

Błażej Rusin

**Ocena ekspresji receptorów estrogenowych
w mięśniach grzbietu
dzieci ze skoliozą idiopatyczną**

rozprawa doktorska

**z Katedry i Kliniki Ortopedii i Traumatologii Dziecięcej
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu
Kierownik: prof. dr hab. Andrzej Szulc**

Promotor: dr hab. Tomasz Kotwicki prof. UM

Poznań 2012

Panu dr hab. Tomaszowi Kotwickiemu profesorowi UM składam serdeczne podziękowania za wskazanie ciekawego tematu pracy, pomoc i poświęcony czas przy jej realizacji. Dzięki wsparciu i okazanej życzliwości mogę teraz przeżywać chwile osobistej satysfakcji z pokonania granicy niewiedzy z obszarem wiedzy.

Pani dr hab. Małgorzacie Kotwickiej dziękuję za wsparcie i umożliwienie realizacji pracy w Zakładzie Biologii Komórki.

Dziękuję pani mgr Aleksandrze Głodek oraz pozostałym pracownikom Zakładu Biologii komórki za nieocenioną pomoc podczas realizacji doświadczalnej części pracy.

Dziękuję rodzinie i bliskim za okazaną wyrozumiałość, cierpliwość i wsparcie.

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	
1.1. Definicja i epidemiologia skoliozy idiopatycznej	1
1.2. Teorie etiopatogenezy skolioz idiopatycznych	2
1.3. Estrogeny	4
1.4. Wpływ estrogenów na występowanie i progresję skolioz	9
1.5. Znaczenie mięśni głębokich grzbietu	11
2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY	14
3. MATERIAŁ	
3.1. Charakterystyka grupy badawczej A	16
3.2. Charakterystyka grupy B	18
3.3. Charakterystyka grupy C	19
4. METODYKA	
4.1. Zgoda na udział w badaniu	20
4.2. Badanie ortopedyczne	21
4.3. Badanie radiologiczne	21
4.4. Badania molekularne	23
4.4.1. Sposób pobrania materiału tkankowego do badań	23
4.4.2. Badanie ekspresji genu receptora estrogenowego ESR1 i ESR2 na poziomie mRNA	26
4.4.3. Badanie techniką western blot	35
4.4.4. Badanie immunohistochemiczne	37
4.5. Sposób analizy wyników	38
4.5.1. Obliczenie poziomu ekspresji genów receptorów estrogenowych w wybranych grupach mięśni grzbietu	38
4.5.2. Analiza poziomu ekspresji badanych genów	38
4.5.3. Porównanie poziomu ekspresji genu receptora ESR1 z poziomem ekspresji genu receptora ESR2.	38

4.5.4. Porównanie poziomu ekspresji badanych genów z wybranymi parametrami klinicznymi i radiologicznymi.	40
4.5.5. Analiza statystyczna	40

5. WYNIKI

5.1. Badanie ortopedyczne	42
5.1.1. Badanie podmiotowe	42
5.1.2. Badanie przedmiotowe	43
5.1.2.1. Wyniki pomiaru kompensacji tułowia za pomocą pionu	43
5.1.2.2. Wyniki pomiaru kąta rotacji tułowia z wykorzystaniem skoliometru Bunnella	45
5.2. Badanie radiologiczne	45
5.2.1. Kąt Cobba	45
5.2.2. Test Rissera	47
5.2.3. Współczynnik ryzyka progresji według Lonsteina i Carlsona	47
5.3. Badanie molekularne	47
5.3.1. Ocena ekspresji genu <i>ESR1</i> i <i>ESR2</i> w mięśniach grzbietu	47
5.3.2. Identyfikacja białkowego produktu ekspresji genów <i>ESR1</i> i <i>ESR2</i>	50
5.3.3. Poziom ekspresji genu <i>ESR1</i> w poszczególnych grupach: A, B i C	53
5.3.4. Poziom ekspresji genu <i>ESR2</i> w poszczególnych grupach: A, B i C	57
5.3.5. Porównanie poziomu ekspresji genów receptorów <i>ESR1</i> i <i>ESR2</i> w skoliozach idiopatycznych oraz innych deformacjach kręgosłupa	61
5.3.6. Porównanie poziomu ekspresji <i>ESR1</i> z danymi klinicznymi i radiologicznymi pacjentek z grupy A	63
5.3.6.1. Ocena poziomu ekspresji genu <i>ESR1</i> w zależności od czasu jaki upłynął pomiędzy wystąpieniem pierwszej miesiączki a operacją	63
5.3.6.2. Ocena korelacji asymetrii ekspresji genu <i>ESR1</i> z kątem rotacji tułowia (KRT) mierzonym skoliometrem Bunnella na szczycie głównego skrzywienia	65

5.3.6.3.	Ocena korelacji poziomu ekspresji genu <i>ESR1</i> z wartością kąta skoliozy według Cobba	65
5.3.6.4.	Ocena korelacji asymetrii ekspresji genu <i>ESR1</i> z wartością współczynnika ryzyka progresji (WRP)	66
5.3.7.	Porównanie ekspresji <i>ESR2</i> z danymi klinicznymi i radiologicznymi pacjentek z grupy A (N=33)	68
5.3.7.1.	Ocena poziomu ekspresji genu <i>ESR2</i> w zależności jaki upłynął pomiędzy wystąpieniem pierwszej miesiączki a operacją	68
5.3.7.2.	Ocena korelacji poziomu ekspresji genu <i>ESR2</i> z kątem rotacji tułowia (KRT) mierzonym skoliometrem Bunnella na szczycie głównego skrzywienia	69
5.3.7.3.	Ocena korelacji poziomu ekspresji genu <i>ESR2</i> z wartością kąta według Cobba	69
5.3.7.4.	Ocena korelacji poziomu ekspresji genu <i>ESR2</i> z wartością współczynnika ryzyka progresji (WRP)	70
6.	DYSKUSJA	71
7.	WNIOSKI	78
8.	PIŚMIENNICTWO	79
9.	STRESZCZENIE	89
10.	ABSTRACT	94
11.	ANEKS	98
	SPIS RYCIN	98
	SPIS TABEL	101
	FORMULARZ ZGODY	102
	INFORMACJA DLA PACJENTA	103
	KARTA BADANIA PACJENTA	104

WYKAZ SKRÓTÓW

ADHD	zespół nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi
BMD	gęstość mineralna kości
BMI	indeks masy ciała
BSA	albumina surowicy krwi bydłcej
cDNA	komplementarny kwas deoksyrybonukleinowy
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy
DNaza	enzym niszczący strukturę DNA, deoksyrybonukleaza
dNTP	deoksyrybonuleotydy
EDTA	kwas etylenodiaminotetraoctowy
EE2	17-alfa-etynyloestradiol
EOIS	skolioza idiopatyczna o wczesnym początku
ESR1	receptor estrogenowy pierwszy
ESR2	receptor estrogenowy drugi
<i>ESR1</i>	gen receptora estrogenowego pierwszego
<i>ESR2</i>	gen receptora estrogenowego drugiego
FA	formaldehyd
FSH	hormon folikulotropowy
GH	hormon wzrostu
GLUT4	transporter glukozy zależny od insuliny, typ 4
HDL	lipoproteina wysokiej gęstości
HPRT	fosfatydylotransferaza hipoksantyno-guaninowa
IGF-I	insulinopodobny czynnik wzrostu I
IL-6	interleukina 6
KRT	kąt rotacji tułowia
LDL	lipoproteina niskiej gęstości
LH	hormon luteinizujący
MOPS	kwas 3-(morfolino)propanosulfonowy
MRI	jądrowy rezonans magnetyczny
mRNA	matrycowy (informacyjny, przekaźnikowy) kwas rybonukleino- wy
MT1	receptor melatoninowy typu pierwszego
MT2	receptor melatoninowy typu drugiego
NaCl	chlorek sodu
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
PBS	roztwór soli fizjologicznej buforowanej fosforanami
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy
qPCR	reakcja łańcuchowej polimerazy DNA z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym
RNA	kwas rybonukleinowy
RNAsin	inhibitor rybonukleaz
RNaza	rybonukleaza

rpm	obroty na minutę
SI	skolioza idiopatyczna
SNP	polimorfizm pojedynczego nukleotydu
TBE	bufor wykorzystywany do elektroforezy na żelu agarozowym złożony z 2-Amino-2 hydroxymethyl-propane-1,3-diolu (Tris), kwasu borowego oraz EDTA
UV	promieniowanie ultrafioletowe
VEGF	czynnik wzrostu śródbłonna naczyń
w/v	stosunek wagowo — objętościowy
WPR	współczynnik ryzyka progresji

1.WSTĘP

1.1 Definicja i epidemiologia skoliozy idiopatycznej

Skolioza idiopatyczna (SI) jest rozwojowym zniekształceniem kręgosłupa i tułowia charakteryzującym się strukturalnym, bocznym i rotacyjnym skrzywieniem kręgosłupa. Deformacja rozwija się w trzech płaszczyznach: strzałkowej - zaburzenie fizjologicznej kifozy piersiowej lub lordozy lędźwiowej, czołowej – wygięcie boczne i poprzecznej – rotacja osiowa kręgow. Według *Scoliosis Research Society* skolioza jest wygięciem kręgosłupa, którego kąt mierzony sposobem Cobba na radiogramie przednio – tylnym wykonanym w pozycji stojącej wynosi co najmniej 10° [36]. SI pojawia się i ulega progresji głównie u dziewcząt w trakcie dojrzewania płciowego, ważnego okresu dla wzrastania i kształtowania się kośćca [66] i dotyczy 1- 3 % populacji dzieci w wieku 10 – 16 lat [116]. Częstość występowania SI u dziewczynek jest dwukrotnie większa niż u chłopców w przypadku skrzywień o kącie Cobba co najmniej 10° , przy czym w przypadku skrzywień powyżej 30° stosunek występowania SI wzrasta do 8:1 na rzecz dziewcząt [116]. Według Dicksona i wsp. [28] odpowiedzialne za to jest wcześniejsze dojrzewanie dziewcząt i wchodzenie w okres szybkiego wzrastania w momencie gdy fizjologiczna kifoza piersiowa ma najmniejsze wartości.

Ryzyko progresji skrzywienia zależy od wieku w którym wystąpi i od kąta w chwili wykrycia skoliozy. Im wcześniej wykryta i im większy kąt w momencie wykrycia tym większe ryzyko progresji (tabela 1.1).

Tabela 1.1. Ryzyko progresji skoliozy idiopatycznej (w %) w zależności od wartości kątowej i od wieku w chwili wykrycia skrzywienia według Nachemsona i wsp. (cytowane za [36])

Wartość kąta Cobba w momen- cie wykrycia (stop- nie)	Wiek rozpoznania (lata)		
	10 – 12	13 - 15	16
< 19	25%	10%	0%
20 -29	60%	40%	10%
30 -59	90%	70%	30%
> 60	100%	90%	70%

1.2. Teorie etiopatogenezy skolioz idiopatycznych

Pomimo licznych badań etiopatogeneza skoliozy idiopatycznej pozostaje nieznana [36, 116, 82, 12]. W świetle wielu doniesień SI jawi się jako zaburzenie uwarunkowane wieloczynnikowo z udziałem elementów systemu neurohormonalnego, neurologicznego, mięśniowego, czynników biochemicznych i strukturalnych [90]. SI jest spotykana u wielu członków jednej rodziny, co sugeruje czynnik genetyczny [89, 113]. Ryzyko wystąpienia skoliozy idiopatycznej u jednego z bliźniąt, w sytuacji gdy drugie jest chore na SI, wynosi według różnych prac od 13% do 73% u bliźniąt monozygotycznych i od 0% do 36% u dwuzygotycznych [57, 13, 2]. Opisano loci na chromosomach autosomalnych 17, 18 i 19 [102, 42, 16] oraz locus na chromosomie X [53] powiązane z występowaniem SI. Postulowane są również modele dziedziczenia wielogenowego [24, 73, 44]. Badania Inoue i wsp. nad polimorfizmem genów dla receptorów witaminy D, dla estrogenów (ESR1) oraz CYP17A1 przemawiają za powiązaniem tych genów z podatnością na SI i jej progresją [51]. Natomiast Gao i wsp. wykazują związek polimorfizmu genu *CHD7* mającego związek z występowaniem zespołu CHARGE (szczelina gałki ocznej, wada serca, atrezja nozdrzy, opóźnienie wzrostu, wady układu moczowo – płciowego, deformacja ucha wewnętrznego i zewnętrznego, głuchota) i podatności na występowanie skoliozy [35].

Zdaniem wielu badaczy progresja skoliozy idiopatycznej związana jest z przyspieszonym i nierównym rośnięciem trzonów kręgow w ich przedniej części, co skutkuje zmniejszeniem kifozy piersiowej, a nawet występowaniem lordozy piersiowej [127, 40, 114]. Inni uważają, że różna kinetyka wzrastania trzonu kręgow u chorych na SI po stronie wypukłej i wklęsłej powoduje zaburzenie kształtu trzonu kręgu w płaszczyźnie czołowej [58].

Porter i wsp. [92] oraz Chu i wsp. [22] zaobserwowali dysproporcję we wzrastaniu kręgosłupa i rdzenia kręgowego u chorych na SI. Opisywane są również zaburzenia w zakresie somatosensorycznych potencjałów wywołanych oraz kontroli postawy u dzieci dotkniętych SI [17, 41]. Rogala w oparciu o badania 136 chorych w wieku od 11 do 18 lat opisał znaczące asymetryczne deficyty w przewodnictwie aferentnym (w badaniach somatosensorycznych potencjałów wywołanych) i eferentnym (w badaniach ruchowych potencjałów wywołanych). Zdaniem autora zmiany te mogą być pierwotnymi w etiologii młodzieńczej skoliozy idiopatycznej [101].

Od dłuższego czasu zainteresowanie budzi powiązanie SI z melatoniną. Związek tego hormonu z rozwojem skoliozy zademonstrowano początkowo na modelu zwierzęcym (u ptaków) [74], jednakże Cheung i wsp. w roku 2005 nie potwierdzili tego powiązania u naczelnych [20]. Doświadczenia nad stymulacją osteoblastów melatoniną *in vitro* pokazały obniżenie proliferacji i różnicowania komórek u pacjentów ze skoliozą [78]. Moreau i wsp. [84] zasugerowali zaburzony mechanizm fosforylacji białka Gi błony komórkowej osteoblastów jako przyczynę nieadekwatnej odpowiedzi tych komórek na melatoninę, a co za tym idzie, podwyższonych stężeń cAMP. Na kanwie tych doniesień zaproponowano wstępną molekularną klasyfikację chorych na skoliozę idiopatyczną [5]. Przy pomocy technik radioimmunologicznych określono zawartość melatoniny w pikogramach na mililitr w mięśniach przykręgosłupowych pacjentów z młodzieńczą postacią skoliozy idiopatycznej. Porównanie wyników otrzymanych z mięśni po obu stronach skrzywienia nie wykazało różnicy w zawartości melatoniny [1]. Taką różnicę potwierdzono w zakresie receptorów melatoninowych MT2, identyfikując większą ekspresję receptorów po stronie wklęsłej skrzywienia [96], podczas gdy dla MT2 nie stwierdzono istotnej różnicy ekspresji. Badania genetyczne nad oboma typami receptorów wykazały związek SNP receptorów melatoniny typu MT1 oraz polimorfizmu regionu promotorowego genu receptora MT2 melatoniny ze skoliozą idiopatyczną [83,94].

Przypuszcza się, że w etiologii SI rolę odgrywa również kalmodulina, białko wiążące jony wapnia i odpowiedzialne za regulację zależnych od cAMP szlaków metabolicznych. Kalmodulina ma również wpływ na kurczliwość mięśni, a jednocześnie jest neurotransmiterem biorącym udział w regulacji sekrecji melatoniny. Zarówno Loewe i wsp. [72] jak i Kindsafer i wsp. [59] w niezależnych badaniach stwierdzili korelację wysokich poziomów kalmoduliny z progresją skrzywienia zdefiniowaną jako wzrost kąta skrzywienia według Cobba o 10° w ciągu roku. Porównanie poziomów kalmoduliny w płytkach krwi chorych na SI i osób zdrowych przez Acaroglu i wsp. [1] wykazało brak istotnej różnicy między grupami. Natomiast w tym samym badaniu wykryto większe poziomy kalmoduliny w mięśniach przykręgosłupowych po stronie wypukłej niż wklęsłej.

Badania nad etiologią skolioz doprowadziły do odkrycia zmniejszonych stężeń w surowicy krwi obwodowej leptyny - białka biorącego udział w regulacji procesów energetycznych komórek u chorych na SI [95]. Stężenia leptyny dodatkowo korelowały z indeksem masy ciała (BMI) pacjentów i mineralną gęstością kości (BMD) mierzoną w

trzonach kręgów kręgosłupa lędźwiowego i szyjki kości udowej. Stwierdzono również odwrotną zależność stężeń leptyny i wieku wystąpienia pierwszej miesiączki: im wcześniej wystąpiła pierwsza miesiączka tym mniejsze poziomy badanego białka. Udowodniono różną ekspresję kolagenu typu X oraz białka RUNX2 (czynnik transkrypcyjnego różnicowania osteoblastów) w brzegach chrząstek nasadowych trzonów kręgów po obu stronach skrzywienia zarówno na szczycie i jak na poziomie dolnego kręgu granicznego [115].

1.3. Estrogeny

1.3.1. Funkcja estrogenów

Estrogeny są hormonami steroidowymi wykazującymi działanie plejotropowe. Głównym źródłem estrogenów są komórki ziarniste jajnika. Niewielkie ilości estradiolu powstają w tkankach docelowych, takich jak kora nadnerczy, komórki Leydiga, komórki kory mózgowej hipokampa czy mózdzku a także w tkance tłuszczowej, na drodze konwersji estronu lub aromatyzacji androgenów [60,14].

Głównym zadaniem estrogenów jest stymulacja rozwoju i utrzymania fenotypu żeńskiego [77]. Plejotropowe działanie estrogenów wyraża się między innymi w:

- regulacji metabolizmu kości i gospodarki mineralnej – indukują antyresorpcyjne szlaki metaboliczne w osteoblastach, działając antagoniście w stosunku do parathormonu zapobiegają nadmiernej resorpcji kości; niskie poziomy estrogenów hamują proliferację i różnicowanie osteoblastów prowadząc do osteopenii; stymulują syntezę IGF-1, hamują cytokiny IL-1, IL-6 i czynnik martwicy nowotworów (TNF), pobudzają syntezę i sekrecję osteoprotegryny,
- wpływie na układ sercowo-naczyniowy – za pośrednictwem tlenu azotu i prostaglandyn rozszerzają naczynia krwionośne, obniżają stężenie cholesterolu całkowitego, zwiększają stężenie lipoprotein o wysokiej gęstości, hamują syntezę wolnych rodników i proliferację mięśni gładkich i komórek śródbłona naczyń, zmniejszają przenikania LDL i akumulację cholesterolu w ścianie naczyń [46],
- oddziaływaniu na układ nerwowy – wpływają na różnicowanie neuroblastów i tworzenie synaps, modułują neurotransmisję, hamują tworzenie złogów amylo-

idu i zwiększają przepływ krwi przez ośrodkowy układ nerwowy, regulują stany emocjonalne, funkcje kognitywne oraz uczenie się,

- wpływie na stan skóry – zwiększając przepuszczalność błon komórkowych oraz stymulując wzrost zawartości kolagenu zwiększają nawodnienie, elastyczność i grubość skóry, powodując przyspieszenie gojenia uszkodzeń skóry i tkanek miękkich,
- oddziaływaniu na gospodarkę węglowodanową – zwiększają wrażliwość komórek tłuszczowych na insulinę, stymulują obniżenie stężenia glukozy we krwi poprzez wpływ na komórki beta trzustki i wątrobowy klirens insuliny,
- działaniu na układ krzepnięcia – zwiększają stężenie czynników krzepnięcia II, VII, IX i X oraz zwiększają poziom fibrynogenu,
- oraz ich wpływie na tkankę mięśniową co zostanie omówione w rozdziale 1.3.4 [31, 122, 91, 104].

1.3.2. Receptory estrogenowe

Zasadniczy mechanizm działania estrogenów na tkanki docelowe ma charakter genowy i polega na aktywacji wewnątrzkomórkowych receptorów estrogenowych (ESR). W organizmie człowieka występują dwa typy receptorów estrogenowych: pierwszy (ESR1), zwany także receptorem alfa i drugi (ESR2) zwany receptorem beta. Należą one do dużej rodziny receptorów jądrowych i są białkami pełniącymi funkcje czynników transkrypcyjnych [69, 109]. Receptory estrogenowe ESR1 i ESR2 kodowane są przez dwa oddzielne geny *ESR1* i *ESR2*. Gen *ESR1* zlokalizowany jest na w części q24-q27 chromosomu 6. Składa się on z 488,3 tysiąca par zasad i zbudowany jest z ośmiu eksonów. Zmapowany w prążku q23.2 chromosomu 4. gen *ESR2* zbudowany jest z 61,2 tysięcy par zasad i składa się z dziewięciu eksonów [32,85].

Receptory ESR1 i ESR2 zbudowane są z sześciu funkcjonalnych domen oznaczonych literami od A do F (rycina 1.1).

Zawierająca fragment AF-1domena A/B znajduje się na aminowym końcu białka. Fragment AF-1 (ang. *transcriptional activation function 1*) jest niezależnym od przyłączenia liganda fragmentem odpowiedzialnym za aktywację transkrypcji.

