w odniesieniu do danych istotnych dla powyższego badania.
 5. Badacz i przedstawiciel organu nadzorującego są zobowiązani do zachowania tajemnicy zawodowej.
 6. W przypadku opublikowania wyników badania poufność danych personalnych mojej rodziny zostanie zagwarantowana.
 7. Wyniki badania zostaną przesłane na podany poniżej adres.
 8. Wyrażona przeze mnie zgoda obejmuje udział mojego dziecka we wszystkich przewidzianych (opisanych na odwrocie formularza zgody) w projekcie badawczym procedurach:
 - wyrażam zgodę na pobranie krwi obwodowej dziecka celem izolacji DNA,
 - wyrażam zgodę na przechowywanie wyizolowanego DNA w Katedrze i Zakładzie Biologii Komórki Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu,
- wyrażam zgodę na wykonanie badań molekularnych polimorfizmu genu receptora estrogenowego typu alfa i beta oraz genu *CHD7*,

Zgodę na udział w badaniach potwierdzam własnoręcznym podpisem.

Kopia powyższego oświadczenia została mi przekazana.

Dane dziecka

Imię	Nazwisko	Pesel
------	----------	-------

Dane rodzica

Imię	Nazwisko	Pesel
------	----------	-------

Kontakt

Adres	nr tel.
-------	---------

.....

Podpis Rodzica

.....

Podpis lekarza

Załącznik 5 – Karta badania

Typ skoliozy					
Nazwisko imię				Data Badania	
Data uro- dzenia		Płeć		Miesiączka	
Wzrost		Wzrost siedząc		Waga	
Rozpoznanie (wiek)		Wywiad rodzinny		Typ skrzywienia (wg Lenke)	
Wiotkość		Skala Tannera	P	Leczenie gorsetowe	
			T		
Przebyte choroby			Przebyte operacje		
Uwagi					

Data	KRT Th prox	KRT Th	KRT Th/L	KRT S
	plurimetr Th	plurimetr L	plurimetr S2	Pion C7
	Cobb Th prox	Cobb Th	Cobb Th/L	Risser
Progresja				