

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО АКУШЕРСТВО И ГИНЕКОЛОГИЯ

д-р СВЕТЛА ТОДОРОВА НИКОЛОВА

**АСОЦИАТИВНО ПРОУЧВАНЕ НА ПОЛИМОРФНИ ГЕНЕТИЧНИ
ВАРИАНТИ С ПРЕДРАЗПОЛАГАЩ И МОДИФИЦИРАЩ ЕФЕКТ
ЗА ИДИОПАТИЧНА СКОЛИОЗА ПРИ БЪЛГАРСКИ ПАЦИЕНТИ**

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

за придобиване на образователна и научна степен “ДОКТОР”

Област на висше образование: 4., „Природни науки, математика и информатика”

Професионално направление: 4.3., „Биологически науки”

Докторска програма „ГЕНЕТИКА“

Научен ръководител: доц. д-р Алексей Савов, дб

Научен консултант: проф. д-р Иво Кременски, дм, дмн

Официални рецензенти:

проф. д-р Любен Стоков, дм, дмн

проф. д-р Върбан Ганев, дм, дбн

София

2016

ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

Кирилица:

АИС – адолесцентна идиопатична сколиоза

ИИС – инфантилна идиопатична сколиоза

ЮИС – ювенилна идиопатична сколиоза

Латиница:

Th – торакална сколиоза

Th-L – тораколумбална сколиоза

L – Лумбална сколиоза

SRS – Scoliosis Research Society

SNP – единичен нуклеотиден полиморфизъм

PCR – полимеразна верижна реакция

RFLP – полиморфизъм по дължината на рестрикционните фрагменти

HWE – равновесие по Харди-Вайнберг

GWAS – цялостно геномно проучване

CHD7 – хромодомен хеликаза свързващ белтък-7

MTNR1B – мелатонинов рецептор тип 1B

IL17RC – рецептор за интерлевкин-17

GPR126 – G-протеин свързан рецептор G6

TGFβ1 – трансформиращ растежен фактор тип β1

LBX1 - Ladybird Homeobox Domain 1

CHL1 – клетъчна адхезионна молекула L1 подобен ген

IL-6 – интерлевкин-6

MMP3 – матриксна металопротеиназа-3

TRH1 – триптофан хидроксилаза-1

MATN1 – матрилин-1

ESR1 – естрогенов рецептор тип 1

ACE – ангиотензин конвертиращ ензим

ACTN3 – актинин-3

AMPD1 – аденозинмонофосфатдезаминаза-1

VDR – витамин Д рецептор

BMP4 – костен морфогенен протеин-4

Lep – лептин

IGF-1 – инсулиноподобен растежен фактор-1

OR – отношение на шансовете

RR – релативен риск, отношение на рисковете

CI – доверителен интервал

N – Брой пациенти плюс контроли

n – брой пациенти или брой контроли

n₁ – брой пациенти

n₂ – брой контроли

ВЪВЕДЕНИЕ

Идиопатичната сколиоза, обект на дисертационния труд, представлява актуален и обществено значим проблем в световен мащаб.

Сколиозата е най-често срещаната гръбначна деформация с начало в детска възраст. При ненавременно и неправилно проведено лечение сколиозата може да доведе до трайни последици, влошаващи сериозно качеството на живот, като: хронична болка, дегенеративни изменения на гръбначния стълб, затрудняване функцията на дихателната, сърдечно-съдовата и гастроинтестиналната система. Ефектът върху психиката, особено в пубертета, не бива да се подценява, тъй като съществува сериозен риск от пренасяне на негативните емоционални събития в зряла възраст с последваща социална изолация. Жените със сколиоза са изложени на риск от бърза прогресия на деформацията при бременност, а родоразрешението е предимно с цезарово сечение.

В най-малко 75% от случаите деформацията има неясен произход и се означава като идиопатична сколиоза. Съвременната концепция разглежда идиопатичната сколиоза като мултифакторно заболяване с участие на генетични и негенетични фактори при възникването и прогресията на изкривяването.

Първите популационни проучвания върху генетичните фактори за идиопатична сколиоза датират от 60-те години на миналия век. Фамилните и близначните проучвания показват влиянието на наследствеността и предлагат модели на унаследяване без да са в състояние да идентифицират конкретни гени и генетични промени, свързани със заболяването.

Прогресът на молекулярната биология дава възможност за цялостни геномни проучвания, идентифициране на локуси, скачени с дадено заболяване, откриване на полиморфизми в гени, които предразполагат към или модифицират риска от развитие на дадено заболяване. Така, наред с клинично-генеалогичните данни (висок процент на съвпадение при монозиготни близнаци, по-голям брой на засегнати индивиди от единия пол, наличие на семейства с поне един болен във всяко поколение) се получават и директни доказателства за участието и тежестта на генетичния компонент при възникването и прогресията на дадено заболяване.

В периода 1992-2015 г. са проведени над 100 молекулярно-генетични проучвания: на кандидат-гени за идиопатична сколиоза (анализи за скаченост, асоциативни проучвания) и няколко цялостни геномни асоциативни проучвания.

Намерени са положителни асоциации предимно с единични нуклеотидни полиморфизми в гени, свързани със структурата на съединителната тъкан, костната обмяна, сигналния път на мелатонина, пубертета и растежа и аксоналната ориентация. Силната вариабилност по отношение на резултатите предполага етническа и генетична хетерогенност.

В България проучванията върху етиологията на идиопатичната сколиоза датират от 80-те години на XX век, когато Т. Милковска-Димитрова и колектив установяват симптоми на вродена съединително-тъканна малостойност при голяма част от изследваните деца с клинична диагноза идиопатична сколиоза [1, 2].

През 2000 г. П. Танчев и колектив от УСБАЛО „Проф. Бойчо Бойчев” провеждат клинични и рентгенографски изследвания при момичета, трениращи художествена гимнастика, в опит да обяснят 10 пъти по-високата честота на срещане на идиопатична сколиоза при тези спортисти в сравнение с контроли, които не се занимават активно със спорт. Резултатите предполагат важната етиологична роля на „опасната триада”: общ лакситет на ставите, забавена зрелост, асиметрично натоварване на гръбначния стълб [3].

През 2015 г. Николова и колектив публикуват първите резултати от молекулярно-генетични асоциативни проучвания тип случаи/контроли, целящи да изследват връзката на единични нуклеотидни полиморфизми в кандидат-гени с предразположението към идиопатична сколиоза при български пациенти. Полиморфизми в гените за интерлевкин-6 и естрогенов рецептор тип 1 показват статистически значима асоциация с възникването на идиопатичната сколиоза и нейната прогресия [4, 5]. Същите полиморфни варианти са докладвани като рискови за развитието и прогресията на идиопатичната сколиоза в кавказката и в китайската популация.

Има нужда от нови генетични маркери с диагностична и прогностична стойност, в частност за вземането на терапевтични решения при засегнатите индивиди. Такива генетични маркери могат да осигурят прогноза на сколиозата в по-големи популационни групи в сравнение с тези, които понастоящем могат да бъдат скринирани с помощта на известни рискови фактори. Наличието на генетичен тест ще позволи ранна диагностика и прогноза на сколиозата, както и ранни клинични интервенции за ограничаване прогресията на болестта. Идентифицирането на генетични маркери ще позволи също селекция на индивиди за клинични процедури, включващи по-слабо инвазивни методи.

I. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Сколиозата е комплексна триизмерна деформация на гръбначния стълб, включваща латерално изкривяване във фронталната равнина, промени в сагиталния профил и ротация на прешлените в аксиалната равнина [6]. Според SRS минималният ъгъл на Cobb за дефиниция на сколиозата е 10° , измерен на рентгенография в предно-задна проекция и в изправено положение. Латерални девиации между 0 и 10° се разглеждат като асиметрии, а не като същинска сколиоза (www.srs.org). Сколиозата е най-често срещаната скелетна деформация в детска възраст [7]. В 75% от случаите структурната сколиоза има неясен произход и се класифицира клинично като идиопатична [8].

1. КЛАСИФИКАЦИЯ

През годините са предложени множество клинични класификации на идиопатичната сколиоза, като най-релевантните класификации, намиращи приложение в клиничната практика са базирани на: възраст на поява на деформацията (хронологична класификация), ъгъл на Cobb (ангуларна класификация) и засегнат отдел на гръбначния стълб (топографска класификация).

Хронологичната класификация е предложена от James (1954). Идиопатичната сколиоза може да се развие през всички периоди от раждането до завършване на растежа, но има три възрастови пика – от 0 до 3 години (инфантилна идиопатична сколиоза, ИИС), от 5 до 8 години (ювенилна идиопатична сколиоза, ЮИС) и от 10 години до завършване на растежа (адолесцентна идиопатична сколиоза, АИС) според класификацията на James [9].

Хронологичната класификация се среща в различни модификации по отношение на долната и горната възрастова граница в различните групи. Според SRS идиопатичната сколиоза се наблюдава в три възрастови групи – ИИС (от 0 до 3 години), ЮИС (от 4 до 10 години) и АИС (от 10 до 18 години) (www.srs.org).

Тази класификация е важна, тъй като, колкото по-дълъг е периодът между поставяне на диагнозата и завършване на растежа, толкова по-голям е рискът от прогресия на деформацията [10].

Терминът "ранна сколиоза" се използва общо за означаване на ИИС и ЮИС, т.е. сколиоза с ранно начало - преди 10-годишна възраст [10].

Ъгълът на сколиозата, измерен на фронтална рентгенография по метода на Cobb, е един от решаващите фактори при определяне поведението при сколиоза и е директно свързан с всички терапевтични решения. Има много рентгенологични класификации, основани на ъгъла на сколиозата, като всички от тях включват следните общи принципи [11-15]: 1. При ъгъл на Cobb под 10° , диагнозата „сколиоза“ не може да бъде поставена; 2. При криви над 30° рискът от прогресия на сколиозата значително нараства; 3. При криви над 50° консенсусът е, че сколиозата почти винаги прогресира.

Според класификация, предложена от Negrini et al. (2012), сколиозата може да бъде: лека (ъгъл на Cobb до 25°), умерена (ъгъл на Cobb 25° - 45°), тежка (ъгъл на Cobb 45° - 60°) и много тежка (ъгъл на Cobb 60° или повече) [10].

Топографската класификация на сколиозата се основава на топографската анатомия на деформацията във фронталната равнина. Класификацията на Ponseti (1950) различава 4 основни типа криви: торакална, лумбална, торако-лумбална и S-образна [16].

Класификацията на Lenke (2001) разглежда сколиозата като сложна триизмерна деформация и прави оценка на промените във фронталната и сагиталната равнина [17].

2. ЕПИДЕМИОЛОГИЯ

Според данни на SRS ИИС е най-рядко срещаната форма на идиопатична сколиоза. Момчетата биват по-често засегнати в сравнение с момичетата в съотношение 3:2 [18]. Деформацията засяга торакалния отдел в над 85% от случаите, като конвекситетът на торакалната крива при ИИС е ляв в 75-93% от случаите [19, 20]. Няколко проучвания [21-23] съобщават за регресионно развитие в половината от случаите с ИИС. Приема се, че повечето криви са самоограничаващи се с растежа [20]. Ако разликата в ъглите между апикалния прешлен и съответните му ребра е над 20° , измерена на рентгенография в предно-задна проекция, вероятността от прогресия на деформацията е голяма [20].

По данни на SRS ЮИС представлява 10–15 % от всички случаи на идиопатична сколиоза. Съотношението момичета към момчета е 2:1 до 4:1, като във възрастта между 3 и 6 години се наблюдава по-голям процент на засегнати момчета и общото съотношение достига 1:1, а между 6 и 10 години – повече засегнати момичета и съотношение 8:1 в полза на женския пол [20]. Тази сколиоза обикновено е прогресивна (70% от случаите) [20]. Криви над 30° показват тенденция към прогресия (с 1° - 3° /годишно преди 10-годишна възраст и с 4.5° - 11° /годишно през пубертета) и необходимост от оперативно лечение в 95 % от случаите на торакални криви с голям ъгъл на Cobb [20, 24].

АИС е най-често срещаната скелетна деформация в детска възраст [25]. Според SRS честотата на АИС е между 2% и 3% в общата популация, като тя варира в интервала от 0.93 до 12% при различните популационни групи според регресионен анализ на епидемиологичните данни [26]. Честотата показва връзка с размера на кривата и намалява до 0.29% в общата популация за криви над 20° [27]. Само 5% от децата с АИС имат криви над 30° [20]. Близко 10% от пациентите с АИС се нуждаят от корсетолечение [25, 28, 29], а при 0.1% деформациите прогресират до необходимост от оперативно лечение [30-32].

Според обобщени данни от епидемиологичните проучвания АИС се среща по-често при момичета с общо съотношение на момичета:момчета от 1.5:1 до 3:1, което нараства с възрастта и с тежестта на деформацията [33]. Съотношението е 1.4:1 при малки криви от 10° до 20° [34], нараства до 5.4:1 при ъгъл на Cobb между 20° и 30° [12, 35] и достига 7.2:1 при криви над 40° [33].

Торакалните криви са най-често срещани (48 %), следвани от торако-лумбални/лумбални криви (40 %), двойните криви (9 %) и двойните торакални криви (3 %) са по-редки [36]. Около 80 % от всички деца имат торакални или торако-лумбални/лумбални криви [36]. При момчетата се наблюдава по-висок процент на торако-лумбални/лумбални криви, момичетата имат по-висок процент на торакални и двойни криви [36]. При АИС се наблюдават предимно дясноконвексни криви - декстросколиоза [33], при ИИС се наблюдават по-често лявоконвексни криви - левосколиоза [19]; при ЮИС лявоконвексните и дясноконвексните криви се срещат в съотношение 1:1 до 6-годишна възраст на изява на деформацията [37, 38], а дясноконвексните криви се срещат при 80% от децата на възраст между 6 и 10 години [20]. При ИИС ротацията на прешлените е предимно лява, при АИС преобладава дясната ротация, при ЮИС няма зависимост [39].

В някои популации се наблюдава по-висока честота на идиопатичната сколиоза. Най-високата докладвана честота при европейска популация е 9.2% [40]. Kamtsiuris et al. (2007) намират по-висока честота при деца от немски произход (5.5 %) в сравнение с деца на емигранти (3.5 %). Тази разлика би могла да се дължи на генетични фактори и не може да се обясни с малнутриция или нисък социален статус, тъй като сред децата от семейства с висок или среден социален статус има по-висока честота (6.2 % и 5.6 %, съответно) в сравнение с децата с нисък социален статус (3.5 %) [41]. Carter et al. (1987) описват по-висока честота на сколиозата при афроамериканската популация (9.7 %) в сравнение с кавказката популация (8.1 %) [42].

За България резултатите от профилактичните прегледи показват трайно високи стойности на неправилните стойки – 16,83% и на структурните гръбначни изкривявания /сколиози и кифози/ – 6,81% по данни на Баракова и колектив (2008). В мащабно изследване на същия колектив от 1987/88 г. сред 39 613 деца и подрастващи тези стойности са съответно 15,03% и 5,87%. Вижда се, че неправилните стойки са нараснали с 1,8%, а структурните гръбначни изкривявания - с 0.94% за 20 годишен период [43]. Тези проучвания съобщават за голям брой сколиози от първа степен според старите класификации, т. е. под 10°. При това няма информация колко от всички случаи са идиопатични. Според проучване на УСБАЛО „Проф. Бойчо Бойчев” за нашата страна честотата на сколиозите е 1.2% при ученици [44].

3. ЕТИОЛОГИЯ И ПАТОГЕНЕЗА

Сколиозата е описана още от Hippocrates (On the Articulations, part 47, около 400 г. пр.н.е.). Терминът „сколиоза” идва от гръцки език и в превод означава „извит”, използван е от Galen (131-201 сл.н.е.). Определението „идиопатична сколиоза” е въведено в началото на ХХ век. До днес, идиопатичната сколиоза е обект на проучвания, като етиологията ѝ все още остава загадка.

Идиопатичната сколиоза е уникално заболяване, защото се среща само при човека. При други гръбначни, сколиозата е най-често вродена, цикатрициална, невромускулна или експериментално индуцирана [45]. Вероятно изправената стойка има тясна връзка с развитието на идиопатична сколиоза [46]. Специфични фактори, включващи генерализиран ставен лакситет, забавена зрелост и асиметрично натоварване на гръбнака, увеличават значително риска от възникване и прогресия при идиопатичната сколиоза [3]. Сред рисковите фактори за прогресия са още големият ъгъл на изкривяването, ранно начало на заболяването (преди 10-годишна възраст), остеопения и късно менархе (OMIM #608765, www.omim.org).

Има множество хипотези относно произхода на гръбначните изкривявания. Обсъжданите възможни причини са: неправилна стойка, асиметрично натоварване на паравертебралната мускулатура, бърз растеж, хормонални нарушения, родови травми, генетични фактори. Независимо от отключващия механизъм, при веднъж обособена структурна деформация, патологичните последици за пациентите са сходни. Наблюдава се прогресивна загуба на торзионна подвижност в резултат на фиксирана асиметрия и последваща редукция на движението на гръдния кош и виталния капацитет. Колкото по-малко е детето по времето на развитие на структурната деформация, толкова по-тежки са симптомите и при малки деца сколиозата създава висок риск от сериозни усложнения, включително респираторни.

3.1.КЛИНИКО-ГЕНЕАЛОГИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ

Участието на генетични фактори във възникването на идиопатичната сколиоза е широко възприето. Ролята на генетичните фактори е обсъждана от 1896 година, когато британският хирург А.Н. Tubby (*Deformities*, p. 104) посочва, че наследственият фактор е чест и важен, като цитира от практиката си две семейства с няколко засегнати членове [47, 48]. През 1912 г. Tubby използва термините „идиопатични форми на сколиоза” и „идиопатична сколиоза” и пише, че наследственият характер на тези форми на сколиоза е безспорен като се позовава и на други източници като Adams, Vogt, според които най-малко половината от случаите са наследствени, Eulenburg, който смята, че 25% от случаите имат наследствен характер и Karewski, според който фамилните случаи са около 12% [49].

По-късно, Garland прави заключението, че ролята на генетиката не бива да се подценява при идиопатичните форми на сколиоза. Той построява родословно дърво на 5 поколения от едно семейство с 9 засегнати членове (5 мъже и 4 жени) и демонстрира класически автозомно-доминантен менделов модел на унаследяване [47].

Първите популационни проучвания, публикувани в англоезичната литература, на Harrington (1977), Wynne-Davies (1968) и Riseborough and Wynne-Davies (1973), документират повишената честота на заболяването в рамките на големи фамилии в сравнение с общата популация [7]. Harrington et al. (1977) изследват жени с ъгъл на сколиозата над 15° и откриват честота на сколиозата от 27% сред техните дъщери [50]. Популационните проучвания, включващи индексни пациенти и техните семейства, показват риск от развитие на сколиоза около 11% за родственици от първа степен, 2.4% - за втора степен и 1.4% - за трета степен [51, 52]. Голямо американско популационно проучване отпреди 10 години показва, че 97% от пациентите с идиопатична сколиоза имат поне един засегнат родственик [53]. Приема се участие поне на един мажорен ген в етиопатогенезата на заболяването и се предполага участие на различни гени при различните фамилии.

Според различни проучвания, конкордантността при монозиготни близнаци е 73% [54], 92.3% [55], при дизиготни – 36% [54], 62.5% [55]. Конкордантността при дизиготни близнаци е значително по-висока от докладваната честота на заболяването сред родственици от първа степен [51, 52]. Въпреки тези убедителни аргументи за фамилния характер на идиопатичната сколиоза, моделът на унаследяване остава дискуссионен. По-големи популационни проучвания предлагат автозомно-доминантен [51], Х-свързан [56] и мултифакторен модел на унаследяване [52]. Cowell et al. (1972), отбелязват сравнително рядко предаване от мъж на мъж [56]. При друго проучване Robin и Cohen (1975) проследяват предаването на сколиозата в пет поколения на едно семейство. Те наблюдават директно предаване на идиопатична сколиоза от баща на син в повече от един случай, което също предполага автозомен или мултифакторен модел на унаследяване [57].

Вариабилните резултати от тези ранни проучвания подчертават важността на използваните диагностични критерии и методи. Включването на пациенти със синдром на Марфан, рахит, остеогенезис имперфекта и други вторични деформации би могло да доведе до компрометиране на резултатите. Ранните проучвания разглеждат сколиозата като менделово заболяване. Причини за отклоненията от класическия менделов модел на унаследяване най-често са непълната пенетрантност и генетичната (локусна и алелна) хетерогенност. Фактът, че конкордантността при монозиготните близнаци е по-висока, показва значително участие на генетични фактори в етиологията на идиопатичната сколиоза. Различията при монозиготни близнаци по отношение на ъгъла на сколиозата, апикалния прешлен и конвекситета на кривата и възрастта на откриване на

деформацията показват участието на външни фактори [58] или на епигенетични фактори [59]. Тези резултати дават основание да се говори за генетично предразположение към идиопатична сколиоза.

3.2.МОЛЕКУЛНИ ОСНОВИ НА ИДИОПАТИЧНАТА СКОЛИОЗА

През последните две десетилетия е натрупано значително количество данни за естествената история на идиопатичната сколиоза и е постигнат напредък при изясняването на молекулярните и клетъчните промени в гръбначните елементи при прогресия на изкривяването. Растящият брой публикации върху генетиката на идиопатичната сколиоза дава надежди за идентифициране на генетичните основи и разбиране на молекулярната патогенеза на заболяването. В периода 1992-2015 г. са публикувани резултатите от над 100 молекулярно-генетични проучвания, които се опитват да идентифицират гените за идиопатична сколиоза. Изследвани са големи родословия (анализ за скаченост) и са проведени множество популационни проучвания случаи/контроли (асоциативни проучвания). Тествани са над 30 кандидат-гена и са идентифицирани множество полиморфни генетични варианти, свързани с възникването или прогресията на деформацията, което предполага че идиопатичната сколиоза може да се дължи на множество гени с различно разпределение при различните популации.

Селекцията на кандидат-гени може да се основава на биологични системи с възможно участие в етиопатогенезата на дадено заболяване (по клинични данни или резултати от проучвания върху животински модели), предходни генетични изследвания, показали статистически значима асоциация (репликативни проучвания) или резултати от анализи за скаченост (в комбинация с хипотези). В периода 1992-2006 г. много проучвания върху кандидат-гени за идиопатична сколиоза са базирани на изследване на големи родословия [60-64]. Докато фамилените проучвания са подходящи за идентифицирането на генетични варианти, лежащи в основата на редки състояния, или субфенотипи на чести заболявания [65], те все по-рядко намират приложение при изследването на комплексните болести поради ниския потенциал за детекция на чести генетични варианти [65, 66]. Това може да обясни защо след 2006 г. асоциативните проучвания случаи/контроли съставляват основната част от проучванията върху кандидат-гени за идиопатична сколиоза.

3.2.1 Асоциативни проучвания

Разделени в подгрупи, кандидат-гените за идиопатична сколиоза, участват в: сигналния път на мелатонина, изграждането на съединителната тъкан, костното формиране и метаболизъм, пубертета и развитието и др. Търсят се асоциации на кандидат-гените с предразположението към деформация, с прогресията (тежестта) на заболяването и в някои случаи – с коморбидността като ниска костна плътност или абнормни антропометрични показатели.

Неврологична хипотеза

Според тази хипотеза, основана на множество наблюдения, сколиотичната деформация на гръбначния стълб е следствие от първична лезия в нервната система. Например, сколиозата е често срещана при неврологични/невромускулни заболявания. Добре позната е и асоциацията между сколиоза и сирингомиелия. В този случай, не е известно дали сколиозата е последица от сирингомиелията или и двете са вторични последици от друга първична неврологична лезия [67].

Друг възможен патогенетичен механизъм на сколиозата включва постурални нарушения поради дефицит на окуло-вестибуларната и проприоцептивната функция. Едно проучване установява значителна ляво-дясна асиметрия в хоризонталните очни движения и по-голям среден брой на хоризонталните очни движения при пациенти с идиопатична сколиоза в сравнение с контроли. Тези резултати подкрепят хипотезата за повлияни окуло-вестибуларни функции при сколиозата. Развитието на сколиоза, индуцирано от отолитна лезия при морски свинчета, показва, че деформацията е вторична [68]. Със сколиозата са свързани и други мозъчни лезии. Късовълнова електролиза, създаваща микроскопични лезии в понса или в периакведукталното сиво мозъчно вещество, води до експериментална сколиоза при плъхове и зайци [69]. Пинеалектомията при пилета, риби и бипедални плъхове, води до сколиоза, подобна на идиопатичната [70-74]. Този ефект не се наблюдава при четирикраки животни и предполага важното значение на изправения стоеж за отключване на деформитета. Невъзможните хоризонтални очни движения и сколиозата се срещат съвместно при едно автозомно-рецесивно синдромно заболяване (HGPPS, OMIM #607313, www.omim.org), което се дължи на мутация със загуба на функция в *ROBO3* – ген, кодиращ трансмембранен рецептор, контролиращ аксоналната ориентация. Единствените физикални находки при пациенти с HGPPS са липсващите хоризонтални очни движения и тежката прогресивна сколиоза [75]. Може да се предполага, че сколиозата е вторична деформация, дължаща се на нарушения в аксоналната ориентация в крайния мозък. Как точно описаните неврологични лезии водят до сколиоза, остава неясно. При пациенти с HGPPS, изследователите предполагат вторично нарушение в мускулния тонус и движенията, за да обяснят сколиозата [75].

При мишки с дефицит на невротрофин-3 (NTF3) се наблюдава проприоцептивна дисфункция, дължаща се на агенезия на мускулни вретена, апоптоза на проприоцептивни неврони и нарушаване на синапсните контакти между сензорните и моторните неврони [76]. Редукция в броя на мускулните вретена и намалена функция са установени в спинални мускулни влакна от пациенти с идиопатична сколиоза [77]. Увеличената експресия на матрична РНК на *NTF3* е установена в паравертебралните мускули на пациенти с АИС [78]. Анализ за скаченост установява нов локус за АИС - 12p13, включващ гена *NTF3* [79]. Всички тези резултати сочат потенциалната роля на *NTF3* в патогенезата на АИС. Генът *NTF3* е тясно свързан с проприоцептивните механизми на постурален контрол, поради което е изследван във връзка с предразположението към АИС и резултите от корсетолечението. Общо 362 пациенти с АИС и 377 здрави контроли от китайска популация са генотипирани за 2 SNPs, селектирани с помощта на NapMap project. Проведени са изследване тип случаи/контроли и изследване само в групата на случаите за оценка на участието на *NTF3* (rs11063714) и *NTF3* (rs1805149) в етиологията и прогресията на АИС. Група от 120, недостигнали скелетна зрялост пациенти с АИС, провеждащи корсетолечение за минимален период от 2 години, е изследвана и ефективността на ортезното лечение е оценена в контекста на *NTF3* генотипите. Авторите установяват, че промоторният полиморфизъм *NTF3* (rs11063714) е свързан с тежестта на кривата и изхода от корсетолечението при китайски пациенти [80]. Тази асоциация не е потвърдена при изследване на японски пациенти (2117 случая) с АИС [81].

Mogean et al. (2004) опитват да обяснят появата на сколиоза с нарушения в продукцията на мелатонина, следствие от пинеалектомия при опитни животни, както и с установените нарушения в сигналния път на мелатонина в култивирани остеоласти от пациенти с идиопатична сколиоза [82]. Експерименталните данни сочат, че пилета и плъхове с дефицит на мелатонин развиват гръбначни деформации, в същото време последните могат да се предотвратят чрез реадминистрация на мелатонина [83, 84].

Друг експериментален ефект от мелатониновия дефицит при пилета включва редуцирана остеобластна активност и остеопороза. Възстановяването на нивата на мелатонина предотвратява развитието на сколиоза и остеопороза [85]. Липсата на значителни разлики между мелатониновите нива на пациенти и контроли подсказва, че идиопатичната сколиоза при хората може да се дължи на други компоненти на мелатониновия път [86]. Установяването на дисфункция в мелатониновия път чрез определяне нивата на цикличен аденозинмонофосфат в остеобласти от пациенти с тежка идиопатична сколиоза води до въвеждането на клиничен кръвен тест, използващ клетъчна диелектрична спектроскопия и моноклеарни клетки от периферна кръв. Този клетъчно-базиран метод може да служи като пресимптоматичен биохимичен скрининг тест за оценка на риска от развитие на сколиоза без установяване на конкретни генни промени [87].

Проучени са гените, кодиращи мелатонинов рецептор 1A (*MTNR1A*) и 1B (*MTNR1B*), но резултатите не са убедителни. Генетичният вариант на *MTNR1A* (rs2119882) не показва асоциация с началото или с прогресията на АИС при анализ за скаченост в 47 американски семейства с описан автозомно-доминантен модел на унаследяване [63], при китайска кохорта (226 случая/277 контроли) [88] и американска кохорта (589 случая/ 1,533 контроли [89].

За *MTNR1B*, Qiu et al. (2006) не откриват асоциация между АИС и три полиморфизма в кодиращия район при китайски момичета (472 случая/304 контроли) [90]. Групата по-късно провежда асоциативно проучване на два етапа (етап I: 472 случая/304 контроли; етап II: 342 случая/ 347 проби от умбиликална кръв като контроли) и демонстрира асоциацията между промоторен полиморфизъм *MTNR1B* (rs4753426) и предразположението към АИС при китайски момичета [91]. Асоциацията между АИС и същия SNP по-нататък е отхвърлена в две независими американски проучвания – първото сред 406 случая/479 контроли [92] и второто сред 589 случая/1,533 контроли [89], в унгарско проучване (126 случая/197 контроли) [93] и в японско проучване (798 случая/1,239 контроли) [94].

Генът за триптофан хидроксилаза 1 (*TPH1*) кодира ензим, есенциален за серотониновата биосинтеза (серотонинът е прекурсор на мелатонина). Полиморфизмът *TPH1* (rs10488682) е асоцииран с предиспозицията към АИС в китайска кохорта (103 случая/107 контроли) [95], но не и при японци (798 случая/1,239 контроли) [94] или американци (589 случая/1,533 контроли) [89]. Според последното китайско проучване полиморфизмът *TPH-1* (rs10488682) повишава резистентността към корсетолечение в група от 312 пациенти с АИС [96].

Други компоненти на мелатониновия път, които не показват асоциация с АИС, включват арилалкиламин N-ацетил трансфераза (*AANAT*) при китайско проучване (103 случая/107 контроли) [95] и американско проучване (589 случая/1,533 контроли) [89]; G протеин свързващ рецептор 50 (*GPR50*) и мелатонинов рецептор $ROR\alpha$ при американско проучване (406 случая/479 контроли) [92]; ацетилсеротонин O-метилтрансфераза (*ASMT*) и протеин киназа C делта (*PKCD*) в американска кохорта (589 случая/1,533 контроли) [89].

Автономната нервна система чрез хипоталамичния невроендокринен контрол върху пубертета, скелетния растеж и възрастта на менархе вероятно участва в етиопатогенезата на АИС. Мелатониновата дисфункция също включва автономната нервна система. Патогенезата на дясноконвексната торакална АИС при момичета според някои автори се обяснява с дисфункция на симпатиковата нервна система. Ниският индекс на телесната маса (BMI) при момичета с АИС е свързан с понижени циркулиращи нива на лептина. Лептинът, секретирани от адипоцитите, е основен хормон с множество регулаторни функции върху растежа и репродукцията, като: 1) подтискане

на апетита; 2) инициране на пубертета при момичета и 3) стимулиране растежа на дългите кости, ангиогенна и хондрогенна функция при мишки, както и антиостеогенна функция на централно ниво посредством симпатикуса. При момичета с АИС е документирана по-голяма активност на автономната нервна система в сравнение с контроли [97].

Привържениците на тази хипотеза смятат, че при пациенти с АИС има нарушен хипоталамичен отговор на действието на лептина, резултиращ в повишена симпатикова активност, водеща по невроендокринни механизми до: 1) висок ръст, 2) ускорен растеж, 3) по-ранна скелетна зрялост, 4) екстраспинални скелетни асиметрии, като периапикални ребра, 5) генерализирана остеопения и 6) по-нисък ВМІ. В допълнение, симпатиковите ефекти може да доведат до латерални спинални асиметрии, утежняващи невроендокринните ефекти върху растежа на адолесцентния гръбнак. В патогенезата на АИС, концепцията „лептин-симпатикова нервна система” допълва общата неврологична хипотеза, включваща соматичната нервна система. Възможно е АИС при момичета да е иницирана от хипоталамична дисфункция по отношение на енергийния метаболизъм (биоенергетика), повлияваща аксиалния скелетен растеж. При предразположените момичета, постуралните механизми на соматичната нервна система не могат да контролират асиметричните растежни промени в гръбнака и ребрата при подрастващите; това става причина за възникване на латерални девиации и сколиози. Повлияната от външни фактори стойка при момичета с предразположение към АИС, може да засили дисхармонията между автономната и соматичната нервна система и да доведе до гръбначна асиметрия или до сколиоза [97].

Един функционален полиморфизъм в лептиновия ген - *Lep* (rs7799039) е изследван за връзка с АИС в унгарска популационна извадка (126 случая/197 контроли), но единична асоциация не е установена. Когато авторите изследват взаимодействието на този генетичен вариант с други функционални полиморфизми – *BMP4* (rs4898820), *IL-6* (rs1800795), *MTNR1B* (rs4753426), установяват статистически значима връзка между определени двойни генотипни комбинации и развитието на АИС [93].

В заключение, *MTNR1B* и *TPH1* може да са асоциирани с предразположението, а *NTF3* – с прогресията на идиопатичната сколиоза при китайската популация.

Структура на съединителната тъкан

Друга водеща хипотеза предполага, че идиопатичната сколиоза е следствие от увреждания на меките тъкани, като спинални лигаменти и паравертебрални мускули. Имунохистохимичният анализ на лигаментум флаум показва някои промени в структурирането на влакната при пациенти с идиопатична сколиоза, сравнени с контроли [98]. Някои проучвания показват намалено количество на глюкозоаминогликан в междупрешленовите дискове на пациенти с идиопатична сколиоза [69]. Параспиналните мускули на конвексната страна показват хипертрофични и ЕМГ промени [69, 99]. Много проучвания, предимно в азиатски популации, показват генерализирана остеопения при идиопатична сколиоза [100-102]. Едно проучване посочва остеопенията на феморалната шийка като индикатор за прогресия на изкривяването, OR=2.3 [103].

Гените, които кодират структурни белтъци на извънклетъчния матрикс на съединителната тъкан, са потенциални кандидат-гени за идиопатична сколиоза. Гените, кодиращи фибрилин (*FBN1*), еластин (*ELN*), колаген I тип A1 и A2 (*COL1A1*, *COL1A2*), колаген II тип A1 (*COL2A1*) и агрекан (*ACAN*), не показват асоциация с идиопатичната

сколиоза при анализ за скаченост и/или тест за предаване на неравновесието в скачеността (TDE) [60-62, 64].

Човешките лизилоксидази са ензими, участващи в моделирането на колагена и еластина. Въпреки предходни експерименти с животински модели, предполагащи връзка на лизилоксидазите с идиопатичната сколиоза, положителна асоциация не е установена при общо 112 SNPs в кодиращите райони на 5 кандидат-гена (*LOX*, *LOX1*, *LOX2*, *LOX3*, *LOX4*) в американската популация (кохорта от 138 случая/411 контроли и репликативна кохорта от 400 случая/506 контроли) [104].

Дипептидилпептидаза 9 (*DPP9*) е широко експресиран, ген, който кодира протеаза с функция, важна за клетъчната адхезия, миграция и апоптоза [105]. На базата на локализацията му в 19p13.3, регион, свързан с идиопатичната сколиоза в две проучвания за скаченост [106, 107], той е изследван като кандидат-ген за АИС при асоциативно проучване на китайска извадка (571 случая/236 контроли). Асоциация с 5 репрезентативни SNPs, селектирани от *HarMap Project*, не е открита [88].

На базата на миши модели на гръбначни деформации са селектирани кандидат-гени за идиопатична сколиоза, като *MATN1*, който кодира неколагеновия протеин матрилин-1, познат още като хрущялен матриксен протеин. Продуктът на този ген принадлежи към семейство протеини, съдържащи домен А на фактора на von Willebrand и участва в изграждането на извънклетъчния матрикс на съединителната тъкан, като има съществена роля за поддържане на стойката [100, 108]. Италиански учени провеждат амплификация и фрагментен анализ на участък от *MATN1*, съдържащ микросателитен маркер, както и тест за неравновесие в скачеността в популация от 81 триоса. По такъв начин установяват, че един вътрегенен микросателитен полиморфизъм (къс тандемен повтор) в 30-и нетранслируем район на гена се среща по-често при индексните пациенти с идиопатична сколиоза [109]. Асоциативно проучване (419 случая/750 контроли) открива, че един промоторен полиморфизъм - *MATN1* (*rs1149048*) е асоцииран с предразположението към АИС и прогресията на деформацията в китайската популация [110]. Тази асоциация е отхвърлена в по-голяма японска кохорта (789 случая/1,239 контроли) [94]. В корейска популация *Yae et al.* (2012) установяват положителна връзка между *MATN1* (*rs1065755*) и профила на кривата, като най-силна е връзката между полиморфизма и възникването на двойна крива [111]. Базирани на малки кохорти, ранните резултати за *MATN1*, биха могли да бъдат фалшиво положителни или обусловени от генетичната хетерогенност на отделните популации.

Разграждането и ремоделирането на извънклетъчния матрикс са важни процеси при физиологичната енхондрална осификация. Процесът е регулиран основно от матриксните металопроотеинази (MMPs) и техните инхибитори (тъканни инхибитори на металопроотеиназите, TIMPs) [112, 113].

TIMP2 е основният инхибитор, експресиран по време на енхондралната осификация и с капацитет да инхибира широк диапазон от MMPs [105]. Генът *TIMP2* е локализиран в 17q25.3, район показал скаченост с идиопатичната сколиоза [114]. Един SNP в промотора на *TIMP2* (*rs8179090*) е асоцииран с тежестта на торакалната сколиоза (n=354), но не и с лумбалната сколиоза (n=216) или с предразположението към деформация в китайска кохорта (570 случая/210 контроли) [115]. Авторите правят извода, че *TIMP2* е ген-модификатор при АИС в китайската популация. Не е намерена асоциация между *TIMP2* (*rs8179090*) и прогресията на АИС при японски пациенти (n=2117) [81].

Промоторният полиморфизъм *MMP3* (*rs3025058* -1171 5A/6A) може да регулира експресията на *MMP3* [93]. Проучванията на италиански учени [116, 117] предполагат важното участие на този функционален полиморфизъм в генетичното

предразположение към АИС в малка италианска кохорта (53 случая/206 контроли). Честотата на генотип 5A/5A на *MMP-3* полиморфизма при пациенти с АИС е почти 3 пъти по-висока в сравнение с контроли (30.2% срещу 11.2%, $p = 0.01$, $OR = 3.34$). Резултатите не са потвърдени в по-голяма китайска кохорта (487 случая/494 контроли) [118]. Не е потвърдена и асоциацията между *MMP3* (5A/6A) и АИС при унгарско проучване (126 случая/197 контроли), но авторите предполагат, че *MMP3* може да модифицира предразположението към АИС при взаимодействие с други 2 гена (*BMP4* и *MTNR1B*) [93].

В обобщение за изследваните структурни гени, *TIMP2* е асоцииран с тежестта на торакалните криви при китайци. Тези резултати трябва да бъдат потвърдени при независимо проучване. Асоциациите с *MMP3* в малки европейски кохорти не са потвърдени при китайската популация. Асоциацията с промоторния полиморфизъм на *MATN1* в китайската популация не е потвърдена при японската, а асоциацията с микросателитния полиморфизъм на *MATN1* в италианската популация трябва да бъде изследвана в по-голяма извадка. Анализът за скаченост и за неравновесие в скачеността, показали негативни резултати, биха могли да се окажат неспособни да идентифицират чести варианти, асоциирани с идиопатичната сколиоза, така че съответните гени не могат да бъдат категорично изключени като кандидат-гени за идиопатична сколиоза.

Пубертет и растеж

Тъй като идиопатичната сколиоза се развива и прогресира в периода на костен растеж, гените, обуславящи соматотропни и андрогенни ефекти, са дискутирани като потенциални кандидат-гени за идиопатична сколиоза.

Генът, кодиращ цитохром P450 17- α хидроксилаза (*CYP17*), е потенциален кандидат-ген за прогресия на идиопатичната сколиоза заради критичната му роля в андрогеновата синтеза. В кохорта от 304 японци не е открита асоциация с деформацията [119].

Двете форми на естрогеновия рецептор - *ESR1* (ER α) и *ESR2* (ER β) са експресирани в остеобластите и в остеокластите [120], което сочи, че естрогенът регулира остеобластната функция директно [121]. Moldovan et al. (2008) демонстрират антагонистичните ефекти на 17- β -естрадиола и мелатонина върху остеобласти при АИС и стигат до извода, че интерференцията между половите хормони и сигналния път на мелатонина би могла да бъде отключващ или активиращ фактор в патогенезата на АИС. На молекулярно ниво е възможно естрогена да атенюира отговора на остеобластите към мелатонина чрез десенсибилизация на мелатониновите рецептори. Загубата на експресия на ER β при много от пациентите с АИС изглежда важен фактор за промяна в рецепторното съотношение ER α /ER β , което впоследствие би могло да повлияе сигналните естрогенови пътища [122].

Генът *ESR1* е интензивно проучван, тъй като съдържа полиморфни маркери - PvuII (rs2234693) и XbaI (rs9340799). Полиморфизмът *ESR1* (XbaI) е идентифициран като фактор при прогресията на идиопатичната сколиоза в японско проучване сред 304 момичета [119]; при китайски момичета (202 случая/174 контроли) *ESR1* (XbaI) е асоцииран с предиспозиция към АИС, прогресия на кривата и абнормен растеж [123]. В друго китайско проучване, анализ на малка група от пациенти с двойни криви (67 случая/100 контроли) показва, че другият полиморфизъм - *ESR1* (PvuII) е свързан с профила на кривата [124]. При български момичета е открита връзка между *ESR1* (PvuII) и риска от поява и прогресия на деформацията (80/160) [5]. При италианско

проучване, Esposito et al. (2009) установяват, че *ESR1* (XbaI) е асоцииран с по-ниски нива на стероиди при семейства с идиопатична сколиоза (174 случая/104 контроли) [125]. Асоциациите на АИС с *ESR1* (XbaI) и *ESR1* (PvuII) не са потвърдени при по-голяма кохорта от китайски момичета (540 случая/260 контроли) [126], нито асоциацията на АИС с *ESR1* (XbaI) е потвърдена при репликативно проучване при японски момичета (798 случая/637 контроли) [127]. Резултатите от проведения мета-анализ на няколко големи проучвания върху АИС в азиатската популация ($n_1 = 1827$ случаи и $n_2 = 1253$ контроли) не откриват значима асоциация между *ESR1* (rs9340799 XbaI) и АИС (odds ratio 1.09, 95 % CI 0.96-1.23, $p = 0.17$). Въпреки това авторите не изключват връзка с прогресията на кривата [128].

Генът *ESR1* е изследван и при момчета, като е установена асоциация със забавен пубертет [129], крипторхизъм [130], репродуктивни проблеми [131], депресия [132], количествени белези като ръст [133], костна плътност [134] и др. Въпреки нормалните естрогенови нива е установена понижена експресия на *ESR1* в остеоласти и остеоцити от млади мъже и мъже на средна възраст с идиопатична остеопороза [135]. При проучване сред здрави подрастващи момчета (средна възраст 16.9 години) е наблюдавана асоциация между рестрикционните полиморфизми *ESR1* (XbaI) и *ESR1* (PvuII) и костната маса [136]. При две други проучвания тази асоциация е по-значима в предпубертетна възраст в сравнение със зрели индивиди [137, 138]. Изследвано и описано е взаимодействието между гените *ESR1* и *VDR* и връзката му с костната маса при малки деца от двата пола [139]. Интерпретацията на посочените резултати е затруднена от факта, че няма директни доказателства за влиянието на рестрикционните полиморфизми върху нивата и активността на *ESR1*. Има обаче данни, че тези полиморфизми повлияват генната транскрипция [140].

Въпреки че *ESR1* е основният естрогенов рецептор в костите, *ESR2* може да модулира функцията на *ESR1* [141]. При китайско проучване полиморфизмът *ESR2* (rs1256120) е асоцииран с предразположението и прогресията на АИС при женски пол (218 случая/140 контроли) [142], като асоциацията е отхвърлена при по-голямо японско проучване (798 случая/637 контроли) [127]. Друг полиморфизъм в *ESR2* е свързан с костната плътност при мъже [143]. Необходими са още проучвания на *ESR2* при мъжкия пол с последващ мета-анализ на резултатите. Според полски автори [144-146] няма никаква връзка между естрогеновите рецептори, началото и прогресията на АИС и възрастта на менархе.

Три SNPs в гена за G-протеин 30 (*GPR30/GPER*), куплиран с естрогеновия рецептор - rs3808351, rs10269151, rs4266553 показват асоциация с прогресията на АИС, но не и с етиологията на АИС при китайци (389 случая/338 контроли) [147]. При японски пациенти с АИС (2117 случая) не е намерена асоциация между тези три полиморфизма и прогресията на деформацията [81].

Има данни, че естрогенът усилва ефекта от взаимодействието растежен хормон/инсулин-подобен растежен фактор при двата пола и е основният медиатор на ускорения линеарен растеж и увеличаването на костните размери от началото до средата на пубертета [148]. Тъй като ускореният растеж има отношение към прогресията на налична деформация, гените, свързани с растежа, са кандидат-гени, включени в проучвания върху идиопатичната сколиоза. Инсулин-подобният растежен фактор (IGF-1) има съществена роля за растежа на костите, следователно генът *IGF-1* е потенциален ген-модификатор при идиопатичната сколиоза. Въпреки че няма установена асоциация между АИС и рецептора за растежния хормон (*GHR*) при китайска кохорта (510 случая/363 контроли) [91] и последващо репликативно проучване [149], *IGF-1* (rs5742612) е асоцииран с тежестта на кривата при китайски деца с АИС (340 случая) [150]. Липсва асоциация между предразположението към АИС

и *IGF-1* (rs5742612) при китайски пациенти (506 случая/227 контроли) [149, 150] и при японски пациенти (798 случая/1,239 контроли) [94]. През 2012 г. Moon et al. докладват асоциация на два SNPs - rs2449539 в *LAPTM4B* и rs5742612 в *IGF-1*, асоциирани едновременно с предразположението и тежестта на идиопатичната сколиоза при корейци в малко проучване (68 случая/ 35 контроли) [151].

В заключение, асоциациите, описани в малки популационни кохорти, между идиопатичната сколиоза и честите полиморфизми на гените, кодиращи естрогеновите рецептори, не са потвърдени при по-големи проучвания. Гените *GPR30* (*GPER*) и *IGF-1* показват асоциация с прогресията на идиопатичната сколиоза в китайска популация, като тези резултати трябва да бъдат валидирани в кавказка популация.

Костна структура и костна обмяна

Други кандидат-гени за идиопатична сколиоза са гените, свързани с образуването на костната тъкан и нейния структурен интегритет. Костните морфогенни протеини са полипептидни растежни фактори, които усилват диференциацията на остеобластите [152]. Костният морфогенен протеин 4 (*BMP4*) е способен да стимулира *de novo* костна и хрущялна синтеза [153, 154]. Генът *BMP4* е тестван в унгарско проучване (референтен SNP rs4898820) (126 случая/ 197 контроли), като не е открита единична асоциация с АИС, но генотипни комбинации на *BMP4* (rs4898820) с *MMP3* (-1171 5A/6A), *MTNR1B* (rs4753426) и *Lep* (rs7799039) показват връзка с началото на АИС [93].

Генът за калмодулин 1 (*CALM1*) кодира калций зависим регулаторен белтък, който медира широк набор от белтъци и играе ключова роля в регулацията на костния търн-овър [155]. Калмодулинът, като вторичен посредник на мелатонина и поради ефектите си върху мускулния контрактилитет, е обсъждан като ключова молекула в етиологията на идиопатичната сколиоза [156]. Увеличените калмодулинови нива в тромбоцитите показват асоциация с прогресията на АИС [157]. Нещо повече, стабилизация с корсет или вертеброеза намалява тези нива при 82 и 90 % от пациентите, респективно [158]. В контролирано клинично проучване пациентите с АИС показват асиметрично разпределение на нивата на калмодулина в параспиналната мускулатура, по-високи на конвексната и по-ниски на конкавната страна на кривата [159].

В китайско проучване (100 случая/100 контроли) е изследвана връзката между основните типове криви при АИС и *CALM1*, като са открити значими разлики в генотипните честоти на *CALM1* (rs12885713) между пациенти с двойни криви и контроли и между пациенти с лумбални криви и контроли и в генотипните честоти на *CALM1* (rs5871) между пациенти с торакални криви и контроли [124]. При китайско проучване сред 146 пациенти с АИС и 146 контроли е потърсена връзка между 12 SNPs в *CALM1* и етиологията и прогресията на АИС. Общо, 3 SNPs показват връзка с предразположението към АИС: rs2300496, rs2300500 и rs3231718 [160].

Генерализираната ниска костна маса и остеопенията в аксиалния и в периферния скелет са описани при идиопатичната сколиоза [161]. Детайлните механизми и причините за загуба на костна маса не са идентифицирани. За откриване на гени, асоциирани с остеопенията при сколиоза, са тествани гени, потенциално асоциирани с остеопорозата.

Интерлевкин-6 (*IL-6*) има разнообразни активности, свързани с функциите на имунните клетки и с репликацията и диференциацията на различни клетъчни типове. Остеобластните клетки продуцират *IL-6* и експресират неговия рецептор – *IL-6R*. Друг източник на *IL-6* в костната тъкан са стромалните клетки на костния мозък, които

продуцират IL-6 след стимулация с IL-1 и TNF- α . Капацитетът на IL-6 да повлиява костната резорбция *in vitro* варира в зависимост от изследваната система, наблюдавани са, както стимулиращ, така и инхибиращ ефект. Смята се, че основният ефект на IL-6 е да регулира диференциацията на остеокластните прогенитори до зрели остеокласти. IL-6 също директно стимулира продукцията на RANKL и OPG в костната тъкан. Описана е и *in vitro* индукция на остеокластогенезата по RANKL-независим механизъм. IL-6 може да медира някои абнормни изменения в костите във връзка със стареенето или различни заболявания - болест на Paget, малигнена хиперкалцемия, фиброзна дисплазия, гигантоклетъчен тумор на костта и др. Инхибирането на рецептора за интерлевкин-6 води до блокиране на остеокластогенезата *in vivo* и *in vitro* [162]. Тези данни дават основание генът *IL-6* да се разглежда като кандидат-ген за остеопорозата.

Добре известно е, че дегенерацията на междупрешленовите дискове е част от комплексна каскада от събития, иницирана от покачване нивата и активността на инфламаторните цитокини: туморнекротизиращ фактор-алфа (TNF- α), интерлевкин-1 α (IL-1 α), интерлевкин-1 β (IL-1 β), интерлевкин-6 (IL-6), интерлевкин-8 (IL-8), интерлевкин-17 (IL-17). В допълнение, други метаболити, свързани с възпалителния отговор, като простаноиди, тромбосани и азотен оксид, са представени в дегенеративно изменените дискове. Тези агенти увеличават експресията на матрикс-деградиращи ензими, като металопротеиназите. Увеличената активност на тези ензими води до разрушаване структурата на агрекана, основният протеогликан на екстрацелуларния матрикс на *nucleus pulposus* и *annulus fibrosus*. Освен протеогликаните, металопротеиназите разрушават и фибрилните протеини на матрикса. В допълнение към катализирането на тези катаболитни процеси, цитокините повлияват клетъчния метаболизъм по различни пътища. Първо, те подтискат репаративните процеси в матрикса. Второ, цитокините ускоряват вътреклетъчните процеси, които водят до деградация на *nucleus pulposus* и *annulus fibrosus*. Трето, стимулират апоптозата [163]. Дисбалансът в катаболитните и анаболитните процеси води до дегенерация на междупрешленовите дискове, дискови хернии и радикулити. Освобождаването на хемокини от дегенеративните дискове промотира инфилтрацията и активацията на имунни клетки, водещи до по-нататъшно амплифициране на възпалителната каскада. Според съвременните схващания възпалението е един от ключовите фактори за дегенерацията на междупрешленовите дискове [164].

Burke et al. (2003) култивират тъканни проби, получени интраоперативно от междупрешленови дискове на пациенти с идиопатична сколиоза и изследват културалната среда за продукция на проинфламаторни медиатори. В резултат, както дегенеративните, така и сколиотичните *nuclei pulposi* отговарят на външни проинфламаторни стимули със секреция на повишени количества на IL-6, IL-8, PGE₂, но не и на TNF- α , като дегенеративните дискове са по-чувствителни към външни въздействия [165].

Полиморфизмът *IL-6* (-174 G/C) в промоторния район на гена повлиява нивата и функционалната активност на цитокиновия продукт. Трансфекцията с *IL-6* (-174C) алела в HeLa клетки *in vitro* води до понижени нива на IL-6 в сравнение с *IL-6* (-174G) алела [93]. Алелът *IL-6* (-174 G) и хомозиготният GG генотип е асоцииран с предразположението към АИС при малка италианска кохорта (53 случая/ 206 контроли) [116, 117] и според данните от българско проучване (80 случая/160 контроли) [4], като резултатите са потвърдени в рамките на двойна асоциация с *Lep* при по-голяма унгарска извадка (126 случая/197 контроли) [93]. Същият маркер в *IL-6* не е полиморфен в по-голяма (487 случая/494 контроли) кохорта от китайци [118]. Въпреки че не е асоцииран с етиологията и прогресията на идиопатичната сколиоза друг

генетичен вариант на *IL-6* е асоцииран с по-ниската костна плътност в лумбалната област при корейци с АИС (198 случая/120 контроли) [166].

Известно е, че рецепторът на витамин Д (*VDR*) изпълнява важна роля в регулацията на костния растеж. Пубертетът е критичен период за натрупване на костна маса; около 40% от скелетната маса се формира по време на пубертетното съзряване [167]. Morrison et al. (2005) свързват *VDR* (*BsmI*) с пиковата костна маса [168]. При асоциативно генетично проучване, Inoue et al. (2002) не откриват връзка между полиморфните варианти на гена и прогресията на идиопатичната сколиоза при японци [169]. След това Suh et al. (2010) провеждат изследване между *VDR* (*FokI*, rs2228570), (*BsmI*, rs1544410) и (*Cdx2*, rs11568820) и АИС и откриват асоциация между: 1) *VDR* (*BsmI*) и предразположението към АИС при корейци и 2) *VDR* (*BsmI*) и ниската костна плътност в лумбалния отдел на гръбначния стълб при пациенти с АИС [170]. По-късно, Yilmaz et al. (2012) не откриват връзка между *VDR* (*BsmI*) и прогресията на кривата при турски пациенти с АИС [171]. Nowak et al. (2012) установяват промени в експресията на *VDR* при пациенти с идиопатична сколиоза [172].

Рестриционният полиморфизъм *FokI* може да се разглежда като независим маркер, тъй като не се наблюдава скаченост (*LD*) с други полиморфизми в гена *VDR* [173]. По тази причина, скаченост с друг полиморфен генетичен вариант не е вероятно обяснение на асоциациите, наблюдавани с този полиморфизъм, съответно функционалните изследвания трябва да бъдат фокусирани върху този полиморфизъм. Два протеинови варианта кореспондират с двата алела: дълга молекула на *VDR* (полиморфен *T*-алел или “*T*” алел) и протеин, скъсен с 3 аминокиселини (див тип *C*-алел или “*F*” алел) [174]. Установено е, че двата протеинови варианта имат различен потенциал да индуцират транскрипция на витамин Д зависими гени [175-177]. В проучване на Arai et al. (1997), са получени доказателства за функционалния характер на *FokI*. Данните от проучванията на трансфектирани клетки *HeLa* предполагат, че състоящият се от 424 аминокиселини протеинов вариант (кореспондиращ с дивия тип *C*-алел или *F* алел) притежава с 1.7 пъти по-висока активност от дългия протеинов вариант, състоящ се от 427 аминокиселини [175]. Jurutka et al. (2000) демонстрират, че скъсеният протеинов вариант (424 аминокиселини) взаимодейства по-ефективно с транскрипционен фактор *TFIIIB*. Авторите правят заключението, че скъсеният вариант на рецептора за витамин Д по-ефективно иницира транскрипция на зависимите гени [176]. Colombini et al. (2014) откриват връзка между *VDR* (*FokI*) и патологии на лумбалния гръбнак, което предполага, че дегенеративните изменения на гръбначния стълб се влияят от генетични фактори [178]. Необходими са проучвания на асоциацията между *VDR* (*FokI*) и идиопатичната сколиоза.

Гените *RANK*, сега известен като *TNFRSF11A*, *RANKL* и *OPG*, сега познат като *TNFRSF11B*, са изследвани за връзка с тежестта на идиопатичната сколиоза и ниската костна плътност в асоциативно проучване със 198 корейски момичета. Авторите откриват положителна асоциация само между *OPG* (rs 2073618, 1181 G/C) и ниската костна плътност при момичета с АИС [179].

Един чест полиморфизъм в гена за ангиотензин-конвертиращ ензим (*ACE*) (NCBI ref. SNP ID: rs1799752) представлява инсерция/делеция (*I/D*) на *Alu* секвенция от 287 бази в интрон 16 [180]. Има много доказателства за функционалния характер на този полиморфизъм [181-184]. Изследванията на Almeida (2010) показват, че генотипът *DD* е свързан с по-висока активност на плазмения *ACE* в сравнение с *II* и *ID* [185]. Активността на *ACE* е повишена 2 пъти при хомозиготи (*D/D*) в сравнение с (*I/I*). Хетерозиготните носители *I/D* показват интермедиерна *ACE* активност. Такъв ефект е наблюдаван по отношение и на плазмените и на тъканните нива на *ACE* [186]. Ензимът *ACE* катализира превръщането на неактивния ангиотензин *I* в активната форма на

вазоконстриктора ангиотензин II. Ангиотензин II, освен че повишава кръвното налягане, има ефект и върху костната обмяна, като активира остеокластите посредством RANKL индукция. [187]. Клиничните проучвания показват, че ниската ACE активност, асоциирана с ACE I/I генотип, е свързана с по-добра прогноза при лечение на остеопорозата в сравнение с другите генотипи [188]. Наблюдавани са сигнификантни разлики в генотипните и алелните честоти на ACE (I/D) между пациенти с остеопороза и контроли при турско проучване (238 случая/124 контроли) [189]. Тези резултати предполагат участието на ACE в патогенезата на остеопорозата.

Във връзка с идиопатичната сколиоза до момента този полиморфизъм е изследван само в рамките на голяма бразилска фамилия с 22 засегнати членове с различна степен на изкривяване. Установена е по-висока честота на DD генотипа и D алела при засегнатите индивиди [190].

Генът *ACTN3* кодира α -актинин-3, актинсвързващ протеин със структурна роля в саркомерната Z-линия на скелетните мускули и регулаторна роля в мускулната обмяна [191]. Изоформата *ACTN3* е специфична за мускулните влакна тип II [180]. Един разпространен нонсенс полиморфизъм в екзон 16, кодон 577 на *ACTN3* води до заместване на аргининина (R) със стоп кодон (X) [192]. Алел R отговаря за нормалната синтеза на протеинов продукт, докато алел X в хомозиготно състояние напълно блокира продукцията на функционален α -актинин-3 [191, 192]. При „knockout” мишки е изяснено, че дефицитът на *ACTN3* повлиява функцията на скелетните мускули [191]. При индивиди с XX генотип не се развива заболяване. Възможно е α -актинин-2 да е способен да компенсира липсата на α -актинин-3 във фибри тип II въпреки че не са установени повишени нива на α -актинин-2 в отговор на дефицита. Секвенцията на *ACTN3* остава висококонсервативна, в еволюционен план, след дивергенцията с *ACTN2* преди повече от 300 млн. години; α -актинин-2 и α -актинин-3 са с различна експресия във времево и пространствено отношение през ембрионалното развитие; експресията на *ACTN2* не се припокрива изцяло с тази на *ACTN3* в постнаталния период в скелетните мускули [193].

Изследванията на Wajchenberg et al. (2013) върху потенциалната асоциация на *ACTN3* с АИС не показват сигнификантни разлики между генотипните и алелните честоти на този полиморфизъм [190].

Трансформирацията растежен фактор бета 1 (TGFB1, TGF- β 1) е мултифункционален пептид, чиято експресия е свързана с физиологичните процеси на растеж, диференциация, регенерация и отговор на стрес [194-6] в много клетъчни типове (OMIM #190180, www.omim.org). Dickinson et al. (1990) установяват високи нива на матрична РНК и/или протеин в развиващите се тъкани на скелета и кожата, което предполага ролята на TGFB1 за растежа и диференциацията им [197]. *TGFB1* е един от кандидат-гените за остеопорозата и при 27–68% от децата с идиопатична сколиоза е измерена намалена костна плътност [198]. Остеопенията е един от рисковите фактори за прогресия на сколиозата [101, 103]. Полиморфизмът *TGFB1* (-509C/T; -1347C/T) повлиява плазмените нива на TGFB1. Shah et al. (2006) показват, че разликата в нивата се дължи на супресия на транскрипцията от активаторния протеин - *AP1*. In vitro и in vivo е установено, че AP1 комплексът, съдържащ JunD и c-Fos, се свързва към промотора на *TGFB1* само при наличие на дивия тип алел -1347C. По такъв начин, повишените нива на TGFB1 са свързани с полиморфния алел -1347T поради загуба на негативна регулация, осъществявана от AP1. Shah et al. (2006) също установяват, че HIF1A се свързва към участък, който се припокрива с мястото на свързване на AP1 около позиция -1347, което предполага, че двата транскрипционни фактора се конкурират за свързване към -1347C [199].

Нарушенията в TGF- β сигналния път играят важна роля в разнообразни наследствени и придобити заболявания, включващи сколиотична деформация. Прогресивна сколиоза се наблюдава при 45-60% от пациентите със синдром на Marfan [200]. Заболяването има автозомно-доминантно предаване и представлява генерализирана съединителнотъканна дисплазия в резултат от мутация във фибрили-1 (*FBN1*). *FBN1* стабилизира латентните TGF- β комплекси в извънклетъчния матрикс [194]. Разнообразните прояви на синдрома на Marfan най-вероятно се дължат на нарушения в хомеостазата на извънклетъчния матрикс, като мутантните форми на *FBN1* водят до промени в механичните свойства на съединителната тъкан, увеличена TGF- β сигнализация и нарушаване на взаимодействията между клетки и матрикс [201]. Марфаноподобните фенотипи също може да бъдат причинени от мутации в TGF- β рецепторите. Сколиоза се наблюдава при 46% от пациентите със синдрома на Loeys-Dietz – мултисистемно заболяване, дължащо се на мутации в *TGFBR1* или *TGFBR2* [202]. Мутации в гена TGF- β 1 причиняват болест на Samurati-Engelmann, която се свързва с марфаноиден хабитус и повишена TGF- β сигнализация [203]. Повишената TGF- β активност има роля и в патогенезата на мускулните дистрофии. Некрозата на миоцитите повишава TGF- β сигнализацията, което подпомага мускулната фиброза [204, 205]. Пациентите с мускулна дистрофия тип Дюшен имат 90% шанс от развитие на тежка прогресивна сколиоза [206].

При руско асоциативно проучване (300 случая/300 контроли) функционалните полиморфизми на TGF- β 1 показват връзка с предразположението към АИС. В групата на момичетата TGF- β 1 (-509C > T) показва връзка с началото на заболяването и с тежестта на деформацията [207].

Гените, кодиращи TGF- β s и техните рецептори (TGFBRs), могат да бъдат включени в групата на кандидат-гени с участие в етиологията и патогенезата на идиопатичната сколиоза. Промените в транскрипционния профил на TGF- β s и TGFBRs биха могли да повлияят регулацията на много сигнални пътища с потенциално участие в етиопатогенезата на идиопатичната сколиоза [208]. При две проучвания е установена значително повишена експресия на TGF- β 1 в клетки от конкавната страна на деформацията при пациенти с АИС, което предполага участието на TGF- β 1 като етиологичен фактор или вторичен фактор при развитие на деформацията [90, 209]. Участието на TGF- β сигнализацията може да е различно при ЮИС и АИС. Nowak et al. (2014) установяват промени в транскрипцията на TGF- β 2, TGF- β 3 и TGFBR2 в мускулни проби от конкавната страна на кривата при пациенти с АИС. Наблюдава се и повишена транскрипция на гените: *LTBP3*, *LTBP4*, *ITGB4*, *ITGB5* в паравертебралните мускули от конкавната страна на кривата при АИС [198]. Тези резултати предполагат, че екстрацелуларният регион на паравертебралните мускули е интересна цел за бъдещи молекулярно-генетични изследвания върху етиопатогенезата на АИС.

В заключение, *IL-6*, *TGFB1*, *CALM1* и *VDR* може да са асоциирани с предразположението към идиопатична сколиоза, *IL-6* и *TGFB1* – с прогресията на сколиозата, а *IL-6*, *VDR* и *OPG* – с ниска костна плътност. Тези резултати трябва да бъдат потвърдени в по-големи проучвания. Негативните резултати в малки кохорти не изключват положителни генетични асоциации при по-големи проучвания.

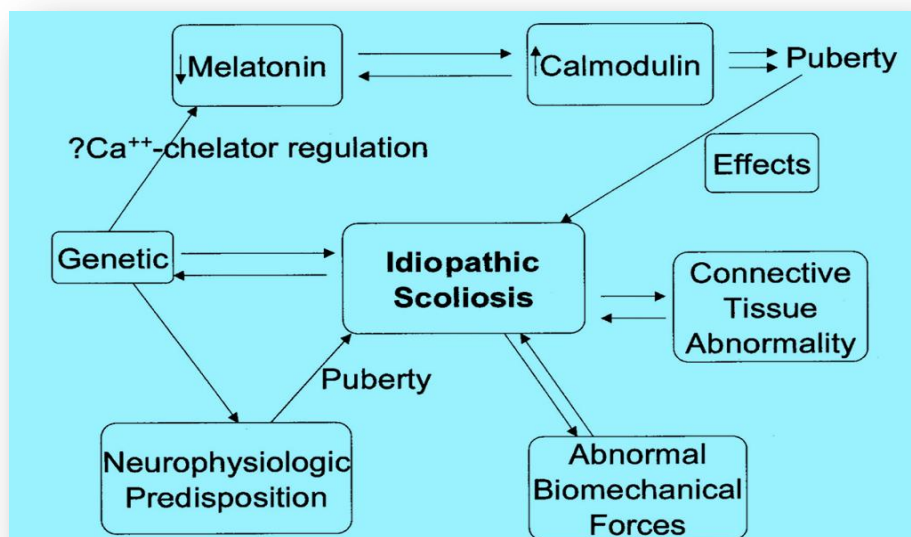
Необходими са асоциативни проучвания тип случаи/контроли за изследване ролята на честите функционални полиморфизми на *ACE* и *ACTN3* в етиопатогенезата на идиопатичната сколиоза.

На базата на проведените асоциативни проучвания в различни популационни групи е предложен следният хипотетичен модел за етиопатогенезата на идиопатичната сколиоза (фиг. 1.1).



Фиг. 1.1 Хипотетичен модел на сколиозата (адаптирано от Cheng et al., 2007 [210])

На фиг. 1.2 е представено участието на генетичните и негенетичните фактори при възникването и прогресията на идиопатичната сколиоза според различните хипотези.



Фиг. 1.2. Хипотетичен модел на сколиозата (Lowe et al., 2000 [69])

На фиг. 1.3 е представен хипотетичен модел, включващ участие на епигенетичните фактори при възникването и прогресията на идиопатичната сколиоза.



Фиг. 1.3. Хипотетичен модел на сколиозата

На таблица 1.1 са представени докладваните до момента кандидат-гени, на таблица 1.2 - позитивните асоциации между полиморфни генетични варианти с предразполагащ и/или модифициращ ефект и идиопатичната сколиоза при асоциативни проучвания в различни популационни групи и на таблица 1.3 – негативните асоциации.

Таблица 1.1. Кандидат-гени за идиопатична сколиоза

Кандидат-гени	Брой асоциативни проучвания	Брой позитивни асоциации	Произход на извадката [Източници]	Брой негативни асоциации	Произход на извадката [Източници]
Структура на съединителната тъкан					
FBN1, ELN, COL1A1, COL2A1	1	0	-	1	Американска [Carr, 1992 [60]]
COL1A2	2	0	-	2	Американска [Carr, 1992 [60]]; Американска [Miller, 1996 [61]]
ACAN	2	0	-	2	Руска [Zorkoltseva, 2002 [62]]; Американска [Marosy, 2006 [64]]
MATN1	4	3	Италианска [Montanaro, 2006 [109]]; Китайска [Chen, 2009 [110]]; Корейска [Bae, 2012 [111]]	1	Японска [Takahashi, 2011 [94]]
LOX1, 2, 3, 4, 5	1	0	-	1	Американска [McGregor, 2011 [104]]
TIMP2	2	1	Китайска [Jiang, 2011 [115]]	1	Японска [Ogura, 2013 [81]]
MMP3	3	1	Италианска [Aulisa, 2007 [116]]	2	Унгарска [Mogocz, 2011 [93]]**; Китайска [Liu, 2010 [118]]
DPP9	1	0	-	1	Китайска [Qiu, 2008 [88]]
Костна хомеостаза					
BMP4, LEP	1	0	-	1	Унгарска [Mogocz, 2011 [93]]**
CALM1	2	2	Китайска [Zhao, 2009 [124]]; Китайска [Zhang, 2014 [160]]	0	-
IL-6	5	3	Италианска [Aulisa, 2007 [116]]; Корейска [Liu, 2010 [118]]; Българска [Nikolova, 2015 [4]]	1*	Унгарска [Mogocz, 2011 [93]]**
VDR	3	1	Корейска [Suh, 2010 [170]]	2	Японска [Inoue, 2002 [169]]; Турска [Yilmaz, 2012 [171]]
TNFRSF11B (OPG)	1	1	Корейска [Eun, 2009 [179]]	0	-
RANK, RANKL	1	0	-	1	Корейска [Eun, 2009 [179]]
TGFB1	1	1	Руска [Ryzhkov, 2013 [207]]	0	-
Нервна тъкан					
NTF3	2	1	Китайска [Qiu, 2012 [80]]	1	Японска [Ogura, 2013 [81]]

Сигнален път на мелатонина					
MTNR1A	3	0	-	3	Американска [Morcuende, 2003 [63]]; Китайска [Qiu, 2008 [88]]; Американска [Nelson, 2011 [89]]
MTNR1B	6	1	Китайска [Qiu, 2007 [91]]	5	Американска [Nelson, 2011 [89]]; Китайска [Qiu, 2006 [90]]; Американска [Shyu, 2010 [92]]; Японска [Takahashi, 2011 [94]]; Унгарска [Morocz, 2011 [93]]**
TPH1	3	1	Китайска [Wang, 2008 [95]]	2	Американска [Nelson, 2011 [89]]; Японска [Takahashi, 2011 [94]]
ASMT (HIOMT)	1	0	-	1	Американска [Nelson, 2011 [89]]
AANAT (SNAT)	2	0	-	2	Американска [Nelson, 2011 [89]]; Китайска [Wang, 2008 [95]]
GPR50	1	0	-	1	Корейска [Shyu, 2010 [92]]
Пубертет и растеж					
CYP17	1	0	-	1	Японска [Inoue, 2002 [119]]
ESR1	8	5	Японска [Inoue, 2002 [119]]; Китайска [Wu, 2006 [123]]; Китайска [Zhao, 2009 [124]]; Италианска [Esposito, 2009 [125]]; Българска [Nikolova, 2015 [5]]	3	Китайска [Tang, 2006 [126]]; Японска [Takahashi, 2010 [127]]; Полска [Janusz, 2013 [145]]
ESR2	3	1	Китайска [Zhang, 2009 [142]]	2	Японска [Takahashi, 2010 [127]]; Полска [Kotwicki, 2014 [146]]
GPER (GPR30)	2	1	Китайска [Peng, 2011 [147]]	1	Японска [Ogura, 2013 [81]]
GHR	2	0	-	2	Китайска [Qiu, 2007 [91]]; Китайска [Yang, 2009 [149]]
IGF-1	4	2	Китайска [Yeung, 2006 [150]]; Корейска [Moon, 2013 [151]]	2	Китайска [Yang, 2009 [149]]; Японска [Takahashi, 2011 [94]]
LAPTM4B	1	1	Корейска [Moon, 2013 [151]]	0	-

*Маркерът не е полиморфен при азиатска популация [118] **Положителна асоциация в генотипни комбинации

Таблица 1.2. Позитивни асоциации на кандидат-гени с идиопатична сколиоза

Локус, ген	Полиморфизъм	Случаи/контроли	Cobb/фенотип	Популация [източник]	Резултати
1p35, MATN1	rs1149048 rs1065755	419/750 166/126	N/A >10°; двойни криви	Китайска [Chen, 2009 [110]] Корейска [Bae, 2012 [111]]	$p = 0.0001^*$, $p = 0.002^{**}$ $p = 0.029^*$, $p = 0.021^*$
3'-UTR MATN1	микросателитен	50/100	>5°	Италианска [Montanaro, 2006 [109]]	$p = 0.0242^*$
17q25, TIMP2	rs8179090	354/210	>20° Th	Китайска [Jiang, 2011 [115]]	$p = 0.019^{**}$
11q22.3, MMP3	rs3025058	53/206	25°–125°	Италианска [Aulisa, 2007 [116]]	$p = 0.010^*$
14q24-q31, CALM1	rs12885713 rs5871 rs2300496 rs2300500 rs3231718	67/100; 20/100 57/100 146/146 146/146 146/146	>30° двойни криви; L >30° Th 31°–130° 31°–130° 31°–130°	Китайска [Zhao, 2009 [124]] Китайска [Zhao, 2009 [124]] Китайска [Zhang, 2014 [160]] Китайска [Zhang, 2014 [160]] Китайска [Zhang, 2014 [160]]	$p = 0.034^*$; $p = 0.009^*$ $p = 0.035^*$ $p = 0.0079^*$ $p = 0.0079^*$ $p = 0.0257^*$
7p21, IL6	rs1800895 rs1800895 rs1800796	53/206 80/160; 62/160 198/120	25°–125° >10°; >40° >10°	Италианска [Aulisa, 2007 [116]] Българска [Nikolova, 2015 [4]] Корейска [Liu, 2010 [118]]	$p < 0.001^*$ $p = 0.002^*$, $p = 0.002^{**}$ $p = 0.0305^*$; $p = 0.0066^{***}$
12q13.11, VDR	rs1544410 (BsmI)	198/120	>10°	Корейска [Suh, 2010 [170]]	$p = 0.0054^*$; $p = 0.0046^{***}$
8q24, TNFRSF11B (OPG)	rs2073618	198/0	>10°	Корейска [Eun, 2009 [179]]	$p = 0.0010^{***}$
11q21-22, MTNR1B	rs4753426	I: 472/304; II: 342/347	>20°	Китайска [Qiu, 2007 [91]]	$p = 0.045^*$; $p = 0.015^*$
11p15.3-p14, TPH1	rs10488682	103/107	>30°	Китайска [Wang, 2008 [95]]	$p = 0.001^*$
6q25.1, ESR1 (alpha)	rs9340799 (XbaI) rs9340799 (XbaI) rs2234693 (PvuII) rs2234693 (PvuII)	202/174 304/0 67/100; 60/100 80/160; 62/160	25°–125° >10° + ротация >30° двойни криви; >40° >10°; >40°	Китайска [Wu, 2006 [123]] Японска [Inoue, 2002 [119]] Китайска [Zhao, 2009 [124]] Българска [Nikolova, 2015 [5]]	$p = 0.010^*$ $p = 0.002^{**}$ $p = 0.014^*$, $p = 0.0128^{**}$ $p = 0.006^*$, $p = 0.023^{**}$
14q23.2, ESR2 (beta)	rs1256120	218/140	12°–135°; >30°	Китайска [Zhang, 2009 [142]]	$p = 0.037^*$, $p = 0.005^{**}$
7p22.3, GPER (GPR30)	rs3808351; rs10269151; rs4266553	389/338	>15°	Китайска [Peng, 2012 [147]]	$p = 0.004^{**}$; $p = 0.048^{**}$; $p = 0.028^{**}$
12q23.2, IGF1	rs5742612 rs5742612	506/227 68/35	>20° >10°	Китайска [Yeung, 2006 [150]] Корейска [Moon, 2013 [151]]	$p = 0.042^{**}$ $p = 0.006^*$, $p = 0.01^{**}$
8q22.1, LAPTM4B	rs2449539	68/35	>10°	Корейска [Moon, 2013 [151]]	$p = 0.004^*$, $p = 0.003^{**}$
12p13.31, NTF3	rs11063714	362/377	N/A	Китайска [Qiu, 2012 [80]]	$p = 0.008^{**}$
19q13.2 TGFB1	rs1800469	300/300	N/A	Руска [Ryzhkov, 2013 [207]]	$p < 0.01^*$; $p < 0.05^{**}$

*предразполагащ ефект **модифициращ ефект ***коморбидност (адаптирана от Gorman et al., 2012 [105])

Таблица 1.3. Негативни асоциации между единични нуклеотидни полиморфизми и идиопатична сколиоза.

Локус, ген	Полиморфизъм	Брой случаи/контроли	Ъгъл на Cobb/фенотип	Популация [източник]
MATN1	rs1149048 rs1149048	798/1,239 53/54	>15° >15°	Японска [Takahashi, 2011 [94]] Турска [Yilmaz, 2012 [171]]
LOX1-5	14 SNPs	538/917	>10°	Американска [McGregor, 2011 [104]]
MMP3	rs3025058	126/197 487/494	64.7° ± 19.2° Жени, N/A	Унгарска [Morocz, 2011 [93]]; Корейска [Liu, 2010 [118]]
DPP9	rs10406145, rs11670570, rs2286367, rs2277733, rs732631	571/236	>20°	Китайска [Qiu, 2008 [88]]
BMP4	rs4898820	126/197	64.7° ± 19.2°	Унгарска [Morocz, 2011 [93]]
LEP	rs7799039	126/197	64.7° ± 19.2°	Унгарска [Morocz, 2011 [93]]
IL6 *	rs1800795	126/197	64.7° ± 19.2°	Унгарска [Morocz, 2011 [93]]*
RANKL	rs12721445, rs2277438	198/0	>10°	Корейска [Eun, 2009 [179]]
RANK	-421 C/T, -575 C/T	198/0	>10°	Корейска [Eun, 2009 [179]]
MTNR1A	rs6847693, rs2165667, rs2165666 rs2119882	589/1,533 226/277	>40° >10°	Американска [Nelson, 2011 [89]] Китайска [Qiu, 2008 [88]]
MTNR1B	10 SNPs rs10830963, rs3781637, rs10830964 rs4753426	589/1,533 473/311 406/479 798/1,239 126/197	>40° >20° >10° >15° 64.7° ± 19.2°	Американска [Nelson, 2011 [89]] Китайска [Qiu, 2006 [90]] Американска [Shyy, 2010 [92]] Японска [Takahashi, 2011 [94]] Унгарска [Morocz, 2011 [93]]
TPH1	rs1800532, rs10488683, rs211105, rs172423 rs10488682	589/1,533 798/1,239	>40° >15°	Американска [Nelson, 2011 [89]]; Японска [Takahashi, 2011 [94]]
ASMT	rs6588807, rs4521942, rs6588810	589/1,533	>40°	Американска [Nelson, 2011 [89]]
AANAT	rs16968964, rs11077823, rs11077821 rs3760138, rs4238989, rs28936679	406/479 103/107	>10° >30°	Американска [Shyy, 2010 [92]]; Китайска [Wang, 2008 [95]]
GPR50	rs561077, rs13440581	406/479	>10°	Американска [Shyy, 2010 [92]]
PKCD	rs1483185, rs3821689, rs17052826, rs13084863	589/1,533	>40°	Американска [Nelson, 2011 [89]]
ESR1	rs9340799 rs2234693, rs9340799 rs2234693, rs9340799	798/637 540/260 287/182	>15° >20° >10°	Японска [Takahashi, 2010 [127]]; Китайска [Tang, 2006 [126]]; Полска [Janusz, 2013 [145]]
ESR2	rs1256120 rs1256120, rs4986938, rs1256049	798/637 248/243	>15° >10°	Японска [Takahashi, 2010 [127]]; Полска [Kotwicki, 2014 [146]]
GPER	rs3808351, rs10269151, and rs4266553	880/492	>10°	Японска [Ogura, 2013 [81]]
GHR	7 SNPs 5 SNPs	106/106 510/363	>20° >20°	Китайска [Yang, 2009 [149]]; Китайска [Qiu, 2007 [91]]
IGF1	rs5742612 rs35767, rs5742612, rs17884626, rs3730195	798/1,239 106/106	>15° >20°	Японска [Takahashi, 2011 [94]]; Китайска [Yang, 2009 [149]]
NTF3	rs11063714	880/492	>10°	Японска [Ogura, 2013 [81]]
TIMP2	rs8179090	880/492	>10°	Японска [Ogura, 2013 [81]]
VDR	rs1544410 (BsmI)	53/54	>15°	Японска [Inoue, 2002 [119]]; Турска [Yilmaz, 2012 [171]]

**Положителна асоциация в генотипни комбинации (адаптирана от Gorman et al., 2012 [105])

3.2.2 Анализ за скаченост

Първото молекулярно-генетично проучване при идиопатична сколиоза [60] представлява анализ за скаченост и търси връзка между 3 колагенови гена и гръбначното изкривяване в 4 големи фамилии, при които е наблюдаван автозомно-доминантен модел на унаследяване. Използвани са генетични маркери за определяне на алелната сегрегация с патологичния фенотип, но авторите не откриват скаченост на колагеновите гени със заболяването. Анализът за скаченост изследва диференциалната сегрегация на алелите сред засегнати и незасегнати членове на едно семейство. Генетичните маркери служат за дефиниране на даден алел, като с помощта на рекомбинацията или липсата на рекомбинация между маркерите се определят локуси, физически близки до специфични региони, имащи връзка със заболяването. Това е традиционната техника за изследване на менделови заболявания, която успешно е прилагана впоследствие при комплексни заболявания, в частност при проучване на субфенотипи на комплексни заболявания, които показват различен модел на унаследяване [211]. Наблюдаваните несъответствия в резултатите повдигат важни въпроси за приложимостта на тези подходи при комплексните заболявания. Анализът за скаченост при идиопатичната сколиоза изисква големи родословия [212] и в допълнение – събиране на подробна информация за всички членове, което е скъпа, времеемка и понякога трудно осъществима процедура. Дори при събрана подробна информация, различията в прилаганите критерии за селекция на пациенти с идиопатична сколиоза водят до вариабилни резултати. Информацията относно минималния ъгъл на Cobb, типа на основната крива и други субфенотипни характеристики на включените лица (начало, прогресия) е крайно необходима. Докато някои проучвания оценяват фенотипа клинично, други се позовават на данни от предходна документация и попълнени въпросници.

При комплексните заболявания са описани подгрупи, в които се наблюдава менделов тип унаследяване и в тях успешно са идентифицирани гени с помощта на анализ за скаченост (напр. *BRCA1* и *BRCA2* при рак на млечната жлеза, *APC* при фамилна аденоматозна полипоза, *LDLR* при фамилна хиперхолестеролемия) [48]. По такъв начин генотип-фенотипните корелации дори в малка подгрупа от пациенти могат да хвърлят светлина върху етиологията на дадено заболяване и в чисто приложен аспект да доведат до подобряване на терапията при тези пациенти [211].

Според принципа на скачеността две последователности (два гена), намиращи се на една хромозома, са физически свързани в група и могат да бъдат разделени само чрез кросинговър (обмяна на генетичен материал между хомоложни двойки хромозоми) по време на мейоза. Вероятността за рекомбинация между два гена при мейозата е пропорционална на разстоянието между тях. Колкото по-малко е разстоянието между два гена, толкова по-малка е вероятността по време на мейоза между тях да протече кросинговър и толкова по-голяма вероятност има те да се предават заедно (скачено) във всяко следващо поколение.

При анализа за скаченост се проследява ко-сегрегацията на даден фенотип с определен генетичен маркер в поколението. При използване на достатъчно голям брой генетични маркери, поне един от тях ще се окаже достатъчно близо до болестния локус, така че неговият начин на унаследяване ще съвпадне с начина на унаследяване на заболяването в семейството.

Съществуват два основни вида анализ за скаченост: параметричен и непараметричен. Параметричният анализ е модел-зависим метод и успешното му прилагане изисква уточняване на: модел на унаследяване на заболяването (доминантен, рецесивен, автозомен, X-свързан), честота на рекомбинация, пенетрантност на

болестния алел, генни и лалени честоти, честота на фенкопията. Показател за значимостта на резултатите от параметричния анализ за скаченост е т.нар. LOD score (Logarithm of the Odds) [213], представляващ десетичен логаритъм от отношението на вероятността получения резултат да се дължи на истинска скаченост между двата изследвани локуса, при определена рекомбинационна фракция θ и вероятността резултатът да се дължи на случайност и двата локуса да не са скачени (при $\theta=0.5$), като се изразява със следната формула:

$$\text{LOD score} = Z = \lg \frac{\text{Вероятност } (\theta)}{\text{Вероятност } (\theta=0.5)}$$

Тази стойност се изчислява за широк диапазон от стойности на θ , а максималният получен резултат се приема като мярка за степен на скаченост.