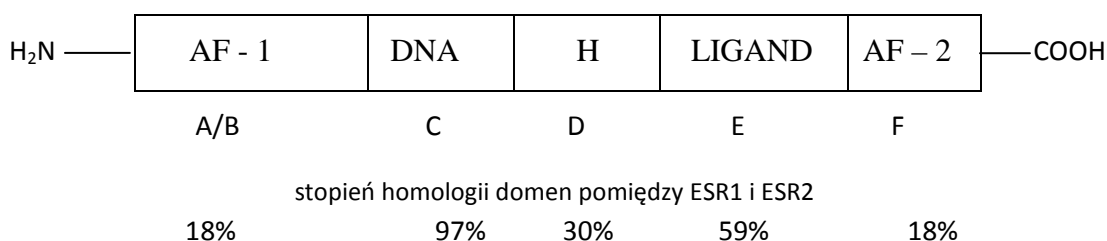
Domena C jest odpowiedzialna za dimeryzację receptora i przyłączenie kompleksu ligand-receptor do swoistej sekwencji DNA. Funkcja ta wiąże się z obecnością

domeny DBD (ang. *DNA binding domain*) posiadającej dwa fragmenty tzw. palców cynkowych.

Domena C (domena zawiasowa) zawiera tzw. rejon giętki receptora (domena H, ang. *hinge domain*), który umożliwia rotację domen DBD w stosunku do innych domen.

Domena E zawiera sekwencję odpowiedzialną za przyłączenie liganda (domena LBD, ang. *ligand binding domain*) oraz fragment AF-2, któremu przypisuje się zależną od przyłączenia liganda funkcję aktywacji transkrypcji.

Funkcja znajdującej się na C-końcu receptora domeny F nie jest do końca poznana. Postuluje się jej udział w rozróżnianiu agonistów i antagonistów estrogenów [27, 55, 108].



Rycina 1.1. Schemat budowy receptorów estrogenowych. A-F – kolejne domeny receptora; AF-1 – fragment odpowiedzialny za aktywacja transkrypcji niezależną od liganda; AF-2 – fragment odpowiedzialny za aktywację transkrypcji zależną od przyłączenia liganda; DNA – domena wiążąca DNA; H – rejon zawiasowy, LIGAND – miejsce przyłączenia liganda (według Tkaczyka [111] we własnej modyfikacji)

U człowieka istnieje kilka izoform receptorów ESR1 i ESR1, które są konsekwencją alternatywnego składowania (ang. *alternative splicing*). W dostępnym piśmiennictwie opisano kilka wariantów splicingowych ESR1, przy czym istnieją warianty, które mimo różnicy w sekwencji dają białko o masie takiej samej jak forma natywna receptora tj. 66 kDa. W komórkach nowotworowych opisano warianty ESR1 o masie 46 kDa. Również ESR2 występuje w kilku izoformach. Alternatywne warianty ESR2 mogą wykazywać wyższą ekspresję niż forma natywna receptora [80a].

Estrogeny będąc związkami o właściwościach lipofilnych przechodzą do komórek na drodze dyfuzji. ESR po związaniu liganda ulega aktywacji. Zmiany konformacyjne zachodzące w aktywowanym receptorze umożliwiają oddysocjowanie białek opiekuńczych i jego dimeryzację. W tej formie receptor transportowany jest do jądra komórkowego. Receptory estrogenowe mogą tworzyć homodimery lub heterodimery.

Na ogół homodimery ESR1 są silniejszymi aktywatorami procesu transkrypcji niż homodimery ESR2. Przy wysokim stężeniu liganda heterodimery wykazują aktywność zbliżoną do homodimerów ESR2 [27 i 55].

Lokalizacja receptorów estrogenowych wykazuje zależność tkankową. Często obie formy receptora występują razem, jednak są tkanki, w których jeden z receptorów wykazuje wyższy poziom ekspresji niż drugi. Wysoki poziom ekspresji mRNA dla ESR1 wykazano między innymi w komórkach ziarnistych jajnika, komórkach nabłonkowych i mięśniowych macicy, gruczole piersiowym, najądrzu, kardiomiocytach, aortie, komórkach kostnych, podwzgórzu, przysadce mózgowej, tkance tłuszczowej i wątrobie. Najwyższe poziomy mRNA dla ESR2 stwierdzono natomiast w komórkach tekalnych i ziarnistych jajnika, kardiomiocytach, prostaty, płucach i w komórkach hipokampa. Współwystępowanie receptorów ESR1 i ESR2 opisano między innymi w gonadach, nadnerczach, komórkach układu immunologicznego (limfocyty, komórki dendrytyczne śledziony), układzie krwionośnym, najądrzu, tarczycy czy w komórkach mięśni szkieletowych [110].

1.3.3. Mechanizm działania receptorów estrogenowych

Receptory estrogenowe wpływają na genom komórek docelowych w kilku mechanizmach. W podstawowym mechanizmie kompleks ligand-receptor wpływa na ekspresję genu docelowego wiążąc się ze swoistym elementem odpowiedzi na estrogeny (ERE, ang. *estrogen respons element*) zlokalizowanym w jego promotorze. Ponieważ około jedna trzecia genów, których ekspresja regulowana jest przez estrogeny nie posiada sekwencji ERE istnieją alternatywne drogi ich działania. Wskazuje się, że kompleks estrogen-receptor może się wiązać z innymi czynnikami transkrypcyjnymi i za ich pośrednictwem oddziaływać na aktywność genów. Postuluje się również obecność drogi niezależnej od przyłączenia liganda, w której proces fosforylacji ESR aktywuje go, co umożliwia wiązanie receptora z sekwencją ERE [55, 52].

Przyjmuje się, że estrogeny mogą wywierać swój wpływ na komórki docelowe również na drodze niegenomowej. Wskazują na to badania opisujące szybką odpowiedź komórek (występującą już po kilkunastu sekundach) na stymulację estrogenami. Na obecnym etapie wiedzy przyjmuje się, że niegenomowy mechanizm działania jest powszechną właściwością hormonów steroidowych. Postuluje się obecność w błonie komórkowej białek o strukturze podobnej do klasycznych, estrogenowych receptorów

jądrowych. Ponieważ jednak klasyczne ESR nie zawierają domen transbłonowych typowych dla receptorów błonowych, sugeruje się, że ulegają one potranslacyjnym modyfikacjom, które umożliwiają im zakotwiczenie w błonie komórkowej [58a].

Wiadomo, że ESR1 i ESR2 nie wykazują aktywności kinaz, dlatego w przekazywanie sygnału z zakotwiczonych w błonie komórkowej ESR muszą być zaangażowane dodatkowe molekuly. Wskazuje się, że koordynatorem transdukcji sygnału jest białko nazywane modulatorem niegenomowej aktywności receptorów estrogenowych (MNAR, ang. *modulator of nongenomic action of estrogen receptor*) [34]. Opisano również niegenomową drogę działania estrogenów, w którą zaangażowany jest nieklasyczny, błonowy receptor dla estrogenów GPR30 [56]. Wskazuje się również na możliwość oddziaływania pomiędzy receptorami dla czynników wzrostu (GFR, ang. *growth factor receptor*) a ESR [27]. Ponadto zaobserwowano, że estrogeny zwiększają aktywność cyklazy adenylowej [50]. Sugeruje się, że pewne błonowe izoformy ESR wiążąc się z białkami Gi wpływają na aktywność fosfolipazy C, co powoduje między innymi wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapniowych [65].

Na podstawie aktualnego stanu wiedzy można przyjąć, że ESR1 i ESR2 obecne są również w mitochondriach. Sugeruje się, że estrogeny wpływają w bezpośredni sposób na funkcje mitochondriów, a zawarte w nich ESR pełnią rolę mitochondrialnych czynników transkrypcyjnych genów mitochondrialnego DNA [93, 107].

1.3.4. Oddziaływanie estrogenów na tkankę mięśniową

Analiza piśmiennictwa wykazuje, że doniesienia o wpływie estrogenów na mięśnie szkieletowe są stosunkowo nieliczne. Istotne publikacje na ten temat pochodzą z ostatnich lat. Wiadomo, że w mięśniach szkieletowych występują oba typy receptorów, co wykazano zarówno na poziomie mRNA jak i na poziomie białkowym [67, 119]. Zdaniem Wiik i wsp. [118] ich ekspresja u dzieci 10-letnich jest większa niż u dorosłych, co może wskazywać na ich istotną rolę w tym wieku. Wiadomo, że czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*) oraz syntaza tlenu azotu występują w mięśniach szkieletowych [43,86], a ich ekspresja podlega regulacji estrogenowej [49]. Gen dla VEGF posiada w swoim regionie promotorowym miejsce funkcjonalnie odpowiadające na obecność estrogeny i wiadomym jest, że jego aktywacja prowadzi do stymulowania w mięśniach szkieletowych zarówno miogenezy jak i angiogenezy [3, 43]. Z kolei oddziaływanie estrogenów poprzez kon-

trolę wytwarzania w mięśniach tlenku azotu będącego wazodilatatorem może być wyrazem wpływu tego hormonu na siłę rozwijaną przez mięśnie i ich adaptację do wysiłku [106]. Ponadto Barros i wsp. wykazali, że receptor ESR2 może w mięśniach szkieletowych zmniejszać ekspresję transportera glukozy zależnego od insuliny (GLUT4) [6]. Powyżsi autorzy wskazują, że estradiol w dużych dawkach wpływa na hamowanie przenikania glukozy do komórek mięśni szkieletowych co wydaje się istotne w kontekście ciężowej oporności na insulinę [7]. Badania na modelu zwierzęcym dowiodły, że rehabilitacja prowadzona w przypadkach zaniku mięśni u gryzoni przebiega szybciej w obecności estrogenów [11].

1.4. Wpływ estrogenów na występowanie i progresję skolioz

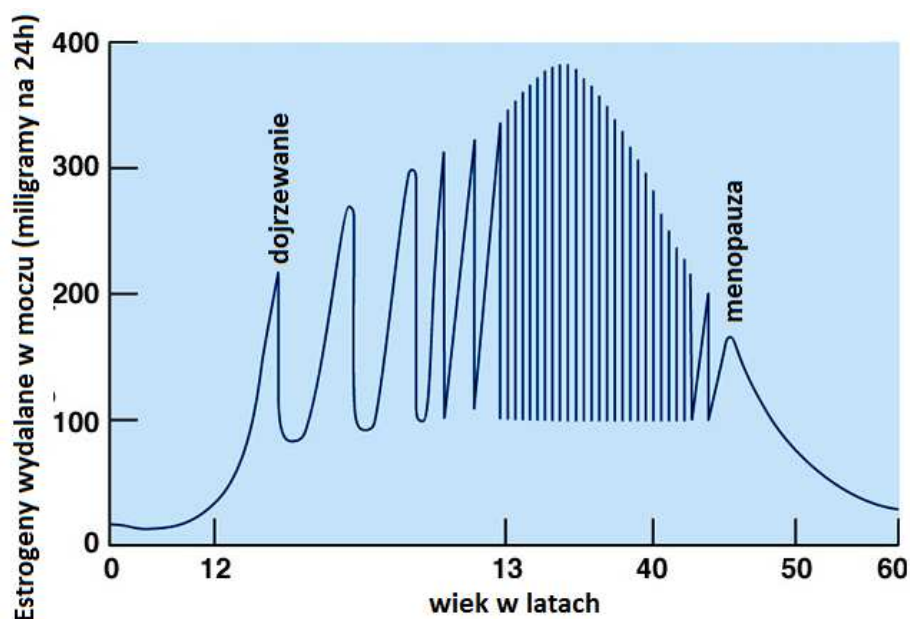
Progresja skrzywienia u chorych na młodzieńczą skoliozę idiopatyczną w okresie pokwitania związana jest między innymi z szybkim wzrastaniem kostnym, na który mają wpływ estrogeny [105]. Doświadczenia na modelu zwierzęcym pokazują bezpośredni wpływ estrogenów jak również ich antagonistów na rozwój skoliozy [9]. Podawanie dużych dawek agonisty estrogenowego 17-alfa-etinyloestradiolu (EE2) świnkom morskim z gatunku *Fundulus heteroclitus* prowadziło do znacznego zwiększenia częstotliwości występowania wad w budowie tkanki kostnej, w tym skrzywienia bocznego kręgosłupa. Jednocześnie w tym samym badaniu podawanie antagonisty estrogenowego o chemicznej nazwie ZM 189 również doprowadziło do zwiększenia częstotliwości występowania skoliozy [9]. Rezultaty doświadczenia pokazują jak skomplikowane i jeszcze nieznanne są mechanizmy działania estrogenów na proces kościotworzenia.

Rozwój i dojrzewanie szkieletu są kontrolowane przez hormony tarczycy, przytarczyc, hormon wzrostu (GH) oraz hormony płciowe. Wzrost kości na długość następuje poprzez kostnienie chrząstki nasadowej, w której znajdują się receptory estrogenowe ESR1 i ESR2 [87]. Powiększanie się jamy szpikowej następuje poprzez podkostnową resorpcję kości a wzrost kości na grubość następuje poprzez odkładanie od strony okostnej [99]. Estrogeny hamują przebudowę tkanki kostnej zapewniając prawidłowy stosunek pomiędzy tworzeniem i resorpcją tkanki kostnej [99]. Na poziomie komórkowym zmniejszają tworzenie się i aktywność osteoklastów przyspieszając jednocześnie ich apoptozę i znacząco redukując ich czas przeżycia [47]. Dwa doniesienia opisują antagonistyczne działanie estrogenów wobec indukowanej przez glukokortykosteroidy apoptozy osteoblastów co wydłuża ich długość życia [80,37]. Żeńskie hormony

płciowe hamują również IL-6 kluczową cytokinę odpowiedzialną za stymulację resorpcji kostnej [125]. Wątpliwości dotyczą modelu działania stymulującego na osteoblasty [21,76, 97,]. Badania na zwierzętach [117] pokazały, że estrogeny mają wpływ na płytkę wzrostową, przyspieszając wyczerpanie potencjału proliferacyjnego chondrocytów i powodując w ten sposób przyspieszone kostnienie płytek. Autorzy tego badania sugerują, że ze względu na podobieństwa w obrazie klinicznym badanych zwierząt (króliki) do ludzi, estrogeny mają podobny wpływ na ludzką chrząstkę nasadową [117].

Dzieci z młodzieńczą postacią skoliozy idiopatycznej są wyższe niż zdrowe [124]. Wpływ żeńskich hormonów płciowych na bioaktywność i sekrecję hormonu wzrostu (GH) jest złożony i zależy od dawki. Krótkotrwałe podawanie estrogenów może spowodować obniżenie stężeń bioaktywnej formy GH oraz IGF-I, podczas gdy przewlekła ekspozycja powoduje ich wzrost [15]. Wysokie dawki estrogenów hamują wydzielanie GH [29], co w efekcie może prowadzić do zakończenia wzrostu kostnego.

Estrogeny wpływają na przebudowę kości, jednakże nie jest jasne powiązanie tego procesu z progresją skrzywienia u chorych na młodzieńczą skoliozę idiopatyczną. Udowodniono, że 17beta estradiol ma wpływ na wzrost masy kostnej w okresie dojrzewania [58]. Należy nadmienić, że okres największej progresji skoliozy idiopatycznej przypada właśnie na początek wieku dojrzewania u dziewcząt (10-12 lat). O ile w dzieciństwie wydzielanie estrogenów jest niewielkie, to w okresie pokwitania, pod wpływem hormonów gonadotropowych przysadki (FSH i LH) następuje w krótkim czasie 20-krotny wzrost wydzielania estrogenów [60]. Występuje tzw. pik estrogenowy (rycina 1.2). Warto zauważyć, że wystąpienie pierwszych trzeciorzędowych cech płciowych pod postacią powiększenia gruczołów sutkowych dziewczynki (S2 w skali Tannera), który to moment jest przez Duval-Beaupere [30] uważany za punkt zwrotny w przebiegu skoliozy idiopatycznej, zapoczątkowujący okres szybkiej progresji, zbiega się dokładnie z pierwszym zauważalnym wzrostem stężenia estradiolu w osoczu [60]. Stąd data pierwszej miesiączki została zaproponowana jako czynnik prognostyczny progresji skoliozy [39].



Rycina 1.2 Zmiany ilości wydalanych w moczu estrogenów u kobiet w zależności od wieku. Schemat według Hyde i Delamater, we własnej modyfikacji [48].

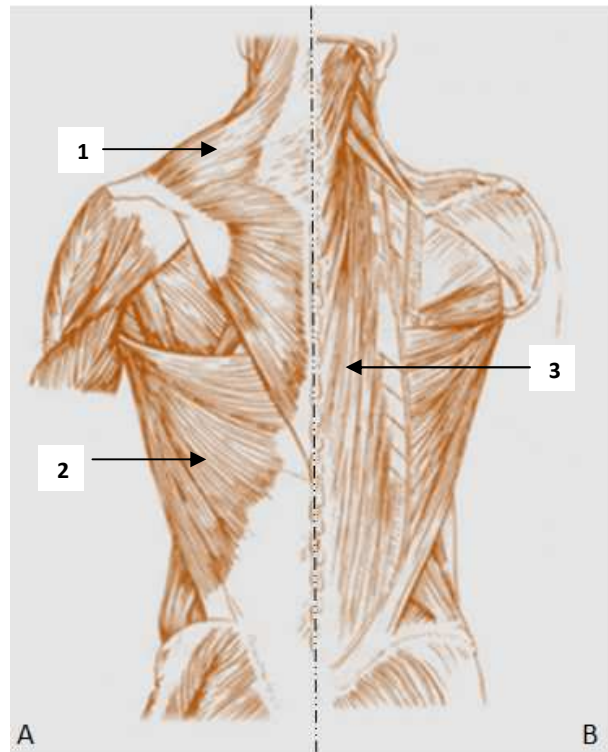
Kwestią sporną pozostaje to czy stężenia hormonów w tym okresie u pacjentów z młodzieńczą skoliozą idiopatyczną różnią się od stężeń u osób zdrowych. W przeprowadzonych badaniach, w których porównywano stężenia 17 beta estradiolu u dziewczynek chorych na SI oraz dziewczynki zdrowych, w dwóch pracach [64, 33] uzyskano istotną różnicę w stężeniach krążących we krwi obwodowej estrogenów na korzyść grupy kontrolnej zdrowych dziewczynki. Taki wynik wskazywałby, że to obniżone poziomy estradiolu mogą przyczyniać się do progresji skoliozy. Rezultatem tym przeczą jednak wyniki dwóch kolejnych badań [103, 98], które pokazują brak różnicy w stężeniach estrogenów w wyżej wspomnianych grupach badawczych. Można więc przypuszczać, że progresja skoliozy może być związana ze zwiększoną ekspresją receptorów estrogenowych oraz ich asymetrycznym rozmieszczeniem.

1.5. Znaczenie mięśni głębokich grzbietu

Zgodnie z klasyfikacją metaboliczno-funkcjonalną w organizmie człowieka wyróżnia się trzy typy włókien mięśniowych: typ I (ang. *slow-twitch oxydative* – wolnokurczliwe, tlenowe), typ IIA (ang. *fast-twitch oxydative-glycolytic* – szybko kurczliwe, tlenowo-beztlenowe) i IIX (ang. *fast-twitch glycolytic* – szybko kurczliwe, beztlenowe) [60]. Proporcja poszczególnych typów mięśni jest cechą osobniczą, genetycznie uwa-

runkowaną, a ponadto w obrębie danego mięśnia proporcje różnych typów włókien są także genetycznie uwarunkowane i zależą głównie od funkcji spełnianej przez dany mięsień. Mięśnie grzbietu leżące wzdłuż kręgosłupa (mięśnie głębokie, właściwe grzbietu [8]) mają funkcję mięśni posturalnych (typ I), zdolnych do długotrwałych wysiłków, rozwijających stosunkową niewielką siłę, o małej szybkości skracania się włókien, wysokiej kapilaryzacji i niskiej zawartości glikogenu. Wytwarzają one energię niemal wyłącznie w wyniku przemian tlenowych [60].

Pełnienie przez głębokie mięśnie grzbietu funkcji statycznej, związanej z utrzymaniem pionowej postawy ciała realizowane jest poprzez złożony układ przebiegu poszczególnych mięśni wzdłuż kręgosłupa, od miednicy do kręgow, klatki piersiowej i czaszki [8] (rycina 1.3). W obrębie tego układu wzajemnie przenikających się i krzyżujących włókien elementy kostne podlegać mogą siłom działającym w różnych kierunkach przestrzeni, a przedłużająca się asymetryczna aktywność mięśni może być powodem pojawienia się przestrzennych przemieszczeń kręgow i żeber [45, 108]. Układ mięśni grzbietu jest pozostałością filogenetycznej zmiany funkcjonowania kręgosłupa wynikłej z osiągnięcia postawy dwunożnej, i z uwagi na stosunkowo krótki okres ewolucyjny, trwający zaledwie około 1 miliona lat, nie ma podstaw aby uważać go za optymalny z biomechanicznego punktu widzenia. Doświadczenia Tylmana udowodniły, że poprzez asymetryczne osłabianie lub wzmacnianie wybranych mięśni głębokich grzbietu możliwe jest doświadczalne wywołanie deformacji kręgosłupa odpowiadającej skoliozie [112].



Rycina 1.3. Schemat budowy mięśni powierzchownych (A) i głębokich (B) grzbietu: 1 – mięsień czworoboczny, 2 – mięsień najszerszy grzbietu, 3 – mięsień prostownik grzbietu. Rycina według A.P.