При едноточковия параметричен анализ (single-point analysis) скачеността на даден фенотипен белег с даден маркер/локус е сигурна при стойност на показателя LOD score ≥ 3 за автозомно-предавани белези (odds ratio 1,000:1), или LOD score ≥ 2 за X-свързани белези (odds ratio 100:1). Обратно, стойност на LOD score ≤ -2 е доказателство за липса на скаченост с изследвания маркер (вероятност по-малко от 1:100 за скаченост с локуса). При многоточковия параметричен анализ (multipoint analysis) стойността на LOD score от 3.3 ($p \sim 10^{-5}$) отговаря на тясна скаченост с изследвания локус [214]. LOD score анализът е изключително полезен при картиране на гени за моногенни заболявания, подчиняващи се на Менделовите закони, чиито параметри лесно могат да бъдат определени.

Непараметричният анализ е модел-независим, базиран на хипотезата, че родствениците, които споделят еднакви белези, споделят еднакви алели. За целите на анализа са необходими само алелните честоти. Стойност на LOD score от 2 ($p = 7 \times 10^{-4}$) показва вероятна скаченост, LOD score от 3.3 ($p = 2 \times 10^{-5}$) е показател за висока степен на скаченост, а при LOD score от 5.4 ($p = 3 \times 10^{-7}$) е налице истинска скаченост. Този метод е подходящ при картиране на гени, отговорни за комплексните заболявания, при които точният модел на унаследяване не е ясен. Сигнификантните резултати трябва да бъдат възпроизведени в независима кохорта, при ниво на значимост $p < 0.01$, според критериите на Lander и Kruglyak [214]. В допълнение към традиционния LOD score анализ, при локусна хетерогенност се изчислява т. нар. HLOD (heterogeneity LOD) [215].

Параметрични анализи за скаченост

При анализите за скаченост броят на мейозите е по-информативен от броя на семействата, като при различните семейства може да сегрегират различни предразполагащи гени [216]. По тази причина, проучване в една или няколко по-големи фамилии, съдържащи много засегнати членове, е оптимално за детекция на предразполагащи локуси. При седем такива проучвания са идентифицирани 9 локуса за идиопатична сколиоза [79, 106, 114, 212, 217-219]. При четири проучвания единични многочленни фамилии показват автозомно-доминантен модел на унаследяване, LOD score е над 3 [114, 212, 217, 219]. Едно проучване показва X-свързан доминантен модел при 29 семейства (202 засегнати индивиди, обща стойност на LOD score = 1.69, като при едно семейство стойността на LOD score = 2.23) [218]. За локус 18q12.1-12.2, стойността на LOD score е под 3 при изключване на индивиди с *rectus excavatum*

($LOD_{\max AIS} = 2.77$) [219], което подсказва че при въпросното семейство двата фенотипа може да бъдат скачени с един и същ локус, като загубата на значимост най-вероятно се дължи на редукцията на изследваната извадка.

В заключение, идентифицирани са 9 локуса за идиопатична сколиоза. От тях 7 преминават прага на статистическа значимост: 3q12.1, 5q13.3, 9q31.2-34.2, 12p, 17p11, 19p13.3, and Xq22.3-27.2 [105]. Резултатите са представени на Таблица 1.4.

Непараметрични анализи за скаченост

Шест от цялостните проучвания за скаченост са етапи на по-машабно изследване, включващо 202 североамерикански семейства (1,198 индивиди, 703 случая с идиопатична сколиоза). Пет от тези проучвания са непараметрични анализи за скаченост [107, 220-223]. Анализирани са различни патологични признаци (кифосколиоза, сколиоза, тежка сколиоза, свързана с пола сколиоза, тип на кривата), показващи сложността при дефинирането на фенотипа на идиопатичната сколиоза. Хромозомните райони 6p, 6q, 9q, 16p, 17p показват скаченост с предразположението към идиопатична сколиоза при 101 семейства с наблюдаван автозомно-доминантен модел на унаследяване [220]. Три други локуса (5p13, 13q13.3 и 13q32) показват скаченост с кифосколиозата (сагитална крива $>40^\circ$) при общо 7 от изследваните семейства [221]. Един локус (19p13) е свързан с прогресията на кривата при семейства, чиито пробанди имат ъгъл на Cobb $\geq 30^\circ$ [107]. Два локуса са свързани със сколиоза с тройна крива (6q15-q21 и 10q23-q25.3) [222], а 1 хромозомен регион (17q) – с тежка сколиоза при мъже [223]. Не всички от тези резултати са значими по стандартите на Lander и Kruglyak [214].

Chan et al. (2002) идентифицират локус 19p13.3 при китайски семейства [106], а Gao et al. (2007) предполагат връзката между гена *CDH7* (8q12) и идиопатичната сколиоза в кавказката популация [224]. Gao et al. (2007) изследват 52 американски семейства с идиопатична сколиоза. Цялостните геномни проучвания показват скаченост на патологичния фенотип с локус 8q12. Финото картиране сочи свързани с идиопатична сколиоза хаплотипи, включващи екзон 2 и 4 на гена *CHD7*, който е мутирал при CHARGE синдром с множествени аномалии. Секвенирането на екзоните на *CHD7* и консервативните интронни секвенции изключва промени в кодиращата последователност, но показва поне един потенциален функционален полиморфизъм, rs4738824, в интрон 2 на *CHD7*, който нарушава свързването на каудален тип (cdx) хомодоменсъдържащи транскрипционни фактори. Това е първият ген, асоцииран с предразположение към идиопатична сколиоза след цялостен анализ за скаченост и предполага етиологично припокриване между редкия, с ранно начало CHARGE синдром, и честата, с късно начало, идиопатична сколиоза [224].

При репликативно проучване сред 187 американски семейства Tilley et al. (2013) не откриват връзка между 22 SNPs в *CHD7* и фамилната идиопатична сколиоза [225]. При малко полско проучване Janusz et al. отхвърлят асоциацията между *CHD7* (rs4738824) и АИС [226].

В заключение, резултатите от 7 непараметрични анализа [106, 107, 220-223, 227] показват, че само 3 локуса достигат статистическа значимост: 6q15-q21, 10q23-q25.3 and 19p13.3 (Таблица 1.5).

Параметричните и непараметричните анализи може да идентифицират едни и същи кандидат-локуси за идиопатична сколиоза. През 2005 г., с помощта на непараметричен анализ за скаченост Miller et al. [2005] първи идентифицират локус 9q31-q34 и предполагат скаченост ($p < 0.006$), резултатът е потвърден през 2008 г. от

Osaka et al. [2008] с помощта на параметричен анализ за скаченост в 1 семейство ($Z_{\max} = 3.64$) [114, 220]. Според стандартите на Lander и Kruglyak [214], стойност на p от 0.01 означава потвърждение на скаченост в репликативна кохорта. Районът 17q25 е идентифициран с параметричен анализ от Osaka et al. [2008] през 2008 г., в две фамилии ($Z_{\max} = 2.64$ и $Z_{\max} = 1.81$), след което е потвърден при непараметричен анализ от Clough et al. [2010] през 2010 г. ($p < 0.01$), като се предполага че този локус е скачен с прогресията [114, 223].

Таблица 1.4. Позитивни резултати от цялостен параметричен анализ за скаченост

Източник	Родословие	Ъгъл на Cobb	Модел на унаследяване	Локус	Статистика
<i>Еднофамилни проучвания</i>					
Salehi (2002) [217]	3 поколения, 11 засегнати индивиди	$10^0 - 20^0$	АД, пенетрантност = 1	17p11	LOD = 3.20
Justice (2003) [218]	6 засегнати индивиди	$>10^0$	ХД, пенетрантност = 0.9 (жени), 0.79 (мъже)	Xq22.3-q27.2	LOD = 2.23
Osaka (2008) [114]	4 поколения, 8 засегнати индивиди	$15^0 - 65^0$	АД, пенетрантност = 0.8	9q31.2-q34.2	$Z_{\max} = 3.64$
Gurnett (2009) [219]	5 поколения, 9 асегнати индивиди, 4 индивиди с <i>rectus excavatum</i>	$15^0 - 70^0$	АД, пнетрантност = 0.8	18q12.1-q12.2	LOD _{max} (AIS+PE) = 3.86 LOD _{max} AIS = 2.77
Edey (2011) [212]	3 поколения, 11 засегнати индивиди	$15^0 - 41^0$	АД	3q12.1 5q13.3	$Z_{\max} = 3.00$ $Z_{\max} = 3.01$
<i>Многофамилни проучвания</i>					
Chan (2002) [106]	7 семейства, 25 засегнати индивиди	$>10^0$	АД пенетрантност = 0.8	19p13.3	LOD = 4.48
Osaka (2008) [114]	2 семейства, 16 засегнати индивиди	$11^0 - 55^0$	АД пенетрантност = 0.8	17q25.3-qtel	$Z_{\max} = 4.08$
Raggio (2009) [79]	7 семейства, 18 засегнати индивиди	$>10^0$	АР, пенетрантност = 1 АД, пенетрантност = 1	12p	LOD = 3.2 LOD = 3.7

*АД-автозомно-доминантен, АР-автозомно-рецесивен, ХД-Х-свързан доминантен модел (адаптирано от Gorman et al., 2012)

Таблица 1.5. Позитивни резултати от цялостен непараметричен анализ за скаченост

Източник	Родословие	Ъгъл на Cobb	Локус	Статистика
Marosy (2010) [222]	5 семейства, 17 засегнати индивиди	$\geq 10^0$	6q15-q21	$p < 2.10^{-10}$
Marosy (2010) [222]	5 семейства, 17 засегнати индивиди	$\geq 10^0$	10q23-q25.3	$p < 2.10^{-7}$
Chan (2002) [106]	7 семейства, 25 засегнати индивиди	$>20^0$	19p13.3	NPL = 5.36, $p = 3.10^{-5}$
Gao (2007) [224]	53 семейства, 130 засегнати индивиди	$15^0 - 113^0$	*8q12 (<i>CHD7</i>)	$Z_{lr} = 2.72, p = 2.10^{-4}$

*Възможна скаченост по критериите на Lander и Kruglyak

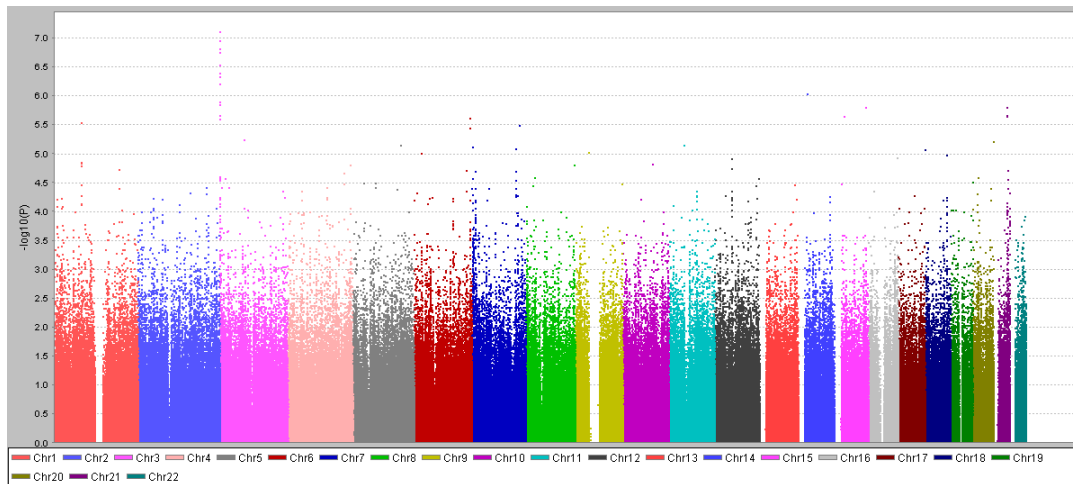
3.2.3 Цялостни геномни асоциативни проучвания

Въпреки сериозните доказателства за участието на генетичния фактор при идиопатичната сколиоза, без характерен модел на унаследяване, анализите за скаченост имат ограничен успех в идентифицирането на генетичните детерминанти. Формира се хипотезата, че сколиозата е следствие от умерен или голям брой чести генетични варианти, които поотделно са свързани с нисък риск от развитие или прогресия на деформацията. За комплексните болести с мултифакторно унаследяване, хипотезата за честите болести и честите генетични варианти (CDCV) мотивира провеждането на цялостни геномни асоциативни проучвания (GWAS) [48]. Целта на GWAS е идентифициране на геномни маркери, асоциирани със заболяване, с последваща характеристика на техния функционален ефект [228]. Според Gibson (2011), ако основният източник на генетична вариабилност в предразположението към комплексните заболявания е диференциалното натрупване на чести генетични варианти, то е възможно стотици или хиляди локуси да участват в етиопатогенезата им и локусите, установени с помощта на GWAS, да имат най-висок импакт при едно поасоново разпределение [229].

Целта на GWAS е откриване на статистически значими асоциации в популацията между честите болести и честите генетични варианти. Едно проучване тип GWAS може да обхване милиони единични нуклеотидни полиморфизми (SNPs), едновременно в генома, с помощта на комерсиални микрочипове за анализиране генотипите на хиляди индивиди. Вариантните алели, които се срещат с по-висока честота при пациентите в сравнение с контролите, вероятно маркират региони, съдържащи генетични корелати със заболяването (напр. гени или генетични делеции/дупликации). Всяка позитивна асоциация изисква потвърждаване в друга популация с по-голям размер на извадката [48].

Първото проучване тип GWAS при идиопатична сколиоза (АИС) е проведено през 2011 г., когато Sharma и сътрудниците му изследват 327 000 SNPs при 419 триоси (болно дете и двама родители) от Utah [230]. Авторите откриват най-значима асоциация между *CHL1* (rs1400180) и АИС ($P < 8 \times 10^{-8}$). Комбинираните резултати от анализа в 3 кохорти (общо 3431 индивиди) показват значима връзка на заболяването със *CHL1* (rs10510181) ($P = 2.58 \times 10^{-8}$), но тя не е потвърдена при отделното GWAS проучване. Резултатите предполагат, че *CHL1*, член на генната фамилия L1, кодираща невронални адхезионни молекули с потенциална роля в сигналната трансдукция, може да е асоцииран с предразположението към АИС. Генът кодира протеин, подобен на Robo3 – трансмембранен рецептор, контролиращ комисуралната аксонална ориентация [75]. Мутации в Robo3 причиняват синдром, характеризиращ се с парализа на хоризонталните очни движения и прогресивна сколиоза (HGPPS). Образните и неврофизиологичните изследвания при пациенти с HGPPS показват аномалии в метенцефалона и неправилна ориентация на моторните и сензорните аксони [231]. Sharma и сътрудниците му идентифицират варианти и на други гени, участващи в механизмите на аксонална ориентация: *DSCAM* ($p = 2.27 \times 10^{-6}$ за rs2222973) и *CNTNAP2* ($p = 6.20 \times 10^{-5}$ за rs11770843), като авторите приемат ниво на статистическа значимост $p < 1 \times 10^{-2}$. *DSCAM* кодира клетъчна адхезионна молекула от същия молекулен клас като *CHL1* и Robo3, която при комисуралните неврони действа като рецептор за нетрин. Частичната загуба на *DSCAM* води до извити опашки при ембриони от риба-зебра, а пълната загуба на гена – до тежко скъсяване на предно-задния диаметър [232]. Контактин-асоцииран протеин 2 или неврексин IV (CNTNAP2) може да взаимодейства директно с протеините от семейство L1 и клас Robo [233, 234]. Авторите на първото цялостно геномно проучване отхвърлят асоциация между АИС и

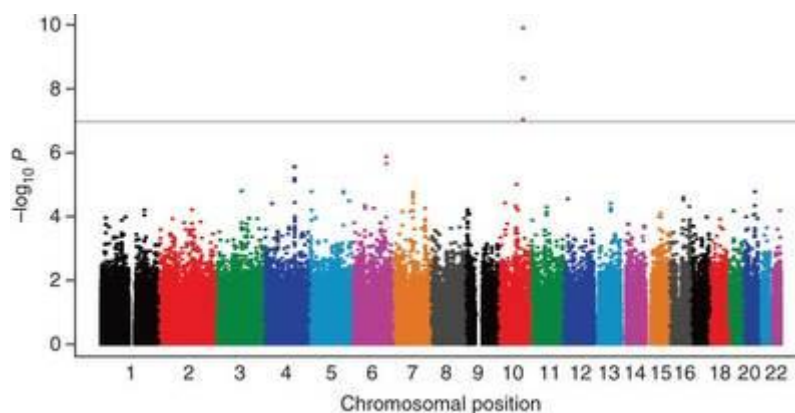
честите варианти на гените *ROBO3* и *CHD7*. На фиг. 4 е представена диграмата, отразяваща резултатите от проучването, на която се вижда най-високото ниво на значимост за маркери в 3-а хромозома (маркерите, разположени на една и съща хромозома, са оцветени в еднакъв цвят).



Фиг. 4. Диаграма тип Manhattan, показваща p -стойностите от GWAS [Sharma et al., 2011 [230]]. Ниво на статистическа значимост $p < 1.0 \times 10^{-2}$.

Две китайски репликативни проучвания - едноетапно (648 случая/ 573 контроли) и двуетапно (500 случая/ 500 контроли) не откриват връзка между rs10510181 и още 4 SNPs (rs2055314, rs331894, rs2272522, rs2272524) в гена *CHLI*, както и с *DSCAM* и *CNTNAP2* [235, 236].

Впоследствие, Takahashi и сътрудниците му (2011) докладват асоциация в източноазиатската популация (1050 случая/1474 контроли; репликационна кохорта: 326 случая/9823 контроли) между АИС и чести генетични варианти в близост с ladybird homeobox 1 (*LBX1*), кодиращ транскрипционен фактор, необходим за развитието на задръжните интерневрони в задните рога на гръбначния мозък, както и за миграцията и по-нататъшното развитие на прекурсорите на мускулните клетки. Най-значимата асоциация се наблюдава при SNP rs11190870 ($P = 1.24 \times 10^{-19}$; OR = 1.56). Авторите предполагат значението на соматосензорните пътища в етиологията на заболяването [237]. На фиг. 5 е представена диграмата, отразяваща резултатите от проучването, на която се вижда най-високото ниво на значимост за маркери в 10-а хромозома.



Фиг. 5. Диаграма тип Manhattan, показваща p -стойностите от GWAS [Takahashi et al., 2011 [237]]. Ниво на статистическа значимост $p < 1.0 \times 10^{-7}$.

В периода 2012-2013, авторите на 3 репликативни асоциативни проучвания в китайската популация потвърждават асоциацията между 3 чести генетични варианта в близост с *LBX1* (rs11190870, rs625039, rs11598564) и повишения риск от развитие на АИС [238-240].

Мета-анализ на резултатите показва, че Т алела на SNP rs11190870 може да бъде главен предразполагащ фактор към идиопатична сколиоза в източноазиатска популация, от женски пол [241].

През 2015 г. ново проучване тип GWAS в кавказката популация потвърждава асоциацията с 2 SNPs в близост до *LBX1* - rs11190870 ($p=5.43 \times 10^{-9}$) и rs11190878 ($p=4.18 \times 10^{-9}$) [242].

Асоциативно проучване в скандинавската популация изследва връзката между rs10510181, rs11190870, rs12946942, rs6570507 и идиопатичната сколиоза (1,739 случая/1,812 контроли). Отново, генетичният вариант rs11190870, downstream от гена *LBX1*, показва значима асоциация с идиопатичната сколиоза ($p=7.0 \times 10^{-18}$). При 100 пациенти с прогресивна сколиоза е проведено екзомно секвениране, при което авторите идентифицират 20 нови варианта, но нито един от тях не е потвърден в голямата кохорта [243].

За да открият нови предразполагащи локуси, Takahashi и екипът му (2013) разширяват проучването си, като сравняват 1819 японски пациенти с АИС с 25 939 контроли без сколиоза. Най-значимият полиморфизъм, който е идентифициран, е с номер rs6570507 ($p=2.25 \times 10^{-10}$, OR=1.28, 95% CI=1.18–1.38) и е локализиран в интрон на *G* протеин-свързан рецептор 126 (*GPR126*) [244]. Генът *GPR126* участва в процеса на миелинизация и в растежа и развитието на гръбначния стълб в детска възраст. Функционален анализ показва, че изключването на *gpr126* при ембриони на рибата-зебра причинява скъсяване на тялото и забавена осификация в развиващия се гръбнак [48].

Впоследствие, Kou и колектив (2013) провеждат репликативно проучване и установяват същия ефект при китайската популация ($p = 1.27 \times 10^{-14}$, OR=1.27, 95% CI=1.20–1.35) [244].

Независимо китайско асоциативно проучване (352 случая/ 149 контроли) открива значима асоциация между 3 SNPs на *GPR126* и предразположението към АИС: rs6570507 ($p = 0.0035$, OR = 1.729), rs7774095 ($p = 0.0078$, OR = 1.687) и rs7755109 ($p = 0.0078$, OR = 1.687), като за последният е установено, че повлиява нивата на мРНК и протеинов продукт [245].

При проучване, обхванало близо 12 000 души, Takahashi и колектив откриват асоциация между прогресията на АИС и rs12946942 (17q24.3) в близост до гените *SOX9* и *KCNJ2*, мутации в които, водят до сколиоза ($P = 4.00 \times 10^{-8}$, OR = 2.05 при ниво на статистическа значимост $p = 5 \times 10^{-8}$) Учените потвърждават асоциацията в китайска популация ($P = 6.43 \times 10^{-12}$, OR = 2.21) [246].

Генът *IL-17RC* е асоцииран с идиопатичната сколиоза при американско проучване тип GWAS, осъществено с микрочипове с плътност 550 000 SNPs (137 случая/ 2126 контроли). Една миссенс замяна в *IL-17RC* (rs708567, S111L) показва значима асоциация с предразположението към АИС ($p = 1.18 \times 10^{-9}$, OR = 2.28) [247].

Китайско репликативно проучване (648 случая/ 573 контроли) показва връзката на *IL-17RC* (rs708567) с възникването и прогресията на АИС ($p=0.023$ и $p=0.007$, съответно) и не открива връзка между идентифицираните при цялостно геномно проучване полиморфизми в *CHL1*, *CNTNAP2* и *DSCAM* и предразположението към АИС и нейната прогресия [235].

Nelson et al. (2011) провеждат GWAS с 906 600 SNPs (1000 случая/ 1000 контроли) и установяват асоциация с SNPs в 9-а, 10-а и 12-а хромозома: rs 10758121 ($p < 2.83 \times$

10^{-8}), локализиран между *NEK7* и *ATP6VIG3*, rs 11190878 ($p < 2.45 \times 10^{-11}$) и rs 7893223 ($p < 1.53 \times 10^{-7}$) локализирани между *TLX1* и *LBX1*, rs 7138732 ($p < 3.87 \times 10^{-8}$) и rs 11181576 ($p < 2.59 \times 10^{-7}$) в близост до гена *PRICKLE 1* [248].

Последното проучване тип GWAS (четвъртото на екипа на Takahashi) идентифицира първият функционален полиморфизъм - rs10738445 в гена за базонуклин-2 (*BNC2*). *BNC2* е транскрипционен фактор, съдържащ домен тип „zinc finger”. Полиморфният алел на *BNC2* (rs10738445) води до повишена генна експресия и фенотип на сколиоза по дозозависим механизъм при рибата-зебра [249].

Съществуват някои важни ограничения при провеждането на GWAS. Първо, за избягване на фалшиво позитивни асоциации при тестване на приблизително 500 000 SNPs при няколко хиляди индивиди, праговата стойност на p трябва да бъде по-малка от 10^{-7} или 10^{-8} . В същото време, това ограничение намалява капацитета за детекция на SNPs с минорен ефект, които обаче могат да играят важна роля в контекста на взаимодействието между гени и фактори на околната среда. Второ, ефективността на едно изследване е зависима от много фактори. При интерпретиране на резултатите от GWAS е важно да се оценят размера на извадката, стойностите на OR, алелните честоти, прагът на значимост и др. [250, 251]. Въпреки тези ограничения GWAS се използват все по-широко при изследване на комплексните болести.

Като цяло, повечето рискови алели, идентифицирани с помощта на GWAS, имат популационна честота $> 5\%$ и нисък импакт ($OR < 1.5$). От 2007 г. GWAS идентифицират над 600 варианта, асоциирани с различни комплексни заболявания, но дори след комбиниране на всички локуси, установени при GWAS, те не обясняват повече от 5–10% от риска за развитие на дадено заболяване [252]. Невъзможността GWAS да изясни етиологията на комплексните заболявания води до нови хипотези, като тази, че комплексните болести са резултат от редки алели с мажорен ефект [48].

Взети заедно, резултатите от цялостните геномни проучвания върху идиопатичната сколиоза обясняват не повече от 1% от наблюдаваните фенотипни вариации [48]. Невъзможността генетичните варианти, идентифицирани чрез GWAS, да обяснят етиологията на комплексните болести, провокира някои дискусии върху причините за т. нар. „липсваща наследственост”. Предполага се, че факторите, отговорни за тази липсваща наследственост, са генните взаимодействия [253], както и някои редки генетични варианти [254], които все още не са добре проучени. Смята се, че редките генетични варианти произлизат от високо пенетрантни алели с ниска популационна честота (обикновено $< 1\%$), но са свързани с висок риск от заболяване [229]. Болест може да настъпи след акумулиране на такива редки генетични варианти, ангажиращи функционално значим клетъчен път. Редките варианти може да бъдат точкови мутации, генни делеции или дупликации. Влиянието на редките генетични варианти върху комплексните болести е обект на много дискусии и проучвания с обещаващи резултати [255].

Резултатите от цялостните геномни проучвания са представени на таблица 1.6.

Таблица 1.6. Най-значими резултати от цялостни геномни асоциативни проучвания (2011-2015 г.)

Произход на извадката [източник]	Брой случаи/контроли	Диагностични критерии, C_{obv}	Генотипираща платформа	SNP	Ген, Локус	P-стойност
Кавказка популация Американско проучване [Sharma et al., 2011] [230]	Нач. извадка: 419 триоси Репл. извадка 1: 375/444 Репл. извадка 2: 187/222	АИС > 10°, ротация	Illumina Human CNV370- Quad arrays (Illumina)	rs1400180 rs10510181	CHL1 (3p26.3) CHL1 (3p26.3)	7.91×10^{-8} 2.58×10^{-8}
Кавказка популация Американско проучване [Dormans et al., 2011] [247]	Общо: 137/2126	АИС	Illumina Human Nap550 Genotyping BeadChip	rs708567 (S111L)	IL17RC (3p25.3)	1.18×10^{-9}
Кавказка популация Американско проучване [Nelson et al., 2011] [248]	Общо: 1000/1000	АИС	Affymetrix HuSNP 6.0 microarray	rs10758121 rs11190878 rs7893223 rs7138732 rs11181576	Между NEK7 и ATP6V1G3 (9 chr) Между TLX1 and LBX1 (10 chr) В близост до PRICKLE 1 (12 chr)	2.83×10^{-8} 2.45×10^{-11} 1.53×10^{-7} 3.87×10^{-8} 2.59×10^{-7}
Азиатска популация Японско проучване [Takahashi et al., 2011] [237]	Нач. извадка: 1050/1474 Репл. извадка: 326/9823	АИС > 15°	Illumina HumanNap550v3 Genotyping BeadChip	rs11190870	LBX1 (10q24.31)	1.24×10^{-19}
Азиатска популация Японско проучване [Kou et al., 2013] [244]	Японска попул. извадка: 1819/25 939 Китайска извадка: N/A	АИС > 15°	Illumina Human OmniExpress 12v1 BeadChips	rs6570507	GPR126 (6q24.1)	Японци: 2.25×10^{-10} Китайци: 1.27×10^{-14}
Азиатска популация Японско проучване [Miyake et al., 2013] [246]	Нач. извадка: 554/1474 Репл. извадка 1: 268/9823 Репл. извадка 2: 571/326	АИС > 40°	Illumina HumanNap550v3 Genotyping BeadChip	rs12946942	в близост до SOX9 и KCNJ2 (17q24.3)	Японци: 4.00×10^{-8} Китайци: 6.43×10^{-12}
Азиатска популация Японско проучване [Ogura et al., 2015] [249]	Общо: 2109/11 140	АИС > 15°	Illumina HumanNap550v3 Genotyping BeadChip	rs10738445	BNC2 (9p22.2)	2.46×10^{-13}
Кавказка популация Американско проучване [Chettier et al., 2015] [242]	Общо: 906/1480	АИС > 15°	Affymetrix HuSNP 6.0 microarray	rs11190870 rs11190878	LBX1 (10q24.31) LBX1 (10q24.31)	5.43×10^{-9} 4.18×10^{-9}

Като се има предвид хетерогенното унаследяване при идиопатичната сколиоза, възможно е редките варианти да сегрегират различно при различните семейства. Техниките на екзомно секвениране и таргетно секвениране са подходящи за проучване на такива редки варианти.

Сравняването на секвенции от случаи с дадено заболяване с референтни геномни секвенции спомага за разграничаването на известни от неизвестни/редки варианти (www.1000genomes.org) и позволява идентификацията на гени с повишено натрупване на редки варианти [256]. Приложено при големи родословия, екзомното секвениране има потенциала да идентифицира редки, специфични за дадена фамилия генетични корелати с идиопатичната сколиоза [257]. Приложено в популацията, екзомното секвениране има капацитета да идентифицира важни гени и пътища, съдържащи редки варианти [258]. Основното ограничение идва от изследването само на кодиращите последователности от генома.

През 2014 г. с помощта на техниката на екзомно секвениране американско проучване (852 случая/669 контроли) установява връзка между редки варианти на *FBN1* и *FBN2* и прогресията на АИС, след което колективът потвърждава резултатите в китайска популационна извадка [259].

Едно скорошно френско-канадско проучване, включващо анализ за скаченост в комбинация с екзомно секвениране, идентифицира рядка миссенс замяна (p.A446T) в гена *POC5*, която ко-сегрегира с идиопатичната сколиоза в голяма фамилия с множество засегнати членове. Впоследствие замяната е открита и при други фамилии и в още 3 случая. Друг вариант - *POC5* (p.A455P) е скачен с деформацията в 1 семейство, а трети рядък вариант - *POC5* (p.A429V) е идентифициран в 5 случая на идиопатична сколиоза. При рибата-зебра повишената експресия на мРНК за всеки един от трите функционални *POC5* варианта води до гръбначна деформация без засягане на други скелетни структури [260].

Другите обяснения за „липсващата наследственост“ при социално-значимите заболявания включват междугенните взаимодействия и взаимодействията гени-външна среда. В този аспект, комплексните заболявания се явяват истинско предизвикателство пред науката [261, 262].

3.2.4 Цитогенетичен анализ

Кандидат-гени може да бъдат селектирани след цитогенетичен анализ, при който се констатира нарушения в определени хромозомни участъци, най-често балансирани аберации. Гените в точките на счупване или в близост до тях са потенциални кандидат-гени, които могат да бъдат анализирани чрез директно секвениране. Чрез такава стратегия е идентифициран 1 кандидат-ген – *SNTG1*.

С цитогенетични методи Bashiardes et al. (2004) изследват малко източно-европейско семейство с перичентрична инверсия на хромозома 8 и идиопатична сколиоза. На базата на потенциална ко-сегрегация на балансирана хромозомна аберация с идиопатичната сколиоза, Bashiardes et al. изследват съответните хромозомни области за кандидат-гени. Точката на счупване в дългото рамо не засяга известен ген и настъпва в район с високоповторени последователности. В късото рамо засяга 32-kb район между екзони 10 и 11 на гена *γ-1-синтрофин* (*SNTG1*). Синтрофините са мембранни протеини, които се свързват с дистрофина. Мутационният анализ на *SNTG1* екзоните при 152-ма пациенти със спорадична идиопатична сколиоза показва делеция на 6 базови двойки в екзон 10 при един пациент и инсерция на 2 бази и делеция в полипиримидиновия тракт на интронната секвенция около 20 бази от сплайс мястото на

екзон 5 на *SNTG1* при двама пациенти. Тези промени не са наблюдавани при скриниране на 480 контролни хромозоми [263]. *SNTG1* се експресира предимно в невроните на Пуркиние на cerebellума, в пирамидните неврони на хипокампа и в кортекса, т.е. частите, които могат да повлияят контрола върху стойката.

3.2.5 Други хипотези за произхода на идиопатичната сколиоза

- Участие на различни видове РНК-и

Микро РНК-ите (miRNAs) са клас от малки, некодиращи РНК-и, участващи в много физиологични процеси, като всяка една miRNA регулира средно 200 таргетни гена. Много гени съдържат таргетни участъци за една или повече miRNA. Различните форми на miRNAs, които свързват специфични матрични РНК-и (mRNAs), могат да регулират генната експресия и показват тъканна специфичност [264]. Негативната регулация на ключови гени от miRNAs би могла да бъде обяснение на даден аспект от етиопатогенезата на комплексните болести. Съвременните молекулярнобиологични техники дават възможност на изследователите да определят нивото на експресия на miRNAs и mRNAs в специфичните тъкани. Идентификацията на таргетните гени може да насочи към нови или суспектни за дадено заболяване биохимични пътища [265]. Тъй като miRNA е анонсирана от Encyclopaedia of DNA Elements (ENCODE) Consortium като съдържаща важни регулаторни елементи с функционална значимост, изследванията с помощта на miRNA чипови технологии са обещаващи.

Liu et al. (2015) откриват промени в експресията при 139 дълги некодиращи РНК-и (lncRNAs) и 546 матрични РНК-и (mRNAs) при пациенти с АИС в сравнение с контроли. Тези мРНК-и може са свързани с костната минерализация, невромускулните синапси, морфогенезата на скелета, метаболизма на нуклеотидите и нуклеиновите киселини, регулацията на сигналните пътища. Общо 4 дълги некодиращи РНК-и показват различна експресия при пациенти, групирани според начало на заболяването, ръст, прогресия и индекс на Risser [266].

- Промени в генната експресия

Генната експресия може да бъде повлияна от геномни модификации или варианти на секвенции, получени при метилиране, хистонна модификация т.е. епигенетични промени. Смята се, че епигенетичните модификации повлияват фенотипната вариабилност при комплексните заболявания без промяна в генната секвенция [267]. Генетичните вариации може да повлияват епигеномната динамика [268], което може да доведе до фенотипна комплексност чрез повлияване на генната експресия и клетъчната функция. Класическият пример с Prader–Willi и Angelman показва значимостта на епигенетиката при манифестация на болестната симптоматика [269]. Като се има предвид фенотипната вариабилност при монозиготни близнаци с идиопатична сколиоза, лесно може да се допусне връзката между епигенетичните модификации и фенотипните различия [270].

Изследванията върху генната експресия са източник на хипотези кои гени и пътища са засегнати при дадено заболяване. При заболявания със засягане на множество тъкани, изборът на тъкан за изследване е затруднен. При синдроми на развитието като идиопатичната сколиоза времето на пробовземане може да има значение за изхода от проучванията върху генната експресия. Друго уточнение е проведеното корсетолечение. Генната регулация може да се променя в отговор на

механичният стрес, индуциран от ортезното лечение и това да доведе до фалшиво позитивни корелации при търсене на диференциална генна експресия в етиопатогенезата на идиопатичната сколиоза [271]. Изборът на контроли е друг важен въпрос при тези проучвания. Ако пробите са взети от гръбначния стълб по време на операция (костни, дискови, мускулни проби), изборът на контроли е крайно ограничен – до интраоперативно получаване на контролни проби от травматични случаи на същата възраст. Тъй като експресията на някои гени зависи от тяхната анатомична локализация, диференциалната генна експресия между случаи и контроли може да се дължи също на този факт.

Nowak et al. установяват промени в експресията на *TGF-β2*, *TGF-β3* и таргетните гени: *LTBP3*, *LTBP4*, *ITGB4* и *ITGB5* [198], в *ACTB* и *GAPDH* [272] и във *VDR* [172] при пациенти с АИС и ЮИС. Те конструират изкуствена невронна мрежа, за да покажат асоциацията между нивата на *ACTB* и *GAPDH* и фамилната идиопатична сколиоза [272].

Fendri et al. (2013) откриват променена експресия на 145 гена в остеобласти от пациенти с АИС. Наблюдавани са значителни промени в експресионните нива на Homeobox гените (*HOXB8*, *HOXB7*, *HOXA13*, *HOXA10*), *ZIC2*, *FAM101A*, *COMP* и *PITX1* в сравнение с контроли. Клъстерният анализ показва взаимодействията на тези гени в пътища, важни за костното развитие, за диференциацията на скелетните елементи и структурния интегритет на прешлените [273].

- Ендофенотипи

Ендофенотипите са определени като ‘микроскопични и вътрешни’ [274] компоненти на едно заболяване, в контраст с онези компоненти, видими при клиничното изследване. Те са обсъждани като пътят от предразполагащи гени, през молекулни механизми до клиничен фенотип [275, 276]. Ендофенотипите са наследствени и са налични преди появата на клиничните симптоми. Те могат да се срещат при някои асимптомни родственици. Ендофенотипите, свързани с дадено заболяване, може да обяснят субфенотипите на това заболяване. Показано е наличието на ендофенотипи сред пациентите с идиопатична сколиоза [277].

- Биологични модели

Биологичните модели могат да допринесат за разбиране на патогенетичните механизми при комплексните заболявания. Генното картиране при животни със сходен патологичен фенотип или определени прояви на дадено заболяване, могат да насочат към важни кандидат-гени, които впоследствие да бъдат изследвани и при хора. Благодарение на трансгенните техники, кандидат-гените могат да бъдат валидирани на функционално ниво. Изборът на подходящ животински модел е силно затруднен от факта, че няма друг организъм с физиологичните извивки на гръбначния стълб, характерни за човека във връзка с изправения стоеж. Използвани са миши и пилешки модели, но идиопатичен тип криви са описани само при риби [278]. При породата гупи са идентифицирани мажорни генни дефекти, причиняващи гръбначни деформации [279]. Това може да означава, че идиопатичната сколиоза не е изключително свързана с изправения стоеж.

Заклучение

До момента, асоциативните проучвания тип случаи/контроли, върху отделни кандидат-гени, са преобладаващият тип изследвания при идиопатичната сколиоза. Селекцията на кандидат-гени е основана на хипотези, включващи биологичните системи с участие в развитието на деформацията и хипотези, основаващи се на резултатите от клиничните наблюдения. Други кандидат-гени са гените, съдържащи се в локусите, скачени с идиопатична сколиоза. В този случай, локусите се изследват за по-голям брой маркери или се секвенират. Основната слабост на асоциативните проучвания е, че сигнификантните асоциации рядко намират потвърждение при репликативните проучвания. Това може да се дължи, както на фалшиво позитивни резултати при първоначалното проучване, така и на спецификите на изследваната популация. Обратно, негативните резултати, получени в малки кохорти, не изключват потенциално участие на кандидат-гена с минорен ефект в етиопатогенезата на заболяването. В последните години са идентифицирани нови кандидат-гени посредством цялостно геномно проучване или екзомно секвениране.

Изследванията показват значителна генетична хетерогенност в етиологията на идиопатичната сколиоза. От една страна, има гени, създаващи предразположение, които обикновено имат ниска пенетрантност и най-често са асоциирани с нисък или умерено повишен риск от развитие на идиопатична сколиоза. В добавка към предразположението към идиопатична сколиоза, генетичните фактори повлияват също и тежестта на клиничната картина. Концепцията за модифициращи гени като елемент от генетичната хетерогенност е широко възприета. Полиморфизми в тези гени са показатели за прогресията на изкривяването и действат като модификатори при идиопатичната сколиоза.

До момента, над 90% от изследванията са върху най-разпространената форма на сколиоза – адолесцентната и върху сколиозата при момичета. Има нужда от проучвания върху етиопатогенезата на ранната сколиоза – инфантилна и ювенилна, както и върху идиопатичната сколиоза при мъжкия пол. Възможно е участието на различни генетични маркери и с различен импакт при ранната и адолесцентната идиопатична сколиоза, както и при мъжкия и женския пол. В същото време има много проучвания на връзката между предразположението към идиопатична сколиоза и различни кандидат-гени, докато проучванията върху връзката между прогресия и кандидат-гени с модифициращ ефект не са толкова много и дизайнът на тези проучвания е много различен по отношение на клиничните критерии за оценка на прогресията (показания за оперативно лечение, средна стойност на ъгъла на сколиозата, увеличаване на ъгъла на сколиозата месечно и годишно, увеличаване на ръстта, проведено корсетолечение и др.) и за подбор на пациентите (минимален ъгъл на сколиозата, възраст) и на контролите (възраст, произход – случайни извадки, субпопулации, проби от биобанки).

От първостепенно значение при сколиозата е ранното диагностициране и правилният избор на терапия. Системите за клинична класификация на идиопатичната сколиоза осигуряват база за терапевтични алгоритми, включващи консервативно и оперативно лечение. Идентифицирането на молекулни маркери с диагностична и прогностична стойност е съвременен подход за ранното откриване и третиране на проблема и прави възможно не само провеждането на профилактични мероприятия, но и ранна терапия, включваща минимално инвазивни процедури.

Обект на настоящия труд са полиморфизми в кандидат-гени, показали връзка с предразположението и прогресията на идиопатичната сколиоза от асоциативни и геномни проучвания, както и такива, показали синергичен ефект върху развитието на идиопатична сколиоза и слабо проучени или неизследвани кандидат-гени.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛ на настоящия дисертационен труд е изследване на асоциацията между единични нуклеотидни полиморфизми в кандидат-гени и идиопатичната сколиоза при български пациенти.

За постигане на целта бяха поставени следните основни **ЗАДАЧИ**:

1. Подбор на пациенти с идиопатична сколиоза и контроли чрез съответните клинични методи и образно-диагностични методи.
2. Определяне на клинични подгрупи според: начало на идиопатичната сколиоза, прогресия, фамилна история, тип гръбначна крива, проведено корсетолечение и пол на лицата.
3. Сравняване стойностите на средната възраст и на средния ъгъл на сколиозата между отделните клинични подгрупи и определяне на връзката между тях.
4. Селекция на полиморфизми в кандидат-гени, показали връзка със заболяването при различни популационни групи:
 - 4.1. При предходни асоциативни проучвания;
 - 4.2. При цялостни геномни проучвания.
5. Оптимизиране и въвеждане на методи за генотипиране на полиморфни варианти в кандидат-гените: *CHD7*, *MTNR1B*, *IL17RC*, *GPR126*, *TGFBI*, *LBX1*, *CHL1*, *IL-6*, *MMP3*, *TPH1*, *MATN1*, *ESR1*, *ACE*, *ACTN3*, *VDR*, *BMP4*, *Lep*, *IGF-1*.
6. Проучване на асоциацията между идиопатичната сколиоза и полиморфизми в кандидат гени, неизследвани до момента за асоциация с идиопатичната сколиоза - *AMPD1*.
7. Определяне на генотипните и алелните честоти на изследваните полиморфни варианти при подгрупите от пациенти и контроли за проучване на връзката им с началото на идиопатичната сколиоза, прогресията, фамилната история и пола.
8. Сравняване на генотипните и алелните честоти на изследваните полиморфни варианти при подгрупите от пациенти за проучване на връзката им с типа на гръбначната крива и с изхода от корсетолечението.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

МАТЕРИАЛИ

1. Клиничен материал

В настоящото проучване бяха включени 105 пациенти с клинично поставена диагноза идиопатична сколиоза и 210 неродствени доброволци без клинични признаци на сколиоза. Всички участници в изследването подписаха информирано съгласие (по образец). Генетичните изследвания бяха одобрени от етичната комисия на МУ-София.

Пациентите бяха насочени от Трета ортопедична клиника на УСБАЛО "Проф. Бойчо Бойчев" и Отделение по ортопедия и травматология към Токуда Болница София. Таблица 3.1 показва разпределението на случаите по основни клинични и демографски показатели. Допълнителна информация е представена в Приложение 1.

Таблица 3.1. Клинични и демографски данни за пациентите с идиопатична сколиоза (n=105)

Показател	Брой (%)
1. Пол	
1.1. Мъже	19 (18.1 %)
1.2. Жени	86 (81.9 %)
2. Тип сколиоза според началото на заболяването	
2.1. Адолесцентна идиопатична сколиоза	78 (74.3 %)
2.2. Ювенилна идиопатична сколиоза	23 (21.9 %)
2.3. Инфантилна идиопатична сколиоза	4 (3.8 %)
3. Тип сколиоза според засегнатия гръбначен отдел	
3.1. Торакална сколиоза	62 (59.1 %)
3.2. Лумбална сколиоза	12 (11.4 %)
3.3. Тораколумбална сколиоза	31 (29.5 %)
4. Тип сколиоза според конвекситета на основната крива	
4.1. Дясноконвексна сколиоза	87 (82.9 %)
4.2. Лявоконвексна сколиоза	18 (17.1 %)
5. Корсетолечение	
5.1. Да	55 (52.4 %)
5.2. Не	47 (43.7 %)
5.3. Липсват данни	3 (2.9%)
6. Оперативно лечение – вертеброеза, дистракция	
6.1. Да	84 (80.0 %)
6.2. Не	21 (20.0 %)
7. Фамилност	
7.1. Положителна фамилна анамнеза	28 (26.7 %)
7.2. Спорадични случаи	77 (73.3 %)
8. Скелетна зрялост (към датата на пробовземане)	
8.1. Пациенти, достигнали скелетна зрялост	36 (34.3 %)
8.2. Пациенти, недостигнали скелетна зрялост	69 (65.7 %)
9. Етнос	
9.1. Български	90 (85.7 %)
9.2. Турски	5 (4.8 %)
9.3. Ромски	10 (9.5 %)

Контролите бяха насочени от други болнични отделения и от Национална генетична лаборатория, като бяха включени членове на болничния персонал и студенти. Те съответстваха на пациентите по пол и етнос, като всички бяха подбрани сред възрастни доброволци със завършил скелетен растеж за изключване възможността от развитие на идиопатична деформация на по-късен етап (Таблица 3.2).

Таблица 3.2. Клинични и демографски данни за контролите (n=210)

Показател	Брой (%)
1. Пол	
1.1. Мъже	38 (18.1 %)
1.2. Жени	172 (81.9 %)
2. Скелетна зрялост (към дата на пробовземане)	
2.1. Индивиди, достигнали скелетна зрялост	210 (100 %)
2.2. Индивиди, недостигнали скелетна зрялост	0 (0 %)
3. Етнос	
3.1. Български	180 (85.7 %)
3.2. Турски	10 (4.8 %)
3.3. Ромски	20 (9.5 %)

Критериите за включване в проучването бяха стриктно съблюдавани от лекарските екипи и приложени при всички лица (Таблица 3.3 и 3.4).

Таблица 3.3. Критерии за включване/изключване на пациенти с идиопатична сколиоза

Критерии за включване	Критерии за изключване
<ol style="list-style-type: none"> 1. Първична деформация 2. Структурна сколиоза - ъгъл на Коб над 10⁰, установен рентгенографски 3. Инфантилна идиопатична сколиоза 4. Ювенилна идиопатична сколиоза 5. Адоlescцентна идиопатична сколиоза 6. Амбулаторни и хоспитализирани пациенти 7. Подписано информирано съгласие 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Функционална сколиоза 2. Конгенитална сколиоза 3. Невромускулна сколиоза 4. Синдромна сколиоза: <ul style="list-style-type: none"> • Marfan, DiGeorge, Prader-Willi, Turner, Von Recklinghausen и др. 5. Дегенеративна сколиоза 6. Травматична сколиоза 7. Вторични деформации при: <ul style="list-style-type: none"> • Тумори, инфекции, рахит и др. 8. Неподписано информирано съгласие

*базирани на Етиологичната класификация на Scoliosis Research Society

Таблица 3.4. Критерии за включване/изключване на контроли в изследването

Критерии за включване	Критерии за изключване
<ol style="list-style-type: none"> 1. Възраст над 18 години (скелетна зрялост) 2. Подписано информирано съгласие 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Първични деформации, установени при клиничен преглед или от налична рентгенография 2. Неподписано информирано съгласие

2. Биологичен материал

От пациентите и контролите бяха взети кръвни проби (10 ml венозна кръв) според медицинските стандарти за извършване на венепункция в стерилни епруветки с антикоагулант (калиева сол на ЕДТА). Кръвта беше съхранявана на 4°C до обработка за изолиране на геномна ДНК. Към настоящия момент в Национална генетична лаборатория се съхранява геномна банка, съдържаща ДНК-проби от 105 лица с идиопатична сколиоза и 210 здрави доброволци.

МЕТОДИ

За изпълнение на поставените цел и задачи бяха прилагани следните методи:

1. Клинични методи

- 1.1 Анамнеза
- 1.2 Обективно изследване
- 1.3 Образно-диагностични изследвания

2. Молекулярно-генетични методи

- 2.1 Биобанкиране
 - 2.1.1 Солева екстракция на ДНК от венозна кръв
 - 2.1.2 Фенолна екстракция на ДНК от венозна кръв
 - 2.1.3 Полуавтоматично изолиране на ДНК от венозна кръв
- 2.2 Полимеразна верижна реакция (polymerase chain reaction – PCR)
 - 2.2.1 Конвенционален PCR
 - 2.2.2 TaqMan PCR в реално време
- 2.3 Полиморфизъм по дължината на рестрикционните фрагменти (RFLP)
- 2.4 Агарозна гел-електрофореза
- 2.5 Директно секвениране (по Sanger)

3. Статистически методи (IBM SPSS Statistics 19.0 за Windows)

3.1 Дескриптивна статистика

- 3.1.1 Вариационен анализ (количествени променливи) – средни стойности (средна аритметична, медиана), стандартно отклонение, минимална и максимална стойност;
- 3.1.2 Честотен анализ (номинални и рангови променливи), абсолютни и относителни честоти;
- 3.1.3 Графични изображения.

3.2 Анализ на равновесието по закона на Харди-Вайнберг (Hardy-Weinberg equilibrium)

3.3 Методи за проверка на хипотези

3.3.1 Параметрични методи

- Т-тест при две независими извадки (Independent Samples Test) – тест на Levene за равенство на две средни при нормално разпределение;
- Дисперсионен анализ (OneWay ANOVA) – сравняване на повече от две независими групи.

3.3.2 Непараметрични методи

- Тест на Колмогоров-Смирнов (Kolmogorov-Smirnov) и тест на Шапиро-Уйлк (Shapiro-Wilk) – проверка за нормалност на разпределението на количествена променлива;
- Тест на Ман-Уитни (Mann-Whitney) – сравняване на две независими групи, когато разпределението не е нормално;
- Тест на Кръскал-Уолис (Kruskal-Wallis) – сравняване на повече от две независими групи, когато разпределението не е нормално;
- Корелационен анализ по Спирман (Spearman) за изследване на връзка между две количествени променливи;
- Хи-квадрат тест (Pearson Chi-square test и Phi and Crammer's V) или точен тест на Фишер (Fisher's exact test) – търсене на връзка между две качествени променливи (p-value).

3.4 Изчисляване на относителен риск (Odds ratio – OR, Risk Ratio – RR, 95% Confidence Interval - CI).

Използваното критично ниво на значимост е $\alpha = 0.05$. Съответната нулева хипотеза се отхвърля, когато P стойността (P-value) е по-малка от α . За обработка на данните от проучването е използван специализирания статистически пакет IBM SPSS Statistics 19.0 за Windows.

1. Клинични методи

Включват подробна анамнеза и клиничен статус на пациента, рентгенография на гръбначен стълб в изправено положение в предно-задна и латерална проекция и рентгенография със странични огъвания - бендинг. По преценка на лекуващия лекар се провеждат допълнителни диагностични изследвания. Данните за пациентите се съхраняват според правилата за защита на личната информация.

1.1 Анамнеза

От анамнестичните данни за целите на изследването е важна събраната информация за: началото на заболяването – инфантилна, ювенилна или адолесцентна идиопатична сколиоза; проведеното до момента лечение – гимнастика, корсетолечение, вертеброреза; съпътстващи състояния, заболявания и травми, които биха могли да доведат до вторична деформация – невропатична, миопатична, фибропатична, остеопатична; родственици с идиопатична сколиоза – фамилни и спорадични случаи.

1.2 Обективно изследване

При прегледа [280, 281] пациентът е стъпил на равна плоскост, като предварително се измерва дължината на долните крайници. Ходилата са събрани в петите, леко отведени откъм пръстите, коленете - изпънати, а ръцете - свободно отпуснати до тялото. Тялото и главата са в обичайното изправено положение без допълнително напрежение на гръбначната и коремна мускулатура.

При оглед отзад се преценява: правилната вертикална позиция на тялото, евентуално наличие на наклон встрани чрез прокарване на отвес от *protuberantia occipitalis externa* или от бодилестия израстък на 7-и шиен прешлен (отвесът минава през средата на сакрума при нормална стойка, както и при балансирана (уравновесена) сколиоза, а преминава встрани при небалансирана (неуравновесена) сколиоза; хоризонталната позиция и симетричността на раменете; разположението, нивото и симетричността на лопатките и особено на долните им ъгли; симетричността на талийните триъгълници; хоризонталната позиция на таза, респ. на хълбочните гребени. Последното е особено важно, за да се изключи разлика в дължината на долните крайници, която да доведе до грешка при определяне на вида на сколиотичното заболяване.

Чрез странично навеждане, активно и пасивно, се установяват възможността за корекция на страничното изкривяване и обемът на движение в гръбначния стълб. При навеждането на гръбначния стълб напред се установява размерът на ребрената гърбица. По-отчетливо се вижда и големината на страничното изкривяване. Едното рамо (от страната на конвекситета) стои по-високо от другото, което се вижда и при двете лопатки. От конкавната страна на изкривяването талията става по-дълбока и заедно със спуснатия горен крайник оформя един празен триъгълник. Тези триъгълни пространства от двете страни са асиметрични.

При оглед отстрани се преценяват: нормалните физиологични извивки на гръбначния стълб (гръдна кифоза и лумбална лордоза) и евентуалното им намаляване

или увеличаване; позицията на шията и главата в сагиталната равнина и тялото; позицията на раменете и долните ъгли на лопатките, коремния и гръдния контур (хълътнали или изпъкнали) и взаиморазположението им. Промените в посочените позиции, контури и взаимоотношения се установяват чрез: тест за волево налягане на гръбначната и коремната мускулатура, при който детето се подканя да застане в позиция "мирно"; тест на Адамс - детето се навежда напред със свободно отпуснати надолу ръце и глава (фиг. 3.1); налягане на гръбначната мускулатура при лежача позиция на детето по корем на твърда кушетка - лицев лег.



Фигура 3.1. Бендинг тест на Адамс (<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/19465.htm>)

При оглед отпред се преценяват: позицията на главата; симетричността на шийно-раменните линии; общата конфигурация и симетричността на гръдния кош; формата и симетричността на мамилите; деформациите на предната гръдна стена (гръдна кост, ребра); симетричността на талийните триъгълници. При по-тежки сколиози често се наблюдава скъсяване на трупа и приближаване на гръдния кош към хълбочния гребен. Гръдният кош е хълътнал откъм изпъкналостта на сколиозата и изпъкнал откъм страната на конкавитета. Пъпът лежи несиметрично спрямо срединната равнина. Мамилите се намират на различна височина.

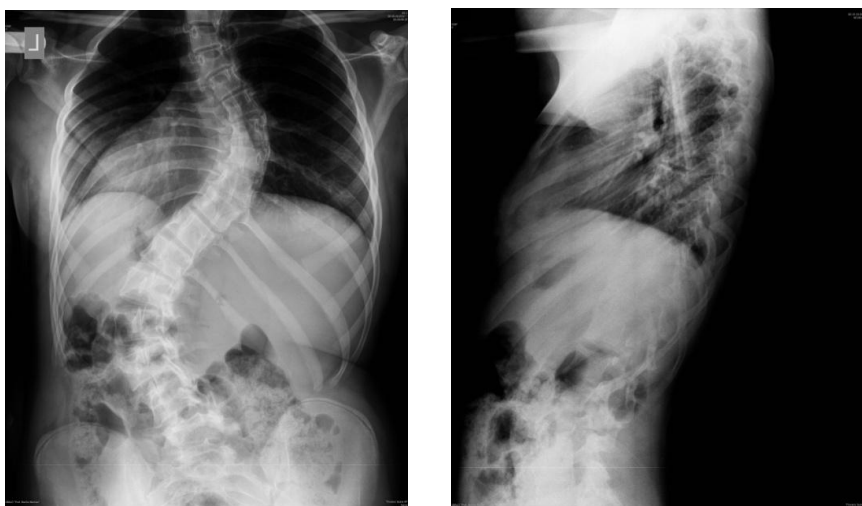
За изключване на вторична сколиоза, резултат от травми и различни заболявания като синдром на Марфан, неврофиброматоза и др. се извършва оглед за: марфаноиден фенотип (по критериите на Гент (<http://emedicine.medscape.com/article/946315-clinical#b4>); белези на други съединително-тъканни дисплазии - стрии, варици, тънка и разтеглива кожа, ставен лакситет; петна с цвят на мляко с кафе, характерни при неврофиброматоза, и др.

1.3 Образно-диагностични изследвания

Най-често използваният метод за диагностика на гръбначните изкривявания е конвенционалната рентгенографска техника. Рентгенографията може да даде данни за причината на сколиозата - вродени аномалии в прешлените, хиперпаратиреодизъм, рахит и др. Рентгенографската оценка включва:

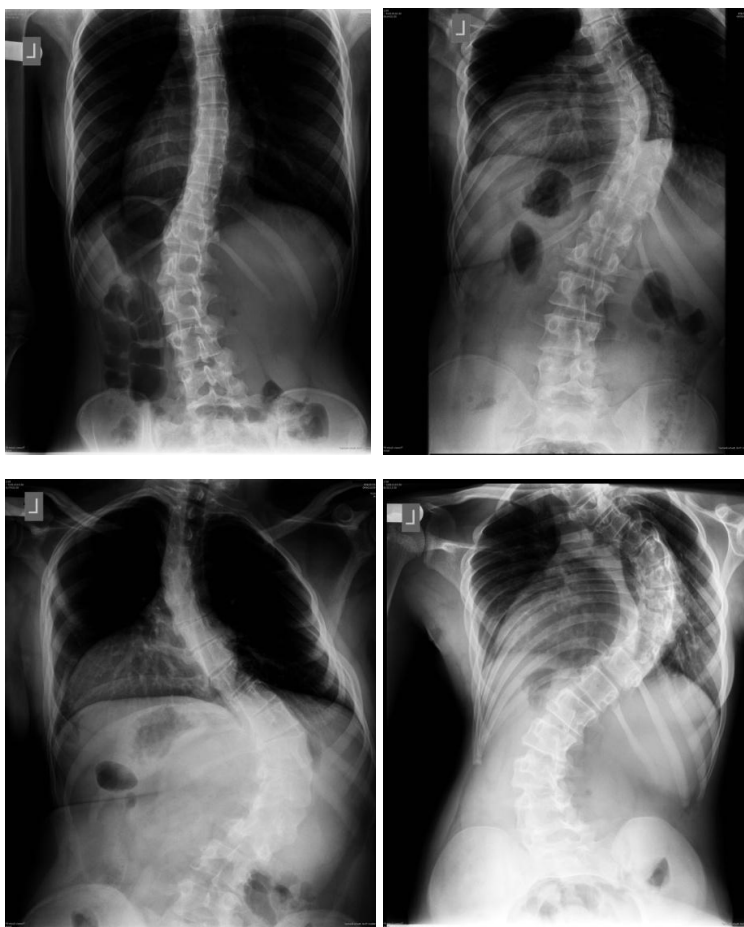
1.3.1 Рентгенографии на гръбначния стълб в изправено положение - предно-задна и латерална проекция.

Центрирането е с гръб към статива при предно-задна проекция или със съответното рамо при латерална проекция (ляво рамо-лявоконвексна сколиоза и дясно рамо-дясноконвексна сколиоза). На предно-задна проекция се измерва ъгъла на сколиозата, а на латерална проекция се оценява гръдната кифоза (Фиг. 3.2).



Фиг. 3.2. Рентгенографии на двойна крива: Предно-задна (вляво) и латерална проекция (вдясно) (УСБАЛО „Проф. Бойчо Бойчев“)

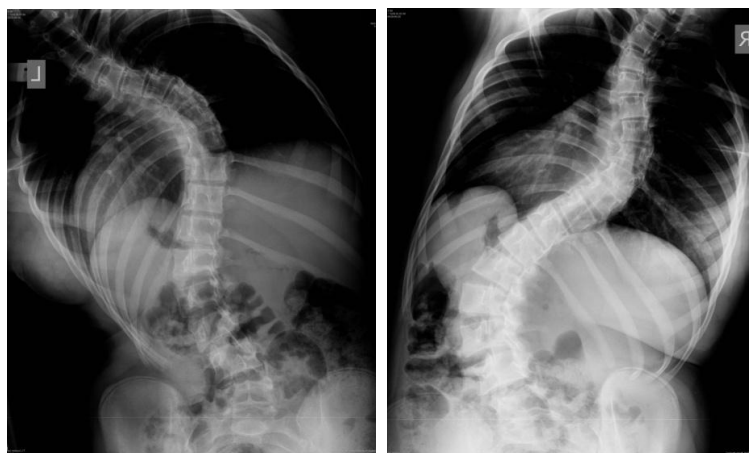
По дефиниция на SRS кривата може да бъде торакална с апекс от Th2 до интервертебралния диск Th11-Th12; торако-лумбална с апекс Th12-L1 и лумбална с апекс от интервертебралния диск между L1 и L2 до L4. Може да се наблюдават една или повече първични криви; С-образна или S-образна сколиоза (двойна или с компенсаторна крива); дясно- или лявоконвексна сколиоза (Фиг. 3.3).



Фиг. 3.3. Рентгенографии на гръбначен стълб: Лявоконвексна лумбална сколиоза (горе вляво), дясноконвексна торакална сколиоза (горе вдясно), дясноконвексна тораколумбална сколиоза (долу вляво) и S-образна сколиоза (долу вдясно) (УСБАЛО „Проф. Бойчо Бойчев“)

1.3.2 Бендинг рентгенографии - в легнало положение.

Целта е максимално огъване, съответно надясно – десен бендинг и наляво – ляв бендинг. Оценява се ригидността на кривата – структурни и неструктурни криви.



Фиг. 3.4. Бендинг рентгенографии на двойна крива: Ляв бендинг (вляво) и десен бендинг (вдясно) (УСБАЛО „Проф. Бойчо Бойчев“)

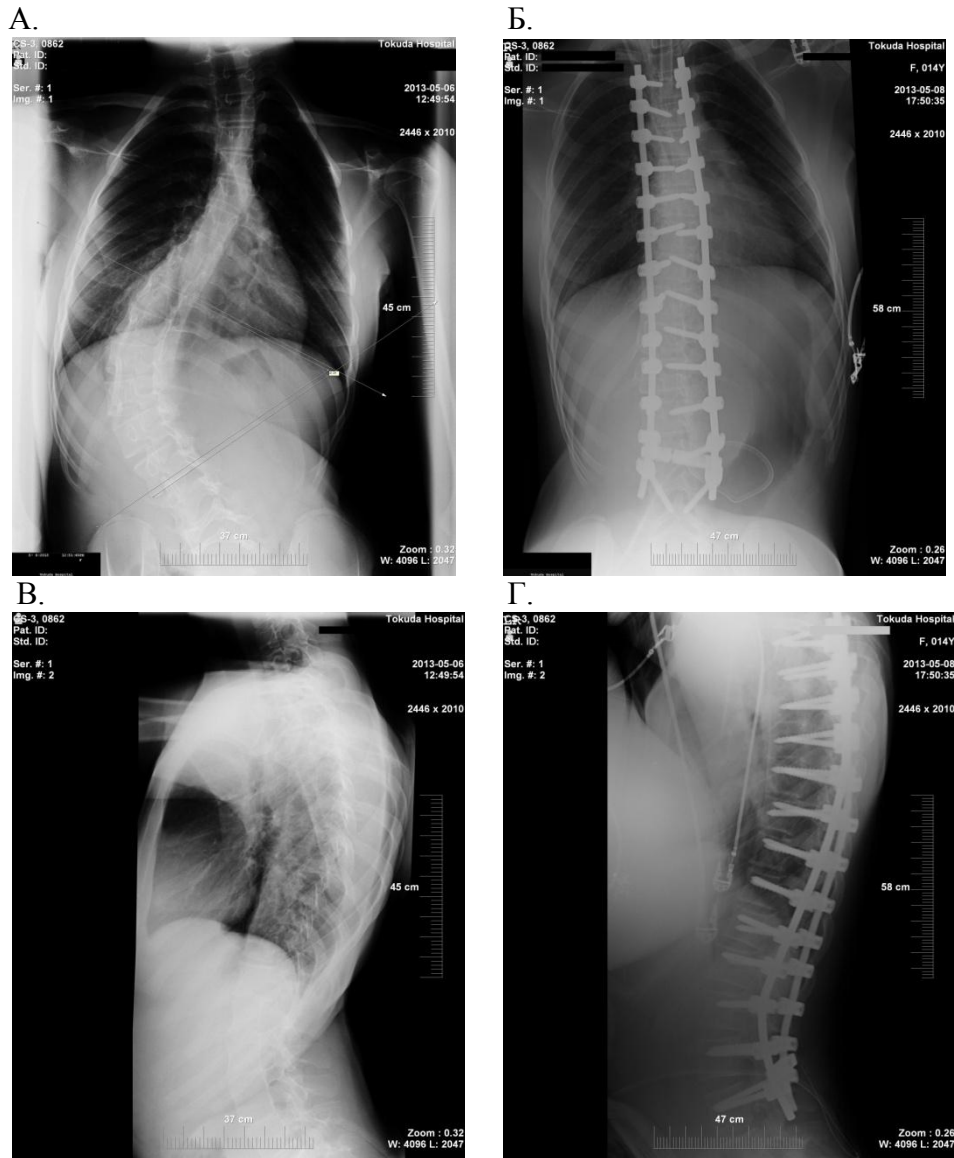
1.3.3 Основни рентгенографски показатели

Определянето на ъгъла на Cobb е „златен стандарт“ за оценка на сколиозата, препоръчван от SRS. Този метод (coreconcepts.com.sg/mcr/cobb-angle-and-scoliosis/) се основава на точното определяне на прешлените с най-голям наклон към конкавната страна в проксималния и дисталния край на кривата. Впоследствие се прекарват паралелни линии през супериорния ръб на крайния проксимален прешлен и през инфериорния ръб на крайния дистален прешлен. Перпендикулярите към тези линии се пресичат. Ъгълът, който се образува, е ъгъл на Cobb или ъгъл на сколиозата. При наличие на двойна крива следва да бъдат измерени и двете структурни кривини – даден прешлен ще бъде краен за едната и начален за другата крива (междинен).



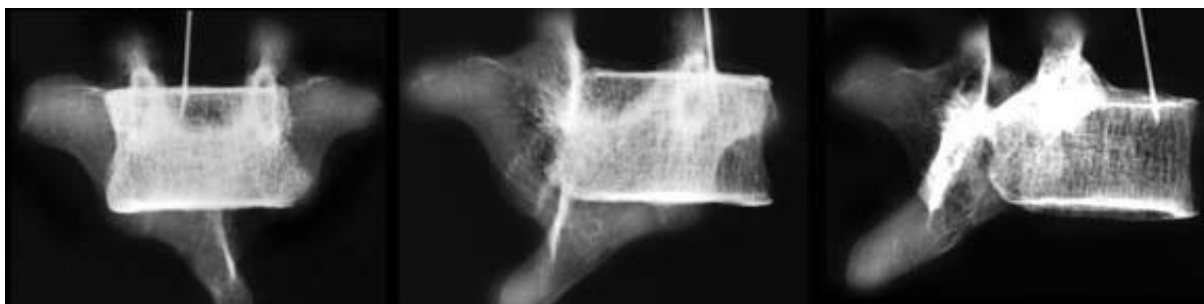
Фиг. 3.5. Торакална крива с апекс Th11-Th12 интервертебрален диск и ъгъл на Cobb – 61.09° (Токуда Болница София)

Минималната стойност на ъгъла на Cobb за дефиниране на сколиоза е 10° (www.srs.org). Криви от 10 до 15° обикновено не се нуждаят от лечение, с изключение на редовни прегледи от ортопед до завършване на растежа, като изкривяването на гръбначния стълб обикновено не се влошава след пубертета. При ъгъл на сколиозата $20-40^{\circ}$ се препоръчва корсетолечение. Пациенти с ъгъл на Cobb над 40° са показани за оперативно лечение – дистракционни методи, задна вертебротомия (фиг. 3.6).

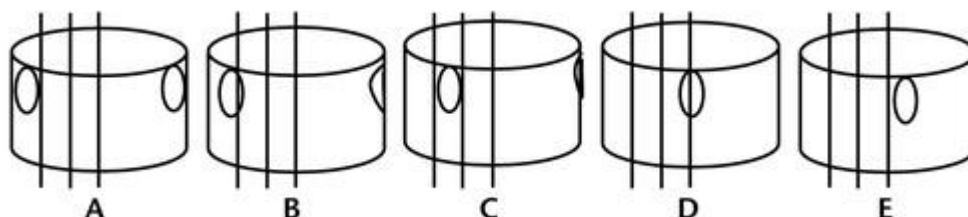


Фиг. 3.6. Предоперативни (А, В) и следоперативни (Б, Г) рентгенографии (Токуда Болница София)

Ротацията на прешлените може да бъде определена с индекса на Nash-Мое. Класификацията на Nash-Мое използва разположението на педикулите на предно-задна проекция като индикатор за вертебралната ротация. Половината от тялото на прешлена, която е откъм конвексната страна на кривата се разделя условно на три сегмента, като локализацията на съответния педикул в някой от сегментите на конвексната половина и визуализацията на другия педикул на конкавната половина, чиято проекция постепенно изчезва с прогресия на деформацията, служи за оценка на степента на вертебрална ротация [282].



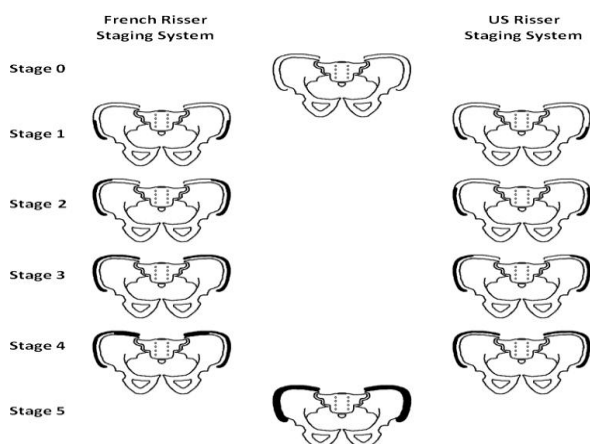
Фиг. 3.7. Рентенографски образ на торакален прешлен с различни степени на ротация: 0° (А), 30° (В), 60° (С). [Defino, 2004 [283]]



Фиг. 3.8. Класификация на Nash-Мое.

- А) неутрална позиция (без ротация)
- В) „+“ съответства на миграция в рамките на първи сегмент на прешленовото тяло
- С) „++“ отговаря на миграция към втори сегмент на прешленовото тяло
- Д) „+++“ означава миграция към трети или среден сегмент на прешленовото тяло
- Е) „++++“ означава, че миграцията преминава срединната линия в посока към конкавната страна на прешленовото тяло [Cheung, 2013 [8]]

Индексът на Risser се определя по степента на калцификация на илиачната апофиза и измерва прогресивната осификация в антеролатерална-постеромедиална посока. Процесът на осификация включва 6 етапа (Risser 0-5). При Risser 0 на рентгенографията не се открива осификационен център в илиачната апофиза, докато Risser 5 съответства на сливане на илиачната апофиза след пълна осификация с хълбочния гребен. При децата нормално стойността на Risser се променя от 1 до 5 за 2-годишен период. Колкото по-висока е стойността, толкова по-близо е индивидът до скелетна зрялост. Необходимо е да се уточни нивото на костна зрялост (растежният потенциал) поради факта, че идиопатичната сколиоза се развива и прогресира в периода на костен растеж [284].



Фиг. 3.9. Определяне индекса на Risser Насquebord, 2012 [284]



Фиг. 3.10. Определяне индекса на Risser (<http://www.srs.org/>)

Прогресията на идиопатичната сколиоза след достигане на скелетна зрялост зависи от тежестта на кривата. Ако ъгълът на Cobb е по-малък от 30° след завършване на скелетния растеж, сколиотичната крива не показва тенденция към прогресия, независимо от вида на кривата. Криви с ъгъл на Cobb между 30° и 50° при достигната скелетна зрялост могат да прогресират с 10°–15° общо до края на живота, ако той е с нормална продължителност, докато деформации с ъгъл на Cobb над 50°–75° нарастват средно с 1° годишно [20].

Честотата на прогресията е различна в зависимост от причината за сколиозата. Конгениталната сколиоза прогресира в 75% от всички случаи. Сред пациентите с идиопатична сколиоза прогресията е най-честа в групата на ювенилната сколиоза (70%–95% от пациентите) [285]. Повечето случаи на инфантилна идиопатична сколиоза са самоограничаващи се. Адолесцентната идиопатична сколиоза също прогресира макар и по-рядко от ювенилната и конгениталната форма. Само 5% от подрастващите с идиопатична сколиоза претърпяват тежка прогресия на деформацията при ъгъл на Cobb над 30° [20]. Факторите, които имат най-значим ефект върху прогресията на адолесцентната идиопатична сколиоза, са магнитудът на кривата и темпът на растеж.

Тъй като темпът на растеж е основен фактор, повлияващ прогресията на деформитета, акуратното определяне на периода на ускорен растеж на гръбначния стълб е важно при терапевтичното поведение. Следните клинични параметри показват значителна асоциация с прогресията на кривата: увеличаване на ръста с повече от 2 см годишно; възраст 9-13 години при откриване на деформацията; костна възраст, отговаряща на 9-14-годишна възраст; илиачна осификация, съответстваща на Risser 0 или 1; късно менархе. Обичайно, растежният темп нараства 0.5-2 години преди менархе; след настъпването на менархе вероятността от прогресия е по-ниска [20; 286]. Индексът на Risser е по-малко надежден при момчета; при тях растежът може да се смята за завършил със сигурност при достигане на Risser 5 [287].

1.3.4 Рентгенографска класификация на Lenke

Класификацията на Lenke се отнася за адолесцентната идиопатична сколиоза и се основава на измерванията от стандартни рентгенографии, като се прави оценка на деформитета в две равнини – фронталната и сагиталната. Същевременно се оценява ригидността на кривите и се отдиференцират структурните от неструктурните криви, което е полезно при планиране обема на оперативната интервенция. Всяка сколиотична крива се оценява по следните показатели:

1. Тип на кривата (1-6)

Според засегнатия отдел на гръбначния стълб се различават:

- PT - проксимална торакална крива (апекс между Th1 и Th3)
- MT - торакална крива (Th3-Th12)
- TL/L - тораколумбална/лумбална крива (Th12-L4).

Кривата може да бъде първична (с най-голям ъгъл на Cobb) или компенсаторна, структурна или неструктурна. Първичните криви са винаги структурни, но не всички структурни криви са първични. Има 6 типа криви според класификацията на Lenke (фиг. 3.11).

2. Лумбален модификатор (А, В, С)

Основава се на позицията на апикалния лумбален прешлен (ALV) спрямо CSVL (централна сакрална линия). Отбелязва се с А, В или С.

А – CSVL минава между педикулите на ALV

В – CSVL допира педикул на ALV

С - CSVL минава медиално от ALV.




3. Торакален сагитален модификатор (-, N, +)

Измерва се по Cobb ъгълът на сагиталната кифоза (Th5-Th12).

- “-“отговаря на хипокифоза ($<10^0$)
- N е норма ($10-40^0$)
- ”+” показва хиперкифоза ($>40^0$).

Curve Type				
Type	Proximal Thoracic	Main Thoracic	Thoracolumbar / Lumbar	Curve Type
1	Non-Structural	Structural (Major*)	Non-Structural	Main Thoracic (MT)
2	Structural	Structural (Major*)	Non-Structural	Double Thoracic (DT)
3	Non-Structural	Structural (Major*)	Structural	Double Major (DM)
4	Structural	Structural (Major*)	Structural	Triple Major (TM)
5	Non-Structural	Non-Structural	Structural (Major*)	Thoracolumbar / Lumbar (TL/L)
6	Non-Structural	Structural	Structural (Major*)	Thoracolumbar / Lumbar - Main Thoracic (TL/L - MT)

<p>STRUCTURAL CRITERIA (Minor Curves)</p> <p><i>Proximal Thoracic:</i> - Side Bending Cobb $\geq 25^\circ$ - T2 - T5 Kyphosis $\geq +20^\circ$</p> <p><i>Main Thoracic:</i> - Side Bending Cobb $\geq 25^\circ$ - T10 - L2 Kyphosis $\geq +20^\circ$</p> <p><i>Thoracolumbar / Lumbar:</i> - Side Bending Cobb $\geq 25^\circ$ - T10 - L2 Kyphosis $\geq +20^\circ$</p>	<p>* Major = Largest Cobb Measurement, always structural Minor = all other curves with structural criteria applied</p> <p>LOCATION OF APEX (SRS definition)</p> <table border="0"> <tr> <td><u>CURVE</u></td> <td><u>APEX</u></td> </tr> <tr> <td>THORACIC</td> <td>T2 - T11-12 DISC</td> </tr> <tr> <td>THORACOLUMBAR</td> <td>T12 - L1</td> </tr> <tr> <td>LUMBAR</td> <td>L1-2 DISC - L4</td> </tr> </table>	<u>CURVE</u>	<u>APEX</u>	THORACIC	T2 - T11-12 DISC	THORACOLUMBAR	T12 - L1	LUMBAR	L1-2 DISC - L4
<u>CURVE</u>	<u>APEX</u>								
THORACIC	T2 - T11-12 DISC								
THORACOLUMBAR	T12 - L1								
LUMBAR	L1-2 DISC - L4								

Lumbar Spine Modifier		Modifiers			Thoracic Sagittal Profile T5 - T12	
A	CSVL Between Pedicles				- (Hypo)	$<10^\circ$
B	CSVL Touches Apical Body(ies)				N (Normal)	$10^\circ - 40^\circ$
C	CSVL Completely Medial				+ (Hyper)	$>40^\circ$

Фиг. 3.11. Класификация на Lenke. Тройната система включва: тип на кривата (1-6), оценка на лумбалния отдел (А, В, С) и на торакалния отдел (-, N, +) [Lenke, 2001 [17]]

За оценка на adolescentната идиопатична сколиоза според класификацията на Lenke са необходими рентгенографии в:

- предно-задна проекция - определя се засегнатият гръбначен отдел и лумбалният модификатор;
- латерална проекция - определя се торакалният сагитален модификатор;
- бендинг рентгенографии - оценява се ригидността на кривата и се разграничават структурни от неструктурни криви.

Според тройната система съществуват общо 54 възможни типа. Най-често срещаният тип крива при adolescentна идиопатична сколиоза според Класификацията на Ленке се отбелязва с 1AN.

2. Молекулярно генетични методи

Настоящото асоциативно проучване включва анализ предимно на функционални единични нуклеотидни полиморфизми в 18 кандидат-гена за идиопатична сколиоза с докладван предразполагащ и/или модифициращ ефект върху патологичния фенотип в различни популационни групи, както и на функционална замяна в още един ген (*AMPD1*), неизследвана до момента за връзка с идиопатичната сколиоза (Приложение 2).

2.1 Биобанкиране

Изолирането на геномна ДНК от левкоцити от периферна кръв се осъществи по метода на солева екстракция, фенолна екстракция или чрез полуавтоматизирана технология, базирана на магнитни частици.

2.1.1. Солева екстракция на геномна ДНК от венозна кръв

Методът [288] включва следните етапи:

1. Разрушаване на еритроцитите с лизиращ буфер.
Към 3-10 ml венозна кръв се добавят 40 ml студен еритроцит-лизиращ буфер. Инкубира се на лед за 30 min. По време на инкубацията епруветката се разклаща неколкостранно.
2. Утаяване на ядрата на левкоцитите след центрофугиране.
Центрофугирането е при 3000 rpm за 10 min на 4°C или на стайна температура. Утайката се ресуспендира в 20 ml студен лизиращ буфер и се центрофугира при същите условия. Супернатантата се евакуира.
3. Разрушаване на ядрата с нуклеолизиращ буфер и протеиназа К.
Получената от предходния етап утайка, се ресуспендира в 5 ml SE (нуклеолизиращ) буфер. Добавят се 30 µl протеиназа К (10 mg/ml) и 400 µl 10% разтвор на натриев додецил сулфат (SDS). При това клетъчните ядра се лизират. Натриевият додецил сулфат е детергент, който дисоциира протеините от ДНК и създава условия за действието на протеиназата. Разбърква се внимателно и се инкубира на 37°C за 12 h или на 55°C за 5 h.
4. Утаяване на белтъците.
След протеолизата се добавят 2 ml преситен 6M NaCl и се разбърква на вортекс за 15 sec. В тази стъпка се отстраняват белтъците и протеиназата. Следва центрофугиране на 3000 rpm за 15 min при стайна температура, за да не преципитира SDS. При това белтъците се утаяват на дъното.
5. Преципитация на ДНК.
Супернатантата, съдържаща ДНК, се прехвърля в нова епруветка и към нея се добавят 2 обема леденостуден абсолютен етанол (или 1 обем изопропанол). Разбърква се внимателно, ДНК видимо преципитира и изплува на повърхността, след което се изважда със стерилна пастъорова пипета и се прехвърля в нова епруветка, съдържаща 1 ml 70% етанол. След кратко промиване в етанола ДНК отново се изважда с пастъоровата пипета и се изсушава на въздуха.
6. Разтваряне на ДНК в TE буфер и съхраняване на -20°C.
ДНК се разтваря в количество между 300 µl и 1,5 ml стерилен TE Буфер и се оставя на клатачка, докато се разтвори. Следва съхранение на -20°C.

2.1.2. Фенолна екстракция на геномна ДНК от венозна кръв

Методът включва следните етапи:

1. Разрушаване на еритроцитите с лизиращ буфер.
Към 3-10 ml венозна кръв се добавят 40 ml студен еритроцит-лизиращ буфер. Инкубира се на лед за 30 min. По време на инкубацията епруветката се разклаща неколkokратно.
2. Утаяване на ядрата на левкоцитите след центрофугиране.
Центрофугирането е при 3000 rpm за 10 min на 4°C или на стайна температура. Утайката се ресуспендира в 20 ml студен лизиращ буфер и се центрофугира при същите условия. Супернатантата се евакуира.
3. Лизиране на ядрата с нуклеолизиращ буфер и протеиназа К в присъствие на SDS.
Получената от предходния етап утайка, се ресуспендира в 5 ml SE (нуклеолизиращ) буфер. Добавят се 30 µl протеиназа К (10 mg/ml) и 400 µl 10% разтвор на натриев додецил сулфат (SDS). При това клетъчните ядра се лизират. Натриевият додецил сулфат е детергент, който дисоциира протеините от ДНК и създава условия за действието на протеиназата. Разбърква се внимателно и се инкубира на 37°C за 12 h или на 55°C за 5 h.
4. Очистване на белтъците и протеиназата от ДНК.
След протеолизата в епруветката се добавят 300 µl фенол (pH=8.0) и 300µl хлороформ/изоамилов алкохол в съотношение 24:1. Разбърква се интензивно на вортекс и се центрофугира за 15 min на 12000 rpm.
5. Утаяване на ДНК с 96% етанол.
Супернатантата, съдържаща ДНК, се прехвърля в нова епруетка и към нея се добавят 1/10 от обема 3М натриев ацетат (CH₃COONa) и внимателно се размесва. Добавят се 2 обема леденостуден абсолютен етанол и се инкубира 30 min на -20°C. Центрофугира се 15 min на 13000 rpm. Супернатантата се отлива внимателно. Утайката се промива с 0.5 ml 70% етанол, след което се центрофугира 10 min на 13000 rpm. Супернатантата се отлива и утайката се изсушава на въздуха.
6. Разтваряне на ДНК в 300-1500µl стерилен TE буфер и съхраняване на -20°C.
ДНК се разтваря в количество между 300 µl и 1,5 ml стерилен TE Буфер и се оставя на клатачка, докато се разтвори. Следва съхранение на -20°C.

Използвани разтвори и реактиви за солева и фенолна екстракция:

- Еритроцит-лизиращ буфер: 155 mM NH₄Cl; 10 mM KHCO₃; 0,1 mM Na₂EDTA, ddH₂O; pH 7.4 (NaOH);
- Нуклеолизиращ буфер (SE): 75 mM NaCl; 25 mM EDTA; pH 8.0 (NaOH);
- Натриев додецил сулфат (SDS): 10% разтвор с бидестилирана вода;
- Преситен разтвор (6M) NaCl;
- Протеиназа К, 20 U/mg (Promega) с концентрация 10 mg/ml;
- Фенол, еквилибриран с Tris pH 8.0 (Appllichem);
- Хлороформ (Appllichem);
- Изоамилов алкохол (Appllichem);
- Етилов алкохол – 70% и абсолютен етанол - 96% (Appllichem);
- TE – буфер: 10 mM Tris/HCl; 0,1 mM EDTA (етилен диамин тетраацетат); pH 7.4.

Апаратура: Центрофуга (Hermle Z 383, Thermo Scientific MicroCL 21); Вортекс (Gemmy VM300P).

2.1.3. Полуавтоматично изолиране на геномна ДНК от венозна кръв

Изолирането се осъществява с кит chemagic DNA Blood Kit special (Chemagen), съдържащ:

- магнитни частици;
- лизиращ буфер № 1 (до 1/3 от разтвора);
- свързващ буфер № 2 (представлява 60% от разтвора);
- промиващи буфери № 3-6, съдържащи етанол;
- елуиращ буфер (10 mM Tris-HCl, pH=8.0);
- TE буфер с pH 8.0.

Позициониране на плаки и контейнери в модула на работа:

Позиция № 1: Поставка за контейнер с типчета за еднократна употреба

Позиция № 2: Панел с 50 ml епруветки съдържащи:

- 10ml кръв;
- 50µl протеиназа;
- 15 ml лизиращ буфер;
- 25 ml свързващ буфер;
- 1000µl магнитни частици.