W przeprowadzonych badaniach nad oceną grubości mięśni głębokich grzbietu na wysokości kręgu szczytowego w obrazie MRI u pacjentów chorych ze SI masa mięśni strony wypukłej była powiększona w stosunku do strony wklęsłej. W tym samym badaniu stwierdzono statystycznie istotną różnicę grubości tkanki tłuszczowej podskórnej położonej wzdłuż kręgosłupa z pogrubieniem po stronie wklęsłej [128]. Asymetrię w aktywności mięśni głębokich grzbietu stwierdzono w badaniach elektromiograficznych [4, 18, 19]. Wykryto różnicę w typie włókien budujących mięśnie głębokie grzbietu. Mannion i wsp. określili, że włókien mięśniowych typu I jest mniej po stronie wklęsłej skrzywienia, a typu IIx więcej po obu stronach łuku skrzywienia w porównaniu do mięśni pobranych od zdrowych dzieci [79].

2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Zakłada się, że w obrębie komórek mięśni grzbietu chorych ze skoliozą idiopatyczną istnieją receptory dla estrogenów oraz, że może występować różnica poziomu ekspresji genów receptorów estrogenowych pomiędzy poszczególnymi grupami mięśniowymi. Ponadto zakłada się, że opisane różnice poziomu ekspresji genów receptorów estrogenowych mogą skutkować zmianą, na przykład asymetrią, w zakresie funkcjonowania mięśni głębokich grzbietu i w ten sposób przyczynić się do powstania lub rozwoju skoliozy idiopatycznej.

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono prac stwierdzających występowanie receptorów estrogenowych w mięśniach grzbietu ani prac wiążących asymetrię występującą w skoliozie idiopatycznej z poziomem ekspresji genów receptorów estrogenowych.

Celem pracy jest zbadanie ekspresji genów receptorów estrogenowych *ESR1* i *ESR2* w komórkach mięśniowych mięśni grzbietu chorych ze skoliozą poddanych leczeniu operacyjnemu.

Cele szczegółowe:

1. Potwierdzenie obecności receptorów estrogenowych trzema niezależnymi technikami: (a) reakcji łańcuchowej polimerazy DNA z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym (qPCR), (b) techniką western blot i (c) immunohistochemiczną przy jednoczesnym ilościowym określeniu poziomu ekspresji genów receptorów estrogenowych w badanych mięśniach.
2. Zbadanie ekspresji genów receptorów estrogenowych w mięśniach właściwych grzbietu (głębokich, przykręgosłupowych) w porównaniu do mięśni powierzchniowych (mięśni obręczy kończyny górnej).
3. Porównanie poziomu ekspresji genu *ESR1* do poziomu ekspresji genu *ESR2* w głębokich mięśniach grzbietu.

4. Porównanie symetrii ekspresji genów receptorów estrogenowych to znaczy poziomu ekspresji w mięśniach głębokich strony wklęsłej i strony wypukłej skoliozy.
5. Zbadanie związku pomiędzy poziomem ekspresji genów receptorów estrogenowych w mięśniach grzbietu a wybranymi parametrami klinicznymi i radiologicznymi skoliozy.

3. MATERIAŁ

Zbadano 48 chorych leczonych operacyjnie w obrębie kręgosłupa w Klinice Ortopedii i Traumatologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu w latach 2008 – 2011. Wyróżniono trzy grupy chorych:

- 1) 33 dziewczęta operowane z powodu skoliozy idiopatycznej, grupa A,
- 2) 8 dziewcząt leczonych operacyjnie z powodu innych niż skolioza idiopatyczna schorzeń kręgosłupa (6 pacjentek) lub reoperowanych z powodu skoliozy idiopatycznej (2 pacjentki), grupa B,
- 3) 7 chłopców operowanych z powodu różnych deformacji kręgosłupa, grupa C.

Właściwą grupę badawczą stanowiła grupa A – dziewcząt operowanych z powodu skoliozy idiopatycznej; operacja była w ich przypadku operacją pierwotną. Z uwagi na charakter badań wymagający pobrania tkanki mięśniowej z okolicy kręgosłupa, nie było możliwe utworzenie grupy kontrolnej dzieci zdrowych. Powstały natomiast dwie grupy odniesienia: B (płeć żeńska) i C (płeć męska).

3.1. Charakterystyka grupy badawczej A

Do grupy A zaliczono 33 pacjentki w wieku od 11 do 21 lat (średnia 15 lat 6 miesięcy \pm 26 mies.). Kryteriami włączenia do grupy były:

1. płeć żeńska,
2. rozpoznanie skoliozy idiopatycznej,
3. kwalifikacja do leczenia operacyjnego,
4. pisemna zgoda rodziców/pacjenta na udział dziecka w badaniu.

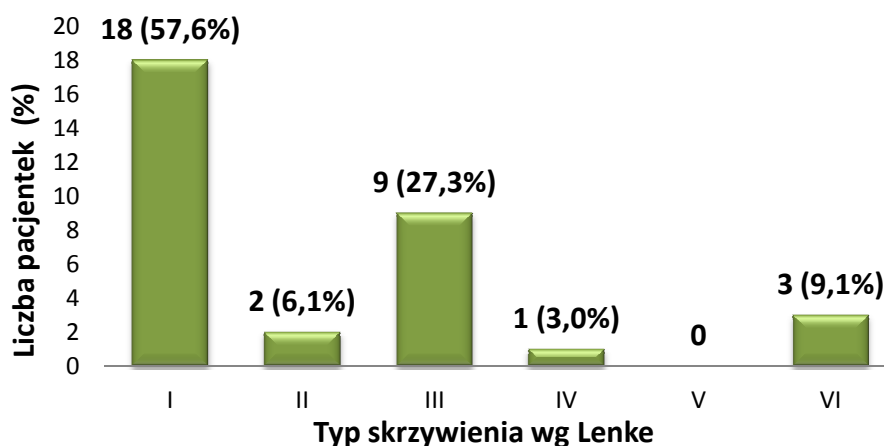
Kryteriami wyłączającymi z grupy badawczej były:

1. płeć męska,
2. rozpoznanie skoliozy innej niż idiopatyczna,
3. przebyte wcześniej operacje w obrębie kręgosłupa,
4. brak zgody rodziców/pacjenta na udział dziecka w badaniu.

W grupie A rozpoznano dwa typy skoliozy idiopatycznej:

- I. młodzieńczą (AIS) u 11 dziewczynek,
- II. o wczesnym początku (EOIS) u 22 dziewczynek,

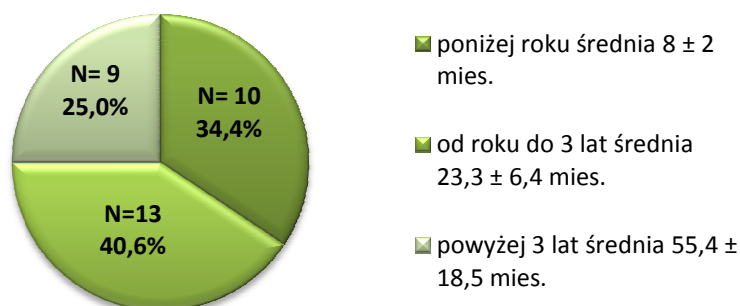
Typ lokalizacyjny skoliozy określono zgodnie z klasyfikacją Lenke i wsp. [67a]. Ponad połowa chorych prezentowała typ I klasyfikacji Lenke. Nie było chorych z typem V skrzywienia. Liczbę pacjentek z poszczególnymi typami skolioz według klasyfikacji Lenke przedstawia rycina 3.1.



Rycina 3.1. Liczba pacjentek z poszczególnymi typami skrzywień wg Lenke [67a].

Wzrost chorych w grupie A wynosił od 147cm do 176cm (średnia $160,2 \pm 7,1$ cm). W chwili leczenia operacyjnego jedna pacjentka nie przebyła jeszcze pierwszej miesiączki, a 32 było po pierwszej miesiączce. Okres jaki upłynął od pierwszej miesiączki do momentu operacji wynosił:

1. Poniżej jednego roku w przypadku 10 dziewcząt (33,3%)
2. Od jednego roku do trzech lat w przypadku 13 dziewcząt (39,4%)
3. Powyżej 3 lat w przypadku 9 dziewcząt (27,3%), rycina 3.2.



Rycina 3.2. Procentowy udział podgrup pacjentek według czasu, jaki upłynął pomiędzy pierwszą miesiączką a datą operacji

3.2. Charakterystyka grupy B

Do grupy B zakwalifikowano 8 chorych płci żeńskiej, które nie spełniały kryteriów grupy A, z tego powodu, że nie stwierdzono u nich skolioz idiopatycznych, lub w przypadkach rozpoznania skoliozy idiopatycznej chore te były już wcześniej operowane. Wiek dziewcząt wynosił od 9 do 22 lat (średnia 13 lat i 10 mies. \pm 4 lata i 2 mies.). Dwie dziewczynki nie miesiączkowały, a sześć miesiączkowało; okres od pierwszej miesiączki do operacji wynosił od 9 miesięcy do 100, w tym u dwóch poniżej roku, u dwóch od roku do 3 lat, a u jednej powyżej 3 lat. Charakterystykę kliniczną chorych grupy B przedstawia tabela 3.1.

Tabela 3.1. Podstawowe dane kliniczne pacjentek z grupy B

Lp.	Rozpoznanie	Wiek w chwili operacji (w latach)	Typ operacji	Czas od wystąpienia pierwszej miesiączki do operacji (w miesiącach)
1	Skolioza dziecięca	22	umocowanie obluźwanego haka	100
2	skolioza wczesnodziecięca	12	kolejny etap dystrakcji bez spondylodezy	9
3	skolioza wrodzona	9	korekcja skrzywienia	nie miesiączkowała
4	skolioza wtórna do zakotwiczenia rdzenia	13	korekcja skrzywienia, uwolnienie rdzenia kręgowego	10
5	skolioza wtórna do koarktacji aorty	15	kolejny etap dystrakcji bez spondylodezy	13
6	skolioza w przebiegu dysplazji kręgosłupowo – przynasadowej	11	korekcja skrzywienia	15
7	skolioza w przebiegu dysplazji kostnej twarzowo – sercowo – czaszkowej	12	wymiana instrumentarium	nie miesiączkowała
8	skolioza w przebiegu mielodysplazji	17	korekcja skrzywienia	49

3.3. Charakterystyka grupy C

W grupie C umieszczono 7 chłopców operowanych w obrębie kręgosłupa. Wiek wynosił od 11 do 24 lat (średnia wieku: 16 lat i 7 mies. \pm 4 lata i 9 mies.). Charakterystykę kliniczną chorych grupy C przedstawia tabela 3.2.

Tabela 3.2. Dane kliniczne pacjentów grupy C

Lp.	Rozpoznanie	Liczba przypadków	Wiek w czasie operacji (w latach)	Typ operacji
1.	skolioza młodzieńcza	2	16 i 22	korekcja skoliozy ze spondylodezą
2.	skolioza dziecięca	4	15, 16, 16 i 24	korekcja skoliozy ze spondylodezą
3.	skolioza w przebiegu krzywicy wrodzonej	1	11	usunięcie instrumentarium

4. METODYKA

U wszystkich chorych wykonano badanie kliniczne, radiologiczne i molekularne. Badanie kliniczne i radiologiczne zostało wykonane w Katedrze i Klinice Ortopedii i Traumatologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu u chorych przyjętych celem leczenia operacyjnego deformacji kręgosłupa. Badania molekularne zostały wykonane w Katedrze i Zakładzie Biologii Komórki Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu na podstawie materiału tkankowego mięśni przykręgosłupowych pobranych do badania w czasie operacji kręgosłupa. Wszyscy chorzy przeszli operację kręgosłupa z dostępu tylnego z użyciem implantów kręgosłupowych. Celem operacji była korekcja skrzywienia kręgosłupa (skoliozy lub kifozy) i stabilizacja uzyskanej korekcji poprzez wytworzenie warunków do powstania spondylodezy. Operatorem był we wszystkich przypadkach promotor pracy.

4.1. Zgoda na udział w badaniu

Na prowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu, nr decyzji 875/09. Praca była realizacją grantu badawczego promotorskiego Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego pt. „Ocena ekspresji receptora estrogenowego typu alfa i beta w tkankach mięśni przykręgosłupowych dzieci ze skolioza idiopatyczną”, nr grantu N N403 583638.

Rodzicom wszystkich pacjentów dostarczono formularz zgody na udział w badaniu (załącznik 1), który był wypełniony w mojej obecności. Formularz zawierał informację o anonimowości i poufności badania oraz o zakresie badań, które będą przeprowadzone. Rodzicom została dostarczona informacja (załącznik 2) o celu badania, zagrożeniach, korzyściach i procedurach wykonywanych w związku z badaniem. Karta zawierała również dane kontaktowe badaczy.

4.2. Badanie ortopedyczne

Badanie ortopedyczne składało się z badania podmiotowego i badania przedmiotowego.

Badanie podmiotowe obejmowało:

1. wywiad oceniający przebyte choroby,
2. wywiad dotyczący występowania skolioz w rodzinie,
3. datę pierwszej miesiączki.

Badanie przedmiotowe obejmowało:

1. ocenę kompensacji tułowia za pomocą pionu poprowadzonego z wyrostka kolczystego kręgu C7 poprzez pomiar odległości pionu od szpary pośladkowej w centymetrach,
2. pomiar kąta rotacji tułowia w teście Adamsa z wykorzystaniem skoliometru Bunnella, wykonany w pozycji stojącej ze swobodnie opuszczonymi kończynami górnymi; pomiar wykonałem na trzech poziomach kręgosłupa (piersiowym proksymalnym, piersiowym głównym i lędźwiowym), zmierzono kąt rotacji tułowia w stopniach.

4.3. Badanie radiologiczne

Do pracy wykorzystano dostępne w historii choroby zdjęcia rentgenowskie kręgosłupa wykonane dla celów diagnostyki i terapii; nie były wykonywane dodatkowe zdjęcia rtg specjalnie dla celów niniejszej pracy. Posłużono się radiogramami całego kręgosłupa wykonanymi na długich kliszach w pozycji stojącej w projekcji przednio-tylnej [26].

Na radiogramach zmierzono:

1. Kąt skoliozy w stopniach, metodą Cobba [23] polegającą na pomiarze kąta pomiędzy prostymi wykreślonymi wzdłuż górnej powierzchni górnego kręgu krańcowego i dolnej powierzchni dolnego kręgu krańcowego danego łuku skrzywienia.
2. Dojrzałość kostną według Rissera [100] w skali od 0 do 5. Test Rissera służy do oceny stopnia dojrzałości kostnej kręgosłupa na podstawie założenia o równoległym kostnieniu miednicy i kręgosłupa. Pełen zakres kostnienia chrząstki grzebień biodrowego świadczy o dojrzałości kostnej kręgosłupa (test Rissera 4 i 5).

Z uwagi na rozbieżne sposoby oceny wartości testu Rissera [61] na potrzeby pracy posługiwano się oryginalną wersją testu [100].

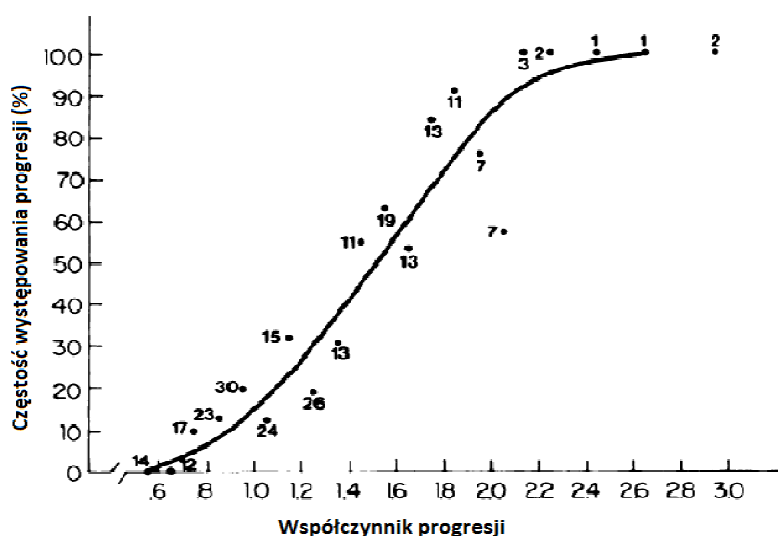
Ponadto obliczono współczynnik ryzyka progresji skoliozy (WRP) według wzoru podanego przez Lonsteina i Carlsona [71] z uwzględnieniem wartości kąta skrzywienia, wartości testu Rissera oraz wieku kalendarzowego zgodnie ze wzorem:

$$\text{Współczynnik ryzyka progresji (WRP)} = \frac{\text{kąt Cobba} - 3 \times \text{test Rissera}}{\text{wiek kalendarzowy (lata)}}$$

Przy tworzeniu WRP autorzy zdefiniowali progresję jako:

1. wzrost wartości kąta skrzywienia według Cobba o co najmniej 10° w przypadku skolioz o wartościach kąta mniejszych lub równych 19° i osiągających wartości końcowe co najmniej 20° lub
2. wzrost wartości kąta skrzywienia według Cobba o co najmniej 5° w przypadku skolioz o wartościach kąta między 20° a 29° .

Zależność współczynnika WRP i procentowego ryzyka progresji skoliozy idiopatycznej przedstawia rycina 4.1.



Rycina 4.1. Częstość występowania progresji u chorych na SI (w procentach) w zależności od wielkości współczynnika ryzyka progresji; schemat na podstawie badania Lonsteina i Carlsona [71], zmodyfikowany.

4.4. Badania molekularne

4.4.1. Sposób pobrania materiału tkankowego do badań

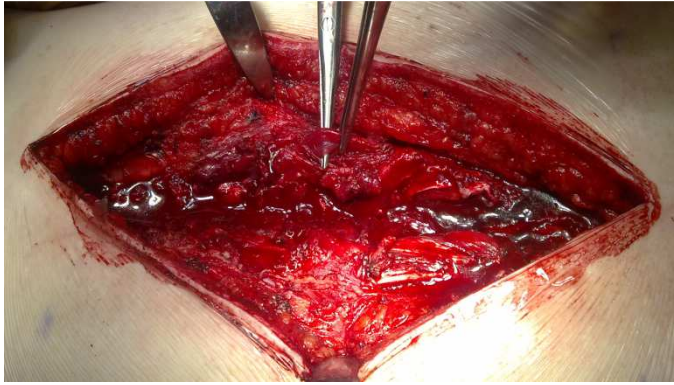
Miejsce pobrania materiału do badań w grupie A

W trakcie odsłaniania kręgosłupa z dostępu tylnego mięśnie głębokie grzbietu, pokrywające łuki i wyrostki kręgów były odsuwane na bok celem umożliwienia dostępu do elementów kostnych. Po instrumentacji i korekcji skrzywienia, w czasie zamykania rany operacyjnej, fragmenty mięśni głębokich grzbietu były w części usuwane. Dotyczyło to w szczególności fragmentów niedokrwionych jako źródła potencjalnego powikłania infekcyjnego oraz fragmentów odnerwionych przy odsłanianiu kręgosłupa, niepełniących funkcji ruchowej w związku z powstaniem pooperacyjnej spondylodezy. Pobranie niewielkich fragmentów tkanki mięśniowej nie wpływało negatywnie na zdrowie pacjenta.

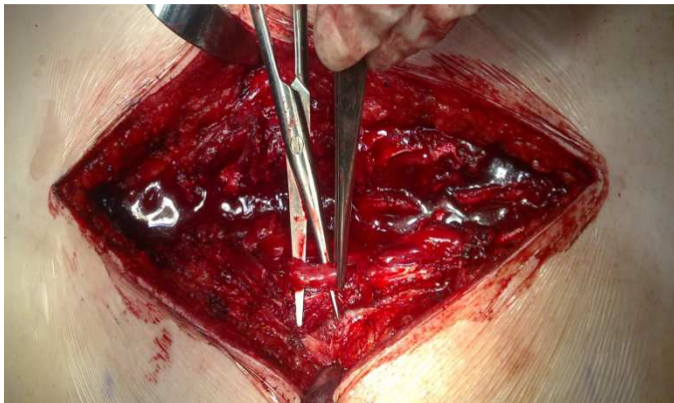
Do badań molekularnych pobrano trzy fragmenty tkanki mięśniowej, o wielkości około 1cm³ każdy, w tym dwa z mięśni głębokich (właściwych) grzbietu oraz jeden z mięśni powierzchniowych grzbietu (mięśni obręczy kończyny górnej). Materiał pobrano z następujących miejsc:

1. mięsień najdłuższy grzbietu (*m. longissimus*) na poziomie szczytu skoliozy po stronie wklęsłości skoliozy (rycina 4.2),
2. mięsień najdłuższy grzbietu (*m. longissimus*) na poziomie szczytu skoliozy po stronie wypukłości skoliozy (rycina 4.3),
3. mięsień powierzchniowy grzbietu – mięsień czworoboczny (*m. trapezius*) (rycina 4.4).