Позиция № 3: 50 ml епруветки с 15 ml миеш буфер № 3

Позиция № 4: 50 ml епруветки с 15 ml миеш буфер № 4

Позиция № 5: 50 ml епруветки с 15 ml миеш буфер № 5

Позиция № 6: 50 ml епруветки с 7.5 ml миеш буфер № 6

Позиция № 7: 50 ml епруветки с 15 ml миеш буфер № 6

Позиция № 8: 13 ml епруветки с 1 ml елуиращ буфер № 7

Изпълнение на метода:

Етап 1. В епруветки от 50 ml, съдържащи 10 ml кръв, взета върху K₃EDTA (етилен диамин тетраацетат), се добавят 2x 7.5 ml лизиращ разтвор № 1, необходим за разкъсване на клетъчните мембрани. Инкубира се за 5 min, след което се добавят 50 µl протеиназа К - за разграждане на клетъчните белтъци. Стартира се програмата 'blood 10k' за лизиране на клетките за 24 min.

Етап 2. Към епруветките с кръв се добавят 25 ml свързващ буфер № 2 и 1000 µl магнитни частици. Движещият модул се зарежда на позиции № 3-8, описани по-горе. След изтичане на програмата, изолираните ДНК проби (на позиция № 8) се оставят за около 15 min и ДНК се разпределя в 2 криоепруветки. Очакван добив: 200-400 µg ДНК.

Апаратура: Полуавтоматичен модул за изолиране на ДНК/РНК (chemagic Magnetic Separation Module I, PerkinElmer, Inc.), Център по молекулна медицина.



Фиг. 3.12. Полуавтоматичен модул за изолиране на ДНК/РНК (chemagic MSM I)

Предимства на технологията на Chemagen пред ръчното солево изолиране:

- Редуциране употребата и контакта с вредни химикали
- По-бързо и същевременно достатъчно ефективно изолиране на геномна ДНК
- По-пълно разтваряне на геномната ДНК в буферната среда
- Минимална контаминация с РНК
- Възможност за обработка на много проби едновременно

Основни недостатъци:

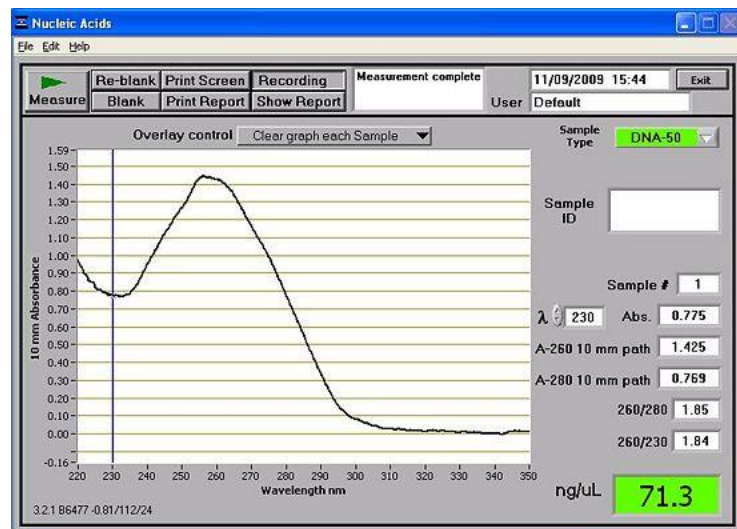
- Необходимост от специализирана апаратура и обучен персонал
- Висока себестойност на китовете за екстракция

Качествена и количествена оценка на изолираната ДНК

След изолирането високомолекулната геномна ДНК беше съхранена в ТЕ буфер при -20°C в ДНК-банката на Национална генетична лаборатория. Концентрацията и чистотата на всяка ДНК проба бяха определени със спектрофотометър NanoDrop 1000 (Thermo Scientific), като за целта бяха използвани $2\ \mu\text{l}$ от всяка проба.



Фиг. 3.13. NanoDrop 1000



Фиг. 3.14. Измерване концентрацията на ДНК (NanoDrop 1000)

Концентрацията на изолираната ДНК може да се определи по формулата:

$$C_{ssDNA} = A_{260} \times 33\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

$$C_{dsDNA} = A_{260} \times 50\ \mu\text{g}/\mu\text{l},$$

където C_{ssDNA} е концентрацията на едноверижната ДНК, C_{dsDNA} – на двойноверижната ДНК, а с A_{260} се означава абсорбцията при дължина на вълната от 260 nm.

За определяне чистотата на ДНК беше взето съотношението от абсорбцията на ДНК при 260 nm и при 280 nm дължина на вълната. При съотношение A_{260}/A_{280} от 1.7 до 2.0 ДНК се приема за свободна от примеси. При $A_{260}/A_{280} < 1.7$ се наблюдават остатъчни белтък/фенол, при $A_{260}/A_{280} > 2.0$ има остатъчна РНК, а при $A_{230}/A_{260} > 0.9$ има остатъчни захари. След измерване на концентрацията, пробите бяха разредени с Tris EDTA буфер (pH 8.0) до $50\ \text{ng}/\mu\text{l}$ за асоциативно проучване на кандидат гени с помощта на амплификация-рестрикция и до $10\ \text{ng}/\mu\text{l}$ за асоциативно проучване на кандидат гени с технологията на PCR в реално време.

2.2 Полимеразна верижна реакция (polymerase chain reaction – PCR)

2.2.1. Конвенционален PCR

Полимеразната верижна реакция (PCR) е революционен метод, въведен от Mullis през 80-те години на XX век, като днес PCR-техниката е в основата на повечето молекулярно-генетични анализи. Методът PCR във всичките си модификации е базиран на способността на ДНК-полимеразата да синтезира полинуклеотидна верига, комплементарна на дадена матрица. Тъй като ДНК-полимеразата може да добавя нуклеотиди само към свободен 3'-ОН край, за инициране на синтеза са необходими олигонуклеотидни праймери. Това дава възможност за фланкиране на специфичен участък от генома, който изследователят цели да амплифицира. В края на реакцията, секвенцията е умножена многократно, получават се милиони нови копия – ампликони (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>).

Използвани реактиви:

- 10X Prime Taq buffer (Genet Bio);
- 10 mM dNTPs Mixture (Genet Bio);
- 20 pmol прав праймер (AlphaDNA);
- 20 pmol обратен праймер (AlphaDNA);
- Prime Taq DNA Polymerase (Genet Bio);
- dH₂O (дестилирана вода);
- Геномна ДНК с концентрация от 50 ng/μl.

Таблица 3.5. PCR mix:

Реактив	Количество, μl	Количество, μl
10X Prime Taq buffer	1	2
10 mM dNTPs Mixture	0,4	0,8
20 pmol прав праймер	0,2	0,4
20 pmol обратен праймер	0,2	0,4
Prime Taq DNA Polymerase	0,05	0,1
Дестилирана вода	7,05	14,1
Геномна ДНК	1	2
Общ обем:	10	20

Методът включва следните етапи:

1. Начална денатурация – осъществява се най-често при 94⁰С в зависимост от съдържанието на гуанин и цитозин в праймерите, при по-високо GC съдържание, температурата е по-висока. Продължителност 5-10 min.
2. Цикъл, състоящ се от три стъпки:
 - a. Денатурация – при същата температура като началната денатурация. Продължителност – 30-60 sec.
 - b. Хибридизация – специфична за дадената двойка праймери температура. Продължителност – 30-60 sec.
 - c. Елонгация – при 72⁰С. Продължителност – 30-150 sec в зависимост от дължината на амплифицирания се фрагмент.Стандартният PCR включва най-често 30-35 цикъла.
3. Крайна елонгация - при 72⁰С. Продължителност – 7-10 min.

Апаратура: AB 2720 Thermal Cycler (Life Technologies); New XP Thermal Cycler (BIOER Technology); QB96 gradient thermal cycler (LKB).

Продуктите бяха визуализирани на 2% агарозен гел. Качественият контрол на реакцията се осъществи с положителна и отрицателна контрола. Като положителна контрола служи ДНК с оптимална концентрация, за която е известно, че се амплифицира таргетният участък. Липсата на продукт в положителната контрола показва, че амплификационната реакция не е протекла. Като отрицателна контрола се използва проба с всички компоненти на реакцията, с изключение на геномна ДНК, която се замества с дестилирана вода. Липсата на продукт в отрицателната контрола доказва, че реакционната смес не е замърсена.

В настоящата разработка 12 SNPs бяха идентифицирани чрез амплификация, последвана от рестрикция. Секвенциите и температурата на хибридизация на съответните праймери са дадени на таблица 3.6.

Таблица 3.6. PCR праймери, използвани за генотипиране на SNPs в изследваните гени.

Ген, Полиморфизъм	Праймери	Хибридизация, °C	PCR продукт bp
<i>IL-6</i> <i>rs1800795</i>	F: 5'-TGACTTCAGCTTTACTCTTTgT-3'	58	198
	R: 5'-CTGATTGGAAACCTTATTAGG-3'		
<i>MMP3</i> <i>rs3025058</i>	F: 5'-GGTTCTCCATTCCTTTGATGGGGGAAAgA-3'	59	130
	R: 5'-TCCTGGAATTCACATCACTGCCACCACT-3'		
<i>TPH1</i> <i>rs10488682</i>	F: 5'-AAGAAGTTGCACAATGCAGACA-3'	58	260
	R: 5'-GTTGGGAAGACTGCAAGAAGC-3'		
<i>MATN1</i> <i>rs1149048</i>	F: 5'-TGGAGGTGAACGAGGAGAAC-3'	58	224
	R: 5'-GAGCGGAGAAGTGACACAGA-3'		
<i>ESR1</i> <i>rs9340799 (XbaI)</i>	F: 5'-CTGCCACCCTATCTGTATCTTTTCCCTATTCTCC-3'	59	1374
	R: 5'-TCTTTCTCTGCCACCCTGGCGTCGATTATCTGA-3'		
<i>ESR1</i> <i>rs2234693 (PvuII)</i>	F: 5'-CTGCCACCCTATCTGTATCTTTTCCCTATTCTCC-3'	59	1374
	R: 5'-TCTTTCTCTGCCACCCTGGCGTCGATTATCTGA-3'		
<i>ACTN3</i> <i>rs1815739 (R577X)</i>	F: 5'-CTGTTGCCTGTGGTAAGTGGG-3'	60	205+86
	R: 5'-TGGTCACAGTATGCAGGAGGG-3'		
<i>AMPD1</i> <i>rs17602729</i>	F: 5'-CTCTGACAAATGGCAGCAAA-3'	58	136
	R: 5'-TGTCTACCCCAAAGCAGTGA-3'		
<i>VDR</i> <i>rs2228670 (FokI)</i>	F: 5'-AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGCTCT-3'	59	265
	R: 5'-ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC-3'		
<i>BMP4</i> <i>rs4898820</i>	F: 5'-CTGGGCAAGTGAGGGGAAT-3'	59	134
	R: 5'-AACTTGGGAAGATATCCTGAAATTCCT-3'		
<i>Lep</i> <i>rs7799039</i>	F: 5'-TTTCCTGTAATTTTCCCGTGAG-3'	55	242
	R: 5'-AAAGCAAAGACAGGCATAAA-3'		
<i>IGF-1</i> <i>rs5742612</i>	F: 5'-CACACACACAGGTTTGAGTTATATG-3'	59	330
	R: 5'-GGTAAAGTAGATTGGAAGACAGC-3'		

*Посочените температури на хибридизация на праймерите са определени с градиентен PCR в диапазона 55-65°C.

Един полиморфизъм - *ACE* (*rs1799752*, I/D) беше определен чрез директна амплификация и агарозна електрофореза.

Секвенциите и температурата на хибридизация на праймерите са дадени на таблица 3.7.

Условията на PCR реакцията за намножаване на *ACE* (*rs1799752*, I/D) са представени на таблица 3.8.

Таблица 3.7. Определяне генотипите на ACE.

Ген, Полиморфизъм	Праимери	Хибризация, °C	PCR продукт, bp
ACE rs1799752 (I/D)	F: 5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3'	61	П – 490 ID – 490 + 190 DD – 190
	R: 5'-GATCTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3'		

Таблица 3.8. Програма за амплифициране генотипите на ACE.

Етап	Температура	Време	} ► 30 цикъла
Начална денатурация	94°C	5 min	
Денатурация	94°C	30 sec	
Хибризация	61°C	30 sec	
Елонгация	72°C	30 sec	
Крайна елонгация	72°C	7 min	

2.2.2. TaqMan PCR в реално време

Технологията TaqMan комбинира полимеразна верижна реакция и детекция на единичната нуклеотидна замяна в една стъпка, като се използва 5'→3' екзонуклеазната активност на ензима Таq ДНК полимеразата. За провеждането на PCR са необходими двойка специфични праймери (прав и обратен) за амплифициране на даден ДНК фрагмент в който се намира нуклеотидната замяна и двойка алел – специфични проби, комплементарни на всеки един от двата алела на изследвания SNP. Всяка проба е двойно белязана, като в 5'-края си носи флуорофор (FAM и VIC), а в 3'-края си – „гасител“ на флуоресценцията (MGB). Когато пробата е интактна, близостта на „гасителя“ до флуорофора, потиска неговата флуоресценция, индуцирана от светлинен източник, посредством флуоресцентен резонансен енергиен трансфер (FRET). Пробите хибрилизират с определена последователност от таргетния ДНК фрагмент в мястото на нуклеотидната замяна. По време на фазата на удължаване и синтез на новата верига от ДНК-полимеразата, 5'-екзонуклеазната активност на ензима разгражда разположената отпред проба, хибризираща с ДНК матрицата. По този начин флуорофорът се отдалечава от „гасителя“, което води до увеличаване интензитета на флуоресценцията. При несъответствие между пробата и таргетната ДНК, поради намалената хибризация, не се генерира флуоресцентен сигнал [289] (Фигура 3.15).



Фиг. 3.15. Принцип на метода: (1) Когато пробата е интактна, близостта на „гасителя“ до флуорофора, потиска неговата флуоресценция; (2) Пробите хибрилизират с определена последователност от таргетния ДНК фрагмент; (3) В хода на реакцията ДНК-полимеразата разгражда пробата и това води до поява на флуоресцентен сигнал.

Необходимии реактиви за TaqMan PCR в реално време:

- Геномна ДНК 10 ng/μl;
- Универсален микс 2X TaqMan® Genotyping Master Mix (Life Technologies);
- Кит 40X TaqMan® Pre-designed SNP Genotyping Assay (Life Technologies);
- dH₂O.

Необходимии консумативи за TaqMan PCR в реално време:

- 96-ямкови плаки (Life Technologies)
- 384-ямкови плаки (Life Technologies)
- Покривала за плаки (Life Technologies)
- Типчета за робот Biomex FX (Beckman Coulter)

Апаратура:

- Робот за накапване на проби – Beckman Coulter Biomex FX
- Апарат 7900HT Fast Real-time PCR (Life Technologies)

Фиг. 3.16. Робот за накапване на проби – Beckman Coulter Biomex FX



Фиг. 3.17. Апарат 7900HT Fast Real-time PCR (Life Technologies)



Техника на TaqManPCR в реално време:

1. В епруветка, на лед се приготвя реакционната смес. Количествата на необходимите реактиви се преизчисляват в зависимост от броя на анализирани проби на базата на следните съотношения за единична реакция:

Таблица 3.9. Реакционна смес за TaqManPCR в реално време.

Реагент	Количество
10 ng/μl геномна ДНК	2.0 μl
2X TaqMan Genotyping Master Mix	2.5 μl
40X TaqMan Genotyping assay	0.125 μl
dH ₂ O	0.375 μl
Общ обем:	5 μl

2. За всеки TaqMan PCR се ползват 384 – ямкови плаки, като в една плака могат да се анализират ДНК проби от четири 96 – ямкови плаки едновременно.
3. Плаките се поставят на робот Biomek FX за накапване на 3 μl от приготвената вече реакционна смес и 2 μl геномна ДНК (10 ng/μl) във всяка ямка.
4. След това плаките се покриват с фолио и се фиксират върху 7900HT Real-Time PCR апарата като се задават условията на амплификация.

PCR реакцията протича в краен обем от 5 μl при следните условия:

Таблица 3.10. Програма за TaqManPCR в реално време.

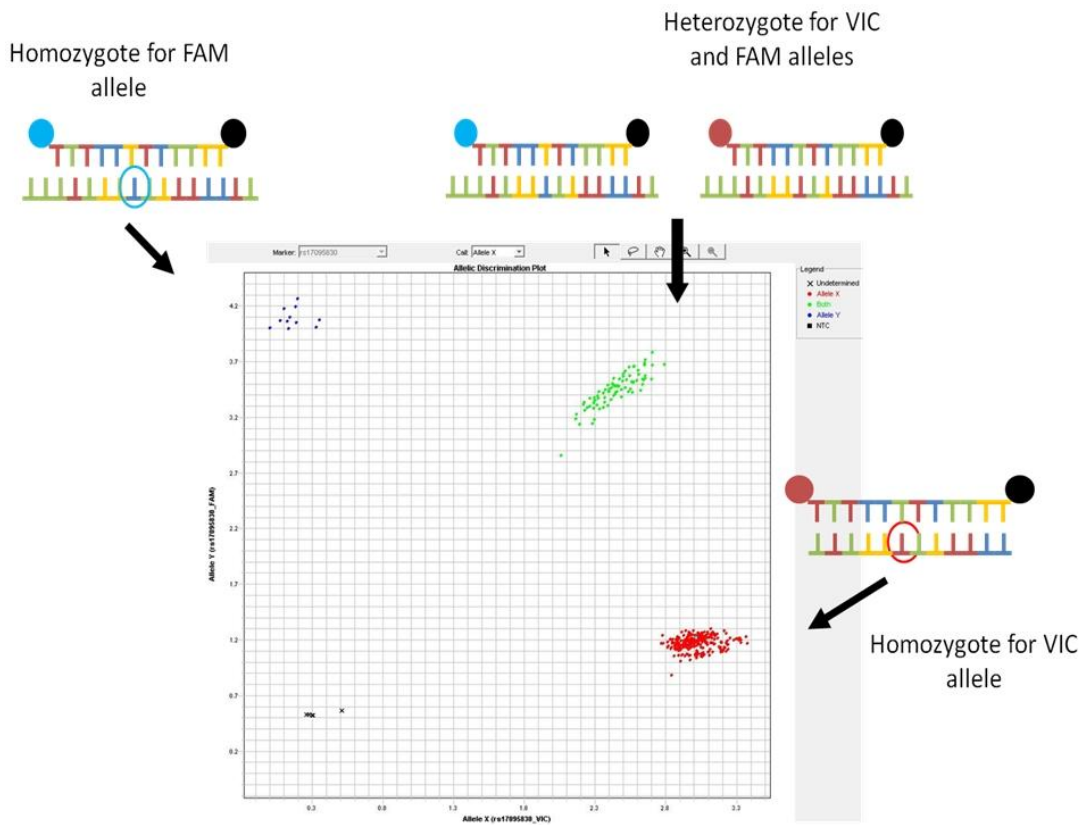
Етап	Температура	Време	} ► 40 цикъла
Начална денатурация	95°C	10 min	
Денатурация	95°C	15 sec	
Хибридизация	60°C	1 min	
Елонгация	72°C	15 sec	
Прекъсване на реакцията	4°C	∞	

Анализ на резултатите:

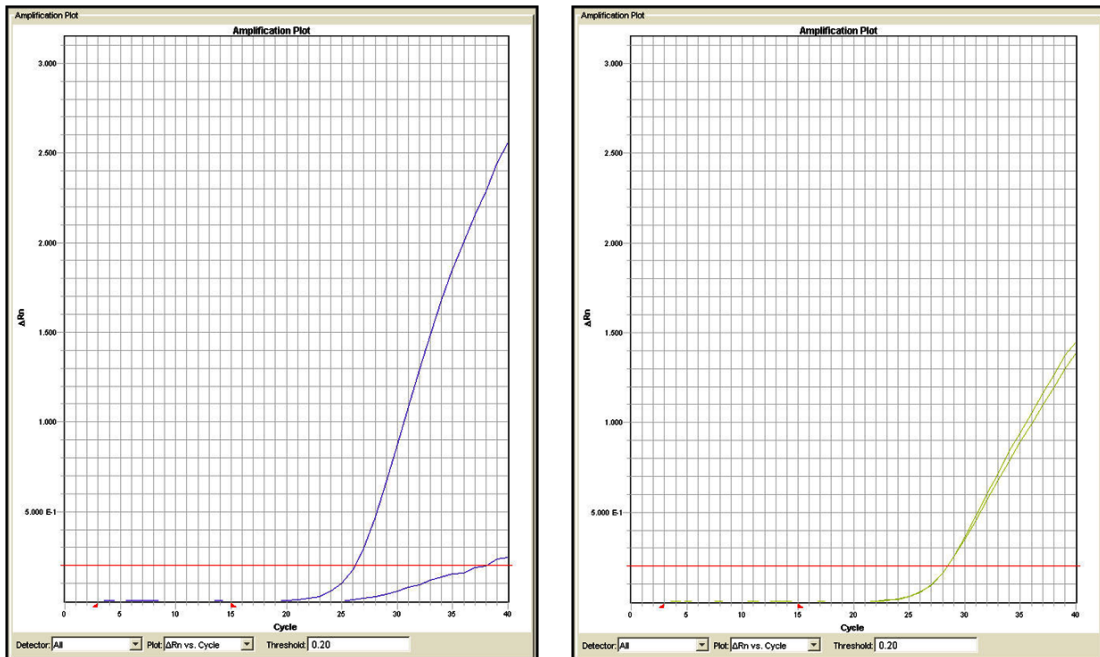
След приключване на програмата, плаките се анализират с помощта на ABI Prism® 7900HT Sequence Detection System.

С помощта на този софтуер предварително се създава матрица, която описва точния вид на анализирания 384 – ямкова плака. Обозначават се заетите ямки, както и местата на негативните контроли (NTC), ямки в които няма ДНК проба и не би следвало да се отчете флуоресцентен сигнал. Веднъж създадена, тази матрица служи за анализ на всички плаки от същия вид. При използването на друг вид плака (с различно разположение) се създава нова матрица. След създаването на матрицата, плаката се поставя в апарата и софтуерът осигурява автоматично измерване и едновременно нормализиране на флуоресцентните сигнали от всяка ямка. Резултатите се представят в табличен и в графичен вид, под формата на алел – дискриминационен плот (Фигура 3.18). На получената графика, активна в момента на анализа, визуално могат да се проследят групите проби, от които е регистриран флуоресцентен сигнал, като нормализираният сигнал от всяка проба е представен с отделна точка.

Хомозиготите по дивия тип алел се регистрират като сини точки по ординатата (FAM флуоресценция), хомозиготите по полиморфния (вариантния) алел – като червени точки по абсцисата (VIC флуоресценция), а хетерозиготите – като зелени точки между двата хомозиготни клъстера (VIC/FAM флуоресценция).



Фигура 3.18. Алел-дискриминационен плот, показващ трите кълъстера – хомозиготи по див тип алел (FAM); хетерозиготи (VIC/FAM) и хомозиготи по полиморфния алел (VIC) (<http://www.di.uq.edu.au/proj19proc>).



Фиг. 3.19. Хомозиготен генотип (вляво) и хетерозиготен генотип (вдясно).

Предимствата на технологията на Fast Real-time PCR пред други методи за генотипиране на SNPs включват:

- Редуциране употребата и контакта с вредни химикали;
- Изцяло автоматизирана детекция;
- Висока чувствителност и специфичност;
- Бърза и лесна детекция;
- Едновременна детекция на хиляди проби.

Основните недостатъци са свързани с:

- Необходимост от специализирана апаратура и обучен персонал;
- Висока себестойност на реактивите и консумативите;
- Методът не е подходящ за малки извадки и генотипиране на отделни проби;
- Тесен интервал на оптималните концентрации на геномна ДНК, което създава допълнителни трудности при изготвянето и дългосрочното съхранение на разрежките.

Въпреки посочените недостатъци, Real-time PCR остава най-бързият метод за детекция на известни SNPs и позволява при събрана представителна извадка от проби обработката да става в рамките на няколко часа.

В хода на научната разработка бяха генотипирани общо 7 SNPs в 7 кандидат-гена за идиопатична сколиоза с помощта на TaqMan Real Time PCR (Таблица 3.11).

Таблица 3.11. SNPs, генотипирани с TaqMan Real Time PCR

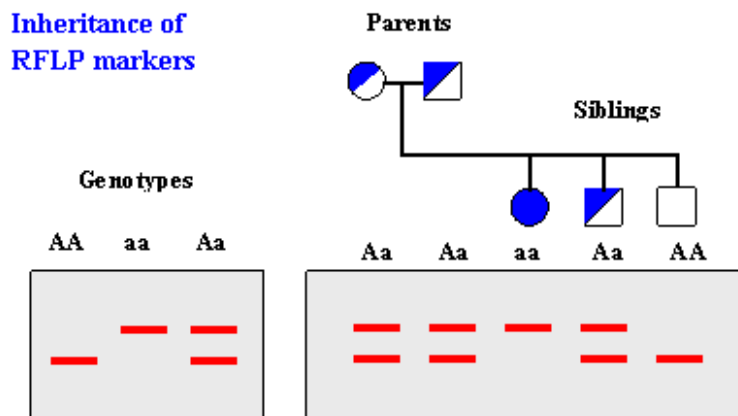
Ген	Полиморфизъм	Алелни честоти в европейска популация (hapmap.ncbi.nlm.nih.gov)		TaqMan SNP Genotyping Assay
		G	A	
<i>CHD7</i>	<i>rs4738824</i>	G	A	TaqMan assay C_509500_10
		0.77	0.23	
<i>MTNR1B</i>	<i>rs4753426</i>	T	C	TaqMan assay C_289583_10
		0.50	0.50	
<i>IL17RC</i>	<i>rs708567</i>	G	A	TaqMan assay C_3008341_10
		0.48	0.52	
<i>GPR126</i>	<i>rs6570507</i>	A	G	TaqMan assay C_2502198_10
		0.32	0.68	
<i>TGFB1</i>	<i>rs1800469</i>	C	T	TaqMan assay C_8708473_10
		0.71	0.29	
<i>LBX1</i>	<i>rs11190870</i>	T	C	TaqMan assay C_1349874_20
		0.59	0.41	
<i>CHL1</i>	<i>rs1400180</i>	T	G	TaqMan assay C_8831533_10
		0.48	0.52	

2.3 Полиморфизъм по дължината на рестрикционните фрагменти (RFLP)

Полиморфизмът по дължината на рестрикционните фрагменти представлява разликата в хомоложни ДНК последователности, която може да бъде установена по наличието на фрагменти с различна дължина след ензимно смятане на ДНК. Повечето RFLP маркери са кодоминантни (в хетерозиготно състояние се детектират и двата алела) и високо локус-специфични (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrflp/>).

Анализът включва следните етапи:

1. ДНК се амплифицира при съответните условия и температура на хибридизация, специфична за съответните праймери.
2. Амплифицираният продукт се смила с подходяща рестриктаза при 37⁰С или по-висока температура за 12 h (over night).
3. Рестрикционните фрагменти се разделят на 3% агарозен гел, съдържащ или впоследствие оцветен с етидиев бромид и се визуализират с UV трансилюминатор с фиксирана дължина на вълната от 315 nm.



Фиг. 3.20. Унаследяване на RFLP маркери. AA и aa съответстват на хомозиготите, а Aa – на хетерозиготите.

Предимства на технологията RFLP пред други методи за генотипиране на SNPs:

- Възможност за многократно повторение и анализ на единични проби;
- Относително проста за изпълнение и интерпретация методика;
- Ниска себестойност.

Основни недостатъци:

- Бавно отчитане на резултатите;
- Значителна ръчна обработка, увеличаваща възможността от аналитични грешки;
- Известна субективност при анализиране на резултатите.

Част от недостатъците на анализа могат да се премахнат с въвеждането на секвенирани контроли от хетерозиготни генотипи. По разделянето на фрагментите на контролата се съди за качеството на рестрикцията. При наличие на една ивица (банд) при хетерозиготна контрола, рестрикция не е протекла. При различен интензитет на бандовете, рестрикцията не е пълна поради недостатъчно количество на ензима или недостатъчно време за рестрикция, както и на температура под или над оптималната за ензимната активност. В тези случаи, анализът за конкретни проби се повтаря.

Таблица 3.12. RFLP микс

Реактив	Количество, μ л	Количество, μ л
PCR-продукт	6	12
Буфер	1.2	2.4
Рестриктаза	0.3	0.6
dH ₂ O	4.5	9.0
Общ обем:	12	24

В настоящата разработка 12 SNPs бяха идентифицирани чрез амплификация, последвана от рестрикция в присъствието на положителни контроли. Рестриктазите бяха подбрани чрез сайта <http://insilico.ehu.es/>. Условиата са дадени по-долу.

Таблица 3.13. Рестриктази

Рестриктаза	Буфер	Разпознавана последователност	Температура за инкубация, °C
SfaNI	NEBuffer 3.1	5'... GCATC (N) ₅ ▼...3' 3'... CGTAG (N) ₉ ▲...5'	37
Tth111I	CutSmart™ NEBuffer 2.1	5'... GACN▼NNGTC...3' 3'... CTGNN▲NCAG...5'	65
SpeI	CutSmart™ NEBuffer 2.1	5'... A▼CTAGT...3' 3'... TGATC▲A...5'	37
MspI	CutSmart™ NEBuffer 2.1	5'... C▼CGG...3' 3'... GGC▲C...5'	37
XbaI	CutSmart™ NEBuffer 2.1	5'... T▼CTAGA...3' 3'... AGATC▲T...5'	37
PvuII	CutSmart™ NEBuffer 2.1, 3.1	5'... CAG▼CTG...3' 3'... GTC▲GAC...5'	37
DdeI	CutSmart™ NEBuffer 2.1, 3.1	5'... C▼TNAG...3' 3'... GANT▲C...5'	37
HpyCH4IV (MaeII)	CutSmart™, NEBuffer 2.1	5'... A▼CGT...3' 3'... TGC▲A...5'	37
FokI	CutSmart™, NEBuffer 1.1, 2.1	5'... GGATG (N) ₉ ▼...3' 3'... CCTAC (N) ₁₃ ▲...5'	37
MluCI	CutSmart™, NEBuffer 1.1	5'... ▼AATT...3' 3'... TTAA▲...5'	37
HhaI	NEB U CutSmart™	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ 5' \dots \text{GCGC} \dots 3' \\ 3' \dots \text{CGCG} \dots 5' \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $	37
BslI	CutSmart™ NEBuffer 3.1	5'... CCNNNNN▼NNGG...3' 3'... GGNN▲NNNNNCC...5'	55

Таблица 3.14. RFLP анализ.

Ген, Полиморфизъм	PCR продукт, bp	Рестриктаза	Дължина на рестрикционните фрагменти, bp
<i>IL-6</i> <i>rs1800795</i>	198	SfaNI	CC: 198
			CG: 198 + 140 + 58
			GG: 140 + 58
<i>MMP3</i> <i>rs3025058</i>	130	Tth111I	5A/5A: 97 + 33
			5A/6A: 130 + 97 + 33
			6A/6A: 130
<i>TPH1</i> <i>rs10488682</i>	260	SpeI	AA: 260
			TA: 260 + 146 + 114
			TT: 146 + 114
<i>MATN1</i> <i>rs1149048</i>	224	MspI	AA: 224
			AG: 224 + 138 + 86
			GG: 138 + 86
<i>ESR1</i> <i>rs9340799 (XbaI)</i>	1374	XbaI	XX: 1374
			Xx: 1374 + 982 + 392
			xx: 982 + 392
<i>ESR1</i> <i>rs2234693 (PvuII)</i>	1374	PvuII	PP: 1374
			Pp: 1374 + 937 + 437
			pp: 937 + 437
<i>ACTN3</i> <i>rs1815739 (R577X)</i>	205+86	DdeI	RR: 205 + 86
			XX: 108 + 97 + 86
			RX: 205 + 108 + 97 + 86
<i>AMPD1</i> <i>rs17602729</i>	136	HpyCH4IV (MaeII)	CC: 97 + 39
			CT: 136 + 97 + 39
			TT: 136
<i>VDR</i> <i>rs2228670 (FokI)</i>	265	FokI	FF: 265
			Ff: 265 + 196 + 69
			ff: 196 + 69
<i>BMP4</i> <i>rs4898820</i>	134	MluCI	GG: 110 + 24
			GT: 110 + 93 + 24 + 17
			TT: 93 + 24 + 17
<i>Lep</i> <i>rs7799039</i>	242	HhaI	GG: 242
			GA: 242 + 181 + 61
			AA: 181 + 61
<i>IGF-1</i> <i>rs5742612</i>	330	BslI	TT: 330
			CT: 330 + 277 + 53
			CC: 277 + 53

2.4 Агарозна гел-електрофореза

Агарозната гел-електрофореза е най-лесният за изпълнение и най-често прилаганият метод за разделяне и анализ на високо- и нискомолекулни фрагменти от ДНК. Основава се на движението на отрицателно заредената ДНК към анода в агарозен гел под действието на електрично поле. Фрагментите се визуализират чрез добавяне на етидиев бромид, който се интеркалира между нуклеотидните бази и предизвиква светенето им при облъчване с ултравиолетови лъчи. Големината на таргетните последователности се отчита спрямо молекулен маркер, състоящ се от различни фрагменти с позната дължина, с разлика между фрагментите най-често 50 или 100 bp.

Хоризонтална агарозна гел-електрофореза

Методът беше прилаган за:

1. Качествена оценка на наличието и степента на деградация на ДНК – разделяне в 0.8% агарозен гел;
2. Разделяне на продуктите от PCR в 2% агарозен гел;
3. Разделяне на рестрикционните фрагменти в 3% агарозен гел.

Необходими реактиви:

- Агароза (Lonza);
- 1xTBE буфер (pH 8): TRIS (Applichem, Germany) - 90mmol/l; Борна киселина (Applichem, Germany) - 90mmol/l; Na₂EDTA (Applichem, Germany) – 1mmol/l;
- Етидиев бромид;
- Буфер за нанасяне на проби (Loading Buffer): 0.25% бромфенол блу (Applichem, Germany); 15% фикол (Applichem, Germany);
- Молекулен маркер - Ladder 50 bp, 100 bp (NEB; Invitrogen); GeneRuler 100 bp (Fermentas).

Апаратура:

- Система за хоризонтална електрофореза (Science-Plus, UK);
- UV Транслюминатор с фиксирана дължина на вълната от 315 nm и фотодокументационна система (MiniBisPro, DNR).

2.5 Директно секвениране (по Sanger)

Секвенирането е основен метод за първично идентифициране на генетични промени – единични нуклеотидни замени, малки делеции и инсерции, фрейм-шифт мутации, както и за потвърждаване на генетични промени, установени с други методи. В настоящата разработка методът на директно секвениране беше прилаган за потвърждаване на хетерозиготния генотип на отделни проби за изследваните полиморфни маркери. Впоследствие тези проби бяха използвани като контроли при рестрикционния анализ.

Необходими реактиви и консумативи:

- ЕхоSAP-IT (USB, USA);
- 10 pM праймери (AlphaDNA);
- 5x секвенционен буфер (Life Technologies);
- Big Dye Terminator v3.1 (Life Technologies);
- dH₂O и ddH₂O (бидестилирана вода);
- 3 M натриев ацетат (Applichem, Germany) + 125 mM EDTA (Applichem, Germany);
- Абсолютен етанол (Applichem, Germany);
- 70 % етанол (Applichem, Germany);
- Дейонизиран формаид (Life Technologies);
- 3130 POP-7 полимер (Life Technologies);
- 96-ямкови плаки (Life Technologies);
- 3130 xl капилярни пипети, 16 x 36 cm (Life Technologies).



Фиг. 3.21. ABI3130xl Sequence Genetic Analyzer (Life Technologies)

Директното секвениране включва следните етапи:

1. Амплификация на таргетния ДНК фрагмент.

Оптималните условия за протичане на реакцията са описани по-горе, заедно с оптималните температури за хибридизация на съответните праймери (Таблица 2.6 и 2.7). Получените PCR продукти се разделят на 2% агарозен гел и се визуализират след оцветяване с етидиев бромид. Продуктите трябва да бъдат чисти, без неспецифични екстрабендове.

2. Ензимно пречистване на PCR продукта.

Получените PCR продукти се пречистват с ензимите Екзонуклеаза I (Ехо) и алкална фосфатаза (SAP) под формата на двукомпонентен реактив - ЕхоSAP-IT (USB, USA). Тази стъпка е необходима за премахването на останалите в пробата дезоксирибонуклеотидтрифосфати (dNTPs), праймери и неспецифични продукти, които биха могли да окажат влияние върху по-нататъшните реакции. Екзонуклеаза I разгражда неизползваните едноверижни праймери и всички други едноверижни ДНК фрагменти, получени по време на амплификацията. Алкалната фосфатаза хидролизира излишните dNTPs. Реакцията на ензимно пречистване включва инкубиране на оптималната за действие на ензимите температура и инкубиране при температура за инактивиране на ензимите.

Микс		Етап	Температура	Продължителност
ЕхоSAP	0.3 µl	Пречистване на PCR продукта	37°C	30 min
dH ₂ O	1.7 µl			
PCR продукт	1.0 µl	Инактивиране на ензимите	80°C	15 min
Общ обем:	3.0 µl	Прекъсване на реакцията	4°C	∞

Таблица 3.15. Условия за ензимно пречистване на PCR продукта.

3. Секвенционна реакция.

За секвенционната реакция се използва кит за секвениране Big Dye® Terminator kit v3.1, (Life Technologies), включващ ДНК-полимераза, небелязани нуклеотиди и флуоресцентно белязани дидезоксинуклеотиди. Към 3'-края на всеки един от четирите вида дидезоксинуклеотиди е свързано различно флуоресцентно багрило.

Реакцията протича в краен обем от 10 µl при следните условия (Таблица 3.16 и Таблица 3.17):

Таблица 3.16. Реакционна смес за секвенционна реакция.

Реагент	Количество
Пречистена матрица	3.0 µl
10 pM праймер – прав (F) или обратен (R)	0.4 µl
5x секвенционен буфер	2.0 µl
Big Dye Terminator v3.1	0.4 µl
ddH ₂ O (бидестилирана вода)	4.2 µl
Общ обем:	10.0 µl

Таблица 3.17. Програма за секвенционна реакция.

Етап	Температура	Време	} ► 30 цикъла
Начална денатурация	96°C	5 min	
Денатурация	96°C	20 sec	
Хибридизация	55-60°C	20 sec	
Елонгация	60°C	2 min	
Крайна елонгация	60°C	5 min	
Прекъсване на реакцията	4°C	∞	

4. Преутаяване на секвенционния продукт.

Прави се с цел отстраняване на несвързаните нуклеотиди. Към секвенционната проба се добавят 1 µl 3 M натриев ацетат и 1 µl 125 mM EDTA, смесени предварително и 25 µl студен абсолютен етанол. Вортексира се и се инкубира на тъмно, на стайна температура за 15 min. Следва центрофугиране на стайна температура за 30 min при 14 000 rpm. Супернатантата се отстранява внимателно чрез обръщане на епруветките и центрофугиране на 500 rpm за 30 sec. Прави се допълнително пречистване, като получената утайка се промива с 35 µl прясно приготвен 70% етанол, вортексира се и се центрофугира за 30 min на 14 000 rpm при стайна температура. Супернатантата се отстранява, като епруветките се обръщат и центрофугират на 500 rpm за 30 sec. Утайката се оставя да изсъхне на стайна температура на тъмно за 12 часа. Сухата утайка може да се съхранява на тъмно при стайна температура в продължение на няколко дни.

5. Разтваряне на секвенционния продукт.

Към сухите утайки се добавят 14 µl високо дейонизиран формамид (Life Technologies), който възпрепятства изпарението и поддържа продуктите денатурирани (едноверижни). Пробите се вортексират, денатурира се за 5 min на 94°C и се прехвърлят върху лед за 5 min. След това отново се вортексират и се центрофугира леко, за да се събере цялото количество на дъното. Така приготвената проба е готова за анализ и се подава на апарата за електрофоретично разделяне.

6. Електрофоретично разделяне и отчитане на секвенционните реакции.

Разделянето на фрагментите в автоматичния секвенатор ABI3130xl се извършва на принципа на капилярната гел-електрофореза. Използваните при секвенционната реакция терминиращи дидезоксинуклеотиди са флуоресцентно белязани, поради което се осъществява лазерна детекция. Всеки от четирите дидезоксинуклеотида е белязан с два флуорофора – флуоресцин и един от четирите типа родамин. Изпълнявайки ролята на донор, флуоресцинът поглъща енергията на лазерния лъч и я прехвърля към акцепторния родамин върху същата молекула. Всеки от четирите акцептора емитира светлина с определена дължина на вълната, която се детектира от апарата и така се идентифицира съответният нуклеотид.

3. Статистически методи за анализ

3.1. Дескриптивна статистика

Беше приложен вариационен анализ за определяне средните стойности на количествените променливи – възраст и ъгъл на сколиозата в различните подгрупи и в групата като цяло. Бяха изчислени стандартно отклонение, медиани, минимални и максимални стойности и ниво на значимост при сравнение на отделните подгрупи.

С помощта на честотен анализ бяха определени абсолютните и относителните честоти на изследваните категорийни променливи – брой (%) на изследваните лица по групи.

3.2. Изчисляване на алелните и генотипни честоти. Анализ на равновесието по закона на Харди-Вайнберг (Hardy-Weinberg equilibrium)

Според закона на Харди-Вайнберг, в идеална популация съотношението между алелните и генотипните честоти в даден локус остава непроменено с течение на времето. В един локус с два алела, сумата от алелните и генотипните честоти е:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1; \quad p + q = 1,$$

където p и q са алелните честоти, съответно на доминантния и на рецесивния алел.

Равновесните генотипни честоти на хомозиготите по двата алела се изразяват чрез квадрата на съответния алел, а генотипната честота на хетерозиготите – чрез произведението на алелните честоти, умножено по две.

Относителните алелни честоти (p и q) се определят от наблюдаваните честоти на генотиповете и се пресмятат по формулите:

$$p = \frac{2 \times AA + Aa}{2 \times (AA + Aa + aa)} \quad ; \quad q = 1 - p$$

Очакваните честоти на трите генотипа се пресмятат по следния начин:

$$AA = p^2n; \quad Aa = 2pqn; \quad aa = q^2n$$

С помощта на χ^2 и p се определя равновесието по Харди-Вайнберг:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E},$$

където O е наблюдаваната честота, а E – очакваната честота за всеки генотип.

Пресмятанятията за статистически значима разлика между очакваните по Харди-Вайнберг алелни честоти и тези наблюдавани в извадката бяха проведени с WinStat 4.3 при ниво на значимост $p < 0.05$.

3.3. Методи за проверка на хипотези

3.3.1. *Параметрични методи*

T-тест при две независими извадки (Independent Samples T-test) беше приложен за сравнение на средните стойности на количествените променливи при нормално разпределение (ъгъл на Cobb) при дефинирани две групи – прогресивна (Cobb >40⁰) и непрогресивна сколиоза (Cobb <40⁰); мъже и жени; пациенти, при които е проведено корсетолечение и такива без корсетолечение; фамилни и нефамилни случаи.

Дисперсионен анализ (OneWay ANOVA) беше приложен за сравнение на средните стойности на количествените променливи с нормално разпределение (ъгъл на Cobb) при дефинирани три групи – според възрастта – инфантилна, ювенилна и адолесцентна идиопатична сколиоза; според модела на кривината – торакална, тораколумбална и лумбална основна крива.

3.3.2. *Непараметрични методи*

Проверката за нормалност на разпределението на количествена променлива (Cobb ъгъл и възраст) беше направена с тест на Колмогоров-Смирнов (Kolmogorov-Smirnov) и Шапиро-Уйлк (Shapiro-Wilk).

Тестът на Ман-Уитни (Mann-Whitney) беше приложен за сравнение на средните стойности на количествените променливи при липса на нормално разпределение (възраст към началото на заболяването) при дефинирани две независими групи – прогресивна (Cobb >40⁰) и непрогресивна сколиоза (Cobb <40⁰); мъже и жени; пациенти, при които е проведено корсетолечение и такива без корсетолечение; фамилни и нефамилни случаи.

Тестът на Кръскал-Уолис (Kruskal-Wallis) беше приложен за сравнение на средните стойности на количествените променливи, когато разпределението не е нормално (възраст към началото на заболяването) при дефинирани три независими групи – според възрастта – инфантилна, ювенилна и адолесцентна идиопатична сколиоза; според вида на основната крива – торакална, тораколумбална и лумбална.

Беше приложен корелационен анализ по Spearman за изследване на връзката между две количествени променливи (възрастта към началото на заболяването и ъгъла на сколиозата по последни измервания) в различните подгрупи от пациенти.

Асоциативното проучване на ролята на изследваните SNPs беше осъществено посредством Хи(χ^2)-квадрат тест (Pearson Chi-square test, Phi and Crammer's V) предвид големината на общата извадка от пациенти и контроли (N > 300) или с точен тест на Фишер (two-tailed Fisher's Exact Test) при малките подгрупи (n < 30), при ниво на статистическа значимост и при двата метода p < 0.05. N се използва за означаване на броя пациенти плюс контроли (n₁+n₂), n - брой пациенти (n₁) или брой контроли (n₂).

3.4. Изчисляване на относителен риск (Odds ratio – OR, Relative Risk/Risk Ratio – RR, 95% Confidence Interval - CI)

Беше изчислена стойността на отношението на шансовете (odd ratio = OR) и на рисковете (risk ratio = RR) в 95% доверителен интервал (95% CI), измерващи относителния риск (шанс) за развитие на болестта и нейната прогресия при наличие на даден генетичен вариант с потенциално предразполагащо или модифициращо действие върху патологичния фенотип. За обработка на данните от проучването е използван специализирания статистически пакет IBM SPSS Statistics 19.0 за Windows.

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. РЕЗУЛТАТИ ОТ КЛИНИЧНАТА ИЗВАДКА И ОБСЪЖДАНЕ

В изследването бяха включени 105 пациенти със средна възраст към началото на заболяването $11,2 \pm 3,1$ години. Средният ъгъл на Cobb беше $54,6 \pm 22,7^{\circ}$, а средният предоперативен ъгъл – $62,7 \pm 17,4^{\circ}$. Средният ъгъл на сколиозата беше определен по данни: 1) от последно проведените рентгенографии при пациенти, подлежащи на консервативно (изправителна гимнастика) и полуконсервативно лечение (корсетолечение); 2) от предоперативните рентгенографии.

Сред пациентите с идиопатична сколиоза преобладаваха тези от женски пол (момичета:момчета 4:1 в общата група и 4,6:1 при оперативните случаи). По литературни данни идиопатичната сколиоза се среща по-често при момичета с общо съотношение на момичета:момчета от 1.5:1 до 3:1, което нараства значително с възрастта. Съотношението е 1.4:1 при малки криви от 10° до 20° и достига 7.2:1 при криви над 40° [33]. Тези данни показват значително по-високия риск от прогресия на деформацията при женския пол.

Най-голяма беше групата от пациенти с адолесцентна идиопатична сколиоза (74,3 %). Според епидемиологичните проучвания АИС е най-често срещаната форма на идиопатична сколиоза [25], която засяга между 2 и 3 % от децата на възраст 10-16 години [30, 290]. Според класификацията на Scoliosis Research Society АИС може да възникне до 18-годишна възраст.

Бяха изследвани основно пациенти с прогресивна идиопатична сколиоза, показани за оперативно лечение (80 %). Сред тях преобладаваха пациентите с АИС, показани за задна вертебротомия. При 52,4 % от всички случаи и при 58,3 % от оперативните случаи има анамнеза за проведено корсетолечение. По данни от ретроспективни проучвания близо 10 % от пациентите с АИС се нуждаят от корсетолечение, а само 0.1 % от всички случаи стигат до етап, в който са показани за оперативно лечение [30, 31].

Наблюдаваха се всички основни видове първични криви – торакална, тораколумбална, лумбална, двойна крива; дясноконвексна и лявоконвексна сколиоза; С-образна и S-образна сколиоза. Преобладаваха пациенти с дясноконвексна торакална сколиоза според първичната крива, а най-малко бяха тези с лявоконвексна лумбална сколиоза. Имаше един случай с две първични криви. По литературни данни торакалните криви са най-чести и при двата пола, следвани от тораколумбални/лумбални криви и значително по-редките модели като двойна първична крива [33, 36]. Около 85% от кривите са дясноконвексни (<http://www.orthopediatrics.com/docs/Guides/scoliosis.html>). Все още не са известни причините, поради които дясноконвексната сколиоза се среща по-често от лявоконвексната форма. Данни за асиметрия, дясна ротация на торакални прешлени и дясноконвексна неструктурна торакална крива са докладвани и при нормалния гръбнак [291].

Преобладаващият тип в изследваната извадка от пациенти с АИС беше 1AN според класификацията на Lenke [17] за най-често срещаният вид идиопатична сколиоза. Тип 1AN съответства на първична торакална крива без оформена вторична лумбална крива и без отклонения в гръдната кифоза в посока на хипо- или хиперкифоза. По-често се срещаха още типове: 1A+, 1BN, 1CN, 3C+, 2AN, 3C+, 4B+, 4C+ и 6AN. Инфантилните и ювенилните форми на идиопатична сколиоза не бяха оценявани по класификацията на Lenke. По данни от рентгенографските проучвания

най-често срещаният тип АИС е 1AN. Други често срещани варианти са 1BN и 2AN [292].

Преобладаващият брой случаи в извадката беше този на спорадичните. Само 26,7% от изследваните бяха с положителна фамилна анамнеза – поне един болен родственик. Ролята на наследствените фактори в етиологията на идиопатичната сколиоза е доказана. Въпреки това, в клиничната практика около 90% от пациентите са спорадични случаи [272]. Точното съотношение на фамилни към нефамилни случаи не е установено.

Основните клинично-демографски данни са представени на таблица 4.1 и таблица 4.2.

Таблица 4.1. Средна възраст (към началото на заболяването) в различните подгрупи.

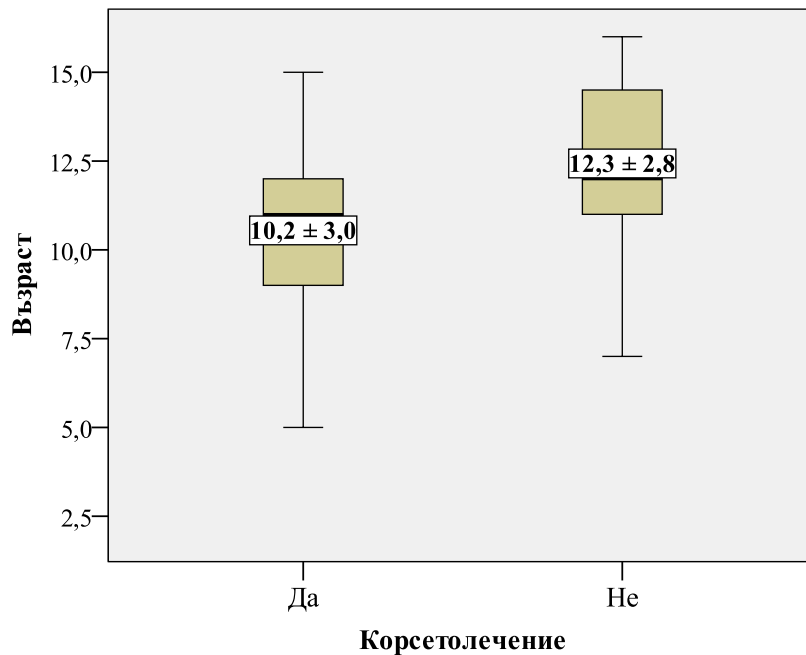
Възраст	N (%)	Mean	SD	Median	Min	Max	Sig.
1. Пол							
Жени	86 (81.9%)	11,0	3,1	12,0	2	16	0.204*
Мъже	19 (18.1%)	11,9	3,1	13,0	6	16	
2. Начало на сколиоза							
ИИС	4 (3.8%)	2,5	0,6	2,5	2	3	0.000**
ЮИС	23 (21.9%)	7,8	1,6	9,0	4	9	
АИС	78 (74.3%)	12,6	1,6	12,0	10	16	
3. Ъгъл на Cobb							
<40 ⁰	21 (20.0%)	11,2	2,7	11,0	7	16	0.555*
>40 ⁰	84 (80.0%)	11,1	3,2	12,0	2	16	
4. Корсетолечение							
Корсетолечение	55 (52.4%)	10,2	3,0	11,0	2	15	0.000*
Без корсетолечение	47 (47.6%)	12,3	2,8	12,0	3	16	
5. Тип на кривата							
Торакална крива	62 (59.1%)	11,0	3,1	12,0	2	16	0.388**
Тораколумбална крива	31 (29.5%)	11,1	3,2	11,0	2	15	
Лумбална крива	12 (11.4%)	12,4	2,8	13,0	9	16	
6. Конвекситет							
D – сколиоза	87 (82.9%)	11,3	2,9	12,0	2	16	0.945*
L – сколиоза	18 (17.1%)	10,9	3,8	11,5	3	16	
7. Фамилна история							
Фамилни случаи	28 (26.7%)	11,1	3,2	12,0	3	16	0.985*
Нефамилни случаи	77 (73.3%)	11,2	3,1	12,0	2	16	
Общо	105 (100%)	11,2	3,1	12,0	2	16	

ИИС – инфантилна идиопатична сколиоза; **ЮИС** – ювенилна идиопатична сколиоза; **АИС** – адолесцентна идиопатична сколиоза; **D** – дясноконвексна сколиоза; **L** – лявоконвексна сколиоза; **SD** – стандартно отклонение. * Mann-Whitney; ** Kruskal-Wallis

От таблицата правят впечатление няколко статистически значими разлики. На първо място, това е очакваната разлика в средната възраст на пациентите с ИИС, ЮИС и АИС. Преобладават пациентите с АИС със средна възраст $12,6 \pm 1,6$ години. Минималната възраст е 10 години, а максималната възраст – 16 години.

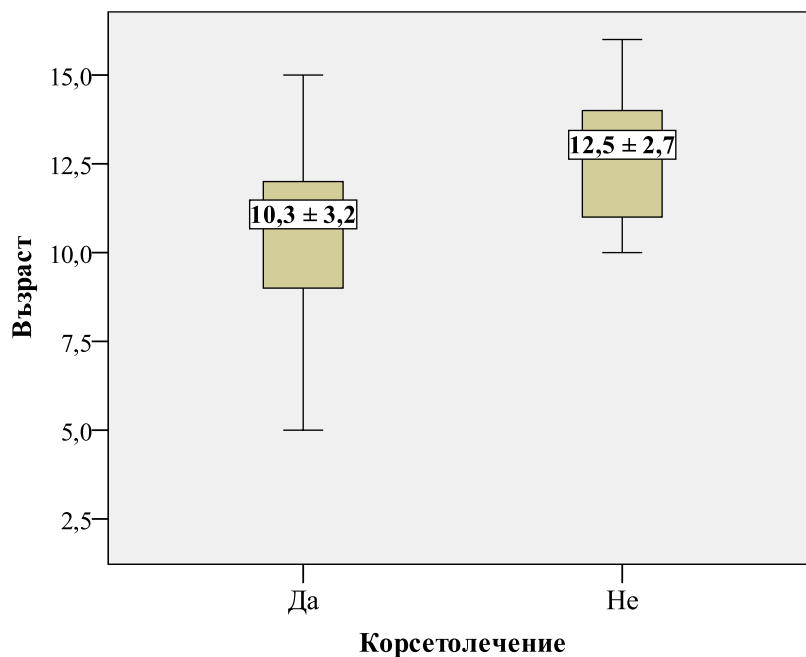
Другата статистически значима разлика се наблюдава между средната възраст на пациентите с и без проведено корсетолечение. При проведено корсетолечение, средната възраст е $10,2 \pm 3,0$ години, а при липса на такова лечение - $12,3 \pm 2,8$ години ($p < 0.0005$). Тези резултати показват, че при по-малките деца по-често се прилага ортезно лечение, докато оперативното лечение се планира по възможност към момент, когато вече няма бурно развитие и нарастване на скелета. Средната възраст, на която е проведена задна вертебротомия при пациенти с АИС, е $14,7 \pm 2,0$ години.

На фиг. 4.1. е представена графично средната възраст към началото на заболяването при пациенти с проведено корсетолечение.



Фиг. 4.1. Средна възраст (+SD) към началото на заболяването при пациенти с проведено корсетолечение и без корсетолечение ($p < 0.0005$, Mann-Whitney Test).

При разглеждане само на групата на прогресивната сколиоза (ъгъл на Cobb $>40^{\circ}$) разликата в средната възраст също е значителна (фиг. 4.2).



Фиг. 4.2. Средна възраст (+SD) към началото на заболяването при пациенти с прогресивна сколиоза и проведено корсетолечение и без корсетолечение ($p < 0.0005$, Mann-Whitney Test).

Таблица 4.2. Среден ъгъл на Cobb в различните подгрупи.

Ъгъл на Cobb	N (%)	Mean	SD	Median	Min	Max	Sig.
1.Пол							
Жени	86 (81.9%)	54,2	22,0	55,0	15	120	0.753*
Мъже	19 (18.1%)	56,1	26,3	54,0	12	125	
2.Начало на сколиоза							
ИИС	4 (3.8%)	82,5	30,7	81,5	46,9	120	0.012***
ЮИС	23 (21.9%)	47,1	21,3	48,0	12	93	
АИС	78 (74.3%)	55,2	21,7	56,5	16	125	
3.Ъгъл на Cobb							
<40 ⁰	21 (20.0%)	22,1	6,3	20,0	12	32	0.000**
>40 ⁰	84 (80.0%)	62,7	17,4	59,5	36	125	
4.Корсетолечение							
Корсетолечение	55 (52.4%)	56,5	17,0	56,0	16	99,7	0.484*
Без корсетолечение	47 (47.6%)	53,4	28,0	53,0	12	125	
5.Тип на кривата							
Торакална крива	62 (59.1%)	54,7	24,7	55,0	12	125	0.071***
Тораколумбална крива	31 (29.5%)	59,3	17,8	60,0	16	99,7	
Лумбална крива	12 (11.4%)	41,6	19,6	42,5	16	80	
6.Конвекситет							
D – сколиоза	87 (82.9%)	54,3	22,1	55,0	12	120	0.821*
L – сколиоза	18 (17.1%)	55,7	25,9	58,0	16	125	
7.Фамилна история							
Фамилни случаи	28 (26.7%)	40,7	24,5	34,0	15	120	0.000**
Нефамилни случаи	77 (73.3%)	59,6	19,8	59,0	12	125	
Общо	105 (100%)	54,6	22,7	55,0	12	125	

ИИС – инфантилна идиопатична сколиоза; ЮИС – ювенилна идиопатична сколиоза; АИС – адолесцентна идиопатична сколиоза; D – дясноконвексна сколиоза; L – лявоконвексна сколиоза; SD – стандартно отклонение. *T-test; **Mann-Whitney; ***OneWay ANOVA

На таблица 4.2 се наблюдават значителни разлики в средния ъгъл на Cobb при прогресивна сколиоза (оперирани случаи) - $62,7^0 \pm 17,4$ и при непрогресивна или бавнопрогресивна сколиоза (неоперирани случаи) – $22,1^0 \pm 6,3$. При разделяне само на оперативните случаи на такива след проведено и без проведено корсетолечение се вижда, че предоперативният ъгъл на Cobb е с по-голяма средна стойност при тези, които никога не са провеждали корсетолечение ($66,0^0 \pm 22,0$).

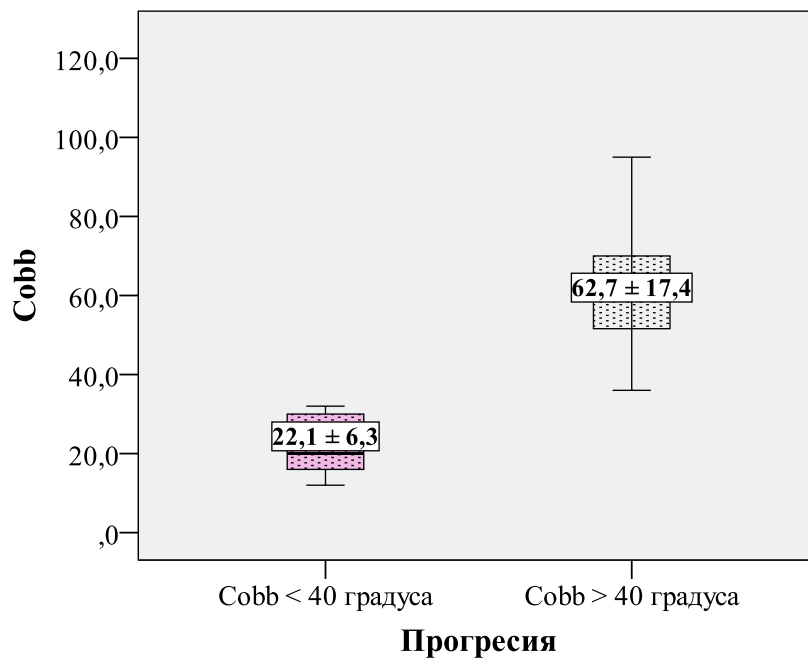
Средният предоперативен ъгъл на сколиозата се различава значително и в зависимост от възрастта ($p=0.012$, OneWay ANOVA). Само при четирима пациенти се наблюдава ИИС и техният среден резултат не е показателен. При сравняване на останалите две групи – на ЮИС и АИС не се достига статистическа значимост ($p=0.11$, T-test). Едно ново сравнително проучване на ЮИС и АИС не открива статистически значими разлики в средния ъгъл на Cobb при пациенти с двете форми на идиопатична сколиоза [293].

При фамилните случаи средният ъгъл на Cobb е значително по-малък от този при нефамилните случаи, но когато се разглеждат само прогресивните фамилни и спорадични случаи, стойностите са близки.

При сравняване на средния ъгъл на лумбалната сколиоза спрямо този при торакалната и тораколумбалната сколиоза, се вижда, че при първични деформации в лумбалния отдел не се достигат толкова високи градуси на ъгъла на Cobb ($41,6^0 \pm 19,6$).

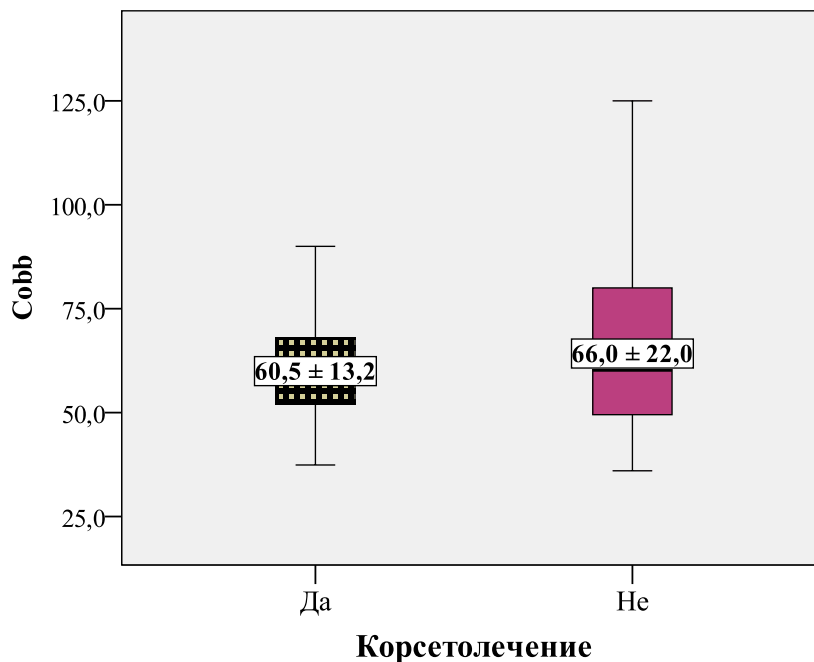
При изследване на 190 пациенти с АИС тип 3C според класификацията на Lenke е установен по-малък предоперативен среден ъгъл на сколиозата в лумбалната област – $43,5^0$ спрямо торакалните криви – 53^0 [294].

На фиг. 4.3 е показан средният ъгъл на непрогресивната и прогресивната идиопатична сколиоза.



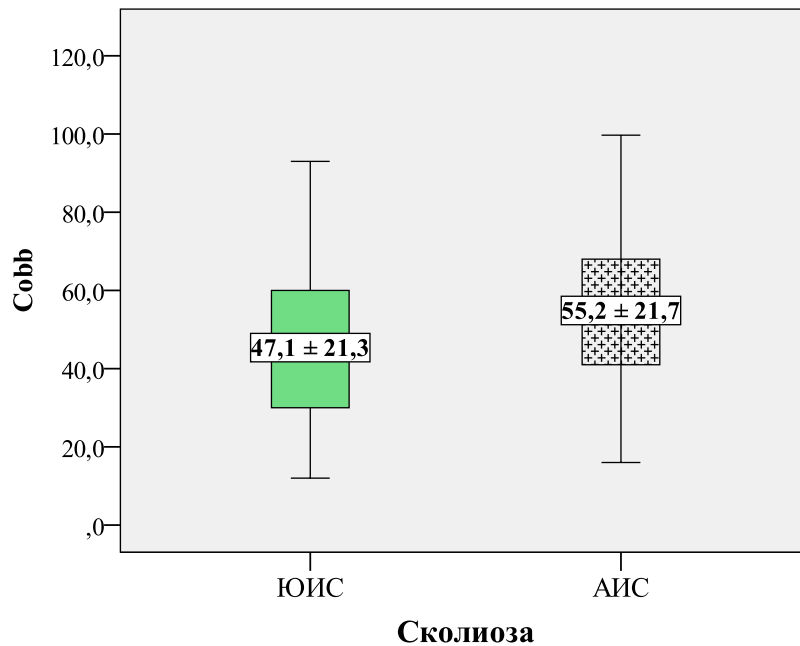
Фиг. 4.3. Средна стойност (+SD) на ъгъл на Cobb при прогресивна и непрогресивна сколиоза ($p < 0.0005$, Mann-Whitney Test).

При сравняване на стойностите в зависимост от проведеното корсетолечение, в групата на прогресивната сколиоза се вижда, че ъгълът на Cobb е по-голям при пациенти, които никога не са провеждали корсетолечение, без да се постига статистическа значимост на този етап (фиг. 4.4).



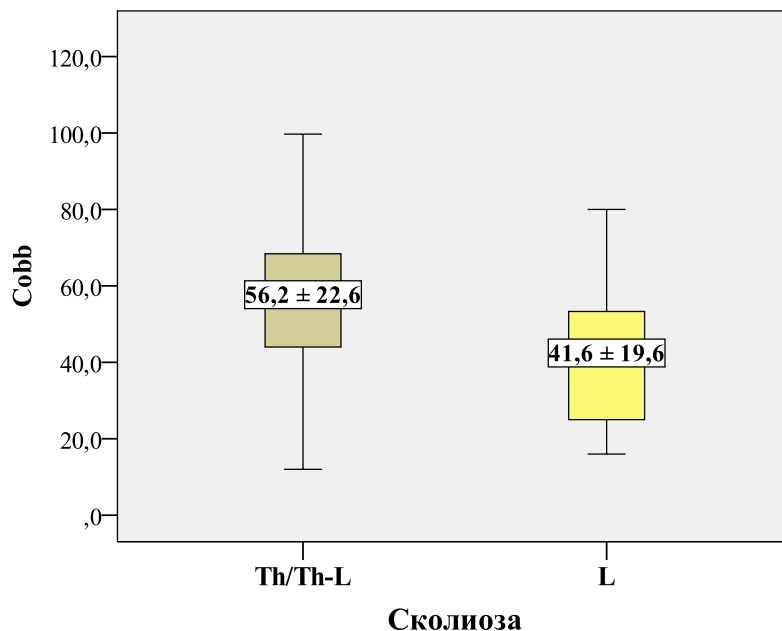
Фиг. 4.4. Средна стойност (+SD) на ъгъл на Cobb при прогресивна сколиоза (Cobb >40°) в зависимост от проведеното корсетолечение ($p = 0.41$, Kruskal-Wallis Test).

На фиг. 4.5 е показан средният ъгъл на сколиозата при ювенилна и адолесцентна форма на идиопатична сколиоза.



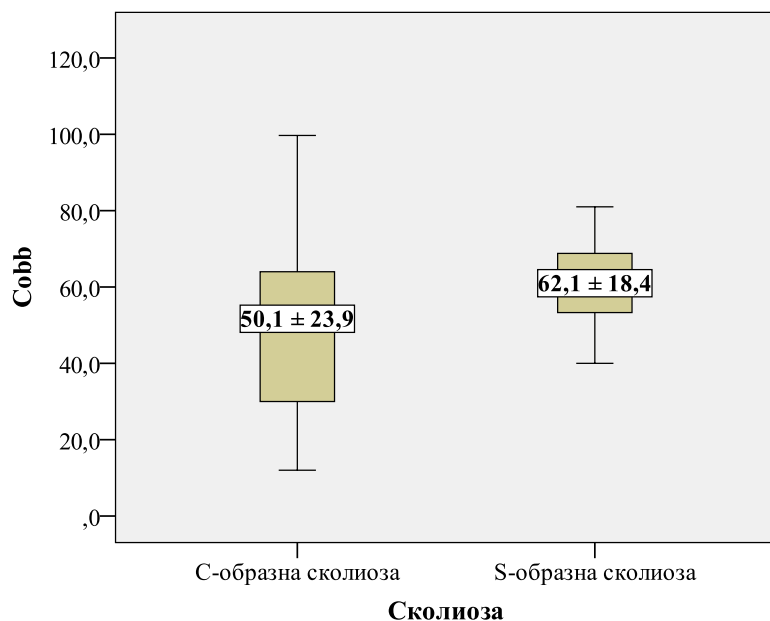
Фиг. 4.5. Средна стойност (+SD) на ъгъл на Cobb в зависимост от възрастта ($p = 0.11$, T-test).

На фиг. 4.6 е показан по-малкият среден ъгъл на Cobb при лумбална сколиоза в сравнение с торакална и тораколумбална форма.



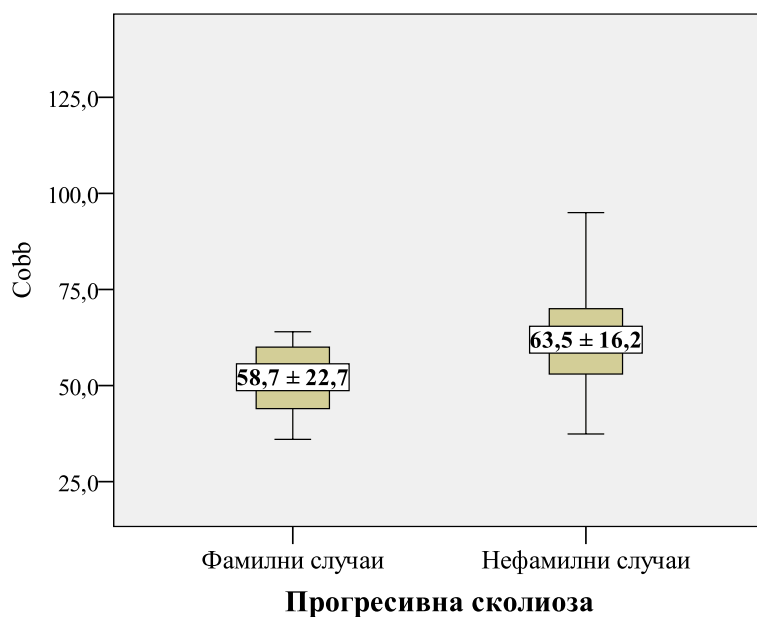
Фиг. 4.6. Средна стойност (+SD) на ъгъл на Cobb в зависимост от типа на кривата ($p = 0.035$, T-test).

На фиг. 4.7 е показан по-големият среден ъгъл на първичната крива при S-образна сколиоза в сравнение с C-образна форма на деформацията.



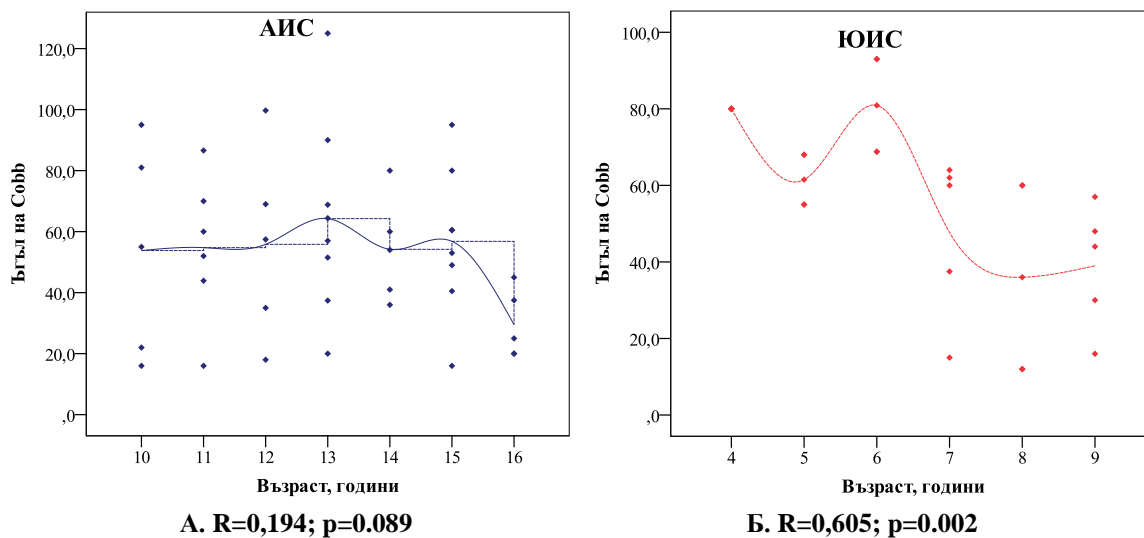
Фиг. 4.7. Средна стойност (+SD) на ъгъл на Cobb при С-образна и S-образна сколиоза ($p = 0.008$, T-test).

На фиг. 4.8 е показан средният ъгъл на Cobb при фамилна и нефамилна прогресивна сколиоза.



Фиг. 4.8. Средна стойност (+SD) на ъгъл на Cobb при фамилни и нефамилни случаи с прогресивна сколиоза ($p = 0.081$, Mann-Whitney Test).

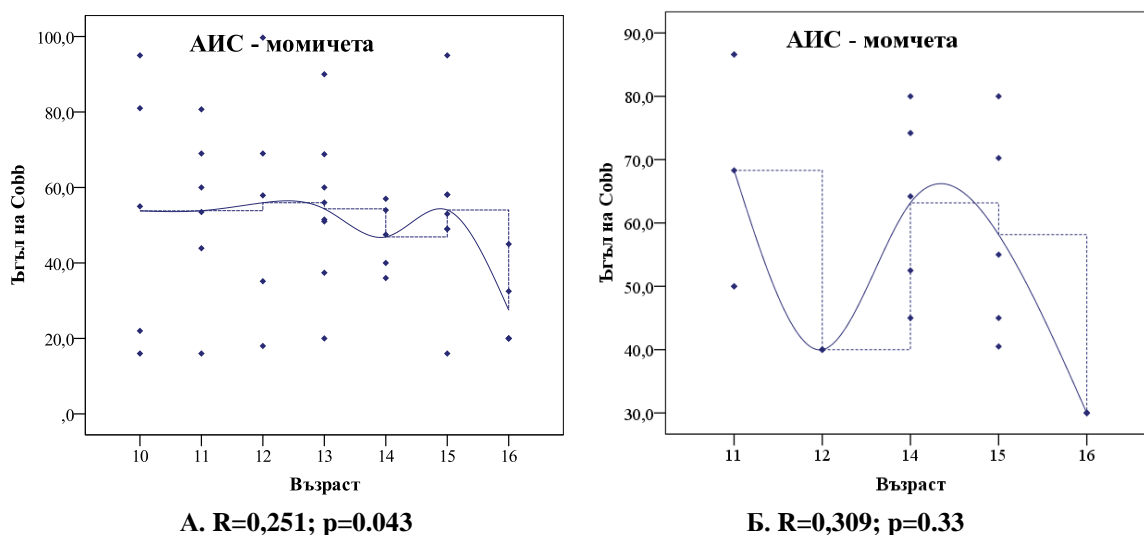
Беше потвърдена линейна корелация между възрастта към началото на заболяването и ъгъла на сколиозата в групата на АИС и ЮИС (фигура 4.9):



Фигура 4.9. Линеен корелационен анализ между ъгъла на сколиозата и възрастта: А. При АИС Б. При ЮИС; R-коефициент на Spearman, p-вероятност.

От фиг 4.9 се вижда, че в групата на ЮИС средният ъгъл най-общо намалява с възрастта, като пикът е на 6-годишна възраст. Прогнозата е по-лоша при начало на ЮИС до 6-годишна възраст, тази ранна сколиоза се характеризира със сериозен риск от прогресия и кардио-пулмонални усложнения [20]. Колкото по-малко е детето по време на поставяне на диагнозата, толкова по-голям е рискът от прогресия на деформацията и предоперативният ъгъл на Cobb е по-голям.

При АИС се наблюдава тенденция към асоциация и при разделяне на случаите по пол се достига статистическа значимост в групата на момичетата (фиг. 4.10А).



Фигура 4.10. Линеен корелационен анализ между ъгъла на сколиозата и възрастта при АИС: А. При момичета Б. При момчета; R-коефициент на Spearman, p-вероятност.

Пиковите съответстват на периодите на ускорен растеж, когато вероятността от поява или прогресия на съществуваща деформация е по-голяма. Средната възраст на пикова растежна скорост е 11.6 години за момичетата и 13.5 години за момчета по данни за България [295].

2. РЕЗУЛТАТИ ОТ АСОЦИАТИВНОТО ПРОУЧВАНЕ И ОБСЪЖДАНЕ

2.1. Селекция на клинични групи

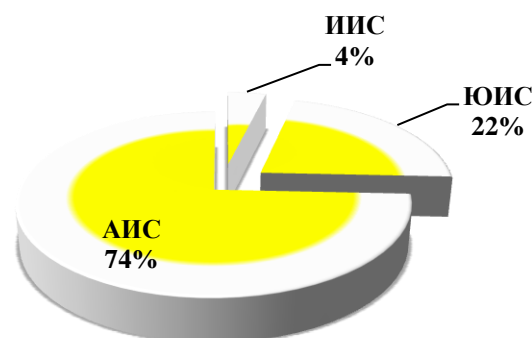
За целите на асоциативното проучване пациентите бяха групирани по следните 5 показателя: начало на идиопатичната сколиоза, прогресия, пол, фамилна история, тип на гръбначната крива. Групата на пациентите с прогресивна сколиоза беше разделена на 2 подгрупи в зависимост от проведеното корсетолечение. Контролната група беше разделена на 2 подгрупи - според пола на изследваните лица.

При проучване на връзката между полиморфизмите и началото, прогресията, фамилната история на заболяването и пола бяха сравнявани случаи с контроли (case-control study).

При проучване на връзката между полиморфизмите и типа на гръбначната крива и изхода от корсетолечението бяха сравнявани помежду им съответните подгрупи от пациенти (case-only study).

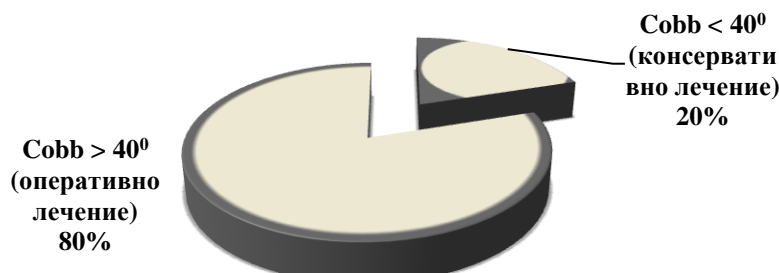
Асоциативно проучване случаи/контроли (case-control study)

- Начало на идиопатична сколиоза: 1) Инфантилна – ИИС (n=4); 2) Ювенилна - ЮИС (n=23); 3) Адолесцентна – АИС (n=78); 4) Контролна група (n=210)



Фиг. 4.11. Разпределение на случаите според началото на заболяването

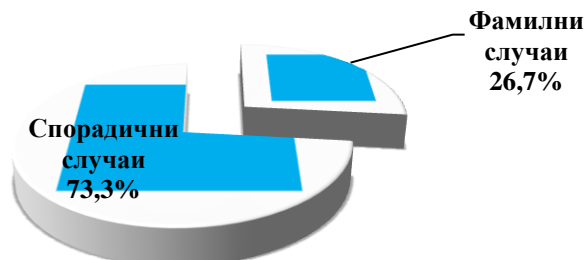
- Прогресия: 1) Непрогресивна или бавнопрогресивна сколиоза - ъгъл на Cobb до 40° (n=21); 2) Прогресивна сколиоза - ъгъл на Cobb над 40° (n=84); 3) Контролна група (n=210)



Фиг. 4.12. Разпределение на случаите според прогресията на заболяването

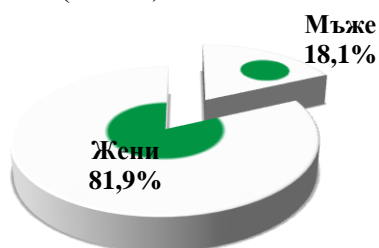
*Имаше двама оперирани пациенти с ъгъл на Cobb < 40° , които бяха включени към втората група

- Фамилна история на заболяването: 1) Фамилни случаи – с поне един болен родственик (n=28); 2) Спорадични случаи - с отрицателна фамилна анамнеза (n=77); 3) Контролна група (n=210)



Фиг. 4.16. Разпределение на случаите според фамилната история на заболяването

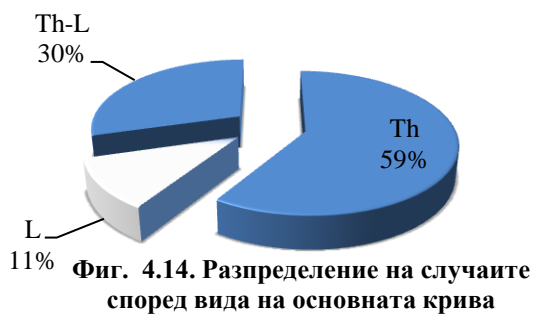
- Пол: 1) Мъжки (n=19); 2) Женски пол (n=86); 3) Контролна група мъже (n=38); 4) Контролна група жени (n=172)



Фиг. 4.13. Разпределение по пол

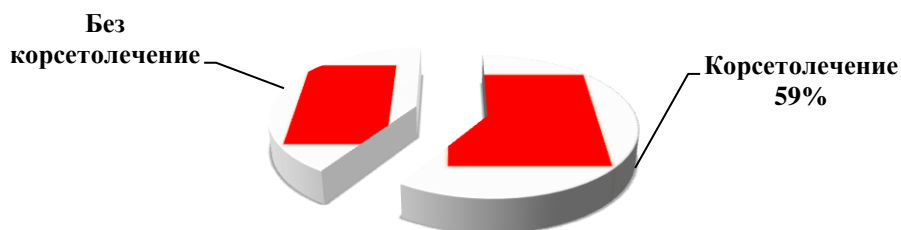
Асоциативно проучване между подгрупи от случаи (case-only study)

- Тип на гръбначната крива: 1) Торакална – Th (n=62); 2) Лумбална - L (n=12); 3) Торако-лумбална сколиоза - Th-L (n=31).



Фиг. 4.14. Разпределение на случаите според вида на основната крива

- Проведено корсетолечение в групата на прогресивната сколиоза: 1) Проведено корсетолечение (n=49); 2) Без предшестващо корсетолечение (n=34).



Фиг. 4.15. Разпределение на оперативните случаи в зависимост от проведеното корсетолечение

2.2. Резултати от SNP генотипирането чрез директна амплификация

2.2.1. Ангиотензин конвертиращ ензим – ACE (rs1799752, -/G; I/D)

Честотата на функционалния полиморфизъм ACE (I/D) бе проучена чрез директна амплификация в групата като цяло и в отделните подгрупи от пациенти с идиопатична сколиоза и беше сравнена с тази на неродствени индивиди без клинични белези на сколиоза (case-control study) или с други подгрупи от пациенти (case-only study).



Фиг 4.16. Резултати от амплификацията на ACE (I/D): II – хомозиготи (490 bp); DI – хетерозиготи (490 + 190 bp); DD – хомозиготи (190 bp); M – маркер 50 bp; първа позиция (вляво) – секвенирана контрола.

Генотипните честоти на ACE (I/D) при пациенти и контроли и анализ на равновесието по Hardy-Weinberg (HWE) са представени в таблица 4.3.

Таблица 4.3. Разпределение на генотипните честоти при пациенти и контроли.

Ген Полиморфизъм	Група	Случаи, N (%)			HWE		Контроли, N (%)			HWE	
		DD	DI	II	χ^2	p	DD	DI	II	χ^2	p
ACE (rs1799752 I/D)	Обща група	31 (29.5)	60 (57.2)	14 (13.3)	3.17	0.08	57 (27.1)	114 (54.3)	39 (18.6)	1.85	0.17
	Мъже	7 (36.8)	9 (47.4)	3 (15.8)	0.001	0.97	6 (15.8)	25 (65.8)	7 (18.4)	3.8	0.05
	Жени	24 (27.9)	51 (59.3)	11 (12.8)	3.93	0.05	51 (29.7)	89 (51.7)	32 (18.6)	0.39	0.53

Полиморфизмът показва съответствие със закона на Hardy-Weinberg. Генотипните и алелните честоти на ACE (I/D) не се различаваха съществено при пациенти и контроли (DD vs. DI vs. II, $p = 0.5$ и D vs. I, $p = 0.36$, χ^2 -тест). Наблюдаваните честоти сред контролите са близки до тези, съобщени от Костадинова и съавтори (I vs. D, $p = 1$, χ^2 -тест) в българска популационна извадка [296].