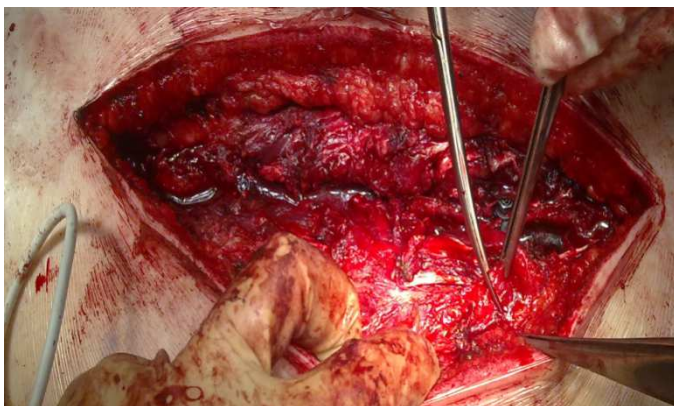
Pobraną tkankę dzielono na trzy części. Tkankę do badań mających na celu ocenę poziomu ekspresji *ESR1* i *ESR2* umieszczano w medium hamującym działanie RNaz (RNAlater; Sigma) i do czasu wykonania analiz przechowywano w temp. -80°C. Materiał do badań techniką western blot umieszczano w PBS i do czasu wykonania analiz przechowywano w temp. -80°C. Tkankę do badań immunohistochemicznych utrwalano w 4% roztworze formaliny.



Rycina 4.2. Miejsce pobrania tkanki z mięśni głębokich grzbietu po stronie wklęsłej skrzywienia

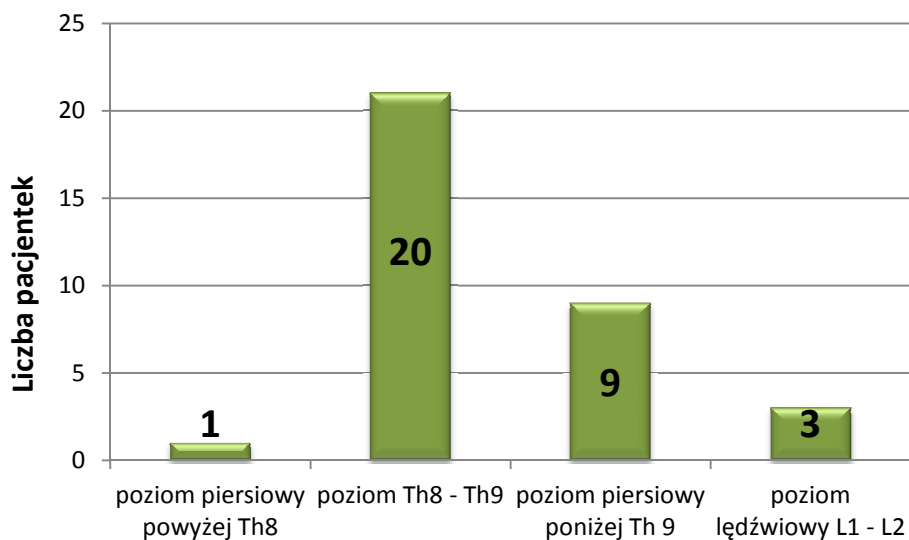


Rycina 4.3. Miejsce pobrania tkanki z mięśni głębokich grzbietu po stronie wypukłej skrzywienia



Rycina 4.4. Miejsce pobrania tkanki z mięśni powierzchniowych grzbietu

W grupie badawczej A fragmenty tkanki mięśniowej pobrano u 30 pacjentek na poziomie szczytu głównego skrzywienia piersiowego, a u 3 pacjentek z typem VI skoliozy według Lenke tkankę pobrano na poziomie szczytu skrzywienia lędźwiowego (rycina 4.5).



Rycina 4.5. Poziom pobrania tkanki mięśniowej z mięśni głębokich grzbietu do badań immunohistochemicznych i molekularnych

Miejsce pobrania materiału do badań w grupie B i C

W grupie badawczej B i C starano się dopełnić takiego samego sposobu pobierania tkanki mięśniowej pod względem lokalizacji jak w grupie A, to znaczy pobierać tkankę z mięśni głębokich grzbietu na poziomie szczytu głównego skrzywienia kręgosłupa po obu jego stronach, a ponadto z mięśnia czworobocznego grzbietu. Odstępstwa od opisanego wyżej miejsca pobrania tkanki mięśniowej dotyczyły:

1. dziewczynki z kifozą w przebiegu przepukliny oponowo-rdzeniowej (poziom pobrania Th7 obustronnie),
2. dziewczynki ze skoliozą w przebiegu dysplazji kręgosłupowo-nasadowej (poziom pobrania Th12).

W trakcie operacji materiał tkankowy pobierałem sam oraz z pomocą promotora. Do transportu próbek pobranych mięśni korzystałem z pomocy drugiej osoby zapoznanej z projektem. Badania molekularne zostały wykonane w części przeze mnie oraz przez pracowników Zakładu Biologii Komórki UM w Poznaniu. Mój udział w badaniach w Zakładzie Biologii Komórki polegał, po uprzednim przeszkoleniu, na wykonywaniu izolacji RNA z tkanki mięśniowej oraz na udziale w wykonaniu syntezy komplementarnego kwasu deoksyrybonukleinowego (cDNA) na matrycy całkowitego RNA (odwrotna transkrypcja).

Próba odniesienia do badań molekularnych i kontrolą pozytywną do badań immunohistochemicznych była tkanka prawidłowego endometrium pochodząca od kobiet, u których wykonano zabieg histerektomii. Każda z pacjentek została poinformowana o celu badań, na które otrzymano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

4.4.2. Badanie ekspresji genu receptora estrogenowego ESR1 i ESR2 na poziomie mRNA

W celu oceny poziomu ekspresji genów receptora estrogenowego ESR1 i ESR2 posłużono się techniką reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR). Badanie składało się z następujących etapów :

1. izolacji RNA z tkanki mięśniowej,
2. oceny ilościowej i jakościowej RNA,
3. syntezy cDNA na matrycy całkowitego RNA,
4. ilościowej analizy produktów reakcji qPCR oraz
5. analizy jakościowej i identyfikacji produktów reakcji qPCR, na podstawie analizy krzywych topnienia oraz rozdziału elektroforetycznego.

Izolacja RNA z tkanki mięśniowej

Całkowite RNA wyizolowano z tkanki z wykorzystaniem TriPure Isolation Reagent (Roche Diagnostics). Procedurę izolacji wykonano według zaleceń producenta we własnej modyfikacji:

1. zamrożoną w ciekłym azocie tkankę homogenizowano w moździerzu,
2. 25 mg tkanki zawieszono w 1ml TriPure Isolation Reagent, a następnie inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej w celu uzyskania dysocjacji nukleoprotein,
3. po dodaniu 200 µl chloroformu intensywnie wytrząsano przez 15 sekund, a następnie inkubowano przez 3 minuty w temperaturze pokojowej,
4. próby poddano wirowaniu z przyśpieszeniem 12 000g przez 15 minut w temperaturze 4°C,
5. zebrano fazę wodną i przeniesiono do nowej probówki,

6. RNA wytrącano przez dodanie 500 μ l alkoholu izopropylowego i inkubację w temperaturze pokojowej przez 10 minut,
7. próby wirowano z przyspieszeniem 12 000g przez 15 minut w temperaturze 4°C,
8. supernatant usunięto, a uzyskany osad przemyto 1 ml 75 % etanolu,
9. próby ponownie wirowano z przyspieszeniem 12 000g przez 5 minut w temperaturze 4°C,
10. usunięto alkohol, a otrzymany osad osuszano przez 5 minut w temperaturze pokojowej,
11. osad RNA rozpuszczono w wodzie pozbawionej RNaz, tak aby stężenie RNA nie przekraczało 3 000 ng/ μ l i inkubowano przez 10 minut w temperaturze 55°C,
12. w celu uzyskania maksymalnej czystości uzyskany roztwór RNA poddano ponownie procedurom od 2 do 11.

W taki sposób przygotowany całkowity RNA przechowywano do czasu dalszych analiz w temperaturze -80°C.

Ocena ilościowa i jakościowa RNA

Wyzolowany RNA oceniano przy pomocy metody spektrofotometrycznej z zastosowaniem spektrofotometru NanoDrop ND-1000 pod względem ilościowym dokonując pomiaru absorbancji przy długości fali 260 nm. Czystość RNA oceniano poprzez porównanie stosunku absorbancji przy długości fali 260 nm w stosunku do absorbancji przy długości fali 280 nm. Natomiast integralność wyizolowanego kwasu nukleinowego oceniano poprzez rozdział elektroforetyczny 1 μ l RNA w żelu zawierającym 1,2% agarozę (w/v) rozpuszczoną w buforze FA (20 mmol/l MOPS; 5 mmol/l CH₃COONa; 1 mM EDTA; pH=7,0) w warunkach denaturujących z formaldehydem (200 mmol/l). W celu wizualizacji RNA do żelu dodano bromek etydyny (50 ng/ml). Elektroforezę prowadzono w buforze FA przy napięciu 80V przez 30 minut. Po zakończeniu elektroforezy prążki rybosomalnego RNA wizualizowano poprzez poddanie działaniu światła UV na transiluminatorze, a uzyskany obraz analizowano przy użyciu systemu Scion Image wersja 4.02.

Synteza cDNA na matrycy całkowitego RNA

Całkowity RNA, który wyizolowano z mięśni szkieletowych, posłużył do syntezy komplementarnego do niego DNA w reakcji odwrotnej transkrypcji. Do syntezy użyto 1 µg RNA i uniwersalny starter oligo(d)T₁₀, którego stężenie końcowe wynosiło 5 mmol/l. Otrzymaną mieszaninę zawierającą RNA, starter i wodę wolną od RNaz umieszczono w termocyklerze i poddano 10 minutowej inkubacji w temperaturze 65°C w celu denaturacji. Aby umożliwić hybrydyzację startera do matrycy RNA, mieszaninę umieszczono na lodzie. Następnie dodawano mieszaninę deoksyrybonukleotydów (dNTP), buforu dla odwrotnej transkryptazy, inhibitor RNaz oraz odwrotną transkryptazę. Stężenia końcowe poszczególnych składników mieszaniny zawarto w tabeli 4.1. Wszystkie odczynniki wykorzystane do syntezy cDNA pochodziły z firmy Roche Diagnostics.

Tabela 4.1. Składniki wykorzystane do przeprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji

składnik	stężenie początkowe	stężenie końcowe
całkowity RNA	zmiennie	1 µg
starter oligo(d)T ₁₀	100 mmol/l	5 mmol/l
mieszanina dNTPs	10 mmol/l	1 mmol/l
inhibitor RNaz	40 U/µl	1U
bufor do odwrotnej transkrypcji	5x	1x
odwrotna transkryptaza	20 U/µl	4U
woda wolna od RNaz	-	dopełniono do objętości 20 µl

Proces przepisywania matrycy RNA na sekwencje komplementarnego DNA przebiegał w trzech etapach:

1. hybrydyzacja startera przez 10 minut w temperaturze 25°C,
2. odwrotna transkrypcja w temperaturze 55°C przez 30 minut,
3. denaturacja odwrotnej transkryptazy w temperaturze 85°C przez 5 minut.

Otrzymane w reakcji odwrotnej transkrypcji cDNA przechowywano w temperaturze -20°C do momentu wykonania reakcji PCR w czasie rzeczywistym, jednak nie dłużej niż przez okres siedmiu dni.

Ilościowa analiza produktów reakcji qPCR

W celu oceny poziomu ekspresji genów receptorów estrogenowych ESR1 i ESR2 w badanych tkankach przeprowadzono łańcuchową reakcję polimerazy z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym. Jako matrycy do amplifikacji fragmentu *ESR1* użyto 2,5 μl cDNA, natomiast dla amplifikacji *ESR2* 1,5 μl cDNA. Do amplifikacji wykorzystano odpowiednio zestawy LightCycler TaqMan Master oraz LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I.

Do reakcji q-PCR zastosowano genowo specyficzne startery zsyntezowane przez firmę GenoMed.

Dla ESR1 wykorzystano sondę hydrolizującą nr 67 (z zestawu sond uniwersalnych firmy Roche) oraz poniższe startery:

- a) ESR1 – starter sensowy o sekwencji:
5' –AATGCTACGAAGTGGGAATGAT– 3'
- b) ESR1 – starter antysensowy o sekwencji:
5' – CAAAGGTTGGCAGCTCTCAT– 3'

Dla ESR2 wykorzystano startery:

- a) ESR2 – starter sensowy o sekwencji:
5' –GAAGCATTCAAGGACATAATG-3'
- b) ESR2 – starter antysensowy o sekwencji:
5' –TCCCCTTCGTAACACTTC-3'.

Położenie starterów na matrycy cDNA pozwoliło na powielenie fragmentów odpowiadającym sekwencjom zdeponowanym w bazie danych NCBI Reference Sequences (RefSeq) dla wszystkich wariantów splicingowych *ESR1* (GenBank. NM_000125.3; NM_001122740.1; NM_001122741.1; NM_001122742.1) oraz wariantów *ESR2* ((NM_001437; NM_001040275; NM_001040276). Sekwencja startera sensowego obejmowała granice sąsiadujących ze sobą eksonów. Pozwoliło to na wyeliminowanie

możliwości syntezy fragmentów pochodzących z DNA genomowego. Charakterystykę poszczególnych starterów dla obu receptorów przedstawiono w tabeli 4.2.

Tabela 4.2. Charakterystyka starterów wykorzystanych do analizy poziomu ekspresji dla obu receptorów

Cecha	ESR1 sensowy	ESR1 antysensowy	ESR2 sensowy	ESR2 antysensowy
długość	22 nt	22 nt	21 nt	19 nt
temperatura topnienia	62,41°C	62,91°C	58,62°C	57,6°C
zawartość par GC	57,14 %	57,14 %	38,1%	47,37%
struktura drugorzędowa	bardzo słaba	brak	słaba	Brak
oddziaływanie primer – primer	Brak	brak	brak	Brak

Poziom ekspresji badanych genów normalizowano względem genu metabolizmu podstawowego, charakteryzującego się stałym poziomem ekspresji w badanych tkankach. W przeprowadzonych badaniach wykorzystano gen fosfatydylotransferazy hipokantyno-guaninowej (*HPRT*).

Zestaw starterów i sonda dla *HPRT* (nr. katalogowy: 05046157001, Roche), które zostały użyte do normalizacji wyników ekspresji *ESR1* objęte są tajemnicą handlową (dlatego w pracy nie zamieszczono szczegółowych informacji o ich strukturze).

Do reakcji amplifikacji fragmentu *HPRT* dla normalizacji ekspresji *ESR2* użyto następujące startery (GenoMed):

- 1) *HPRT* – starter sensowy o sekwencji:
5' – TGAAGAGCTATTGTAATGACCAGTC – 3'
- 2) *HPRT* – starter antysensowy o sekwencji:
5' – CAAATCCAACAAAGTCTGGC – 3'.

Startery sensowy *HPRT* i antysensowy *HPRT* zaprojektowano na podstawie sekwencji genu *HPRT* zdeponowanej w bazie danych NCBI Reference Sequences (RefSeq): NM_000194. Oba startery obejmują sekwencje na granicy dwóch sąsiadujących eksonów, co pozwoliło na wyeliminowanie możliwości syntezy fragmentów z DNA genomowego. Tabela 4.3 przedstawia charakterystykę wykorzystanych starterów.

Tabela 4.3. Charakterystyka starterów użytych do analizy ekspresji genu *HPRT*

Cecha	<i>HPRT</i> sensowy	<i>HPRT</i> antysensowy
Długość	25 nt	25 nt
temperatura topnienia	62,2°C	62,04°C
zawartość par GC	40%	45%
struktura drugorzędowa	brak	Słaba
oddziaływanie primer - primer	brak	Brak

W tabelach 4.4 i 4.5 przedstawiono skład i stężenia mieszaniny reakcyjnej qPCR użytej do ilościowej analizy produktów badanych genów.

Tabela 4.4. Charakterystyka mieszaniny reakcyjnej qPCR dla *ESR1*

Składnik	stężenie początkowe	stężenie końcowe/ilość
cDNA	-	2,5 µl
mieszanina starterów sensowego i antysensowego	5 mmol/l	0,5 mmol/l
sonda hydrolizująca	1 mmol/l	0,1 mmol/l
mieszanina LightCycler TaqMan Master zawierająca polimerazę	10x	1x
woda wolna od RNaz i DNaz	-	do objętości 10 µl

Tabela 4.5. Charakterystyka mieszaniny reakcyjnej qPCR dla *ESR2*

Składnik	stężenie początkowe	stężenie końcowe/ilość
cDNA		1,5 µl
starter (F+R)	5 mmol/l	0,5 mmol/l
Sonda TaqMan	25 mmol/l	3,5 mmol/l
mieszanina LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I zawierająca polimerazę oraz SYBR Green	10x	1x
woda wolna od RNaz i DNaz	-	do objętości 10 µl

Do badań zastosowano termocykler LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics). Profil termiczny reakcji qPCR dla *ESR1*, *ESR2* oraz *HPRT* opisano odpowiednio w tabelach 4.6 i 4.7.

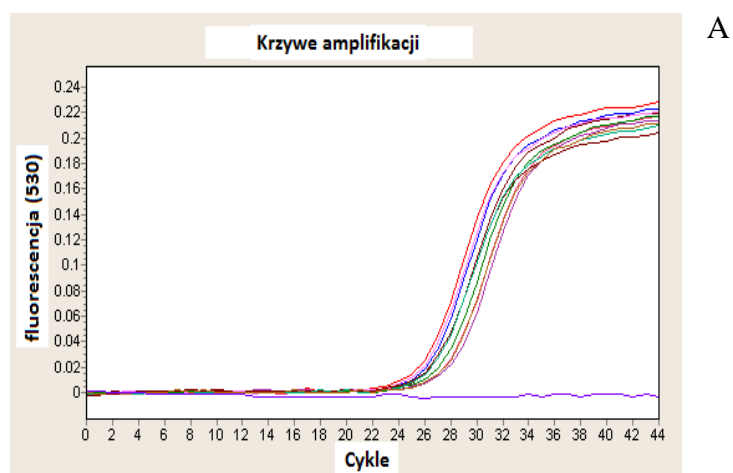
Tabela 4.6. Profil temperaturowy reakcji PCR dla *ESR1* oraz *HPRT*

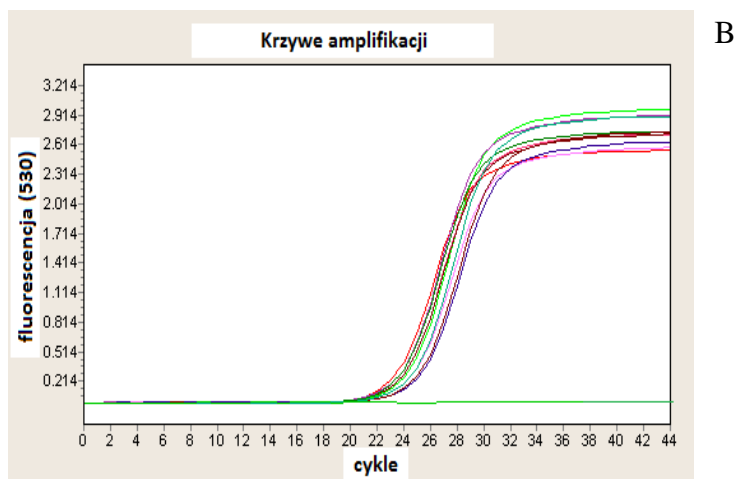
liczba cykli	etap		warunki reakcji w poszczególnych cyklach	
			HPRT	ESR1
1	preinkubacja		95°C, 10 minut	
45	amplifikacja	denaturacja	95°C, 10 s	
		hybrydyzacja starterów wraz z elongacją	60°C, 30 s	60°C, 30 s
		pomiar fluorescencji	72°C, 1 s	72°C, 1 s
1	chłodzenie		30 s, 40°C	

Tabela 4.7. Profil temperaturowy reakcji PCR dla *ESR2* oraz *HPRT*

liczba cykli	etap		warunki reakcji w poszczególnych cyklach	
			HPRT	ESR I
1	preinkubacja		95°C, 10 minut	
45	amplifikacja	denaturacja	95°C, 10 s	
		hybrydyzacja starterów	54°C, 5 s	55°C, 5 s
		elongacja z pomiarem fluorescencji	72°C, 9 s	72°C, 11 s
1	krzywa topnienia	denaturacja	95°C	
		hybrydyzacja produktów	65°C, 5 s	
		denaturacja z ciągłym pomiarem fluorescencji	0,2°C/s	
1	chłodzenie		30 s, 40°C	

Na rycinach 4.6 A i B przedstawiono przykładowe krzywe amplifikacji *HPRT*.





Rycina 4.6. Krzywe amplifikacji genu metabolizmu podstawowego *HPRT* dla reakcji użytej do oceny poziomu ekspresji *ESR1* przy pomocy sond hydrolizujących (rycina A) i dla reakcji z SYBR Green wykonanej dla oceny poziomu ekspresji *ESR2* (rycina B).

Wydajność reakcji qRT-PCR określono na podstawie krzywych wzorcowych wyznaczonych dla analizowanych genów. Na bazie cDNA zsyntetyzowanego z RNA wyizolowanego z tkanki endometrium przeprowadzono reakcje z serii kolejnych rozcieńczeń, co było podstawą do wyznaczenia krzywych wzorcowych. Dziesiętne rozcieńczenia cDNA obejmowały zakres od 1:1 do 1:10 000. Otrzymane w ten sposób rozcieńczenia matrycy poddano amplifikacji zgodnie z procedurą opisaną dla tkanek w tabeli 4.5.