Асоциацията между ACE (I/D) и идиопатичната сколиоза до момента е проучена само в рамките на бразилска фамилия от 25 души, 22-ма, от които имат определена степен на латерална девиация на гръбначния стълб над 5° , а 9-ма имат адолесцентна идиопатична сколиоза над 15° . Резултатите показват: 19 DD хомозиготи (76%) и 6 DI хетерозиготи (24%). Не са идентифицирани II хомозиготи. Честотата на D алела е 88%, а на I алела е 12% [190]. До момента не са провеждани други проучвания.

Асоциацията в отделните подгрупи беше проучена при генотипен (кододоминантен, доминантен и рецесивен модел) и алелен модел на генно влияние (таблица 4.4 и 4.5).

Таблица 4.4. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти и контроли (case-control study)

Подгрупа	Модел	Генотип, Алел	р (χ^2 -тест)	OR [95% CI]
Обща група ($n_1=105, n_2=210$)	Кододоминантен	DD vs. II	0.28	1.51 [0.71-3.21]
	Доминантен	DD vs. DI + II	0.65	1.12 [0.67-1.89]
	Рецесивен	DD + DI vs. II	0.24	1.48 [0.77-2.87]
	Алелен	D vs. I	0.36	1.17 [0.83-1.63]
АИС ($n_1=78, n_2=210$)	Кододоминантен	DD vs. II	0.39	1.43 [0.63-3.27]
	Доминантен	DD vs. DI + II	0.69	1.12 [0.63-1.99]
	Рецесивен	DD + DI vs. II	0.37	1.39 [0.67-2.87]
	Алелен	D vs. I	0.47	1.15 [0.79-1.66]
ЮИС ($n_1=23, n_2=210$)	Кододоминантен	DD vs. II	0.74*	1.37 [0.32-5.80]
	Доминантен	DD vs. DI + II	1*	0.95 [0.35-2.52]
	Рецесивен	DD + DI vs. II	0.59*	1.52 [0.43-5.37]
	Алелен	D vs. I	0.88*	1.09 [0.59-2.02]
Фамилни случаи ($n_1=28, n_2=210$)	Кододоминантен	DD vs. II	1*	0.82 [0.23-2.88]
	Доминантен	DD vs. DI + II	0.65*	0.73 [0.28-1.90]
	Рецесивен	DD + DI vs. II	1*	1.05 [0.38-2.93]
	Алелен	D vs. I	0.78*	0.90 [0.52-1.58]
Спорадични случаи ($n_1=77, n_2=210$)	Кододоминантен	DD vs. II	0.14	1.90 [0.80-4.51]
	Доминантен	DD vs. DI + II	0.38	1.29 [0.73-2.27]
	Рецесивен	DD + DI vs. II	0.17	1.72 [0.79-3.75]
	Алелен	D vs. I	0.19	1.28 [0.88-1.87]
Cobb >40° ($n_1=84, n_2=210$)	Кододоминантен	DD vs. II	0.1	2.05 [0.87-4.84]
	Доминантен	DD vs. DI + II	0.39	1.27 [0.73-2.20]
	Рецесивен	DD + DI vs. II	0.1	1.90 [0.88-4.12]
	Алелен	D vs. I	0.16	1.30 [0.90-1.87]
Cobb <40° ($n_1=21, n_2=210$)	Кододоминантен	DD vs. II	0.49*	0.55 [0.14-2.17]
	Доминантен	DD vs. DI + II	0.46*	0.63 [0.20-1.96]
	Рецесивен	DD + DI vs. II	0.77*	0.73 [0.25-2.11]
	Алелен	D vs. I	0.42*	0.76 [0.41-1.44]
Мъже ($n_1=19, n_2=38$)	Кододоминантен	DD vs. II	0.4*	2.72 [0.48-15.47]
	Доминантен	DD vs. DI + II	0.1*	3.11 [0.87-11.15]
	Рецесивен	DD + DI vs. II	1*	1.20 [0.27-5.30]
	Алелен	D vs. I	0.32*	1.62 [0.73-3.56]
Жени ($n_1=86, n_2=172$)	Кододоминантен	DD vs. II	0.46	1.37 [0.59-3.17]
	Доминантен	DD vs. DI + II	0.78	0.92 [0.52-1.63]
	Рецесивен	DD + DI vs. II	0.24	1.56 [0.74-3.27]
	Алелен	D vs. I	0.66	1.09 [0.75-1.57]

*Fisher's Exact Test (two-tailed); n_1 - брой пациенти, n_2 - брой контроли.

От таблица 4.4 се вижда, че генотипните и алелните честоти на ACE (I/D) не се различават съществено при български пациенти с АИС и контроли (DD vs. II, $p = 0.39$ и D vs. I, $p = 0.47$, χ^2 -тест). При сравняване подгрупата на ЮИС с контролите също не се достига статистически значима асоциация между ACE (I/D) и патологичния фенотип ($p > 0.05$, Fisher's Exact Test). Следователно, полиморфизмът не може да бъде свързан с началото на заболяването.

В подгрупата на фамилните случаи генотипните и алелните честоти на ACE (I/D) не се различават съществено от тези на контролите (DD vs. II, $p = 1$ и D vs. I, $p = 0.78$, Fisher's Exact Test). Следователно, полиморфизмът не може да бъде свързан с фамилната история на идиопатичната сколиоза. При спорадичните случаи също не се отчита статистически значим резултат (DD vs. II, $p = 0.14$ и D vs. I, $p = 0.19$, χ^2 -тест).

В подгрупата на прогресивната сколиоза генотипните и алелните честоти на *ACE* (I/D) са сравними с тези на контролите (DD vs. II, $p = 0.1$ и D vs. I, $p = 0.16$, χ^2 -тест). Следователно, този полиморфизъм не може да бъде обсъждан като самостоятелен модифициращ фактор при идиопатична сколиоза сред български пациенти. В подгрупата на непрогресивната и бавнопрогресивната сколиоза връзката също не е значима (DD vs. II, $p = 0.49$ и D vs. I, $p = 0.42$, Fisher's Exact Test).

При сравнение на пациентите и контролите по пол, сред момчетата не се наблюдава статистически значима асоциация между *ACE* (I/D) и клиничния фенотип (DD vs. II, $p = 0.46$ и D vs. I, $p = 0.66$, χ^2 -тест). При момчетата също не се наблюдава статистически значима асоциация между *ACE* (I/D) и идиопатичната сколиоза (DD vs. II, $p = 0.4$ и D vs. I, $p = 0.32$, Fisher's Exact Test). Следователно, полиморфизмът не може да бъде асоцииран с пола.

Таблица 4.5. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти (case-only study)

Подгрупа	Модел	Генотип, Алел	p (χ^2 -тест)	OR [95% CI]
Cobb >40⁰ Корсетолечение/без корсетолечение (n₁=49, n₂=34)	Кодоминантен	DD vs. II	1*	1.16 [0.25-5.33]
	Доминантен	DD vs. DI + II	1*	1.01 [0.40-2.58]
	Рецесивен	DD + DI vs. II	1*	1.17 [0.29-4.73]
	Алелен	D vs. I	1*	1.04 [0.55-1.96]
Торакална/ тораколумбална+лумбална първична крива (n₁=62, n₂=43)	Кодоминантен	DD vs. II	0.36	1.82 [0.51-6.54]
	Доминантен	DD vs. DI + II	0.46	1.39 [0.58-3.30]
	Рецесивен	DD + DI vs. II	0.46	1.53 [0.49-4.72]
	Алелен	D vs. I	0.4	1.27 [0.73-2.22]
Тораколумбална/ торакална+лумбална първична крива (n₁=31, n₂=74)	Кодоминантен	DD vs. II	0.72*	0.63 [0.16-2.43]
	Доминантен	DD vs. DI + II	0.65*	0.78 [0.30-1.98]
	Рецесивен	DD + DI vs. II	0.75*	0.72 [0.22-2.35]
	Алелен	D vs. I	0.88*	1.09 [0.60-1.98]
Лумбална/ тораколумбална+торакална първична крива (n₁=12, n₂=93)	Кодоминантен	DD vs. II	1*	0.64 [0.09-4.35]
	Доминантен	DD vs. DI + II	1*	0.77 [0.19-3.08]
	Рецесивен	DD + DI vs. II	1*	0.74 [0.14-3.80]
	Алелен	D vs. I	0.83*	0.83 [0.36-1.96]

*Fisher's Exact Test (two-tailed)

От таблица 4.5 се вижда, че пациентите с прогресивна сколиоза бяха разделени на две подгрупи – според проведеното корсетолечение, като при сравняването им не бе открита статистически значима връзка между полиморфизма и прогресията на идиопатичната сколиоза при пациенти с и без предшестващо ортезно лечение (DD vs. II, $p = 1$ и D vs. I, $p = 1$, Fisher's Exact Test). Следователно, полиморфизмът *ACE* (I/D) не може да бъде свързан с изхода от корсетолечението.

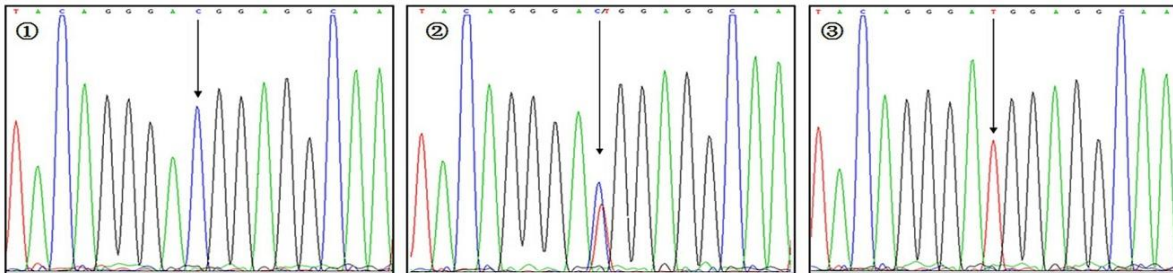
При сравняване подгрупите от пациенти с торакална, тораколумбална и лумбална сколиоза помежду им също не беше установена статистически значима връзка с изследвания полиморфизъм ($p > 0.05$, χ^2 -тест, Fisher's Exact Test). Следователно, *ACE* (I/D) не корелира с типа на гръбначната крива.

В заключение, настоящото проучване показва, че този функционален полиморфен вариант не е предразполагащ или модифициращ фактор за идиопатична сколиоза и не може да бъде свързан с начало на заболяването, пол, фамилна история, тип на кривата и изход от корсетолечението сред българските пациенти с идиопатична сколиоза. Необходими са репликативни проучвания в различни популационни групи за изясняване на евентуалното участие на *ACE* (I/D) в етиопатогенезата на идиопатичната сколиоза.

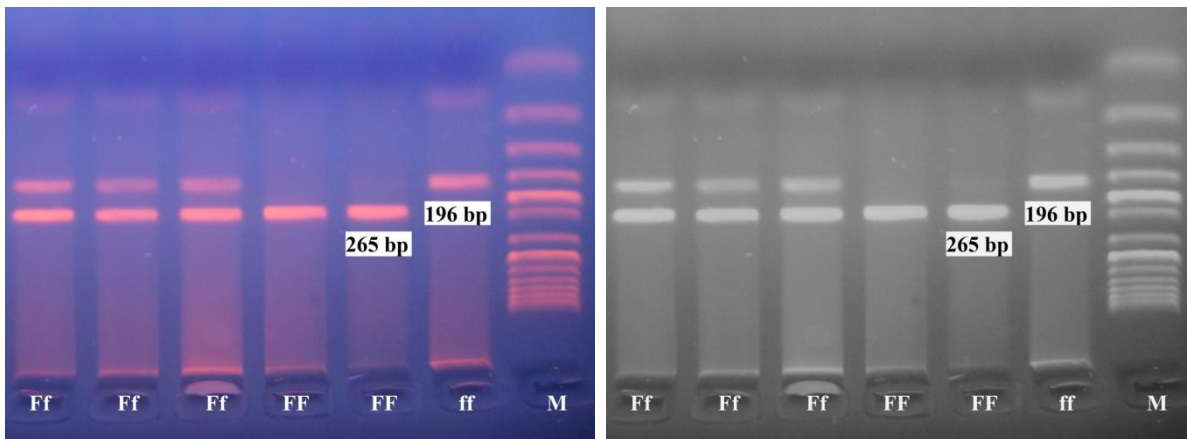
2.3. Резултати от SNP генотипирането чрез амплификация-рестрикция

2.3.1. Витамин Д рецептор – VDR (rs2228570, C/T; FokI, F/f)

Честотата на функционалния полиморфизъм VDR (rs2228570, C/T) беше проучена чрез метода амплификация-рестрикция в групата като цяло и в отделните подгрупи от пациенти с идиопатична сколиоза и беше сравнена с тази на неродствени индивиди без клинични белези на сколиоза (case-control study) или с други подгрупи от пациенти (case-only study).



Фиг. 4.17. Полиморфизъм rs2228570 на VDR: (1) CC; (2) CT; (3) TT генотип.



Фиг 4.18. Резултати от рестрикционния анализ: FF – хомозиготи (265 bp); Ff – хетерозиготи (265 + 196 + 69 bp); ff – хомозиготи (196 + 69 bp); М – маркер 50 bp; първа позиция (вляво) – секвенирана контрола.

Генотипните честоти на VDR FokI (F/f) при пациенти и контроли и анализ на равновесието по Hardy-Weinberg (HWE) са представени в таблица 4.6.

Таблица 4.6. Разпределение на генотипните честоти при пациенти и контроли.

Ген Полиморфизъм	Група	Случаи, N (%)			HWE		Контроли, N (%)			HWE	
		FF	Ff	ff	χ^2	p	FF	Ff	ff	χ^2	p
VDR (rs2228570 F/f)	Обща група	56 (53.3)	43 (41.0)	6 (5.7)	0.37	0.54	108 (51.4)	92 (43.8)	10 (4.8)	3.03	0.08
	Мъже	9 (47.4)	9 (47.4)	1 (5.2)	0.44	0.51	22 (57.9)	16 (42.1)	0 (0)	2.7	0.1
	Жени	47 (54.7)	34 (39.5)	5 (5.8)	0.13	0.72	86 (50.0)	76 (44.2)	10 (5.8)	1.66	0.2

Полиморфизмът показва съответствие със закона на Hardy-Weinberg. Общите генотипни и алелни честоти на *VDR* (rs2228570) бяха сравними при пациенти и контроли (FF vs. Ff vs. ff, $p = 0.86$; F vs. f, $p = 0.89$, χ^2 -тест). Поради ниската популационна честота на хомозиготния ff генотип и ниската му честота в изследваната извадка, хомозиготите по доминантния алел - FF бяха изследвани срещу сбора от хетерозиготите - Ff и хомозиготите по рецесивния алел - ff (доминантен модел) в отделните подгрупи. Наблюдаваните честоти сред контролите са близки до тези, съобщени от Иванова и съавтори (F vs. f, $p = 0.75$, χ^2 -тест) в българска популационна извадка [297].

Първоначално, Suh et al. (2010) откриват асоциация между друг рестрикционен полиморфизъм - *VDR BsmI*, генетичното предразположение към сколиоза и костната плътност при момичета с АИС, но не откриват корелация между *VDR FokI* и АИС при корейски пациенти [170]. По-късно, Yilmaz et al. (2012) съобщават липса на статистически значима асоциация между *VDR BsmI* и прогресията, фамилната история и риска от АИС при пациенти от турски произход [171]. Необходими са репликативни проучвания за разкриване връзката между полиморфните варианти на *VDR* и идиопатичната сколиоза в различни популационни групи.

Генотипните и алелните честоти на *VDR* (rs2228570) не се различаваха съществено при български пациенти с АИС и контроли (FF vs. Ff + ff, $p = 0.72$ и F vs. f, $p = 0.92$, χ^2 -тест). Тези резултати потвърждават липсата на асоциация между *VDR FokI* и АИС, докладвана от Suh et al. (2010) при корейски пациенти [170]. При сравняване подгрупата на ЮИС с контролите също не беше достигната статистически значима асоциация между *VDR FokI* и патологичния фенотип ($p > 0.05$, χ^2 -тест).

При изследване на генната експресия при 9 пациенти с ЮИС и 20 пациенти с АИС Nowak et al. (2012) откриват значителни различия между пациенти с ЮИС и АИС по отношение количеството на мРНК на изоформата *VDR1* в паравертебралните мускулни влакна от конкавната страна ($p = 0.04$). Тази разлика е по-сигнификантна при сравнение само на лицата от женски пол с ЮИС и АИС ($p = 0.03$). Различия в броя копия мРНК на другата изоформа - *VDRs* има в кръвни проби от двата пола с АИС ($p = 0.04$). Тези находки водят авторите до заключението за алтернативен сплайсинг на мРНК на *VDR* в паравертебралните мускули и в левкоцитите на пациенти с идиопатична сколиоза независимо от възрастта. Броят копия на мРНК на изоформата *VDR1* може да бъде един от показателите, различаващи ЮИС от АИС [172].

В подгрупата на фамилните случаи генотипните и алелните честоти на *VDR* (rs2228570) не се различаваха съществено от тези на контролите (FF vs. Ff + ff, $p = 0.36$ и F vs. f, $p = 0.58$, χ^2 -тест). Следователно, полиморфизмът не може да бъде свързан с фамилната история на идиопатичната сколиоза. При спорадичните случаи връзката също не беше значима (FF vs. Ff + ff, $p = 0.92$ и F vs. f, $p = 0.89$, χ^2 -тест).

В подгрупата на прогресивната сколиоза, където ъгълът на Cobb е над 40° , генотипните и алелните честоти на *VDR* (rs2228570) бяха сравними с тези на контролите (FF vs. Ff + ff, $p = 0.82$ и F vs. f, $p = 0.86$, χ^2 -тест). Следователно, този полиморфизъм не може да бъде обсъждан като самостоятелен фактор с модифициращо действие върху патологичния фенотип, асоцииран с бърза прогресия на деформацията сред българските пациенти. В подгрупата на непрогресивната и бавнопрогресивната сколиоза беше отчетен повишен риск - OR = 1.89 (95% CI: 0.73-4.87), но без статистическа значимост, тъй като доверителният интервал съдържа 1.0.

След разделяне на пациентите и контролите по пол, сред момичетата не се наблюдаваше статистически значима асоциация между *VDR* (rs2228570) и клиничния фенотип (FF vs. Ff + ff, $p = 0.48$ и F vs. f, $p = 0.58$, χ^2 -тест). Тези резултати потвърждават липсата на асоциация, докладвана от Suh et al. (2010) при корейски момичета [170].

При момчетата също не се наблюдаваше статистически значима асоциация между VDR (rs2228570) и идиопатичната сколиоза (FF vs. Ff + ff, $p = 0.45$ и F vs. f, $p = 0.35$, χ^2 -тест). Следователно, полиморфизмът не може да бъде асоцииран с пола.

Odds ratios в отделните подгрупи са представени на таблица 4.7.

Таблица 4.7. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти и контроли (case-control study)

Подгрупа	Ген	Генотип, Алел	p (χ^2 -тест)	OR [95% CI]
Обща група ($n_1=105$, $n_2=210$)	VDR (rs2228570)	FF vs. Ff+ff	0.75	1.08 [0.68-1.73]
		F vs. f	0.89	1.02 [0.70-1.49]
АИС ($n_1=78$, $n_2=210$)	VDR (rs2228570)	FF vs. Ff+ff	0.72	1.10 [0.65-1.86]
		F vs. f	0.92	1.02 [0.67-1.55]
ЮИС ($n_1=23$, $n_2=210$)	VDR (rs2228570)	FF vs. Ff+ff	1	1.03 [0.43-2.44]
		F vs. f	0.92	1.03 [0.52-2.06]
Фамилни случаи ($n_1=28$, $n_2=210$)	VDR (rs2228570)	FF vs. Ff+ff	0.36	1.46 [0.65-3.27]
		F vs. f	0.58	1.20 [0.62-2.32]
Спорадични случаи ($n_1=77$, $n_2=210$)	VDR (rs2228570)	FF vs. Ff+ff	0.92	0.97 [0.57-1.63]
		F vs. f	0.89	0.97 [0.64-1.47]
Cobb >40° ($n_1=84$, $n_2=210$)	VDR (rs2228570)	FF vs. Ff+ff	0.82	0.94 [0.57-1.57]
		F vs. f	0.86	0.96 [0.65-1.44]
Cobb <40° ($n_1=21$, $n_2=210$)	VDR (rs2228570)	FF vs. Ff+ff	0.18	1.89 [0.73-4.87]
		F vs. f	0.46	1.33 [0.62-2.87]
Мъже ($n_1=19$, $n_2=38$)	VDR (rs2228570)	FF vs. Ff+ff	0.45	0.65 [0.22-1.98]
		F vs. f	0.35	0.65 [0.27-1.60]
Жени ($n_1=86$, $n_2=172$)	VDR (rs2228570)	FF vs. Ff+ff	0.48	1.21 [0.72-2.03]
		F vs. f	0.58	1.13 [0.74-1.71]

* n_1 - брой пациенти, n_2 - брой контроли.

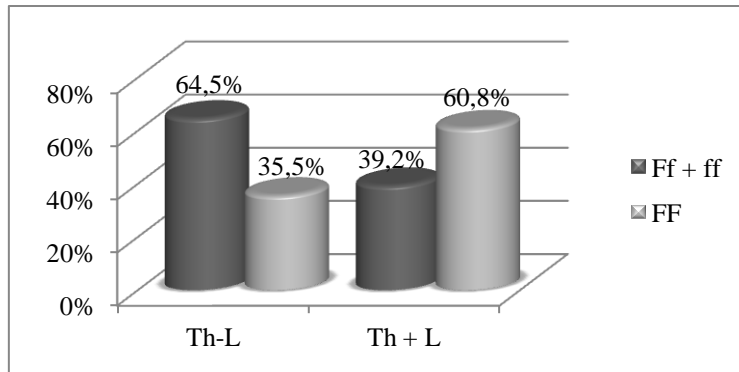
Пациентите с прогресивна сколиоза бяха разделени на две подгрупи според проведеното корсетолечение, като при сравняването им не беше открита статистически значима връзка между полиморфизма и прогресията на сколиозата ($p > 0.05$, χ^2 -тест).

При сравняване подгрупата от пациенти с тораколумбална сколиоза със сбора от останалите пациенти – с торакална и лумбална сколиоза беше установена статистически значима връзка с изследвания полиморфизъм (FF vs. Ff + ff, $p = 0.02$ при OR = 0.35 и 95% CI = 0.15-0.85). Възможно е полиморфизмът да корелира с типа на кривата.

Odds ratios в отделните подгрупи са представени на таблица 4.8.

Таблица 4.8. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти (case-only study)

Подгрупа	Ген	Генотип, Алел	p (χ^2 -тест)	OR [95% CI]
Cobb >40° Корсетолечение/без корсетолечение ($n_1=49$, $n_2=34$)	VDR (rs2228570)	FF vs. Ff+ff	0.42	0.70 [0.29-1.68]
		F vs. f	0.39	0.73 [0.36-1.49]
Торакална/ тораколумбална+лумбална първична крива ($n_1=62$, $n_2=43$)	VDR (rs2228570)	FF vs. Ff+ff	0.05	2.20 [0.99-4.86]
		F vs. f	0.15	1.57 [0.84-2.92]
Тораколумбална/ торакална+лумбална първична крива ($n_1=31$, $n_2=74$)	VDR (rs2228570)	Ff+ff vs. FF	0.02	2.82 [1.18-6.74]
		f vs. F	0.1	1.72 [0.90-3.29]
Лумбална/ тораколумбална+торакална първична крива ($n_1=12$, $n_2=93$)	VDR (rs2228570)	FF vs. Ff+ff	0.71	1.26 [0.37-4.25]
		F vs. f	0.89	1.07 [0.40-2.86]



Фигура 4.19. Доминантен модел на генно влияние (Ff+ff) / FF според типа на основната крива (Th-L – тораколумбална, Th - торакална, L - лумбална крива).

В заключение, този функционален полиморфен вариант няма предразполагащ или модифициращ ефект сред българските пациенти с идиопатична сколиоза и не може да бъде свързан с начало на заболяването, пол, фамилна история и изход от корсетолечението. В същото време полиморфният алел, кореспондиращ с по-ниска активност на VDR [175, 176], се среща значително по-често при тораколумбален тип първична крива, характеризираща се с по-малък среден ъгъл на Cobb. Възможно е полиморфизмът да изпълнява ролата на второстепенен модифициращ фактор.

Промяната в генната експресия при пациенти с адолесцентна и ювенилна форма на идиопатична сколиоза от двата пола налага разширени проучвания върху транскриптома на паравертебралните мускулни клетки.

2.3.2. Инсулиноподобен растежен фактор 1 - IGF-1 (rs5742612, C/T)

Честотата на промоторния полиморфизъм IGF-1 (rs5742612, C/T) беше проучена в групата като цяло и в отделните подгрупи от пациенти с идиопатична сколиоза и беше сравнена с тази на неродствени индивиди без клинични белези на сколиоза (case-control study) или с други подгрупи от пациенти (case-only study).

Генотипните честоти на IGF-1 (rs5742612 C/T) при пациенти и контроли и анализ на равновесието по Hardy-Weinberg (HWE) са представени в таблица 4.9.

Таблица 4.9. Разпределение на генотипните честоти при пациенти и контроли.

Ген Полиморфизъм	Група	Случаи, N (%)			HWE		Контроли, N (%)			HWE	
		ТТ	СТ	СС	χ^2	p	ТТ	СТ	СС	χ^2	p
IGF-1 (rs5742612 T/C)	Обща група	94 (89.5)	10 (9.5)	1 (1.0)	1.42	0.23	185 (88.1)	23 (11.0)	2 (0.9)	1.69	0.19
	Мъже	17 (89.5)	1 (5.25)	1 (5.25)	7.7	0.01	35 (92.1)	3 (7.9)	0 (0)	0.06	0.8
	Жени	77 (89.5)	9 (10.5)	0 (0)	0.26	0.61	150 (87.2)	20 (11.6)	2 (1.2)	1.87	0.17

Полиморфизмът показва съответствие със закона на Hardy-Weinberg в контролните групи. В подгрупата на пациентите от мъжки пол, полиморфизмът показва отклонение, което може да бъде обяснено с малката извадка и с преобладаващия ТТ генотип и в този случай е допустимо.

Генотипните и алелните честоти на IGF-1 (rs5742612, C/T) не се различаваха съществено при пациенти и контроли (ТТ vs. СТ vs. СС, p = 0.93 и Т vs. С, p = 0.73, χ^2 -тест). Поради ниската честота на хомозиготния СС генотип в кавказката популация и в

изследваната извадка, хомозиготите ТТ бяха изследвани срещу сбора от хетерозиготите - СТ и хомозиготите СС (доминантен модел) в отделните подгрупи.

Генетичната асоциация между промоторния полиморфизъм *IGF-1* (rs5742612) и началото на АИС е докладвана първоначално в малка корейска популационна извадка ($p = 0.006$) [151], но не е потвърдена в 2 по-големи китайски проучвания [149, 150] и при голямо японско проучване [94]. Различните резултати могат да бъдат обяснени с размера на извадките, селекцията на пациентите (възраст, пол, ъгъл на сколиозата) и контролите (възраст) и различните генотипни и алелни честоти в различните популационни и етнически групи.

Генотипните и алелните честоти на *IGF-1* (rs5742612) не се различаваха съществено при български пациенти с АИС и контроли (ТТ vs. СТ + СС, $p = 0.84$ и Т vs. С, $p = 0.79$, χ^2 -тест). Тези резултати потвърждават липсата на асоциация между *IGF-1* (rs5742612) и началото на АИС, докладвана при китайски пациенти [149], където размерът на извадката и критериите за селекция на пациентите се доближават в най-голяма степен до настоящото проучване. При сравняване подгрупата на ЮИС с контролите също не беше достигната статистически значима асоциация между *IGF-1* (rs5742612) и патологичния фенотип ($p > 0.05$, Fisher's Exact Test).

В подгрупата на фамилните случаи генотипните и алелните честоти на *IGF-1* (rs5742612) не се различаваха съществено от тези на контролите (ТТ vs. СТ + СС, $p = 0.55$; Т vs. С, $p = 1$, Fisher's Exact Test). Следователно, полиморфизмът не може да бъде свързан с фамилната история на идиопатичната сколиоза. При спорадичните случаи също нямаше връзка (ТТ vs. СТ + СС, $p = 1$; Т vs. С, $p = 0.85$, χ^2 -тест). Yang et al. (2009) снемат фамилна анамнеза, но не съобщават за връзка между полиморфизма и фамилната история на идиопатичната сколиоза [149].

В подгрупата на прогресивната сколиоза, където ъгълът на Cobb е над 40° , генотипните и алелните честоти на *IGF-1* (rs5742612) бяха сравними с тези на контролите (ТТ vs. СТ + СС, $p = 1$; Т vs. С, $p = 0.82$, χ^2 -тест). Следователно, този полиморфизъм не може да бъде обсъждан като самостоятелен фактор с модифициращо действие върху патологичния фенотип, асоцииран с бърза прогресия на деформацията сред българските пациенти. В японска популация Takahashi et al. (2006) не откриват връзка между генотипите на пациенти с прогресивна сколиоза и АИС ($p = 0.51$) [94]. В китайска популация Yeung et al. (2006) измерват средния ъгъл на Cobb и установяват, че той е по-голям при ТТ хомозиготи (ТТ vs ТС vs СС: 38.1° vs 35.9° vs 33.2° ; $p=0.04$, OneWay ANOVA) [150]. При измерване средните стойности на ъгъла на сколиозата при различните генотипове, не бяха открити статистически значими различия при български пациенти (ТТ vs СТ + СС: 54.2° vs 57.6° ; $p=0.64$ и Т vs С: 54.6° vs 53.6° ; $p=0.91$, T-test). Тези резултати могат да бъдат обяснени с големите популационни извадки, при които малките разлики от няколко градуса, се отчитат като сигнификантни. Не трябва да се забравя, че показателят среден ъгъл на сколиозата не е много точен за оценка на връзката между генотип и прогресия, тъй като средният ъгъл може да достигне значителни стойности при ненавременно и адекватно лечение, т.е. зависи и от външни фактори.

След разделяне на пациентите и контролите по пол сред момчетата не се наблюдаваше статистически значима асоциация между *IGF-1* (rs5742612) и клиничния фенотип (ТТ vs. СТ + СС, $p = 0.59$ и Т vs. С, $p = 0.45$, χ^2 -тест). При момчетата също не се наблюдаваше статистически значима асоциация между *IGF-1* (rs5742612) и идиопатичната сколиоза (ТТ vs. СТ + СС, $p = 1$ и Т vs. С, $p = 0.66$, Fisher's Exact Test). Следователно, полиморфизмът не може да бъде асоцииран с пола. Yang et al. (2009) изследват пациенти от двата пола и не откриват значими асоциации в общата извадка и

след разделяне на пациентите по пол [149]. Те не откриват връзка и между друг полиморфизъм *IGF-1* (rs35767) и АИС [149].

Odds ratios при различните подгрупи са представени на таблица 4.10.

Таблица 4.10. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти и контроли (case-control study)

Подгрупа	Ген Полиморфизъм	Генотип, Алел	р (χ^2 -тест)	OR [95% CI]
Обща група (n ₁ =105, n ₂ =210)	<i>IGF-1</i> (rs5742612)	TT vs. CT+CC	0.71	1.15 [0.54-2.45]
		T vs. C	0.73	1.13 [0.56-2.29]
АИС (n ₁ =78, n ₂ =210)	<i>IGF-1</i> (rs5742612)	TT vs. CT+CC	0.84	0.92 [0.42-2.01]
		T vs. C	0.79	0.91 [0.44-1.87]
ЮИС (n ₁ =23, n ₂ =210)	<i>IGF-1</i> (rs5742612)	TT vs. CT+CC	0.34*	2.97 [0.38-23.0]
		T vs. C	0.34*	3.09 [0.41-23.3]
Фамилни случаи (n ₁ =28, n ₂ =210)	<i>IGF-1</i> (rs5742612)	TT vs. CT+CC	0.55*	1.76 [0.39-7.85]
		T vs. C	1*	1.21 [0.36-4.14]
Спорадични случаи (n ₁ =77, n ₂ =210)	<i>IGF-1</i> (rs5742612)	TT vs. CT+CC	1	1.02 [0.45-2.30]
		T vs. C	0.85	1.11 [0.51-2.41]
Cobb >40° (n ₁ =84, n ₂ =210)	<i>IGF-1</i> (rs5742612)	TT vs. CT+CC	1	1.00 [0.46-2.18]
		T vs. C	0.82	1.09 [0.51-2.30]
Cobb <40° (n ₁ =21, n ₂ =210)	<i>IGF-1</i> (rs5742612)	TT vs. CT+CC	0.48*	2.7 [0.35-21.02]
		T vs. C	0.76*	1.37 [0.32-5.99]
Мъже (n ₁ =19, n ₂ =38)	<i>IGF-1</i> (rs5742612)	TT vs. CT+CC	1*	0.73 [0.11-4.78]
		T vs. C	0.66*	0.48 [0.09-2.50]
Жени (n ₁ =86, n ₂ =172)	<i>IGF-1</i> (rs5742612)	TT vs. CT+CC	0.59	1.25 [0.55-2.86]
		T vs. C	0.45	1.36 [0.62-2.99]

*Fisher's Exact Test (two-tailed); n₁- брой пациенти, n₂- брой контроли.

Нямаше статистически значими разлики между пациенти с прогресивна сколиоза при групиране в зависимост от проведеното корсетолечение (p > 0.05, Fisher's Exact Test). При сравняване подгрупите на пациентите с торакална, лумбална и тораколумбална първична крива също не бяха отчетени статистически значими асоциации (p > 0.05, χ^2 -тест, Fisher's Exact Test). Odds ratios при различните подгрупи от пациенти са представени на таблица 4.11.

Таблица 4.11. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти (case-only study)

Подгрупа	Ген Полиморфизъм	Генотип, Алел	р (Fisher's Exact Test)	OR [95% CI]
Cobb >40° Корсетолечение/без корсетолечение (n ₁ =49, n ₂ =34)	<i>IGF-1</i> (rs5742612)	TT vs. CT+CC	0.52	0.58 [0.14-2.43]
		T vs. C	0.53	0.60 [0.15-2.41]
Торакална/ тораколумбална+лумбална първична крива (n ₁ =62, n ₂ =43)	<i>IGF-1</i> (rs5742612)	TT vs. CT+CC	1	0.81 [0.22-2.94]
		T vs. C	1	1.03 [0.32-3.36]
Тораколумбална/ торакална+лумбална първична крива (n ₁ =31, n ₂ =74)	<i>IGF-1</i> (rs5742612)	TT vs. CT+CC	0.5	2.01 [0.41-9.88]
		T vs. C	0.36	2.17 [0.46-10.2]
Лумбална/ тораколумбална+торакална първична крива (n ₁ =12, n ₂ =93)	<i>IGF-1</i> (rs5742612)	TT vs. CT+CC	0.61	0.54 [0.10-2.84]
		T vs. C	0.39	0.47 [0.12-1.81]

В заключение, промоторният полиморфизъм *IGF-1* (rs5742612) няма предразполагащ или модифициращ ефект сред българските пациенти с идиопатична

сколиоза и не може да бъде свързан с възраст на начало на заболяването, пол, фамилна история, тип на кривата и изход от корсетолечението. Тези резултати не изключват потенциалната роля на други полиморфизми на гена *IGF-1* в етиопатогенезата на идиопатичната сколиоза.

2.3.3. Аденозинмонофосфатдезаминаза 1 - *AMPD1* (rs17602729, C/T; C34T)

Асоциацията между *AMPD1* (rs17602729) и идиопатичната сколиоза не бе проучена до момента. Има данни, че индивидите, които експресират вариантния Т алел (2% от кавказката популация са хомозиготи), са склонни към мускулна слабост, крампи, болки и преждевременна умора при физическа активност [298]. Много заболявания, които водят до мускулен дисбаланс и мускулна слабост, може да причинят сколиоза. Невромускулната сколиоза се среща при детска церебрална парализа, мускулни дистрофии, спинална мускулна атрофия, спина бифида, увреждания на гръбначния мозък [33]. Въпросът е дали функционалният полиморфизъм, водещ до мускулна слабост, повишава риска от сколиоза в отсъствие на невромускулно заболяване или травма.

Честотата на функционалния полиморфизъм С34Т във втори екзон на гена *AMPD1* бе проучена в групата като цяло и в отделните подгрупи от пациенти с идиопатична сколиоза и беше сравнена с тази на неродствени индивиди без клинични белези на сколиоза (case-control study) или с други подгрупи от пациенти (case-only study). Генотипните и алелните честоти на *AMPD1* (rs17602729 C/T) и анализ на равновесието по Hardy-Weinberg (HWE) са представени в таблица 4.12.

Таблица 4.12. Разпределение на генотипните честоти при пациенти и контроли.

Ген Полиморфизъм	Група	Случаи, N (%)			HWE		Контроли, N (%)			HWE	
		СС	СТ	ТТ	χ^2	p	СС	СТ	ТТ	χ^2	p
<i>AMPD1</i> (rs17602729 C/T)	Обща група	73 (69.5)	27 (25.7)	5 (4.8)	1.37	0.24	152 (72.4)	53 (25.2)	5 (2.4)	0.02	0.88
	Мъже	11 (57.9)	6 (31.6)	2 (10.5)	0.66	0.42	27 (71.1)	11 (28.9)	0 (0)	1.09	0.3
	Жени	62 (72.1)	21 (24.4)	3 (3.5)	0.52	0.47	125 (72.7)	42 (24.4)	5 (2.9)	0.4	0.53

Полиморфизмът показва съответствие със закона на Hardy-Weinberg. Нямаше статистически значими разлики между генотипните и алелните честоти при пациенти и контроли (СС vs. СТ vs. ТТ, $p = 0.51$; С vs. Т, $p = 0.4$, χ^2 -тест). Поради ниската честота на хомозиготния ТТ генотип в кавказката популация и в изследваната извадка хомозиготите СС бяха изследвани срещу сбора от хетерозиготите - СТ и хомозиготите – ТТ (доминантен модел) в отделните подгрупи. Наблюдаваните честоти сред контролите са близки до тези, съобщени от Атанасов и съавтори (С vs. Т, $p = 1$, χ^2 -тест) в българска популационна извадка [299].

Генотипните и алелните честоти на *AMPD1* (rs17602729) не се различаваха съществено при български пациенти с АИС и контроли (СС vs. СТ + ТТ, $p = 0.6$; С vs. Т, $p = 0.5$, χ^2 -тест). При сравняване подгрупата на ЮИС с контролите също не беше достигната статистически значима асоциация между *AMPD1* (rs17602729) и патологичния фенотип (СС vs. СТ + ТТ, $p = 0.78$; С vs. Т, $p = 0.42$, χ^2 -тест).

В подгрупата на фамилните случаи генотипните и алелните честоти на *AMPD1* (rs17602729) също не се различаваха съществено от тези на контролите (СС vs. СТ + ТТ, $p = 0.13$; С vs. Т, $p = 0.11$, χ^2 -тест). Следователно, полиморфизмът не може да бъде

свързан с фамилната история на идиопатичната сколиоза. При сравняване на алелните честоти на спорадичните случаи и контролите беше отчетена разлика, близка до статистическа значимост на резултата (C vs. T, $p = 0.07$, χ^2 -тест).

В подгрупата на прогресивната сколиоза, където ъгълът на Cobb е над 40° , генотипните и алелните честоти на *AMPD1* (rs17602729) бяха сравними с тези на контролите (CC vs. CT + TT, $p = 0.33$; C vs. T, $p = 0.17$, χ^2 -тест). Следователно, този полиморфизъм не може да бъде обсъждан като самостоятелен фактор с модифициращо действие. Резултатите са сходни при сравняване на пациенти с ъгъл на Cobb $<40^\circ$ с контроли (CC vs. CT + TT, $p = 0.4$; C vs. T, $p = 0.34$, χ^2 -тест).

При разделяне на пациентите и контролите по пол, сред момичетата не се наблюдаваше статистически значима асоциация между *AMPD1* (rs17602729) и клиничния фенотип (CC vs. CT + TT, $p = 0.92$ и C vs. T, $p = 0.86$, χ^2 -тест), както и при момчетата (CC vs. CT + TT, $p = 0.32$ и C vs. T, $p = 0.12$, χ^2 -тест).

Odds ratios при различните подгрупи са представени на таблица 4.13.

Таблица 4.13. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти и контроли (case-control study)

Подгрупа	Ген	Генотип, Алел	p (χ^2 -тест)	OR [95% CI]
Обща група ($n_1=105$, $n_2=210$)	<i>AMPD1</i> (rs17602729)	CC vs. CT+TT	0.6	0.87 [0.52-1.45]
		C vs. T	0.4	0.83 [0.53-1.29]
АИС ($n_1=78$, $n_2=210$)	<i>AMPD1</i> (rs17602729)	CC vs. CT+TT	0.6	0.86 [0.49-1.51]
		C vs. T	0.5	0.84 [0.51-1.38]
ЮИС ($n_1=23$, $n_2=210$)	<i>AMPD1</i> (rs17602729)	CC vs. CT+TT	0.78	0.87 [0.34-2.23]
		C vs. T	0.42	0.73 [0.33-1.58]
Фамилни случаи ($n_1=28$, $n_2=210$)	<i>AMPD1</i> (rs17602729)	CC vs. CT+TT	0.13	2.29 [0.76-6.88]
		C vs. T	0.11	2.29 [0.80-6.57]
Спорадични случаи ($n_1=77$, $n_2=210$)	<i>AMPD1</i> (rs17602729)	CC vs. CT+TT	0.15	0.67 [0.38-1.16]
		C vs. T	0.07	0.65 [0.40-1.03]
Cobb $>40^\circ$ ($n_1=84$, $n_2=210$)	<i>AMPD1</i> (rs17602729)	CC vs. CT+TT	0.33	0.76 [0.44-1.32]
		C vs. T	0.17	0.72 [0.45-1.15]
Cobb $<40^\circ$ ($n_1=21$, $n_2=210$)	<i>AMPD1</i> (rs17602729)	CC vs. CT+TT	0.4	1.62 [0.52-5.02]
		C vs. T	0.34	1.68 [0.58-4.86]
Мъже ($n_1=19$, $n_2=38$)	<i>AMPD1</i> (rs17602729)	CC vs. CT+TT	0.32	0.56 [0.18-1.77]
		C vs. T	0.12	0.47 [0.18-1.24]
Жени ($n_1=86$, $n_2=172$)	<i>AMPD1</i> (rs17602729)	CC vs. CT+TT	0.92	0.97 [0.54-1.73]
		C vs. T	0.86	0.96 [0.58-1.58]

*Fisher's Exact Test (two-tailed); n_1 - брой пациенти, n_2 - брой контроли.

Нямаше статистически значими разлики между пациенти с прогресивна сколиоза при групиране в зависимост от проведеното корсетолечение и между пациенти, групирани според типа на кривата ($p > 0.05$, χ^2 -тест, Fisher's Exact Test).

Odds ratios при различните подгрупи са представени на таблица 4.14.

Таблица 4.14. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти (case-only study)

Подгрупа	Ген	Генотип, Алел	p (χ^2 -тест)	OR [95% CI]
Cobb $>40^\circ$ Корсетолечение/без корсетолечение ($n_1=49$, $n_2=34$)	<i>AMPD1</i> (rs17602729)	CC vs. CT+TT	0.16	1.94 [0.76-4.92]
		C vs. T	0.25	1.58 [0.73-3.42]
Торакална/ тораколумбална+лумбална първична крива ($n_1=62$, $n_2=43$)	<i>AMPD1</i> (rs17602729)	CC vs. CT+TT	0.7	1.18 [0.51-2.74]
		C vs. T	0.29	1.46 [0.72-2.99]

Тораколумбална/ торакална+лумбална първична крива (n ₁ =31, n ₂ =74)	<i>AMPD1</i> (rs17602729)	CC vs. CT+TT C vs. T	0.24 0.11	0.59 [0.24-1.42] 0.55 [0.26-1.14]
Лумбална/ тораколумбална+торакална първична крива (n ₁ =12, n ₂ =93)	<i>AMPD1</i> (rs17602729)	CC vs. CT+TT C vs. T	0.34* 0.58*	2.38 [0.49-11.55] 1.57 [0.44-5.55]

*Fisher's Exact Test (two-tailed)

В заключение, този функционален полиморфен вариант на *AMPD1* няма предразполагащ или модифициращ ефект при български пациенти с идиопатична сколиоза и не може да бъде свързан с начало на заболяването, пол, фамилна история, тип на кривата и изход от корсетолечението на този етап. Резултатите, наблюдавани при сравняване на спорадичните случаи с контролите (C vs. T, p = 0.07, χ^2 -тест), не изключват потенциалната роля на този полиморфизъм в етиопатогенезата на идиопатичната сколиоза и предполагат разширени популационни проучвания за потвърждаване на настоящите резултати.

2.3.4. Актинин 3 - *ACTN3* (rs1815739, C/T; R577X)

Честотата на функционалния полиморфизъм *ACTN3* (R/X) беше проучена в групата като цяло и в отделните подгрупи от пациенти с идиопатична сколиоза и беше сравнена с тази на неродствени индивиди без клинични белези на сколиоза (case-control study) или с други подгрупи от пациенти (case-only study).

Генотипните и алелните честоти на *ACTN3* (R/X) и анализ на равновесието по Hardy-Weinberg (HWE) са представени в таблица 4.15.

Таблица 4.15. Разпределение на генотипните честоти при пациенти и контроли.

Ген Полиморфизъм	Група	Случаи, N (%)			HWE		Контроли, N (%)			HWE	
		RR	RX	XX	χ^2	p	RR	RX	XX	χ^2	p
<i>ACTN3</i> (rs1815739 R/X)	Обща група	37 (35.2)	45 (42.9)	23 (21.9)	1.7	0.19	79 (37.6)	99 (47.2)	32 (15.2)	0.01	0.91
	Мъже	3 (15.8)	11 (57.9)	5 (26.3)	0.56	0.46	15 (39.5)	15 (39.5)	8 (21.0)	1.27	0.26
	Жени	34 (39.5)	34 (39.5)	18 (21.0)	2.82	0.09	64 (37.2)	84 (48.8)	24 (14.0)	0.18	0.67

Полиморфизмът показва съответствие със закона на Hardy-Weinberg. Генотипните и алелните честоти на *ACTN3* (R/X) не се различаваха съществено при пациенти и контроли (RR vs. RX vs. XX, p = 0.34 и R vs. X, p = 0.28, χ^2 -тест). Наблюдаваните честоти сред контролите са близки до тези, съобщени от Атанасов и съавтори (R vs. X, p = 1, χ^2 -тест) в българска популационна извадка [299].

Асоциацията между *ACTN3* (R/X) и идиопатичната сколиоза до момента е проучена само в рамките на една бразилска фамилия от 25 души, 22-ма, от които имат определена степен на латерална девиация на гръбначния стълб над 5⁰, а 9-ма имат адолесцентна идиопатична сколиоза над 15⁰. Резултатите показват: 6 RR хомозиготи (24%), 11 RX хетерозиготи (44%) и 8 XX (32%) хомозиготи. Честотата на R алела е 46%, а на X алела е 54%, т.е. близка до популационната [190]. До момента не са провеждани други проучвания.

Асоциацията в отделните подгрупи беше проучена при генотипен (кододоминантен, доминантен и рецесивен модел) и алелен модел на генно влияние (таблица 4.16 и 4.17).

Таблица 4.16. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти и контроли (case-control study)

Подгрупа	Модел	Генотип, Алел	p (χ^2 -тест)	OR [95% CI]
Обща група (n ₁ =105, n ₂ =210)	Кододоминантен	RR vs. XX	0.2	0.65 [0.33-1.26]
	Доминантен	RR vs. RX + XX	0.68	0.90 [0.55-1.47]
	Рецесивен	RR + RX vs. XX	0.14	0.64 [0.35-1.16]
	Алелен	R vs. X	0.28	0.83 [0.59-1.16]
АИС (n ₁ =78, n ₂ =210)	Кододоминантен	RR vs. XX	0.11	0.55 [0.27-1.14]
	Доминантен	RR vs. RX + XX	0.5	0.83 [0.48-1.43]
	Рецесивен	RR + RX vs. XX	0.07	0.56 [0.29-1.06]
	Алелен	R vs. X	0.15	0.76 [0.52-1.10]
ЮИС (n ₁ =23, n ₂ =210)	Кододоминантен	RR vs. XX	0.35*	2.23 [0.47-10.62]
	Доминантен	RR vs. RX + XX	0.37*	1.52 [0.64-3.61]
	Рецесивен	RR + RX vs. XX	0.54*	1.89 [0.42-8.45]
	Алелен	R vs. X	0.34*	1.45 [0.75-2.80]
Фамилни случаи (n ₁ =28, n ₂ =210)	Кододоминантен	RR vs. XX	0.76*	0.73 [0.23-2.34]
	Доминантен	RR vs. RX + XX	0.68*	0.79 [0.34-1.82]
	Рецесивен	RR + RX vs. XX	0.78*	0.83 [0.29-2.33]
	Алелен	R vs. X	0.66*	0.85 [0.48-1.49]
Спорадични случаи (n ₁ =77, n ₂ =210)	Кододоминантен	RR vs. XX	0.21	0.63 [0.31-1.30]
	Доминантен	RR vs. RX + XX	0.84	0.95 [0.55-1.63]
	Рецесивен	RR + RX vs. XX	0.11	0.59 [0.31-1.13]
	Алелен	R vs. X	0.31	0.82 [0.57-1.20]
Cobb >40° (n ₁ =84, n ₂ =210)	Кододоминантен	RR vs. XX	0.22	0.65 [0.32-1.30]
	Доминантен	RR vs. RX + XX	0.92	1.02 [0.61-1.72]
	Рецесивен	RR + RX vs. XX	0.08	0.58 [0.31-1.08]
	Алелен	R vs. X	0.37	0.85 [0.59-1.22]
Cobb <40° (n ₁ =21, n ₂ =210)	Кододоминантен	RR vs. XX	0.69*	0.68 [0.15-2.99]
	Доминантен	RR vs. RX + XX	0.24*	0.52 [0.18-1.47]
	Рецесивен	RR + RX vs. XX	1*	1.08 [0.30-3.88]
	Алелен	R vs. X	0.51*	0.77 [0.41-1.45]
Мъже (n ₁ =19, n ₂ =38)	Кододоминантен	RR vs. XX	0.23*	0.32 [0.06-1.70]
	Доминантен	RR vs. RX + XX	0.13*	0.29 [0.07-1.16]
	Рецесивен	RR + RX vs. XX	0.74*	0.75 [0.21-2.70]
	Алелен	R vs. X	0.17*	0.56 [0.25-1.22]
Жени (n ₁ =86, n ₂ =172)	Кододоминантен	RR vs. XX	0.36	0.71 [0.34-1.48]
	Доминантен	RR vs. RX + XX	0.72	1.10 [0.65-1.88]
	Рецесивен	RR + RX vs. XX	0.15	0.61 [0.31-1.20]
	Алелен	R vs. X	0.61	0.91 [0.62-1.32]

*Fisher's Exact Test (two-tailed); n₁- брой пациенти, n₂- брой контроли.

От таблица 4.16 се вижда, че генотипните и алелните честоти на *ACTN3* (R/X) не се различават съществено в общата група, както и при български пациенти с АИС и контроли (RR vs. XX, p = 0.11; R vs. X, p = 0.15, χ^2 -тест). При сравняване подгрупата на ЮИС с контролите също не беше достигната статистически значима асоциация между *ACTN3* (R/X) и патологичния фенотип (RR vs. XX, p = 0.35; R vs. X, p = 0.34, Fisher's Exact Test).

В подгрупата на фамилните случаи генотипните и алелните честоти на *ACTN3* (R/X) бяха сравними с тези на контролите (RR vs. XX, p = 0.76; R vs. X, p = 0.66, Fisher's Exact Test). Следователно, полиморфизмът не може да бъде свързан с фамилната история на идиопатичната сколиоза. При сравняване на генотипните и алелните честоти на спорадичните случаи и контролите също не беше отчетена статистически значима разлика (RR vs. XX, p = 0.21; R vs. X, p = 0.31, χ^2 -тест).

В подгрупата на прогресивната сколиоза, където ъгълът на Cobb е над 40⁰, генотипните и алелните честоти на *ACTN3* (R/X) бяха сравними с тези на контролите (RR vs. XX, p = 0.22; R vs. X, p = 0.37, χ^2 -тест). Следователно, този полиморфизъм не може да бъде обсъждан като самостоятелен фактор с модифициращо действие. Резултатите са сходни при сравняване на пациенти с ъгъл на Cobb <40⁰ с контроли (RR vs. XX, p = 0.69; R vs. X, p = 0.51, Fisher's Exact Test).

При разделяне на пациентите и контролите по пол, сред момчетата не се наблюдаваше статистически значима асоциация между *ACTN3* (R/X) и клиничния фенотип (RR vs. XX, p = 0.36; R vs. X, p = 0.61, χ^2 -тест), както и при момчетата (RR vs. XX, p = 0.23; R vs. X, p = 0.17, Fisher's Exact Test).

Таблица 4.17. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти (case-only study)

Подгрупа	Модел	Генотип, Алел	p (χ^2 -тест)	OR [95% CI]
Cobb >40⁰ Корсетолечение/без корсетолечение (n₁=49, n₂=34)	Кодоминантен	RR vs. XX	0.26	1.91 [0.61-5.97]
	Доминантен	RR vs. RX + XX	0.33	1.57 [0.63-3.91]
	Рецесивен	RR + RX vs. XX	0.35	1.63 [0.59-4.48]
	Алелен	R vs. X	0.21	1.49 [0.80-2.78]
Торакална/ тораколумбална+лумбална първична крива (n₁=62, n₂=43)	Кодоминантен	RR vs. XX	0.23	1.91 [0.66-5.56]
	Доминантен	RR vs. RX + XX	0.19	1.75 [0.76-4.03]
	Рецесивен	RR + RX vs. XX	0.45	1.43 [0.56-3.63]
	Алелен	R vs. X	0.18	1.46 [0.84-2.55]
Тораколумбална/ торакална+лумбална първична крива (n₁=31, n₂=74)	Кодоминантен	RR vs. XX	0.22	0.50 [0.16-1.54]
	Доминантен	RR vs. RX + XX	0.39	0.67 [0.27-1.66]
	Рецесивен	RR + RX vs. XX	0.25	0.57 [0.22-1.50]
	Алелен	R vs. X	0.21	0.68 [0.38-1.24]
Лумбална/ тораколумбална+торакална първична крива (n₁=12, n₂=93)	Кодоминантен	RR vs. XX	1*	0.93 [0.14-6.01]
	Доминантен	RR vs. RX + XX	0.53*	0.58 [0.15-2.28]
	Рецесивен	RR + RX vs. XX	0.73*	1.46 [0.30-7.18]
	Алелен	R vs. X	0.83*	0.89 [0.38-2.09]

*Fisher's Exact Test (two-tailed)

От таблица 4.17 се вижда, че няма статистически значими разлики между пациенти с прогресивна сколиоза при групиране в зависимост от проведеното корсетолечение и между пациенти, групирани според типа на кривата (p > 0.05, χ^2 -тест, Fisher's Exact Test).

В заключение, този функционален полиморфен вариант на *ACTN3* няма предразполагащ или модифициращ ефект при български пациенти с идиопатична сколиоза и не може да бъде свързан с начало на заболяването, пол, фамилна история, тип на кривата и изход от корсетолечението. Резултатите, наблюдавани при сравняване на пациенти с АИС с контроли (RR vs. RX + XX, p=0.07, χ^2 -тест) и на пациенти с прогресивна сколиоза с контроли (RR vs. RX + XX, p=0.08, χ^2 -тест), при рецесивен модел на генно влияние, не изключват потенциалната роля на този полиморфизъм в етиопатогенезата на идиопатичната сколиоза и предполагат разширени популационни проучвания за потвърждаване на настоящите резултати.

2.3.5. Костен морфогенен протеин-4 - BMP4 (rs4898820, T/G)

Честотата на функционалния полиморфизъм *BMP4* (rs4898820 T/G) беше проучена в групата като цяло и в отделните подгрупи от пациенти с идиопатична сколиоза и беше сравнена с тази на неродствени индивиди без клинични белези на сколиоза (case-control study) или с други подгрупи от пациенти (case-only study). Асоциацията в отделните подгрупи беше проучена при генотипен (кододоминантен, доминантен и рецесивен) и алелен модел.

Генотипните и алелните честоти на *BMP4* (rs4898820 T/G) и анализ на равновесието по Hardy-Weinberg (HWE) са представени в таблица 4.18.

Таблица 4.18. Разпределение на генотипните честоти при пациенти и контроли.

Ген Полиморфизъм	Група	Случаи, N (%)			HWE		Контроли, N (%)			HWE	
		TT	TG	GG	χ^2	p	TT	TG	GG	χ^2	p
<i>BMP4</i> (rs4898820, T/G)	Обща група	32 (30.5)	53 (50.5)	20 (19.0)	0.06	0.81	53 (25.3)	116 (55.2)	41 (19.5)	2.47	0.12
	Мъже	9 (47.4)	6 (31.6)	4 (21.0)	1.96	0.16	13 (34.2)	17 (44.7)	8 (21.1)	0.3	0.58
	Жени	23 (26.7)	47 (54.7)	16 (18.6)	0.87	0.35	40 (23.3)	99 (57.5)	33 (19.2)	4.0	0.05

Полиморфизмът показва съответствие със закона на Hardy-Weinberg. Генотипните и алелните честоти на *BMP4* (rs4898820 T/G) не се различаваха съществено при пациенти и контроли (TT vs. TG vs. GG, $p = 0.6$ и T vs. G, $p = 0.5$, χ^2 -тест).

Първоначално, Morocz et al. (2011) не откриват единична асоциация между *BMP4* (rs4898820, локализиран в 5'-края на гена) и предразположението към АИС при унгарски пациенти, но изследват взаимодействието между *BMP4* (rs4898820 T/G) и друг функционален полиморфизъм - *MMP3* (rs3025058 5A/6A) и установяват, че OR за следните генотипни комбинации: GG-5A/5A, GG-5A/6A, TT-6A/6A, GT-5A/5A, GT-5A/6A, GT-6A/6A са значително повишени (OR от 5.89 до 7.8). При взаимодействие между *BMP4* (rs4898820 T/G) и друг функционален полиморфизъм - *Lep* (rs7799039 G/A) генотипната комбинация GT-AA е свързана с повишена стойност на OR – 5.42 (95% CI: 1.20-24.52), а при анализ на генотипните комбинации между *BMP4* (rs4898820 T/G) и друг функционален полиморфизъм *MTNR1B* (rs4753426 T/C) е установена повишена стойност на OR – 4.11 (95% CI: 1.07-15.71) за генотипната комбинация CT-GT [93].

В подгрупата на АИС генотипните и алелните честоти на *BMP4* (rs4898820 T/G) бяха сравними при български пациенти и контроли (TT vs. GG, $p = 0.6$ и T vs. G, $p = 0.5$, χ^2 -тест). Тези резултати потвърждават липсата на асоциация между *BMP4* (rs4898820 T/G) и АИС, докладвана от Morocz et al. (2011) при унгарски пациенти [93]. При сравняване подгрупата на ЮИС с контролите също не беше достигната статистически значима асоциация между *BMP4* (rs4898820 T/G) и патологичния фенотип ($p > 0.05$, Fisher's Exact Test).

В подгрупата на фамилен случаи генотипните и алелните честоти на *BMP4* (rs4898820 T/G) не се различаваха съществено от тези на контролите ($p > 0.05$, Fisher's Exact Test). Следователно, полиморфизмът не може да бъде свързан с фамилен история на идиопатичната сколиоза. При спорадичните случаи връзката също не беше значима ($p > 0.05$, χ^2 -тест). Morocz et al. (2011) снемат фамилен анамнез и изследват родственици от първа степен, но не съобщават за връзка между полиморфизма и фамилен история на идиопатичната сколиоза [93].

В подгрупата на прогресивната сколиоза, където ъгълът на Cobb е над 40°, генотипните и алелните честоти на *BMP4* (rs4898820 T/G) бяха сравними с тези на контролите ($p > 0.05$, χ^2 -тест). Тези резултати потвърждават липсата на асоциация, докладвана при унгарски пациенти с прогресивна сколиоза [93]. Следователно, този полиморфизъм не може да бъде обсъждан като самостоятелен фактор с модифициращо действие върху патологичния фенотип, асоцииран с бърза прогресия на деформацията сред българските пациенти. В подгрупата на непрогресивната и бавнопрогресивната сколиоза връзката също не беше значима ($p > 0.05$, Fisher's Exact Test).

След разделяне на пациентите и контролите по пол, сред момчетата не се наблюдаваше статистически значима асоциация между *BMP4* (rs4898820 T/G) и клиничния фенотип ($p > 0.05$, χ^2 -тест). При момчетата също не се наблюдаваше статистически значима асоциация между *BMP4* (rs4898820 T/G) и идиопатичната сколиоза ($p > 0.05$, Fisher's Exact Test). Следователно, полиморфизмът не може да бъде асоцииран с пола. Odds ratios в отделните подгрупи са представени на таблица 4.19.

Таблица 4.19. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти и контроли (case-control study)

Подгрупа	Модел	Генотип, Алел	p (χ^2 -тест)	OR [95% CI]
Обща група (n ₁ =105, n ₂ =210)	Кодоминантен	TT vs. GG	0.54	1.24 [0.62-2.47]
	Доминантен	TT vs. GT + GG	0.32	1.30 [0.77-2.18]
	Рецесивен	TT + GT vs. GG	0.92	1.03 [0.57-1.87]
	Алелен	T vs. G	0.5	1.12 [0.80-1.57]
АИС (n ₁ =78, n ₂ =210)	Кодоминантен	TT vs. GG	0.12	1.90 [0.84-4.27]
	Доминантен	TT vs. GT + GG	0.11	1.57 [0.90-2.75]
	Рецесивен	TT + GT vs. GG	0.29	1.48 [0.72-3.05]
	Алелен	T vs. G	0.11	1.35 [0.93-1.96]
ЮИС (n ₁ =23, n ₂ =210)	Кодоминантен	TT vs. GG	0.37*	0.55 [0.16-1.87]
	Доминантен	TT vs. GT + GG	0.81*	0.82 [0.29-2.32]
	Рецесивен	TT + GT vs. GG	0.27*	0.55 [0.21-1.44]
	Алелен	T vs. G	0.44*	0.75 [0.41-1.38]
Фамилни случаи (n ₁ =28, n ₂ =210)	Кодоминантен	TT vs. GG	0.35*	2.32 [0.59-9.12]
	Доминантен	TT vs. GT + GG	0.49*	1.40 [0.60-3.29]
	Рецесивен	TT + GT vs. GG	0.31*	2.02 [0.58-7.02]
	Алелен	T vs. G	0.32*	1.38 [0.78-2.44]
Спорадични случаи (n ₁ =77, n ₂ =210)	Кодоминантен	TT vs. GG	0.92	1.05 [0.50-2.21]
	Доминантен	TT vs. GT + GG	0.43	1.26 [0.71-2.25]
	Рецесивен	TT + GT vs. GG	0.63	0.86 [0.45-1.62]
	Алелен	T vs. G	0.82	1.04 [0.72-1.51]
Cobb >40° (n ₁ =84, n ₂ =210)	Кодоминантен	TT vs. GG	0.92	1.03 [0.49-2.15]
	Доминантен	TT vs. GT + GG	0.56	1.18 [0.67-2.09]
	Рецесивен	TT + GT vs. GG	0.71	0.89 [0.48-1.66]
	Алелен	T vs. G	0.89	1.03 [0.72-1.47]
Cobb <40° (n ₁ =21, n ₂ =210)	Кодоминантен	TT vs. GG	0.19*	3.09 [0.62-15.4]
	Доминантен	TT vs. GT + GG	0.3*	1.82 [0.72-4.64]
	Рецесивен	TT + GT vs. GG	0.38*	2.30 [0.52-10.3]
	Алелен	T vs. G	0.19*	1.61 [0.83-3.10]
Мъже (n ₁ =19, n ₂ =38)	Кодоминантен	TT vs. GG	0.73*	1.38 [0.32-6.03]
	Доминантен	TT vs. GT + GG	0.39*	1.73 [0.56-5.32]
	Рецесивен	TT + GT vs. GG	1*	1.00 [0.26-3.86]
	Алелен	T vs. G	0.55*	1.32 [0.59-2.93]
Жени (n ₁ =86, n ₂ =172)	Кодоминантен	TT vs. GG	0.67	1.19 [0.54-2.61]
	Доминантен	TT vs. GT + GG	0.54	1.20 [0.67-2.18]
	Рецесивен	TT + GT vs. GG	0.92	1.04 [0.54-2.01]
	Алелен	T vs. G	0.66	1.09 [0.75-1.57]

*Fisher's Exact Test (two-tailed); n₁- брой пациенти, n₂- брой контроли.

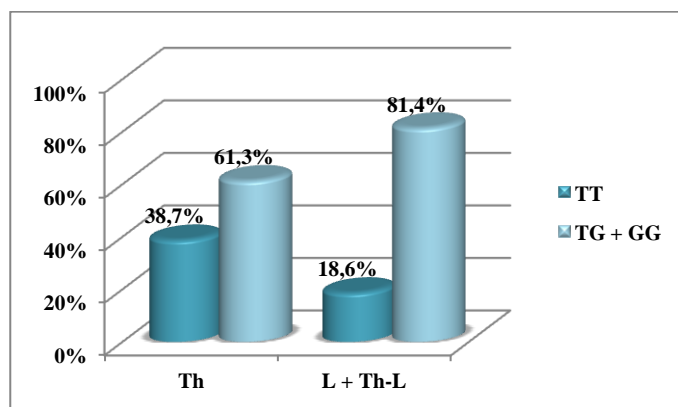
Пациентите с прогресивна сколиоза бяха разделени на две подгрупи според проведеното корсетолечение, като при сравняването им не беше открита статистически значима връзка между полиморфизма и прогресията на сколиозата ($p > 0.05$, χ^2 -тест).

При сравняване подгрупата от пациенти с торакална сколиоза със сбора от останалите пациенти – с торакална и лумбална сколиоза беше установена статистически значима връзка с изследвания полиморфизъм (TT vs. GT + GG, $p = 0.03$ при OR = 2.76 и 95% CI = 1.1-6.95). Възможно е полиморфизмът да корелира с типа на кривата. Odds ratios в отделните подгрупи са представени на таблица 4.20.

Таблица 4.20. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти (case-only study)

Подгрупа	Модел	Генотип, Ален	p (χ^2 -тест)	OR [95% CI]
Cobb >40 ⁰ Корсетолечение/без корсетолечение (n ₁ =49, n ₂ =34)	Кодоминантен	TT vs. GG	0.5	0.64 [0.18-2.31]
	Доминантен	TT vs. GT + GG	0.57	0.76 [0.29-1.97]
	Рецесивен	TT + GT vs. GG	0.6	0.74 [0.24-2.24]
	Алелен	T vs. G	0.5	0.81 [0.43-1.50]
Торакална/ тораколумбална+лумбална първична крива (n ₁ =62, n ₂ =43)	Кодоминантен	TT vs. GG	0.44	1.62 [0.48-5.46]
	Доминантен	TT vs. GT + GG	0.03	2.76 [1.10-6.95]
	Рецесивен	TT + GT vs. GG	0.55	0.73 [0.27-2.02]
	Алелен	T vs. G	0.27	1.37 [0.79-2.38]
Тораколумбална/ торакална+лумбална първична крива (n ₁ =31, n ₂ =74)	Кодоминантен	TT vs. GG	0.89	1.11 [0.29-4.19]
	Доминантен	TT vs. GT + GG	0.57	0.75 [0.28-2.03]
	Рецесивен	TT + GT vs. GG	0.62	1.32 [0.43-4.02]
	Алелен	T vs. G	0.64	0.87 [0.48-1.57]
Лумбална/ тораколумбална+торакална първична крива (n ₁ =12, n ₂ =93)	Кодоминантен	TT vs. GG	0.55*	0.29 [0.02-3.43]
	Доминантен	TT vs. GT + GG	0.1*	0.18 [0.02-1.47]
	Рецесивен	TT + GT vs. GG	1*	1.2 [0.24-5.96]
	Алелен	T vs. G	0.3*	0.64 [0.27-1.50]

*Fisher's Exact Test (two-tailed)



Фигура 4.20. Доминантен модел на генно влияние TT/ (TG+GG) според типа на основната крива (Th-L – тораколумбална, Th - торакална, L - лумбална крива).

В заключение, този функционален полиморфен вариант няма предразполагащ или модифициращ ефект сред българските пациенти с идиопатична сколиоза и не може да бъде свързан с начало на заболяването, пол, фамилна история и изход от корсетолечението. В същото време хомозиготният генотип TT се среща значително по-често при торакален тип първична крива и е потенциален второстепенен модифициращ фактор при веднъж отключена деформация. Тези резултати не изключват потенциалната роля на други полиморфизми на гена *VMP4* в етиопатогенезата на идиопатичната сколиоза.

2.3.6. Лептин – *Lep* (rs7799039, G/A)

Честотата на функционалния полиморфизъм *Lep* (rs7799039 G/A) беше проучена в групата като цяло и в отделните подгрупи от пациенти с идиопатична сколиоза и беше сравнена с тази на неродствени индивиди без клинични белези на сколиоза (case-control study) или с други подгрупи от пациенти (case-only study). Асоциацията в отделните подгрупи беше проучена при генотипен (кододоминантен, доминантен и рецесивен) и алелен модел. Генотипните и алелните честоти на *Lep* (rs7799039 G/A) и анализ на равновесието по Hardy-Weinberg (HWE) са представени в таблица 4.21.

Таблица 4.21. Разпределение на генотипните честоти при пациенти и контроли.

Ген Полиморфизъм	Група	Случаи, N (%)			HWE		Контроли, N (%)			HWE	
		GG	GA	AA	χ^2	p	GG	GA	AA	χ^2	p
<i>Lep</i> (rs779903, G/A)	Обща група	27 (25.7)	50 (47.6)	28 (26.7)	0.24	0.63	43 (20.5)	103 (49.0)	64 (30.5)	0.02	0.89
	Мъже	6 (31.6)	8 (42.1)	5 (26.3)	0.46	0.5	11 (28.9)	15 (39.5)	12 (31.6)	1.68	0.2
	Жени	21 (24.4)	42 (48.8)	23 (26.8)	0.04	0.83	32 (18.6)	88 (51.2)	52 (30.2)	0.24	0.62

Полиморфизмът показва съответствие със закона на Hardy-Weinberg. Генотипните и алелните честоти на *Lep* (rs7799039 G/A) не се различаваха съществено при пациенти и контроли (GG vs. GA vs. AA, $p = 0.54$ и G vs. A, $p = 0.28$, χ^2 -тест).

Асоциативното проучване на Mórocz et al. (2011) е първото, търсещо връзка между функционалния полиморфизъм G-2548A на лептиновия ген и предразположението към идиопатична сколиоза. Учените не откриват значима единична асоциация между *Lep* (rs7799039 G/A) и АИС, но изследват взаимодействието между друг функционален полиморфизъм - *IL-6* (rs1800795 G/C) и *Lep* (rs7799039 G/A) и установяват, че OR на генотипната двойна хомозиготна комбинация AA-(*Lep*)-CC-(*IL-6*) е със значително повишена стойност (OR = 4.67; 95% CI: 1.24–17.60), при изследване на взаимодействието между друг функционален полиморфизъм – *BMP4* (rs4898820 T/G) и *Lep* (rs7799039 G/A), OR на генотипната комбинация GT-(*BMP4*)-AA-(*Lep*) е със значително повишена стойност (OR = 5.42; 95% CI: 1.20–24.52), при анализ на взаимодействието между друг функционален полиморфизъм – *MTNR1B* (rs4753426 T/C) и *Lep* (rs7799039 G/A), ORs на генотипните комбинации TT-(*MTNR1B*)-AA-(*Lep*) и CT-(*MTNR1B*)-AG-(*Lep*) са повишени (OR = 5.48; 95% CI: 1.20–20.48 и OR = 3.26; 95% CI: 1.22–8.69, съответно) за унгарска популация [93].

Liang et al. (2012) не откриват асоциация между 6 други SNP (rs3828942 в интрон, rs75506045 в кодиращ регион, rs10954174, rs41457646 и rs11761556 в нетранслируемия 3'-край, както и още един небелязан полиморфизъм в кодиращ регион) на лептиновия ген и генетичното предразположение към развитие и по-нататъшна прогресия на АИС. Авторите установяват нормална експресия на лептиновия ген в адипоцити и остеоласти от китайски пациенти с прогресивна форма на АИС. В същото време, понижената експресия на гена за лептиновия рецептор при момичета с АИС може да доведе до понижена чувствителност към действието на лептина. Според авторите абнормният отговор на действието на лептина може да изпълнява определена роля в етиопатогенезата на АИС при китайска популация [300].

В подгрупата на АИС генотипните и алелните честоти на *Lep* (rs7799039 G/A) бяха сравними при български пациенти и контроли (GG vs. AA, $p = 0.41$ и G vs. A, $p = 0.43$, χ^2 -тест). Тези резултати потвърждават липсата на асоциация между *Lep* (rs7799039) и АИС, докладвана от Mórocz et al. (2011) при унгарски пациенти [93]. При

сравняване подгрупата на ЮИС с контролите също не беше достигната статистически значима асоциация между *Lep* (rs7799039 G/A) и патологичния фенотип ($p > 0.05$, Fisher's Exact Test).

В подгрупата на фамилните случаи генотипните и алелните честоти на *Lep* (rs7799039 G/A) не се различаваха съществено от тези на контролите ($p > 0.05$, Fisher's Exact Test). Следователно, полиморфизмът не може да бъде свързан с фамилната история на идиопатичната сколиоза. При спорадичните случаи връзката също не беше значима ($p > 0.05$, χ^2 -тест). Mrocz et al. (2011) снемат фамилна анамнеза и изследват родственици от първа степен, но не съобщават за връзка между полиморфизма и фамилната история на идиопатичната сколиоза [93].

В подгрупата на прогресивната сколиоза, генотипните и алелните честоти на *Lep* (rs7799039 G/A) бяха сравними с тези на контролите ($p > 0.05$, χ^2 -тест). Тези резултати потвърждават липсата на асоциация, докладвана при унгарски пациенти с прогресивна сколиоза [93]. Следователно, този полиморфизъм не може да бъде обсъждан като самостоятелен фактор с модифициращо действие при българските пациенти. В подгрупата на непрогресивната и бавнопрогресивната сколиоза връзката също не беше значима ($p > 0.05$, Fisher's Exact Test).

След разделяне на пациентите и контролите по пол, не се наблюдаваше статистически значима асоциация между *Lep* (rs7799039 G/A) и идиопатичната сколиоза ($p > 0.05$, χ^2 -тест, Fisher's Exact Test). Следователно, полиморфизмът не може да бъде асоцииран с пола.

Odds ratios в отделните подгрупи са представени на таблица 4.22.

Таблица 4.22. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти и контроли (case-control study)

Подгрупа	Модел	Генотип, Алел	p (χ^2 -тест)	OR [95% CI]
Обща група (n ₁ =105, n ₂ =210)	Кодоминантен	GG vs. AA	0.28	1.44 [0.75-2.76]
	Доминантен	GG + GA vs. AA	0.48	1.21 [0.71-2.03]
	Рецесивен	GG vs. GA + AA	0.29	1.34 [0.77-2.33]
	Алелен	G vs. A	0.28	1.20 [0.86-1.67]
АИС (n ₁ =78, n ₂ =210)	Кодоминантен	GG vs. AA	0.41	1.35 [0.66-2.78]
	Доминантен	GG + GA vs. AA	0.71	1.12 [0.63-1.98]
	Рецесивен	GG vs. GA + AA	0.35	1.34 [0.73-2.46]
	Алелен	G vs. A	0.43	1.16 [0.80-1.68]
ЮИС (n ₁ =23, n ₂ =210)	Кодоминантен	GG vs. AA	0.52*	1.79 [0.51-6.22]
	Доминантен	GG + GA vs. AA	0.48*	1.58 [0.56-4.44]
	Рецесивен	GG vs. GA + AA	0.59*	1.37 [0.51-3.69]
	Алелен	G vs. A	0.44*	1.33 [0.72-2.45]
Фамилни случаи (n ₁ =28, n ₂ =210)	Кодоминантен	GG vs. AA	0.14	2.38 [0.73-7.77]
	Доминантен	GG + GA vs. AA	0.17	2.02 [0.73-5.54]
	Рецесивен	GG vs. GA + AA	0.33	1.55 [0.64-3.77]
	Алелен	G vs. A	0.14	1.52 [0.87-2.66]
Спорадични случаи (n ₁ =77, n ₂ =210)	Кодоминантен	GG vs. AA	0.57	1.23 [0.60-2.53]
	Доминантен	GG + GA vs. AA	0.92	1.03 [0.58-1.82]
	Рецесивен	GG vs. GA + AA	0.44	1.27 [0.69-2.36]
	Алелен	G vs. A	0.61	1.10 [0.76-1.59]
Cobb >40° (n ₁ =84, n ₂ =210)	Кодоминантен	GG vs. AA	0.55	1.24 [0.61-2.52]
	Доминантен	GG + GA vs. AA	0.75	1.10 [0.63-1.91]
	Рецесивен	GG vs. GA + AA	0.53	1.21 [0.66-2.22]
	Алелен	G vs. A	0.57	1.11 [0.78-1.59]
Cobb <40° (n ₁ =21, n ₂ =210)	Кодоминантен	GG vs. AA	0.2*	2.60 [0.72-9.44]
	Доминантен	GG + GA vs. AA	0.33*	1.86 [0.60-5.76]
	Рецесивен	GG vs. GA + AA	0.26*	1.94 [0.74-5.11]
	Алелен	G vs. A	0.15*	1.63 [0.86-3.09]

Мъже (n ₁ =19, n ₂ =38)	Кодоминантен	GG vs. AA	1*	1.31 [0.31-5.53]
	Доминантен	GG + GA vs. AA	0.77*	1.29 [0.38-4.42]
	Рецесивен	GG vs. GA + AA	1*	1.13 [0.34-3.74]
	Алелен	G vs. A	0.84*	1.17 [0.54-2.55]
Жени (n ₁ =86, n ₂ =172)	Кодоминантен	GG vs. AA	0.29	1.48 [0.71-3.10]
	Доминантен	GG + GA vs. AA	0.56	1.19 [0.67-2.12]
	Рецесивен	GG vs. GA + AA	0.28	1.41 [0.76-2.64]
	Алелен	G vs. A	0.32	1.21 [0.84-1.74]

*Fisher's Exact Test (two-tailed); n₁- брой пациенти, n₂- брой контроли.

Пациентите с прогресивна сколиоза бяха разделени на две подгрупи според проведеното корсетолечение, като при сравняването им не беше открита статистически значима връзка между полиморфизма и прогресията на сколиозата ($p > 0.05$, χ^2 -тест).

При групиране на пациентите в зависимост от типа на кривата също не беше установена статистически значима връзка с изследвания полиморфизъм.

Odds ratios в отделните подгрупи са представени на таблица 4.23.

Таблица 4.23. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти (case-only study)

Подгрупа	Модел	Генотип, Алел	p (χ^2 -тест)	OR [95% CI]
Cobb >40° Корсетолечение/без корсетолечение (n ₁ =49, n ₂ =34)	Кодоминантен	GG vs. AA	0.65	1.33 [0.39-4.52]
	Доминантен	GG + GA vs. AA	0.92	1.04 [0.40-2.73]
	Рецесивен	GG vs. GA + AA	0.53	1.39 [0.49-3.96]
	Алелен	G vs. A	0.66	1.15 [0.62-2.13]
Торакална/ тораколумбална+лумбална първична крива (n ₁ =62, n ₂ =43)	Кодоминантен	GG vs. AA	0.22	0.50 [0.16-1.53]
	Доминантен	GG + GA vs. AA	0.12	0.48 [0.19-1.22]
	Рецесивен	GG vs. GA + AA	0.67	0.82 [0.34-2.00]
	Алелен	G vs. A	0.22	0.71 [0.41-1.23]
Тораколумбална/ торакална+лумбална първична крива (n ₁ =31, n ₂ =74)	Кодоминантен	GG vs. AA	0.5	1.50 [0.46-4.84]
	Доминантен	GG + GA vs. AA	0.54	1.36 [0.51-3.63]
	Рецесивен	GG vs. GA + AA	0.62	1.27 [0.50-3.26]
	Алелен	G vs. A	0.49	1.23 [0.68-2.24]
Лумбална/ тораколумбална+торакална първична крива (n ₁ =12, n ₂ =93)	Кодоминантен	GG vs. AA	0.35*	3.38 [0.33-34.7]
	Доминантен	GG + GA vs. AA	0.17*	4.5 [0.55-36.58]
	Рецесивен	GG vs. GA + AA	1*	0.96 [0.24-3.84]
	Алелен	G vs. A	0.39*	1.49 [0.63-3.53]

*Fisher's Exact Test (two-tailed)

В заключение, този функционален полиморфен вариант няма предразполагащ или модифициращ ефект сред българските пациенти с идиопатична сколиоза и не може да бъде свързан с начало на заболяването, пол, фамилна история, тип на кривата и изход от корсетолечението. Тези резултати не изключват потенциалната роля на други полиморфизми на лептиновия ген и неговия рецептор в етиопатогенезата на идиопатичната сколиоза.

2.3.7. Матрили-1 - MATN1 (rs1149048, A/G)

Честотата на промоторния полиморфизъм MATN1 (rs1149048 A/G) беше проучена в групата като цяло и в отделните подгрупи от пациенти с идиопатична сколиоза и беше сравнена с тази на неродствени индивиди без клинични белези на сколиоза (case-control study) или с други подгрупи от пациенти (case-only study). Асоциацията в отделните подгрупи беше проучена при генотипен (кодоминантен, доминантен и рецесивен) и алелен модел.

Полиморфизмът показва съответствие със закона на Hardy-Weinberg. При сравняване на генотипните и алелните честоти на *MATN1* (rs1149048 A/G) между общата извадка от пациенти и контроли не се наблюдаваха статистически значими разлики (GG vs. AG vs. AA, $p = 0.43$ и G vs. A, $p = 0.17$, χ^2 -тест).

Генотипните и алелните честоти на *MATN1* (rs1149048 A/G) и анализ на равновесието по Hardy-Weinberg (HWE) са представени в таблица 4.24.

Таблица 4.24. Разпределение на генотипните честоти при пациенти и контроли.

Ген Полиморфизъм	Група	Случаи, N (%)			HWE		Контроли, N (%)			HWE	
		AA	AG	GG	χ^2	p	AA	AG	GG	χ^2	p
<i>MATN1</i> (rs1149048 A/G)	Обща група	35 (33.3)	45 (42.9)	25 (23.8)	1.91	0.17	83 (39.5)	88 (41.9)	39 (18.6)	3.2	0.07
	Мъже	3 (15.8)	10 (52.6)	6 (31.6)	0.12	0.73	15 (39.5)	17 (44.7)	6 (15.8)	0.1	0.75
	Жени	32 (37.2)	35 (40.7)	19 (22.1)	2.4	0.12	68 (39.5)	71 (41.3)	33 (19.2)	3.31	0.07

Генът за матрилин-1 е предложен като кандидат-ген за идиопатична сколиоза на базата на миши модели на сколиоза и кифоза [301, 302]. Тези модели дават яснота относно патогенетичните механизми на гръбначните деформации и подпомагат селекцията на кандидат-гени. Четири типа дефекти показват връзка с повечето случаи на сколиоза при мишки: мутации, водещи до нарушения в междуклетъчната комуникация, вътреклетъчната сигнална трансдукция, синтезата на матриксни протеини и техния метаболизъм [301].

Първото проучване на полиморфен вариант на *MATN1* показва връзка между интрагенния микросателитен полиморфизъм в 3'-края на *MATN1* и идиопатичната сколиоза при хора в популация от 81 триоси от италиански произход. При пациенти с тежка, умерена и лека форма на идиопатична сколиоза (инфантилна, ювенилна и адолесцентна) и техните родители (с или без сколиоза) са идентифицирани 3 алела, съдържащи 103 bp, 101 bp и 99 bp. Генотипирането е осъществено с фрагментен анализ. Анализът за скаченост показва преференциална трансмисия на алела с дължина от 103 bp ($\text{Chi-square} = 5.058$, $\text{df} = 1$, $P = 0.024$) и предполага връзка на гена за матрилин-1 с фамилната идиопатична сколиоза според авторите на проучването [109].

В китайска популация, Chen et al. (2009) проучват асоциацията между 7 SNPs в *MATN1* и риска от развитие на АИС в група от 419 пациенти и 460 здрави контроли с метода на PCR-RFLP. Авторите установяват, че полиморфният G алел на *MATN1* (rs1149048 A/G) е предразполагащ фактор за АИС ($P = 0.0027$, $\text{OR} = 1.34$, 95% CI: 1.11-1.62), като индивидите с хомозиготния генотип GG притежават по-висок риск от развитие на АИС в сравнение с останалите пациенти с АИС (GG vs. AA+AG, $P = 0.0008$, $\text{OR} = 1.61$, 95% CI: 1.22-2.12). Полиморфизмът *MATN1* (rs1149048 A/G) е свързан също и с тежестта на АИС при китайци, като при пациенти с хомозиготен GG генотип е измерен значително по-голям ъгъл на Cobb ($P = 0.002$) [110].

В корейска популация, Baе et al. (2012) проучват връзката между *MATN1* и АИС при генотипиране на 166 пациенти и 126 контроли, като свързват *MATN1* (rs1065755 A/G) с модела на кривата при сравнение между пациенти и контроли. Алелът А на SNP rs1065755 е асоцииран с по-висок риск от АИС в сравнение с алела G при изследване на генотип-фенотипните корелации ($P = 0.029$). В допълнение, честотата на алел А на SNP rs1065755 при пациенти с АИС и двойни първични криви е по-висока ($P = 0.021$, $\text{ORs} = 2.56$, 95% CI = 1.12-5.83). Хаплотипният анализ показва, че честотата на GATT (31.3%) при АИС с две първични криви е по-висока в сравнение с контроли (15.2%)

($P = 0.024$, $ORs = 2.54$ within 95% $CI = 1.11-5.84$). В заключение, *MATN1* (rs1065755 A/G) е асоцииран с АИС при корейски пациенти [111].

През 2012 г. Yilmaz et al. изследват 53 пациенти и 54 здрави възрастни доброволци от турски произход в търсене на връзка между АИС и *MATN1* (rs1149048 A/G). Авторите не установяват асоциация между полиморфизма и началото, прогресията и фамилната история на АИС при турски пациенти [171].

През 2014 г. Zhang et al. провеждат мета-анализ на предишни проучвания за установяване връзката на *MATN1* (rs1149048 A/G) с АИС, като оценяват асоциациите при различни популации. Мета-анализът е проведен с помощта на софтуер STATA 12.0 за изчисляване стойността на OR и 95 % CI. Включени са общо 1436 пациенти с АИС и 1879 контроли. Резултатите показват, че алел G на *MATN1* (rs1149048 A/G) е свързан с повишен риск от развитие на АИС [$OR = 1.13$, 95 % $CI (1.02-1.25)$, $P = 0.023$]. Хомозиготният генотип (GG vs. GA + AA) също се явява рисков фактор за възникване на АИС. Тези резултати са валидни за азиатска, но не и за кавказка популация. Заключение на авторите е, че връзката между *MATN1* (rs1149048 A/G) и идиопатичната сколиоза, в частност АИС, трябва да бъде проучена и при други популации и етнически групи [160].

В подгрупата на АИС генотипните и алелните честоти на *MATN1* (rs1149048 A/G) бяха сравними при български пациенти и контроли (GG vs. AA, $p = 0.43$ и G vs. A, $p = 0.46$, χ^2 -тест). Тези резултати потвърждават липсата на асоциация между *MATN1* (rs1149048 A/G) и АИС, докладвана от Yilmaz et al. (2012) при турски пациенти [171]. При сравняване подгрупата на ЮИС с контролите също не беше достигната статистически значима асоциация между *MATN1* (rs1149048 A/G) и патологичния фенотип (GG vs. AA, $p = 0.18$ и G vs. A, $p = 0.11$, Fisher's Exact Test). Следователно, изследваният полиморфизъм не може да бъде свързан с възрастта на поява на идиопатичната сколиоза.

В подгрупата на фамилните случаи, генотипните и алелните честоти на *MATN1* (rs1149048 A/G) се различаваха значително от тези на контролната група (GG vs. AA, $p = 0.01$ и G vs. A, $p = 0.006$, Fisher's Exact Test). Хомозиготният GG генотип се свързва с 1.9 пъти по-висок риск, а G алелът - с 1.5 пъти по-висок риск от идиопатична сколиоза при положителна фамилна анамнеза (GG vs. AG + AA, $RR=1.92$, 95% $CI: 1.09-3.41$; G vs. A, $RR=1.49$, 95% $CI: 1.16-1.91$). Следователно, полиморфизмът *MATN1* (rs1149048 A/G) може да бъде свързан с фамилната история на идиопатичната сколиоза. Такава връзка на гена за матрилин-1 с фамилната идиопатична сколиоза предполага и изследването на Montanaro et al. (2006) в италианска популационна извадка [109].

В подгрупата на прогресивната сколиоза, където ъгълът на Cobb е над 40° , генотипните и алелните честоти на *MATN1* (rs1149048 A/G) бяха сравними с тези на контролите ($p > 0.05$, χ^2 -тест). Тези резултати потвърждават липсата на асоциация, докладвана при турски пациенти с прогресивна сколиоза [171]. Следователно, този полиморфизъм не може да бъде обсъждан като фактор, асоцииран с бърза прогресия на деформацията сред българските пациенти.

В подгрупата на непрогресивната и бавнопрогресивната сколиоза обаче, беше наблюдавана статистически значима асоциация с полиморфния вариант на *MATN1* по кододоминантен модел (GG vs. AA, $p = 0.02$ и G vs. A, $p = 0.01$, Fisher's Exact Test) и по рецесивен модел (GG vs. AG + AA, $p=0.01$, $OR=3.29$, 95% $CI: 1.30-8.35$). Хомозиготният GG генотип се свързва с 2.3 пъти по-висок риск, а полиморфният G алел – с 1.5 пъти по-висок риск от развитие на бавнопрогресивна и непрогресивна форма на идиопатична сколиоза (среден ъгъл на Cobb $22.1 \pm 6.3^{\circ}$) при българските пациенти (GG vs. AG + AA, $p=0.01$, $RR=2.31$, 95% $CI: 1.31-4.08$; G vs. A, $p=0.01$, $RR=1.51$, 95% $CI: 1.14-1.98$).

След разделяне на пациентите и контролите по пол, сред момчетата не се наблюдаваше статистически значима асоциация между *MATN1* (rs1149048 A/G) и клиничния фенотип ($p > 0.05$, χ^2 -тест). При момчетата също не беше достигнато ниво на значимост $p < 0.05$ (Fisher's Exact Test), но беше отчетена повишена стойност на $OR=2.23$ при 95% CI: 1.01-4.93. Възможно е полиморфизмът да бъде асоцииран с пола, но е необходимо разширено проучване за установяване на такава зависимост.

Odds ratios в отделните подгрупи са представени на таблица 4.25.

Таблица 4.25. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти и контроли (case-control study)

Подгрупа	Модел на генно влияние	Генотип, Алел	p (χ^2 -тест)	OR [95% CI]
Обща група ($n_1=105$, $n_2=210$)	Кодоминантен	GG vs. AA	0.25	1.52 [0.80-2.88]
	Доминантен	GG + AG vs. AA	0.28	1.31 [0.80-2.14]
	Рецесивен	GG vs. AG + AA	0.28	1.37 [0.78-2.42]
	Алелен	G vs. A	0.17	1.26 [0.90-1.77]
АИС ($n_1=78$, $n_2=210$)	Кодоминантен	GG vs. AA	0.43	1.32 [0.66-2.66]
	Доминантен	GG + AG vs. AA	0.72	1.10 [0.65-1.89]
	Рецесивен	GG vs. AG + AA	0.39	1.32 [0.70-2.47]
	Алелен	G vs. A	0.46	1.15 [0.79-1.67]
ЮИС ($n_1=23$, $n_2=210$)	Кодоминантен	GG vs. AA	0.18*	2.55 [0.73-8.88]
	Доминантен	GG + AG vs. AA	0.11*	2.35 [0.84-6.58]
	Рецесивен	GG vs. AG + AA	0.41*	1.55 [0.57-4.18]
	Алелен	G vs. A	0.11*	1.67 [0.91-3.07]
Фамилни случаи ($n_1=28$, $n_2=210$)	Кодоминантен	GG vs. AA	0.01*	4.26 [1.36-13.3]
	Доминантен	GG + AG vs. AA	0.036*	3.01 [1.10-8.22]
	Рецесивен	GG vs. AG + AA	0.046*	2.44 [1.04-5.69]
	Алелен	G vs. A	0.006*	2.20 [1.25-3.87]
Спорадични случаи ($n_1=77$, $n_2=210$)	Кодоминантен	GG vs. AA	0.86	1.06 [0.51-2.20]
	Доминантен	GG + AG vs. AA	0.92	1.02 [0.60-1.75]
	Рецесивен	GG vs. AG + AA	0.86	1.06 [0.55-2.06]
	Алелен	G vs. A	0.86	1.03 [0.71-1.50]
Cobb >40° ($n_1=84$, $n_2=210$)	Кодоминантен	GG vs. AA	0.73	1.14 [0.55-2.32]
	Доминантен	GG + AG vs. AA	0.54	1.18 [0.70-1.99]
	Рецесивен	GG vs. AG + AA	0.92	1.03 [0.54-1.97]
	Алелен	G vs. A	0.63	1.09 [0.76-1.57]
Cobb <40° ($n_1=21$, $n_2=210$)	Кодоминантен	GG vs. AA	0.02*	3.83 [1.2-12.19]
	Доминантен	GG + AG vs. AA	0.24*	2.09 [0.74-5.93]
	Рецесивен	GG vs. AG + AA	0.01*	3.29 [1.30-8.35];
	Алелен	G vs. A	0.01*	2.25 [1.18-4.30];
Мъже ($n_1=19$, $n_2=38$)	Кодоминантен	GG vs. AA	0.1*	5.0 [0.93-26.8]
	Доминантен	GG + AG vs. AA	0.13*	3.48 [0.86-14.02]
	Рецесивен	GG vs. AG + AA	0.3*	2.46 [0.67-9.05]
	Алелен	G vs. A	0.07*	2.23 [1.01-4.93]
Жени ($n_1=86$, $n_2=172$)	Кодоминантен	GG vs. AA	0.57	1.22 [0.61-2.47]
	Доминантен	GG + AG vs. AA	0.72	1.10 [0.65-1.88]
	Рецесивен	GG vs. AG + AA	0.58	1.19 [0.63-2.25]
	Алелен	G vs. A	0.57	1.11 [0.77-1.62]

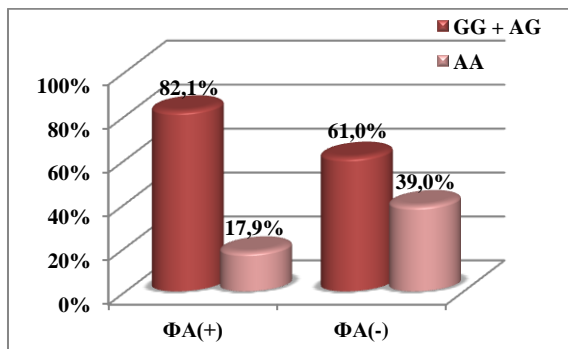
*Fisher's Exact Test (two-tailed); n_1 - брой пациенти, n_2 - брой контроли.

Асоциацията между *MATN1* (rs1149048 A/G) и фамилната и непрогресивна идиопатична сколиоза беше допълнително проучена. Фамилните случаи бяха сравнени със спорадичните случаи, прогресивните - с непрогресивните случаи, както и фамилните прогресивни - с фамилните непрогресивни случаи и непрогресивните фамилни - с непрогресивните спорадични случаи (case-only study). Във всички тези случаи се наблюдаваха сигнификантни разлики ($p < 0.05$, Fisher's Exact Test).

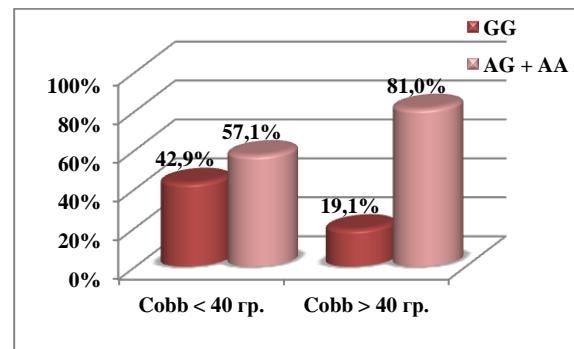
Освен това, фамилните непрогресивни случаи бяха сравнени с контролите (case-control study) и също беше отчетена статистически значима връзка между *MATN1* (rs1149048 A/G) и фамилната непрогресивна идиопатична сколиоза ($p < 0.05$, Fisher's Exact Test). Резултатите са представени на таблица 4.26.

Таблица 4.26. Проучване на асоциацията между *MATN1* (rs1149048 A/G) и фамилната непрогресивна идиопатична сколиоза.

Подгрупа	Модел на генно влияние	Генотип, Ален	p (Fisher's Exact Test)	OR [95% CI]
Фамилни/Спорадични случаи ($n_1=28, n_2=77$)	Кодоминантен	GG vs. AA	0.03	4.00 [1.16-13.8]
	Доминантен	GG + AG vs. AA	0.04	2.94 [1.01-8.56]
	Рецесивен	GG vs. AG + AA	0.12	2.30 [0.88-5.98]
	Алелен	G vs. A	0.02	2.13 [1.14-3.97]
Прогресивни/непрогресивни случаи ($n_1=84, n_2=21$)	Кодоминантен	GG vs. AA	0.07	3.38 [0.97-11.78]
	Доминантен	GG + AG vs. AA	0.44	1.78 [0.59-5.33]
	Рецесивен	GG vs. AG + AA	0.04	3.19 [1.15-8.85]
	Алелен	G vs. A	0.04	2.06 [1.03-4.10]
Фамилни непрогресивни/фамилни прогресивни случаи ($n_1=14, n_2=14$)	Кодоминантен	GG vs. AA	0.03	Infinity
	Доминантен	GG + AG vs. AA	0.04	Infinity
	Рецесивен	GG vs. AG + AA	0.24	3.67 [0.7-19.12]
	Алелен	G vs. A	0.03	4.0 [1.28-12.47]
Непрогресивни фамилни/непрогресивни спорадични случаи ($n_1=14, n_2=7$)	Кодоминантен	GG vs. AA	0.02	Infinity
	Доминантен	GG + AG vs. AA	0.001	Infinity
	Рецесивен	GG vs. AG + AA	0.64	2.5 [0.36-17.5]
	Алелен	G vs. A	0.007	7.5 [1.78-31.68]
Фамилни непрогресивни случаи/контроли ($n_1=14, n_2=210$)	Кодоминантен	GG vs. AG	0.0005	Infinity
	Доминантен	GG + AG vs. AA	0.003	Infinity
	Рецесивен	GG vs. AG + AA	0.01	4.38 [1.45-13.22]
	Алелен	G vs. A	0.0003	4.59 [1.91-11.04]



Фигура 4.21. Доминантен модел на генно влияние (GG+AG)/AA според фамилната анамнеза (ФА).



Фигура 4.22. Рецесивен модел на генно влияние GG/(AG+AA) при непрогресивна сколиоза (Cobb < 40°).

При сравняване на фамилните случаи със спорадичните случаи се вижда, че полиморфният G ален и GG генотип се срещат по-често при фамилна сколиоза (фиг. 4.21). Когато фамилните случаи се разделят на прогресивни и непрогресивни, се вижда, че няма статистически значима разлика между прогресивните фамилни случаи, прогресивните спорадични случаи и контролите. При сравняване на непрогресивните фамилни случаи с непрогресивните спорадични случаи и контролите, обаче, се открива че и в двата случая GG генотипът и G аленът се свързват с повишен риск от непрогресивна сколиоза при фамилни случаи. Това се вижда и от разликата между фамилни непрогресивни и фамилни прогресивни случаи (фиг. 4.22).

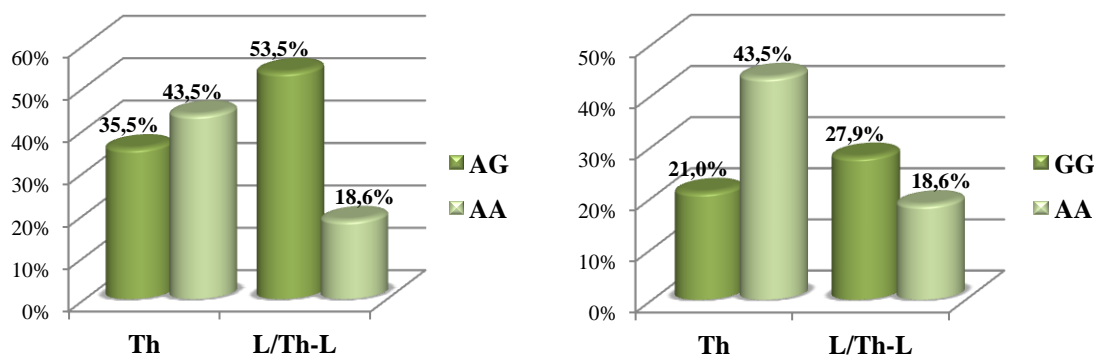
Пациентите с прогресивна сколиоза бяха разделени на две подгрупи според проведеното корсетолечение, като при сравняването им не беше открита статистически значима връзка между полиморфизма и прогресията на сколиозата ($p > 0.05$, χ^2 -тест).

При сравняване подгрупата от пациенти с торакална сколиоза със сбора от останалите пациенти – с торакална и лумбална сколиоза беше установена статистически значима връзка с изследвания полиморфизъм, но в случая - с А алела и АА генотипа. Възможно е дивият тип АА да се свързва по-често с торакална първична крива при наличие на други отключващи фактори (АА vs. АG + GГ, $p = 0.01$, RR = 2.34, 95% CI: 1.18-4.65). Odds ratios в отделните подгрупи са представени на таблица 4.27.

Таблица 4.27. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти (case-only study)

Подгрупа	Модел на генно влияние	Генотип, Алел	p (χ^2 -тест)	OR [95% CI]
Корсетолечение/без корсетолечение (n ₁ =49, n ₂ =34)	Кодоминантен	АА vs. GГ	0.38	1.73 [0.51-5.91]
	Доминантен	АА vs. АG + GГ	0.55	1.32 [0.53-3.32]
	Рецесивен	АА + АG vs. GГ	0.41	1.58 [0.53-4.72]
	Алелен	А vs. G	0.38	1.32 [0.71-2.48]
Торакална/ тораколумбална+лумбална първична крива (n ₁ =62, n ₂ =43)	Кодоминантен	АА vs. GГ АА vs. АG	0.04* 0.01*	3.12 [1.02-9.48] 3.54 [1.32-9.42]
	Доминантен	АА vs. АG + GГ	0.01*	3.38 [1.35-8.45]
	Рецесивен	АА + АG vs. GГ	0.49*	1.46 [0.59-3.60]
	Алелен	А vs. G	0.02*	1.91 [1.09-3.33]
Тораколумбална/ торакална+лумбална първична крива (n ₁ =31, n ₂ =74)	Кодоминантен	АА vs. GГ	0.13*	0.37 [0.11-1.22]
	Доминантен	АА vs. АG + GГ	0.07*	0.37 [0.14-1.02]
	Рецесивен	АА + АG vs. GГ	0.46*	0.67 [0.26-1.75]
	Алелен	А vs. G	0.09*	0.58 [0.32-1.05]
Лумбална/ тораколумбална+торакална първична крива (n ₁ =12, n ₂ =93)	Кодоминантен	АА vs. GГ	0.64*	2.25 [0.35-14.6]
	Доминантен	АА vs. АG + GГ	0.33*	0.36 [0.08-1.76]
	Рецесивен	АА + АG vs. GГ	1*	0.93 [0.23-3.74]
	Алелен	А vs. G	0.39*	0.67 [0.28-1.57]

*Fisher's Exact Test (two-tailed)



Фигура 4.23. Кодоминантен модел на генно влияние според типа на първичната крива (Th - торакална, Th-L – тораколумбална, L - лумбална крива).

В заключение, промоторният полиморфизъм *MATN1* (rs1149048 A/G) се свързва с фамилна непрогресивна сколиоза. Необходимо е разширено проучване за потвърждаване на резултатите. Идентифицирането на молекулни маркери за непрогресивна и бавнопрогресивна сколиоза би било полезно при оценка риска от прогресия на деформацията при засегнати индивиди с поне един болен родственик.

2.3.8. Матриксна металопроотеиназа-3 - MMP3 (rs3025058; -1171 5A/6A)

Честотата на функционалния полиморфизъм *MMP3* (-1171 5A/6A) беше проучена в групата като цяло и в отделните подгрупи от пациенти с идиопатична сколиоза и беше сравнена с тази на неродствени индивиди без клинични белези на сколиоза (case-control study) или с други подгрупи от пациенти (case-only study). Асоциацията в отделните подгрупи беше проучена при генотипен (кододоминантен, доминантен и рецесивен) и алелен модел.

Генотипните и алелните честоти на *MMP3* (-1171 5A/6A) и анализ на равновесието по Hardy-Weinberg (HWE) са представени в таблица 4.28.

Таблица 4.28. Разпределение на генотипните честоти при пациенти и контроли.

Ген Полиморфизъм	Група	Случаи, N (%)			HWE		Контроли, N (%)			HWE	
		6A/6A	6A/5A	5A/5A	χ^2	p	6A/6A	6A/5A	5A/5A	χ^2	p
<i>MMP3</i> (-1171 5A/6A)	Обща група	32 (30.5)	48 (45.7)	25 (23.8)	0.7	0.4	61 (29.1)	108 (51.4)	41 (19.5)	0.3	0.58
	Мъже	8 (42.1)	9 (47.4)	2 (10.5)	0.05	0.82	15 (39.5)	18 (47.4)	5 (13.1)	0.01	0.91
	Жени	24 (27.9)	39 (45.3)	23 (26.8)	0.74	0.39	46 (26.8)	90 (52.3)	36 (20.9)	0.43	0.51

Полиморфизмът показва съответствие със закона на Hardy-Weinberg. Генотипните и алелните честоти на *MMP3* (-1171 5A/6A) не се различаваха съществено при пациенти и контроли (6A/6A vs. 5A/6A vs. 5A/5A, $p = 0.57$ и 6A vs. 5A, $p = 0.73$, χ^2 -тест). Генотипните и алелните честоти в контролната група бяха близки до тези, съобщени от Vlaykova et al. (2014) в българска популационна извадка (6A/6A vs. 5A/6A vs. 5A/5A, $p = 0.92$ и 6A vs. 5A, $p = 0.78$, χ^2 -тест) [303].

Асоциативното проучване на Aulisa et al. (2007) е първото, търсещо връзка между функционалния полиморфизъм *MMP3* (-1171 5A/6A) и етиопатогенезата на АИС, в европейска популация. Авторите установяват, че промоторният полиморфизъм на *MMP3* е важен фактор в генетичното предразположение към АИС [116, 117].

Техните резултати не са потвърдени при асоциативно проучване в унгарска популационна извадка (126 случая и 197 контроли). Въпреки това, Morocz et al. (2011) изследват взаимодействието между *BMP4* (rs4898820 T/G) и *MMP3* (rs3025058 5A/6A) и установяват, че ORs на следните генотипни комбинации: GG-5A/5A, GG-5A/6A, TT-6A/6A, GT-5A/5A, GT-5A/6A, GT-6A/6A са значително повишени (OR от 5.89 до 7.8) при пациенти с АИС. При анализ на генотипните комбинации между *MTNR1B* (rs4753426 T/C) и *MMP3* (rs3025058 5A/6A) авторите установяват, че OR на генотипната комбинация СТ-5A/6A е повишено (OR=2.81, 95% CI: 1.02-7.72) при пациенти с АИС [93].

При изследване на китайска популация (487 случая и 494 контроли) Liu et al. (2010) не откриват значими разлики в генотипните и алелните честоти на *MMP3* (-1171 5A/6A) между пациенти с АИС и контроли (6A/6A vs. 5A/6A vs. 5A/5A, $p = 0.73$ и 6A vs. 5A, $p = 0.75$, χ^2 -тест). Максималните стойности на ъгъла на Cobb също не се различават съществено между отделните генотипи (6A/6A vs. 5A/6A vs. 5A/5A, $p = 0.392$) и авторите правят извода, че *MMP3* (rs3025058 5A/6A) не е свързан с етиологията и прогресията на АИС в китайската популация [118].

В подгрупата на АИС генотипните и алелните честоти на *MMP3* (-1171 5A/6A) бяха сравними при български пациенти и контроли (5A/5A vs. 6A/6A, $p = 0.55$ и 5A vs. 6A, $p = 0.64$, χ^2 -тест). Тези резултати потвърждават липсата на асоциация между *MMP3* (-1171 5A/6A) и АИС, докладвана от Morocz et al. (2011) при унгарски пациенти [93] и

от Liu et al. (2010) при китайски пациенти [118]. При сравняване подгрупата на ЮИС с контролите също не беше достигната статистически значима асоциация между *MMP3* (-1171 5A/6A) и патологичния фенотип ($p = 1$, Fisher's Exact Test). Следователно, изследваният полиморфизъм не може да бъде свързан с възрастта на поява на идиопатичната сколиоза при българските пациенти.

Наблюдаваните различия спрямо изследването на Aulisa et al. (2007) може да се дължат на малката извадка от италиански пациенти, имаща характер по-скоро на предварително проучване, което по-късно не е валидирано в по-голяма популация.

Odds ratios в отделните подгрупи са представени на таблица 4.29.

Таблица 4.29. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти и контроли (case-control study)

Подгрупа	Модел на генно влияние	Генотип, Алел	p (χ^2 -тест)	OR [95% CI]
Обща група ($n_1=105, n_2=210$)	Кодоминантен	5A/5A vs. 6A/6A	0.65	1.16 [0.60-2.24]
	Доминантен	5A/5A + 5A/6A vs. 6A/6A	0.79	0.93 [0.56-1.56]
	Рецесивен	5A/5A vs. 5A/6A + 6A/6A	0.38	1.29 [0.73-2.26]
	Алелен	5A vs. 6A	0.73	1.06 [0.76-1.48]
АИС ($n_1=78, n_2=210$)	Кодоминантен	5A/5A vs. 6A/6A	0.55	1.24 [0.61-2.53]
	Доминантен	5A/5A + 5A/6A vs. 6A/6A	0.78	0.92 [0.52-1.62]
	Рецесивен	5A/5A vs. 5A/6A + 6A/6A	0.26	1.42 [0.77-2.62]
	Алелен	5A vs. 6A	0.64	1.09 [0.76-1.58]
ЮИС ($n_1=23, n_2=210$)	Кодоминантен	5A/5A vs. 6A/6A	1*	1.06 [0.32-3.58]
	Доминантен	5A/5A + 5A/6A vs. 6A/6A	1*	0.94 [0.37-2.39]
	Рецесивен	5A/5A vs. 5A/6A + 6A/6A	1*	1.15 [0.40-3.27]
	Алелен	5A vs. 6A	1*	1.02 [0.55-1.87]
Фамилни случаи ($n_1=28, n_2=210$)	Кодоминантен	5A/5A vs. 6A/6A	0.59	1.32 [0.47-3.71]
	Доминантен	5A/5A + 5A/6A vs. 6A/6A	0.74	0.86 [0.37-2.02]
	Рецесивен	5A/5A vs. 5A/6A + 6A/6A	0.27	1.65 [0.68-4.01]
	Алелен	5A vs. 6A	0.67	1.13 [0.64-1.97]
Спорадични случаи ($n_1=77, n_2=210$)	Кодоминантен	5A/5A vs. 6A/6A	0.81	1.10 [0.52-2.31]
	Доминантен	5A/5A + 5A/6A vs. 6A/6A	0.89	0.96 [0.54-1.70]
	Рецесивен	5A/5A vs. 5A/6A + 6A/6A	0.63	1.17 [0.62-2.21]
	Алелен	5A vs. 6A	0.86	1.04 [0.71-1.50]
Cobb >40° ($n_1=84, n_2=210$)	Кодоминантен	5A/5A vs. 6A/6A	0.86	1.07 [0.52-2.21]
	Доминантен	5A/5A + 5A/6A vs. 6A/6A	0.92	0.97 [0.55-1.68]
	Рецесивен	5A/5A vs. 5A/6A + 6A/6A	0.71	1.12 [0.60-2.10]
	Алелен	5A vs. 6A	0.89	1.02 [0.72-1.47]
Cobb <40° ($n_1=21, n_2=210$)	Кодоминантен	5A/5A vs. 6A/6A	0.57*	1.49 [0.49-4.56]
	Доминантен	5A/5A + 5A/6A vs. 6A/6A	0.81*	0.82 [0.32-2.13]
	Рецесивен	5A/5A vs. 5A/6A + 6A/6A	0.16*	2.06 [0.78-5.43]
	Алелен	5A vs. 6A	0.63*	1.21 [0.64-2.28]
Мъже ($n_1=19, n_2=38$)	Кодоминантен	5A/5A vs. 6A/6A	0.57*	1.33 [0.21-8.49]
	Доминантен	5A/5A + 5A/6A vs. 6A/6A	0.54*	1.12 [0.36-3.42]
	Рецесивен	5A/5A vs. 5A/6A + 6A/6A	0.57*	1.29 [0.23-7.35]
	Алелен	5A vs. 6A	0.78*	1.12 [0.50-2.54]
Жени ($n_1=86, n_2=172$)	Кодоминантен	5A/5A vs. 6A/6A	0.58	1.22 [0.60-2.51]
	Доминантен	5A/5A + 5A/6A vs. 6A/6A	0.84	0.94 [0.53-1.68]
	Рецесивен	5A/5A vs. 5A/6A + 6A/6A	0.29	1.38 [0.76-2.52]
	Алелен	5A vs. 6A	0.62	1.10 [0.76-1.58]

*Fisher's Exact Test (two-tailed); n_1 - брой пациенти, n_2 - брой контроли.

От таблица 4.29 се вижда, че в подгрупата на прогресивната сколиоза, където ъгълът на Cobb е над 40°, генотипните и алелните честоти на *MMP3* (-1171 5A/6A) също са сравними с тези на контролите ($p > 0.05$, χ^2 -тест). Тези резултати потвърждават липсата на връзка с прогресията на идиопатичната сколиоза, докладвана в китайската

популация [118]. Следователно, полиморфизмът не може да бъде обсъждан като модифициращ генетичен вариант за идиопатична сколиоза при българските пациенти.

В останалите подгрупи също не бяха наблюдавани значими разлики ($p > 0.05$). Следователно, промоторният полиморфизъм на *MMP3* не може да бъде свързан с пола и фамилната история на идиопатичната сколиоза при българските пациенти.

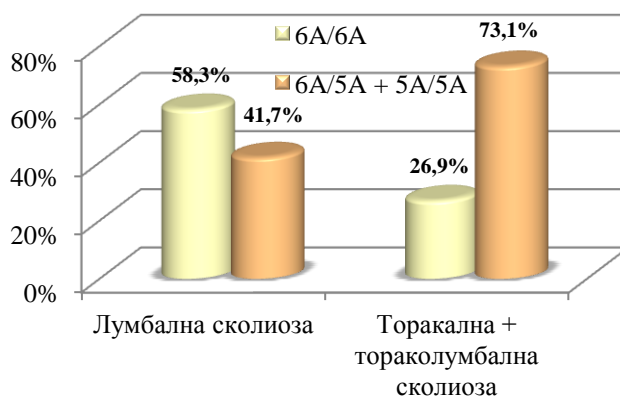
На таблица 4.30 са представени Odds Ratios, получени при сравняване на отделните подгрупи от пациенти.

Таблица 4.30. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти (case-only study)

Подгрупа	Модел на генно влияние	Генотип, Алел	p (χ^2 -тест)	OR [95% CI]
Cobb >40⁰ Корсетолечение/без корсетолечение (n ₁ =49, n ₂ =34)	Кодоминантен	5A/5A vs. 6A/6A	0.48	1.57 [0.45-5.53]
	Доминантен	5A/5A + 5A/6A vs. 6A/6A	0.71	1.20 [0.46-3.09]
	Рецесивен	5A/5A vs. 5A/6A + 6A/6A	0.46	1.51 [0.51-4.53]
	Алелен	5A vs. 6A	0.5	1.24 [0.66-2.31]
Торакална/ тораколумбална+лумбална първична крива (n ₁ =62, n ₂ =43)	Кодоминантен	5A/5A vs. 6A/6A	0.92	1.05 [0.37-2.98]
	Доминантен	5A/5A + 5A/6A vs. 6A/6A	0.09	2.05 [0.88-4.76]
	Рецесивен	5A/5A vs. 5A/6A + 6A/6A	0.2	0.55 [0.22-1.37]
	Алелен	5A vs. 6A	0.75	1.09 [0.63-1.90]
Тораколумбална/ торакална+лумбална първична крива (n ₁ =31, n ₂ =74)	Кодоминантен	5A/5A vs. 6A/6A	0.71	1.24 [0.41-3.74]
	Доминантен	5A/5A + 5A/6A vs. 6A/6A	0.79	0.89 [0.36-2.19]
	Рецесивен	5A/5A vs. 5A/6A + 6A/6A	0.42	1.48 [0.57-3.85]
	Алелен	5A vs. 6A	0.75	1.10 [0.61-2.00]
Лумбална/ тораколумбална+торакална първична крива (n ₁ =12, n ₂ =93)	Кодоминантен	6A/6A vs. 5A/5A	0.74*	1.47 [0.38-5.72]
	Доминантен	6A/6A vs. 6A/5A + 5A/5A	0.04*	3.81 [1.11-13.1]
	Рецесивен	6A/6A + 5A/6A vs. 5A/5A	0.47*	0.58 [0.16-2.13]
	Алелен	6A vs. 5A	0.39*	1.53 [0.64-3.67]

*Fisher's Exact Test (two-tailed)

При сравняване подгрупите от пациенти с различен тип на кривата беше установена статистически значима връзка с лумбалната сколиоза. Възможно е хомозиготният генотип 6A/6A, свързан със значително по-ниски нива на MMP3 в сравнение с 5A/5A [93], да е свързан с по-често развитие на лумбална първична крива при наличие на други отключващи фактори. Известно е, че средният ъгъл на лумбалната сколиоза е значително по-малък от този при торакална първична крива. Типът на първичната крива има важно значение при оценка на евентуална прогресия на деформацията. Необходимо е резултатът да бъде потвърден при по-голяма извадка от пациенти с лумбална сколиоза.



Фигура 4.24. Доминантен модел (6A/6A)/(6A/5A+5A/5A) при основните типове първични криви.

2.3.9. Интерлевкин-6 - IL-6 (rs1800795; -174G/C)

Честотата на функционалния полиморфизъм *IL-6* (-174G/C) беше проучена в групата като цяло и в отделните подгрупи от пациенти с идиопатична сколиоза и беше сравнена с тази на неродствени индивиди без клинични белези на сколиоза (case-control study) или с други подгрупи от пациенти (case-only study). Асоциацията в отделните подгрупи беше проучена при генотипен (кододоминантен, доминантен и рецесивен) и алелен модел.

Наблюдаваните генотипни и алелни честоти на *IL-6* (-174G/C) в контролната група не се различаваха значително от съобщените от Ivanova et al. (2011) за малка българска популационна извадка (GG vs. GC vs. CC, p=0.35 и G vs. C, p=0.13) [304]. Генотипните и алелните честоти на *IL-6* (-174G/C) и анализ на равновесието по Hardy-Weinberg (HWE) са представени в таблица 4.31.

Таблица 4.31. Разпределение на генотипните честоти при пациенти и контроли.

Ген Полиморфизъм	Група	Случаи, N (%)			HWE		Контроли, N (%)			HWE	
		GG	GC	CC	χ^2	p	GG	GC	CC	χ^2	p
<i>IL-6</i> (rs1800795 G/C)	Обща група	54 (51.4)	40 (38.1)	11 (10.5)	0.75	0.39	63 (30.0)	94 (44.8)	53 (25.2)	2.2	0.14
	Мъже	10 (52.6)	7 (36.9)	2 (10.5)	0.21	0.65	13 (34.2)	19 (50.0)	6 (15.8)	0.05	0.83
	Жени	44 (51.2)	33 (38.4)	9 (10.4)	0.55	0.46	50 (29.1)	75 (43.6)	47 (27.3)	2.8	0.09

Полиморфизмът показва съответствие със закона на Hardy-Weinberg. Генотипните и алелните честоти на *IL-6* (-174G/C) се различаваха съществено при пациенти и контроли (GG vs. GC vs. CC, p < .0001 и G vs. C, p < .0001, χ^2 -тест). На базата на тези резултати функционалният полиморфизъм *IL-6* (-174G/C) може да се разглежда като самостоятелен фактор, свързан с предразположението към идиопатична сколиоза.

Асоциативното проучване на Aulisa et al. (2007) между 53 пациенти (възраст на Cobb 25⁰-125⁰) и 206 контроли от италиански произход е първото проучване, търсещо връзка между *IL-6* и предразположението към АИС. Резултатите от него показват, че честотата на хомозиготния GG генотип на *IL-6* (-174G/C) при италиански пациенти с АИС е два пъти по-висока в сравнение с контроли (52.8% vs. 26.2%, P < 0.001, OR=10.54). Авторите правят извода, че промоторният полиморфизъм *IL-6* (-174G/C) е потенциален важен фактор в генетичното предразположение към АИС [116, 117].

Техните резултати не са потвърдени при асоциативно проучване в два пъти по-голяма по размер унгарска популационна извадка от 126 случая на прогресивна АИС и 197 контроли [93]. Въпреки това, Morocz et al. (2011) изследват взаимодействието между *IL-6* (rs1800795 G/C) и *Lep* (rs7799039 G/A) и установяват статистически значима разлика между честотите на генотипната комбинация CC-(*IL-6*)-AA-(*Lep*) при пациенти и контроли (p=0.027, OR=4.67, 95% CI: 1.24-17.60) [93].

В китайска популация Liu et. al. (2010) не откриват значими разлики между генотипните и алелните честоти на *IL-6* (-174 G/C) при 487 момичета с АИС и 494 контроли, всъщност всички са носители на GG генотип, което показва, че този locus е слабо полиморфен в китайската популация [118]. Друг промоторен вариант - *IL-6* (-572 G/C) е асоцииран с ниска костна плътност в лумбалния отдел на гръбначния стълб при изследване на 198 корейски момичета с АИС и 120 контроли (p=0.0022) [166].

На таблица 4.32 са представени ORs, получени при сравняване на отделните подгрупи от български пациенти и контроли.

Таблица 4.32. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти и контроли (case-control study)

Подгрупа	Модел на генно влияние	Генотип, Алел	р (χ^2 -тест)	OR [95% CI]
Обща група (n ₁ =105, n ₂ =210)	Кодоминантен	GG vs. CC	<0.0001	4.13 [1.96-8.69]
		GG vs. GC	0.008	2.01 [1.20-3.38]
	Доминантен	GG vs. GC + CC	0.002	2.47 [1.52-4.01]
	Рецесивен	GG + GC vs. CC	0.0002	2.88 [1.44-5.80]
АИС (n ₁ =78, n ₂ =210)	Кодоминантен	GG vs. CC	0.0002	4.42 [1.91-10.2]
		GG vs. GC	0.01	2.24 [1.26-3.98]
	Доминантен	GG vs. GC + CC	0.0002	2.72 [1.60-4.64]
	Рецесивен	GG + GC vs. CC	0.01	2.95 [1.33-6.54]
ЮИС (n ₁ =23, n ₂ =210)	Кодоминантен	GG vs. CC	0.08	3.08 [0.82-11.6]
		GG vs. GC	0.2	1.82 [0.71-4.65]
	Доминантен	GG vs. GC + CC	0.08	2.14 [0.9-5.1]
	Рецесивен	GG + GC vs. CC	0.2	2.25 [0.64-7.88]
Фамилни случаи (n ₁ =28, n ₂ =210)	Кодоминантен	GG vs. CC	0.0007	15.14 [1.96-117.23]
		GG vs. GC	0.01	2.98 [1.26-7.06]
	Доминантен	GG vs. GC + CC	0.0003	4.2 [1.84-9.61]
	Рецесивен	GG + GC vs. CC	0.01	9.11 [1.21-68.7]
Спорадични случаи (n ₁ =77, n ₂ =210)	Кодоминантен	GG vs. CC	0.008	2.75 [1.28-5.93]
		GG vs. GC	0.048	1.79 [1.00-3.20]
	Доминантен	GG vs. GC + CC	0.008	2.05 [1.2-3.5]
	Рецесивен	GG + GC vs. CC	0.048	2.03 [1.00-4.12]
Cobb >40° (n ₁ =84, n ₂ =210)	Кодоминантен	GG vs. CC	0.0001	4.73 [2.05-10.92]
		GG vs. GC	0.006	2.17 [1.24-3.78]
	Доминантен	GG vs. GC + CC	0.0002	2.69 [1.60-4.53]
	Рецесивен	GG + GC vs. CC	0.003	3.21 [1.45-7.08]
Cobb <40° (n ₁ =21, n ₂ =210)	Кодоминантен	GG vs. CC	0.17	2.52 [0.65-9.80]
		GG vs. GC	0.42	1.49 [0.56-3.97]
	Доминантен	GG vs. GC + CC	0.23	1.75 [0.70-4.36]
	Рецесивен	GG + GC vs. CC	0.26	2.03 [0.57-7.15]
Мъже (n ₁ =19, n ₂ =38)	Кодоминантен	GG vs. CC	0.43*	2.31 [0.38-14.0]
		GG vs. GC	0.25*	2.09 [0.63-6.91]
	Доминантен	GG vs. GC + CC	0.25*	2.14 [0.70-6.57]
	Рецесивен	GG + GC vs. CC	0.71*	1.59 [0.29-8.77]
Жени (n ₁ =86, n ₂ =172)	Кодоминантен	GG vs. CC	0.0001	4.60 [2.02-10.4]
		GG vs. GC	0.02	2.00 [1.12-3.56]
	Доминантен	GG vs. GC + CC	0.0005	2.56 [1.50-4.37]
	Рецесивен	GG + GC vs. CC	0.01	2.89 [1.35-6.16]
Алелен	G vs. C	<0.0001	2.29 [1.55-3.38]	

*Fisher's Exact Test (two-tailed); n₁- брой пациенти, n₂- брой контроли.

В общата извадка от пациенти и контроли честотата на хомозиготния GG генотип и на G алела беше по-висока при пациенти с идиопатична сколиоза в сравнение с контроли (GG vs. CC, p <.0001, OR=4.13, 95% CI: 1.96-8.69 и G vs. C, p <.0001, OR=2.17, 95% CI: 1.52-3.09, χ^2 -тест). Носителството на хомозиготния GG генотип се свързва с 1.7 пъти по-висок риск (GG vs. GC+CC, RR=1.71, 95% CI: 1.3-2.26), а на G алел – с 1.35 пъти по-висок риск (G vs. C, RR=1.35, 95% CI: 1.19-1.53) от развитие на идиопатична сколиоза при българи.

В подгрупата на АИС генотипните и алелните честоти на *IL-6* (-174G/C) също се различаваха при пациенти и контроли (GG vs. CC, $p = 0.0002$, OR=4.42, 95% CI: 1.91-10.2 и G vs. C, $p < .0001$, OR=2.31, 95% CI: 1.55-3.44, χ^2 -тест). Носителството на хомозиготния GG генотип се свързва с 1.8 пъти по-висок риск от развитие на АИС (GG vs. GC+CC, RR=1.8, 95% CI: 1.34-2.4), а на G алел – с 1.37 пъти по-висок риск (G vs. C, RR=1.37, 95% CI: 1.2-1.57).

Тези резултати дават основание полиморфният алел да се разглежда като протективен фактор, а дивият тип G алел, свързан с повишена транскрипция на гена – като предразполагащ фактор за идиопатична и адолесцентна идиопатична сколиоза при български пациенти. Възможно е носителството на G алел или на GG генотип да повлиява цитокиновата експресия в отговор на гръбнака на механичен стрес (асиметрично натоварване) и да повишава податливостта към деформация и по-нататъшна прогресия на деформацията.

При сравнение с резултатите, наблюдавани при италиански пациенти [116, 117], може да се каже, че настоящото изследване потвърждава положителната асоциация между полиморфизма *IL-6* (-174G/C) и АИС, като нивото на значимост е сходно и при двете проучвания ($p < 0.001$), а разликите в стойностите на ORs се обясняват с размера на извадките и възможни различия в генотипните честоти при българска и италианска популация. Липсата на асоциация между *IL-6* (-174G/C) и АИС, докладвана при унгарски пациенти [93], би могла да се дължи на различия в генотипните и алелните честоти на този полиморфизъм между отделните популационни групи и различните критерии за селекция на пациенти - оперативни и неоперативни случаи.

В подгрупата на ЮИС се наблюдава тенденция към асоциация (табл. 4.32), която в допълнение към резултатите от общата извадка предполага разширено проучване върху асоциацията между *IL-6* (-174G/C) и ранната идиопатична сколиоза.

В подгрупата и на фамилените и на нефамилните случаи генотипните и алелните честоти на *IL-6* (-174G/C) се различаваха съществено от тези на контролите (табл. 4.32). Носителството на GG генотип и G алел се свързва, както с фамилената, така и със спорадичната форма на идиопатична сколиоза, като разликите в генотипните и алелните честоти са по-големи при фамилената форма на идиопатична сколиоза. Тъй като извадката от пациенти с фамилената форма на сколиоза не отговаря по размер на тази от пациенти с нефамилна форма на заболяването, на този етап не може да се твърди със сигурност къде асоциацията е по-значима.

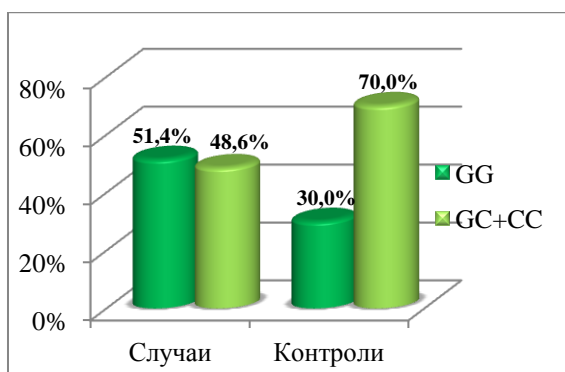
При пациентите с прогресивна сколиоза, довела до необходимост от оперативно лечение, честотата на хомозиготния GG генотип и на G алела също беше по-висока в сравнение с контроли (GG vs. CC, $p = 0.0001$, OR=4.73, 95% CI: 2.05-10.92 и G vs. C, $p < .0001$, OR=2.34, 95% CI: 1.59-3.45, χ^2 -тест). Носителството на хомозиготния GG генотип се свързва с 1.8 пъти по-висок риск (GG vs. GC+CC, RR=1.79, 95% CI: 1.34-2.38), а на G алел – с 1.38 пъти по-висок риск от прогресия на деформацията (G vs. C, RR=1.38, 95% CI: 1.21-1.57).

Тези резултати дават основание G алелът на *IL-6* (-174G/C) да се разглежда като модифициращ генетичен фактор за идиопатична сколиоза при български пациенти, асоцииран с тежка прогресия на кривата (ъгъл на Cobb $> 40^\circ$).

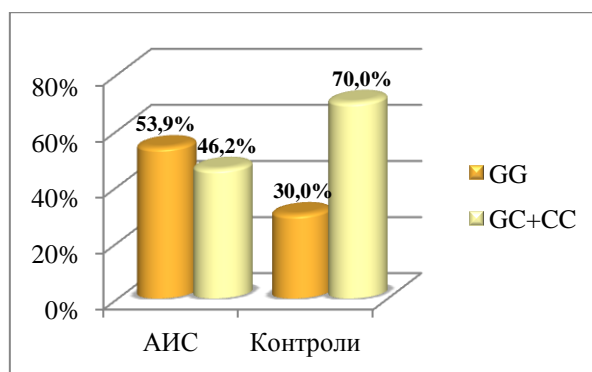
В допълнение, в групата на непрогресивната сколиоза не се наблюдават сигнификантни разлики между пациенти и контроли (табл. 4.32).

След разделяне на пациентите и контролите по пол, само при момичетата се наблюдаваше статистически значима асоциация между *IL-6* (-174G/C) и клиничния фенотип (табл. 4.32).

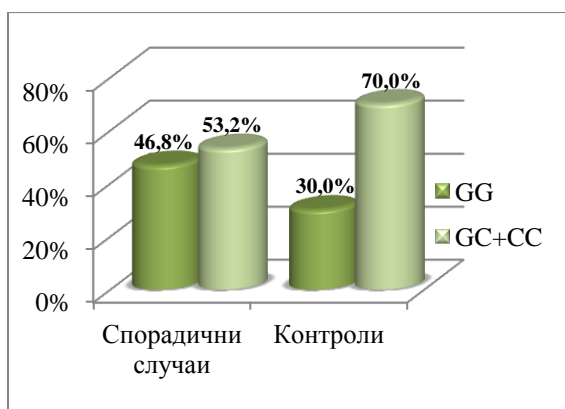
По-долу са представени графично доминантни модели на генно влияние в общата група и в подгрупите на АИС, фамилна, спорадична и прогресивна сколиоза и в групата на момичетата с идиопатична сколиоза (фиг. 4.25-4.30).



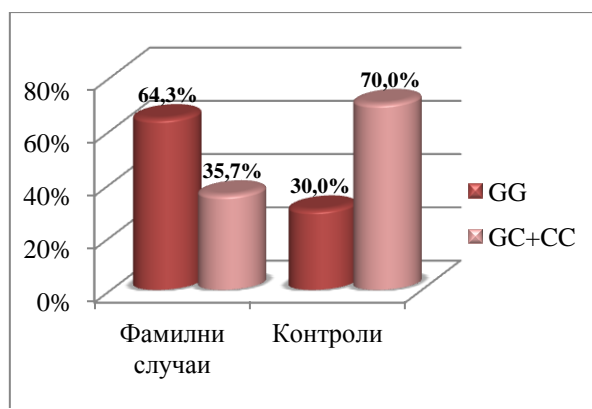
Фиг. 4. 25. Доминантен модел на генно влияние GG/(GC+CC) в общата група.



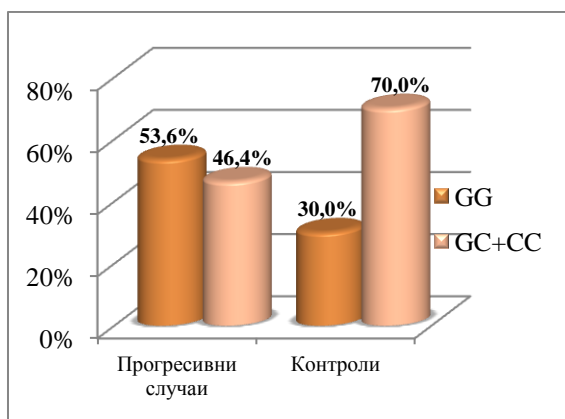
Фиг. 4. 26. Доминантен модел на генно влияние GG/(GC+CC) при АИС



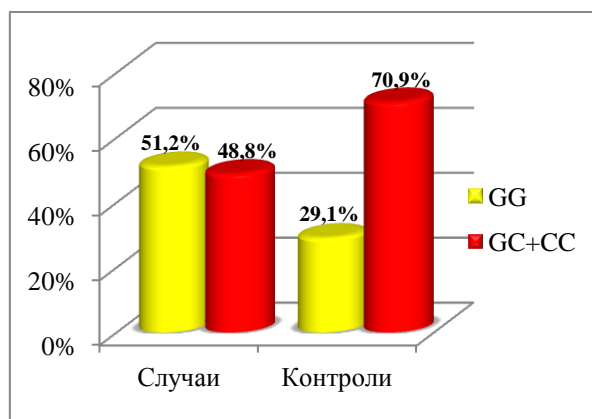
Фиг. 4. 27. Доминантен модел на генно влияние GG/(GC+CC) при спорадична идиопатична сколиоза.



Фиг. 4. 28. Доминантен модел на генно влияние GG/(GC+CC) при фамилна идиопатична сколиоза.

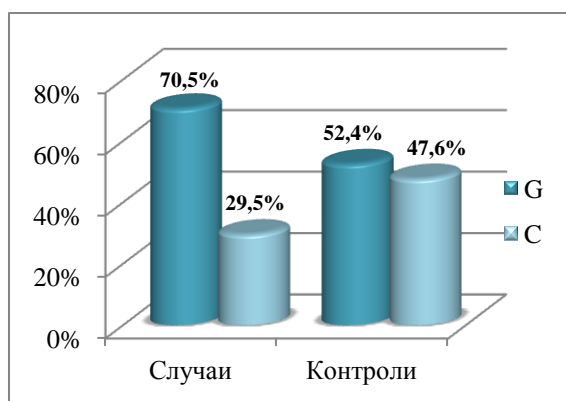


Фиг. 4. 29. Доминантен модел на генно влияние GG/(GC+CC) при прогресивна идиопатична сколиоза.

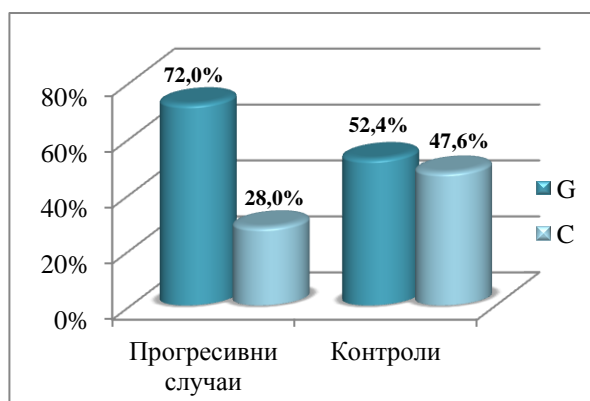


Фиг. 4. 30. Доминантен модел на генно влияние GG/(GC+CC) при идиопатична сколиоза сред лица от женски пол.

На фиг. 4.31 и фиг. 4.32 са представени алелни модели в общата група и в подгрупата на прогресивната сколиоза.



Фиг. 4. 31. Процентно разпределение на алелите G и C в общата група.



Фиг. 4. 32. Процентно разпределение на алелите G и C при прогресивна идиопатична сколиоза.

Полиморфизмът *IL-6* (-174G/C) не показва връзка с изхода от корсетолечението и типа на кривата при сравняване на отделните подгрупи от пациенти ($p > 0.05$, Fisher's Exact Test). При сравняване само на пациенти с торакална сколиоза с контроли обаче, се наблюдаваше статистически значима асоциация с торакалния тип крива (GG vs. CC, $p=0.0006$, OR=4.73, 95% CI: 1.86-12.03 и G vs. C, $p=0.0001$, OR=2.31, 95% CI: 1.5-3.57, Fisher's Exact Test). Торакалната сколиоза е свързана с по-лоша прогноза и по-голяма средна стойност на ъгъла на изкривяването [305].

Odds ratios в отделните подгрупи от пациенти са представени на таблица 4.33.

Таблица 4.33. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти (case-only study)

Подгрупа	Модел на генно влияние	Генотип, Алел	p (Fisher's Exact Test)	OR [95% CI]
Cobb >40 ⁰ Корсетолечение/без корсетолечение (n ₁ =49, n ₂ =34)	Кодоминантен	GG vs. CC	1	0.79 [0.17-3.72]
		GG vs. GC	0.81	0.83 [0.33-2.12]
	Доминантен	GG vs. GC + CC	0.82	0.82 [0.34-1.98]
		Рецесивен	GG + GC vs. CC	1
Торакална/ тораколумбална+лумбална първична крива (n ₁ =62, n ₂ =43)	Кодоминантен	GG vs. CC	0.74	1.31 [0.35-4.84]
		GG vs. GC	0.83	1.16 [0.51-2.67]
	Доминантен	GG vs. GC + CC	0.69	1.19 [0.55-2.60]
		Рецесивен	GG + GC vs. CC	1
Тораколумбална/ торакална+лумбална първична крива (n ₁ =31, n ₂ =74)	Кодоминантен	GG vs. CC	0.27	0.38 [0.10-1.45]
		GG vs. GC	0.48	0.66 [0.27-1.64]
	Доминантен	GG vs. GC + CC	0.28	0.58 [0.25-1.36]
		Рецесивен	GG + GC vs. CC	0.29
Лумбална/ тораколумбална+торакална първична крива (n ₁ =12, n ₂ =93)	Кодоминантен	GG vs. CC	0.33	Infinity
		GG vs. GC	0.55	1.57 [0.44-5.61]
	Доминантен	GG vs. GC + CC	0.36	2.04 [0.58-7.26]
		Рецесивен	GG + GC vs. CC	0.36
	Алелен	G vs. C	0.16	2.27 [0.74-6.93]

В заключение, получените резултати дават основание GG генотипът и G алелът на *IL-6* (-174G/C), които са асоциирани с повишени цитокинови нива, да се разглеждат като предразполагащ и модифициращ фактор за идиопатична сколиоза при български пациенти. В допълнение се наблюдава корелация с началото на АИС, с фамилната и

спорадичната форма, с женския пол и с торакалния тип крива. Съответно, полиморфният алел, свързан с по-ниски цитокинови нива, има протективен ефект.

Необходимо е разширено популационно проучване за потвърждаване на резултатите и изследване връзката на *IL-6* (-174G/C) с ЮИС и мъжкия пол. Идентифицирането на молекулни маркери за прогресивна сколиоза би било полезно при оценка на риска от бърза прогресия на деформацията, което ще позволи ранна терапия, включително минимално инвазивни хирургични интервенции.

2.3.10. Триптофанхидроксилаза-1 - *TPH1* (rs10488682, T/A)

Честотата на промоторния полиморфизъм *TPH1* (rs10488682 T/A) беше проучена в групата като цяло и в отделните подгрупи от пациенти с идиопатична сколиоза и беше сравнена с тази на неродствени индивиди без клинични белези на сколиоза (case-control study) или с други подгрупи от пациенти (case-only study). Асоциацията в отделните подгрупи беше проучена при генотипен (кодоминантен, доминантен и рецесивен) и алелен модел.

Генотипните и алелните честоти на *TPH1* (rs10488682 T/A) и анализ на равновесието по Hardy-Weinberg (HWE) са представени в таблица 4.34.

Таблица 4.34. Разпределение на генотипните честоти при пациенти и контроли.

Ген Полиморфизъм	Група	Случаи, N (%)			HWE		Контроли, N (%)			HWE	
		AA	TA	TT	χ^2	p	AA	TA	TT	χ^2	p
<i>TPH1</i> (rs10488682 A/T)	Обща група	54 (51.4)	44 (41.9)	7 (6.7)	0.24	0.62	132 (62.8)	64 (30.5)	14 (6.7)	2.51	0.11
	Мъже	11 (57.9)	6 (31.6)	2 (10.5)	0.66	0.42	25 (65.8)	11 (28.9)	2 (5.3)	0.28	0.59
	Жени	43 (50.0)	38 (44.2)	5 (5.8)	0.83	0.36	107 (62.2)	53 (30.8)	12 (7.0)	2.2	0.14

Полиморфизмът показва съответствие със закона на Hardy-Weinberg. Генотипните и алелните честоти на *TPH1* (rs10488682 T/A) не показаха статистически значими разлики между пациенти и контроли (AA vs. TA vs. TT, p = 0.12 и A vs. T, p = 0.11, χ^2 -тест), но при доминантен модел на генно влияние се наблюдаваше резултат, близък до статистически значима асоциация (TT + TA vs. AA, p=0.05, OR: 1.6, 95% CI: 0.99-2.57).

Асоциативното проучване на Wang et al. (2008) е първото, търсещо връзка между промоторния полиморфизъм *TPH1* (rs10488682 T/A) и етиопатогенезата на АИС. Авторите изследват 16 SNPs в *TPH1* и *AANAT* при 103 пациенти и 107 контроли от китайска популация и установяват положителна асоциация на rs10488682 с предразположението към АИС, но не и с пола или възрастта на сколиозата [95]. Техните резултати предполагат, че *TPH1* е предразполагащ ген за идиопатична сколиоза и съществува тясна връзка между нарушената синтеза на мелатонина и АИС.

Тази хипотеза не е потвърдена при асоциативно проучване в японската популация (798 момичета с АИС и 1239 контроли) и авторите стигат до извода, че *TPH1* (rs10488682 T/A) не е свързан с началото или с прогресията на АИС в японска популация [94].

В кавказката популация Nelson et al. (2011) изследват 4 SNPs в *TPH1* за връзка с АИС при 589 пациенти и 1533 контроли и не намират статистически значими асоциации [89].

В подгрупата на АИС генотипните и алелните честоти на *TPH1* (rs10488682 Т/А) бяха сравними при български пациенти и контроли (ТТ + ТА vs. АА, $p=0.08$, OR: 1.61, 95% CI: 0.95-2.72 и Т vs. А, $p = 0.11$, χ^2 -тест).

Тези резултати потвърждават липсата на асоциация между *TPH1* (rs10488682 Т/А) и АИС, докладвана за кавказката популация [89] и за японската популация [94].

В останалите подгрупи също не се наблюдават статистически значими асоциации, в подгрупата на прогресивната сколиоза и на момичетата с идиопатична сколиоза се наблюдават стойности на $p < 0.1$.

Odds ratios в отделните подгрупи са представени на таблица 4.35.

Таблица 4.35. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти и контроли (case-control study)

Подгрупа	Модел на генно влияние	Генотип, Алел	p (χ^2 -тест)	OR [95% CI]
Обща група ($n_1=105$, $n_2=210$)	Кодоминантен	ТТ vs. АА	0.68	1.22 [0.47-3.20]
	Доминантен	ТТ + ТА vs. АА	0.05	1.60 [0.99-2.57]
	Рецесивен	ТТ vs. ТА + АА	1	1.00 [0.39-2.56]
	Алелен	Т vs. А	0.11	1.36 [0.93-1.99]
АИС ($n_1=78$, $n_2=210$)	Кодоминантен	ТТ vs. АА	0.58	1.41 [0.51-3.92]
	Доминантен	ТТ + ТА vs. АА	0.08	1.61 [0.95-2.72]
	Рецесивен	ТТ vs. ТА + АА	0.76	1.17 [0.43-3.15]
	Алелен	Т vs. А	0.11	1.40 [0.92-2.13]
ЮИС ($n_1=23$, $n_2=210$)	Кодоминантен	ТТ vs. АА	1*	0.86 [0.10-7.14]
	Доминантен	ТТ + ТА vs. АА	0.16*	1.85 [0.78-4.38]
	Рецесивен	ТТ vs. ТА + АА	1*	0.64 [0.08-5.07]
	Алелен	Т vs. А	0.35*	1.40 [0.71-2.78]
Фамилни случаи ($n_1=28$, $n_2=210$)	Кодоминантен	ТТ vs. АА	0.38*	2.18 [0.55-8.57]
	Доминантен	ТТ + ТА vs. АА	0.1*	1.95 [0.88-4.32]
	Рецесивен	ТТ vs. ТА + АА	0.7*	1.68 [0.45-6.26]
	Алелен	Т vs. А	0.09*	1.69 [0.92-3.10]
Спорадични случаи ($n_1=77$, $n_2=210$)	Кодоминантен	ТТ vs. АА	1	0.92 [0.29-2.95]
	Доминантен	ТТ + ТА vs. АА	0.14	1.49 [0.88-2.52]
	Рецесивен	ТТ vs. ТА + АА	0.79	0.77 [0.24-2.41]
	Алелен	Т vs. А	0.31	1.25 [0.82-1.92]
Cobb >40° ($n_1=84$, $n_2=210$)	Кодоминантен	ТТ vs. АА	1	1.10 [0.37-3.22]
	Доминантен	ТТ + ТА vs. АА	0.07	1.61 [0.97-2.69]
	Рецесивен	ТТ vs. ТА + АА	0.82	0.89 [0.31-2.54]
	Алелен	Т vs. А	0.16	1.34 [0.89-2.03]
Cobb <40° ($n_1=21$, $n_2=210$)	Кодоминантен	ТТ vs. АА	0.62*	1.71 [0.34-8.53]
	Доминантен	ТТ + ТА vs. АА	0.48*	1.54 [0.62-3.79]
	Рецесивен	ТТ vs. ТА + АА	0.64*	1.47 [0.31-6.98]
	Алелен	Т vs. А	0.33*	1.43 [0.70-2.90]
Мъже ($n_1=19$, $n_2=38$)	Кодоминантен	ТТ vs. АА	0.58*	2.27 [0.28-18.3]
	Доминантен	ТТ + ТА vs. АА	0.77*	1.40 [0.45-4.33]
	Рецесивен	ТТ vs. ТА + АА	0.59*	2.12 [0.27-16.3]
	Алелен	Т vs. А	0.47*	1.45 [0.58-3.63]
Жени ($n_1=86$, $n_2=172$)	Кодоминантен	ТТ vs. АА	1	1.04 [0.34-3.12]
	Доминантен	ТТ + ТА vs. АА	0.06	1.65 [0.98-2.78]
	Рецесивен	ТТ vs. ТА + АА	0.5	0.82 [0.28-2.42]
	Алелен	Т vs. А	0.17	1.34 [0.88-2.04]

*Fisher's Exact Test (two-tailed); n_1 - брой пациенти, n_2 - брой контроли.

На основата на тези резултати и поради ниската популационна честота на Т алела е обосновано разширено популационно проучване за установяване потенциалната роля на *TPH1* (rs10488682 Т/А) в предразположението към различните възрастови форми на идиопатична сколиоза при българските пациенти.

Пациентите с прогресивна сколиоза бяха разделени на две подгрупи според проведеното корсетолечение, като при сравняването им не беше открита статистически значима връзка между полиморфизма и прогресията на сколиозата ($p > 0.05$, Fisher's Exact Test). Следователно, *TPH1* (rs10488682 T/A) не може да бъде свързан с изхода от корсетолечението.

При сравняване подгрупите от пациенти с торакална, тораколумбална и лумбална сколиоза не беше установена статистически значима връзка с изследвания полиморфизъм ($p > 0.05$, Fisher's Exact Test). Следователно, *TPH1* (rs10488682 T/A) не може да бъде свързан с типа на кривата. Odds ratios в отделните подгрупи от пациенти са представени на таблица 4.36.

Таблица 4.36. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти (case-only study)

Подгрупа	Модел на генно влияние	Генотип, Алел	p-стойност (Fisher's Exact Test)	OR [95% CI]
Cobb >40° Корсетолечение/без корсетолечение (n ₁ =49, n ₂ =34)	Кодоминантен	ТТ vs. АА	0.15	0.16 [0.02-1.59]
	Доминантен	ТТ + ТА vs. АА	0.83	0.88 [0.37-2.12]
	Рецесивен	ТТ vs. ТА + АА	0.15	0.16 [0.02-1.47]
	Алелен	Т vs. А	0.38	0.73 [0.36-1.45]
Торакална/ тораколумбална+лумбална първична крива (n ₁ =62, n ₂ =43)	Кодоминантен	ТТ vs. АА	1	0.92 [0.19-4.51]
	Доминантен	ТТ + ТА vs. АА	1	0.98 [0.45-2.14]
	Рецесивен	ТТ vs. ТА + АА	1	0.92 [0.20-4.33]
	Алелен	Т vs. А	1	0.98 [0.53-1.80]
Тораколумбална/ торакална+лумбална първична крива (n ₁ =31, n ₂ =74)	Кодоминантен	ТТ vs. АА	0.66	0.43 [0.05-3.91]
	Доминантен	ТТ + ТА vs. АА	1	0.98 [0.45-2.14]
	Рецесивен	ТТ vs. ТА + АА	1	0.92 [0.20-4.33]
	Алелен	Т vs. А	1	0.98 [0.53-1.80]
Лумбална/ тораколумбална+торакална първична крива (n ₁ =12, n ₂ =93)	Кодоминантен	ТТ vs. АА	0.58	2.69 [0.43-16.7]
	Доминантен	ТТ + ТА vs. АА	0.76	0.73 [0.22-2.47]
	Рецесивен	ТТ vs. ТА + АА	0.18	3.52 [0.60-20.6]
	Алелен	Т vs. А	1	1.09 [0.43-2.78]

В заключение, въз основа на представените резултати този промоторен полиморфен вариант няма предразполагащ или модифициращ ефект сред българските пациенти с идиопатична сколиоза и не може да бъде свързан с началото на заболяването, пола, фамилната история, типа на кривата и изхода от корсетолечението. Въпреки това, поради ниската популационна честота на полиморфния алел, не е изключена потенциална роля на *TPH1* в етиопатогенезата на идиопатичната сколиоза при разширени проучвания или при други популационни групи.

2.3.11. Естрогенов рецептор *mum 1* – *ESR1* (rs9340799, A/G; *XbaI*, X/x) и *ESR1* (rs2234693, C/T; *PvuII*, P/p)

Генотипните и алелните честоти на честите полиморфизми *ESR1* (*XbaI*, X/x) и *ESR1* (*PvuII*, P/p) бяха проучени в групата като цяло и в отделните подгрупи от пациенти с идиопатична сколиоза и сравнени с тези на неродствени индивиди без клинични белези на сколиоза (case-control study) или с други подгрупи от пациенти (case-only study). Асоциацията в отделните подгрупи беше проучена по генотипен (кодоминантен, доминантен и рецесивен) и алелен модел.

Генотипните и алелните честоти на изследваните полиморфизми и анализ на равновесието по Hardy-Weinberg (HWE) са представени на таблица 4.37 и 4.38.

Таблица 4.37. Разпределение на генотипните честоти на *ESRI* (rs9340799) при пациенти и контроли

Ген Полиморфизъм	Група	Случаи, N (%)			HWE		Контроли, N (%)			HWE	
		XX	Xx	xx	χ^2	p	XX	Xx	xx	χ^2	p
<i>ESRI</i> (XbaI, X/x)	Обща група	21 (20.0)	56 (53.3)	28 (26.7)	0.54	0.46	30 (14.3)	114 (54.3)	66 (31.4)	2.95	0.09
	Мъже	2 (10.5)	11 (57.9)	6 (31.6)	0.85	0.36	6 (15.8)	24 (63.2)	8 (21.0)	2.7	0.1
	Жени	19 (22.1)	45 (52.3)	22 (25.6)	0.2	0.66	24 (14.0)	90 (52.3)	58 (33.7)	1.36	0.24

Таблица 4.38. Разпределение на генотипните честоти на *ESRI* (rs2234693) при пациенти и контроли

Ген Полиморфизъм	Група	Случаи, N (%)			HWE		Контроли, N (%)			HWE	
		PP	Pp	pp	χ^2	p	PP	Pp	pp	χ^2	p
<i>ESRI</i> (PvuII, P/p)	Обща група	32 (30.5)	56 (53.3)	17 (16.2)	0.83	0.36	39 (18.6)	119 (56.7)	52 (24.7)	3.98	0.05
	Мъже	4 (21.1)	11 (57.8)	4 (21.1)	0.47	0.49	7 (18.4)	23 (60.5)	8 (21.1)	1.7	0.19
	Жени	28 (32.6)	45 (52.3)	13 (15.1)	0.54	0.46	32 (18.6)	96 (55.8)	44 (25.6)	2.55	0.11

Полиморфизмите показаха съответствие със закона на Hardy-Weinberg. При сравняване на генотипните и алелните честоти на общата група от пациенти с контролната се наблюдаваха сигнификантни разлики за *ESRI* (PvuII) полиморфизма (PP vs. Pp vs. pp, $p=0.032$ и P vs. p, $p=0.02$, χ^2 -тест). За другият полиморфизъм - *ESRI* (XbaI) не бяха отчетени сигнификантни разлики в общата извадка (XX vs. Xx vs. xx, $p=0.38$ и X vs. x, $p=0.21$, χ^2 -тест).

Генотипните и алелните честоти на изследваните полиморфни маркери в контролната група не се различаваха съществено от тези, съобщени от Kamenarska et al. (2012) за българска популация (PP vs. Pp vs. pp, $p = 0.55$, P vs. p, $p = 0.74$ и XX vs. Xx vs. xx, $p = 0.55$, X vs. x, $p = 0.47$, χ^2 -тест) [306].

На базата на тези резултати, хомозиготният генотип PP на *ESRI* (PvuII) би могъл да се разглежда като самостоятелен предразполагащ фактор за идиопатична сколиоза при българските пациенти.

Проучването на Inoue et al. (2002) върху връзката между прогресията на сколиозата и *ESRI* гена в японска популация при проследяване на 304 пациенти (ъгъл на Cobb над 10^0) показва по-висока честота на X алела при прогресивните случаи, дефинирани от авторите като случаи с прогресия на кривата над 5^0 до завършване на растежа спрямо първоначалната рентгенографска оценка (Xx vs. xx, $p = 0.03$) и по-високи измерени стойности на средния ъгъл на Cobb при носителство на X алела (XX+Xx vs. xx, $p=0.002$). Според авторите пациенти с генотип XX и Xx притежават по-висок риск от прогресия, налагаща оперативно лечение (Xx vs. Xx vs. xx, 21.4%, 24.7% vs. 7.6%, $P < 0.001$). В допълнение, учените установяват, че честотата на пациентите, достигнали скелетна зрялост на 16 години или по-късно, е по-висока при генотипите XX и Xx в сравнение с xx (33.3%, 29.9% vs. 16.8%, $P = 0.013$). [119].

В китайска популация от 202 пациенти (Cobb 25^0 - 125^0) и 174 контроли Wu et al. (2006) установяват, че честотата на XX генотипа на *ESRI* (XbaI) е повишена при

пациентите с АИС ($p=0.005$), а X алелът е по-често срещан в сравнение с контроли ($p=0.001$). Авторите установяват, че при момичета с ръст над 160 см и ъгъл на сколиозата над 40° честотата на XX генотипа е по-висока в сравнение с контроли ($p=0.001$ и $p<0.001$, респективно). Въз основа на тези резултати, учените стигат до заключението, че полиморфизмът *ESR1* (XbaI) може да бъде асоцииран с повишен риск от развитие на идиопатична сколиоза в китайската популация [123].

Друг колектив [126] прави проучване в по-голяма извадка от китайската популация на асоциацията между *ESR1* и предразположението към идиопатична сколиоза сред 540 момичета с АИС (Cobb над 20°) и 260 здрави доброволци и между прогресията на сколиозата и *ESR1* в група от 364 пациенти с АИС, проследени до завършване на растежа. Генотипният и хаплотипният анализ не показват връзка между рестрикционните полиморфизми *ESR1* (XbaI) и *ESR1* (PvuII) и началото или прогресията на идиопатичната сколиоза [126].

Впоследствие, при изследване на връзката между модела на двойна първична крива и *ESR1* гена в проучване, обхванало 67 пациенти с АИС и двойна крива (Cobb $>30^{\circ}$) и 100 контроли, Zhao et al. (2009) установяват статистически значими разлики между пациенти с: 1) двойни криви, 2) ъгъл на Cobb $\geq 40^{\circ}$, 3) торакална сколиоза и здрави контроли по отношение на другия полиморфен вариант - *ESR1* (PvuII) ($p=0.014$, $p=0.0128$ и $p=0.0184$, съответно) в китайска популация [124].

В най-голямото асоциативно проучване между *ESR1* (XbaI) и идиопатичната сколиоза, сравняващо 798 пациенти с АИС (Cobb $>15^{\circ}$) и 637 съответстващи им по пол контроли, асоциацията между полиморфен вариант *ESR1* (XbaI), предразположението и прогресията на АИС не е потвърдена в японска популация [127].

Мета-анализ на 4 големи проучвания в азиатската популация (1827 случая/1253 контроли) не открива значима асоциация на *ESR1* (XbaI) с АИС (X vs. x, OR=1.09, 95 % CI: 0.96-1.23, $p = 0.17$), но не изключва потенциално участие на този полиморфен вариант при прогресията на АИС [128].

Първото публикувано изследване на асоциацията между *ESR1* и АИС в европейска популация не открива никаква връзка между рестрикционните полиморфизми, предразположението и тежестта на деформацията при изследване на 287 момичета с АИС (Cobb 10° - 114°) и 182 здрави контроли от полски произход [145]. Учените не откриват връзка между *ESR1* и възрастта на менархе при общо 208 момичета с АИС, но установяват сигнификантни разлики при групиране на пациентите в зависимост от тежестта на сколиозата, като групата с ъгъл на Cobb $\geq 50^{\circ}$ има по-голяма средна възраст на менархе в сравнение с леката и умерената форма на сколиоза [144]. Техните резултати потвърждават правопрпорционалната зависимост между късното менархе и прогресията на деформацията.

На таблица 4.39 са представени ORs, получени при сравняване генотипните и алелните честоти на *ESR1* (XbaI) между отделните подгрупи от български пациенти и контроли.

Таблица 4.39. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти и контроли (case-control study)

Подгрупа	Модел на генно влияние	Генотип, Алел	p (χ^2 -тест)	OR [95% CI]
Обща група ($n_1=105$, $n_2=210$)	Кодоминантен	XX vs. xx	0.17	1.65 [0.81-3.36]
	Доминантен	XX + Xx vs. xx	0.38	1.26 [0.75-2.12]
	Рецесивен	XX vs. Xx + xx	0.19	1.50 [0.81-2.77]
	Алелен	X vs. x	0.21	1.24 [0.89-1.73]
АИС ($n_1=78$, $n_2=210$)	Кодоминантен	XX vs. xx	0.82	1.10 [0.49-2.49]
	Доминантен	XX + Xx vs. xx	0.92	1.03 [0.59-1.81]
	Рецесивен	XX vs. Xx + xx	0.81	1.09 [0.53-2.25]
	Алелен	X vs. x	0.84	1.04 [0.71-1.50]

ЮИС (n ₁ =23, n ₂ =210)	Кодоминантен	XX vs. xx Xx vs. xx	0.02* 0.19*	5.13 [1.24-21.2] 2.43 [0.67-8.84]
	Доминантен	XX + Xx vs. xx	0.09*	3.06 [0.88-10.6]
	Рецесивен	XX vs. Xx + xx	0.06*	2.63 [1.00-6.92]
	Алелен	X vs. x	0.03*	2.01 [1.08-3.73]
Фамилни случаи (n ₁ =28, n ₂ =210)	Кодоминантен	XX vs. xx	0.78*	1.20 [0.41-3.55]
	Доминантен	XX + Xx vs. xx	0.52*	0.71 [0.31-1.60]
	Рецесивен	XX vs. Xx + xx	0.4*	1.64 [0.61-4.37]
	Алелен	X vs. x	1*	0.99 [0.56-1.74]
Спорадични случаи (n ₁ =77, n ₂ =210)	Кодоминантен	XX vs. xx	0.11	1.94 [0.86-4.40]
	Доминантен	XX + Xx vs. xx	0.12	1.62 [0.88-2.98]
	Рецесивен	XX vs. Xx + xx	0.28	1.45 [0.73-2.88]
	Алелен	X vs. x	0.12	1.34 [0.93-1.94]
Cobb >40⁰ (n ₁ =84, n ₂ =210)	Кодоминантен	XX vs. xx	0.13	1.80 [0.84-3.84]
	Доминантен	XX + Xx vs. xx	0.38	1.29 [0.73-2.28]
	Рецесивен	XX vs. Xx + xx	0.13	1.64 [0.86-3.13]
	Алелен	X vs. x	0.17	1.29 [0.90-1.84]
Cobb <40⁰ (n ₁ =21, n ₂ =210)	Кодоминантен	XX vs. xx	1*	1.10 [0.26-4.70]
	Доминантен	XX + Xx vs. xx	1*	1.15 [0.43-3.09]
	Рецесивен	XX vs. Xx + xx	1*	1.00 [0.28-3.60]
	Алелен	X vs. x	0.87*	1.06 [0.56-2.01]
Мъже (n ₁ =19, n ₂ =38)	Кодоминантен	XX vs. xx	0.65*	0.44 [0.07-3.03]
	Доминантен	XX + Xx vs. xx	0.52*	0.58 [0.17-2.00]
	Рецесивен	XX vs. Xx + xx	0.71*	0.63 [0.11-3.45]
	Алелен	X vs. x	0.55*	0.72 [0.33-1.60]
Жени (n ₁ =86, n ₂ =172)	Кодоминантен	XX vs. xx	0.06	2.09 [0.96-4.54]
	Доминантен	XX + Xx vs. xx	0.18	1.48 [0.83-2.64]
	Рецесивен	XX vs. Xx + xx	0.1	1.75 [0.90-3.41]
	Алелен	X vs. x	0.08	1.39 [0.96-2.01]

*Fisher's Exact Test (two-tailed); n₁- брой пациенти, n₂- брой контроли.

В общата извадка и в групата на АИС не се наблюдаваха статистически значими разлики между пациенти и контроли ($p > 0.05$, χ^2 -тест). Тези резултати потвърждават липсата на асоциация между полиморфен маркер *ESRI* (XbaI) и АИС, докладвана в най-големите проучвания в китайска [126] и в японска популация [127].

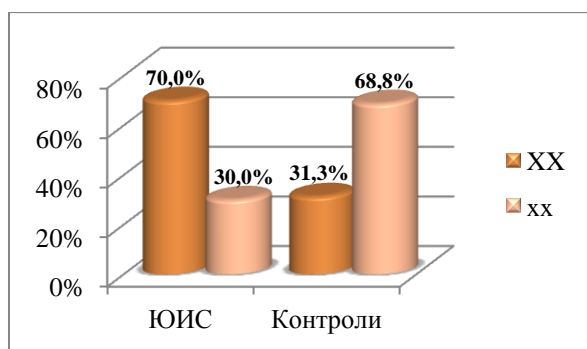
При сравняване на пациенти с ЮИС с контроли обаче, бяха отчетени сигнификантни разлики (XX vs. xx, $p = 0.02$, OR=5.13, 95% CI: 1.24-21.2 и X vs. x, $p = 0.03$, OR=2.01, 95% CI: 1.08-3.73, Fisher's Exact Test). При разделяне групата на ЮИС на прогресивна и непрогресивна сколиоза бяха отчетени статистически значими разлики само между оперативните случаи и контролите (XX vs. xx, $p = 0.04$, OR=5.5, 95% CI: 1.01-30.0 и X vs. x, $p = 0.056$, OR=2.12, 95% CI: 1.00-4.52, Fisher's Exact Test). При сравняване на групата от случаи с ранно начало до 6-годишна възраст (ИИС + ЮИС) с контролите се наблюдава статистически значима асоциация (XX vs. xx, $p = 0.017$ и X vs. x, $p = 0.013$, Fisher's Exact Test). Възможно е през пубертета XX генотипът да се свързва с прогресия на деформациите, които имат ранно начало. Генотипът хх би могъл да има протективен ефект, респективно. Тези резултати изискват потвърждаване при разширени и репликативни проучвания.

В подгрупата и на фамилните и на нефамилните случаи генотипните и алелните честоти на *ESRI* (XbaI) не се различаваха съществено от тези на контролите (табл. 4.39). Няма данни за други изследвания на гена при фамилната идиопатична сколиоза.

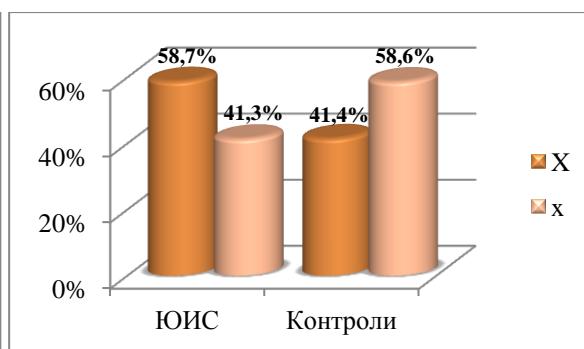
В групата на прогресивната сколиоза също не бяха отчетени статистически значими резултати (табл. 4.39). Следователно, *ESRI* (XbaI) не може да се разглежда като модифициращ генетичен фактор за идиопатична сколиоза при български пациенти, асоцииран с тежка прогресия на кривата (ъгъл на Cobb >40⁰), водеща до

необходимост от оперативно лечение, но *ESRI* би могъл да изпълнява ролята на ген-модификатор в късните етапи от патогенезата (през пубертета) при сколиозата с ранно начало. Тези резултати потвърждават получената от полски учени негативна асоциация между полиморфизма и прогресивната АИС при пациенти от двата пола [145]. След разделяне на пациентите и контролите по пол също не се наблюдаваха статистически значими разлики (табл. 4.39).

По-долу са представени графично кодоминантен генотипен модел и алелен модел в подгрупата на ЮИС (фиг. 4.33-4.34).



Фиг. 4. 33. Кодоминантен модел на генно влияние GG/(GC+CC) при ЮИС.



Фиг. 4. 34. Процентно разпределение на алелите X и x при пациенти с ЮИС и контроли.

На таблица 4.40 са представени ORs, получени при сравняване генотипните и алелните честоти на *ESRI* (PvuII) между отделните подгрупи от пациенти и контроли.

Таблица 4.40. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти и контроли (case-control study)

Подгрупа	Модел на генно влияние	Генотип, Алел	p (χ^2 -тест)	OR [95% CI]
Обща група (n ₁ =105, n ₂ =210)	Кодоминантен	PP vs. pp	0.01	2.51 [1.22-5.16]
		Pp vs. pp	0.57	1.20 [0.63-2.27]
	Доминантен	PP + Pp vs. pp	0.08	1.70 [0.93-3.12]
	Рецесивен	PP vs. Pp + pp	0.02	1.92 [1.12-3.30]
АИС (n ₁ =78, n ₂ =210)	Кодоминантен	PP vs. pp	0.08	2.00 [0.90-4.42]
		PP + Pp vs. pp	0.22	1.50 [0.78-2.90]
	Рецесивен	PP vs. Pp + pp	0.12	1.62 [0.88-2.97]
	Алелен	P vs. p	0.1	1.36 [0.94-1.96]
ЮИС (n ₁ =23, n ₂ =210)	Кодоминантен	PP vs. pp	0.06*	4.00 [1.02-15.7]
		PP + Pp vs. pp	0.3*	2.19 [0.63-7.68]
	Рецесивен	PP vs. Pp + pp	0.03*	2.82 [1.14-6.98]
	Алелен	P vs. p	0.04*	1.93 [1.03-3.62]
Фамилни случаи (n ₁ =28, n ₂ =210)	Кодоминантен	PP vs. pp	0.04*	5.33 [1.07-26.5]
		Pp vs. pp	0.17*	3.28 [0.73-14.7]
	Доминантен	PP + Pp vs. pp	0.05*	4.28 [0.98-18.6]
	Рецесивен	PP vs. Pp + pp	0.31*	1.75 [0.72-4.27]
Спорадични случаи (n ₁ =77, n ₂ =210)	Кодоминантен	PP vs. pp	0.05	2.13 [0.99-4.59]
		Pp vs. pp	0.82	0.92 [0.47-1.83]
	Доминантен	PP + Pp vs. pp	0.35	1.36 [0.71-2.59]
	Рецесивен	PP vs. Pp + pp	0.02	1.99 [1.10-3.60]
Алелен	P vs. p	0.06	1.43 [0.99-2.08]	

Cobb >40° (n ₁ =84, n ₂ =210)	Кодоминантен	PP vs. pp	0.05	2.08 [0.98-4.42]
	Доминантен	PP + Pp vs. pp	0.29	1.40 [0.75-2.62]
	Рецесивен	PP vs. Pp + pp	0.03	1.86 [1.04-3.33]
	Алелен	P vs. p	0.06	1.40 [0.98-2.01]
Cobb <40° (n ₁ =21, n ₂ =210)	Кодоминантен	PP vs. pp Pp vs. pp	0.004* 0.03*	Infinity** Infinity**
	Доминантен	PP + Pp vs. pp	0.01*	Infinity**
	Рецесивен	PP vs. Pp + pp	0.15*	2.19 [0.83-5.79]
	Алелен	P vs. p	0.02*	2.26 [1.16-4.42]
Мъже (n ₁ =19, n ₂ =38)	Кодоминантен	PP vs. pp	1*	1.14 [0.21-6.37]
	Доминантен	PP + Pp vs. pp	1*	1.00 [0.26-3.86]
	Рецесивен	PP vs. Pp + pp	1*	1.18 [0.30-4.67]
	Алелен	P vs. p	1*	1.05 [0.48-2.30]
Жени (n ₁ =86, n ₂ =172)	Кодоминантен	PP vs. pp Pp vs. pp	0.01 0.51	2.96 [1.33-6.59] 1.27 [0.62-2.61]
	Доминантен	PP + Pp vs. pp	0.06	1.93 [0.98-3.82]
	Рецесивен	PP vs. Pp + pp	0.01	2.11 [1.17-3.82]
	Алелен	P vs. p	0.01	1.64 [1.13-2.37]

*Fisher's Exact Test (two-tailed); n₁- брой пациенти, n₂- брой контроли.