Analiza produktów reakcji qPCR

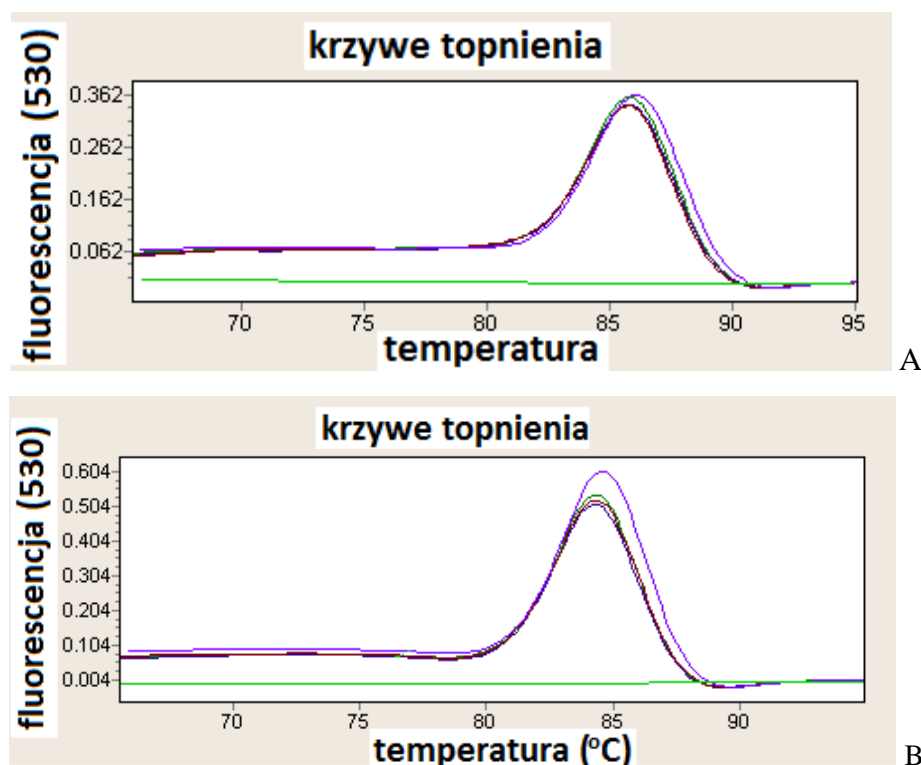
Na podstawie krzywej topnienia produktu (oprogramowanie 4.05 dla LightCycler 2.0) przeanalizowano zgodność produktów reakcji qPCR, a następnie porównano z kontrolą pozytywną, którą stanowiła tkanka endometrium.

Dodatkowo zgodność produktu potwierdzano przez rozdział elektroforetyczny w żelu zawierającym 2% agarozę rozpuszczoną w buforze TBE (89 mmol/l Tris, 89 mmol/l kwas borny, 2 mmol/l EDTA; pH 8.0) w obecności bromku etydyny (50 ng/ml). Elektroforezę prowadzono w buforze TBE przy napięciu 80V przez około 45 minut. Produkty reakcji qPCR po zakończeniu procesu elektroforezy uwidaczniano za pomocą transiluminatora (UVT-20LE, HeroLab). Otrzymany obraz poddano analizie przy użyciu systemu Scion Image ver. 4.02. Marker wielkości HyperLadder V (Bioline) posłużył do określenia wielkości produktu.

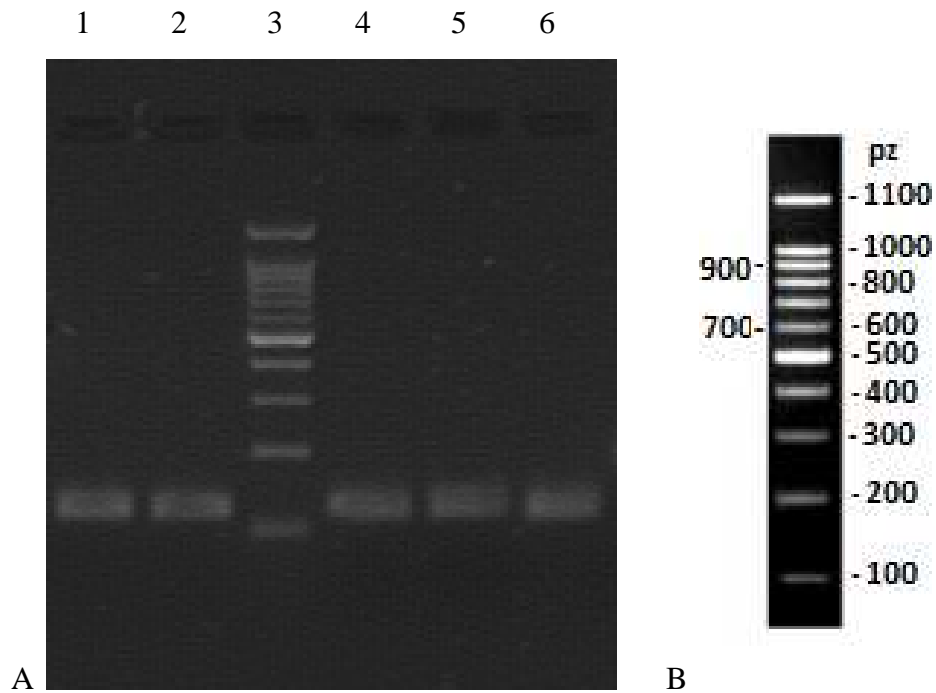
Identyfikacja produktów reakcji qPCR dla genów receptora ESR1 i ESR2

W celu identyfikacji produktu reakcji qPCR dla receptora ESR1 zastosowano technikę sond hydrolizujących TaqMan. Poziom genu referencyjnego określono również za pomocą specyficznej sondy hydrolizującej. Ze względu na zastosowaną metodykę nie było konieczności stosowania dodatkowych reakcji identyfikacji produktu.

W reakcji qPCR z SybrGreen dla genu receptora ESR2 oraz genu *HPRT* identyfikacji produktów dokonano poprzez analizę krzywych topnienia (odpowiednio ryciny 4.7A oraz 4.7.B) oraz poprzez elektroforetyczny rozdział powielonej matrycy w 2% żelu agarozowym (rycina 4.8.).



Rycina 4.7. Krzywe topnienia dla produktów genu *ESR2* (A) oraz genu referencyjnego *HPRT* (B) pacjentki P.W. Oznaczenia: mięsień powierzchniowy - kolor ciemnozielony, mięśnie głębokie po stronie wklęsłej - kolor brązowy, mięśnie głębokie po stronie wypukłej - kolor niebieski, endometrium - kolor fioletowy, kontrola negatywna (płaska linia) - kolor zielony.



Rycina.4.8. A. Rozdział elektroforetyczny potwierdzający obecność produktu amplifikacji DNA otrzymanego w reakcji qPCR dla receptora ESR2 u czterech pacjentek (kolumna pierwsza, trzecia, czwarta i piąta). W kolumnie drugiej produkt amplifikacji DNA receptora ESR2 z tkanki endometrium. W kolumnie trzeciej marker wielkości produktu, dodatkowo przedstawiony w części B (Nova 100bp Novazym); pz – pary zasad.

4.4.3. Badanie techniką western blot

Izolacja białek z tkanki mięśniowej

Izolacja ekstraktów białkowych z tkanek przebiegała według następującego protokołu:

- 1) zamrożone w ciekłym azocie tkanki homogenizowano w moździerzu,
- 2) próby zawieszono w buforze izolacyjnym z inhibitorami proteinaz (320 mmol/l sacharoza; 10 mmol/l Tris; 1 mmol/l Mg^{2+} ; 2 mmol/l DDT; 0,2 mmol/l PMSF; pH 7,5),
- 3) następnie wirowano 10 minut przy 3 000 x g w temperaturze 4°C, usuwano osad, supernatant przenoszono do nowej probówki,
- 4) wirowano przez 10 minut przy 30 000 x g w temperaturze 4°C, supernatant przenoszono do nowej probówki.

Tak przygotowane ekstrakty białkowe mierzono spektrofotometrycznie przy użyciu spektrofotometru NanoDrop ND-1000. Stężenia białek zmierzono metodą Bradford inkubując ekstrakt białkowy przez 10 minut z odczynnikiem Quick Start Bradford Dye Reagent (BioRad) w stosunku 1:100, wykonując pomiar przy długości fali 595 nm. Każdy z pomiarów został powtórzony dwukrotnie, a uzyskane wyniki uśrednione. Krzywą wzorcową wyznaczono również metodą Bradford, na podstawie pomiarów albuminy surowicy wołowej (BSA; Roche Diagnostics) o malejących stężeniach dziesiętnych w zakresie 1 mg/ml – 0,001 mg/ml.

Analiza western blot

Wyizolowane ekstrakty białkowe w ilości 50 µg poddano analizie western blot, która została przeprowadzona w następujących etapach:

1. rozdział elektroforetyczny w 12% żelu poliakrylamidowym w buforze do migracji warunkach denaturujących przy napięciu 200V w czasie 40 minut,
2. przenoszenie białek na membranę Hybond-C Extra (GE Healthcare Europe, Sacylay, Francja) przez 90 minut przy natężeniu 300 mA w buforze do transferu,
3. inkubacja w temperaturze 4° przez 1 godzinę w 5% buforze blokującym (BioRad),
4. inkubacja przez 24 godziny w temperaturze 4°C z polikonalnymi przeciwciałami króliczymi skierowanym przeciwko aminowemu końcowi *ESR1* (Santa Cruz Biotechnology) oraz karboksylowemu końcowi *ESR2* (Abcam) , rozcieńczonym odpowiednio 1:500 i 1:250 w buforze blokującym (BioRad),
5. odpłukanie niezwiązanych przeciwciał pierwszorzędowych w buforze zawierającym Tris (pH 8,8; 1 mmol/l) oraz 0,1% Tween 20 przez 5 minut; reakcję powtórzono trzykrotnie,
6. nakrapianie na błony skonjugowanych z alkaliczną fosfatazą antykróliczych przeciwciał drugorzędowych (Sigma Aldrich) w rozcieńczeniu 1:500,
7. inkubacja z wytrząsaniem 150 rpm przez 60 minut, w temperaturze pokojowej,
8. odpłukanie niezwiązanych przeciwciał drugorzędowych (tak jak w punkcie 4)
9. identyfikacja białek na podstawie reakcji barwnej po przez dodanie substratu dla alkalicznej fosfatazy (NBT/BCIP; Sigma-Aldrich),
10. zatrzymania reakcji barwnej poprzez przepłukanie błony wodą dejonizowaną.

4.4.4. Badanie immunohistochemiczne

Próbki tkanki mięśniowej utrwalone w 4% formalinie odwadniano i zatapiano w parafinie stosując standardowe techniki histochemiczne. Skrawki o grubości 3 μm przyklejone do szkiełka podstawowego umieszczono w cieplarni na 15 minut w temperaturze 50°C. Tkanę odparafinowano ksylenem i nawodniono poprzez przeprowadzenie przez szereg alkoholowy. W celu oceny morfologii tkanek wykonano barwienie hematoxyliną i eozyną.

W badaniach immunohistochemicznych antygeny odsłonięto przy pomocy dwukrotnego gotowania szkiełek w kuchence mikrofalowej (2 x 10 min., 250W) w buforze cytrynianowym o pH 6,0 (0,1 mol/l kwasu cytrynowego, 0,1 mol/l roztwór cytrynianu sodu). Preparaty pozostawiono do wystygnięcia w temperaturze pokojowej. W celu uniknięcia niespecyficznego wiązania przeciwciał, preparaty umieszczono w buforze blokującym TBS-T (100 mmol/l Tris, 65 mmol/l NaCl, 0,1% Tween 20; pH 7,5), zawierającym 3% BSA (Roche Diagnostic) na 1 godzinę w temperaturze pokojowej.

W badaniach użyto pierwszorzędowych, poliklonalnych przeciwciał króliczych skierowanych przeciwko ESR1 (Santa Cruz Biotechnology) oraz ESR2 (Abcam) w rozcieńczeniu 1:50. Inkubację przeprowadzono przez 24 godziny w temperaturze 4°C, a następnie preparaty poddano trzykrotnemu płukaniu w buforze TBS-T przez 15 minut. Następnym etapem była inkubacja próbek z drugorzędowymi kozimi antykróliczymi przeciwciałami skoniugowanymi z alkaliczną fosfatazą (AP) (Sigma-Aldrich) w rozcieńczeniu 1:200, po wcześniejszym zablokowaniu aktywności endogennej fosfatazy roztworem lewamisolu (2 mmol/l) przez 20 minut. Czas inkubacji wynosił 1 godzinę. Mieszanina BCIP/NBT (Sigma-Aldrich), która była substratem dla AP, została wykorzystana do wywoływania reakcji barwnej.

Skrawki endometrium posłużyły jako kontrola pozytywna. Preparaty w których przeciwciała pierwszorzędowe zastąpiono buforem blokującym, stanowiły kontrolę negatywną.

4.5. Sposób analizy wyników

4.5.1. Obliczenie poziomu ekspresji genów receptorów estrogenowych w wybranych grupach mięśni grzbietu.

Obliczono poziom ekspresji genu dla każdej z trzech lokalizacji, to znaczy w mięśniach głębokich grzbietu po stronie wklęsłości skoliozy ($ESR1_{wkl}$, $ESR2_{wkl}$), w mięśniach głębokich po stronie wypukłości skoliozy ($ESR1_{wyp}$, $ESR2_{wyp}$) oraz w mięśniach powierzchniowych grzbietu ($ESR1_{pow}$, $ESR2_{pow}$).

Obliczono średnią ekspresję w mięśniach głębokich dla receptorów $ESR1_{głęb}$ i $ESR2_{głęb}$:

$$ESR1_{głęb} = \frac{ESR1_{wkl} + ESR1_{wyp}}{2} \quad ESR2_{głęb} = \frac{ESR2_{wkl} + ESR2_{wyp}}{2}$$

Obliczono stosunek (ratio) poziomu ekspresji genów obu receptorów w mięśniach strony wypukłej do strony wklęsłej:

$$r_{ESR1} = \frac{ESR1_{wyp}}{ESR1_{wkl}} \quad r_{ESR2} = \frac{ESR2_{wyp}}{ESR2_{wkl}}$$

4.5.2. Analiza poziomu ekspresji badanych genów

Dokonano porównania poziomu ekspresji, osobno dla genu *ESR1* i genu *ESR2*, pomiędzy stroną wypukłą a wklęsłą skoliozy oraz między mięśniami głębokimi a powierzchniowymi grzbietu.

4.5.3. Porównanie poziomu ekspresji genu receptora *ESR1* z poziomem ekspresji genu receptora *ESR2*.

Reakcje qPCR wykonano przy użyciu dwóch różnych technik: SYBR Green dla *ESR1* i z zastosowaniem sond hydrolizujących TaqMan dla *ESR2*. Aby możliwym było bezpośrednie porównanie poziomu ekspresji genu *ESR1* i genu *ESR2* posłużono się przeliczeniem w oparciu o sposób podany przez Livaka i Schmittgena [70].

Względny poziom ekspresji genów *ESR1* i *ESR2* po stronie wklęsłej i wypukłej wyliczono uwzględniając ekspresję genu referencyjnego *HPRT* w badanej próbce i za każdym razem odnoszono do tkanki kontrolnej jaką stanowił mięsień powierzchniowy pobrany od danego pacjenta.

Równanie dla względnej ekspresji genu *ESR1* po stronie wklęsłej skrzywienia:

$$R = \frac{(E_{ESR1wkl}) \Delta C_{pESR1wkl}}{(E_{HPRT\ ESR1wkl}) \Delta C_{pHPRT\ ESR1wkl}}$$

gdzie:

$$\Delta C_{pESR1wkl} = C_{p\text{powierzchniowe}} - C_{pESR1wkl},$$

$$\Delta C_{pHPRT\ ESR1wkl} = C_{pHPRT\ \text{powierzchniowe}} - C_{pHPRT\ ESR1wkl}$$

R – ratio

C_p – punkt wejścia reakcji w fazę logarytmiczną (inaczej C_t, threshold cycle; cykl progowy)

E – wydajność reakcji wyznaczona na podstawie krzywej wzorcowej

Równanie dla względnej ekspresji genu *ESR2* po stronie wypukłej skrzywienia:

$$R = \frac{(E_{ESR2wyp}) \Delta C_{pESR2wyp}}{(E_{HPRT\ ESR2wyp}) \Delta C_{pHPRT\ ESR2wyp}}$$

Gdzie:

$$\Delta C_{pESR1wyp} = C_{p\text{powierzchniowe}} - C_{pESR1wyp},$$

$$\Delta C_{pHPRT\ ESR1wyp} = C_{pHPRT\ \text{powierzchniowe}} - C_{pHPRT\ ESR1wyp}$$

Równanie dla względnej ekspresji genu *ESR2* po stronie wklęsłej skrzywienia:

$$R = \frac{(E_{ESR2wkl}) \Delta C_{pESR2wkl}}{(E_{HPRT\ ESR2wkl}) \Delta C_{pHPRT\ ESR2wkl}}$$

gdzie:

$$\Delta C_{pESR2wkl} = C_{p\text{powierzchniowe}} - C_{pESR2wkl},$$

$$\Delta C_{pHPRT\ ESR2wkl} = C_{pHPRT\ \text{powierzchniowe}} - C_{pHPRT\ ESR2wkl}$$

Równanie dla względnej ekspresji genu *ESR2* po stronie wypukłej skrzywienia:

$$R = \frac{(E_{ESR2wyp})^{\Delta C_{p_{ESR2wyp}}}}{(E_{HPRT\ ESR2wyp})^{\Delta C_{p_{HPRT\ ESR2wyp}}}}$$

gdzie:

$$\Delta C_{p_{ESR2wyp}} = C_{p_{powierzchniowe}} - C_{p_{ESR2wyp}},$$

$$\Delta C_{p_{HPRT\ ESR2wyp}} = C_{p_{HPRT\ powierzchniowe}} - C_{p_{HPRT\ ESR2wyp}}$$

4.5.4. Porównanie poziomu ekspresji badanych genów z wybranymi parametrami klinicznymi i radiologicznymi

Porównano poziom ekspresji genów receptorów *ESR1* i *ESR2* u chorych ze skoliozą idiopatyczną w stosunku do chorych operowanych z powodu innych niż skolioza idiopatyczna deformacji kręgosłupa.

W grupie chorych ze skoliozą idiopatyczną porównano poziom ekspresji genów *ESR1* i *ESR2* pomiędzy trzema podgrupami pacjentek: (1) u których w chwili operacji upłynął nie więcej niż rok od wystąpienia pierwszej miesiączki (N=11), (2) u których w chwili operacji upłynęło więcej niż rok ale mniej niż trzy lata (N=13) oraz (3) u których upłynęło więcej niż trzy lata od wystąpienia pierwszej miesiączki (N=9). Dokonano oceny korelacji poziomu ekspresji genów receptorów *ESR1* i *ESR2* z wartością kąta skoliozy według Cobba, kąta rotacji tułowia Bunnella oraz współczynnika ryzyka progresji skoliozy (WRP) Lonsteina i Carlsona.

4.5.5. Analiza statystyczna

Przy opracowaniu statystycznym danych posługiwano się pakietem statystycznym STATISTICA 10.0 i GraphPad InStat oraz arkuszem kalkulacyjnym Microsoft Excel 2000. Normalność rozkładu sprawdzano testem Kolmogorova–Smirnova. Jednorodność wariancji analizowano testem Fishera-Snedocora (analiza dwóch zmiennych) lub testem Bartleeta (analiza trzech zmiennych). Dla porównania dwóch średnich stosowano testy t-Studenta w przypadku rozkładu normalnego, a testy nieparametryczne,

Manna-Whitneya i Wilcoxon, w przypadku braku rozkładu normalnego. Przy braku jednorodności wariancji zmiennych niepowiązanych stosowano test t-Studenta z korektą Welcha o rozkładzie normalnym. Dla porównania kilku grup zmiennych niepowiązanych zastosowano test parametryczny ANOVA lub nieparametryczny test Kruskala-Wallisa - w przypadku wystąpienia różnic istotnych statystycznie wykonywano test wielokrotnych porównań odpowiednio Tukeya-Kramera lub test Dunna. Dla porównania kilku grup zmiennych powiązanych zastosowano test Friedmana. Korelacje między zmiennymi obliczono przy użyciu współczynnika korelacji liniowej Pearsona (dla zmiennych o rozkładzie normalnym) lub współczynnika korelacji rang Spearmana (przy braku normalności rozkładu). Poziom istotności przyjęto jako $p = 0,05$.

5. WYNIKI

5.1. Badanie ortopedyczne

5.1.1. Badanie podmiotowe

Wywiad oceniający przebyte choroby

Wywiad przeprowadzony wśród chorych grupy A wykazał u jednej pacjentki obecność wady wrodzonej w postaci powiększonego wyrostka poprzecznego kręgu L5 po stronie lewej. Jedna chora przeżyła operację zamknięcia przetrwałego przewodu tętniczego Botalla.

W grupie B w wywiadzie oprócz schorzeń będących pierwotną przyczyną wystąpienia skrzywienia kręgosłupa, odnotowano mielodysplazję, stopę wydrążoną i paluch szponiasty u jednej pacjentki, młodzieńcze reumatoidalne zapalenie stawów u jednej chorej.

W grupie C wywiad wykazał obecność padaczki i stwardnienia guzowatego u jednego pacjenta, alergię pyłkową, zespół złego wchłaniania i wypadanie płatków zastawki dwudzielnej u jednego chorego.