**в подгрупата на непрогресивната сколиоза не се срещат пациенти с генотип pp

В общата извадка честотата на PP генотипа и на P алела беше по-висока при пациенти в сравнение с контроли (PP vs. pp, $p = 0.01$, OR=2.51, 95% CI: 1.22-5.16 и P vs. p, $p = 0.02$, OR=1.51, 95% CI: 1.08-2.11, χ^2 -тест). Носителството на хомозиготния PP генотип се свързва с 1.6 пъти по-висок риск от развитие на идиопатична сколиоза по рецесивен модел на генно влияние (PP vs. Pp+pp, RR=1.64, 95% CI: 1.1-2.46), а на P алел – с 1.2 пъти по-висок риск (P vs. p, RR=1.22, 95% CI: 1.19-1.53).

Получените различия с изследването на Janusz et al. (2013) не могат да се обяснят с разлики в популационните честоти, тъй като генотипните и алелните честоти на изследваните полиморфни маркери в контролната група не се различават съществено при български и полски пациенти (PP vs. Pp vs. pp, $p = 0.21$, P vs. p, $p = 0.35$, χ^2 -тест). В същото време полските учени включват в проучването си само пациенти с АИС [145]. При анализ в различните възрастови групи, полиморфният вариант *ESR1* (PvuII) не показва асоциация с АИС, което съответства на предходните изследвания върху АИС [123, 126, 145], но показва статистически значима асоциация с ЮИС, отново по рецесивен модел (PP vs. Pp+pp, $p = 0.03$, OR = 2.82, 95% CI: 1.14-6.98, Fisher's Exact Test). Тези резултати отново навеждат на мисълта, че е възможно участие на различни генетични полиморфизми в етиопатогенезата на ранната и на адолесцентната идиопатична сколиоза. Във всеки случай са необходими разширени популационни проучвания и репликативни проучвания за валидиране на настоящите резултати и уточняване ролята на *ESR1* (PvuII) за късната прогресия на инфантилната и ювенилната (ранна) идиопатична сколиоза.

В подгрупата и на фамилните и на нефамилните случаи генотипните честоти на *ESR1* (PvuII) се различаваха значително от тези на контролите, съответно при кодоминантен за фамилната и при рецесивен модел на генно влияние за спорадичната идиопатична сколиоза (табл. 4.40). Няма данни за други изследвания на връзката на гена *ESR1* с фамилната история на идиопатичната сколиоза. Положителната асоциация, наблюдавана в групата на спорадичните случаи, отново би могла да се обясни с връзка с идиопатичната сколиоза с ранно начало.

При пациентите с прогресивна сколиоза, довела до необходимост от оперативно лечение, честотата на хомозиготния PP генотип и на P алела също беше по-висока в сравнение с контроли (PP vs. Pp+pp, $p = 0.03$, OR = 1.86, 95% CI: 1.04-3.33, χ^2 -тест).

Носителството на хомозиготния PP генотип се свързва с 1.6 пъти по-висок риск (PP vs. Pp+pp, RR=1.6, 95% CI: 1.04-2.47) от прогресия на деформацията при рецесивен модел на генно влияние в общата група. Тези резултати дават основание хомозиготният генотип PP на *ESR1* (PvuII) да се разглежда като модифициращ генетичен фактор за идиопатична сколиоза при български пациенти, асоцииран с прогресия на кривата (ъгъл на Cobb >40°). При разглеждане само на адолесцентната прогресивна сколиоза, такава зависимост не се наблюдаваше (PP vs. Pp+pp, p = 0.11, OR = 1.68, 95% CI: 0.88-3.20, χ^2 -тест), а се наблюдаваше връзка с прогресивната ранна сколиоза (ИИС + ЮИС) (PP vs. Pp+pp, p = 0.02, OR = 3.19, 95% CI: 1.2-8.45, Fisher's Exact Test).

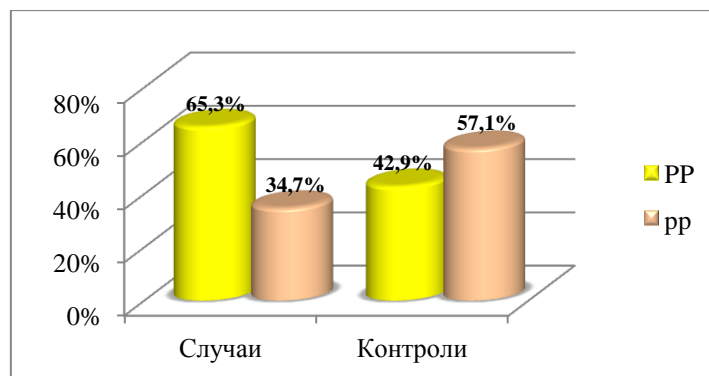
Корелационният анализ на Spearman показва връзка между възрастта към началото на сколиозата и достигнатият предоперативен ъгъл на кривата в групата на ЮИС (R=0,605; p=0.002). По литературни данни, прогнозата е по-лоша при начало на ЮИС до 6-годишна възраст, тази ранна сколиоза се характеризира със сериозен риск от прогресия [20]. Високи стойности на предоперативните ъгли бяха наблюдавани и при случаите с ИИС. Колкото по-малко е детето по време на поставяне на диагнозата, толкова по-голям е рискът от прогресия на деформацията и предоперативният ъгъл на Cobb е по-голям.

При сравняване на групата от случаи с ранно начало до 6-годишна възраст (ИИС + ЮИС) с контролите се наблюдава статистически значима асоциация (PP vs. pp, p=0.004 и P vs. p, p=0.003, Fisher's Exact Test).

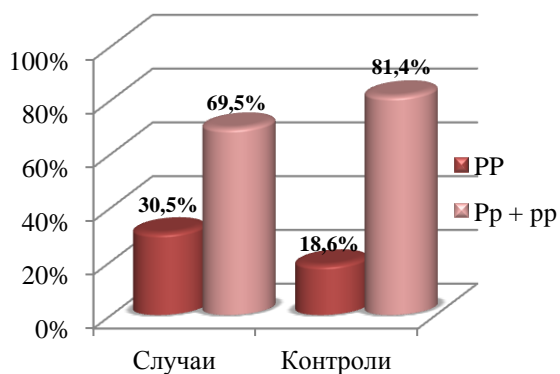
Тези резултати показват, че генотипът PP на *ESR1* (PvuII) може да е свързан с късните етапи от прогресията (през пубертета) най-вече на ранната (инфантилна и ювенилна идиопатична сколиоза с изява до 6-годишна възраст).

След разделяне по пол, само при момичетата се наблюдаваше статистически значима асоциация между *ESR1* (PvuII) и патологичния фенотип (табл. 4.40).

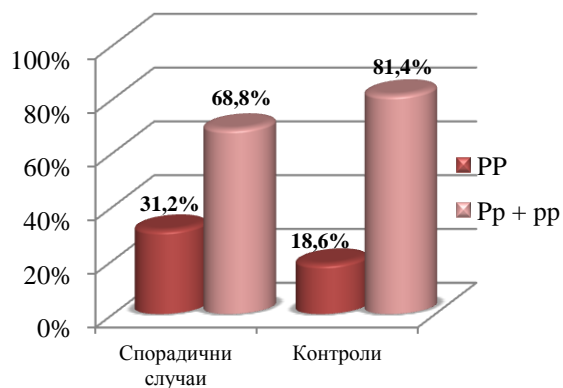
На фиг. 4.35 е представен кодоминантен модел на генно влияние в общата група. На фиг. 4.36-4.41 са представени графично рецесивни модели на генно влияние в общата група и в подгрупите.



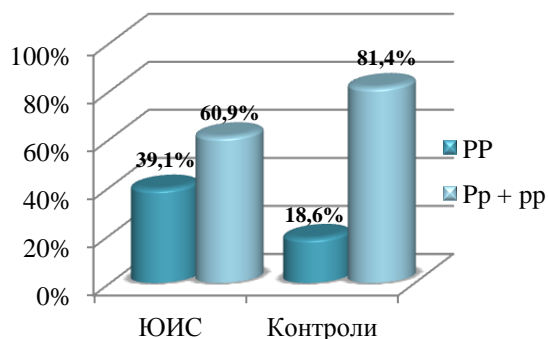
Фиг. 4. 35. Кодоминантен модел на генно влияние PP vs. pp в общата извадка.



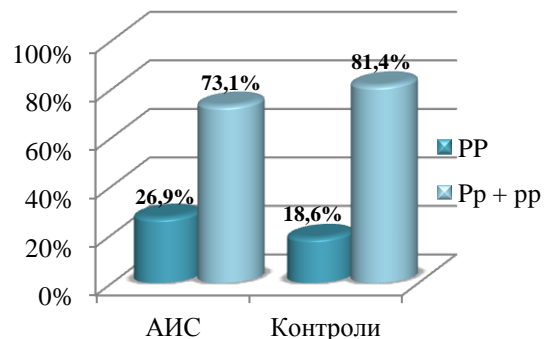
Фиг. 4. 36. Рецесивен модел на генно влияние PP/(Pp+pp) в общата извадка.



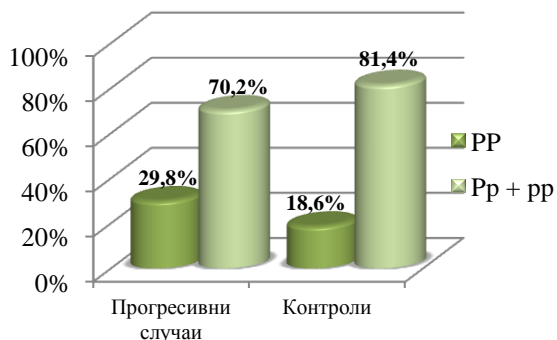
Фиг. 4. 37. Рецесивен модел на генно влияние PP/(Pp+pp) при спорадични случаи.



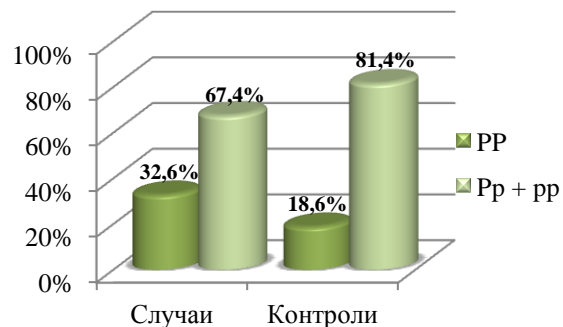
Фиг. 4. 38. Рецесивен модел на генно влияние PP/(Pp+pp) при ЮИС.



Фиг. 4. 39. Рецесивен модел на генно влияние PP/(Pp+pp) при АИС (p>0.05).



Фиг. 4. 40. Рецесивен модел на генно влияние PP/(Pp+pp) при прогресивна сколиоза.



Фиг. 4. 41. Рецесивен модел на генно влияние PP/(Pp+pp) при лица от женски пол.

Пациентите с прогресивна сколиоза бяха разделени на две подгрупи според проведеното корсетолечение, като при сравняването им не беше открита статистически значима връзка между *ESR1* (XbaI) и прогресията на деформацията ($p > 0.05$, χ^2 -тест).

По отношение на другия полиморфизъм - *ESR1* (PvuII) се наблюдаваха сигнификантни разлики между двете подгрупи от пациенти, с преобладаване на PP генотипа при пациентите с предшестващо корсетолечение (PP vs. Pp+pp, $p=0.04$, OR=2.94, 95% CI: 1.03-8.47, χ^2 -тест). Тези резултати още веднъж показват, че

хомозиготният генотип PP на *ESRI* (PvuII) би могъл да бъде свързан с повишен риск от прогресия на деформацията. Odds ratios са дадени в таблица 4.41 и 4.42.

Таблица 4.41. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти (case-only study)

Подгрупа	Модел на генно влияние	Генотип, Алел	р-стойност (χ^2 -тест)	OR [95% CI]
Cobb >40⁰ Корсетолечение/без корсетолечение (n ₁ =49, n ₂ =34)	Кодоминантен	XX vs. xx	0.2	2.36 [0.62-9.03]
	Доминантен	XX + Xx vs. xx	0.48	1.44 [0.53-3.90]
	Рецесивен	XX vs. Xx + xx	0.2	2.09 [0.67-6.56]
	Алелен	X vs. x	0.23	1.46 [0.78-2.72]
Торакална/ тораколумбална+лумбална първична крива (n ₁ =62, n ₂ =43)	Кодоминантен	XX vs. xx	0.31	1.88 [0.56-6.27]
	Доминантен	XX + Xx vs. xx	0.81	1.11 [0.46-2.67]
	Рецесивен	XX vs. Xx + xx	0.2	1.97 [0.70-5.57]
	Алелен	X vs. x	0.38	1.28 [0.74-2.23]
Тораколумбална/ торакална+лумбална първична крива (n ₁ =31, n ₂ =74)	Кодоминантен	XX vs. xx	0.74*	0.71 [0.18-2.82]
	Доминантен	XX + Xx vs. xx	0.63*	1.36 [0.51-3.63]
	Рецесивен	XX vs. Xx + xx	0.29*	0.50 [0.15-1.62]
	Алелен	X vs. x	0.88*	0.92 [0.51-1.66]
Лумбална/ тораколумбална+торакална първична крива (n ₁ =12, n ₂ =93)	Кодоминантен	XX vs. xx	0.68*	0.48 [0.08-2.78]
	Доминантен	XX + Xx vs. xx	0.3*	0.46 [0.13-1.59]
	Рецесивен	XX vs. Xx + xx	1*	0.78 [0.16-3.86]
	Алелен	X vs. x	0.39*	0.65 [0.27-1.57]

*Fisher's Exact Test (two-tailed)

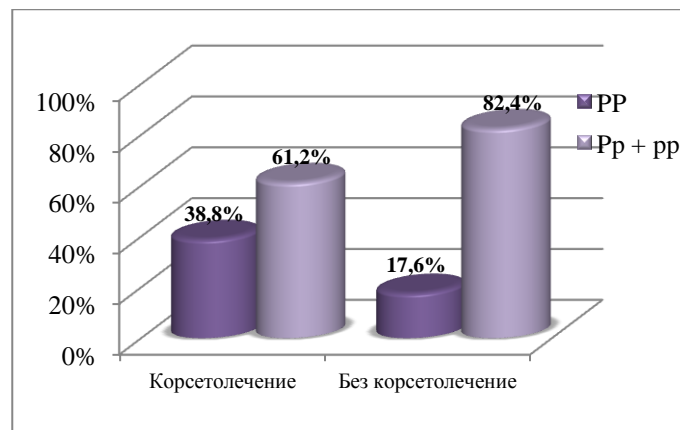
При сравняване подгрупите от пациенти с торакална, тораколумбална и лумбална сколиоза не беше установена статистически значима връзка с изследваните полиморфизми ($p > 0.05$, χ^2 -тест, Fisher's Exact Test). Следователно, *ESRI* (XbaI) и *ESRI* (PvuII) не могат да бъдат свързани с типа на кривата (табл. 4.41 и 4.42).

Таблица 4.42. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти (case-only study)

Подгрупа	Модел на генно влияние	Генотип, Алел	р-стойност (χ^2 -тест)	OR [95% CI]
Cobb >40⁰ Корсетолечение/без корсетолечение (n ₁ =49, n ₂ =34)	Кодоминантен	PP vs. pp	0.09	3.17 [0.83-12.13]
	Доминантен	PP + Pp vs. pp	0.41	1.58 [0.53-4.72]
	Рецесивен	PP vs. Pp + pp	0.04	2.96 [1.03-8.47]
	Алелен	P vs. p	0.07	1.78 [0.95-3.32]
Торакална/ тораколумбална+лумбална първична крива (n ₁ =62, n ₂ =43)	Кодоминантен	PP vs. pp	0.21	2.15 [0.65-7.13]
	Доминантен	PP + Pp vs. pp	0.27	1.79 [0.63-5.08]
	Рецесивен	PP vs. Pp + pp	0.37	1.49 [0.63-3.53]
	Алелен	P vs. p	0.24	1.39 [0.80-2.43]
Тораколумбална/ торакална+лумбална първична крива (n ₁ =31, n ₂ =74)	Кодоминантен	PP vs. pp	0.24	0.48 [0.14-1.67]
	Доминантен	PP + Pp vs. pp	0.25	0.54 [0.18-1.57]
	Рецесивен	PP vs. Pp + pp	0.5	0.72 [0.28-1.86]
	Алелен	P vs. p	0.29	0.73 [0.40-1.32]
Лумбална/ тораколумбална+торакална първична крива (n ₁ =12, n ₂ =93)	Кодоминантен	PP vs. pp	1*	0.78 [0.12-5.16]
	Доминантен	PP + Pp vs. pp	1*	0.96 [0.19-4.84]
	Рецесивен	PP vs. Pp + pp	0.75*	0.74 [0.19-2.92]
	Алелен	P vs. p	0.83*	0.87 [0.37-2.05]

*Fisher's Exact Test (two-tailed)

На фиг. 4.42. е показан графично рецесивен модел на генно влияние в зависимост от проведеното корсетолечение.



Фиг. 4. 42. Рecessивен модел на генно влияние PP/(Pp+pp) в зависимост от корсетолечението.

Анализ на комбинациите от генотипите на двата полиморфизма не показва статистически значими асоциации с началото или прогресията на идиопатичната сколиоза в общата извадка ($p > 0.05$, χ^2 -тест).

В заключение, полиморфизмът *ESR1* (XbaI) не показва връзка с предразположението към идиопатична сколиоза или с прогресията на кривата в общата извадка, но XX генотипът показва връзка с прогресивната ранна сколиоза.

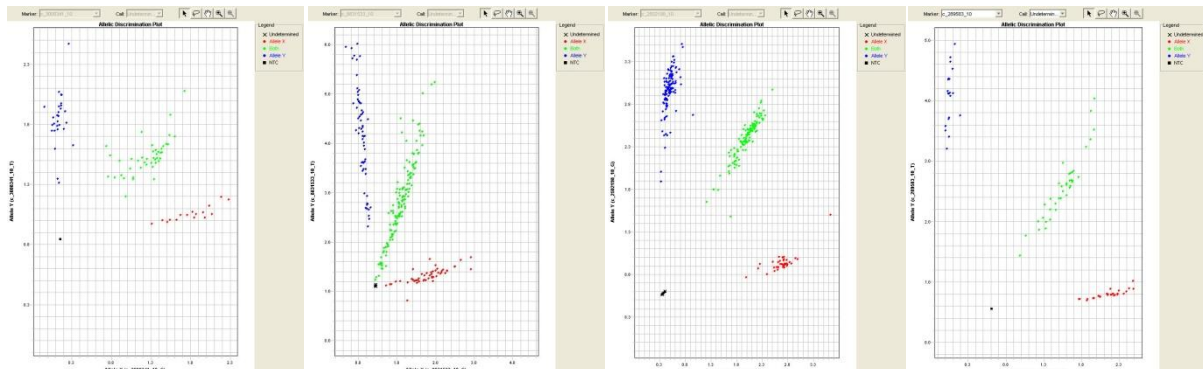
Рискът от прогресия е основната разлика между ювенилния и adolescentния тип сколиоза. Пациентите с ЮИС по-често развиват тежки деформации и според различни проучвания 27% до 80% от изследваните случаи с ЮИС се нуждаят от оперативно лечение, докато при АИС тежка прогресия се наблюдава само при 0,1% от пациентите [198]. Изследванията на Ward et al. (2010) показват, че началото на АИС се унаследява независимо от типа на кривата и нейната тежест [307]. Изглежда, че генетичните маркери за АИС се различават от тези при ЮИС [308].

При *ESR1* (PvuII) се наблюдава асоциация с предразположението към сколиоза в общата извадка, както и при разделяне по пол, фамилна история и прогресия на заболяването, но не се наблюдава асоциация с adolescentната, а само с ранната форма на прогресивната сколиоза при групиране на случаите според началото на заболяването.

Следователно, *ESR1* (XbaI) и *ESR1* (PvuII) биха могли да имат връзка с прогресията в периода на пубертета на идиопатичната сколиоза с ранно начало (преди 10-годишна възраст) и не показват връзка с предразположението или прогресията на АИС при български пациенти.

2.4. Резултати от SNP генотипирането чрез TaqMan PCR в реално време

Чрез технологията TaqMan PCR в реално време бяха генотипирани общо 7 SNPs. На фиг. 4.43 са показани алел-дискриминационни плотове на част от тях.

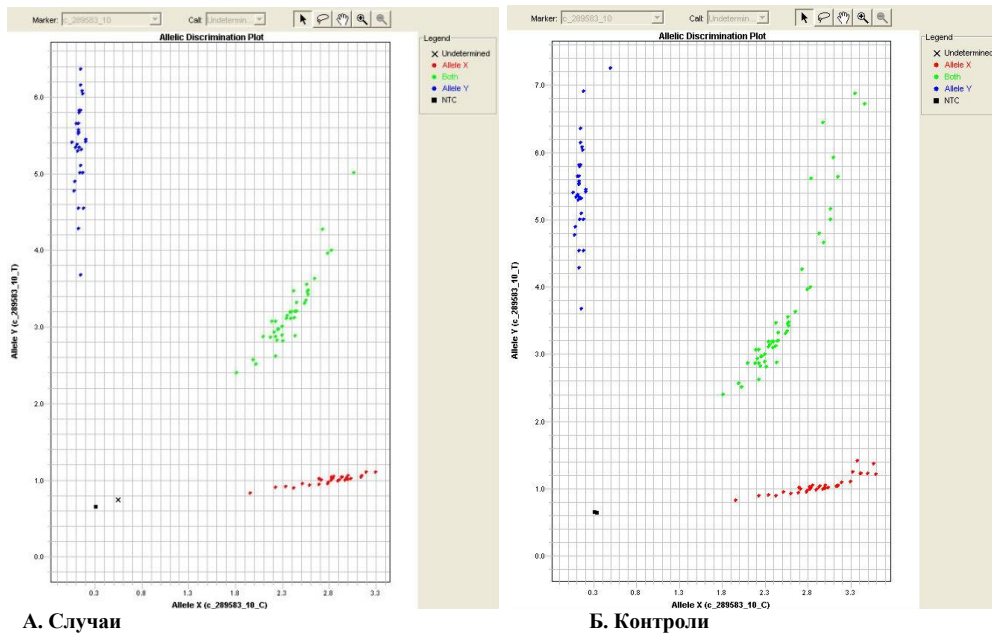


А. *IL17RC* (rs708567 G/A) Б. *CHLI* (rs1400180 T/G) В. *GPR126* (rs6570507 A/G) Г. *MTNR1B* (rs4753426 T/C)
Фиг. 4.43. Алел-дискриминационни плотове от SNP генотипирането чрез TaqMan Real Time PCR.

2.4.1. Мелатонинов рецептор тип 1В - *MTNR1B* (rs4753426, T/C)

Честотата на функционалния полиморфизъм *MTNR1B* (rs4753426 T/C) беше проучена в групата като цяло и в отделните подгрупи от пациенти с идиопатична сколиоза и беше сравнена с тази на неродствени индивиди без клинични белези на сколиоза (case-control study) или с други подгрупи от пациенти (case-only study). Асоциацията в отделните подгрупи беше проучена по генотипен (кододоминантен, доминантен и рецесивен) и алелен модел.

На фиг. 4.44 е показан алел-дискриминационен плот с резултати от генотипирането на *MTNR1B* (rs4753426 T/C) при случаи и контроли.



Фиг. 4.44. Алел-дискриминационен плот за *MTNR1B* (rs4753426 T/C) при случаи и контроли. Със син цвят са представени хомозиготите див тип (ТТ), с червен цвят са хомозиготите по вариантния алел (СС), а със зелен цвят са хетерозиготите (ТС).

Генотипните и алелните честоти на изследвания полиморфизъм и анализ на равновесието по Hardy-Weinberg (HWE) са представени на таблица 4.43.

Таблица 4.43. Разпределение на генотипните честоти при пациенти и контроли.

Ген Полиморфизъм	Група	Случаи, N (%)			HWE		Контроли, N (%)			HWE	
		ТТ	ТС	СС	χ^2	p	ТТ	ТС	СС	χ^2	p
<i>MTNR1B</i> (rs4753426 T/C)	Обща група	21 (20.0)	53 (50.5)	31 (29.5)	0.04	0.85	59 (28.1)	93 (44.3)	58 (27.6)	2.74	0.1
	Мъже	4 (21.1)	7 (36.8)	8 (42.1)	1.0	0.32	9 (23.7)	17 (44.7)	12 (31.6)	0.38	0.54
	Жени	17 (19.8)	46 (53.5)	23 (26.7)	0.48	0.49	50 (29.1)	76 (44.2)	46 (26.7)	2.31	0.13

Полиморфизмът показва съответствие със закона на Hardy-Weinberg при контролите. В общата група от пациенти се наблюдава допустимо отклонение, което може да се дължи на асоциация с патологичния фенотип.

При сравняване на общите генотипни и алелни честоти на *MTNR1B* (rs4753426 T/C) между случаи и контроли не се наблюдаваха сигнификантни разлики (CC vs. TC vs. TT, $p=0.29$ и C vs. T, $p=0.24$, χ^2 -тест). На базата на тези резултати полиморфизмът *MTNR1B* (rs4753426 T/C) не може да се разглежда като самостоятелен предразполагащ фактор за идиопатична сколиоза при българските пациенти.

Унагарските изследователи Morocz et al. (2011) не намират връзка между полиморфизма и началото на АИС, но изследват взаимодействията му с други полиморфизми и докладват положителни асоциации между началото на АИС и генотипни комбинации: *MTNR1B-MMP3*, *MTNR1B-Lep*, *MTNR1B-BMP4* [93].

В групата на АИС не се наблюдаваха статистически значими разлики между пациенти и контроли ($p>0.05$, χ^2 -тест). Тези резултати потвърждават липсата на асоциация между полиморфен маркер *MTNR1B* (rs4753426 T/C) и АИС, докладвана при унгарски пациенти [93], американски пациенти [89, 92] и японски пациенти [94]. В подгрупата на ЮИС, обаче се наблюдаваше резултат, близък до статистическа значимост (CC + CT vs. TT, $p=0.047$, OR= 4.1, 95% CI: 0.93-18.05, Fisher's Exact Test). Необходими са разширени проучвания за установяване на връзката между *MTNR1B* (rs4753426 T/C) и ранната идиопатична сколиоза.

В подгрупата и на фамилните и на нефамилните случаи също нямаше статистически значими разлики между генотипните и алелните честоти на *MTNR1B* (rs4753426 T/C) на пациенти и контроли ($p>0.05$, χ^2 -тест, Fisher's Exact Test).

При пациентите с прогресивна сколиоза също не бяха отчетени статистически значими резултати ($p>0.05$, χ^2 -тест). Следователно, *MTNR1B* (rs4753426 T/C) не може да се разглежда като модифициращ генетичен фактор за идиопатична сколиоза при български пациенти, асоцииран с тежка прогресия на кривата (ъгъл на Cobb $>40^0$), водеща до необходимост от оперативно лечение. Тези резултати потвърждават наблюдаваната от унгарски учени единична негативна асоциация между полиморфизма и прогресивната идиопатична сколиоза [93]. При пациентите с непрогресивна сколиоза също не бяха отчетени статистически значими резултати ($p>0.05$, Fisher's Exact Test). След разделяне на пациентите и контролите по пол също не се наблюдаваха статистически значими разлики ($p>0.05$, χ^2 -тест, Fisher's Exact Test).

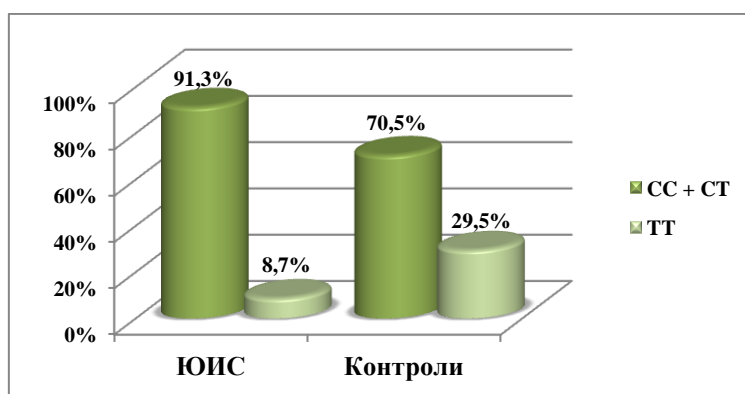
На таблица 4.44 са представени ORs, получени при сравняване генотипните и алелните честоти на *MTNR1B* (rs4753426 T/C) между отделните подгрупи от български пациенти и контроли.

Таблица 4.44. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти и контроли (case-control study)

Подгрупа	Модел на генно влияние	Генотип, Алел	p (χ^2 -тест)	OR [95% CI]
Обща група (n ₁ =105, n ₂ =210)	Кодоминантен	CC vs. TT	0.23	1.50 [0.77-2.91]
	Доминантен	CC vs. CT + TT	0.72	1.10 [0.65-1.84]
	Рецесивен	CC + CT vs. TT	0.12	1.56 [0.89-2.75]
	Алелен	C vs. T	0.24	1.22 [0.88-1.70]
АИС (n ₁ =78, n ₂ =210)	Кодоминантен	CC vs. TT	0.34	1.41 [0.70-2.86]
	Доминантен	CC vs. CT + TT	0.72	1.13 [0.60-2.12]
	Рецесивен	CC + CT vs. TT	0.39	1.30 [0.71-2.39]
	Алелен	C vs. T	0.31	1.21 [0.84-1.75]
ЮИС (n ₁ =23, n ₂ =210)	Кодоминантен	CC vs. TT	0.44*	2.54 [0.47-13.6]
	Доминантен	CC vs. CT + TT	0.61*	0.66 [0.23-1.94]
	Рецесивен	CC + CT vs. TT	0.047*	4.1 [0.93-18.05]
	Алелен	C vs. T	0.44*	1.31 [0.71-2.42]
Фамилни случаи (n ₁ =28, n ₂ =210)	Кодоминантен	CC vs. TT	0.41	1.63 [0.50-5.27]
	Доминантен	CC vs. CT + TT	1	0.95 [0.38-2.40]
	Рецесивен	CC + CT vs. TT	0.27	1.80 [0.65-4.95]
	Алелен	C vs. T	0.47	0.81 [0.46-1.43]
Спорадични случаи (n ₁ =77, n ₂ =210)	Кодоминантен	CC vs. TT	0.31	1.46 [0.70-3.05]
	Доминантен	CC vs. CT + TT	1	1.02 [0.53-1.93]
	Рецесивен	CC + CT vs. TT	0.21	1.49 [0.80-2.79]
	Алелен	C vs. T	0.36	0.84 [0.58-1.22]
Cobb >40° (n ₁ =84, n ₂ =210)	Кодоминантен	CC vs. TT	0.33	1.41 [0.70-2.86]
	Доминантен	CC vs. CT + TT	1	1.01 [0.54-1.90]
	Рецесивен	CC + CT vs. TT	0.24	1.43 [0.78-2.62]
	Алелен	C vs. T	0.39	0.85 [0.60-1.22]
Cobb <40° (n ₁ =21, n ₂ =210)	Кодоминантен	CC vs. TT	0.49*	2.03 [0.49-8.52]
	Доминантен	CC vs. CT + TT	1*	0.95 [0.34-2.69]
	Рецесивен	CC + CT vs. TT	0.21*	2.34 [0.67-8.25]
	Алелен	C vs. T	0.42*	0.76 [0.40-1.44]
Мъже (n ₁ =19, n ₂ =38)	Кодоминантен	CC vs. TT	0.72*	1.50 [0.34-6.58]
	Доминантен	CC vs. CT + TT	0.56*	1.58 [0.50-4.92]
	Рецесивен	CC + CT vs. TT	1*	1.16 [0.31-4.41]
	Алелен	C vs. T	0.55*	1.31 [0.59-2.89]
Жени (n ₁ =86, n ₂ =172)	Кодоминантен	CC vs. TT	0.31	1.47 [0.70-3.09]
	Доминантен	CC vs. CT + TT	1	1.00 [0.56-1.79]
	Рецесивен	CC + CT vs. TT	0.11	1.66 [0.89-3.11]
	Алелен	C vs. T	0.32	1.20 [0.83-1.74]

*Fisher's Exact Test (two-tailed); n₁- брой пациенти, n₂- брой контроли.

На фиг. 4.45 е представен графично рецесивен генотипен модел при ЮИС.



Фиг. 4. 45. Рецесивен модел на генно влияние (CC + CT) / TT при сравняване на ЮИС и контроли (p=0.047, Fisher's Exact Test).

Пациентите с прогресивна сколиоза бяха разделени на две подгрупи според проведеното корсетолечение, като при сравняването им не беше открита статистически значима връзка между *MTNR1B* (rs4753426 T/C) и прогресията на сколиозата ($p > 0.05$, χ^2 -тест).

При сравняване подгрупите от пациенти с торакална, тораколумбална и лумбална сколиоза беше установена статистически значима връзка между изследвания полиморфизъм и торакалния модел крива (TT vs. CC, $p=0.03$, OR=3.75, 95% CI: 1.02-13.8 и TT vs. CT + CC, $p=0.02$, OR=3.68, 95% CI: 1.14-11.9, χ^2 -тест). Следователно, *MTNR1B* (rs4753426 T/C) корелира с типа на кривата. Генотипът TT е свързан с близо 3 пъти по-висок риск от засягане на торакалния отдел (RR=2.95, 95% CI: 1.07-8.15) в сравнение с другите отдели на гръбначния стълб без да е самостоятелно свързан с началото на сколиозата.

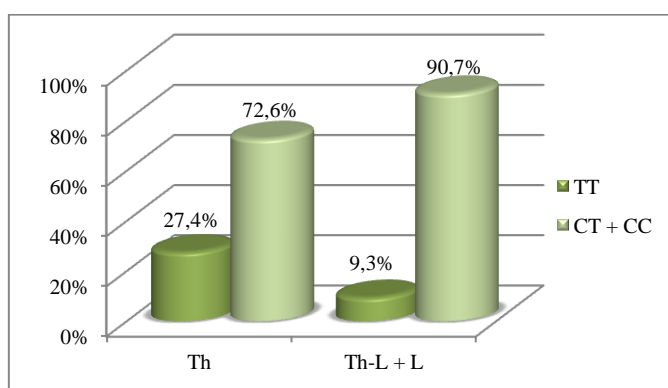
Odds ratios в отделните подгрупи от пациенти са дадени в таблица 4.45.

Таблица 4.45. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти (case-only study)

Подгрупа	Модел на генно влияние	Генотип, Алел	p (χ^2 -тест)	OR [95% CI]
Cobb >40° Корсетолечение/без корсетолечение (n ₁ =49, n ₂ =34)	Кодоминантен	CC vs. TT	0.22	2.17 [0.62-7.60]
	Доминантен	CC vs. CT + TT	0.22	2.17 [0.62-7.60]
	Рецесивен	CC + CT vs. TT	0.46	1.51 [0.51-4.53]
	Алелен	C vs. T	0.19	1.52 [0.81-2.84]
Торакална/ тораколумбална+лумбална първична крива (n ₁ =62, n ₂ =43)	Кодоминантен	TT vs. CC TT vs. CT	0.03 0.04	3.75 [1.02-13.8] 3.52 [1.04-11.9]
	Доминантен	TT + CT vs. CC	0.31	1.54 [0.66-3.59]
	Рецесивен	TT vs. CT + CC	0.02	3.68 [1.14-11.9]
	Алелен	T vs. C	0.05	1.74 [0.99-3.06]
Тораколумбална/ торакална+лумбална първична крива (n ₁ =31, n ₂ =74)	Кодоминантен	CC vs. TT	0.35	2.02 [0.54-7.61]
	Доминантен	CC vs. CT + TT	0.81	1.20 [0.49-2.98]
	Рецесивен	CC + CT vs. TT	0.29	2.01 [0.62-6.56]
	Алелен	C vs. T	0.35	1.33 [0.73-2.42]
Лумбална/ тораколумбална+торакална първична крива (n ₁ =12, n ₂ =93)	Кодоминантен	CC vs. TT	0.07*	Infinity
	Доминантен	CC vs. CT + TT	0.5*	1.84 [0.54-6.32]
	Рецесивен	CC + CT vs. TT	0.12*	Infinity
	Алелен	C vs. T	0.13*	2.18 [0.86-5.51]

*Fisher's Exact Test (two-tailed)

На фиг. 4.46 е представен графично рецесивен генотипен модел при сравняване на основните видове криви.



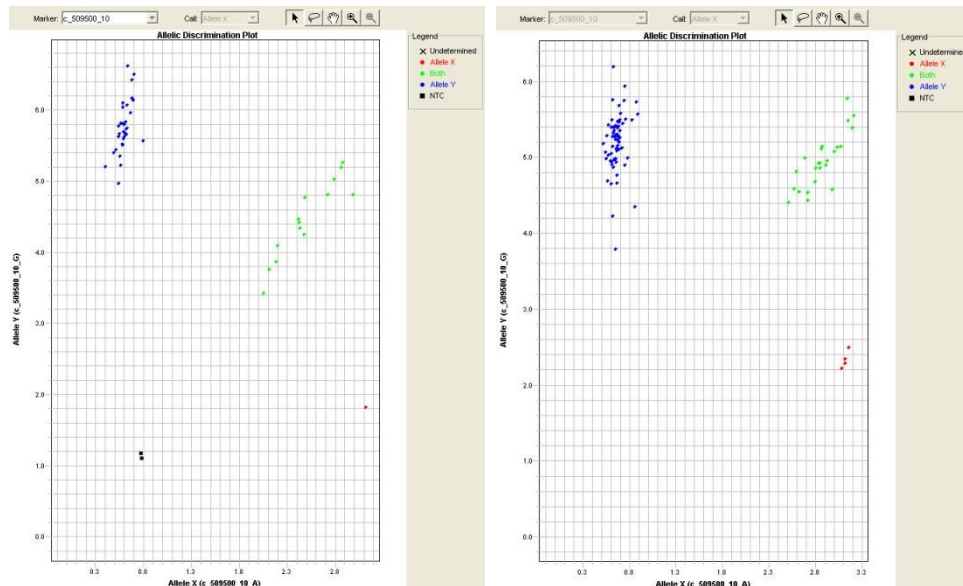
Фиг. 4. 46. Рецесивен модел на генно влияние TT / (CC + CT) при сравняване на торакалния (Th) тип крива със сбора от тораколумбалния (Th-L) и лумбалния (L) тип крива ($p=0.02$, χ^2 -тест).

В заключение, функционалният полиморфизъм *MTNR1B* (rs4753426 T/C) не може да бъде разглеждан като предразполагащ и модифициращ генетичен вариант за идиопатична сколиоза със самостоятелно значение. Резултатите за ЮИС налагат разширено проучване върху връзката му с ранната идиопатична сколиоза. Корелацията с торакалния тип крива предполага, че дивият тип алел може да има участие при прогресията на деформацията в комбинация с други алели, като такъв синергичен ефект на полиморфни варианти в етиопатогенезата на идиопатичната сколиоза е изследван и докладван [93].

2.4.2. Хромодомен хеликаза свързващ белтък-7 - *CHD7* (rs4738824, G/A)

Честотата на полиморфизъм *CHD7* (rs4738824 G/A), показал асоциация с идиопатичната сколиоза при цялостен анализ за скаченост, беше проучена в общата група и в отделните подгрупи от пациенти и беше сравнена с тази на неродствени индивиди без сколиоза (case-control study) или с други подгрупи пациенти (case-only study). Асоциацията беше проучена по генотипен (доминантен) и алелен модел.

На фиг. 4.47 е показан алел-дискриминационен плот с резултати от генотипирането на *CHD7* (rs4738824 G/A) при случаи и контроли.



Фиг. 4.47. Алел-дискриминационен плот за *CHD7* (rs4738824 G/A) при случаи (вляво) и контроли (вдясно). Със син цвят са представени хомозиготите див тип (GG), с червен цвят са хомозиготите по вариантния алел (AA), а със зелен цвят са хетерозиготите (GA).

Генотипните и алелните честоти на изследвания полиморфизъм и анализ на равновесието по Hardy-Weinberg (HWE) са представени на таблица 4.46.

Таблица 4.46. Разпределение на генотипните честоти при пациенти и контроли.

Ген Полиморфизъм	Група	Случаи, N (%)			HWE		Контроли, N (%)			HWE	
		GG	GA	AA	χ^2	p	GG	GA	AA	χ^2	p
<i>CHD7</i> (rs4738824 G/A)	Обща група	65 (61.9)	38 (36.2)	2 (1.9)	1.8	0.18	135 (64.3)	64 (30.5)	11 (5.2)	0.87	0.35
	Мъже	13 (68.4)	5 (26.3)	1 (5.3)	0.29	0.59	29 (76.3)	9 (23.7)	0 (0)	0.69	0.41
	Жени	52 (60.5)	33 (38.4)	1 (1.2)	2.9	0.09	106 (61.6)	55 (32.0)	11 (6.4)	1.09	0.3

Полиморфизмът показва съответствие със закона на Hardy-Weinberg. При сравняване на общите генотипни и алелни честоти на *CHD7* (rs4738824 G/A) между случаи и контроли не се наблюдаваха сигнификантни разлики (GG vs. GA + AA, $p=0.68$ и G vs. A, $p=0.89$, χ^2 -тест). На базата на тези резултати полиморфизмът *CHD7* (rs4738824 G/A) не може да се разглежда като самостоятелен предразполагащ фактор за идиопатична сколиоза при българските пациенти.

Генът *CDH7* (8q12) показва връзка с идиопатичната сколиоза след непараметричен анализ за скаченост в кавказка популация (53 фамилии: 130 засегнати индивиди) [224]. Авторите смятат, че има поне един функционален полиморфизъм, свързан с предразположението към идиопатична сколиоза. Предварителни резултати от полско проучване показват липса на асоциация между *CHD7* (rs4738824) и предразположението към АИС при момичета с прогресивна и непрогресивна сколиоза и с отрицателна фамилна анамнеза [226].

В групата на АИС не се наблюдаваха статистически значими разлики между български пациенти и контроли ($p>0.05$, χ^2 -тест). Тези резултати потвърждават липсата на асоциация между полиморфен маркер *CHD7* (rs4738824 G/A) и АИС, докладвана при полски пациенти [226]. В подгрупата на ЮИС също не се наблюдаваха статистически значими разлики между пациенти и контроли ($p>0.05$, χ^2 -тест).

В подгрупата и на фамилните и на нефамилните случаи също нямаше статистически значими разлики между генотипните и алелните честоти на *CHD7* (rs4738824 G/A) на пациенти и контроли ($p>0.05$, χ^2 -тест).

При пациентите с прогресивна сколиоза също не бяха отчетени статистически значими резултати ($p>0.05$, χ^2 -тест). Следователно, *CHD7* (rs4738824 G/A) не може да се разглежда като модифициращ генетичен фактор за идиопатична сколиоза при български пациенти, асоцииран с тежка прогресия на кривата (Ъгъл на Cobb $>40^\circ$), водеща до необходимост от оперативно лечение. При пациентите с непрогресивна сколиоза също не бяха отчетени статистически значими резултати ($p>0.05$, χ^2 -тест).

След разделяне на пациентите и контролите по пол също не се наблюдаваха статистически значими разлики ($p>0.05$, χ^2 -тест, Fisher's Exact Test).

Резултатите са обобщени на таблица 4.47.

Таблица 4.47. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти и контроли (case-control study)

Подгрупа	Ген	Генотип, Алел	p (χ^2 -тест)	OR [95% CI]
Обща група ($n_1=105$, $n_2=210$)	<i>CHD7</i> (rs4738824)	GG vs. AG+AA	0.68	0.90 [0.56-1.47]
		G vs. A	0.89	1.03 [0.68-1.56]
АИС ($n_1=78$, $n_2=210$)	<i>CHD7</i> (rs4738824)	GG vs. AG+AA	0.53	0.84 [0.49-1.44]
		G vs. A	0.86	1.04 [0.66-1.64]
ЮИС ($n_1=23$, $n_2=210$)	<i>CHD7</i> (rs4738824)	GG vs. AG+AA	0.92	1.04 [0.42-2.57]
		G vs. A	0.89	1.06 [0.49-2.28]
Фамилни случаи ($n_1=28$, $n_2=210$)	<i>CHD7</i> (rs4738824)	GG vs. AG+AA	0.46	0.74 [0.33-1.65]
		G vs. A	0.86	0.94 [0.48-1.87]
Спорадични случаи ($n_1=77$, $n_2=210$)	<i>CHD7</i> (rs4738824)	GG vs. AG+AA	0.92	0.97 [0.56-1.67]
		G vs. A	0.79	1.06 [0.67-1.69]
Cobb $>40^\circ$ ($n_1=84$, $n_2=210$)	<i>CHD7</i> (rs4738824)	GG vs. AG+AA	1	1.00 [0.59-1.70]
		G vs. A	0.58	1.14 [0.72-1.80]
Cobb $<40^\circ$ ($n_1=21$, $n_2=210$)	<i>CHD7</i> (rs4738824)	GG vs. AG+AA	0.28	0.61 [0.25-1.51]
		G vs. A	0.39	0.73 [0.35-1.50]
Мъже ($n_1=19$, $n_2=38$)	<i>CHD7</i> (rs4738824)	GG vs. AG+AA	0.75*	0.67 [0.20-2.28]
		G vs. A	0.22*	0.45 [0.15-1.39]
Жени ($n_1=86$, $n_2=172$)	<i>CHD7</i> (rs4738824)	GG vs. AG+AA	0.86	0.95 [0.56-1.62]
		G vs. A	0.6	1.13 [0.72-1.77]

*Fisher's Exact Test (two-tailed); n_1 - брой пациенти, n_2 - брой контроли.

Пациентите с прогресивна сколиоза бяха разделени на две подгрупи според проведеното корсетолечение, като при сравняването им не беше открита статистически значима връзка между *CHD7* (rs4738824 G/A) и прогресията на сколиозата ($p > 0.05$, χ^2 -тест).

При сравняване подгрупите от пациенти с торакална, тораколумбална и лумбална сколиоза беше установена статистически значима връзка между изследвания полиморфизъм и тораколумбалния тип крива (GG vs. AG+AA, $p=0.01$, OR=3.54, 95% CI: 1.30-9.64 и G vs. A, $p=0.02$, OR=3.00, 95% CI: 1.19-7.54, χ^2 -тест). Следователно, *CHD7* (rs4738824 G/A) корелира с типа на кривата. Генотипът GG е свързан с близо 1.5 пъти по-висок риск от засягане на торакалния отдел на гръбначния стълб (RR=1.49, 95% CI: 1.14-1.96).

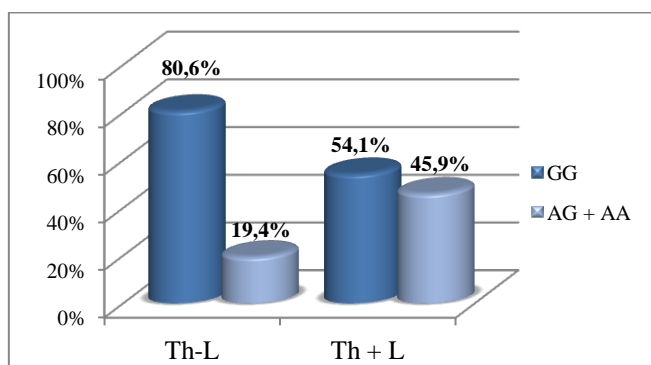
Odds ratios в отделните подгрупи от пациенти са дадени в таблица 4.48.

Таблица 4.48. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти (case-only study)

Подгрупа	Ген	Генотип, Ален	p (χ^2 -тест)	OR [95% CI]
Cobb >40° Корсетолечение/без корсетолечение (n ₁ =49, n ₂ =34)	<i>CHD7</i> (rs4738824)	GG vs. AG+AA G vs. A	0.89 0.78	0.94 [0.38-2.34] 0.89 [0.40-1.98]
Торакална/ тораколумбална+лумбална първична крива (n ₁ =62, n ₂ =43)	<i>CHD7</i> (rs4738824)	GG vs. AG+AA G vs. A	0.07 0.07	0.47 [0.20-1.08] 0.51 [0.24-1.06]
Тораколумбална/ торакална+лумбална първична крива (n ₁ =31, n ₂ =74)	<i>CHD7</i> (rs4738824)	GG vs. AG+AA G vs. A	0.01 0.02	3.54 [1.30-9.64] 3.00 [1.19-7.54]
Лумбална/ тораколумбална+торакална първична крива (n ₁ =12, n ₂ =93)	<i>CHD7</i> (rs4738824)	GG vs. AG+AA G vs. A	0.53* 0.59*	0.58 [0.17-1.93] 0.72 [0.27-1.94]

*Fisher's Exact Test (two-tailed)

На фиг. 4.48 е представен графично доминантен генотипен модел при сравняване на основните видове криви.



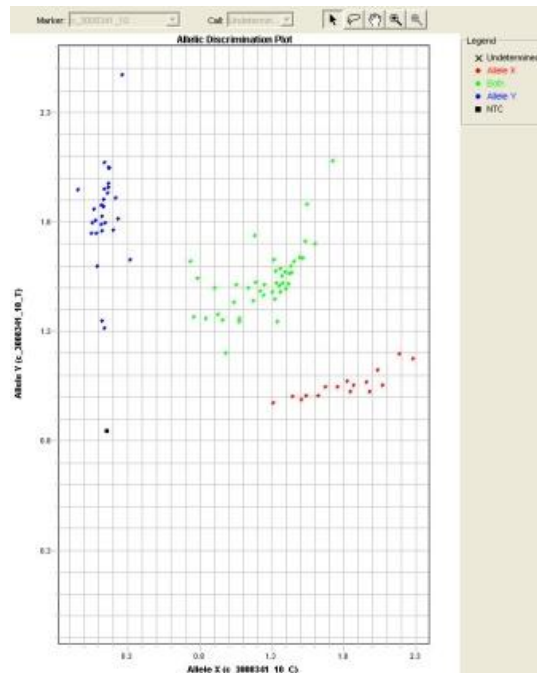
Фиг. 4. 48. Типове криви – доминантен модел

В заключение, полиморфизмът *CHD7* (rs4738824 G/A) не може да бъде разглеждан като предразполагащ и модифициращ генетичен вариант за идиопатична сколиоза със самостоятелно значение. Корелацията с тораколумбалния тип крива предполага, че дивият тип алел може да има участие при прогресията на деформацията в комбинация с други алели, такъв синергичен ефект в етиопатогенезата на идиопатичната сколиоза е изследван и докладван [93].

2.4.3. Рецетор за интерлевкин-17 – *IL17RC* (rs708567, G/A; S111L)

Честотата на функционалния полиморфизъм *IL17RC* (rs708567 G/A), показал асоциация с идиопатичната сколиоза при GWAS, беше определена в групата като цяло и в отделните подгрупи от пациенти и беше сравнена с тази на неродствени индивиди без клинични белези на сколиоза (case-control study) или с други подгрупи от пациенти (case-only study). Асоциацията в отделните подгрупи беше проучена при генотипен (кододоминантен, доминантен и рецесивен) и алелен модел.

На фиг. 4.49 е показан алел-дискриминационен плот с резултати от генотипирането на *IL17RC* (rs708567 G/A) при случаи и контроли.



Фиг. 4.49. Алел-дискриминационен плот за *IL17RC* (rs708567 G/A). Със син цвят са представени хомозиготите див тип (GG), с червен цвят са хомозиготите по вариантния алел (AA), а със зелен цвят са хетерозиготите (GA).

Генотипните и алелните честоти на *IL17RC* (rs708567 G/A) и анализ на равновесието по Hardy-Weinberg (HWE) са представени в таблица 4.49.

Таблица 4.49. Разпределение на генотипните честоти при пациенти и контроли.

Ген Полиморфизъм	Група	Случаи, N (%)			HWE		Контроли, N (%)			HWE	
		GG	GA	AA	χ^2	p	GG	GA	AA	χ^2	p
<i>IL17RC</i> (rs708567 G/A)	Обща група	22 (21.0)	48 (45.7)	35 (33.3)	0.54	0.46	82 (39.0)	97 (46.2)	31 (14.8)	0.07	0.79
	Мъже	2 (10.5)	11 (57.9)	6 (31.6)	0.85	0.36	18 (47.4)	15 (39.5)	5 (13.1)	0.43	0.51
	Жени	20 (23.3)	37 (43.0)	29 (33.7)	1.45	0.23	64 (37.2)	82 (47.7)	26 (15.1)	0.001	0.97

Полиморфизмът показва съответствие със закона на Hardy-Weinberg. Генотипните и алелните честоти на *IL17RC* (rs708567 G/A) се различаваха съществено при пациенти и контроли (AA vs. GA vs. GG, $p < .0001$ и A vs. G, $p < .0001$, χ^2 -тест).

На базата на тези резултати функционалният полиморфизъм *IL17RC* (rs708567 G/A) може да се разглежда като самостоятелен предразполагащ фактор за идиопатична сколиоза при българските пациенти.

На таблица 4.50 са представени ORs, получени при сравняване на отделните подгрупи от български пациенти и контроли.

Таблица 4.50. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти и контроли (case-control study)

Подгрупа	Модел на генно влияние	Генотип, Алел	p (χ^2 -тест)	OR [95% CI]
Обща група (n ₁ =105, n ₂ =210)	Кодоминантен	AA vs. GG	<0.0001	4.21 [2.14-8.26]
		AG vs. GG	0.04	1.84 [1.03-3.31]
	Доминантен	AA + AG vs. GG	0.001	2.42 [1.40-4.17]
	Рецесивен	AA vs. AG + GG	0.0001	2.89 [1.65-5.04]
	Алелен	A vs. G	<0.0001	2.11 [1.50-2.95]
АИС (n ₁ =78, n ₂ =210)	Кодоминантен	AA vs. GG	<0.0001	5.90 [2.72-12.8]
		AG vs. GG	0.02	2.34 [1.16-4.71]
	Доминантен	AA + AG vs. GG	0.0003	3.20 [1.66-6.18]
	Рецесивен	AA vs. AG + GG	<0.0001	3.42 [1.88-6.21]
	Алелен	A vs. G	<0.0001	2.49 [1.71-3.63]
ЮИС (n ₁ =23, n ₂ =210)	Кодоминантен	AA vs. GG	0.52*	1.65 [0.50-5.44]
		AG vs. GG	1*	1.06 [0.40-2.80]
	Доминантен	AA + AG vs. GG	0.82*	1.20 [0.49-2.96]
	Рецесивен	AA vs. AG + GG	0.54*	1.60 [0.55-4.64]
	Алелен	A vs. G	0.52*	1.26 [0.68-2.34]
Фамилни случаи (n ₁ =28, n ₂ =210)	Кодоминантен	AA vs. GG	0.0001	7.94 [2.38-26.5]
		AG vs. GG	0.11	2.54 [0.79-8.16]
	Доминантен	AA + AG vs. GG	0.01	3.84 [1.29-11.5]
	Рецесивен	AA vs. AG + GG	0.0003	4.33 [1.87-10.0]
	Алелен	A vs. G	0.0001	2.95 [1.65-5.28]
Спорадични случаи (n ₁ =77, n ₂ =210)	Кодоминантен	AA vs. GG	0.001	3.38 [1.61-7.10]
		AG vs. GG	0.1	1.69 [0.89-3.20]
	Доминантен	AA + AG vs. GG	0.01	2.10 [1.16-3.81]
	Рецесивен	AA vs. AG + GG	0.004	2.46 [1.32-4.57]
	Алелен	A vs. G	0.0009	1.87 [1.29-2.71]
Cobb >40° (n ₁ =84, n ₂ =210)	Кодоминантен	AA vs. GG	0.0001	3.90 [1.91-7.96]
		AG vs. GG	0.12	1.65 [0.88-3.08]
	Доминантен	AA + AG vs. GG	0.007	2.19 [1.23-3.92]
	Рецесивен	AA vs. AG + GG	0.0003	2.89 [1.60-5.22]
	Алелен	A vs. G	<0.0001	2.04 [1.42-2.92]
Cobb <40° (n ₁ =21, n ₂ =210)	Кодоминантен	AA vs. GG	0.01*	6.17 [1.5-25.39]
		AG vs. GG	0.1*	3.1 [0.83-11.49]
	Доминантен	AA + AG vs. GG	0.03*	3.84 [1.1-13.46]
	Рецесивен	AA vs. AG + GG	0.04*	2.89 [1.08-7.72]
	Алелен	A vs. G	0.008*	2.41 [1.26-4.61]
Мъже (n ₁ =19, n ₂ =38)	Кодоминантен	AA vs. GG	0.01*	10.8 [1.64-70.9]
		AG vs. GG	0.02*	6.6 [1.26-34.54]
	Доминантен	AA + AG vs. GG	0.008*	7.65 [1.55-37.8]
	Рецесивен	AA vs. AG + GG	0.15*	3.05 [0.79-11.7]
	Алелен	A vs. G	0.008*	3.13 [1.39-7.01]
Жени (n ₁ =86, n ₂ =172)	Кодоминантен	AA vs. GG	0.0005	3.57 [1.72-7.40]
		AG vs. GG	0.26	1.44 [0.77-2.72]
	Доминантен	AA + AG vs. GG	0.02	1.96 [1.09-3.52]
	Рецесивен	AA vs. AG + GG	0.0006	2.86 [1.55-5.27]
	Алелен	A vs. G	0.0004	1.93 [1.33-2.80]

*Fisher's Exact Test (two-tailed); n₁- брой пациенти, n₂- брой контроли.

Полиморфизмът *IL17RC* (rs708567, S111L) показва статистически значима асоциация с предразположението към АИС при американско проучване тип GWAS (137 случая/ 2126 контроли) [247]. Китайско репликативно проучване (648 случая/ 573 контроли) потвърждава връзката на *IL17RC* (rs708567) с възникването и прогресията на АИС [235].

В общата извадка от български пациенти и контроли честотата на хомозиготния АА генотип и на А алела беше по-висока при пациентите (АА vs. GG, $p < .0001$, OR=4.21, 95% CI: 2.14-8.26 и А vs. G, $p < .0001$, OR=2.11, 95% CI: 1.50-2.95, χ^2 -тест). Носителството на хомозиготния АА генотип се свързва с 2.26 пъти по-висок риск (АА vs. GA+GG, RR=2.26, 95% CI: 1.48-3.45), а на А алел – с 1.48 пъти по-висок риск (А vs. G, RR=1.48, 95% CI: 1.25-1.76) от развитие на идиопатична сколиоза при българи.

В подгрупата на АИС генотипните и алелните честоти на *IL17RC* (rs708567 G/A) също се различаваха при пациенти и контроли (АА vs. GG, $p < .0001$, OR=5.9, 95% CI: 2.72-12.8 и А vs. G, $p < .0001$, OR=2.49, 95% CI: 1.71-3.63, χ^2 -тест). Носителството на хомозиготния АА генотип се свързва с 2.52 пъти по-висок риск (АА vs. GA+GG, RR=2.52, 95% CI: 1.63-3.89), а на А алел – с 1.59 пъти по-висок риск (А vs. G, RR=1.59, 95% CI: 1.33-1.9) от развитие на АИС при българи.

Тези резултати дават основание функционалният полиморфизъм *IL17RC* (rs708567 G/A) да се разглежда като предразполагащ генетичен фактор за идиопатична и адолесцентна идиопатична сколиоза при български пациенти. Възможно е носителството на полиморфния А алел или на АА генотип да повлиява експресията на цитокиновия рецептор и цитокиновата сигнализация при механичен стрес върху гръбнака (асиметрично натоварване) и да повишава податливостта към деформация и към по-нататъшна прогресия на деформацията.

В подгрупата на ЮИС не се наблюдава асоциация с патологичния фенотип (табл. 4.50), което предполага наличие на различни предразполагащи фактори при ранната идиопатична сколиоза (преди 10 години) и тази с късно начало (след 10 години).

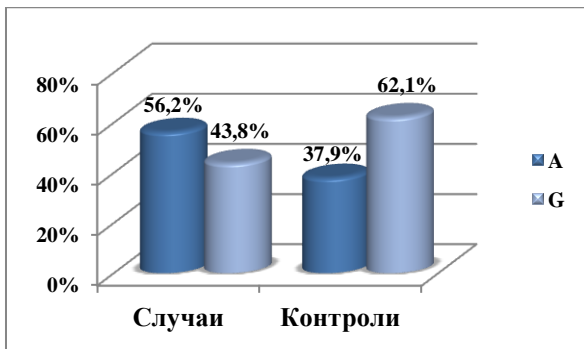
В подгрупата и на фамилените и на нефамилните случаи генотипните и алелните честоти на *IL17RC* (rs708567 G/A) се различаваха съществено от тези на контролите (табл. 4.50). Носителството на АА генотип и А алел се свързва, както с фамилената, така и със спорадичната форма на идиопатична сколиоза. Тъй като извадката от пациенти с фамилна история на сколиоза не отговаря по размер на тази от пациенти с отрицателна фамилна анамнеза, на този етап не може да се твърди със сигурност кога асоциацията е по-значима.

При пациентите с прогресивна сколиоза, довела до необходимост от оперативно лечение, честотата на хомозиготния АА генотип и на А алела също беше по-висока в сравнение с контроли (АА vs. GG, $p = 0.0001$, OR=3.90, 95% CI: 1.91-7.96 и А vs. G, $p < .0001$, OR=2.04, 95% CI: 1.42-2.92, χ^2 -тест). Тези резултати дават основание функционалният полиморфизъм *IL17RC* (rs708567 G/A) да се разглежда като модифициращ генетичен фактор за идиопатична сколиоза при български пациенти, асоцииран с тежка прогресия на кривата (ъгъл на Cobb $>40^\circ$). Носителството на хомозиготния АА генотип се свързва с 2.26 пъти по-висок риск (АА vs. GA+GG, RR=2.26, 95% CI: 1.45-3.52), а на А алел – с 1.46 пъти по-висок риск (А vs. G, RR=1.46, 95% CI: 1.22-1.76) от прогресия на деформацията при български пациенти.

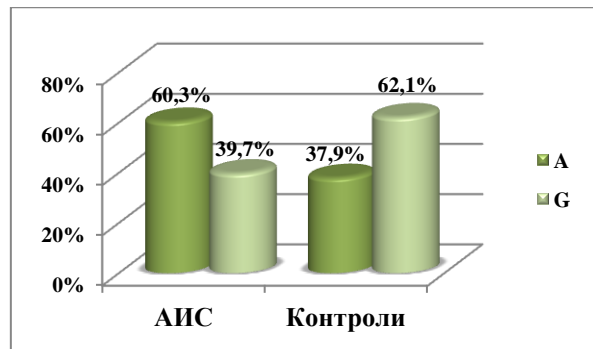
В допълнение, в групата на непрогресивната сколиоза също се наблюдават сигнификантни разлики между пациенти и контроли, които следва да бъдат потвърдени в по-голяма извадка (табл. 4.50).

След разделяне на пациентите и контролите по пол и при момчетата и при момчетата се наблюдаваше статистически значима асоциация между *IL17RC* (rs708567 G/A) и клиничния фенотип (табл. 4.50).

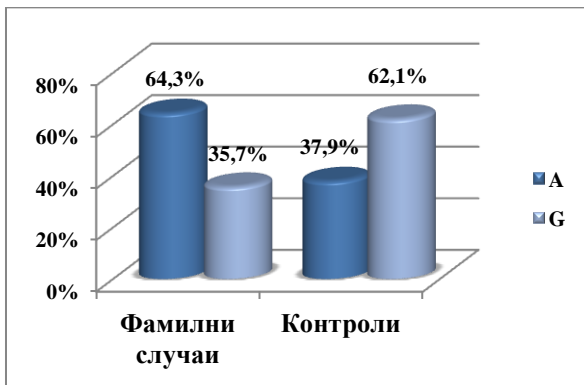
По-долу са представени графично алелни модели в общата група и в подгрупите на АИС, фамилна, спорадична, прогресивна, непрогресивна сколиоза и при всеки от двата пола (фиг. 4.50-4.57).



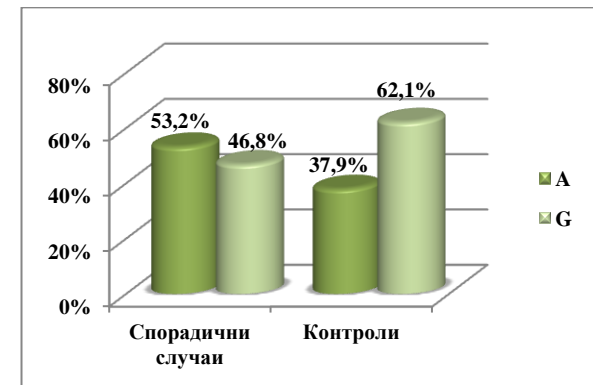
Фиг. 4. 50. Процентно разпределение на алелите А и G при пациенти и контроли в общата група.



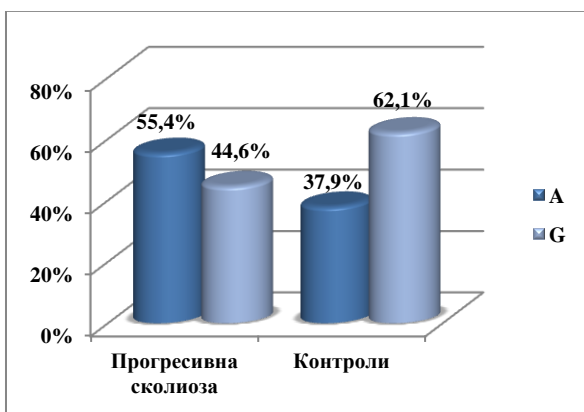
Фиг. 4. 51. Процентно разпределение на алелите А и G при пациенти с АИС и контроли.



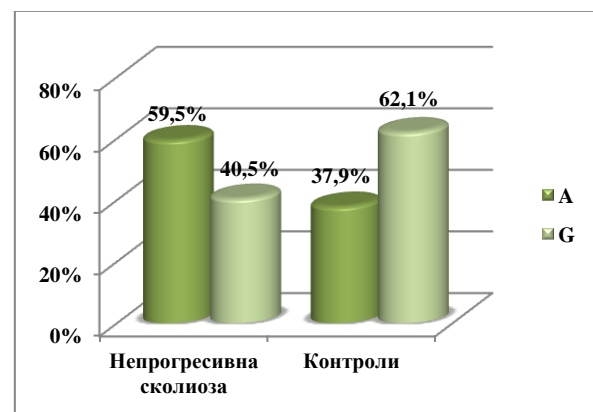
Фиг. 4. 52. Процентно разпределение на алелите А и G при случаи с положителна фамилна анамнеза и контроли.



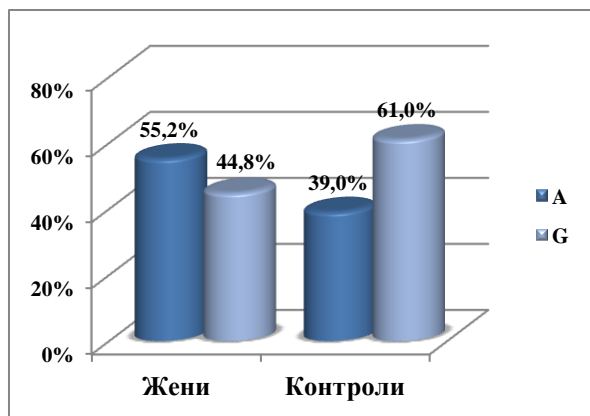
Фиг. 4. 53. Процентно разпределение на алелите А и G при случаи с отрицателна фамилна анамнеза и контроли.



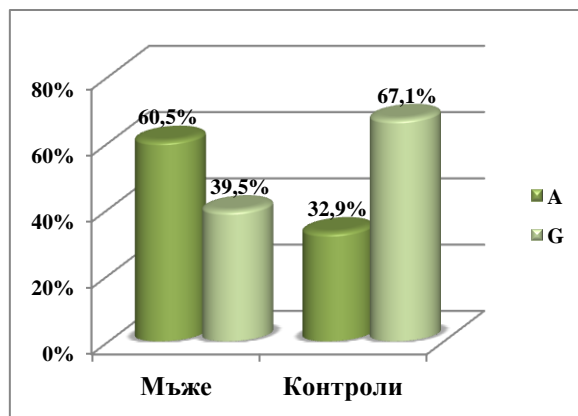
Фиг. 4. 54. Процентно разпределение на алелите А и G при случаи с прогресивна идиопатична сколиоза и контроли.



Фиг. 4. 55. Процентно разпределение на алелите А и G при случаи с непрогресивна идиопатична сколиоза и контроли.



Фиг. 4. 56. Процентно разпределение на алелите А и G при момичета с идиопатична сколиоза и контроли.



Фиг. 4. 57. Процентно разпределение на алелите А и G при момчета с идиопатична сколиоза и контроли.

Пациентите с прогресивна сколиоза бяха разделени на две подгрупи според проведеното корсетолечение, като при сравняването им не беше открита статистически значима връзка между полиморфизма и прогресията на сколиозата ($p > 0.05$, χ^2 -тест).

При сравняване подгрупите от пациенти с торакална, тораколумбална и лумбална сколиоза помежду им също не беше установена статистически значима връзка с изследвания полиморфизъм ($p > 0.05$, χ^2 -тест, Fisher's Exact Test). Следователно, *IL17RC* (rs708567 G/A) не може да бъде свързан с изхода от корсетолечението или с типа на кривата. Odds ratios в отделните подгрупи от пациенти са представени на таблица 4.51.

Таблица 4.51. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти (case-only study)

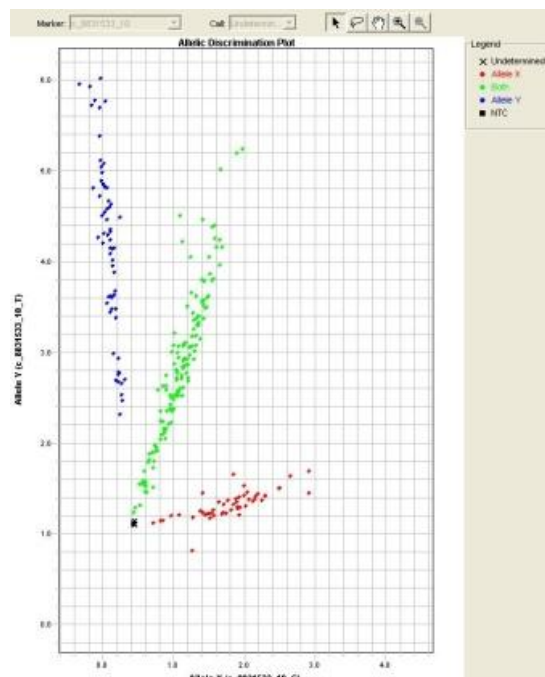
Подгрупа	Модел на генно влияние	Генотип, Алел	p (χ^2 -тест)	OR [95% CI]
Cobb >40 ⁰ Корсетолечение/без корсетолечение (n ₁ =49, n ₂ =34)	Кодоминантен	AA vs. GG	0.18	0.43 [0.13-1.48]
	Доминантен	AA + AG vs. GG	0.46	0.66 [0.22-1.98]
	Рецесивен	AA vs. AG + GG	0.1	0.46 [0.18-1.16]
	Алелен	A vs. G	0.12	0.61 [0.32-1.14]
Торакална/ тораколумбална+лумбална първична крива (n ₁ =62, n ₂ =43)	Кодоминантен	AA vs. GG	0.24	1.92 [0.65-5.69]
	Доминантен	AA + AG vs. GG	0.33	1.59 [0.62-4.10]
	Рецесивен	AA vs. AG + GG	0.33	1.52 [0.66-3.54]
	Алелен	A vs. G	0.22	1.41 [0.81-2.46]
Тораколумбална/ торакална+лумбална първична крива (n ₁ =31, n ₂ =74)	Кодоминантен	AA vs. GG	0.17	0.44 [0.13-1.45]
	Доминантен	AA + AG vs. GG	0.43	0.67 [0.25-1.81]
	Рецесивен	AA vs. AG + GG	0.13	0.48 [0.18-1.26]
	Алелен	A vs. G	0.14	0.64 [0.35-1.16]
Лумбална/ тораколумбална+торакална първична крива (n ₁ =12, n ₂ =93)	Кодоминантен	AA vs. GG	1*	1.06 [0.23-4.94]
	Доминантен	AA + AG vs. GG	1*	0.77 [0.19-3.13]
	Рецесивен	AA vs. AG + GG	0.75*	1.5 [0.44-5.12]
	Алелен	A vs. G	1*	1.1 [0.47-2.61]

*Fisher's Exact Test (two-tailed)

Получените резултати дават основание функционалният полиморфизъм *IL17RC* (rs708567 G/A) да се разглежда като предразполагащ и модифициращ фактор за идиопатична сколиоза при български пациенти, свързан с началото и прогресията на заболяването, с АИС, с фамилни и нефамилни форми, с идиопатична сколиоза и при двата пола.

2.4.4. Клетъчна адхезионна молекула L1 подобен ген - *CHL1* (rs1400180, T/G)

Честотата на полиморфизма *CHL1* (rs1400180 T/G), показал асоциация с АИС при GWAS, беше определена в групата като цяло и в отделните подгрупи от пациенти и беше сравнена с тази на неродствени индивиди без клинични белези на сколиоза (case-control study) или с други подгрупи от пациенти (case-only study). Асоциацията в отделните подгрупи беше проучена при генотипен (кодоминантен, доминантен и рецесивен) и алелен модел. На фиг. 4.58 е показан алел-дискриминационен плот с резултати от генотипирането на *CHL1* (rs1400180 T/G) при случаи и контроли.



Фиг. 4.58. Алел-дискриминационен плот за *CHL1* (rs1400180 T/G). Със син цвят са представени хомозиготите див тип (TT), с червен цвят са хомозиготите по вариантния алел (GG), а със зелен цвят са хетерозиготите (TG).

Генотипните и алелните честоти на *CHL1* (rs1400180 T/G) и анализ на равновесието по Hardy-Weinberg (HWE) са представени в таблица 4.52.

Таблица 4.52. Разпределение на генотипните честоти при пациенти и контроли.

Ген Полиморфизъм	Група	Случаи, N (%)			HWE		Контроли, N (%)			HWE	
		TT	TG	GG	χ^2	p	TT	TG	GG	χ^2	p
<i>CHL1</i> (rs1400180 A/C)	Обща група	28 (26.7)	54 (51.4)	23 (21.9)	0.1	0.75	51 (24.3)	117 (55.7)	42 (20.0)	2.84	0.09
	Мъже	7 (36.8)	8 (42.1)	4 (21.1)	0.35	0.55	10 (26.3)	21 (55.3)	7 (18.4)	0.48	0.49
	Жени	21 (24.4)	46 (53.5)	19 (22.1)	0.43	0.51	41 (23.8)	96 (55.8)	35 (20.3)	2.38	0.12

Полиморфизмът показва съответствие със закона на Hardy-Weinberg. Генотипните и алелните честоти на *CHL1* (rs1400180 T/G) не се различаваха съществено при пациенти и контроли (TT vs. TG vs. GG, $p = 0.77$ и T vs. G, $p = 1$, χ^2 -тест), от което следва, че полиморфизмът не може да се разглежда като самостоятелен предразполагащ фактор за идиопатична сколиоза при българските пациенти.

На таблица 4.53 са представени ORs, получени при сравняване на отделните подгрупи.

Таблица 4.53. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти и контроли (case-control study)

Подгрупа	Модел на генно влияние	Генотип, Алел	p (χ^2 -тест)	OR [95% CI]
Обща група ($n_1=105, n_2=210$)	Кодоминантен	TT vs. GG	1	1.00 [0.5-1.99]
	Доминантен	TT vs. TG + GG	0.65	1.13 [0.66-1.94]
	Рецесивен	TT + TG vs. GG	0.69	0.89 [0.5-1.58]
	Алелен	T vs. G	1	1.01 [0.72-1.41]
АИС ($n_1=78, n_2=210$)	Кодоминантен	TT vs. GG	0.92	1.03 [0.47-2.23]
	Доминантен	TT vs. TG + GG	0.81	1.08 [0.59-1.96]
	Рецесивен	TT + TG vs. GG	0.92	0.97 [0.51-1.85]
	Алелен	T vs. G	0.92	1.02 [0.7-1.47]
ЮИС ($n_1=23, n_2=210$)	Кодоминантен	TT vs. GG	0.54*	1.65 [0.46-5.85]
	Доминантен	TT vs. TG + GG	0.31*	1.66 [0.67-4.15]
	Рецесивен	TT + TG vs. GG	1*	1.19 [0.38-3.68]
	Алелен	T vs. G	0.44*	1.30 [0.7-2.42]
Фамилни случаи ($n_1=28, n_2=210$)	Кодоминантен	TT vs. GG	0.51*	0.55 [0.15-2.07]
	Доминантен	TT vs. TG + GG	0.34*	0.52 [0.17-1.57]
	Рецесивен	TT + TG vs. GG	1*	0.92 [0.35-2.40]
	Алелен	T vs. G	0.48*	0.8 [0.45-1.39]
Спорадични случаи ($n_1=77, n_2=210$)	Кодоминантен	TT vs. GG	0.69	1.16 [0.55-2.45]
	Доминантен	TT vs. TG + GG	0.24	1.41 [0.79-2.51]
	Рецесивен	TT + TG vs. GG	0.7	0.88 [0.47-1.67]
	Алелен	T vs. G	0.61	1.10 [0.76-1.6]
Cobb >40° ($n_1=84, n_2=210$)	Кодоминантен	TT vs. GG	1	1.01 [0.48-2.12]
	Доминантен	TT vs. TG + GG	0.73	1.11 [0.62-1.98]
	Рецесивен	TT + TG vs. GG	0.78	0.92 [0.49-1.71]
	Алелен	T vs. G	1	1.01 [0.71-1.44]
Cobb <40° ($n_1=21, n_2=210$)	Кодоминантен	TT vs. GG	1*	0.99 [0.28-3.47]
	Доминантен	TT vs. TG + GG	0.79*	1.25 [0.46-3.38]
	Рецесивен	TT + TG vs. GG	0.78*	0.8 [0.28-2.31]
	Алелен	T vs. G	1*	1.01 [0.54-1.91]
Мъже ($n_1=19, n_2=38$)	Кодоминантен	TT vs. GG	1*	1.23 [0.26-5.85]
	Доминантен	TT vs. TG + GG	0.54*	1.63 [0.5-5.31]
	Рецесивен	TT + TG vs. GG	1*	0.85 [0.21-3.35]
	Алелен	T vs. G	0.84*	1.17 [0.53-2.58]
Жени ($n_1=86, n_2=172$)	Кодоминантен	TT vs. GG	0.89	0.94 [0.44-2.03]
	Доминантен	TT vs. TG + GG	0.92	1.03 [0.56-1.89]
	Рецесивен	TT + TG vs. GG	0.74	0.90 [0.48-1.69]
	Алелен	T vs. G	0.89	0.98 [0.68-1.41]

*Fisher's Exact Test (two-tailed); n_1 - брой пациенти, n_2 - брой контроли.

При първото проучване тип GWAS при идиопатична сколиоза (АИС) Sharma и сътрудниците му откриват най-значима асоциация между *CHL1* (rs1400180) и АИС ($P < 8 \times 10^{-8}$) [230], но тази асоциация не е потвърдена при независими изследвания. При репликативно проучване в китайската популация [235], включващо други полиморфизми, показали значимост при изследването на Sharma et al. (2011) не е потвърдена връзка между *CHL1* (rs1400181) и АИС.

В подгрупата на АИС генотипните и алелните честоти на *CHLI* (rs1400180) бяха сравними при български пациенти и контроли ($p > 0.5$, χ^2 -тест). В останалите подгрупи също не бяха наблюдавани статистически значими разлики (таблица 4.53 и 4.54).

Таблица 4.54. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти (case-only study)

Подгрупа	Модел на генно влияние	Генотип, Алел	p (χ^2 -тест)	OR [95% CI]
Сobb >40⁰ Корсетолечение/без корсетолечение (n ₁ =49, n ₂ =34)	Кодоминантен	ТТ vs. GG	0.5	0.63 [0.16-2.43]
	Доминантен	ТТ vs. TG + GG	0.75	1.17 [0.43-3.24]
	Рецесивен	ТТ + TG vs. GG	0.2	0.48 [0.15-1.50]
	Алелен	T vs. G	0.58	0.84 [0.45-1.56]
Торакална/ тораколумбална+лумбална първична крива (n ₁ =62, n ₂ =43)	Кодоминантен	ТТ vs. GG	0.79	0.86 [0.28-2.64]
	Доминантен	ТТ vs. TG + GG	0.81	0.90 [0.37-2.16]
	Рецесивен	ТТ + TG vs. GG	0.84	0.91 [0.35-2.34]
	Алелен	T vs. G	0.79	0.93 [0.53-1.61]
Тораколумбална/ торакална+лумбална първична крива (n ₁ =31, n ₂ =74)	Кодоминантен	ТТ vs. GG	0.89	0.91 [0.27-3.06]
	Доминантен	ТТ vs. TG + GG	0.89	0.94 [0.36-2.44]
	Рецесивен	ТТ + TG vs. GG	0.92	0.95 [0.35-2.59]
	Алелен	T vs. G	0.89	0.96 [0.53-1.73]
Лумбална/ тораколумбална+торакална първична крива (n ₁ =12, n ₂ =93)	Кодоминантен	ТТ vs. GG	0.68*	1.75 [0.29-10.5]
	Доминантен	ТТ vs. TG + GG	0.73*	1.44 [0.40-5.21]
	Рецесивен	ТТ + TG vs. GG	0.73*	1.46 [0.30-7.18]
	Алелен	T vs. G	0.67*	1.31 [0.55-3.10]

*Fisher's Exact Test (two-tailed)

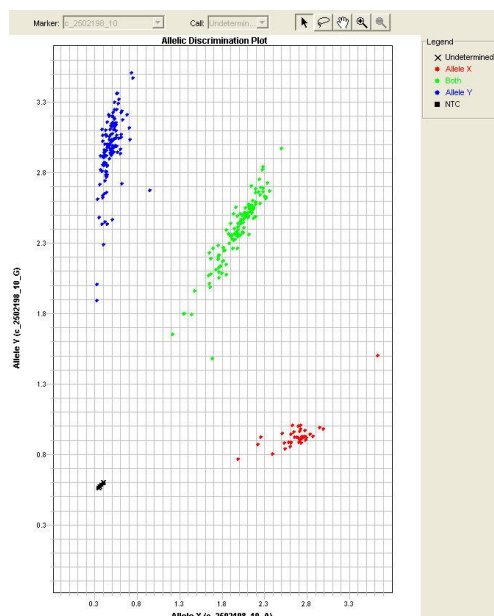
В заключение, този полиморфен вариант няма предразполагащ или модифициращ ефект сред българските пациенти с идиопатична сколиоза и не може да бъде свързан с начало на заболяването, пол, фамилна история, тип на кривата и изход от корсетолечението. Тези резултати не изключват потенциалната роля на други полиморфизми на гена *CHLI* в етиопатогенезата на идиопатичната сколиоза.

2.4.5. G-протеин свързан рецептор G6 - *GPR126* (rs6570507, A/G)

Честотата на интронния полиморфизъм *GPR126* (rs6570507 A/G), показал връзка с идиопатичната сколиоза при GWAS, беше анализирана в групата като цяло и в отделните подгрупи от пациенти и беше сравнена с тази на неродствени индивиди без клинични белези на сколиоза (case-control study) или с други подгрупи от пациенти (case-only study).

Асоциацията в отделните подгрупи беше проучена при генотипен (кодоминантен, доминантен и рецесивен) и алелен модел.

На фиг. 4.59 е показан алел-дискриминационен плот с резултати от генотипирането на *GPR126* (rs6570507 A/G) при случаи и контроли.



Фиг. 4.59. Алел-дискриминационен плот за *GPR126* (rs6570507 A/G). Със син цвят са представени хомозиготите по вариантният алел (GG), с червен цвят са хомозиготите див тип алел (AA), а със зелен цвят са хетерозиготите (AG).

Генотипните и алелните честоти на *GPR126* (rs6570507 A/G) и анализ на равновесието по Hardy-Weinberg (HWE) са представени в таблица 4.55.

Таблица 4.55. Разпределение на генотипните честоти при пациенти и контроли.

Ген Полиморфизъм	Група	Случаи, N (%)			HWE		Контроли, N (%)			HWE	
		GG	AG	AA	χ^2	p	GG	AG	AA	χ^2	p
<i>GPR126</i> (rs6570507 A/G)	Обща група	57 (54.3)	34 (32.4)	14 (13.3)	5.17	0.02	78 (37.1)	101 (48.1)	31 (14.8)	0.03	0.85
	Мъже	8 (42.1)	6 (31.6)	5 (26.3)	2.36	0.12	12 (31.6)	18 (47.4)	8 (21.1)	0.07	0.8
	Жени	49 (57.0)	28 (32.5)	9 (10.5)	2.46	0.12	66 (38.4)	83 (48.3)	23 (13.4)	0.15	0.7

Полиморфизмът показва съответствие със закона на Hardy-Weinberg. В общата извадка от пациенти и контроли честотата на хомозиготния GG генотип и на полиморфния G алел на *GPR126* (rs6570507 A/G) беше по-висока при пациенти с идиопатична сколиоза в сравнение с контроли (GG vs. GA vs. AA, $p = 0.01$ и G vs. A, $p = 0.02$, χ^2 -тест) и на базата на тези резултати полиморфизмът *GPR126* (rs6570507 A/G) може да се разглежда като самостоятелен предразполагащ фактор за идиопатична сколиоза при българските пациенти. Носителството на хомозиготния GG генотип се свързва с 1.46 пъти по-висок риск (GG vs. GA+AA, RR=1.46, 95% CI: 1.14-1.87), а на G алела – с 1.15 пъти по-висок риск (G vs. A, RR=1.15, 95% CI: 1.03-1.29) от развитие на идиопатична сколиоза при българи.

На таблица 4.56 са представени ORs, получени при сравняване на отделните подгрупи от пациенти и контроли.

Таблица 4.56. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти и контроли (case-control study)

Подгрупа	Модел на генно влияние	Генотип, Алел	p (χ^2 -тест)	OR [95% CI]
Обща група (n ₁ =105, n ₂ =210)	Кодоминантен	GG vs. AA	0.19	1.62 [0.79-3.32]
	Доминантен	GG vs. AG + AA	0.004	2.01 [1.25-3.23]
	Рецесивен	GG + AG vs. AA	0.73	1.13 [0.57-2.22]
	Алелен	G vs. A	0.02	1.51 [1.06-2.16]
АИС (n ₁ =78, n ₂ =210)	Кодоминантен	GG vs. AA	0.15	1.79 [0.8-3.99]
	Доминантен	GG vs. AG + AA	0.002	2.31 [1.36-3.92]
	Рецесивен	GG + AG vs. AA	0.67	1.18 [0.55-2.53]
	Алелен	G vs. A	0.01	1.67 [1.11-2.49]
ЮИС (n ₁ =23, n ₂ =210)	Кодоминантен	GG vs. AA	0.76*	1.46 [0.38-5.58]
	Доминантен	GG vs. AG + AA	0.37*	1.55 [0.65-3.68]
	Рецесивен	GG + AG vs. AA	1*	1.15 [0.32-4.12]
	Алелен	G vs. A	0.43*	1.31 [0.69-2.5]
Фамилни случаи (n ₁ =28, n ₂ =210)	Кодоминантен	GG vs. AA	0.55*	1.72 [0.46-6.46]
	Доминантен	GG vs. AG + AA	0.41*	1.47 [0.66-3.24]
	Рецесивен	GG + AG vs. AA	0.78*	1.44 [0.41-5.07]
	Алелен	G vs. A	0.38*	1.34 [0.74-2.43]
Спорадични случаи (n ₁ =77, n ₂ =210)	Кодоминантен	GG vs. AA	0.24	1.59 [0.73-3.47]
	Доминантен	GG vs. AG + AA	0.002	2.26 [1.33-3.84]
	Рецесивен	GG + AG vs. AA	0.92	1.04 [0.49-2.19]
	Алелен	G vs. A	0.02	1.59 [1.06-2.37]
Cobb >40° (n ₁ =84, n ₂ =210)	Кодоминантен	GG vs. AA	0.18	1.7 [0.78-3.69]
	Доминантен	GG vs. AG + AA	0.003	2.15 [1.29-3.59]
	Рецесивен	GG + AG vs. AA	0.71	1.15 [0.55-2.41]
	Алелен	G vs. A	0.02	1.59 [1.08-2.34]
Cobb <40° (n ₁ =21, n ₂ =210)	Кодоминантен	GG vs. AA	0.76*	1.32 [0.34-5.14]
	Доминантен	GG vs. AG + AA	0.48*	1.54 [0.62-3.79]
	Рецесивен	GG + AG vs. AA	1*	1.04 [0.29-3.74]
	Алелен	G vs. A	0.51*	1.27 [0.65-2.48]
Мъже (n ₁ =19, n ₂ =38)	Кодоминантен	GG vs. AA	1*	1.07 [0.25-4.46]
	Доминантен	GG vs. AG + AA	0.56*	1.58 [0.5-4.92]
	Рецесивен	GG + AG vs. AA	0.74*	0.75 [0.21-2.7]
	Алелен	G vs. A	0.84*	1.11 [0.51-2.44]
Жени (n ₁ =86, n ₂ =172)	Кодоминантен	GG vs. AA	0.14	1.9 [0.81-4.46]
	Доминантен	GG vs. AG + AA	0.005	2.13 [1.26-3.6]
	Рецесивен	GG + AG vs. AA	0.5	1.32 [0.58-2.99]
	Алелен	G vs. A	0.01	1.64 [1.1-2.46]

*Fisher's Exact Test (two-tailed); n₁ - брой пациенти, n₂ - брой контроли.

При предходни проучвания *GPR126* (rs6570507 A/G) показва статистически значима асоциация с предразположението към АИС при японци (GWAS, 1819 случая/ 25939 контроли) [244] и при китайци (352 случая/ 149 контроли) [245].

В подгрупата на АИС генотипните и алелните честоти на *GPR126* (rs6570507 A/G) също се различаваха при български пациенти и контроли (GG vs. GA+AA, p = 0.002, OR=2.31, 95% CI: 1.36-3.92 и G vs. A, p = 0.01, OR=1.67, 95% CI: 1.11-2.49, χ^2 -тест). Носителството на хомозиготния GG генотип се свързва с 1.55 пъти по-висок риск (GG vs. GA+AA, RR=1.55, 95% CI: 1.2-2.01), а на G алел – с 1.18 пъти по-висок риск (G vs. A, RR=1.18, 95% CI: 1.05-1.34) от развитие на АИС.

Тези резултати дават основание полиморфизмът *GPR126* (rs6570507 A/G) да се разглежда като предразполагащ генетичен фактор за идиопатична и адолесцентна идиопатична сколиоза при български пациенти. Известно е, че генът *GPR126* участва в растежа и развитието на гръбначния стълб в детска възраст. Възможно е определени генетични варианти да повишават податливостта към деформации в периода на растеж, но до момента няма данни за екзонни варианти на гена, свързани със сколиозата.

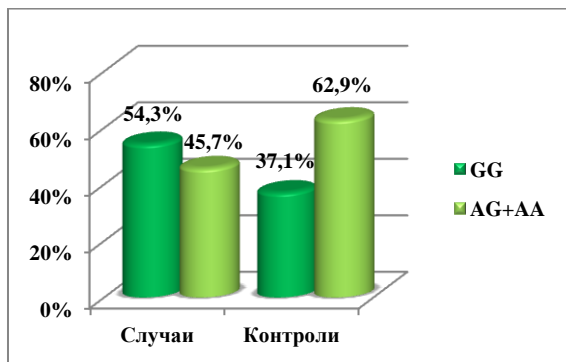
В подгрупата на ЮИС не се наблюдава статистически значима асоциация с патологичния фенотип (табл. 4.56), което предполага наличие на различни предразполагащи фактори при ранната и при късната идиопатична сколиоза.

В подгрупата на спорадичните случаи генотипните и алелните честоти на *GPR126* (rs6570507 A/G) се различаваха съществено от тези на контролите (табл. 4.56). Следователно, носителството на GG генотип и G алел се свързва с нефамилната форма на идиопатична сколиоза.

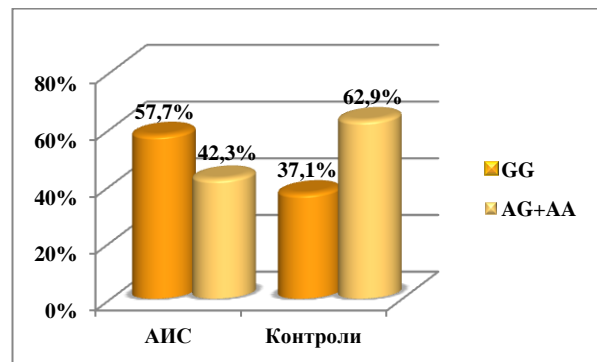
При пациентите с прогресивна сколиоза, довела до необходимост от оперативно лечение, честотата на хомозиготния GG генотип и на G алела също беше по-висока в сравнение с контроли (GG vs. GA+AA, $p = 0.003$, OR=2.15, 95% CI: 1.29-3.59 и G vs. A, $p = 0.02$, OR=1.59, 95% CI: 1.08-2.34, χ^2 -тест). Носителството на хомозиготния GG генотип се свързва с 1.5 пъти по-висок риск (GG vs. GA+AA, RR=1.51, 95% CI: 1.16-1.95), а на G алел – с 1.17 пъти по-висок риск от прогресия на деформацията (G vs. A, RR=1.17, 95% CI: 1.03-1.32). Следователно, *GPR126* (rs6570507 A/G) може да се разглежда като модифициращ генетичен фактор за идиопатична сколиоза при български пациенти, асоцииран с тежка прогресия на кривата (ъгъл на Cobb $>40^\circ$).

След разделяне на пациентите и контролите по пол само при момичетата се наблюдаваше статистически значима асоциация между *GPR126* (rs6570507 A/G) и клиничния фенотип (табл. 4.56).

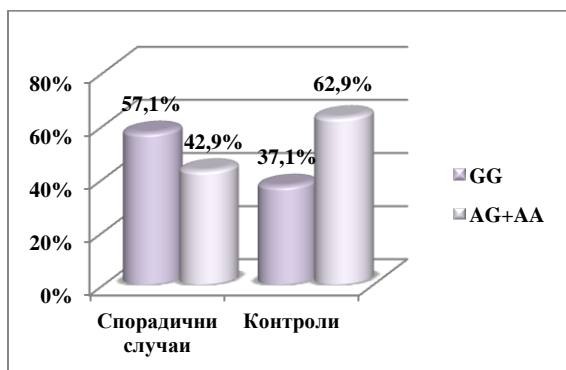
По-долу са представени графично доминантни модели на генно влияние в общата група и в подгрупите на АИС, спорадична и прогресивна сколиоза и при женския пол (фиг. 4.60-4.64).



Фиг. 4.60. Доминантен модел на генно влияние GG / (GA+AA) в общата група.



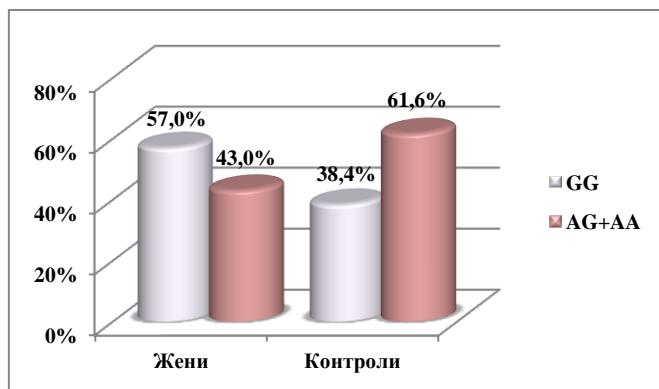
Фиг. 4.61. Доминантен модел на генно влияние GG / (GA+AA) при сравняване на АИС и контроли



Фиг. 4.62. Доминантен модел на генно влияние GG / (GA+AA) при сравняване на спорадични случаи и контроли



Фиг. 4.63. Доминантен модел на генно влияние GG / (GA+AA) при сравняване на прогресивни случаи и контроли



Фиг. 4.64. Доминантен модел на генно влияние GG / (GA+AA) при женски пол.

Пациентите с прогресивна сколиоза бяха разделени на две подгрупи според проведеното корсетолечение, като при сравняването им не беше открита статистически значима връзка между полиморфизма и прогресията на сколиозата ($p > 0.05$, Fisher's Exact Test). Следователно, *GPR126* (rs6570507 A/G) не може да бъде свързан с изхода от корсетолечението.

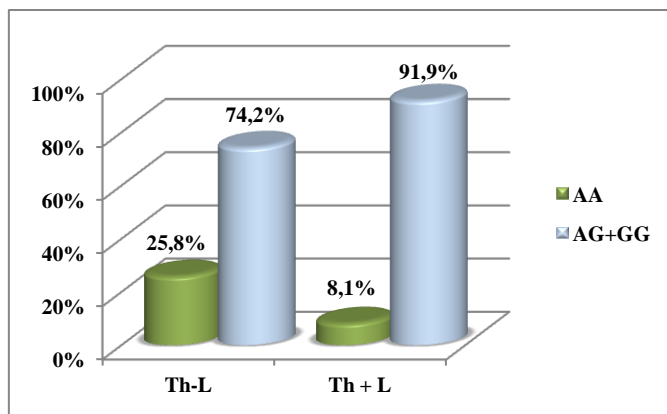
При сравняване подгрупите от пациенти с торакална, тораколумбална и лумбална сколиоза помежду им беше установена статистически значима асоциация между дивия тип алел и тораколумбалния тип крива (AA vs. GG, $p = 0.02$ и A vs. G, $p = 0.01$, Fisher's Exact Test), при която средният предоперативен ъгъл на сколиозата е по-малък. Между полиморфния алел и торакалния тип крива, при която средният предоперативен ъгъл на сколиозата е по-голям, се наблюдаваше тенденция към асоциация (G vs. A, $p=0.09$, Fisher's Exact Test).

Odds ratios в отделните подгрупи от пациенти са представени на таблица 4.57.

Таблица 4.57. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти (case-only study)

Подгрупа	Модел на генно влияние	Генотип, Алел	p (Fisher's Exact Test)	OR [95% CI]
Cobb >40° Корсетолечение/без корсетолечение (n ₁ =49, n ₂ =34)	Кодоминантен	GG vs. AA	1	0.84 [0.22-3.28]
	Доминантен	GG vs. AG + AA	1	1.05 [0.44-2.54]
	Рецесивен	GG + AG vs. AA	1	0.80 [0.21-2.98]
	Алелен	G vs. A	1	0.97 [0.49-1.93]
Торакална/ тораколумбална+лумбална първична крива (n ₁ =62, n ₂ =43)	Кодоминантен	GG vs. AA	0.22	2.47 [0.75-8.11]
	Доминантен	GG vs. AG + AA	0.23	1.7 [0.78-3.73]
	Рецесивен	GG + AG vs. AA	0.25	2.13 [0.68-6.67]
	Алелен	G vs. A	0.09	1.69 [0.93-3.08]
Тораколумбална/ торакална+лумбална първична крива (n ₁ =31, n ₂ =74)	Кодоминантен	GG vs. AA	0.02	0.22 [0.07-0.76]
		GG vs. AG	0.62	0.71 [0.27-1.86]
	Доминантен	GG vs. AG + AA	0.13	2.03 [0.87-4.76]
	Рецесивен	AA vs. AG + GG	0.03	3.94 [1.24-12.57]
	Алелен	A vs. G	0.01	2.25 [1.2-4.21]
Лумбална/ тораколумбална+торакална първична крива (n ₁ =12, n ₂ =93)	Кодоминантен	GG vs. AA	0.33	Infinity
	Доминантен	GG vs. AG + AA	1	1.2 [0.36-4.07]
	Рецесивен	GG + AG vs. AA	0.21	Infinity
	Алелен	G vs. A	0.36	1.68 [0.6-4.72]

На фиг. 4.65 е представен рецесивен модел на генно влияние при тораколумбален тип крива.



Фиг. 4.65. Рецесивен модел на генно влияние AA / (GA+GG) при тораколумбален тип крива.

В заключение, полиморфизмът *GPR126* (rs6570507 A/G) може да се разглежда като предразполагащ и модифициращ фактор за идиопатична сколиоза при български пациенти, свързан с началото и прогресията на заболяването, с АИС, спорадичната сколиоза и женския пол. Дивият тип алел А по-често се асоциира с тораколумбален тип крива.

2.4.6. *Ladybird homeobox domain 1 - LBX1* (rs11190870, T/C)

Честотата на полиморфизма rs11190870 в близост до *LBX1*, показал значима връзка с идиопатичната сколиоза при GWAS, беше анализирана в групата като цяло и в отделните подгрупи от пациенти и беше сравнена с тази на контроли без клинични данни за сколиоза (case-control study) или с други подгрупи пациенти (case-only study).

Асоциацията в отделните подгрупи беше проучена при генотипен (кодминантен, доминантен и рецесивен) и алелен модел.

Генотипните и алелните честоти на *LBX1* (rs11190870 T/C) и анализ на равновесието по Hardy-Weinberg (HWE) са представени в таблица 4.58.

Таблица 4.58. Разпределение на генотипните честоти при пациенти и контроли.

Ген Полиморфизъм	Група	Случаи, N (%)			HWE		Контроли, N (%)			HWE	
		ТТ	ТС	СС	χ^2	p	ТТ	ТС	СС	χ^2	p
<i>LBX1</i> (rs11190870 T/C)	Обща група	68 (64.8)	32 (30.4)	5 (4.8)	0.24	0.63	101 (48.1)	81 (38.6)	28 (13.3)	3.15	0.08
	Мъже	12 (63.1)	6 (31.6)	1 (5.3)	0.05	0.83	18 (47.4)	15 (39.5)	5 (13.1)	0.43	0.51
	Жени	56 (65.1)	26 (30.2)	4 (4.7)	0.19	0.66	83 (48.2)	66 (38.4)	23 (13.4)	2.74	0.1

Полиморфизмът показва съответствие със закона на Hardy-Weinberg. В общата извадка от пациенти и контроли честотата на хомозиготния ТТ генотип и на дивия тип Т алел на *LBX1* (rs11190870 T/C) беше по-висока при пациенти с идиопатична сколиоза в сравнение с контроли (ТТ vs. ТС vs. СС, p = 0.006 и Т vs. С, p = 0.0009, χ^2 -тест) и на базата на тези резултати ТТ генотипът и Т алелът на *LBX1* (rs11190870 T/C) може да се разглеждат като самостоятелен предразполагащ фактор за идиопатична сколиоза при

българските пациенти. Носителството на хомозиготния ТТ генотип се свързва с 1.35 пъти по-висок риск (ТТ vs. ТС+СС, RR=1.35, 95% CI: 1.1-1.64), а на Т алела – с 1.19 пъти по-висок риск (Т vs. С, RR=1.19, 95% CI: 1.08-1.31) от развитие на идиопатична сколиоза при българи. Следователно, полиморфният алел С и генотипът СС имат протективен ефект.

На таблица 4.59 са представени ORs, получени при сравняване на отделните подгрупи от български пациенти и контроли.

Таблица 4.59. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти и контроли (case-control study)

Подгрупа	Модел на генно влияние	Генотип, Алел	p (χ^2 -тест)	OR [95% CI]
Обща група (n ₁ =105, n ₂ =210)	Кодоминантен	ТТ vs. СС	0.006	3.77 [1.39-10.2]
		ТТ vs. ТС	0.04	1.70 [1.02-2.84]
	Доминантен	ТТ vs. ТС + СС	0.005	1.98 [1.22-3.22]
	Рецесивен	ТТ + ТС vs. СС	0.02	3.08 [1.15-8.22]
	Алелен	Т vs. С	0.0009	1.94 [1.30-2.87]
АИС (n ₁ =78, n ₂ =210)	Кодоминантен	ТТ vs. СС	0.05	2.72 [0.99-7.47]
	Доминантен	ТТ vs. ТС + СС	0.03	1.82 [1.07-3.11]
	Рецесивен	ТТ + ТС vs. СС	0.1	2.25 [0.84-6.04]
	Алелен	Т vs. С	0.01	1.74 [1.13-2.67]
ЮИС (n ₁ =23, n ₂ =210)	Кодоминантен	ТТ vs. СС	0.08*	Infinity
	Доминантен	ТТ vs. ТС + СС	0.13*	2.02 [0.82-4.98]
	Рецесивен	ТТ + ТС vs. СС	0.09*	Infinity
	Алелен	Т vs. С	0.04*	2.30 [1.04-5.06]
Фамилни случаи (n ₁ =28, n ₂ =210)	Кодоминантен	ТТ vs. СС	0.03*	Infinity
	Доминантен	ТТ vs. ТС + СС	0.03*	2.70 [1.14-6.40]
	Рецесивен	ТТ + ТС vs. СС	0.05*	Infinity
	Алелен	Т vs. С	0.005*	2.90 [1.34-6.31]
Спорадични случаи (n ₁ =77, n ₂ =210)	Кодоминантен	ТТ vs. СС	0.05	2.66 [0.97-7.32]
	Доминантен	ТТ vs. ТС + СС	0.03	1.79 [1.05-3.05]
	Рецесивен	ТТ + ТС vs. СС	0.11	2.22 [0.82-5.96]
	Алелен	Т vs. С	0.01	1.71 [1.11-2.63]
Cobb >40° (n ₁ =84, n ₂ =210)	Кодоминантен	ТТ vs. СС	0.01	3.74 [1.25-11.23]
		ТТ vs. ТС	0.07	1.67 [0.96-2.89]
	Доминантен	ТТ vs. ТС + СС	0.01	1.94 [1.15-3.27]
	Рецесивен	ТТ + ТС vs. СС	0.03	3.08 [1.04-9.06]
	Алелен	Т vs. С	0.003	1.91 [1.24-2.93]
Cobb <40° (n ₁ =21, n ₂ =210)	Кодоминантен	ТТ vs. СС	0.2*	3.88 [0.49-30.8]
	Доминантен	ТТ vs. ТС + СС	0.12*	2.16 [0.84-5.56]
	Рецесивен	ТТ + ТС vs. СС	0.33*	3.08 [0.40-23.8]
	Алелен	Т vs. С	0.08*	2.06 [0.93-4.56]
Мъже (n ₁ =19, n ₂ =38)	Кодоминантен	ТТ vs. СС	0.39*	3.33 [0.35-32.2]
	Доминантен	ТТ vs. ТС + СС	0.4*	1.90 [0.62-5.89]
	Рецесивен	ТТ + ТС vs. СС	0.65*	2.73 [0.3-25.18]
	Алелен	Т vs. С	0.27*	1.84 [0.74-4.59]
Жени (n ₁ =86, n ₂ =172)	Кодоминантен	ТТ vs. СС	0.01	3.88 [1.27-11.83]
		ТТ vs. ТС	0.06	1.71 [0.97-3.02]
	Доминантен	ТТ vs. ТС + СС	0.01	2.00 [1.17-3.42]
	Рецесивен	ТТ + ТС vs. СС	0.03	3.16 [1.06-9.46]
	Алелен	Т vs. С	0.002	1.96 [1.26-3.04]

*Fisher's Exact Test (two-tailed); n₁- брой пациенти, n₂- брой контроли.

Първоначално, Takahashi и сътрудниците му (2011) докладват асоциация между АИС и rs11190870 при цялостно геномно проучване в японска популация (1376 случая/11297 контроли) [237], впоследствие 3 репликативни асоциативни проучвания в

китайската популация [238-240] и 2 в кавказката популация - едно GWAS проучване [242] и цялостно екзомно секвениране [243] потвърждават асоциацията.

В подгрупата на АИС генотипните и алелните честоти на *LBX1* (rs11190870 T/C) също се различаваха при български пациенти и контроли (TT vs. TC+CC, $p = 0.03$, OR = 1.82, 95% CI: 1.07-3.11 и T vs. C, $p = 0.01$, OR = 1.74, 95% CI: 1.13-2.67, χ^2 -тест). Носителството на хомозиготния TT генотип се свързва с 1.3 пъти по-висок риск от развитие на АИС (TT vs. TC+CC, RR=1.31, 95% CI: 1.05-1.63), а на T алел – с 1.16 пъти по-висок риск (T vs. C, RR=1.16, 95% CI: 1.04-1.29) от развитие на АИС.

Тези резултати дават основание TT генотипът и T алелът на *LBX1* (rs11190870 T/C) да се разглеждат като предразполагащ генетичен фактор за идиопатична и адолесцентна идиопатична сколиоза при български пациенти. Генът *LBX1* кодира транскрипционен фактор, необходим за развитието на задръжните интерневрони в задните рога на гръбначния мозък, както и за миграцията и по-нататъшното развитие на прекурсорите на мускулните клетки.

Изследванията върху животински модели след дорзална ризотомия показват висока честота на сколиозата и предполагат ролята на соматосензорната дисфункция в етиопатогенезата на сколиозата [309-312]. При клинични проучвания е установено, че подрастващи деца с функционални или органични нарушения на соматосензорните пътища са по-предразположени към сколиоза в сравнение със свои връстници [45]. При пациенти с АИС честотата на соматосензорни нарушения е по-голяма в сравнение с общата популация [313-315]. Генът *LBX1* се експресира в дорзалната част на гръбначния мозък и в задния мозък и е важен за оцеляването на сензорните неврони [316-321]. При мишки с делетиран ген (*Lbx1*^{-/-}) морфологията на невроните и невронните вериги в задните рога са аберантни, което предполага, че *LBX1* е критичен фактор за развитието на сензорните пътища в гръбначния мозък [318]. Възможно е абнормната експресия на *LBX1* да играе роля за развитието на АИС чрез сензорна дисфункция [237].

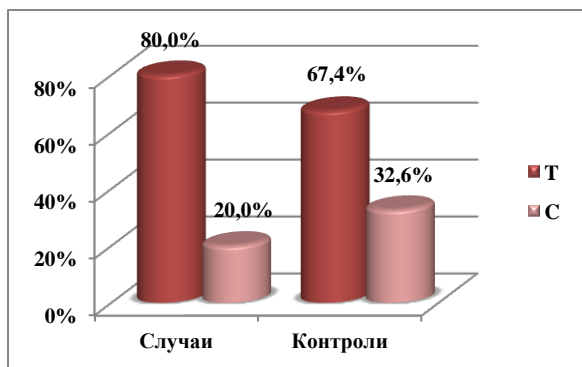
В подгрупата на ЮИС се наблюдаваше статистически значима разлика в разпределението на алелните честоти между пациенти и контроли (табл. 4.59), което предполага възможно участие на този генетичен фактор и при ранната сколиоза. Необходимо е разширено проучване за потвърждаване на тази хипотеза.

В подгрупата и на фамилните и на спорадичните случаи генотипните и алелните честоти на *LBX1* (rs11190870 T/C) се различаваха съществено от тези на контролите (табл. 4.59). Следователно, носителството на TT генотип и T алел се свързва с фамилната и с нефамилната форма на идиопатична сколиоза.

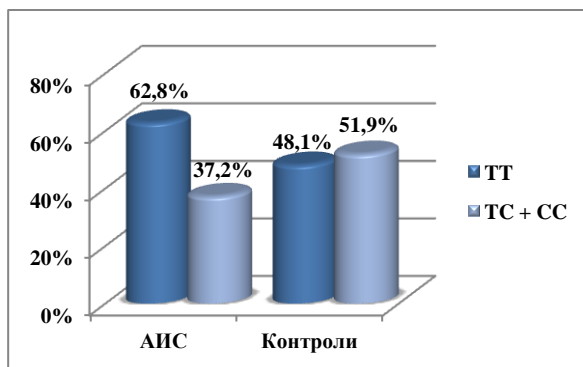
При пациентите с прогресивна сколиоза, довела до необходимост от оперативно лечение, честотата на хомозиготния TT генотип и на T алела също беше по-висока в сравнение с контроли (табл. 4.59). Носителството на хомозиготния TT генотип се свързва с 1.34 пъти по-висок риск (TT vs. TC+CC, RR=1.51, 95% CI: 1.16-1.95), а на T алел – с 1.18 пъти по-висок риск от прогресия на деформацията (T vs. C, RR=1.17, 95% CI: 1.03-1.32). Следователно, *LBX1* (rs11190870 T/C) може да се разглежда като модифициращ генетичен фактор за идиопатична сколиоза при български пациенти, асоцииран с тежка прогресия на кривата (ъгъл на Cobb >40°).

След разделяне на пациентите и контролите по пол само при момичетата се наблюдаваше статистически значима асоциация между *LBX1* (rs11190870 T/C) и клиничния фенотип (табл. 4.59).

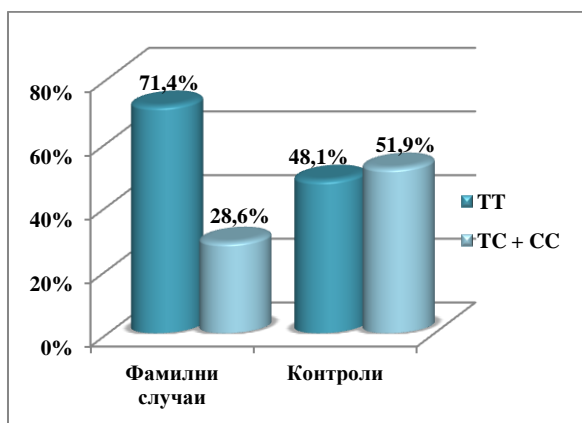
По-долу са представени графично модели на генно влияние в общата група и в подгрупите на АИС, спорадична, фамилна и прогресивна сколиоза и при женския пол (фиг. 4.66-4.71).



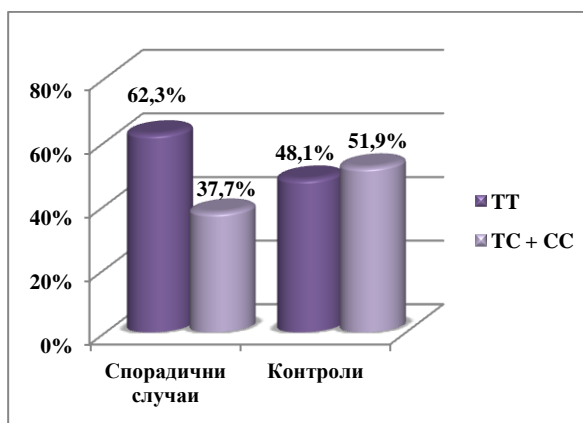
Фиг. 4.66. Процентно разпределение на алелите Т и С в общата извадка.



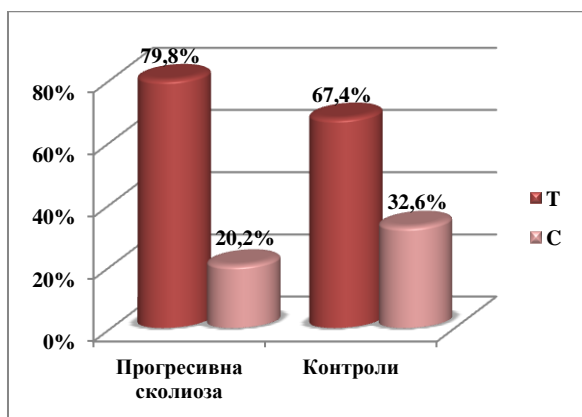
Фиг. 4.67. Доминантен модел на генно влияние TT / (TC+CC) при АИС.



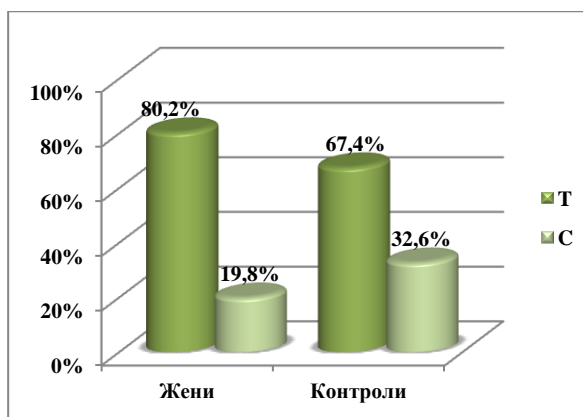
Фиг. 4.68. Доминантен модел на генно влияние TT / (TC+CC) при положителна фамилна анамнеза.



Фиг. 4.69. Доминантен модел на генно влияние TT / (TC+CC) при отрицателна фамилна анамнеза.



Фиг. 4.70. Процентно разпределение на алелите Т и С при прогресивна сколиоза.



Фиг. 4.71. Процентно разпределение на алелите Т и С при женския пол.

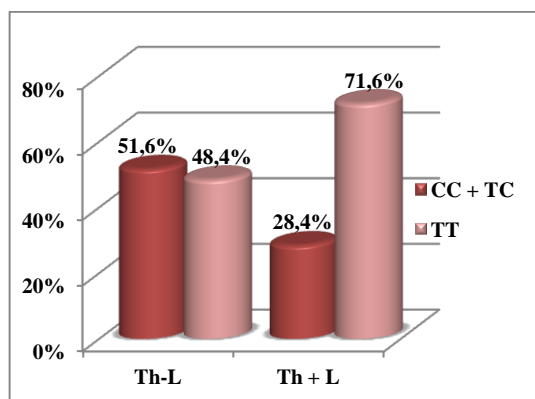
Полиморфизмът *LBX1* (rs11190870 Т/С) не показва връзка с изхода от корсетолечението ($p > 0.05$, Fisher's Exact Test).

При сравняване подгрупите от пациенти с торакална, тораколумбална и лумбална сколиоза помежду им беше установена статистически значима асоциация между полиморфизма и тораколумбалния тип крива (CC+TC vs. TT, $p = 0.03$ и C vs. T, $p = 0.01$, Fisher's Exact Test), при която средният предоперативен ъгъл на сколиозата е по-малък. Odds ratios в отделните подгрупи от пациенти са представени на таблица 4.60.

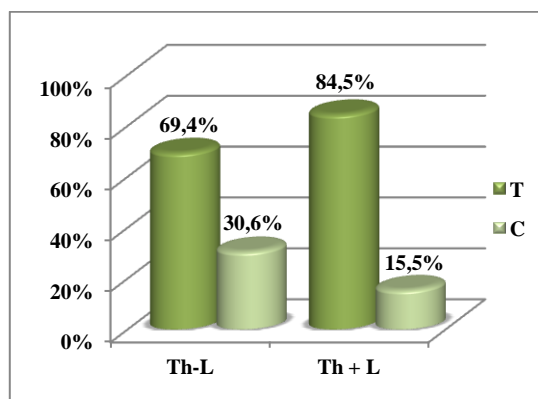
Таблица 4.60. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти (case-only study)

Подгрупа	Модел на генно влияние	Генотип, Ален	p (Fisher's Exact Test)	OR [95% CI]
Cobb >40° Корсетолечение/без корсетолечение (n ₁ =49, n ₂ =34)	Кодоминантен	ТТ vs. СС	1	1.35 [0.18-10.3]
	Доминантен	ТТ vs. ТC + СС	0.82	0.82 [0.33-2.07]
	Рецесивен	ТТ + ТC vs. СС	1	1.47 [0.20-11.0]
	Алелен	Т vs. С	1	0.92 [0.42-2.01]
Торакална/ тораколумбална+лумбална първична крива (n ₁ =62, n ₂ =43)	Кодоминантен	ТТ vs. СС	0.38	2.42 [0.38-15.5]
	Доминантен	ТТ vs. ТC + СС	0.53	1.37 [0.61-3.09]
	Рецесивен	ТТ + ТC vs. СС	0.65	2.25 [0.36-14.1]
	Алелен	Т vs. С	0.38	1.41 [0.71-2.77]
Тораколумбална/ торакална+лумбална първична крива (n ₁ =31, n ₂ =74)	Кодоминантен	ТТ vs. СС	0.09	0.19 [0.03-1.24]
	Доминантен	СС + ТC vs. ТТ	0.03	2.69 [1.13-6.41]
	Рецесивен	СС vs. ТC + ТТ	0.15	3.86 [0.61-24.3]
	Алелен	С vs. Т	0.01	2.40 [1.19-4.83]
Лумбална/ тораколумбална+торакална първична крива (n ₁ =12, n ₂ =93)	Кодоминантен	ТТ vs. СС	0.59	Infinity
	Доминантен	ТТ vs. ТC + СС	0.05	6.95 [0.86-56.1]
	Рецесивен	ТТ + ТC vs. СС	1	Infinity
	Алелен	Т vs. С	0.05	6.5 [0.85-49.61]

Резултатите са представени графично на фиг. 4.72 и 4.73.



Фиг. 4.72. Доминантен модел на генно влияние (СС+ТC) / ТТ при тораколумбален тип крива.



Фиг. 4.73. Процентно разпределение на алелите С и Т при тораколумбален тип крива.

В заключение, ТТ генотипът и Т алелът на rs11190870 се свързват с началото и с прогресията на идиопатичната сколиоза, с АИС, с фамилната история и с женския пол, следователно полиморфният С алел и СС генотип имат протективен ефект. С алелът показва асоциация с тораколумбалния тип крива.

2.4.7. Трансформиращ растежен фактор тип В1 – *TGFB1* (*TGF-β1*) rs1800469 C/T (-509C > T)

Честотата на функционалния полиморфизъм *TGFB1* (rs1800469 C/T) беше проучена в групата като цяло и в отделните подгрупи от пациенти с идиопатична сколиоза и беше сравнена с тази на неродствени индивиди без клинични белези на сколиоза (case-control study) или с други подгрупи от пациенти (case-only study).

Асоциацията в отделните подгрупи беше проучена при генотипен (кододоминантен, доминантен и рецесивен) и алелен модел. Генотипните и алелните честоти на *TGFBI* (rs1800469 C/T) и HWE са представени в таблица 4.61.

Таблица 4.61. Разпределение на генотипните честоти при пациенти и контроли.

Ген Полиморфизъм	Група	Случаи, N (%)			HWE		Контроли, N (%)			HWE	
		ТТ	СТ	СС	χ^2	р	ТТ	СТ	СС	χ^2	р
<i>TGFBI</i> (rs1800469 C/T)	Обща група	53 (50.5)	42 (40.0)	10 (9.5)	0.16	0.69	68 (32.4)	104 (49.5)	38 (18.1)	0.03	0.87
	Мъже	10 (52.6)	8 (42.1)	1 (5.3)	0.14	0.71	15 (39.5)	17 (44.7)	6 (15.8)	0.1	0.75
	Жени	43 (50.0)	34 (39.5)	9 (10.5)	0.34	0.56	53 (30.8)	87 (50.6)	32 (18.6)	0.13	0.72

Полиморфизмът показва съответствие със закона на Hardy-Weinberg. В общата извадка от пациенти и контроли честотата на хомозиготния ТТ генотип и на полиморфния Т алел на *TGFBI* (rs1800469 C/T) беше по-висока при пациенти с идиопатична сколиоза в сравнение с контроли (ТТ vs. ТС vs. СС, $p = 0.005$ и Т vs. С, $p = 0.001$, χ^2 -тест) и на базата на тези резултати *TGFBI* (rs1800469 C/T) може да се разглежда като самостоятелен предразполагащ фактор за идиопатична сколиоза при българските пациенти.

Носителството на хомозиготния ТТ генотип се свързва с 1.56 пъти по-висок риск (ТТ vs. ТС+СС, RR=1.56, 95% CI: 1.19-2.05), а на Т алела – с 1.23 пъти по-висок риск (Т vs. С, RR=1.23, 95% CI: 1.09-1.39) от развитие на идиопатична сколиоза при българи.

На таблица 4.62 са представени ORs, получени при сравняване на отделните подгрупи от пациенти и контроли.

Таблица 4.62. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти и контроли (case-control study)

Подгрупа	Модел на генно влияние	Генотип, Алел	р (χ^2 -тест)	OR [95% CI]
Обща група ($n_1=105$, $n_2=210$)	Кододоминантен	ТТ vs. СС	0.005	2.96 [1.35-6.49]
		ТТ vs. ТС	0.01	1.93 [1.16-3.21]
	Доминантен	ТТ vs. ТС + СС	0.002	2.13 [1.32-3.44]
	Рецесивен	ТТ + ТС vs. СС	0.05	2.1 [1.00-4.4]
АИС ($n_1=78$, $n_2=210$)	Кододоминантен	ТТ vs. СС	0.007	3.54 [1.37-9.13]
		ТТ vs. ТС	0.06	1.71 [0.98-2.98]
	Доминантен	ТТ vs. ТС + СС	0.01	1.98 [1.17-3.37]
	Рецесивен	ТТ + ТС vs. СС	0.03	2.65 [1.07-6.55]
ЮИС ($n_1=23$, $n_2=210$)	Кододоминантен	ТТ vs. СС	0.26*	2.42 [0.65-9.03]
		ТТ vs. ТС + СС	0.02*	2.71 [1.13-6.50]
	Рецесивен	ТТ + ТС vs. СС	0.59*	1.47 [0.42-5.21]
	Алелен	Т vs. С	0.06*	1.90 [0.97-3.72]
Фамилни случаи ($n_1=28$, $n_2=210$)	Кододоминантен	ТТ vs. СС	0.03*	7.26 [0.91-57.71]
		ТТ vs. ТС	0.41*	1.42 [0.63-3.21]
	Доминантен	ТТ vs. ТС + СС	0.20*	1.81 [0.82-4.02]
	Рецесивен	ТТ + ТС vs. СС	0.06*	5.97 [0.79-45.27]
Спорадични случаи ($n_1=77$, $n_2=210$)	Кододоминантен	ТТ vs. СС	0.03	2.48 [1.09-5.67]
		ТТ vs. ТС	0.007	2.18 [1.23-3.87]
	Доминантен	ТТ vs. ТС + СС	0.002	2.26 [1.33-3.84]
	Рецесивен	ТТ + ТС vs. СС	0.19	1.67 [0.77-3.64]
	Алелен	Т vs. С	0.005	1.76 [1.19-2.62]

Cobb >40° (n ₁ =84, n ₂ =210)	Кодоминантен	TT vs. CC TT vs. TC	0.008 0.007	3.07 [1.31-7.2] 2.1 [1.22-3.64]
	Доминантен	TT vs. TC + CC	0.001	2.30 [1.37-3.85]
	Рецесивен	TT + TC vs. CC	0.07	2.10 [0.93-4.71]
	Алелен	T vs. C	0.001	1.88 [1.27-2.76]
Cobb <40° (n ₁ =21, n ₂ =210)	Кодоминантен	TT vs. CC	0.33*	2.51 [0.52-12.24]
	Доминантен	TT vs. TC + CC	0.47*	1.57 [0.63-3.9]
	Рецесивен	TT + TC vs. CC	0.39*	2.1 [0.47-9.4]
	Алелен	T vs. C	0.25*	1.5 [0.77-2.93]
Мъже (n ₁ =19, n ₂ =38)	Кодоминантен	TT vs. CC	0.37*	4.00 [0.42-38.46]
	Доминантен	TT vs. TC + CC	0.4*	1.7 [0.56-5.17]
	Рецесивен	TT + TC vs. CC	0.4*	3.38 [0.38-30.29]
	Алелен	T vs. C	0.3*	1.73 [0.73-4.07]
Жени (n ₁ =86, n ₂ =172)	Кодоминантен	TT vs. CC TT vs. TC	0.01 0.01	2.88 [1.24-6.69] 2.08 [1.18-3.65]
	Доминантен	TT vs. TC + CC	0.003	2.25 [1.32-3.82]
	Рецесивен	TT + TC vs. CC	0.09	1.96 [0.89-4.31]
	Алелен	T vs. C	0.003	1.81 [1.22-2.66]

*Fisher's Exact Test (two-tailed); n₁- брой пациенти, n₂- брой контроли.

При руско асоциативно проучване (300 случая/300 контроли) функционалните полиморфизми на TGF-β1 показват връзка с предразположението към АИС. В групата на момичетата TGF-β1 (-509C > T) показва връзка с началото на заболяването и с тежестта на деформацията по рецесивен модел на генно влияние [207].

Взаимодействието между различните клетъчни типове на нервната и мускулната тъкан са медиирани основно от дифундиращи фактори, много от които представляват растежни фактори като TGF-βs [322]. Промените в транскрипционния профил на TGF-βs и TGFBRs биха могли да повлияят регулацията на много сигнални пътища с потенциално участие в етиопатогенезата на идиопатичната сколиоза [208]. В същото време, участието на TGF-β сигнализацията може да е различно при ЮИС и АИС [198].

В подгрупата на АИС генотипните и алелните честоти на TGFBI (rs1800469 C/T) също се различаваха при български пациенти и контроли (TT vs. TC+CC, p = 0.01, OR = 1.98, 95% CI: 1.17-3.37 и T vs. C, p = 0.003, OR = 1.79, 95% CI: 1.21-2.66, χ²-тест). Носителството на хомозиготния TT генотип се свързва с 1.5 пъти по-висок риск от развитие на АИС (TT vs. TC+CC, RR=1.5, 95% CI: 1.11-2.03), а на T алел – с 1.23 пъти по-висок риск (T vs. C, RR=1.23, 95% CI: 1.08-1.41) от развитие на АИС.

Тези резултати потвърждават наблюдаваните при руски пациенти с АИС асоциации [207] и дават основание TT генотипът и T алелът на TGFBI (rs1800469 C/T) да се разглеждат като предразполагащ генетичен фактор за АИС при български пациенти. В подгрупата на ЮИС също се наблюдаваше асоциация с TT генотипа по доминантен модел на генно влияние (табл. 4.62), което предполага възможно участие на този генетичен фактор и при ранната сколиоза. Необходимо е разширено проучване за потвърждаване на тази хипотеза.

В подгрупата и на фамилните и на спорадичните случаи генотипните и алелните честоти на TGFBI (rs1800469 C/T) се различаваха съществено от тези на контролите (табл. 4.62). Следователно, носителството на TT генотип и T алел се свързва с фамилната и с нефамилната форма на идиопатична сколиоза.

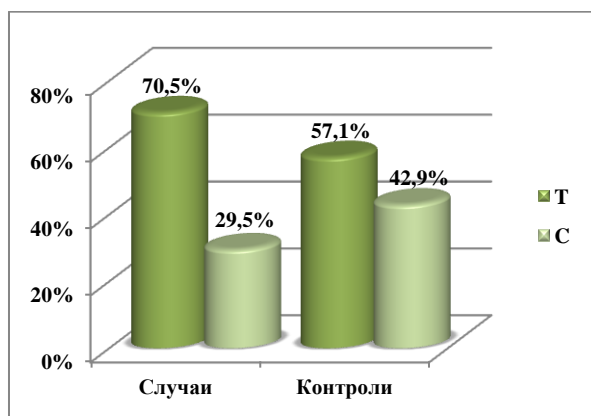
При пациентите с прогресивна сколиоза, довела до необходимост от оперативно лечение, честотата на хомозиготния TT генотип и на T алела също беше по-висока в сравнение с контроли (табл. 4.62). Носителството на хомозиготния TT генотип се свързва с 1.62 пъти по-висок риск (TT vs. TC+CC, RR=1.62, 95% CI: 1.22-2.15), а на T алел – с 1.25 пъти по-висок риск от прогресия на деформацията (T vs. C, RR=1.25, 95% CI: 1.1-1.42). Следователно, TGFBI (rs1800469 C/T) може да се разглежда като

модифициращ генетичен фактор за идиопатична сколиоза при български пациенти, асоцииран с тежка прогресия на кривата (Ъгъл на Cobb >40°). Тези резултати потвърждават асоциацията с прогресията на сколиозата при руски пациенти [207].

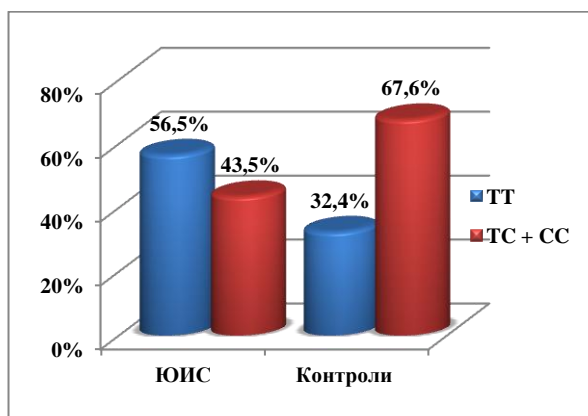
След разделяне на пациентите и контролите по пол само при момичетата се наблюдаваше статистически значима асоциация между *TGFBI* (rs1800469 C/T) и клиничния фенотип (табл. 4.59). Резултатите съответстват на наблюдаваните при момичета с АИС от руски произход [207].

В заключение, полиморфизмът *TGFBI* (rs1800469 C/T), асоцииран с повишена генна експресия [207], се свързва с началото и с прогресията на идиопатичната сколиоза, с АИС и ЮИС, с фамилните и нефамилните форми и с женския пол.

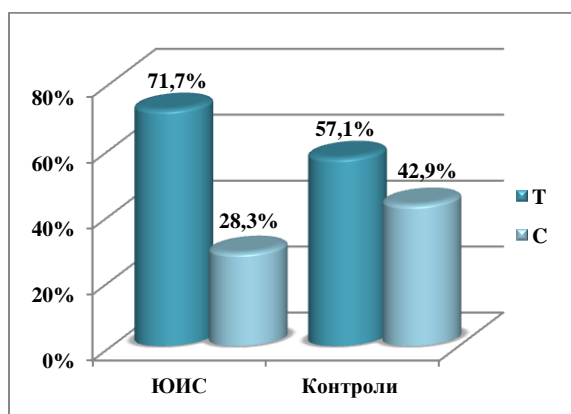
По-долу са представени графично различни модели на генно влияние в общата група и в подгрупите на АИС, ЮИС, спорадична, фамилна и прогресивна сколиоза и при женския пол (фиг. 4.74-4.81).



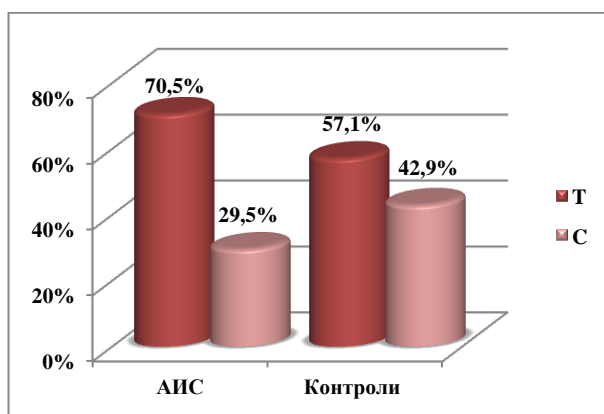
Фиг. 4.74. Процентно разпределение на алелите Т и С при пациенти и контроли.



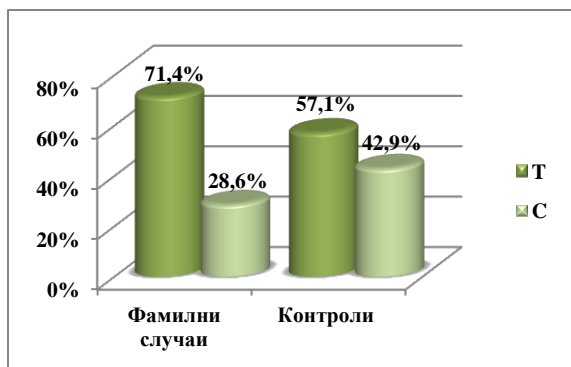
Фиг. 4.75. Доминантен модел на генно влияние TT / (TC+CC) при ЮИС.



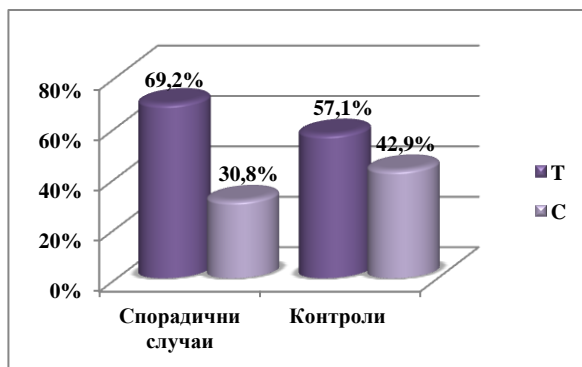
Фиг. 4.76. Процентно разпределение на алелите Т и С при ЮИС.



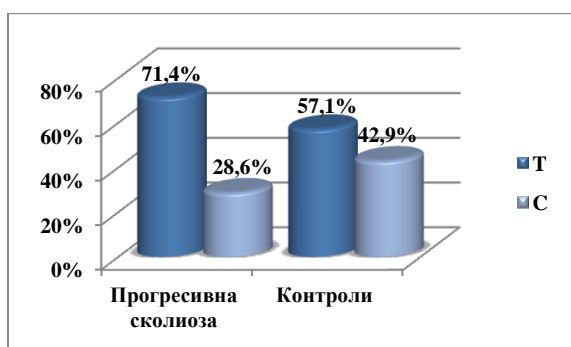
Фиг. 4.77. Процентно разпределение на алелите Т и С при АИС.



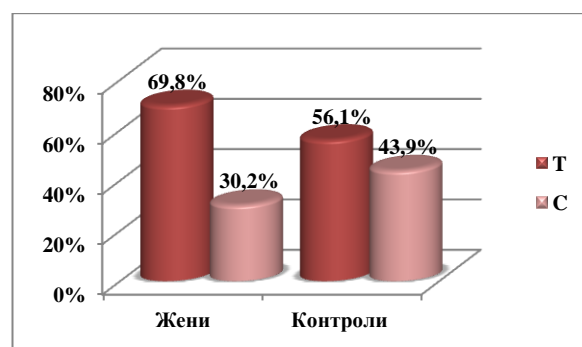
Фиг. 4.78. Процентно разпределение на алелите Т и С при фамилна анамнеза.



Фиг. 4.79. Процентно разпределение на алелите Т и С при спорадични случаи.



Фиг. 4.80. Процентно разпределение на алелите Т и С при прогресивна сколиоза.



Фиг. 4.81. Процентно разпределение на алелите Т и С при женски пол.

Полиморфизмът *TGFBI* (rs1800469 C/T) не показва връзка с изхода от корсетолечението и с типа на кривата ($p > 0.05$, Fisher's Exact Test). Odds ratios в отделните подгрупи от пациенти са представени на таблица 4.63.

Таблица 4.63. Odds Ratios в отделните подгрупи от пациенти (case-only study)

Подгрупа	Модел на генно влияние	Генотип, Алел	p (Fisher's Exact Test)	OR [95% CI]
Cobb >40 ⁰ Корсетолечение/без корсетолечение (n ₁ =49, n ₂ =34)	Кодоминантен	ТТ vs. СС	1	0.92 [0.19-4.35]
	Доминантен	ТТ vs. ТС + СС	0.83	1.13 [0.47-2.71]
	Рецесивен	ТТ + ТС vs. СС	1	0.85 [0.19-3.83]
	Алелен	Т vs. С	1	1.04 [0.53-2.06]
Торакална/ тораколумбална+лумбална първична крива (n ₁ =62, n ₂ =43)	Кодоминантен	ТТ vs. СС	0.73	0.65 [0.15-2.81]
	Доминантен	ТТ vs. ТС + СС	0.84	1.12 [0.51-2.43]
	Рецесивен	ТТ + ТС vs. СС	0.52	0.59 [0.14-2.42]
	Алелен	Т vs. С	1	0.96 [0.53-1.76]
Тораколумбална/ торакална+лумбална първична крива (n ₁ =31, n ₂ =74)	Кодоминантен	ТТ vs. СС	1	0.92 [0.21-4.04]
	Доминантен	ТТ vs. ТС + СС	0.83	0.89 [0.38-2.06]
	Рецесивен	ТТ + ТС vs. СС	1	0.98 [0.24-4.04]
	Алелен	Т vs. С	0.87	0.93 [0.49-1.77]
Лумбална/ тораколумбална+торакална първична крива (n ₁ =12, n ₂ =93)	Кодоминантен	ТТ vs. СС	0.58	Infinity
	Доминантен	ТТ vs. ТС + СС	1	0.98 [0.29-3.26]
	Рецесивен	ТТ + ТС vs. СС	0.37	Infinity
	Алелен	Т vs. С	0.65	1.29 [0.49-3.43]

V. ОБОБЩЕНИЕ

При сравняване стойностите на клиничните показатели - средна възраст и среден ъгъл на сколиозата между отделните клинични подгрупи се наблюдават закономерни разлики и положителна корелация между тези два фактора. В групата на ювенилната идиопатична сколиоза (ЮИС) средният ъгъл най-общо намалява с възрастта, като пикът е на 6-годишна възраст. Колкото по-малко е детето по време на поставяне на диагнозата, толкова по-голям е рискът от прогресия на деформацията и предоперативният ъгъл на Cobb е по-голям. При адолесцентната идиопатична сколиоза (АИС) се наблюдава тенденция към асоциация и при разделяне на случаите по пол се достига статистическа значимост в групата на момичетата. По-големите градуси на сколиозата съответстват на периодите на ускорен растеж, когато вероятността от поява или прогресия на съществуваща деформация е по-голяма.

Резултатите от молекулярно-генетичното проучване показват, че полиморфизмите: *ACE* (*rs1799752*), *VDR* (*rs2228570*), *IGF-1* (*rs5742612*), *AMPD1* (*rs17602729*), *ACTN3* (*rs1815739*), *BMP4* (*rs4898820*), *TPH1* (*rs10488682*), *Lep* (*rs7799039*), *MMP-3* (*rs3025058*), *MTNR1B* (*rs4753426*) и *CHD7* (*rs4738824*) и *CHL1* (*rs1400180*) нямат самостоятелен предразполагащ или модифициращ ефект при идиопатична сколиоза сред българските пациенти (табл. 4.64).

Табл. 4.64. Полиморфизми, показали липса на асоциация с предразположението и прогресията на идиопатичната сколиоза.

Ген	Полиморфизъм	P	Брой проучвания, показали позитивни резултати	Брой проучвания, показали негативни резултати
<i>MMP3</i>	<i>rs3025058</i>	NS	1	2
<i>BMP4</i>	<i>rs4898820</i>	NS	0	1
<i>Lep</i>	<i>rs7799039</i>	NS	0	1
<i>MTNR1B</i>	<i>rs4753426</i>	NS	1	3
<i>TPH1</i>	<i>rs10488682</i>	NS	1	1
<i>IGF-1</i>	<i>rs5742612</i>	NS	2	2
<i>VDR</i>	<i>rs2228570</i>	NS	0	1
<i>CHD7</i>	<i>rs4738824</i>	NS	1	1
<i>CHL1</i>	<i>rs1400180</i>	NS	1	0
<i>ACE</i>	<i>rs1799752</i>	NS	1	0
<i>ACTN3</i>	<i>rs1815739</i>	NS	0	1
<i>AMPD1</i>	<i>rs17602729</i>	NS	0	0

Някои от тези полиморфизми показват асоциация с типа на гръбначната крива (торакална, торако-лумбална, лумбална), което предполага тяхното значение като второстепенни модифициращи фактори при идиопатичната сколиоза.

Необходими са репликативни проучвания в различни популационни групи за изясняване на евентуалното участие на тези полиморфизми в етиопатогенезата на идиопатичната сколиоза, по специално за: *ACE* (*rs1799752*), *AMPD1* (*rs17602729*) и *ACTN3* (*rs1815739*), за които няма данни за други проучвания тип случаи/контроли. Предвид нивото на значимост при цялостните геномни проучвания тип GWAS ($p < 10^{-5}$), последните не са подходящи за детекция на чести генетични варианти с минорен или умерен ефект в етиопатогенезата на социално-значимите заболявания.

На табл. 4.65 са представени полиморфизмите, показали положителни асоциации с предразположението и/или прогресията на идиопатичната сколиоза.

Табл. 4.65. Полиморфизми, показали положителни асоциации с идиопатичната сколиоза.

Ген	SNP	P	Брой проучвания с позитивни резултати	Брой проучвания с негативни резултати
<i>TGFB1</i>	<i>rs1800469</i>	0.001* 0.001**	1	0
<i>GPR126</i>	<i>rs6570507</i>	0.004* 0.003**	3	0
<i>LBX1</i>	<i>rs11190870</i>	0.0009* 0.003**	6	0
<i>IL17RC</i>	<i>rs708567</i>	< 0.0001* < 0.0001**	2	0
<i>IL-6</i>	<i>rs180095</i>	< 0.0001* < 0.0001**	1	1
<i>ESR1</i>	<i>rs2234693</i>	0.01* 0.03**	1	2
<i>ESR1</i>	<i>rs9340799</i>	0.02*	2	3
<i>MATN1</i>	<i>rs1149048</i>	0.01**	1	2

*предразположение **прогресия

Общо, 7 полиморфизма са асоциирани с предразположението към идиопатична сколиоза: *IL-6* (*rs1800795*), *ESR1* (*rs9340799*), *ESR1* (*rs2234693*), *IL17RC* (*rs708567*), *GPR126* (*rs6570507*), *LBX1* (*rs11190870*), *TGFB1* (*rs1800469*), като *ESR1* (*rs9340799*) се свързва само с ЮИС. От тях 3 полиморфизма се явяват рискови фактори за развитието на идиопатична сколиоза: *IL17RC* (*rs708567*), *GPR126* (*rs6570507*), *TGFB1* (*rs1800469*), а останалите 4 полиморфизма имат протективен ефект. Полиморфизмите *ESR1* (*rs9340799*) и *ESR1* (*rs2234693*) се свързват с ранната сколиоза, останалите полиморфизми – с АИС, а *TGFB1* (*rs1800469*) – с АИС и с ЮИС.

Общо, 7 полиморфизма са асоциирани с прогресията на кривата: *TGFB1* (*rs1800469* C/T), *ESR1* (*rs2234693*), *MATN1* (*rs1149048*), *IL17RC* (*rs708567*), *GPR126* (*rs6570507*), *LBX1* (*rs11190870*), *IL-6* (*rs1800795*). От тях 3 полиморфизма са модифициращи фактори при идиопатичната сколиоза: *TGFB1* (*rs1800469*), *GPR126* (*rs6570507*) и *IL17RC* (*rs708567*), 3 полиморфизма имат протективен ефект по отношение на прогресията: *IL-6* (*rs1800795*), *ESR1* (*rs2234693*), *LBX1* (*rs11190870*), а *MATN1* (*rs1149048*) се свързва само с бавнопрогресивна и непрогресивна сколиоза.

Общо, 6 полиморфизма са асоциирани с фамилната история на идиопатичната сколиоза: *MATN1* (*rs1149048*), *ESR1* (*rs2234693*), *IL-6* (*rs1800795*), *TGFB1* (*rs1800469*), *LBX1* (*rs11190870*), *IL17RC* (*rs708567*). От тях 3 полиморфизма се явяват рискови фактори за развитието на идиопатична сколиоза при положителна фамилна анамнеза: *MATN1* (*rs1149048*), *TGFB1* (*rs1800469*), *IL17RC* (*rs708567*), а останалите 3 полиморфизма имат протективен ефект.

Общо, 6 полиморфизма показват асоциация със спорадичната идиопатична сколиоза: *TGFB1* (*rs1800469*), *ESR1* (*rs2234693*), *IL17RC* (*rs708567*), *GPR126* (*rs6570507*), *LBX1* (*rs11190870*), *IL-6* (*rs708567*). От тях 3 полиморфизма се явяват рискови фактори за развитието на идиопатична сколиоза при отрицателна фамилна анамнеза: *TGFB1* (*rs1800469*), *IL17RC* (*rs708567*), *GPR126* (*rs6570507*), а останалите 3 полиморфизма имат протективен ефект.

Общо, 6 полиморфизма са асоциирани с пола при идиопатична сколиоза: *TGFB1* (*rs1800469*), *GPR126* (*rs6570507*), *IL17RC* (*rs708567*), *IL-6* (*rs1800795*), *ESR1* (*rs2234693*), *LBX1* (*rs11190870*). От тях три полиморфизма са рискови фактори за развитие на деформацията при женския пол: *TGFB1* (*rs1800469*), *GPR126* (*rs6570507*), *IL17RC* (*rs708567*), а останалите 3 полиморфизма имат протективен ефект при женския пол. Полиморфизмът *IL17RC* (*rs708567*) се явява рисков фактор за развитие на идиопатична сколиоза и при мъжкия пол.

Общо, 8 полиморфизма са асоциирани с типа на кривата и е възможно да модифицират фенотипа при отключена деформация без да имат задължително самостоятелно значение на предразполагащ или модифициращ фактор: *VDR* (*rs2228570*), *BMP4* (*rs4898820*), *MATN1* (*rs1149048*), *MMP3* (*rs3025058*), *MTNR1B* (*rs4753426*), *CHD7* (*rs4738824*), *GPR126* (*rs6570507*), *LBX1* (*rs11190870*).

Един полиморфизъм - *ESR1* (*rs2234693*) се свързва с резистентност към корсетолечение.

Тези резултати показват значителна хетерогенност в генетичното предразположение към идиопатична сколиоза при българските пациенти и възможно участие на различни генетични варианти при ранната и късната сколиоза, при прогресивните и непрогресивните форми, при фамилните и спорадичните случаи и при двата пола. От една страна се наблюдават генетични варианти със самостоятелно значение на рискови фактори с предразполагащ и/или модифициращ ефект, а от друга страна има генетични маркери с второстепенно значение на модифициращи фактори.

Относителният риск (RR) от развитие и прогресия на идиопатична сколиоза при носителство на определени генотипове и алели с предразполагащ и модифициращ ефект е представен на табл. 4.66 и 4.67.

Табл. 4.66. Оценка на риска при носителство на генотипове и алели с предразполагащ ефект.

Ген	SNP	Генотип, Алел	RR
<i>IL17RC</i>	<i>rs708567</i> (G/A)	AA vs. GA+GG	2.26
		A vs. G	1.48
<i>IL-6</i>	<i>rs180095</i> (G/C)	GG vs. GC+CC	1.7
		G vs. C	1.35
<i>ESR1</i>	<i>rs2234693</i> (P/p)	PP vs. Pp+pp	1.6
		P vs. p	1.2
<i>TGFB1</i>	<i>rs1800469</i> (C/T)	TT vs. TC+CC	1.56
		T vs. C	1.23
<i>GPR126</i>	<i>rs6570507</i> (A/G)	GG vs. GA+AA	1.46
		G vs. A	1.15
<i>LBX1</i>	<i>rs11190870</i> (T/C)	TT vs. TC+CC	1.35
		T vs. C	1.19

Табл. 4.67. Оценка на риска при носителство на генотипове и алели с модифициращ ефект.

Ген	SNP	Генотип, Алел	RR
<i>IL17RC</i>	<i>rs708567</i> (G/A)	AA vs. GA+GG	2.26
		A vs. G	1.46
<i>IL-6</i>	<i>rs180095</i> (G/C)	GG vs. GC+CC	1.8
		G vs. C	1.38
<i>ESR1</i>	<i>rs2234693</i> (P/p)	PP vs. Pp+pp	1.6
		P vs. p	1.2
<i>TGFB1</i>	<i>rs1800469</i> (C/T)	TT vs. TC+CC	1.62
		T vs. C	1.25
<i>GPR126</i>	<i>rs6570507</i> (A/G)	GG vs. GA+AA	1.5
		G vs. A	1.17
<i>LBX1</i>	<i>rs11190870</i> (T/C)	TT vs. TC+CC	1.34
		T vs. C	1.18

Идентифицирането на молекулни маркери с диагностична и прогностична стойност ще бъде полезно в клиничната практика за ранна диагностика на предразположението към сколиоза при родственици и за по-точна прогноза на риска от бърза прогресия на деформацията при засегнати индивиди. Това ще позволи провеждане на профилактични мероприятия и ранна терапия.

VI. ИЗВОДИ

1. Възрастта на началните клинични прояви при идиопатична сколиоза е важен показател за степента на прогресия на гръбначната крива. При по-ранна възраст, рискът от прогресия на деформацията е повишен и предоперативния ъгъл е по-голям.
2. Съществува хетерогенност в генетичното предразположение към идиопатична сколиоза при българските пациенти. От една страна се наблюдават полиморфни варианти със самостоятелно значение на рискови фактори (с предразполагаш и/или модифициращ ефект) или с протективен ефект, а от друга страна има генетични маркери с второстепенно значение на модифициращи фактори.
3. Възможно е участие на различни генетични варианти при ранната и късната сколиоза, при прогресивните и непрогресивните форми, при фамилените и спорадичните случаи, комбинациите от тях, както и в зависимост от пола.
4. Потвърдените асоциации с кандидат-гени, както от предходни асоциативни проучвания, базирани на хипотези, така и от цялостни геномни асоциативни проучвания, предполагат участие на полиморфни варианти в различни кандидат-гени, при това с различно ниво на значимост, в етиопатогенезата на идиопатичната сколиоза при българските пациенти.
5. Отхвърлена е асоциация с неизследвания до момента за връзка с деформацията функционален полиморфизъм в гена за аденозинмонофосфатдезаминаза, което показва, че хомозиготният генотип, свързан с периоди на миалгии, мускулни крампи, слабост и преждевременна умора, не е самостоятелен предразполагаш фактор за идиопатична сколиоза при българските пациенти.
6. Проучването на генетични маркери би послужило за възможна оценка на риска от прогресия на сколиозата и/или възможна обвързаност с конкретен фенотип, което дава възможност за приложение в клиничната практика за индивидуална прогноза, профилактика или ранна терапия - с минимално инвазивни интервенции и икономически измерим ефект.

VII. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ

Научно-теоретични приноси

1. Поставено е началото на молекулярно-генетичните проучвания върху идиопатичната сколиоза в България и възможности за включване на генетични изследвания в мащабни профилактични програми.
2. За първи път:
 - 2.1. в България е проучена честотата на 11 полиморфизма: *IGF-1* (*rs5742612*), *CHD7* (*rs4738824*), *MTNR1B* (*rs4753426*), *IL17RC* (*rs708567*), *GPR126* (*rs6570507*), *LBX1* (*rs11190870*), *CHL1* (*rs1400180*), *TPH1* (*rs10488682*), *MATN1* (*rs1149048*), *BMP4* (*rs4898820*), *Lep* (*rs7799039*).
 - 2.2. в европейска популация е изследвана връзката между идиопатичната сколиоза и 5 полиморфизма: *IGF-1* (*rs5742612*), *TPH1* (*rs10488682*), *VDR* (*rs2228570*), *ACE* (*rs1799752*), *ACTN3* (*rs1815739*).
 - 2.3. е проучена връзката между идиопатичната сколиоза и функционален полиморфизъм *AMPD1* (*rs17602729*).

Методични приноси

1. Създадена е геномна банка за идиопатична сколиоза към Национална генетична лаборатория (Лаборатория по Клинична генетика на СБАЛАГ „Майчин дом“).
2. Оптимизирани са методи за генотипиране на общо 20 полиморфизма в 19 гена.

Научно - приложни приноси

1. Разработен е алгоритъм за изследване на набор от генетични маркери с цел ранна диагностика на предразположението към сколиоза при родственици.
2. Разработен е алгоритъм за изследване на набор от генетични маркери с цел прогноза на риска от прогресия на сколиозата при засегнатите деца.

Приноси с потвърдителен характер

1. Потвърдена е връзката между предразположението към адолесцентна идиопатична сколиоза и полиморфизмите: *IL-6* (*rs1800795*), *IL17RC* (*rs708567*), *GPR126* (*rs6570507*), *LBX1* (*rs11190870*), *TGFB1* (*rs1800469*).
2. Потвърдена е връзката между прогресията на идиопатичната сколиоза и полиморфизмите: *IL17RC* (*rs708567*) и *TGFB1* (*rs1800469*).

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

ID	Пол	Начало, години	Тип	Основни характеристики на сколиотичната деформация			ФА	Корсетолечение
				Ъгъл ⁰ на Cobb	Конвекситет на основната крива	Топография		
A1	M	14	AIS	45.0	D	Th	-	-
A2	F	12	AIS	68.0	D	Th	-	+
A3	M	15	AIS	80.0	D	Th-L	-	-
A4	F	16	AIS	20.0	D	Th	-	-
A5	M	12	AIS	40.0	D	Th	-	-
A6	F	12	AIS	68.0	D	Th	-	+
A7	F	9	JIS	32.0	D	Th	+	+
A8	M	9	JIS	29.0	D	Th	+	+
A9	F	15	AIS	53.0	D	Th	-	-
A10	F	11	AIS	70.0	D	Th	-	+
A11	F	16	AIS	45.0	D	Th	-	-
A12	F	8	JIS	60.0	L	Th-L	-	+
A13	M	11	AIS	50.0	D	Th-L	-	+
A14	F	9	JIS	46.0	D	Th	-	+
A15	F	9	JIS	48.0	D	Th	+	+
A16	F	12	AIS	74.0	D	Th	-	-
A17	F	12	AIS	59.0	D	Th	-	+
A18	F	6	JIS	93.0	D	Th	-	+
A19	F	9	JIS	57.0	D	Th-L	-	+
A20	F	10	AIS	22.0	D	Th	-	-
A21	F	12	AIS	40.0	D	Th-L	+	-
A22	F	15	AIS	95.0	D	Th-L	+	-
A23	F	11	AIS	63.0	D	Th-L	-	+
A24	F	12	AIS	18.0	D	Th	+	+
A25	M	9	JIS	22.0	D	Th	+	+
A26	F	12	AIS	30.0	D	Th	-	-
A27	F	5	JIS	55.0	D	Th	+	+
A28	F	13	AIS	54.0	D	Th	-	+
A29	F	11	AIS	60.0	D	Th-L	-	-
A30	F	3	IIS	46.9	L	Th	-	+
A31	F	5	JIS	68.0	L	Th-L	-	-
A32	F	11	AIS	75.9	D	DMC	-	+
A33	M	14	AIS	68.4	D	Th-L	-	-
A34	F	13	AIS	68.8	D	Th	-	+
A35	F	12	AIS	99.7	D	Th-L	-	+
A36	F	15	AIS	58.1	L	Th-L	-	-
A37	F	11	AIS	80.7	D	Th	-	-
A38	F	12	AIS	20.0	D	Th	+	-
A39	M	7	JIS	64.0	D	Th-L	+	+
A40	F	9	JIS	52.6	D	L	-	+
A41	F	12	AIS	70.0	D	Th	-	+
A42	F	14	AIS	57.0	D	Th	+	-
A43	F	11	AIS	51.2	D	Th	-	+
A44	F	11	AIS	60.0	D	Th-L	-	+
A45	F	11	AIS	67.1	L	Th	-	-
A46	F	12	AIS	57.9	D	Th	-	+
A47	M	15	AIS	49.5	D	Th-L	-	-
A48	F	9	JIS	30.0	D	Th-L	-	-
A49	F	11	AIS	52.0	D	Th	+	+
A50	M	11	AIS	86.6	D	Th	-	-
A51	F	10	AIS	44.0	D	Th	+	+

A52	F	12	AIS	30.0	D	Th	+	-
A53	F	11	AIS	43.9	D	Th-L	-	-
A54	F	3	IIS	120.0	D	Th	+	-
A55	F	7	JIS	15.0	D	Th	+	-
A56	M	15	AIS	60.5	D	Th	-	-
A57	F	13	AIS	37.4	L	Th-L	-	+
A58	M	15	AIS	40.5	D	Th	-	-
A59	F	14	AIS	40.0	D	Th-L	-	+
A60	F	12	AIS	55.0	D	Th	-	+
A61	M	6	JIS	68.8	L	Th-L	-	+
A62	F	11	AIS	55.0	D	Th-L	-	+
A63	F	7	JIS	60.0	D	Th-L	-	-
A64	F	13	AIS	20.0	D	Th	+	-
A65	F	14	AIS	36.0	D	Th	+	-
A66	F	9	JIS	46.0	L	L	-	+
A67	F	2	IIS	73.0	D	Th-L	-	+
A68	F	16	AIS	20.0	L	L	+	-
A69	F	15	AIS	16.0	L	L	+	-
A70	F	13	AIS	90.0	D	Th-L	-	-
A71	M	13	AIS	125.0	L	Th	-	-
A72	M	14	AIS	80.0	L	L	-	-
A73	F	12	AIS	20.0	D	L	+	-
A74	F	9	JIS	16.0	D	Th-L	+	-
A75	F	13	AIS	60.0	D	Th	-	-
A76	F	13	AIS	52.0	D	Th	+	+
A77	F	10	AIS	66.0	D	Th-L	-	+
A78	F	11	AIS	68.0	D	Th	-	+
A79	F	11	AIS	55.0	D	Th-L	-	-
A80	F	14	AIS	41.0	D	L	+	-
A81	F	10	AIS	81.0	L	Th	-	+
A82	F	12	AIS	57.0	D	Th	-	+
A83	F	10	AIS	95.0	D	Th	-	-
A84	F	12	AIS	57.0	D	Th	+	-
A85	F	14	AIS	54.0	D	Th	-	+
A86	F	11	AIS	16.0	D	Th	-	+
A87	F	13	AIS	51.0	D	Th-L	-	-
A88	F	9	JIS	44.0	L	L	-	+
A89	F	2	IIS	90.0	D	Th	-	+
A90	M	8	JIS	12.0	D	Th	-	-
A91	F	12	AIS	66.0	L	L	-	-
A92	F	10	AIS	16.0	D	Th	-	-
A93	F	11	AIS	75.0	D	Th	-	-
A94	F	12	AIS	80.0	D	Th	-	-
A95	F	9	JIS	30.0	L	L	+	+
A96	M	14	AIS	60.0	D	Th-L	-	+
A97	M	9	JIS	54.0	D	Th	-	+
A98	F	4	JIS	80.0	D	Th	-	+
A99	F	13	AIS	60.0	D	Th	+	+
A100	F	15	AIS	49.0	D	Th-L	-	+
A101	F	14	AIS	54.0	D	L	-	+
A102	F	12	AIS	70.0	D	Th-L	-	+
A103	F	13	AIS	56.0	D	Th	-	+
A104	F	13	AIS	58.0	L	Th	-	+
A105	M	16	AIS	30.0	L	L	+	-

*ID-идентификационен номер; M-мъжки пол; F-женски пол; AIS-адолесцентна идиопатична сколиоза; IIS-инфантилна идиопатична сколиоза; JIS-ювенилна идиопатична сколиоза; D-Дясноконвексна крива (Dextroscoliosis); L-Лявоконвексна крива (Levoscoliosis); Th-торакална сколиоза; Th-L-тораколумбална сколиоза; L- лумбална сколиоза; DMC-двойна крива (Double major curve); ФА-фамилна анамнеза.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Ген	Полиморфизъм	Алелни честоти в европейска популация (hapmap.ncbi.nlm.nih.gov)		Метод
		Див тип алел	Полиморфен алел	
<i>CHD7</i>	<i>rs4738824</i>	G	A	TaqMan assay C_509500_10
		0.77	0.23	
<i>MTNR1B</i>	<i>rs4753426</i>	T	C	TaqMan assay C_289583_10
		0.50	0.50	
<i>IL17RC</i>	<i>rs708567</i>	G	A	TaqMan assay C_3008341_10
		0.48	0.52	
<i>GPR126</i>	<i>rs6570507</i>	A	G	TaqMan assay C_2502198_10
		0.32	0.68	
<i>TGFB1</i>	<i>rs1800469</i> (-509C/T)	C	T	TaqMan assay C_8708473_10
		0.71	0.29	
<i>LBX1</i>	<i>rs11190870</i>	T	C	TaqMan assay C_1349874_20
		0.59	0.41	
<i>CHL1</i>	<i>rs1400180</i>	T	G	TaqMan assay C_8831533_10
		0.48	0.52	
<i>IL-6</i>	<i>rs1800795</i> (-174G/C)	G	C	PCR-RFLP
		0.58	0.42	
<i>MMP3</i>	<i>rs3025058</i> (-1171 5A/6A)	5A	6A	PCR-RFLP
		0.47	0.53	
<i>TPH1</i>	<i>rs10488682</i>	T	A	PCR-RFLP
		0.74	0.26	
<i>MATN1</i>	<i>rs1149048</i>	G	A	PCR-RFLP
		0.47	0.53	
<i>ESR1</i>	<i>rs9340799</i> (<i>Xba</i> I)	A	G	PCR-RFLP
		0.69	0.31	
<i>ESR1</i>	<i>rs2234693</i> (<i>Pvu</i> II)	C	T	PCR-RFLP
		0.42	0.58	

<i>ACE</i>	<i>rs1799752</i> (-/G; I/D)	I (G)	D (-)	PCR
		NA	NA	
<i>ACTN3</i>	<i>rs1815739</i> (R577X)	C	T	PCR-RFLP
		0.57	0.43	
<i>AMPD1</i>	<i>rs17602729</i> (C34T)	C	T	PCR-RFLP
		0.88	0.12	
<i>VDR</i>	<i>rs2228570</i> (FokI)	C	T	PCR-RFLP
		0.38	0.62	
<i>BMP4</i>	<i>rs4898820</i>	T	G	PCR-RFLP
		0.51	0.49	
<i>Lep</i>	<i>rs7799039</i>	G	A	PCR-RFLP
		0.56	0.44	
<i>IGF-1</i>	<i>rs5742612</i>	C	T	PCR-RFLP
		0.04	0.96	

* NA – няма данни от International HarMap Project за европейски популации

VIII. ЛИТЕРАТУРНА СПРАВКА

- [1]. Милковска-Димитрова, Т., Каракашов, Ат. Вродена съединителнотъканна малостойност у децата. Медицина и физкултура. София, 1987.
- [2]. Димитрова, Т., Каракашов, Ат., Георгиева, В. Вродена съединителнотъканна малостойност. Медицина и физкултура. София, 1995.
- [3]. Tanchev PI, Dzherov AD, Parushev AD, Dikov DM, Todorov MB. Scoliosis in rhythmic gymnasts. *Spine*. 2000 Jun 1;25(11):1367-72.
- [4]. Nikolova S, Dikova M, Dikov D, Djerov A, Dzhebir G, Atanasov V, et al. Role of the IL-6 Gene in the Etiopathogenesis of Idiopathic Scoliosis. *Analytical Cellular Pathology*. 2015;2015:621893.
- [5]. Nikolova S, Yablanski V, Vlaev E, Stokov L, Savov A, Kremensky I. Association between Estrogen Receptor Alpha Gene Polymorphisms and Susceptibility to Idiopathic Scoliosis in Bulgarian Patients: A Case-Control Study. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*. 2015; 3(2):278-82.
- [6]. Atmaca H, Inanmaz M, Bal E, Caliskan I, Kose K. Axial plane analysis of Lenke 1A adolescent idiopathic scoliosis as an aid to identify curve characteristics. *The Spine Journal*. 2014;14(10):2425-33.
- [7]. Miller N. Genetics and functional pathology of idiopathic scoliosis. In: Kusumi K, Dunwoodie S, eds. *The genetics and development of scoliosis*. Springer. New York, 2010.
- [8]. Cheung WY, Luk KDK. Focus on Classification of adolescent idiopathic scoliosis. In: *Children's Orthopaedics*. The British Editorial Society of Bone and Joint Surgery, 2013.
- [9]. James JJ. Idiopathic scoliosis; the prognosis, diagnosis, and operative indications related to curve patterns and the age at onset. *J Bone Joint Surg Br*. 1954 Feb;36-B(1):36-49.
- [10]. Negrini S, Aulisa AG, Aulisa L, Circo AB, de Mauroy JC, Durmala J, et al. 2011 SOSORT guidelines: Orthopaedic and Rehabilitation treatment of idiopathic scoliosis during growth. *Scoliosis*. 2012;7:3
- [11]. Negrini S, Grivas TB, Kotwicki T, Maruyama T, Rigo M, Weiss HR. Why do we treat adolescent idiopathic scoliosis? What we want to obtain and to avoid for our patients. SOSORT 2005 Consensus paper. *Scoliosis*. 2006;1:4.
- [12]. Lonstein JE. Scoliosis: surgical versus nonsurgical treatment. *Clin Orthop Relat Res*. 2006;443:248-59.
- [13]. Bunnell WP. The natural history of idiopathic scoliosis. *Clin Orthop Relat Res*. 1988;229:20-5.
- [14]. Weinstein SL, Dolan LA, Cheng JC, Danielsson A, Morcuende JA. Adolescent idiopathic scoliosis. *Lancet*. 2008;371(9623):1527-37.
- [15]. Hawes MC. Health and function of patients with untreated idiopathic scoliosis. *Jama*. 2003;289(20):2644.
- [16]. Ponseti IV, Friedman B. Prognosis in idiopathic scoliosis. *J Bone Joint Surg Am*. 1950;32A(2):381-95.
- [17]. Lenke LG, Betz RR, Harms J, Bridwell KH, Clements DH, Lowe TG, et al. Adolescent idiopathic scoliosis: a new classification to determine extent of spinal arthrodesis. *J Bone Joint Surg Am*. 2001;83-A(8):1169-81.
- [18]. Wynne-Davies R. Infantile idiopathic scoliosis. Causative factors, particularly in the first six months of life. *J Bone Joint Surg Br*. 1975;57(2):138-41.
- [19]. Lincoln T. Infantile Idiopathic Scoliosis. *Am J Orthop*. 2007;36(11):586-90.
- [20]. Van Goethem J, Van Campenthout A. Scoliosis. In: Van Goethem J, van den Hauwe L, Parizel PM, eds. *Spinal Imaging*. Springer. Heidelberg, 2007.
- [21]. Diedrich O, von Stempel A, Schloz M, Schmitt O, Kraft CN. Long-term observation and management of resolving infantile scoliosis. *J Bone Joint Surg Br*. 2002 Sep; 84(7):1030-5.
- [22]. McMaster M. Infantile idiopathic scoliosis: can it be prevented? *J Bone Joint Surg Br*. 1983;65:612-7.
- [23]. Perdriolle R. La scoliose. Son étude tridimensionnelle. Maloine Edieur. Paris, 1979.
- [24]. Coillard C, Circo AB, Rivard CH. SpineCor treatment for juvenile idiopathic scoliosis: SOSORT award 2010 winner. *Scoliosis*. 2010;5:25.
- [25]. Altaf F. Adolescent Idiopathic Scoliosis. *BMJ*. 2013;346:f2508.
- [26]. Grivas TB, Vasiliadis E, Mouzakis V, Mihas C, Koufopoulos G. Association between adolescent idiopathic scoliosis prevalence and age at menarche in different geographic latitudes. *Scoliosis*. 2006;1:9.
- [27]. Asher M and Burton DC. Adolescent idiopathic scoliosis: natural history and long term treatment effects. *Scoliosis*. 2006;1:2.
- [28]. Weinstein SL, Dolan LA, Wright JG, Dobbs MB. Effects of bracing in adolescents with idiopathic scoliosis. *N Engl J Med*. 2013 Oct;369(16):1512-21.