Wywiad dotyczący występowania skolioz w rodzinie

W grupie A u 3 pacjentek wywiad rodzinny wykazał obecność skoliozy idiopatycznej: u matki w jednym przypadku, u siostry matki w jednym przypadku i u siostry ojca w jednym przypadku.

W grupie B odnotowano jeden przypadek wystąpienia skoliozy idiopatycznej w rodzinie - u siostry pacjentki.

W grupie C u dwóch pacjentów wywiad rodzinny wskazywał na występowanie skoliozy idiopatycznej. W obu przypadkach u siostry pacjenta.

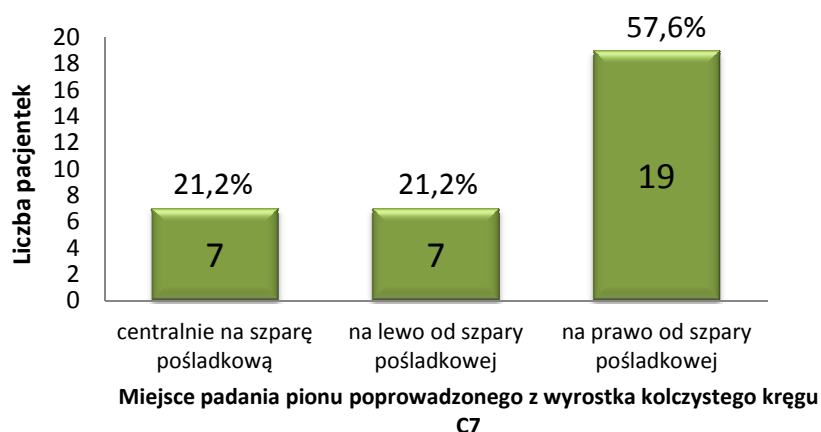
Wywiad dotyczący wystąpienia pierwszej miesiączki

Dane dotyczące występowania pierwszej miesiączki zawarto w opisie chorych w podrozdziale 3.1 i 3.2.

5.1.2. Badanie przedmiotowe

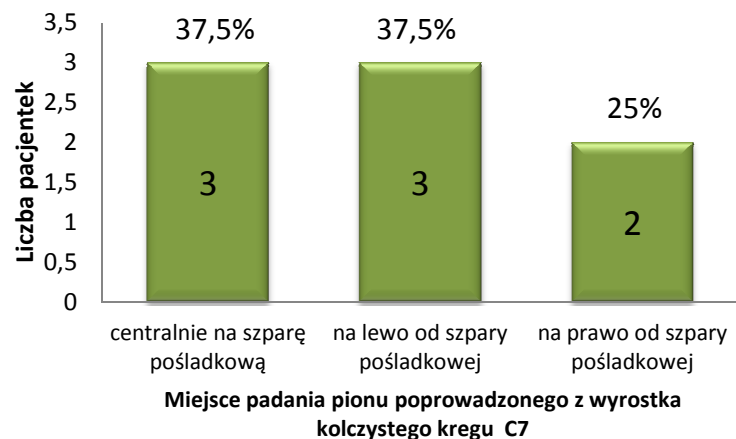
5.1.2.1. Wyniki pomiaru kompensacji tułowia za pomocą pionu

W grupie A pion spuszczonej z wyrostka kolczystego C7 padał centralnie na szparę pośladkową u 7 pacjentek, u 7 padał w stronę lewą (od 1 do 6 cm), a u 19 w stronę prawą (od 0,5 do 3 cm), rycina 5.1. Kierunek dekompensacji liniowej był zgodny z kierunkiem wypukłości głównego skrzywienia piersiowego u 19 pacjentek, a u 7 pion padał niezgodnie z kierunkiem głównego skrzywienia.



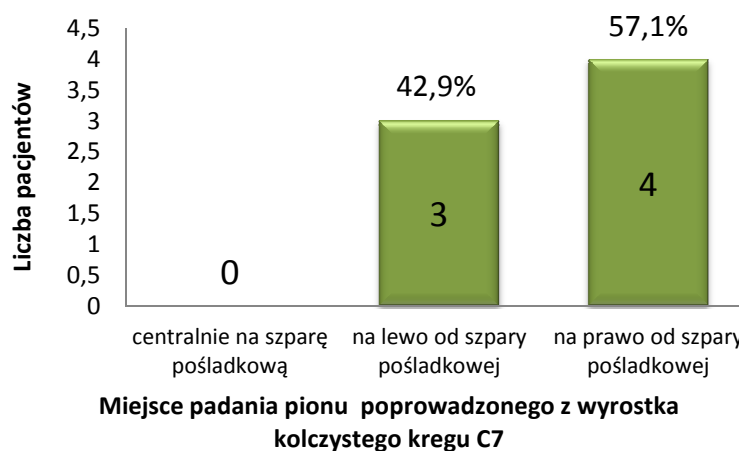
Rycina 5.1. Procentowy udział chorych w grupie A według miejsca padania pionu z wyrostka kolczystego kręgu C7 względem szpary pośladkowej

W grupie B pion spuszczonej z C7 padał centralnie na szparę pośladkową u 3 pacjentek, u 2 pacjentek padał w stronę prawą (od 1 do 5 cm), u 3 pacjentek padał w stronę lewą (od 1,5 do 3 cm). Kierunek dekompensacji liniowej był zgodny z kierunkiem wypukłości głównego skrzywienia piersiowego u 3 dziewczynek, a u 2 pion padał niezgodnie z kierunkiem głównego skrzywienia, rycina 5.2. U jednej pacjentki operowanej z powodu skoliozy w przebiegu przepukliny oponowo-rdzeniowej badanie pionem było niemożliwe.



Rycina 5.2. Procentowy udział chorych w grupie B według miejsca padania pionu z wyrostka kolczystego kręgu C7 względem szpary pośladkowej

W grupie C pion spuszczone z C7 padał u 4 pacjentów w stronę prawą od szpary pośladkowej (od 1 i do 3cm), u 3 pacjentów na stronę lewą (od 1 do 2,5cm), rycina 5.3. Kierunek dekompensacji liniowej był zgodny z kierunkiem wypukłości głównego skrzywienia piersiowego u 5 pacjentów, a u 2 pacjentów pion padał niezgodnie z kierunkiem głównego skrzywienia.



Rycina 5.3. Procentowy udział chorych w grupie C według miejsca padania pionu z wyrostka kolczystego kręgu C7 względem szpary pośladkowej

5.1.2.2. Wyniki pomiaru kąta rotacji tułowia z wykorzystaniem skoliometru Bunnella

Kąt rotacji tułowia pacjentek z typem I, II, III i IV według Lenkego mierzony skoliometrem Bunnella na szczycie głównego skrzywienia piersiowego w teście Adamsa, wynosił od 5° do 30° (średnia $17,9^{\circ} \pm 5,7^{\circ}$).

Kąt rotacji tułowia pacjentek z typem VI mierzony na szczycie skrzywienia lędźwiowego (który był głównym łukiem skoliozy) wynosił od 12° do 23° (średnia $17,0^{\circ} \pm 4,5^{\circ}$).

W trzech przypadkach u chorych z bardzo dużymi skoliozami (kąt Cobba odpowiednio 110° , 110° i 85°) zakres skoliometru (do 30 stopni) nie wystarczał do wykonania pomiaru z uwagi na bardzo dużą rotację tułowia (garb żebrowy). U tych chorych jako wynik pomiaru przyjęto kąt 30° .

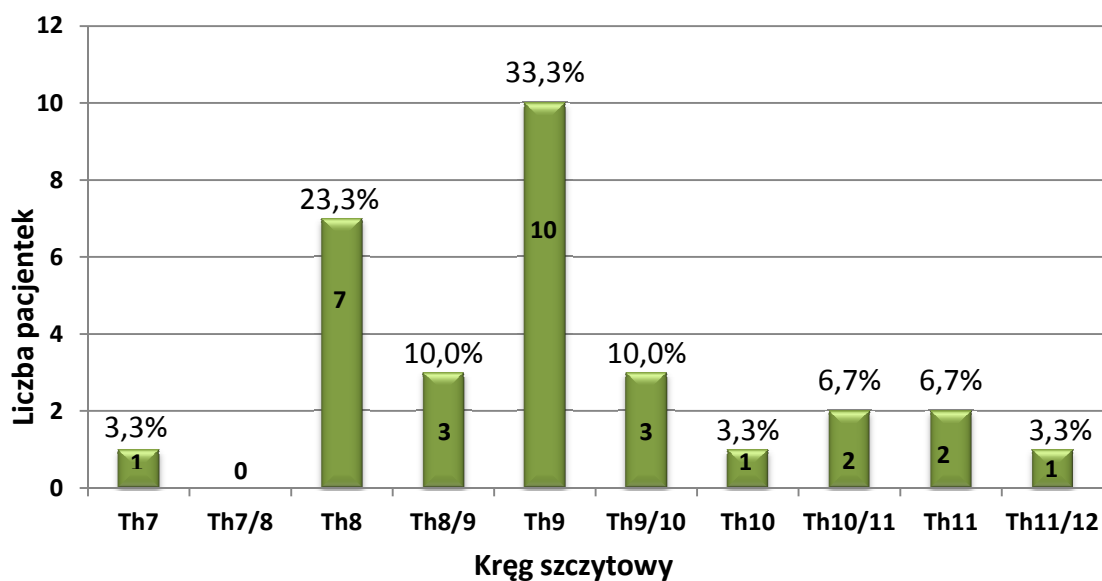
5.2. Badanie radiologiczne

5.2.1. Kąt Cobba

W grupie A kąt Cobba skrzywienia głównego wynosił od 50° do 114° (średnia $74,6^{\circ} \pm 17,9^{\circ}$) w tym:

- 1) 9 dziewczynek z wartością kąta według Cobba $\leq 60^{\circ}$,
- 2) 18 dziewczynek z wartością kąta 61° - 90° ,
- 3) 6 dziewczynek z wartościami kąta Cobba $> 90^{\circ}$.

Kręgosłupowy kąt głównego skrzywienia piersiowego w grupie 30 pacjentek z typem I, II, II lub IV według Lenke pokazuje rycina 5.4.



Rycina 5.4. Poziom kręgu szczytowego w grupie A. Znak / oznacza krążek międzykręgowy między danymi kręgami

Dla grupy 3 dziewcząt z typem VI skrzywienia według Lenkego kręgosłup szczytowy głównego skrzywienia znajdował się w części lędźwiowej kręgosłupa na poziomie:

- 1) kręgosłup L1 – jedna pacjentka,
- 2) krążek międzykręgowy L1/L2 – dwie pacjentki.

W grupie B kąt Cobba wynosił od 50° do 90° (średnia $69,9^{\circ} \pm 16,9^{\circ}$), w tym:

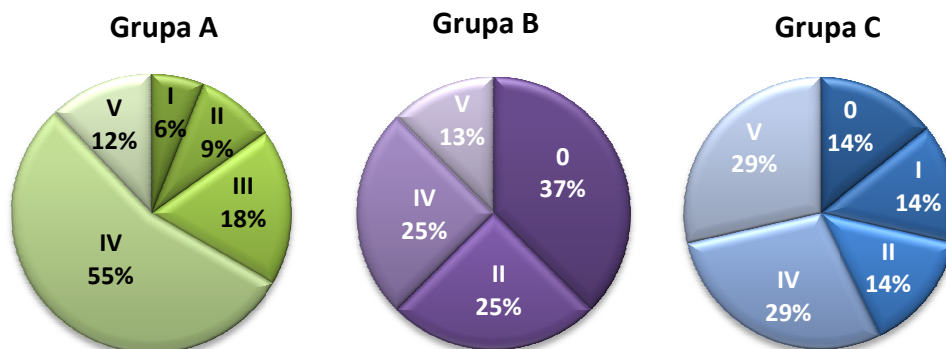
- 1) 4 dziewczynki o wartościach kąta według Cobba $\leq 60^{\circ}$,
- 2) 4 dziewczynki o wartościach kąta według Cobba $61^{\circ} - 90^{\circ}$.

W grupie C kąt Cobba wynosił od 60° do 90° (średnia $79,8^{\circ} \pm 16,2^{\circ}$), w tym:

- 1) 1 chłopiec o wartościach kąta według Cobba $\leq 60^{\circ}$,
- 2) 4 chłopców o wartościach kąta według Cobba $61^{\circ} - 90^{\circ}$,
- 3) 2 chłopców o wartościach kąta według Cobba $> 90^{\circ}$.

5.2.2. Test Rissera

Rozkład wartości testu Rissera w poszczególnych grupach przedstawia rycina 5.3.



Rycina 5.5. Procentowy rozkład wartości testu Rissera w grupie A, B i C

5.2.3. Współczynnik ryzyka progresji według Lonsteina i Carlsona

W grupie A współczynnik WRP wyliczony zgodnie ze wzorem podanym w podrozdziale 4.3 wyniósł od 1,9 do 8,5 (średnia $4,4 \pm 1,7$). Dla 4 pacjentek współczynnik był poniżej 2,5, co zdaniem Lonsteina i Carlsona należy interpretować jako ryzyko progresji skoliozy między 80% a 90%. Pozostałe chore ze współczynnikiem większym lub równym 2,5 obarczone były stuprocentowym ryzykiem progresji skrzywienia.

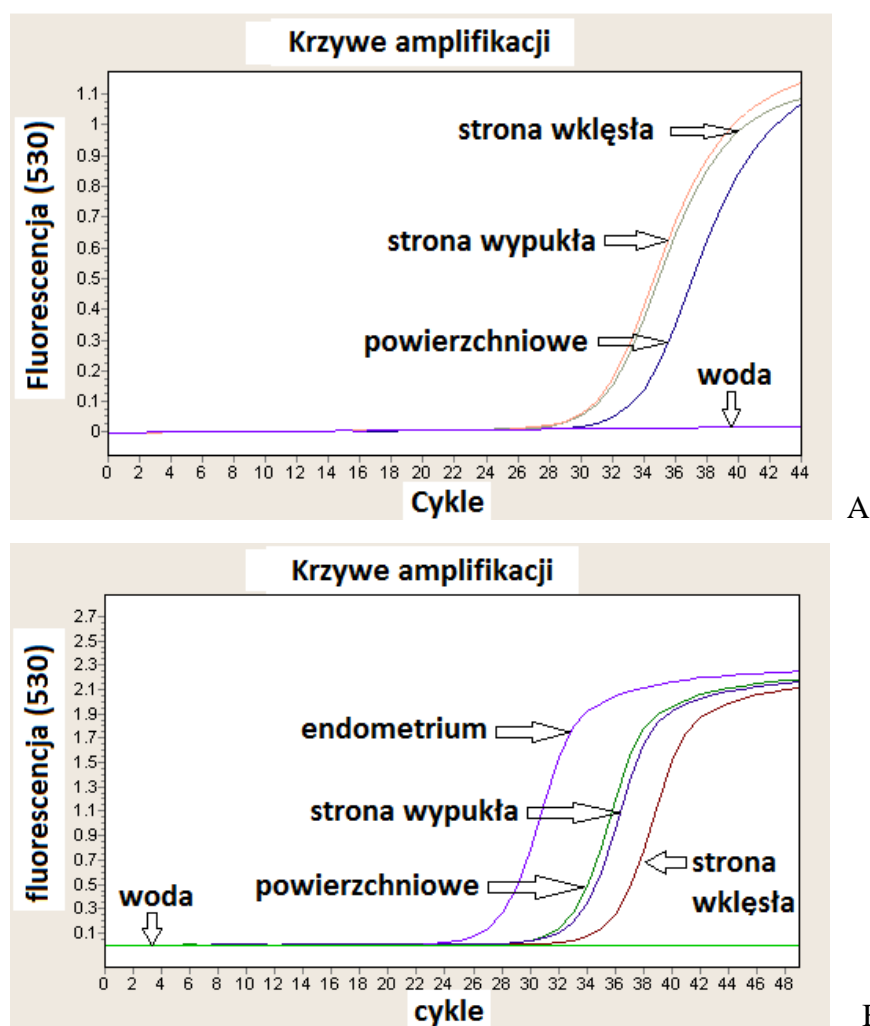
Dla grup B i C nie wyliczono współczynnika z powodu występowania innych rozpoznań niż skolioza idiopatyczna, dla której stosuje się powyższe obliczenia.

5.3. Badanie molekularne

5.3.1. Ocena ekspresji genu *ESR1* i *ESR2* w mięśniach grzbietu

*Stwierdzenie ekspresji genu *ESR1* i *ESR2* w mięśniach grzbietu*

Obecność produktu reakcji ilościowej PCR (qPCR) dla każdej próbki tkanki mięśniowej (mięśni głębokich po stronie wklęsłej i wypukłej skoliozy oraz mięśni powierzchniowych grzbietu) potwierdzono dla każdego pacjenta na podstawie analizy krzywych amplifikacji genów receptorów estrogenowych *ESR1* i *ESR2* (rycina 5.6. A i B).



Rycina 5.6. Przykładowe krzywe amplifikacji genu *ESR1* (A) i *ESR2* (B) dla pacjentki P.W.

Określenie poziomu ekspresji genu ESR1 i genu ESR2 dla wszystkich badanych (N=48)

Względny poziom ekspresji (w stosunku do poziomu ekspresji genu referencyjnego *HPRT*) genów receptora estrogenowego *ESR1* i *ESR2* u wszystkich pacjentów przedstawiono w tabeli 5.1.

Tabela 5.1. Względny poziom ekspresji genów *ESR1* oraz *ESR2* w mięśniach powierzchniowych i głębokich grzbietu (N=48)

grupa mięśni	minimum	maksimum	średnia	odch. stand.
<i>ESR1</i>				
powierzchniowe	$48,0 \times 10^{-7}$	$14,7 \times 10^{-4}$	$27,3 \times 10^{-5}$	$23,8 \times 10^{-5}$
głębokie po stronie wklęsłej	$97,0 \times 10^{-7}$	$11,5 \times 10^{-4}$	$40,6 \times 10^{-5}$	$27,8 \times 10^{-5}$
głębokie po stronie wypukłej	$82,0 \times 10^{-6}$	$30,0 \times 10^{-3}$	$48,8 \times 10^{-5}$	$53,5 \times 10^{-5}$
<i>ESR2</i>				
powierzchniowe	$10,0 \times 10^{-7}$	$70,0 \times 10^{-3}$	$18,34 \times 10^{-3}$	$19,06 \times 10^{-3}$
głębokie po stronie wklęsłej	$10,0 \times 10^{-7}$	$23,0 \times 10^{-2}$	$25,40 \times 10^{-3}$	$40,37 \times 10^{-3}$
głębokie po stronie wypukłej	$10,0 \times 10^{-7}$	$10,0 \times 10^{-2}$	$16,65 \times 10^{-3}$	$19,44 \times 10^{-3}$

oznaczenia: odch. stand. – odchylenie standardowe

Poziom ekspresji *ESR1* w badanych grupach mięśni różnił się w sposób istotny statystycznie ($p=0,006$, test Friedmana). Test wielokrotnych porównań wykazał, że poziom ekspresji *ESR1* w mięśniach powierzchniowych był znamienne niższy w stosunku do poziomu jego ekspresji w mięśniach głębokich grzbietu zarówno w stosunku do strony wklęsłej jak i do strony wypukłej ($p<0,05$). Poziom ekspresji *ESR1* w mięśniach głębokich grzbietu pomiędzy stroną wklęsłą a wypukłą nie różnił się w sposób istotny statystycznie ($p>0,05$).

Poziom ekspresji *ESR2* wyznaczony dla wszystkich badanych pacjentów nie wykazał znamienych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami mięśni ($p>0,05$, test Fiedmana).

Porównanie poziomu ekspresji genu *ESR1* i *ESR2* dla wszystkich badanych (N=48)

W celu uzyskania możliwości bezpośredniego porównania poziomu ekspresji w badanych tkankach genu receptora estrogenowego *ESR1*, który wyznaczono w reakcji qPCR z użyciem sond hydrolizujących TaqMan z poziomem ekspresji genu receptora *ESR2*, który wyznaczono w reakcji qPCR SYBRGreen, posłużono się wzorem delta/delta zaproponowanym przez Livaka i Schmittgena [70] (podrozdział 4.5).

Nie stwierdzono znamiennej statystycznie różnicy pomiędzy średnią poziomem ekspresji genu *ESR1* w stosunku do średniej poziomu ekspresji genu *ESR2* w mięśniach głębokich grzbietu ($2,43 \pm 3,53$ vs. $2,75 \pm 4,23$; $p=0,4$). Porównanie ekspresji *ESR1* w stosunku do *ESR2* w mięśniach głębokich po stronie wklęsłej jak i po stronie wypukłej również nie wykazała znamienych statystycznie różnic (tabela 5.2).