- [29]. Schlösser T, van der Heijden G, Versteeg A, Castelein R. How 'Idiopathic' Is Adolescent Idiopathic Scoliosis? A Systematic Review on Associated Abnormalities. *PLoS One*. 2014 May;9(5):e97461.
- [30]. Weiss H-R, Moramarco M. Indication for surgical treatment in patients with adolescent Idiopathic Scoliosis – a critical appraisal. *Patient Safety in Surgery*. 2013;7:17.
- [31]. Weiss HR, Moramarco M. Scoliosis—treatment indications according to current evidence. *OA Musculoskeletal Med*. 2013;1(1):1.
- [32]. Taylor TKF, Cumming RG, Jones FL, McCann RG, Plunkett-Cole M: The epidemiology and demography of adolescent idiopathic scoliosis. *Spine: State of the Art Reviews* 2000;14:305-11.
- [33]. Konieczny MR, Senyurt H., Krauspe R. Epidemiology of adolescent idiopathic scoliosis. *Journal of Children's Orthopaedics*. 2013;7(1):3-9.
- [34]. Mo F, Cunningham ME. Pediatric scoliosis. *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine*. 2011;4(4):175-182.
- [35]. Parent S, Newton PO, Wenger DR. Adolescent idiopathic scoliosis: etiology, anatomy, natural history, and bracing. *Instr Course Lect*. 2005;54:529-36.
- [36]. Suh SW, Modi HN, Yang JH, Hong JY. Idiopathic scoliosis in Korean schoolchildren: a prospective screening study of over 1 million children. *Eur Spine J*. 2011;20(7):1087-94.
- [37]. Figueiredo UM, James JJ. Juvenile idiopathic scoliosis. *J Bone Joint Surg Br*. 1981;63(B-1):61-6.
- [38]. Chiu YL, Huang TJ, Hsu RW. Curve patterns and etiologies of scoliosis: analysis in a university hospital clinic in Taiwan. *Changgeng Yi Xue Za Zhi*. 1998;21(4):421-8.
- [39]. Janssen MM, Kouwenhoven JW, Schlösser TP, Viergever MA, Bartels LW, Castelein RM, et al. Analysis of preexistent vertebral rotation in the normal infantile, juvenile, and adolescent spine. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2011;36(7):E486-E491.
- [40]. Nissinen M, Heliovaara M, Ylikoski M, Poussa M. Trunk asymmetry and screening for scoliosis: a longitudinal cohort study of pubertal schoolchildren. *Acta Paediatr*. 1993;82(1):77-82.
- [41]. Kamtsiuris P, Atzpodien K, Ellert U, Schlack R, Schlaud M. Prevalence of somatic diseases in German children and adolescents. Results of the German Health Interview and Examination Survey for Children and Adolescents (KiGGS) *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2007; 50(5-6):686-700.
- [42]. Carter OD, Haynes S. Prevalence rates for scoliosis in US adults: results from the first national health and nutrition examination survey. *Int J Epidemiol*. 1987;16:537-44.
- [43]. Баракова, П. Сравнителен анализ на честотата на разпространение на гръбначните изкривявания и техният ход на развитие в съвременната поликлинична мрежа. *Научни трудове на Русенския университет*. 2008;47:47-50.
- [44]. Танчев, П., Д. Диков, А. Джеров, А. Парушев, Л. Захариев, Н. Тодоров и др. Скрининг-прегледи за структурни сколиози в София. Анализ на резултатите при 4800 ученици. *Ортопедия и травматология*. 1996;33(2):69-73.
- [45]. Kouwenhoven JM, Castelein RM. The Pathogenesis of Adolescent Idiopathic Scoliosis: A Review of the Literature. *Spine*. 2008;33:2898-908.
- [46]. Cotterill PC, Kostuik JP, D'Angelo G, Fernie GR, Maki BE. An anatomical comparison of the human and bovine thoracolumbar spine. *J Orthop Res*. 1986;4:298-303.
- [47]. Garland H. Hereditary Scoliosis. *The British Medical Journal*. 1934 Feb 24;1(3816):328.
- [48]. Gorman KF, Julien C, Oliazadeh N, Tang Q, Moreau A. Genetics of Idiopathic Scoliosis. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. 2014.
- [49]. Tubby A. Deformities, including diseases of the bones and joints: a text-book of orthopaedic surgery. Macmillan and Co, London, 1912.
- [50]. Harrington PR. The etiology of idiopathic scoliosis. *Clin. Orthop. Relat. Res*. 1977;126:17-25.
- [51]. Wynne-Davies R. Familial (idiopathic) scoliosis. A family survey. *J Bone Joint Surg Br*. 1968;50(1):24-30.
- [52]. Riseborough EJ and Wynne-Davies R. A genetic survey of idiopathic scoliosis in Boston, Massachusetts. *J. Bone Joint Surg. Am*. 1973;55(5):974-82.
- [53]. Ogilvie JW, Braun J, Argyle V, Nelson L, Meade M. and Ward K. The search for idiopathic scoliosis genes. *Spine*. 2006;31(6):679-81.
- [54]. Kesling KL, Reinker KA. Scoliosis in twins. A meta-analysis of the literature and report of six cases. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1997;22:2009-14.
- [55]. Inoue M, Minami S, Kitahara H, Otsuka Y, Nakata Y, Takaso M, et al. Idiopathic scoliosis in tweens studied by DNA fingerprinting: the incidence and type of scoliosis. *J Bone Joint Surg Br*. 1998;80:212-7.

- [56]. Cowell HR, Hall JN, and MacEwen, GD. Genetic aspects of idiopathic scoliosis. A Nicholas Andry Award essay, 1970. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1972;86:121–31.
- [57]. Robin GC and Cohen T. Familial scoliosis. A clinical report. *J. Bone Joint Surg. Br.* 1975;57(2):146–8.
- [58]. Hermus JPS, van Rhijn LW, van Ooij A. Non-genetic expression of adolescent idiopathic scoliosis: a case report and review of the literature. *European Spine Journal.* 2007;16(3):338-41.
- [59]. Van Rhijn LW, Jansen EJ, Plasmans CM, Veraart BE. Curve characteristics in monozygotic twins with adolescent idiopathic scoliosis: 3 new twin pairs and a review of the literature. *Acta Orthop Scand.* 2001 Dec;72(6):621-5.
- [60]. Carr AJ, Ogilvie DJ, Wordsworth BP, Priestly LM, Smith R, Sykes B. Segregation of structural collagen genes in adolescent idiopathic scoliosis. *Clin Orthop Relat Res.* 1992;274:305–310.
- [61]. Miller NH, Mims B, Child A, Milewicz DM, Sponseller P, Blanton SH. Genetic analysis of structural elastic fiber and collagen genes in familial adolescent idiopathic scoliosis. *J Orthop Res.* 1996; 14(6):994–999.
- [62]. Zorkol'tseva IV, Liubinskiĭ OA, Sharipov RN, Zaĭdman AM, Aksenovich TI, Dymshits GM. 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(2):196–200.
- [63]. Morcuende JA, Minhas R, Dolan L, Stevens J, Beck J, Wang K, et al. Allelic variants of human melatonin 1A receptor in patients with familial adolescent idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976).* 2003;28(17):2025–8.
- [64]. Marosy B, Justice CM, Nzegwu N, Kumar G, Wilson AF, Miller NH. Lack of association between the aggrecan gene and familial idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976).* 2006;31(13):1420–5.
- [65]. Chen Q, Zhang Y, Johnson DM, Goetinck PF. Assembly of a novel cartilage matrix protein filamentous network: molecular basis of differential requirement of von Willebrand factor A domains. *Mol Biol Cell.* 1999;10:2149–62.
- [66]. The International HapMap Consortium. The International HapMap Project *Nature.* 2003;426:789–96.
- [67]. Herring, J.A. *Tachdjian's Pediatric Orthopaedics.* Philadelphia, Saunders, 2002.
- [68]. Wise CA and Sharma S. Current Understanding of Genetic Factors in Idiopathic Scoliosis. In: Kusumi, K, Dunwoodie S, eds. *The genetics and development of scoliosis.* New York, Springer, 2010;167-190.
- [69]. Lowe TG, Edgar M, Margulies JY, Miller NH, Raso VJ, Reinker KA, et al. Etiology of idiopathic scoliosis: current trends in research. *J. Bone Joint Surg. Am.* 2000;82-A:1157–68.
- [70]. Machida M, Dubousset J, Imamura Y, Iwaya T, Yamada T, and Kimura J. An experimental study in chickens for the pathogenesis of idiopathic scoliosis. *Spine.* 1993;18:1609–15.
- [71]. Machida M, Miyashita Y, Murai I, Dubousset J, Yamada T, and Kimura J. Role of serotonin for scoliotic deformity in pinealectomized chicken. *Spine.* 1997;22:1297–301.
- [72]. Machida M, Murai I, Miyashita Y, Dubousset J, Yamada T, and Kimura J. Pathogenesis of idiopathic scoliosis. Experimental study in rats. *Spine.* 1999;24:1985–9.
- [73]. Bagnall KM, Beuerlein M, Johnson P, Wilson J, Raso VJ, and Moreau M. Pineal transplantation after pinealectomy in young chickens has no effect on the development of scoliosis. *Spine.* 2001;26:1022–7.
- [74]. Fjellidal PG, Grotmol S, Kryvi H, Gjerdet NR, Taranger GL, Hansen T, et al. Pinealectomy induces malformation of the spine and reduces the mechanical strength of the vertebrae in Atlantic salmon, *Salmo salar.* *J. Pineal Res.* 2004;36:132–9.
- [75]. Jen JC, Chan WM, Bosley TM, Wan J, Carr JR, Rub U, et al. Mutations in a human ROBO gene disrupt hindbrain axon pathway crossing and morphogenesis. *Science.* 2004;304:1509–13.
- [76]. Giampietro PF. SNPPing away at the genetic basis of adolescent idiopathic scoliosis. *Annals of Translational Medicine.* 2015;3(1):S26.
- [77]. Tourtellotte WG and J. Milbrandt. Sensory ataxia and muscle spindle agenesis in mice lacking the transcription factor *Egr3.* *Nature Genetics.* 1998;20(1):87–91.
- [78]. Wang R, Y. Qiu, and B. Rui. Neurotrophin-3 mRNA expression in paravertebral muscles of patients with idiopathic scoliosis. *Chinese Journal of Spine and Spinal Cord.* 2007;15:532–4.
- [79]. Raggio CL, PF. Giampietro, S. Dobrin, C. Zhao, D. Dorshorst, N. Ghebraniou, et al. A novel locus for adolescent idiopathic scoliosis on chromosome 12p. *Journal of Orthopaedic Research,* 2009;27(10):1366–72.
- [80]. Qiu Y, Mao SH, Qian BP, Jiang J, Qiu XS, Zhao Q, et al. A promoter polymorphism of neurotrophin 3 gene is associated with curve severity and bracing effectiveness in adolescent idiopathic scoliosis. *Spine.* 2012;37(2):127-33.

- [81]. Ogura Y, Takahashi Y, Kou I, Nakajima M, Kono K, Kawakami N, et al. A replication study for association of 5 single nucleotide polymorphisms with curve progression of adolescent idiopathic scoliosis in Japanese patients. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2013 Apr 1;38(7):571-5.
- [82]. Moreau A, Wang DS, Forget S, Azeddine B, Angeloni D, Fraschini F, et al. Melatonin signaling dysfunction in adolescent idiopathic scoliosis. *Spine*. 2004;29:1772-81.
- [83]. Machida M, Dubousset J, Imamura Y, Iwaya T, Yamada T, Kimura J, et al. Pathogenesis of idiopathic scoliosis: sEPs in chicken with experimentally induced scoliosis and in patients with idiopathic scoliosis. *J Pediatr Orthop*. 1994;14:329-35.
- [84]. Machida M, Dubousset J, Imamura Y, Iwaya T, Yamada T, Kimura J. Role of melatonin deficiency in the development of scoliosis in pinealectomized chickens. *J Bone Joint Surg Br*. 1995;77:134-8.
- [85]. Kono H, Machida M, Saito M, Nishiwaki Y, Kato H, Hosogane N, et al. Mechanism of osteoporosis in adolescent idiopathic scoliosis: experimental scoliosis in pinealectomized chickens. *J Pineal Res*. 2011;51(4):387-93.
- [86]. Girardo M, Bettini N, Dema E, Cervellati S. The role of melatonin in the pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis (AIS) *Eur Spine J*. 2011;20(1):S68-S74.
- [87]. Moreau A, Akoume Ndong MY, Azeddine B, Franco A, Rompre PH, Roy-Gagnon MH, et al. Molecular and genetic aspects of idiopathic scoliosis. Blood test for idiopathic scoliosis. *Orthopade*. 2009;38(2):114-6, 118-21.
- [88]. Qiu XS, Tang NL, Yeung HY, Cheng JC, Qiu Y. Lack of association between the promoter polymorphism of the MTNR1A gene and adolescent idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2008;33(20):2204-7.
- [89]. Nelson LM, Ward K, Ogilvie JW. Genetic variants in melatonin synthesis and signaling pathway are not associated with adolescent idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2011 Jan 1;36(1):37-40.
- [90]. Qiu XS, Tang NL, Yeung HY, Qiu Y, Qin L, Lee KM, et al. The role of melatonin receptor 1B gene (MTNR1B) in adolescent idiopathic scoliosis—a genetic association study. *Stud Health Technol Inform*. 2006;123:3-8.
- [91]. Qiu XS, Tang NL, Yeung HY, Lee KM, Hung VW, Ng BK, et al. Melatonin receptor 1B (MTNR1B) gene polymorphism is associated with the occurrence of adolescent idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2007;32(16):1748-53.
- [92]. Shyy W, Wang K, Gurnett CA, Dobbs MB, Miller NH, Wise C, et al. Evaluation of GPR50, hMel-1B, and ROR-alpha melatonin-related receptors and the etiology of adolescent idiopathic scoliosis. *J Pediatr Orthop*. 2010;30(6):539-43.
- [93]. Morocz M, Czibula A, Grozer ZB, Szecsenyi A, Almos PZ, Rasko I, et al. Association study of BMP4, IL6, Leptin, MMP3, and MTNR1B gene promoter polymorphisms and adolescent idiopathic scoliosis. *Spine*. 2011;36(2):E123-E130.
- [94]. Takahashi Y., M. Matsumoto, T. Karasugi, K. Watanabe, K. Chiba, N. Kawakami, et al. Lack of association between adolescent idiopathic scoliosis and previously reported single nucleotide polymorphisms in MATN-1, MTNR1B, TPH1, and IGF1 in a Japanese population. *J Orthop Res*. 2011;29(7):1055-8.
- [95]. Wang H, Wu Z, Zhuang Q, Fei Q, Zhang J, Liu Y, et al. Association study of tryptophan hydroxylase 1 and arylalkylamine N-acetyltransferase polymorphisms with adolescent idiopathic scoliosis in Han Chinese. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2008 Sep 15;33(20):2199-203.
- [96]. Xu L, Qiu X, Sun X, Mao S, Liu Z, Qiao J, et al. Potential genetic markers predicting the outcome of brace treatment in patients with adolescent idiopathic scoliosis. *European Spine Journal*. 2011;20(10):1757-64.
- [97]. Burwell RG, Dangerfield PH, Moulton A, Anderson SI. Etiologic theories of idiopathic scoliosis: autonomic nervous system and the leptin-sympathetic nervous system concept for the pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis. *Stud Health Technol Inform*. 2008;140:197-207.
- [98]. Miller NH, Mims B, and Milewicz DM. The potential role of elastic fiber system in adolescent idiopathic scoliosis. *J. Bone Joint Surg. Am*. 1994;76:1193-206.
- [99]. Lonstein JE. Adolescent idiopathic scoliosis. *Lancet*. 1994;344:1407-12.
- [100]. Cheng JC, Guo X, and Sher AH. Persistent osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis. A longitudinal follow up study. *Spine*. 1999;24:1218-12.
- [101]. Lee WT, Cheung CS, Tse YK, Guo X, Qin L, Lam TP, et al. Association of osteopenia with curve severity in adolescent idiopathic scoliosis: a study of 919 girls. *Osteoporos. Int*. 2005;16:1924-32.

- [102]. Cheng JC, Hung VW, Lee WT, Yeung HY, Lam TP, Ng BK, et al. Persistent osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis—longitudinal monitoring of bone mineral density until skeletal maturity. *Stud. Health Technol. Inform.* 2006;123:47–51.
- [103]. Hung VW, Qin L, Cheung CS, Lam TP, Ng BK, Tse YK, et al. Osteopenia: a new prognostic factor of curve progression in adolescent idiopathic scoliosis. *J. Bone Joint Surg. Am.* 2005;87:2709–16.
- [104]. McGregor TL, Gurnett CA, Dobbs MB, Wise CA, Morcuende JA, Morgan TM, et al. Common polymorphisms in human lysyl oxidase genes are not associated with the adolescent idiopathic scoliosis phenotype. *BMC Med Genet.* 2011;12:92.
- [105]. Gorman KF, Julien C, Moreau A. The genetic epidemiology of idiopathic scoliosis. *European Spine Journal.* 2012;21(10):1905–19.
- [106]. Chan V, Fong GC, Luk KD, Yip B, Lee MK, Wong MS, et al. A genetic locus for adolescent idiopathic scoliosis linked to chromosome 19p13.3. *Am J Hum Genet.* 2002;71(12):401–6.
- [107]. Alden KJ, Marosy B, Nzegwu N, Justice CM, Wilson AF, Miller NH. Idiopathic scoliosis: identification of candidate regions on chromosome 19p13. *Spine (Phila Pa 1976).* 2006;31(16):1815–9.
- [108]. Deak F, Piecha D, Bachrati C, Paulsson M, and Kiss I. Primary structure and expression of matrilin-2, the closest relative of cartilage matrix protein within the von Willebrand factor type A-like module superfamily. *J. Biol. Chem.* 1997;272:9268–74.
- [109]. Montanaro L, Parisini P, Greggi T, Di Silvestre M, Campoccia D, Rizzi S, et al. Evidence of a linkage between *matrilin-1* gene (*MATN1*) and idiopathic scoliosis. *Scoliosis.* 2006;1:21.
- [110]. Chen Z, Tang NL, Cao X, Qiao D, Yi L, Cheng JC, et al. Promoter polymorphism of matrilin-1 gene predisposes to adolescent idiopathic scoliosis in a Chinese population. *European Journal of Human Genetics.* 2009;17(4):525–32.
- [111]. Bae JW, Cho CH, Min WK, Kim UK. Associations between matrilin-1 gene polymorphisms and adolescent idiopathic scoliosis curve patterns in a Korean population. *Mol Biol Rep.* 2012 May; 39(5):5561–7.
- [112]. Ortega N, Behonick DJ, Werb Z. Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends Cell Biol.* 2004;14:86–93.
- [113]. Varghese S. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in bone: an overview of regulation and functions. *Front Biosci.* 2006;11:2949–66.
- [114]. Ocaka L, Zhao C, Reed JA, Ebenezer ND, Brice G, Morley T, et al. 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.
- [115]. Jiang J, Qian B, Mao S, Zhao Q, Qiu X, Liu Z, et al. A Promoter Polymorphism of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 (TIMP-2) Gene Is Associated With Severity of Thoracic Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976).* 2012;37(1):41–7.
- [116]. Aulisa L, Papaleo P, Pola E, Angelini F, Aulisa AG, Tamburrelli FS, et al. Association between IL-6 and MMP-3 gene polymorphisms and adolescent idiopathic scoliosis: a case-control study. *Spine.* 2007;32(24):2700–2.
- [117]. Aulisa A, Pola E, Papaleo P, Galli M, Aulisa L. The association between IL-6 and MMP-3 gene polymorphisms and adolescent idiopathic scoliosis: a case-control study. *Scoliosis.* 2009;4(1):O1
- [118]. Liu Z, Tang NL, Cao XB, Liu WJ, Qiu XS, Cheng JC, et al. 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(18):1701–5.
- [119]. Inoue M, Minami S, Nakata Y, Kitahara H, Otsuka Y, Isobe K, et al. Association between estrogen receptor gene polymorphisms and curve severity of idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976).* 2002; 27(21):2357–62.
- [120]. Compston JE. Sex steroids and bone. *Physiol Rev.* 2001 Jan;81(1):419–47.
- [121]. Lambertini E, Penolazzi L, Giordano S, Del Senno L, Piva R. Expression of the human oestrogen receptor-alpha gene is regulated by promoter F in MG-63 osteoblastic cells. *Biochemical Journal.* 2003;372(Pt 3):831–9.
- [122]. Moldovan F, K. Letellier, F.B. Azeddine, G. Lacroix, D.S. Wang, I. Turgeon, et al. The Role of Estrogens and Estrogen Receptors in the Pathogenesis of Adolescent Idiopathic Scoliosis (AIS). *J Bone Joint Surg Br.* 2008;90-B(III):431.
- [123]. Wu J, Qiu Y, Zhang L, Sun Q, Qiu X, He Y. Association of estrogen receptor gene polymorphisms with susceptibility to adolescent idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976).* 2006;31(10):1131–6.
- [124]. Zhao D, Qiu GX, Wang YP, Zhang JG, Shen JX, Wu ZH. Association between adolescent idiopathic scoliosis with double curve and polymorphisms of calmodulin1 gene/estrogen receptor- α gene. *Orthop Surg.* 2009;1(3):222–30.

- [125]. Esposito T, Uccello R, Caliendo R, Martino GF, Gironi Carnevale UA, Cuomo S, et al. Estrogen receptor polymorphism, estrogen content and idiopathic scoliosis in human: a possible genetic linkage. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2009;116(1–2):56–60.
- [126]. Tang NL, Yeung HY, Lee KM, Hung VW, Cheung CS, Ng BK, et al. A relook into the association of the estrogen receptor [alpha] gene (PvuII, XbaI) and adolescent idiopathic scoliosis: a study of 540 Chinese cases. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2006; 31(21):2463–8.
- [127]. Takahashi Y, Matsumoto M, Karasugi T, Watanabe K, Chiba K, Kawakami N, et al. Replication study of the association between adolescent idiopathic scoliosis and two estrogen receptor genes. *J Orthop Res*. 2010;29(6):834–7.
- [128]. Chen S, Zhao L, Roffey DM, Phan P, Wai EK. Association between the ESR1 -351A>G single nucleotide polymorphism (rs9340799) and adolescent idiopathic scoliosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur Spine J*. 2014 Dec;23(12):2586–93.
- [129]. Kang B, Kim S, Park M, Yoon K, Shim K. Estrogen receptor α polymorphism in boys with constitutional delay of growth and puberty. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*. 2013 Jun;18(2):71–5.
- [130]. Yoshida R, Fukami M, Sasagawa I, Hasegawa T, Kamatani N, Ogata T. Association of Cryptorchidism with a Specific Haplotype of the Estrogen Receptor Gene: Implication for the Susceptibility to Estrogenic Environmental Endocrine Disruptors. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2005;90(8):4716 – 21.
- [131]. Ge Y-Z, Xu L-W, Jia R-P, Xu Z, Li W-C, Wu R, et al. Association of polymorphisms in estrogen receptors (*ESR1* and *ESR2*) with male infertility: a meta-analysis and systematic review. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2014;31(5):601–11.
- [132]. Vermeersch H, T'Sjoen G, Kaufman J, Van Houtte M. ESR1 polymorphisms, daily hassles, anger expression, and depressive symptoms in adolescent boys and girls. *Hormones and Behavior*. 2013;63(3):447–53.
- [133]. Dahlgren A, Lundmark P, Axelsson T, Lind L, Syvänen A-C. Association of the Estrogen Receptor 1 (*ESR1*) Gene with Body Height in Adult Males from Two Swedish Population Cohorts. *PLoS ONE*. 2008;3(3):e1807.
- [134]. Gennari L, Klein R, and Ferrari S. Skeletal Genetics: The genetics of peak bone mass. In: Orwoll ES, Bilezikian JP, Vanderschueren D, eds. *Osteoporosis in Men: The Effects of Gender on Skeletal Health*. USA, Elsevier, 2010;2(3.12):149–63.
- [135]. Braidman I, Baris C, Wood L, Selby P, Adams J, Freemont A, et al. Preliminary evidence for impaired estrogen receptor-alpha protein expression in osteoblasts and osteocytes from men with idiopathic osteoporosis. *Bone*. 2000 May;26(5):423–7.
- [136]. Lorentzon M, Ronny Lorentzon, Torbjörn Bäckström, and Peter Nordström. Estrogen Receptor Gene Polymorphism, But Not Estradiol Levels, Is Related to Bone Density in Healthy Adolescent Boys: A Cross-Sectional and Longitudinal Study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1999;84:12.
- [137]. Boot AM, van der Sluis IM, de Muinck Keizer-Schrama SM, van Meurs JB, Krenning EP, Pols HA, et al. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and bone mineral density in healthy children and young adults. *Calcif Tissue Int*. 2004 Jun;74(6):495–500.
- [138]. Pennisi P, Chevalley T, Mannen D, Herrmann F, Brandi ML, Fiore C, et al. Genetic variation in estrogen receptor alpha and interleukin-6 is associated with bone mass acquisition in prepubertal girls and boy: interaction with calcium supplements. *Clinical cases in mineral and bone metabolism*. 2005;3(3):232.
- [139]. Willing MC, Torner JC, Burns TL, Janz KF, Marshall T, Gilmore J, et al. Gene polymorphisms, bone mineral density and bone mineral content in young children: the Iowa Bone Development Study. *Osteoporos Int*. 2003 Aug;14(8):650–8.
- [140]. Gennari L, Merlotti D, De Paola V, Calabrò A, Becherini L, Martini G, et al. Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetics of osteoporosis: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2005 Feb 15;161(4):307–20.
- [141]. Sims NA, Clément-Lacroix P, Minet D, Frasion-Vanhulle C, Gaillard-Kelly M, Resche-Rigon M, et al. A functional androgen receptor is not sufficient to allow estradiol to protect bone after gonadectomy in estradiol receptor-deficient mice. *Journal of Clinical Investigation*. 2003;111(9):1319–27.
- [142]. Zhang HQ, Lu SJ, Tang MX, Chen LQ, Liu SH, Guo CF, et al. Association of estrogen receptor beta gene polymorphisms with susceptibility to adolescent idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2009;34(8):760–4.
- [143]. Pelat C, Van Pottelbergh I, Cohen-Solal M, Ostertag A, Kaufman JM, Martinez M, et al. Complex segregation analysis accounting for GxE of bone mineral density in European pedigrees selected through a male proband with low BMD. *Ann Hum Genet*. 2007 Jan;71(Pt 1):29–42.

- [144]. Janusz P, Kotwicka M, Andrusiewicz M, Czaprowski D, Czubak J, Kotwicki T. Estrogen receptors genes polymorphisms and age at menarche in idiopathic scoliosis. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2014;15:383.
- [145]. 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. Gonzalez-Alegre P, ed. *PLoS ONE*. 2013;8(10):e76806.
- [146]. Kotwicki T, Janusz P, Andrusiewicz M, Chmielewska M, Kotwicka M. Estrogen receptor 2 gene polymorphism in idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2014 Dec 15;39(26):E1599-607.
- [147]. Peng Y, Liang G, Pei Y, Ye W, Liang A, Su P. Genomic polymorphisms of G-Protein Estrogen Receptor 1 are associated with severity of adolescent idiopathic scoliosis. *International Orthopaedics*. 2012;36(3):671-7.
- [148]. Rubin K. Pubertal development and bone. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*. 2000;7(2):65-70.
- [149]. Yang Y, Z. Wu, T. Zhao, H. Wang, D. Zhao, J. Zhang, et al. Adolescent idiopathic scoliosis and the single-nucleotide polymorphism of the growth hormone receptor and IGF-1 genes. *Orthopaedics*. 2009;32(6):411.
- [150]. Yeung H.Y., N.L. Tang, K.M. Lee, B.K. Ng, V.W. Hung, R. Kwok, et al. 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.
- [151]. Moon E.S., H.S. Kim, V. Sharma, J.O. Park, H.M. Lee, S.H. Moon, et al. Analysis of Single Nucleotide Polymorphism in Adolescent Idiopathic Scoliosis in Korea: For Personalized Treatment, *Yonsei Med J*. 2013;54(2):500-9.
- [152]. Canalis E, Economides AN, Gazzero E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev*. 2003;24:218–35.
- [153]. Wijngaard A, Pijpers MA, Joosten PH, Roelofs JM, Zoelen EJ, Olijve W. Functional characterization of two promoters in the human bone morphogenetic protein- 4 gene. *J Bone Miner Res*. 1999;14:1432–41.
- [154]. Wijngaard A, Mulder WR, Dijkema R, Boersma CJ, Mosselman S, Zoelen EJ, et al. Antiestrogens specifically up-regulate bone morphogenetic protein-4 promoter activity in human osteoblastic cells. *Mol Endocrinol*. 2000;14:623–33.
- [155]. Williams JP, Micoli K, McDonald JM, Ann NY. Calmodulin-an often-ignored signal in osteoclasts. *Acad Sci*. 2010;1192:358–64.
- [156]. Dayer R, Haumont T, Belaieff W, Lascombes P. Idiopathic scoliosis: etiological concepts and hypotheses. *Journal of Children’s Orthopaedics*. 2013;7(1):11-6.
- [157]. 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(8):1186–92.
- [158]. Lowe T, Lawellin D, Smith D, Price C, Haher T, Merola A, et al. Platelet calmodulin levels in adolescent idiopathic scoliosis: do the levels correlate with curve progression and severity? *Spine (Phila Pa 1976)*. 2002;27(7):768–75.
- [159]. Acaroglu E, Akel I, Alanay A, Yazici M, Marcucio R. Comparison of the melatonin and calmodulin in paravertebral muscle and platelets of patients with or without adolescent idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2009;34(18):E659–63.
- [160]. Zhang Y, Z. Gu, and G. Qiu. The Association Study of Calmodulin 1 Gene Polymorphisms with Susceptibility to Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Biomed Res Int*. 2014;2014:168106.
- [161]. Cheng JC, Tang SP, Guo X, Chan CW, Qin L. Osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis: a histomorphometric study. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2001;26:E19–E23.
- [162]. Lorenzo J. Cytokines and the Pathogenesis of Osteoporosis. In: Markus R, Feldman D, Dempster D, Luckey M, Cauley J, eds. *Osteoporosis. USA*, Elsevier, 2013;1(38):915-37.
- [163]. Austin MS and Klein GR, eds. *Recent Advances in Orthopaedics*. New Delhi, Jaypee Brothers Medical Publishers, 2014.
- [164]. Risbud MV and Shapiro IM. Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: pain and disc content, *Nature Reviews Rheumatology*. 2014;10(1):44–56.
- [165]. Burke JG, Watson RW, Conhyea D, McCormack D, Dowling FE, Walsh MG, et al. Human nucleus pulposus can respond to a pro-inflammatory stimulus. *Spine*. 2003;28(24):2685–93.
- [166]. Lee JS, Suh KT, Eun IS. Polymorphism in interleukin-6 gene is associated with bone mineral density in patients with adolescent idiopathic scoliosis. *The Journal of Bone & Joint Surgery Series B*. 2010;92(8):1118–22.
- [167]. Saggese G, Baroncelli GI, Bertelloni S. Puberty and bone development, *Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2002;16(1):53–64.

- [168]. Morrison NA, George PM, Vaughan T, Tilyard MW, Frampton CM, and Gilchrist NL. Vitamin D receptor genotypes influence the success of calcitriol therapy for recurrent vertebral fracture in osteoporosis. *Pharmacogenetics and Genomics*. 2005;15(2):127–35.
- [169]. Inoue M, Minami S, Nakata Y, Takaso M, Otsuka Y, Kitahara H, et al. Prediction of curve progression in idiopathic scoliosis from gene polymorphic analysis. *Stud Health Technol Inform*. 2002;91:90-6.
- [170]. Suh K.T., I.S. Eun, J.S. Lee. Polymorphism in vitamin D receptor is associated with bone mineral density in patients with adolescent idiopathic scoliosis. *Eur Spine J*. 2010;19:1545–50.
- [171]. Yilmaz H., C. Zateri, A. Uludag, C. Bakar, S. Kosar, O. Ozdemir. Single-nucleotide polymorphism in Turkish patients with adolescent idiopathic scoliosis: curve progression is not related with MATN-1, LCT C/T-13910, and VDR BsmI. *J Orthop Res*. 2012; 30(9):1459-63.
- [172]. Nowak R, Szota J, Mazurek U. Vitamin D Receptor gene (VDR) transcripts in bone, cartilage, muscles and blood and microarray analysis of vitamin D responsive genes expression in paravertebral muscles of Juvenile and Adolescent Idiopathic Scoliosis patients. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2012;13:259.
- [173]. Uitterlinden AG, Y. Fang, J. B. J. van Meurs, H. A. P. Pols, and J. P. T. M. van Leeuwen. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene*. 2004;338(2):143–56.
- [174]. Fang Y., J.B. van Meurs, A.P. Bergink, A. Hofman, C.M. van Duijn, J.P. van Leeuwen, et al. Cdx-2 polymorphism in the promoter region of the human vitamin D receptor gene determines susceptibility to fracture in the elderly. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2003;18(9):1632–41.
- [175]. Arai H., K.-I. Miyamoto, Y. Taketani, H. Yamamoto, Y. Iemori, K. Morita, et al. A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1997;12(6):915–21.
- [176]. Jurutka PW, L. S. Remus, G. K. Whitfield, P. D. Thompson, J. C. Hsieh, H. Zitzer, et al. The polymorphic N terminus in human vitamin D receptor isoforms influences transcriptional activity by modulating interaction with transcription factor IIB. *Molecular Endocrinology*. 2000;14(3):401–20.
- [177]. Jurutka PW, Whitfield GK, Hsieh JC, Thompson PD, Haussler CA, Haussler MR. Molecular nature of the vitamin D receptor and its role in regulation of gene expression. *Rev Endocr Metab Disord*. 2001 Apr;2(2):203-16.
- [178]. Colombini A, Brayda-Bruno M, Lombardi G, Croiset SJ, Vrech V, Maione V, et al. FokI Polymorphism in the Vitamin D Receptor Gene (VDR) and Its Association with Lumbar Spine Pathologies in the Italian Population: A Case-Control Study. *PLoS One*. 2014;9(5):e97027.
- [179]. Eun IS, Park WW, Suh KT, Kim JI, Lee JS. Association between osteoprotegerin gene polymorphism and bone mineral density in patients with adolescent idiopathic scoliosis. *Eur Spine J*. 2009;18(12):1936–40.
- [180]. Wang G, Padmanabhan S, Wolfarth B, Fuku N, Lucia A, Ahmetov I, et al. Genomics of Elite Sporting Performance: What little we know and necessary advances. *Advances in Genetics*. 2013;84:123-49.
- [181]. Eisenmann JC, Sarzynski MA, Glenn K, Rothschild M, Heelan KA. ACE I/D genotype, adiposity, and blood pressure in children. *Cardiovascular Diabetology*. 2009;8:14.
- [182]. Kritchevsky SB, Nicklas BJ, Visser M, Simonsick EM, Newman AB, Harris TB, et al. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion genotype, exercise, and physical decline. *JAMA*. 2005 Aug 10; 294(6):691-8.
- [183]. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *The Journal of clinical investigation*. 1990;86:1343–6.
- [184]. Tiret L, Rigat B, Visvikis S, Breda C, Corvol P, Cambien F, et al. Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *American Journal of Human Genetics*. 1992;51(1):197-205.
- [185]. Almeida SS, Barros CC, Moraes MR, Russo FJ, Haro AS, Rosa TS, et al. Plasma Kallikrein and Angiotensin I-converting enzyme N- and C-terminal domain activities are modulated by the insertion/deletion polymorphism. *Neuropeptides*. 2010 Apr;44(2):139-43.
- [186]. Sayed-Tabatabaei FA, Oostra BA, Isaacs A, van Duijn CM, Witteman JC. ACE polymorphisms. *Circ Res*. 2006 May 12;98(9):1123-33.
- [187]. Shimizu H, H. Nakagami, M. K. Osako, R. Hanayama, Y. Kunugiza, T. Kizawa, et al. Angiotensin II accelerates osteoporosis by activating osteoclasts. *The FASEB Journal*. 2008;22(7):2465-75.
- [188]. Lynn H, Kwok T, Wong SY, Woo J, Leung PC. Angiotensin converting enzyme inhibitor use is associated with higher bone mineral density in elderly Chinese. *Bone*. 2006 Apr;38(4):584-8.

- [189]. Cakmak B, A. Inanir, N. Karakus, O. Ates, S. Yigit. Association between the ACE gene I/D polymorphism and osteoporosis in a Turkish population. *Zeitschrift für Rheumatologie*. 2015;74(4):346-50.
- [190]. Wajchenberg M, Luciano R de P, Araújo RC, Martins DE, Puertas EB, Almeida SS. Polymorphism of the ace gene and the α -actinin-3 gene in adolescent idiopathic scoliosis. *Acta Ortopedica Brasileira*. 2013;21(3):170-4.
- [191]. Berman Y, North KN. A gene for speed: the emerging role of alpha-actinin-3 in muscle metabolism. *Physiology (Bethesda)*. 2010 Aug;25(4):250-9.
- [192]. North KN, N. Yang, D. Wattanasirichaigoon, M. Mills, S. Eastal & A. H. Begg. A common nonsense mutation results in α -actinin-3 deficiency in the general population. *Nature Genetics*. 1999;21:353-4.
- [193]. Mills M, Yang N, Weinberger R, vander Woude DL, Beggs AH, Eastal S, et al. Differential expression of the actin-binding proteins, α -actinin-2 and -3, in different species: implications for the evolution of functional redundancy. *Hum Mol Genet*. 2001;10:1335-46.
- [194]. Burks TN and Cohn RD. Role of TGF- β signaling in inherited and acquired myopathies. *Skeletal Muscle*. 2011; 1(1), article 19.
- [195]. Santibañez JFS, Quintanilla M, Bernabeu C. TGF- β /TGF- β receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clinical Science*. 2011;121(6):233-51.
- [196]. Zhao CG, X.-J. He, B. Lu, H.-P. Li, and A.-J. Kang. Increased expression of collagens, transforming growth factor- β 1, and - β 3 in gluteal muscle contracture. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2010;11:15.
- [197]. Dickinson ME, Kobrin MS, Silan CM, Kingsley DM, Justice MJ, Miller DA, et al. Chromosomal localization of seven members of the murine TGF-beta superfamily suggests close linkage to several morphogenetic mutant loci. *Genomics*. 1990;6:505-20.
- [198]. Nowak R, Kwiecien M, Tkacz M, and Mazurek U. Transforming Growth Factor-Beta (TGF- β) Signaling in Paravertebral Muscles in Juvenile and Adolescent Idiopathic Scoliosis. *BioMed Research International*. 2014;2014: 594287
- [199]. Shah R, Hurley CK, Posch PE. A molecular mechanism for the differential regulation of TGF-beta-1 expression due to the common SNP -509C-T (c.-1347C-T). *Hum. Genet*. 2006;120:461-9.
- [200]. Hadley-Miller N, Mims B, Milewicz DM. The potential role of the elastic fiber system in adolescent idiopathic scoliosis. *Journal of Bone and Joint Surgery A*. 1994;76(8):1193-206.
- [201]. Velleman SG, Shin J, Li X, Song Y. Review: the skeletal muscle extracellular matrix: possible roles in the regulation of muscle development and growth. *Canadian Journal of Animal Science*. 2012;92(1):1-10.
- [202]. Erkoa G, Sponseller PD, Paulsen LC, Oswald GL, Loeys BL, Dietz HC. Musculoskeletal findings of Loeys-Dietz syndrome. *The Journal of Bone & Joint Surgery*. 2010;92(9):1876-83.
- [203]. Mizuguchi T, Matsumoto N. Recent progress in genetics of Marfan syndrome and Marfan-associated disorders. *Journal of Human Genetics*. 2007;52(1):1-12.
- [204]. Vetrone SA, Montecino-Rodriguez E, Kudryashova E, Kramerova I, Hoffman EP, Liu SD, et al. Osteopontin promotes fibrosis in dystrophic mouse muscle by modulating immune cell subsets and intramuscular TGF- β . *The Journal of Clinical Investigation*. 2009;119(6):1583-94.
- [205]. Goldstein JA, McNally EM. Mechanisms of muscle weakness in muscular dystrophy. *Journal of General Physiology*. 2010;136(1):29-34.
- [206]. Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care. *The Lancet Neurology*. 2010;9(2):177-89.
- [207]. Ryzhkov I.I., Borzilov E.E., Churnosov M.I., Ataman A.V., Dedkov A.A., Polonikov A.V. Transforming Growth Factor Beta 1 is a Novel Susceptibility Gene for Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Spine*. 2013; 38(12):E699-704.
- [208]. Massagué J. How cells read TGF- β signals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2000;1(3):169-78.
- [209]. Xu H, G. Qiu, Z. Wu, Y. Wang, J. Zhang, Y. Liu, et al. Expression of transforming growth factor and basic fibroblast growth factor and core protein of proteoglycan in human vertebral cartilaginous endplate of adolescent idiopathic scoliosis. *Spine*. 2005;30(17):1973-8.
- [210]. Cheng J.C., N.L. Tang, H.Y. Yeung, N. Miller. Genetic association of complex traits: using idiopathic scoliosis as an example. *Clin Orthop Relat Res*. 2007;462:38-44.
- [211]. Baron M. The search for complex disease genes: fault by linkage or fault by association? *Mol Psychiatry*. 2001 Mar;6(2):143-9.

- [212]. Edery P, Margaritte-Jeannin P, Biot B, Labalme A, Bernard JC, Chastang J, et al. New disease gene location and high genetic heterogeneity in idiopathic scoliosis. *European Journal of Human Genetics*. 2011;19(8): 865–9.
- [213]. Morton NE. Sequential tests for the detection of linkage. *Am J Hum Genet*. 1955 Sep;7(3):277-318.
- [214]. Lander E, Kruglyak L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet*. 1995;11(3):241–7.
- [215]. Schulze TG, McMahon FJ. Genetic linkage and association studies in bipolar affective disorder: a time for optimism. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2003 Nov 15;123C(1):36-47.
- [216]. Bickeböller H. Investigation of linkage and association: issues on study design. *Int Stat Rev*. 2000;68(1):75–81.
- [217]. Salehi LB, Mangino M, Serio S, Cicco D, Capon F, Semprini S, et al. Assignment of a locus for autosomal dominant idiopathic scoliosis (IS) to human chromosome 17p11. *Hum Genet*. 2002;111(4–5):401–404.
- [218]. Justice CM, Miller NH, Marosy B, Zhang J, Wilson AF. Familial idiopathic scoliosis: evidence of an X-linked susceptibility locus. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2003;28(6):589–94.
- [219]. Gurnett CA, Alae F, Bowcock A, Kruse L, Lenke LG, Bridwell KH, et al. Genetic linkage localizes an adolescent idiopathic scoliosis and pectus excavatum gene to chromosome 18 q. *Spine (Phila Pa 1976)* 2009;34(2):E94–E100.
- [220]. Miller NH, Justice CM, Marosy B, Doheny KF, Pugh E, Zhang J, et al. Identification of candidate regions for familial idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2005;30(10):1181–7.
- [221]. Miller NH, Marosy B, Justice CM, Novak SM, Tang EY, Boyce P, et al. Linkage analysis of genetic loci for kyphoscoliosis on chromosomes 5p13, 13q13.3, and 13q32. *Am J Med Genet A*. 2006;140(10):1059–68.
- [222]. Marosy B, Justice CM, Vu C, Zorn A, Nzegwu N, Wilson AF, et al. Identification of susceptibility loci for scoliosis in FIS families with triple curves. *Am J Hum Genet A*. 2010;152A(4):846–55.
- [223]. Clough M, Justice CM, Marosy B, Miller NH. Males with familial idiopathic scoliosis: a distinct phenotypic subgroup. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2010;35(2):162–8.
- [224]. Gao X, Gordon D, Zhang D, Browne R, Helms C, Gillum J, et al. *CHD7* Gene Polymorphisms Are Associated with Susceptibility to Idiopathic Scoliosis. *American Journal of Human Genetics*. 2007;80(5):957-65.
- [225]. Tilley MK, Justice CM, Swindle K, Marosy B, Wilson AF, Miller NH. *CHD7* Gene Polymorphisms and Familial Idiopathic Scoliosis. *Spine*. 2013;38(22):10.
- [226]. Janusz, T. Kotwicki, M. Kotwicka, M. Andrusiewicz. Association of *CHD7* Polymorphism with Susceptibility to and Severity of Idiopathic Scoliosis in Central European Population: Preliminary Study. *Studies in Health Technology and Informatics*. 2012;176(8):448.
- [227]. Gao X, Gordon D, Zhang D, Browne R, Helms C, Gillum J, et al. *CHD7* gene polymorphisms are associated with susceptibility to idiopathic scoliosis. *Am J Hum Genet*. 2011;80(5):957–65.
- [228]. Stranger BE, Stahl EA and Raj T. Progress and promise of genome-wide association studies for human complex trait genetics. *Genetics*. 2011;187(2):367–83.
- [229]. Gibson G. Rare and common variants: twenty arguments. *Nature Reviews. Genetics*. 2011;13(2):135–45.
- [230]. Sharma S, Gao X, Londono D, Devroy SE, Mauldin KN, Frankel JT, et al. Genome-wide association studies of adolescent idiopathic scoliosis suggest candidate susceptibility genes. *Human Molecular Genetics*. 2011;20(7):1456–66.
- [231]. Sicotte NL, Salamon G, Shattuck DW. Diffusion tensor MRI shows abnormal brainstem crossing fibers associated with *ROBO3* mutations. *Neurology*. 2006;67(3):519-21.
- [232]. Yimlamai D., L. Konnikova, L. G. Moss, D. G. Jay. The zebrafish down syndrome cell adhesion molecule is involved in cell movement during embryogenesis. *Developmental Biology*. 2005;279(1): 44–57.
- [233]. Schmid RS, Maness PF. L1 and NCAM adhesion molecules as signaling co-receptors in neuronal migration and process outgrowth. *Current opinion in neurobiology*. 2008;18(3):245-50.
- [234]. Banerjee S, Blauth K, Peters K, Rogers SL, Fanning AS, Bhat MA. *Drosophila* Neurexin IV Interacts with Roundabout and is Required for Repulsive Midline Axon Guidance. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2010;30(16):5653-67.
- [235]. Zhou S, Zhu Z, Qiu X, Wu W, Wang W, Liu Z, et al. Association study of *IL-17RC*, *CHL1*, *DSCAM* and *CNTNAP2* genes polymorphisms with adolescent idiopathic scoliosis susceptibility in a Chinese Han population. *Stud Health Technol Inform*. 2012;176:47-51.

- [236]. Qiu XS, Lv F, Zhu ZZ, Qian BP, Wang B, Yu Y, et al. Lack of association between the *CHL1* gene and adolescent idiopathic scoliosis susceptibility in Han Chinese: a case-control study. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2014 Feb 10;15:38.
- [237]. Takahashi Y, Kou I, Takahashi A, Johnson TA, Kono K, Kawakami N, et al. A genome-wide association study identifies common variants near *LBX1* associated with adolescent idiopathic scoliosis. *Nature Genetics*. 2011 Oct 23;43(12):1237–40.
- [238]. Fan YH, Song YQ, Chan D, Takahashi Y, Ikegawa S, Matsumoto M, et al. SNP rs11190870 near *LBX1* is associated with adolescent idiopathic scoliosis in southern Chinese. *Journal of Human Genetics*. 2012 Apr;57(4):244–6.
- [239]. Gao W, Peng Y, Liang G, Liang A, Ye W, Zhang L, et al. Association between common variants near *LBX1* and adolescent idiopathic scoliosis replication in the Chinese Han population. *PLoS ONE*. 2013;8(1):e53234.
- [240]. Jiang H, Qiu X, Dai J, Yan H, Zhu Z, Qian B, et al. Association of rs11190870 near *LBX1* with adolescent idiopathic scoliosis susceptibility in a Han Chinese population. *European Spine Journal*. 2013 Feb;22(2):282–6.
- [241]. Liang J, Xing D, Li Z, Chua S, Li S. Association Between rs11190870 Polymorphism Near *LBX1* and Susceptibility to Adolescent Idiopathic Scoliosis in East Asian Population: A Genetic Meta-Analysis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2014 May 15;39(11):862-9.
- [242]. Chettier R, Nelson L, Ogilvie JW, Albertsen HM, Ward K. Haplotypes at *LBX1* Have Distinct Inheritance Patterns with Opposite Effects in Adolescent Idiopathic Scoliosis. Fang S, ed. *PLoS ONE*. 2015;10(2):e0117708.
- [243]. Grauers A, Wang J, Einarsdottir E, Simony A, Danielsson A, Åkesson K, et al. Candidate gene analysis and exome sequencing confirm *LBX1* as a susceptibility gene for idiopathic scoliosis. *Spine J*. 2015 Oct 1;15(10):2239-46.
- [244]. Kou I, Takahashi Y, Johnson TA, Takahashi A, Guo L, Dai J, et al. Genetic variants in *GPR126* are associated with adolescent idiopathic scoliosis. *Nat Genet*. 2013 Jun;45(6):676-9.
- [245]. Xu JF, Yang GH, Pan XH, Zhang SJ, Zhao C, Qiu BS, et al. Association of *GPR126* gene polymorphism with adolescent idiopathic scoliosis in Chinese populations. *Genomics*. 2015 Feb;105(2):101-7.
- [246]. Miyake A, Kou I, Takahashi Y, Johnson TA, Ogura Y, Dai J, et al. Identification of a Susceptibility Locus for Severe Adolescent Idiopathic Scoliosis on Chromosome 17q24.3. Grant SFA, ed. *PLoS One*. 2013 Sep 4;8(9):e72802.
- [247]. Dormans JP, Grant SF, Sampson P, Rendon N, Chiavacci R, Hakonarson H. A Genome Wide Association Study Identifies *IL17RC* as an Adolescent Idiopathic Scoliosis Locus. *Spine: Affiliated Society Meeting abstracts*. 2011; 2011:96, Podium Presentations Abstracts.
- [248]. Nelson LM, Chettier R, Ogilvie JW and Ward K. Candidate genes for susceptibility of adolescent idiopathic scoliosis identified through a large genome-wide association study. *Spine: Affiliated Society Meeting Abstracts*. 2011;2011:96–7.
- [249]. Ogura Y, Kou I, Miura S, Takahashi A, Xu L, Takeda K, et al. A Functional SNP in *BNC2* Is Associated with Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Am J Hum Genet*. 2015 Aug 6;97(2):337-42.
- [250]. Mägi R, Pfeufer A, Nelis M, Montpetit A, Metspalu A, Remm M et al. Evaluating the performance of commercial whole-genome marker sets for capturing common genetic variation. *BMC Genomics*. 2007 Jun 11;8:159.
- [251]. Jorgenson E and Witte JS. Coverage and power in genomewide association studies. *American Journal of Human Genetics*. 2006;78(5):884–8.
- [252]. Riancho JA. Genome-wide association studies (GWAS) in complex diseases: advantages and limitations. *Reumatologi'a Clinica*. 2012;8(2):56–7.
- [253]. Zuk O, Hechter E, Sunyaev SR and Lander ES. The mystery of missing heritability: genetic interactions create phantom heritability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2012;109(4):1193–8.
- [254]. Asimit J and Zeggini E. Testing for rare variant associations in complex diseases. *Genome Medicine*. 2009;1(11):24.
- [255]. De Ligt J, Veltman JA and Vissers LE. Point mutations as a source of de novo genetic disease. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2013;23(3):257–63.
- [256]. Morris AP and Zeggini E. An evaluation of statistical approaches to rare variant analysis in genetic association studies. *Genetic Epidemiology*. 2010; 34(2):188–93.
- [257]. Peng G, Fan Y, Palculict TB, Shen P, Ruteshouser EC, Chi AK, et al. Rare variant detection using family-based sequencing analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2013 Mar 5;110(10):3985– 90.

- [258]. Myers RA, Casals F, Gauthier J, Hamdan FF, Keebler J, Boyko AR, et al. A population genetic approach to mapping neurological disorder genes using deep resequencing. *PLoS Genetics*. 2011 Feb;7(2):e1001318.
- [259]. Buchan JG, Alvarado DM, Haller GE, Cruchaga C, Harms MB, Zhang T, et al. Rare variants in *FBN1* and *FBN2* are associated with severe adolescent idiopathic scoliosis. *Human Molecular Genetics*. 2014 Oct 1;23(19):5271-82.
- [260]. Patten SA, Margaritte-Jeannin P, Bernard J-C, Alix E, Labalme A, Besson A, et al. Functional variants of *POC5* identified in patients with idiopathic scoliosis. *The Journal of Clinical Investigation*. 2015 Mar 2;125(3):1124-8.
- [261]. DeYoung CG and Clark R. The gene in its natural habitat: the importance of gene-trait interactions. *Development and Psychopathology*. 2012;24(4):1307-18.
- [262]. Ackert-Bicknell CL and Karasik D. Impact of the environment on the skeleton: is it modulated by genetic factors? *Current Osteoporosis Reports*. 2013;11(3):219-28.
- [263]. Bashiardes S, Veile R, Allen M, Wise CA, Dobbs M, Morcuende JA, et al. *SNTG1*, the gene encoding gamma-1-syntrophin: a candidate gene for idiopathic scoliosis. *Hum. Genet*. 2004;115:81-9.
- [264]. Ameres SL and Zamore PD. Diversifying microRNA sequence and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2013;14(8):475-88.
- [265]. Martins M, Rosa A, Guedes LC, Fonseca BV, Gotovac K, Violante S, et al. Convergence of miRNA expression profiling, a-synuclein interacton and GWAS in Parkinson's disease. *PLoS One*. 2011;6(10):e25443.
- [266]. Liu X-Y, Wang L, Yu B, Zhuang Q, and Wang Y-P. Expression Signatures of Long Noncoding RNAs in Adolescent Idiopathic Scoliosis. *BioMed Research International*. 2015;2015:276049.
- [267]. Schumacher A and Petronis A. Epigenetics of complex diseases: from general theory to laboratory experiments. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2006;310:81-115.
- [268]. Zhi D, Aslibekyan S, Irvin MR, Claas SA, Borecki IB, Ordovas JM, et al. SNPs located at CpG sites modulate genome-epigenome interaction. *Epigenetics*. 2013 Aug;8(8):802-6.
- [269]. Mann MR and Bartolomei MS. Towards a molecular understanding of Prader-Willi and Angelman syndromes. *Human Molecular Genetics*. 1999;8(10):1867-73.
- [270]. Andersen MO, Thomsen K and Kyvik KO. Adolescent idiopathic scoliosis in twins: a population-based survey. *Spine*. 2007;32(8):927-30.
- [271]. Chiquet M. Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress. *Matrix Biology*. 1999;18(5):417-26.
- [272]. Waller T., Nowak R., Tkacz M., Zapart D., Mazurek U. Familial or Sporadic Idiopathic Scoliosis – classification based on artificial neural network and GAPDH and ACTB transcription profile. *BioMedical Engineering OnLine*. 2013;12:1.
- [273]. Fendri K, Patten SA, Kaufman GN, Zaouter C, Parent S, Grimard G, et al. Microarray expression profiling identifies genes with altered expression in Adolescent Idiopathic Scoliosis. *European Spine Journal*. 2013 Jun;22(6):1300-11.
- [274]. John B and Lewis KR. Chromosome variability and geographic distribution in insects. *Science*. 1966;152(3723):711-21.
- [275]. Gottesman II and Gould TD. The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *American Journal of Psychiatry*. 2003;160(4):636-45.
- [276]. Chan RCK and Gottesman II. Neurological soft signs as candidate endophenotypes for schizophrenia: a shooting star or a Northern star? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2008;32(5):957-971.
- [277]. Akoume M-Y, Azeddine B, Turgeon I, Franco A, Labelle H, Poitras B, et al. Cell-based screening test for idiopathic scoliosis using cellular dielectric spectroscopy. *Spine*. 2010 Jun 1;35(13):E601-8.
- [278]. Gorman KF, Tredwell SJ and Breden F. The mutant guppy syndrome curveback as a model for human heritable spinal curvature. *Spine*. 2007;32(7):735-41.
- [279]. Gorman KF, Christians JK, Parent J, Ahmadi R, Weigel D, Dreyer C, et al. A major QTL controls susceptibility to spinal curvature in the curveback guppy. *BMC Genetics*. 2011 Jan 26;12(1):16.
- [280]. Наредба № 2 от 4 февруари 2003 г. за организация и провеждане на профилактични прегледи при лица от 0 до 18 години и диспансерно наблюдение на задължително здравноосигурени лица, МЗ, Държавен вестник брой: 4, 2003. Дата на обнародване: 21.04.2004 (Отм., ДВ, бр. 4 от 16.01.2004 г. - в сила от 30.01.2004 г.)
- [281]. Владимиров Б., Джеров Д., Иванов Вл. Ортопедия, травматология и ортотика. ИК Знание ЕООД – Стара Загора, 2000.

- [282]. Nash CL, Moe JH. A study of vertebral rotation. *J Bone Joint Surg Am.* 1969;51(2):223–9.
- [283]. Defino HLA and de Araujo PHM. Comparative study of the measurements of the vertebral rotation using Nash & Moe and Raimondi methods. *Acta Ortop. Bras.* 2004;12(3):167-73.
- [284]. Hacquebord J.H., Leopold S.S. In Brief: The Risser Classification: A Classic Tool for the Clinician Treating Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Clinical Orthopaedics and Related Research.* 2012;470(8):2335-8.
- [285]. Samdani AE, Betz RR. Infantile and juvenile idiopathic scoliosis. In: Errico TJ, Lonner BS, Moulton AW, eds. *Surgical management of spinal deformities.* Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier, 2009;89–96.
- [286]. Ylikoski M. Growth and progression of adolescent idiopathic scoliosis in girls. *J Pediatr Orthop B.* 2005;14(5):320–4.
- [287]. Kim H., Kim H.S., Moon E.S., Yoon C., Chung T., Song H., et al. Scoliosis Imaging: What Radiologists Should Know. *RadioGraphics.* 2010;30:1823–42.
- [288]. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research.* 1988;16(3):1215.
- [289]. Kwok PY. Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Annual review of genomics and human genetics.* 2001;2:235-58.
- [290]. Yee A., Song Y., Chan D., Cheung K. Understanding the Basis of Genetic Studies: Adolescent Idiopathic Scoliosis as an Example. *Spine Deformity, Basic Science.* 2013;2:1-9.
- [291]. Doi T, Harimaya K, Mitsuyasu H, Matsumoto Y, Masuda K, Kobayakawa K, et al. Right thoracic curvature in the normal spine. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research.* 2011 Jan 14;6:4.
- [292]. Mummaneni PV, Ondra SL, Sasso RC. Thoracolumbar deformity advances: Operative treatment of thoracolumbar deformity. In: Haid RW, Subach BR, Rodts GE, eds. *Advances in Spinal Stabilization.* Prog Neurol Surg. Basel, Karger, 2003;16:225-39.
- [293]. Donzelli S., Zaina F., Lusini M., Minnella S., Negrini S. In favour of the definition "adolescents with idiopathic scoliosis": juvenile and adolescent idiopathic scoliosis braced after ten years of age, do not show different end results. *Scoliosis.* 2014 Jun 27;9:7.
- [294]. Yong, M., Izatt, M.T., Adam, C.J., Labrom, R.D., Askin, G.N. Secondary Curve Behavior in Lenke Type 1C Adolescent Idiopathic Scoliosis after Thoracoscopic Selective Anterior Thoracic Fusion. *Spine.* 2012;3(23):1965–74.
- [295]. Попов Б., Хигиена, хранене и професионални болести. Изд. Везни-4, София, 2010.
- [296]. Kostadinova E, Miteva L, Stanilova S. Genetic polymorphism in angiotensin-converting enzyme gene and congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Trakia Journal of Sciences.* 2014;12(1):191-6.
- [297]. Ivanova J., Doukova P., Boyanov M., Popivanov P. FokI and BsmI polymorphisms of the vitamin D receptor gene and bone mineral density in a random Bulgarian population sample. *Endocrine.* 2006;29(3):413-8.
- [298]. Ginevičienė V, A. Jakaitienė, A. Pranculis, K. Milašius, L. Tubelis and A. Utkus. *AMPD1* rs17602729 is associated with physical performance of sprint and power in elite Lithuanian athletes. *BMC Genetics.* 2014;15:58.
- [299]. Atanasov P., T. Djarova, M. Kalinski, L. Petrov, R. Kaneva, S. Mugandani, et al. *ACTN3* and *AMPD1* Polymorphism and Genotype Combinations in Bulgarian Athletes Performing Wingate Test. *Journal of Sports Science.* 2015 Oct;3(3):1-10.
- [300]. Liang G, Gao W, Liang A., Ye W, Peng Y, Zhang L, et al. Normal leptin expression, lower adipogenic ability, decreased leptin receptor and hyposensitivity to leptin in adolescent idiopathic scoliosis. *PLoS One.* 2012;7(5):e36648.
- [301]. Blank RD, Raggio CL, Giampietro PF, Camacho NP. A genomic approach to scoliosis pathogenesis. *Lupus.* 1999;8:356–60.
- [302]. Giampietro PF, Raggio CL, Blank RD. Synteny-defined candidate genes for congenital and idiopathic scoliosis. *Am J Med Genet.* 1999;83:164–77.
- [303]. Vlaykova T, Kurzawski M, Tacheva T, Dimov D, Gulubova M, Yovchev Y, et al. Investigation of the role of *MMP3 -1171insA* polymorphism in cutaneous malignant melanoma – a preliminary study. *Biotechnology, Biotechnological Equipment.* 2014 Sep 3;28(5):904-10.
- [304]. Ivanova M, Ruiqing J, Kawai S, Matsushita M, Ochiai N, Maruya E, et al. IL-6 SNP diversity among four ethnic groups as revealed by bead-based liquid array profiling. *Int J Immunogenet.* 2011 Feb; 38(1):17-20.
- [305]. Wang W, Zhu Z, Zhu F, Sun C, Wang Z, Sun X, et al. Different curve pattern and other radiographic characteristics in male and female patients with adolescent idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976).* 2012;37(18):1586–92.

- [306]. Kamenarska Z, Hristova M, Dourmishev L, Andonova S, Kaneva R, Mitev V, et al. Association between Estrogen Receptor- α Gene Polymorphisms and Lupus Nephritis in Bulgarian Patients, *BANTAO Journal*. 2012;10(2):59-62.
- [307]. Ward K, Ogilvie J, Argyle V, Nelson L, Meade M, Braun J, et al. Polygenic inheritance of adolescent idiopathic scoliosis: a study of extended families in Utah. *The American Journal of Medical Genetics A*. 2010 May;152A(5):1178–88.
- [308]. Ogilvie JW. Update on prognostic genetic testing in adolescent idiopathic scoliosis (AIS). *Journal of Pediatric Orthopaedics*. 2011;31:S46–S48.
- [309]. Pincott JR, Taffs LF. Experimental scoliosis in primates: a neurological cause. *J Bone Joint Surg Br*. 1982;64:503–7.
- [310]. Pincott JR, Davies JS, Taffs LF. Scoliosis caused by section of dorsal spinal nerve roots. *J Bone Joint Surg Br*. 1984;66:27–9.
- [311]. Barrios C, Tunon MT, De Salis JA, Beguiristain JL, Canadell J. Scoliosis induced by medullary damage: an experimental study in rabbits. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1987;12:433–9.
- [312]. Suk SI, Song HS, Lee CK. Scoliosis induced by anterior and posterior rhizotomy. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1989;14:692–7.
- [313]. Cheng JC, Guo X, Sher AH. Posterior tibial nerve somatosensory cortical evoked potentials in adolescent idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1998;23:332–7.
- [314]. Cheng JC, Guo X, Sher AH, Chan YL, Metreweli C. Correlation between curve severity, somatosensory evoked potentials, and magnetic resonance imaging in adolescent idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1999;24:1679–84.
- [315]. Guo X, Chau WW, Hui-Chan CW, Cheung CS, Tsang WW and Cheng JC. Balance control in adolescents with idiopathic scoliosis and disturbed somatosensory function. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2006 Jun 15;31(14):E437–40.
- [316]. Huang M, Huang T, Xiang Y, Xie Z, Chen Y, Yan R, et al. Ptf1a, Lbx1 and Pax2 coordinate glycinergic and peptidergic transmitter phenotypes in dorsal spinal inhibitory neurons. *Dev Biol*. 2008 Oct 15;322(2):394–405.
- [317]. Gross MK, Dottori M, Goulding M. Lbx1 specifies somatosensory association interneurons in the dorsal spinal cord. *Neuron*. 2002;34:535–49.
- [318]. Muller T, Brohmann H, Pierani A, Heppenstall PA, Lewin GR, Jessell TM, et al. The homeodomain factor lbx1 distinguishes two major programs of neuronal differentiation in the dorsal spinal cord. *Neuron*. 2002 May 16;34(4):551–62.
- [319]. Cheng L, Samad OA, Xu Y, Mizuguchi R, Luo P, et al. Lbx1 and Tlx3 are opposing switches in determining GABAergic versus glutamatergic transmitter phenotypes. *Nat Neurosci*. 2005;8:1510–5.
- [320]. Sieber MA, Storm R, Martinez-de-la-Torre M, Muller T, Wende H, et al. Lbx1 acts as a selector gene in the fate determination of somatosensory and viscerosensory relay neurons in the hindbrain. *J Neurosci*. 2007;27:4902–9.
- [321]. Jagla K, Dolle P, Mattei MG, Jagla T, Schuhbauer B, Dretzen G, et al. Mouse Lbx1 and human LBX1 define a novel mammalian homeobox gene family related to the Drosophila lady bird genes. *Mech Dev*. 1995 Nov;53(3):345–56.
- [322]. McLennan IS and K. Koishi. The transforming growth factor-betas: multifaceted regulators of the development and maintenance of skeletal muscles, motoneurons and Schwann cells. *International Journal of Developmental Biology*. 2002;46(4):559–67.

Цитирани сайтове

1. <http://emedicine.medscape.com/>
2. <http://www.boneandjoint.org.uk/>
3. <http://www.coreconcepts.com.sg/>
4. <http://www.di.uq.edu.au/>
5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
6. <http://www.scielo.br/>
7. <http://www.srs.org/>
8. <http://www.orthopediatrics.com/>
9. <http://insilico.ehu.es/>
10. <http://www.omim.org>
11. <http://www.1000genomes.org>

СПРАВКА ЗА ПУБЛИКАЦИИ И ДОКЛАДИ

ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Nikolova S**, Dikova M, Dikov D, Djerov A, Dzhebir G, Atanasov V, Savov A, Kremensky I. Role of the IL-6 Gene in the Etiopathogenesis of Idiopathic Scoliosis. *Analytical Cellular Pathology*, vol. 2015, Article ID 621893, 2015 (**IF 2015 = 1.76**)
2. **Nikolova S**, Yablanski V, Vlaev E, Stokov L, Savov A, Kremensky I. Association between Estrogen Receptor Alpha Gene Polymorphisms and Susceptibility to Idiopathic Scoliosis in Bulgarian Patients: A Case-Control Study. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, vol. 3, no. 2, p. 278-282, 2015 (**IF 2015 = 1.09**)
3. **Nikolova S**, Dikova M, Savov A, Kremensky I. Genetics of Idiopathic Scoliosis. *Pediatriya*, vol. 52, no. 4, pp. 16–19, 2012

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. **Николова С.**, Яблански В., Влаев Е., Савов А., Кременски И. Проучване на асоциацията между идиопатична сколиоза и полиморфни варианти на гените *MTNR1B* и *CHD7* при български пациенти. Представен доклад на XXV-тата традиционна Международна научна конференция, 4-5.06.2015 г., хотел «Марица изток» - Старозагорски минерални бани, България.
2. **Nikolova S**, Yablanski V, Vlaev E, Stokov L, Savov A, Kremensky I. Association between Estrogen Receptor 1 Gene and Idiopathic Scoliosis. Poster. Oral presentation. 16th Congress of the European Federation of National Associations of Orthopaedics and Traumatology (EFORT), 26-29 May 2015, Prague, Czech Republic
3. **Nikolova S**, Dikova M, Dikov D, Djerov A, Lashkov D, Savov A, Kremensky I, Tanchev P. Association Between IL-6 Promoter Polymorphism And Susceptibility To Idiopathic Scoliosis: A Case-Control Study. Poster. 15th Congress of the European Federation of National Associations of Orthopaedics and Traumatology (EFORT), 4-6 June 2014, London, UK.
4. Dourmishev L, Kamenarska Z, Hristova M, Vinkov A, **Nikolova S**, Kaneva R, Miteva L, Savov A, Mitev V. Investigation of TNF-alpha, IL-10, IL-6, IL-RN and MBL2 gene polymorphisms in patients with dermatomyositis. Poster. 23rd EADV Congress, 08-12 October 2014, Amsterdam, The Netherlands.
5. **Николова С.**, Дикова М., Диков Д., Джеров А., Лашков Д., Савов А., Кременски И., Бенкин М., Танчев П. Проучване на асоциацията между 8 генетични варианта и идиопатична сколиоза при български пациенти. Представен доклад на XII-ти Национален конгрес на Българската ортопедична и травматологична асоциация (БОТА) с международно участие, 9-12.10.2013 г., Златни Пясъци, България.
6. **Nikolova S**, Dikova M, Dikov D, Djerov A, Lashkov D, Savov A, Kremensky I, Tanchev P. Association between Matrix Metalloproteinase-3 Genetic Polymorphism and Susceptibility to Idiopathic Scoliosis. Представен доклад на 2nd Budapest Spine Conference – combined meeting of the Hungarian Spine Society and Spine Experts Group, 29th and 30th November 2013, Budapest, Hungary.

7. Hristova M, Kamenarska Z, **Nikolova S**, Kaneva R, Dourmishev L. IL-6 Promoter Polymorphism (-174G/C) in patients with Dermatomyositis. Poster. 22nd EADV Congress, 2-6 October 2013, Istanbul, Turkey.
8. **Nikolova S**, Dikova M, Dikov D, Dzherov A, Lashkov D, Tanchev P. Association between CHD7 and IL-6 gene polymorphisms and idiopathic scoliosis in Bulgarians: A pilot study. Annual Spine experts group meeting and Slovenia 2012 Spine symposium. Ljubljana, Slovenia, Nov. 29th and 30th, 2012. Abstract. Page 66.
9. Дикова М., Димитрова А., Кехайов Р. **Николова С.** Профилактика на тромбоемболични усложнения при ортопедична операция на дете след исхемичен инсулт. Постер от IV-та Национална конференция по трансфузионна терапия – алтернативи на хемотрансфузията в клиничната практика с международно участие, 21-22.10.2011 г., гр. София, България

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ

1. „Проучване на асоциацията между полиморфизми в 6 кандидат-гена: IL17RC, GPR126, VDR, BMP4, Lrp, TGFB1 и предразположението към идиопатична сколиоза”, Водещ изследовател: Светла Николова, МУ-София, 2014
2. „Изследване на асоциацията между полиморфизми в 8 кандидат-гена и етиологията и прогресията на идиопатична сколиоза при български пациенти”, Водещ изследовател: Доц. Алексей Савов, дб, МУ-София, 2012
3. “Genome-wide Screening for CNVs in Mental Retardation”, Водещ изследовател: Проф. Д-р Венета Божинова, дм, ФНИ, 2009
4. «Микроструктурни небалансирани геномни промени при пациенти с идиопатично умствено изоставане», Водещ изследовател: Доц. Алексей Савов, дб, МУ-София, 2009
5. „Изследване на генетични и епигенетични промени на FMR1 при български пациенти с клиничен фенотип на синдром на чуплива X хромозома”, Водещ изследовател: ст. ас. Д-р Радослава Въжарова, МУ-София, 2009
6. “Анализ на големи геномни делеции, инсерции и пренареждания в BRCA1 и BRCA2 гените при български пациенти с наследствен карцином на гърдата”, Водещ изследовател: гл. ас. Атанаска Миткова, дб, МУ-София, 2009
7. ”Национален университетски комплекс за биомедицински и приложни изследвания”, Водещ изследовател: Проф. Д-р Ваньо Митев, дм, дбн, ФНИ, 2008

НАУЧНИ НАГРАДИ

1. Първа награда за постер от IV-та Национална конференция по хематология и трансфузионна терапия – алтернативи на хемотрансфузията в клиничната практика с международно участие, 21-22.10.2011 г., гр. София, България.
2. Номинация за най-добър постер от 16th EFORT Congress, 26-29 May 2015, Prague, Czech Republic.

РЕЗЮМЕ

Сколиозата е най-често срещаната гръбначна деформация с начало в детска възраст. При ненавременно и неправилно проведено лечение сколиозата може да доведе до трайни последици, влошаващи сериозно качеството на живот, като: хронична болка, дегенеративни изменения на гръбначния стълб, затрудняване функцията на дихателната, сърдечно-съдовата и гастроинтестиналната система. В най-малко 75% от случаите деформацията има неясен произход и се означава като идиопатична сколиоза. Съвременната концепция разглежда идиопатичната сколиоза като мултифакторно заболяване с участие на генетични и негенетични фактори при възникването и прогресията на изкривяването.

Цел на настоящия дисертационен труд е изследване на асоциацията между единични нуклеотидни полиморфизми в кандидат-гени и идиопатичната сколиоза при български пациенти.

Общо, 7 полиморфизма са асоциирани с предразположението към идиопатична сколиоза: *IL-6* (*rs1800795*), *ESR1* (*rs9340799*), *ESR1* (*rs2234693*), *IL17RC* (*rs708567*), *GPR126* (*rs6570507*), *LBX1* (*rs11190870*), *TGFBI* (*rs1800469*), като *ESR1* (*rs9340799*) и *ESR1* (*rs2234693*) се свързват само с ранната сколиоза, останалите полиморфизми – с късната сколиоза, а *TGFBI* (*rs1800469*) – с ранната и с късната идиопатична сколиоза.

Общо, 7 полиморфизма са асоциирани с прогресията на кривата: *TGFBI* (*rs1800469 C/T*), *ESR1* (*rs2234693*), *MATN1* (*rs1149048*), *IL17RC* (*rs708567*), *GPR126* (*rs6570507*), *LBX1* (*rs11190870*), *IL-6* (*rs1800795*), като *MATN1* (*rs1149048*) се свързва само с бавнопрогресивна и непрогресивна сколиоза.

Общо, 6 полиморфизма са асоциирани с фамилната история на идиопатичната сколиоза: *MATN1* (*rs1149048*), *ESR1* (*rs2234693*), *IL-6* (*rs1800795*), *TGFBI* (*rs1800469*), *LBX1* (*rs11190870*), *IL17RC* (*rs708567*).

Общо, 6 полиморфизма показват асоциация със спорадичната идиопатична сколиоза: *TGFBI* (*rs1800469*), *ESR1* (*rs2234693*), *IL17RC* (*rs708567*), *GPR126* (*rs6570507*), *LBX1* (*rs11190870*), *IL-6* (*rs708567*).

Общо, 6 полиморфизма са асоциирани с пола при идиопатична сколиоза: *TGFBI* (*rs1800469*), *GPR126* (*rs6570507*), *IL17RC* (*rs708567*), *IL-6* (*rs1800795*), *ESR1* (*rs2234693*), *LBX1* (*rs11190870*).

Общо, 8 полиморфизма са асоциирани с типа на кривата и е възможно да модифицират фенотипа при отключена деформация без да имат задължително самостоятелно значение на предразполагащ или модифициращ фактор: *VDR* (*rs2228570*), *BMP4* (*rs4898820*), *MATN1* (*rs1149048*), *MMP3* (*rs3025058*), *MTNR1B* (*rs4753426*), *CHD7* (*rs4738824*), *GPR126* (*rs6570507*), *LBX1* (*rs11190870*).

Полиморфизъм *ESR1* (*rs2234693*) се свързва с резистентност към корсетолечение.

Тези резултати показват значителна хетерогенност в генетичното предразположение към идиопатична сколиоза при българските пациенти и възможно участие на различни генетични варианти при ранната и късната сколиоза, при прогресивните и непрогресивните форми, при фамилните и спорадичните случаи и при двата пола. От една страна се наблюдават генетични варианти със самостоятелно значение на рискови фактори с предразполагащ и/или модифициращ ефект, а от друга страна има генетични маркери с второстепенно значение на модифициращи фактори.

Идентифицирането на молекулни маркери с диагностична и прогностична стойност ще бъде полезно в клиничната практика за ранна диагностика на предразположението към сколиоза при родственици и за по-точна прогноза на риска от бърза прогресия на деформацията при засегнати индивиди. Това ще позволи провеждане на профилактични мероприятия и ранна терапия.

SUMMARY

Scoliosis is the most common spine deformity with onset in childhood. In case of untimely and improper treatment scoliosis can lead to lasting consequences, seriously impairing quality of life, such as chronic pain, degenerative changes of the spine, hindering the function of the respiratory, cardiovascular and gastrointestinal system. At least 75% of deformation is of unknown origin and is referred to as idiopathic scoliosis. The current concept of idiopathic scoliosis consists of a multifactorial disease involving genetic and non-genetic factors in the occurrence and progression of curvature.

The purpose of this dissertation is an association study between single nucleotide polymorphisms in candidate genes and idiopathic scoliosis in Bulgarian patients.

A total of 7 polymorphisms were associated with susceptibility to idiopathic scoliosis: *IL-6* (*rs1800795*), *ESR1* (*rs9340799*), *ESR1* (*rs2234693*), *IL17RC* (*rs708567*), *GPR126* (*rs6570507*), *LBX1* (*rs11190870*), *TGFBI* (*rs1800469*), including *ESR1* (*rs9340799*) and *ESR1* (*rs2234693*) were associated only with early onset scoliosis, other polymorphisms – with late onset scoliosis, and *TGFBI* (*rs1800469*) with two forms of scoliosis.

A total of 7 polymorphisms were associated with curve progression: *TGFBI* (*rs1800469* C/T), *ESR1* (*rs2234693*), *MATN1* (*rs1149048*), *IL17RC* (*rs708567*), *GPR126* (*rs6570507*), *LBX1* (*rs11190870*), *IL-6* (*rs1800795*), including *MATN1* (*rs1149048*) was associated only with non-progressive and slow progressive scoliosis.

A total of 6 polymorphisms were associated with familial history of idiopathic scoliosis: *MATN1* (*rs1149048*), *ESR1* (*rs2234693*), *IL-6* (*rs1800795*), *TGFBI* (*rs1800469*), *LBX1* (*rs11190870*), *IL17RC* (*rs708567*).

A total of 6 polymorphisms were associated with sporadic idiopathic scoliosis: *TGFBI* (*rs1800469*), *ESR1* (*rs2234693*), *IL17RC* (*rs708567*), *GPR126* (*rs6570507*), *LBX1* (*rs11190870*), *IL-6* (*rs708567*).

A total of 6 polymorphisms were associated with gender: *TGFBI* (*rs1800469*), *GPR126* (*rs6570507*), *IL17RC* (*rs708567*), *IL-6* (*rs1800795*), *ESR1* (*rs2234693*), *LBX1* (*rs11190870*).

A total of 8 polymorphisms were associated with curve pattern and it is possible to modify the phenotype when deformation is unlocked, without having the necessarily independent role of modifying or predisposing factor: *VDR* (*rs2228570*), *BMP4* (*rs4898820*), *MATN1* (*rs1149048*), *MMP3* (*rs3025058*), *MTNR1B* (*rs4753426*), *CHD7* (*rs4738824*), *GPR126* (*rs6570507*), *LBX1* (*rs11190870*).

The polymorphism *ESR1* (*rs2234693*) was associated with resistance to bracing therapy.

These results show substantial heterogeneity in genetic predisposition to idiopathic scoliosis in Bulgarian patients and the possible participation of different genetic variants in the early and late onset scoliosis, in progressive and non-progressive forms, in family and sporadic cases, in both genders. First, there are genetic variants that are independent predisposing and/or modifying factors, second there are genetic markers of minor modifying effect.

The identification of molecular markers with diagnostic and prognostic value will be useful in clinical practice for early diagnosis of scoliosis among relatives and for more accurate prognosis of the risk of rapid progression of the deformity among affected individuals. That will permit prophylaxis and early treatment.

СЪДЪРЖАНИЕ

ВЪВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА I. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	5
1. КЛАСИФИКАЦИЯ	5
2. ЕПИДЕМИОЛОГИЯ	6
3. ЕТИОЛОГИЯ И ПАТОГЕНЕЗА	7
3.1. КЛИНИКО-ГЕНЕАЛОГИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ.....	8
3.2. МОЛЕКУЛНИ ОСНОВИ НА ИДИОПАТИЧНАТА СКОЛИОЗА.....	9
3.2.1 Асоциативни проучвания.....	9
3.2.2 Анализ за скаченост.....	27
3.2.3 Цялостни геномни асоциативни проучвания.....	32
3.2.4 Цитогенетичен анализ.....	37
3.2.5 Други хипотези за произхода на идиопатичната сколиоза.....	38
Заклучение.....	40
ГЛАВА II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	41
ГЛАВА III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	42
МАТЕРИАЛИ	42
1. Клиничен материал.....	42
2. Биологичен материал.....	43
МЕТОДИ	44
1. Клинични методи.....	45
1.1. Анамнеза	45
1.2. Обективно изследване	45
1.3. Образно-диагностични изследвания	46
2. Молекулярно генетични методи.....	53
2.1. Биобанкиране	53
2.1.1. Солева екстракция на ДНК от венозна кръв.....	53
2.1.2. Фенолна екстракция на ДНК от венозна кръв	54
2.1.3. Полуавтоматично изолиране на ДНК от венозна кръв.....	55
2.2. Полимеразна верижна реакция	57
2.2.1. Конвенционален PCR.....	57
2.2.2. TaqMan PCR в реално време.....	59
2.3. Полиморфизъм по дължината на рестриционните фрагменти (RFLP).....	64
2.4. Агарозна гел-електрофореза	66
2.5. Директно секвениране (по Sanger)	67
3. Статистически методи за анализ.....	70
3.1. Дескриптивна статистика	70
3.2. Изчисляване на алелните и генотипни честоти. Анализ на равновесието по закона на Харди-Вайнберг	70
3.3. Методи за проверка на хипотези	71
3.3.1. Параметрични методи	71
3.3.2. Непараметрични методи	71
3.4. Изчисляване на относителен риск	71
ГЛАВА IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	72
1. РЕЗУЛТАТИ ОТ КЛИНИЧНАТА ИЗВАДКА И ОБСЪЖДАНЕ.....	72
2. РЕЗУЛТАТИ ОТ АСОЦИАТИВНОТО ПРОУЧВАНЕ И ОБСЪЖДАНЕ.....	80
2.1. Селекция на клинични групи.....	80
2.2. Резултати от SNP генотипирането чрез директна амплификация.....	82

2.2.1. <i>Ангиотензин конвертиращ ензим – ACE (rs1799752, -/G; I/D)</i>	82
2.3. <i>Резултати от SNP генотипирането чрез амплификация-рестрикция</i>	85
2.3.1. <i>Витамин Д рецептор – VDR (rs2228570, C/T; FokI, F/f)</i>	85
2.3.2. <i>Инсулиноподобен растежен фактор 1 - IGF-1 (rs5742612, C/T)</i>	88
2.3.3. <i>Аденозинмонофосфатдезаминаза 1 - AMPD1 (rs17602729, C/T; C34T)</i>	91
2.3.4. <i>Актинин 3 - ACTN3 (rs1815739, C/T; R577X)</i>	93
2.3.5. <i>Костен морфогенен протеин-4 - BMP4 (rs4898820, T/G)</i>	96
2.3.6. <i>Лептин – Lep (rs7799039, G/A)</i>	99
2.3.7. <i>Матрилин-1 - MATN1 (rs1149048, A/G)</i>	101
2.3.8. <i>Матриксна металопротеиназа-3 - MMP3 (rs3025058; -1171 5A/6A)</i>	107
2.3.9. <i>Интерлевкин-6 - IL-6 (rs1800795; -174G/C)</i>	110
2.3.10. <i>Триптофанхидроксилаза-1 - TPH1 (rs10488682, T/A)</i>	115
2.3.11. <i>Естрогенов рецептор тип 1 – ESR1 (rs9340799, A/G; XbaI, X/x) и ESR1 (rs2234693, C/T; PvuII, P/p)</i>	117
2.4. <i>Резултати от SNP генотипирането чрез TaqMan PCR в реално време</i> ...	127
2.4.1. <i>Мелатонинов рецептор тип 1B - MTNR1B (rs4753426, T/C)</i>	127
2.4.2. <i>Хромодомен хеликаза свързващ белтък-7 - CHD7 (rs4738824, G/A)</i>	131
2.4.3. <i>Рецептор за интерлевкин-17 – IL17RC (rs708567, G/A; S111L)</i>	134
2.4.4. <i>Клетъчна адхезионна молекула L1 подобен ген - CHL1 (rs1400180, T/G)</i> .	139
2.4.5. <i>G-протеин свързан рецептор G6 - GPR126 (rs6570507, A/G)</i>	141
2.4.6. <i>Ladybird homeobox domain - LBX1 (rs11190870, T/C)</i>	146
2.4.7. <i>Трансформиращ растежен фактор тип В1 – TGFB1 (TGF-β1) rs1800469 C/T (-509C > T)</i>	150
ГЛАВА V. <i>ОБОБЩЕНИЕ</i>	155
ГЛАВА VI. <i>ИЗВОДИ</i>	158
ГЛАВА VII. <i>СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ</i>	159
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	160
ПРИЛОЖЕНИЕ 2.....	162
ГЛАВА VIII. <i>ЛИТЕРАТУРНА СПРАВКА</i>	164
СПРАВКА ЗА ПУБЛИКАЦИИ И ДОКЛАДИ.....	178
РЕЗЮМЕ.....	180
СЪДЪРЖАНИЕ.....	182

ДЕКЛАРАЦИЯ ЗА ОРИГИНАЛНОСТ

Декларирам, че представените в настоящия дисертационен труд резултати са плод на собствени изследвания, а обсъждането и изводите не са заимствани от други източници без цитиране.

Дата:.....

гр. София

Подпис.....

/Светла Николова/