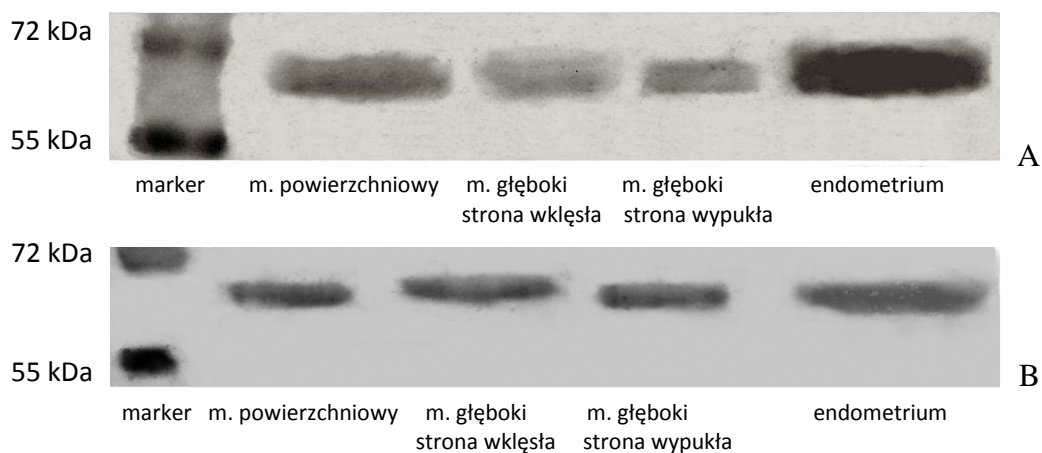
Tabela 5.2. Porównanie poziomu ekspresji genu receptora *ESR1* i genu receptora *ESR2* obliczonego przy pomocy wzoru delta/delta

	ESR 1	ESR 2	p
mięśnie głębokie	$2,80 \pm 4,08$	$2,75 \pm 4,23$	0,4
mięśnie głębokie po stronie wklęsłej	$1,73 \pm 1,0$	$2,62 \pm 4,01$	0,54
mięśnie głębokie po stronie wypukłej	$2,39 \pm 2,55$	$2,35 \pm 3,22$	0,12

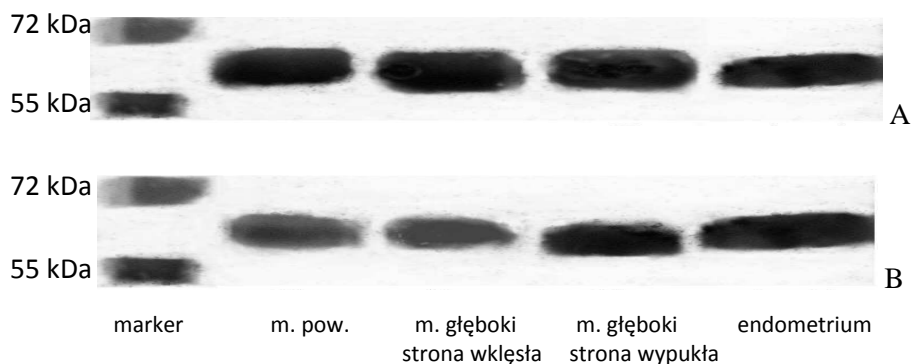
5.3.2. Identyfikacja białkowego produktu ekspresji genów *ESR1* i *ESR2*

Badanie techniką western blot

Badanie western blot wykonane dla 10 losowo wybranych pacjentek techniką western blot wykazało we wszystkich badanych próbkach tkanki mięśniowej obecność białkowych receptorów estrogenowych *ESR1* i *ESR2* o wielkości odpowiednio 66 i 67 kDa (rycina 5.7 i 5.8).



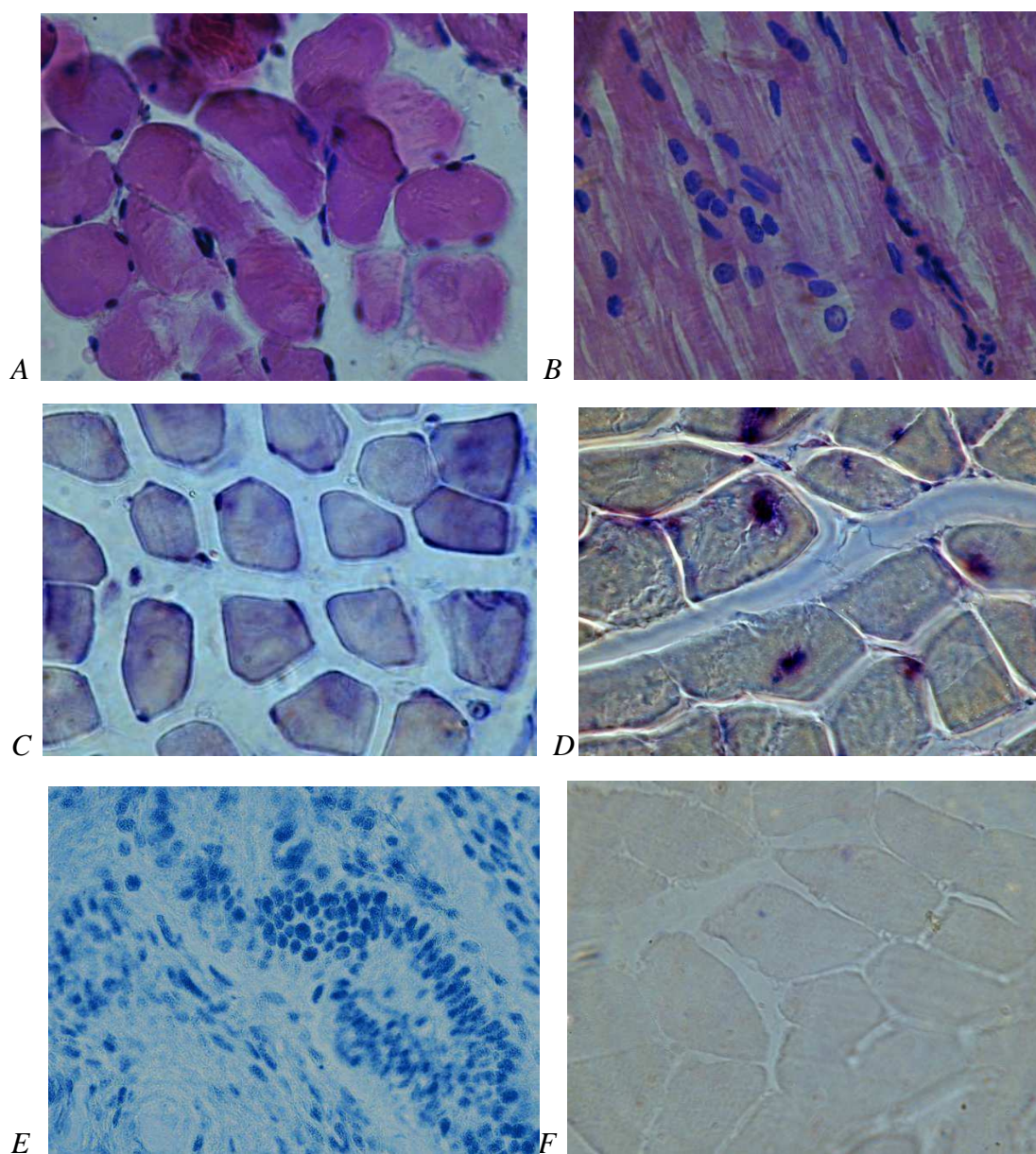
Rycina 5.7. Badanie techniką western blot dla dwóch pacjentek (A i B) potwierdzające obecność w badanej tkance mięśniowej białka ESR1 o masie 66 kDa. Po stronie prawej kontrola (endometrium).



Rycina 5.8. Badanie techniką western blot dla dwóch pacjentek (A i B) potwierdzające obecność w badanej tkance mięśniowej białka ESR2 o masie 67 kDa. Po prawej kontrola (endometrium).

Badanie immunohistochemiczne

Badanie immunohistochemiczne wykonane dla 10 losowo wybranych pacjentów wykazało obecność receptorów estrogenowych ESR1 i ESR2 w tkance mięśniowej (rycina 5.9.).



Rycina 5.9. Badanie immunohistochemiczne tkanki mięśniowej pacjentki D.O.

- A – barwienie hematoksyliną i eozyną, przekrój poprzeczny,
- B – barwienie hematoksyliną i eozyną, przekrój podłużny,
- C – obecność receptora ESR1 (fioletowe wybarwienie) w pobliżu błony komórkowej i jądrach włókien mięśniowych,
- D – obecność receptora ESR2 (fioletowe wybarwienie) w jądrach włókien mięśniowych,
- E – kontrola pozytywna dla ESR1 (tkanka endometrium),
- F – kontrola negatywna (tkanka mięśniowa).

5.3.3. Poziom ekspresji genu *ESR1* w poszczególnych grupach: A, B i C

Poziom ekspresji ESR1 w grupie A

Wartości średnie, minimum, maksimum oraz odchylenie standardowe względnego poziomu ekspresji genu receptora *ESR1* w mięśniach grzbietu pacjentek grupy A przedstawia tabela 5.3.

Tabela 5.3. Względny poziom ekspresji genu *ESR1* w grupie pacjentek A (N=33)

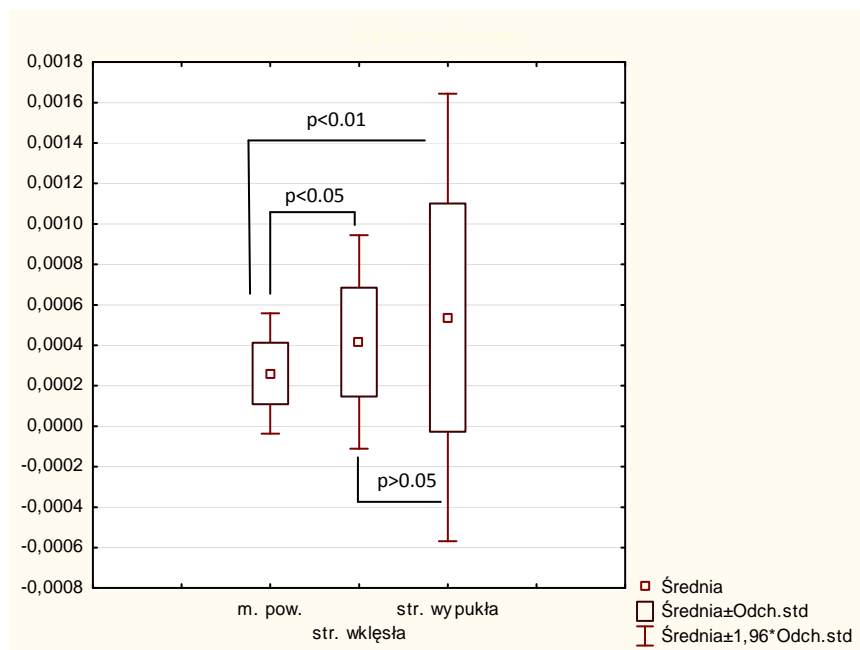
grupa mięśni	minimum	maksimum	średnia	odch. stand.
Powierzchniowe	$97,0 \times 10^{-6}$	$60,9 \times 10^{-5}$	$26,1 \times 10^{-5}$	$15,2 \times 10^{-5}$
głębokie po stronie wklęsłej	$11,5 \times 10^{-5}$	$11,5 \times 10^{-4}$	$41,6 \times 10^{-5}$	$26,9 \times 10^{-5}$
głębokie po stronie wypukłej	$82,0 \times 10^{-6}$	$30,0 \times 10^{-4}$	$53,7 \times 10^{-5}$	$56,4 \times 10^{-5}$

oznaczenia: odch. stand. – odchylenie standardowe

Poziom ekspresji genu *ESR1* w trzech badanych grupach mięśni różnił się w sposób istotny statystycznie ($p=0,002$, test Friedmana), rycina 5.10. Test wielokrotnych porównań wykazał, że poziom ekspresji *ESR1* w mięśniach powierzchniowych był znacznie niższy niż w mięśniach głębokich zarówno strony wklęsłej ($p<0,05$) jak i strony wypukłej ($p<0,01$).

Poziom ekspresji *ESR1* w mięśniach głębokich po stronie wypukłej był większy niż po stronie wklęsłej, jednak różnica nie była istotna statystycznie ($p>0,05$).

Stosunek (ratio) poziomu ekspresji genu *ESR1* mięśni strony wypukłej do mięśni strony wklęsłej u 18 dziewcząt był $r_{ESR1} > 1$ (większa ekspresja po stronie wypukłej), a u 15 dziewcząt był $r_{ESR1} < 1$ (większa ekspresja po stronie wklęsłej).



Rycina 5.10. Względny poziom ekspresji genu *ESR1* w badanych grupach mięśni u pacjentek z grupy A.

Poziom ekspresji *ESR1* w grupie B

Wartości średnie, minimum, maksimum oraz odchylenie standardowe względnego poziomu ekspresji genu receptora *ESR1* w mięśniach grzbietu pacjentek grupy B przedstawia tabela 5.4.

Tabela 5.4. Względny poziom ekspresji genu *ESR1* w grupie pacjentek B (N=8)

grupa mięśni	minimum	maksimum	średnia	odch. stand.
Powierzchniowe	$48,0 \times 10^{-6}$	$14,7 \times 10^{-4}$	$42,5 \times 10^{-5}$	$46,0 \times 10^{-5}$
głębokie po stronie wklęsłej	$97,0 \times 10^{-6}$	$85,7 \times 10^{-5}$	$34,7 \times 10^{-5}$	$28,5 \times 10^{-5}$
głębokie po stronie wypukłej	$11,4 \times 10^{-5}$	$56,0 \times 10^{-5}$	$28,0 \times 10^{-5}$	$18,9 \times 10^{-5}$

oznaczenia: odch. stand. – odchylenie standardowe

U pacjentek z grupy B nie stwierdzono znamienych statystycznie różnic pomiędzy poziomem ekspresji *ESR1* w badanych grupach mięśni ($p=0,9$).

Poziom ekspresji *ESR1* w grupie C (N=7)

Wartości średnie, minimum, maksimum oraz odchylenie standardowe względnego poziomu ekspresji genu receptora *ESR1* w mięśniach grzbietu pacjentów grupy C przedstawia tabela 5.5.

Tabela 5.5. Względny poziomy ekspresji genu *ESR1* w grupie pacjentów C (N=5)

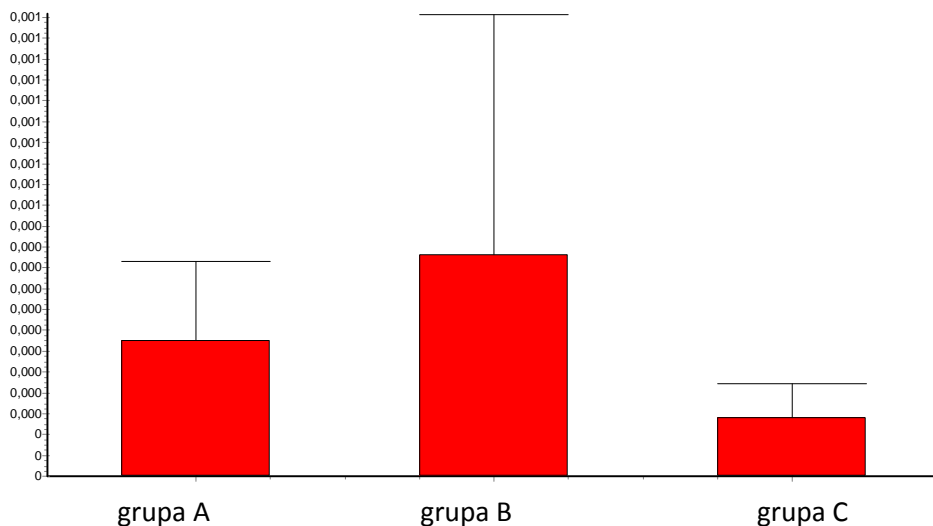
grupa mięśni	minimum	maksimum	Średnia	odch. stand.
Powierzchniowe	$58,0 \times 10^{-6}$	$19,8 \times 10^{-5}$	$11,2 \times 10^{-5}$	$66,0 \times 10^{-6}$
głębokie po stronie wklęsłej	$10,2 \times 10^{-5}$	$10,4 \times 10^{-4}$	$43,0 \times 10^{-5}$	$37,7 \times 10^{-5}$
głębokie po stronie wypukłej	$10,8 \times 10^{-5}$	$17,5 \times 10^{-4}$	$49,2 \times 10^{-5}$	$70,7 \times 10^{-5}$

Oznaczenia: odch. stand. – odchylenie standardowe

U pacjentów z grupy C nie stwierdzono znamienych statystycznie różnic pomiędzy poziomem ekspresji genu *ESR1* w badanych grupach mięśniowych ($p=0,7$).

Porównanie poziomu ekspresji *ESR1* pomiędzy grupami A, B i C

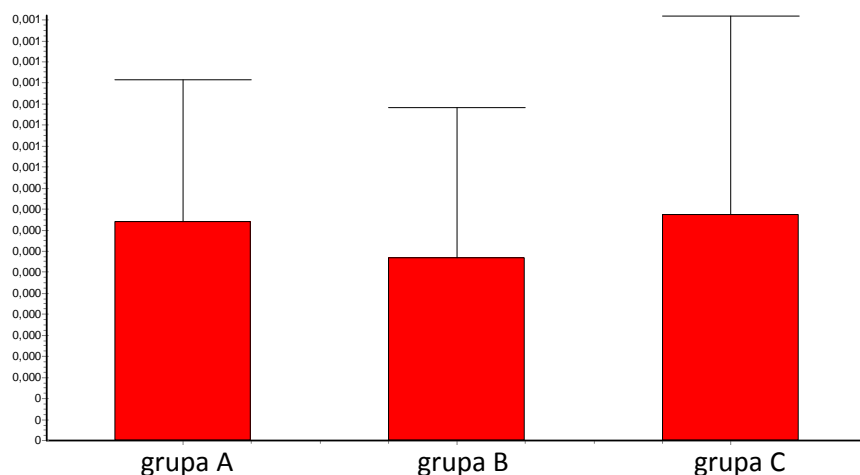
Względny poziom ekspresji *ESR1* w mięśniach powierzchniowych pomiędzy grupami A, B i C różnił się w sposób istotny statycznie ($p=0,049$; test Kruskala-Wallis) (Ryc. 5.11). Test wielokrotnych porównań wykazał, że poziom ekspresji *ESR1* u pacjentów grupy C (chłopców) był znamienne niższy niż u pacjentów grupy A i B (dziewcząt) ($p<0,05$). Różnice średnich poziomu ekspresji pomiędzy grupami A i B nie były istotne statystycznie ($p>0,05$).



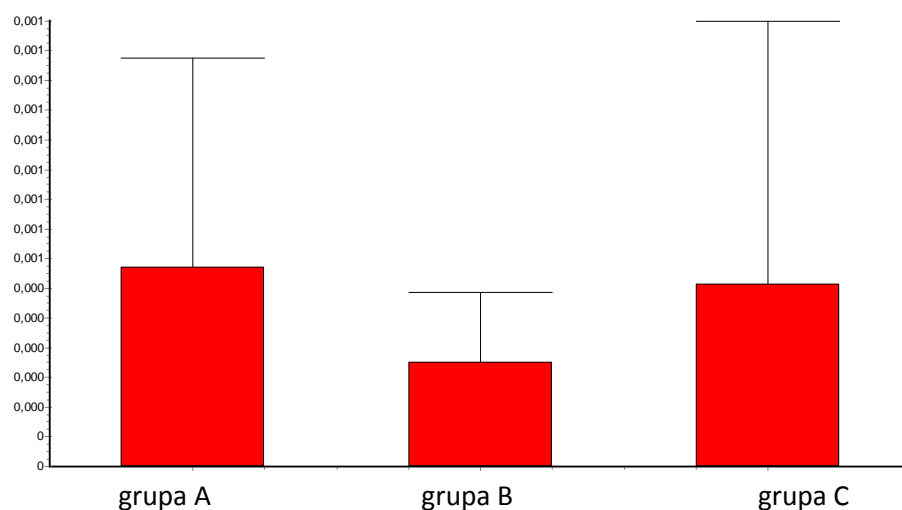
Rycina 5.11. Porównanie względnego poziomu ekspresji genu *ESRI* w mięśniach powierzchniowych pomiędzy pacjentami grupy A, B i C. Wynik dla grupy C znacząco niższy niż dla grup A i B.

Względny poziom ekspresji *ESRI* w mięśniach głębokich po stronie wklęsłej pomiędzy grupami A, B i C nie różnił się w sposób istotny statystycznie ($p=0,53$; test Kruskala-Wallisa) (rycina 5.12).

Podobnie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy poziomem ekspresji *ESRI* w mięśniach głębokich po stronie wypukłej pomiędzy grupami A, B i C ($p=0,12$; test Kruskala-Wallisa) (rycina 5.13).



Rycina 5.12. Porównanie względnego poziomu ekspresji genu *ESRI* w mięśniach głębokich po stronie wklęsłej pomiędzy pacjentami grupy A, B i C.



Rycina 5.13. Porównanie względnego poziomu ekspresji genu *ESR1* w mięśniach głębokich po stronie wypukłej pomiędzy pacjentami grupy A, B i C.

5.3.4. Poziom ekspresji genu *ESR2* w poszczególnych grupach: A, B i C

Poziom ekspresji genu ESR2 w grupie A

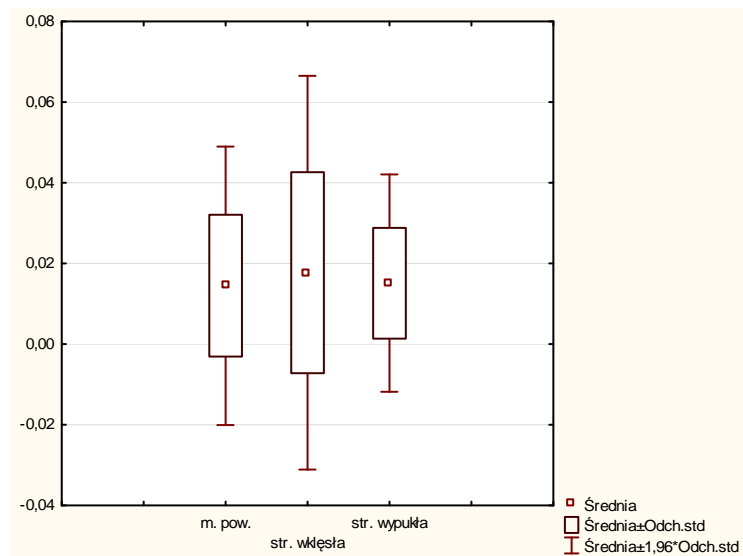
Wartości średnie, minimum, maksimum oraz odchylenie standardowe względnego poziomu ekspresji genu receptora *ESR2* w mięśniach grzbietu pacjentek grupy A przedstawia tabela 5.6.

Tabela 5.6. Względny poziom ekspresji genu *ESR2* u pacjentek w grupie A (N=33)

grupa mięśni	minimum	maksimum	średnia	odch. stand.
Powierzchniowe	$10,0 \times 10^{-7}$	$50,0 \times 10^{-3}$	$14,47 \times 10^{-3}$	$17,6 \times 10^{-3}$
głębokie po stronie wklęsłej	$10,0 \times 10^{-7}$	$14,0 \times 10^{-2}$	$17,7 \times 10^{-3}$	$24,91 \times 10^{-3}$
głębokie po stronie wypukłej	$10,0 \times 10^{-7}$	$50,0 \times 10^{-3}$	$15,1 \times 10^{-3}$	$13,75 \times 10^{-3}$

oznaczenia: odch. stand. – odchylenie standardowe

Analiza przeprowadzona dla pacjentek grupy A nie wykazała znamienych statystycznie różnic poziomu ekspresji genu *ESR2* pomiędzy badanymi grupami mięśni ($p = 0,4$), rycina 5.11.



Rycina 5.14. Poziom ekspresji genu *ESR2* w badanych grupach mięśni u pacjentek z grupy A. Brak różnic istotnych statystycznie.

Stosunek (ratio) poziomów ekspresji genu *ESR2* strony wypukłej do wklęsłej u 14 dziewcząt był $r_{ESR1} > 1$ (większa ekspresja po stronie wypukłej), a u 14 dziewcząt był $r_{ESR2} < 1$ (większa ekspresja po stronie wklęsłej). Znotowano 5 wyników równych 1, co oznacza brak asymetrii w poziomach ekspresji genu pomiędzy strona wklęsłą a wypukłą.

Poziom ekspresji genu ESR2 w grupie B

Wartości średnie, minimum, maksimum oraz odchylenie standardowe względnego poziomu ekspresji genu receptora *ESR2* w mięśniach grzbietu pacjentek grupy B przedstawia tabela 5.7.

Nie stwierdzono znamiennej statycznie różnic poziomu ekspresji genu *ESR2* pomiędzy badanymi grupami mięśni ($p=0,3$) wśród pacjentek grupy B.

Tabela 5.7. Względny poziom ekspresji genu *ESR2* pacjentek w grupie B (N=8)

grupa mięśni	minimum	maksimum	średnia	odch. stand.
powierzchniowe	$23,4 \times 10^{-4}$	$70,0 \times 10^{-3}$	$26,9 \times 10^{-3}$	$36,8 \times 10^{-3}$
głębokie po stronie wklęsłej	$39,7 \times 10^{-4}$	$23,0 \times 10^{-2}$	$43,02 \times 10^{-3}$	$76,72 \times 10^{-3}$
głębokie po stronie wypukłej	$39,6 \times 10^{-4}$	$10,0 \times 10^{-2}$	$34,04 \times 10^{-3}$	$19,4 \times 10^{-3}$

oznaczenia: odch. stand. – odchylenie standardowe

Poziom ekspresji genu ESR2 w grupie C

Wartości średnie, minimum, maksimum oraz odchylenie standardowe względnego poziomu ekspresji genu receptora *ESR2* w mięśniach grzbietu pacjentek grupy C przedstawia tabela 5.8.

Tabela 5.8. Względny poziom ekspresji genu *ESR2* u pacjentów grupy C (N=7)

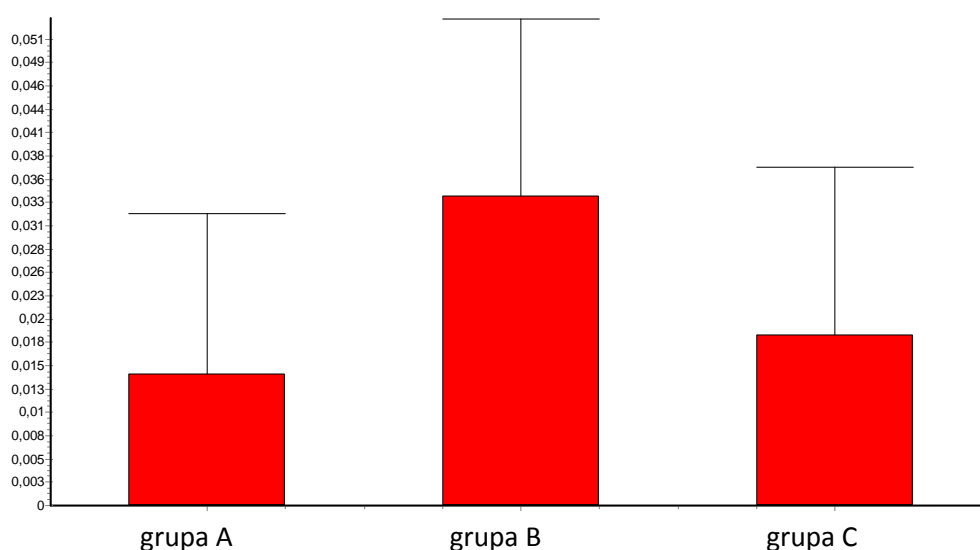
grupa mięśni	minimum	maksimum	średnia	odch. stand.
powierzchniowe	$42,7 \times 10^{-4}$	$50,0 \times 10^{-3}$	$18,81 \times 10^{-3}$	$18,34 \times 10^{-3}$
głębokie po stronie wklęsłej	$20,0 \times 10^{-3}$	$11,0 \times 10^{-2}$	$48,0 \times 10^{-3}$	$36,33 \times 10^{-3}$
głębokie po stronie wypukłej	$10,0 \times 10^{-7}$	$20,0 \times 10^{-3}$	$10,42 \times 10^{-3}$	$95,11 \times 10^{-4}$

oznaczenia: odch. stand. – odchylenie standardowe

U pacjentów z grupy C nie stwierdzono znamienych statystycznie różnic pomiędzy poziomem ekspresji genu *ESR2* w badanych grupach mięśniowych ($p=0,6$).

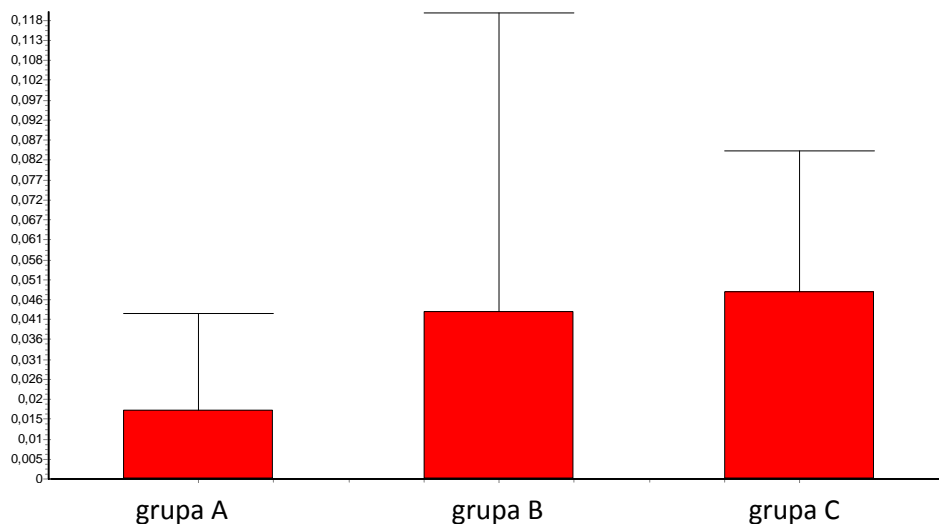
Porównanie poziomu ekspresji genu *ESR2* pomiędzy grupami A, B i C

Względny poziom ekspresji *ESR2* w mięśniach powierzchniowych pomiędzy grupami A, B i C różnił się w sposób istotny statystycznie ($p=0,027$; test Kruskala-Wallisa) (rycina. 5.15). Test wielokrotnych porównań wykazał, że poziom ekspresji *ESR2* u pacjentów grupy B był znacząco wyższy niż u pacjentów grupy A i C. Różnice średnich poziomu ekspresji pomiędzy grupami A i C nie były istotne statystycznie ($p>0,05$).



Rycina 5.15. Porównanie względnego poziomu ekspresji genu *ESR2* w mięśniach powierzchniowych pomiędzy pacjentami grupy A, B i C.

Względny poziom ekspresji *ESR2* w mięśniach głębokich po stronie wklęsłej pomiędzy grupami A, B i C różnił się w sposób istotny statycznie ($p=0,028$; test Kruskala-Wallisa). Test wielokrotnych porównań wykazał znacząco niższy poziom ekspresji *ESR2* w grupie A w stosunku do pozostałych grup ($p<0,05$) (rycina 5.16).



Rycina 5.16. Porównanie względnego poziomu ekspresji genu *ESR2* w mięśniach głębokich po stronie wklęsłej pomiędzy pacjentami grupy A, B i C.

Względny poziom ekspresji *ESR2* w mięśniach głębokich po stronie wypukłej pomiędzy grupami A, B i C nie różnił się w sposób istotny statycznie ($p=0,86$; test Kruskala-Wallis).

5.3.5. Porównanie poziomu ekspresji genów receptorów *ESR1* i *ESR2* w skoliozach idiopatycznych oraz innych deformacjach kręgosłupa

Dokonano porównania poziomu ekspresji genów receptora *ESR1* i *ESR2* pomiędzy grupą pacjentów ze skoliozą idiopatyczną ($N=40$: 33 pacjentki z grupy A, 1 pacjentka z grupy B oraz 6 pacjentów z grupy C), a grupą pacjentów z innymi niż skolioza idiopatyczna deformacjami kręgosłupa ($N=8$: 7 pacjentek z grupy B i 1 pacjent z grupy C).

Poziom ekspresji genu receptora estrogenowego ESR1

Średnie arytmetyczne i odchylenia standardowe poziomu ekspresji *ESR1* z rozdzieleniem na poszczególne grupy mięśniowe u pacjentów z rozpoznaniem SI oraz innymi deformacjami kręgosłupa prezentuje tabela 5.9.

Tabela 5.9. Poziom ekspresji *ESR1* w mięśniach grzbietu dla pacjentów ze skoliozą idiopatyczną (N=40) oraz pacjentów ze skoliozami nieidiopatycznymi (N=8)

	Pacjenci SI (N=40)	Pacjenci ze skoliozami nieidiopatycznymi (N=8)	P
mięśnie powierzchniowe	$24,1 \times 10^{-5} \pm 15,2 \times 10^{-5}$	$42,6 \times 10^{-5} \pm 46,0 \times 10^{-5}$	0,29
mięśnie głębokie po stronie wklęsłej	$42,8 \times 10^{-5} \pm 28,4 \times 10^{-5}$	$30,1 \times 10^{-5} \pm 24,0 \times 10^{-5}$	0,25
mięśnie głębokie po stronie wypukłej	$50,5 \times 10^{-5} \pm 54,3 \times 10^{-5}$	$42,9 \times 10^{-5} \pm 55,5 \times 10^{-5}$	0,25

wyniki przedstawiono jako średnia \pm odchylenie standardowe

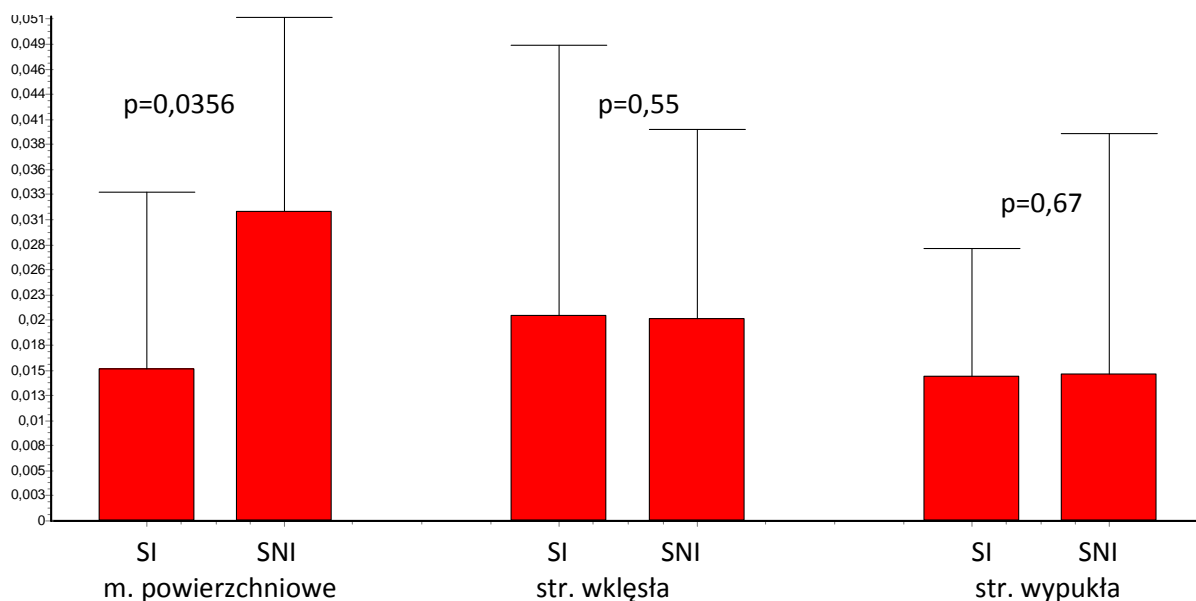
Poziom ekspresji genu receptora estrogenowego ESR2

Średnie i odchylenia standardowe poziomu ekspresji *ESR2* z rozdzieleniem na poszczególne grupy mięśniowe u pacjentów z rozpoznaniem SI oraz innymi deformacjami kręgosłupa prezentuje tabela 5.10. Istotna statystycznie różnica wystąpiła tylko dla grupy mięśni powierzchniowych, rycina 5.18.

Tabela 5.10. Poziom ekspresji *ESR2* w mięśniach grzbietu dla pacjentów ze skoliozą idiopatyczną oraz pacjentów ze skoliozami nieidiopatycznymi

	Pacjenci SI (N=40)	Pacjenci ze skoliozami nieidiopatycznymi (N=8)	P
mięśnie powierzchniowe	$15,6 \times 10^{-3} \pm 18,0 \times 10^{-3}$	$31,5 \times 10^{-3} \pm 19,8 \times 10^{-3}$	0,0356
mięśnie głębokie po stronie wklęsłej	$20,9 \times 10^{-3} \pm 27,7 \times 10^{-3}$	$23,59 \times 10^{-3} \pm 19,3 \times 10^{-3}$	0,55
mięśnie głębokie po stronie wypukłej	$14,7 \times 10^{-3} \pm 13,1 \times 10^{-3}$	$21,9 \times 10^{-3} \pm 29,8 \times 10^{-3}$	0,67

wyniki przedstawiono jako średnia \pm odchylenie standardowe.



Rycina 5.17. Porównanie względnego poziomu ekspresji *ESR2* w badanych grupach mięśniowych u pacjentów ze skoliozą idiopatyczną (SI) w stosunku do pacjentów ze skoliozami nieidiopatycznymi (SNI).

5.3.6. Porównanie poziomu ekspresji *ESR1* z danymi klinicznymi i radiologicznymi pacjentek z grupy A

5.3.6.1. Ocena poziomu ekspresji genu *ESR1* w zależności od czasu jaki upłynął pomiędzy wystąpieniem pierwszej miesiączki a operacją

Grupę A podzielono na trzy podgrupy:

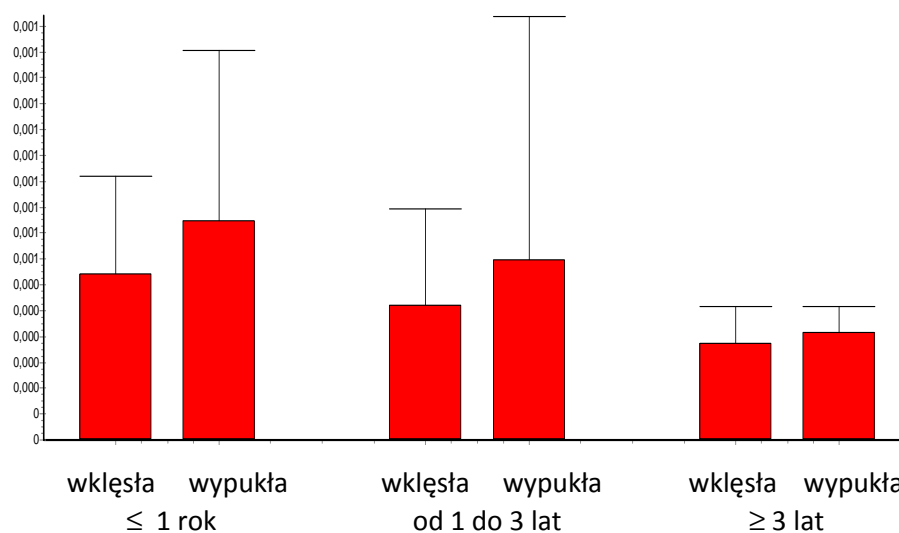
- 1) w pierwszej podgrupie (N=11) znalazły się pacjentki, u których w chwili operacji upłynął nie więcej niż rok od wystąpienia pierwszej miesiączki (N=10) oraz jedna pacjentka niemiesiączkująca,
- 2) w drugiej podgrupie (N=13) znalazły się pacjentki, u których w chwili operacji upłynęło więcej niż rok ale nie więcej niż trzy lata od wystąpienia pierwszej miesiączki,
- 3) w trzeciej podgrupie (N=9) znalazły się pacjentki, u których w chwili operacji upłynęło więcej niż trzy lata od wystąpienia pierwszej miesiączki,

Średnie poziomu ekspresji genu *ESRI* dla obu podgrup w trzech grupach mięśniowych przedstawia tabela 5.11., a w formie graficznej rycina 5.18.

Tabela 5.11. Średnie poziomu ekspresji genu *ESRI* w zależności od czasu, jaki upłynął pomiędzy pierwszą miesiączką a operacją

grupa mięśni	okres od pierwszej miesiączki do operacji			p
	≤ 12 m-cy	>12 m-cy ≤36 m-cy	>36 m-cy	
głębokie po stronie wklęsłej	$51,53 \times 10^{-5} \pm 29,9 \times 10^{-5}$	$41,5 \times 10^{-5} \pm 29,9 \times 10^{-5}$	$29,7 \times 10^{-5} \pm 11,6 \times 10^{-5}$	0.2
głębokie po stronie wypukłej	$67,9 \times 10^{-5} \pm 52,50 \times 10^{-5}$	$55,8 \times 10^{-5} \pm 75,1 \times 10^{-5}$	$33,3 \times 10^{-5} \pm 8,14 \times 10^{-5}$	0.2
P	0,07	0,5	0,4	

oznaczenia: odch. stand. – odchylenie standardowe



Rycina 5.18. Średnie i odchylenia standardowe poziomu ekspresji genu *ESRI* w badanych grupach mięśni u pacjentek z grupy A w zależności od czasu jaki upłynął od daty pierwszej miesiączki w chwili operacji.

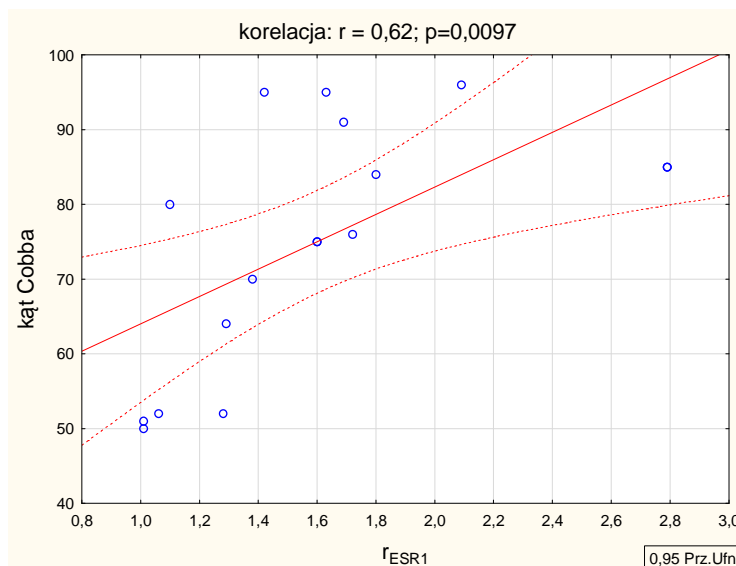
5.3.6.2. Ocena korelacji asymetrii ekspresji genu *ESR1* z kątem rotacji tułowia (KRT) mierzonym skoliometrem Bunnella na szczycie głównego skrzywienia

Nie stwierdzono istotnej statycznie korelacji pomiędzy wielkością asymetrii ekspresji genu *ESR1* (ratio $r_{ESR1} = ESR1_{wyp}/ESR1_{wkl}$) w mięśniach głębokich grzbietu a KRT ($p=0,264$).

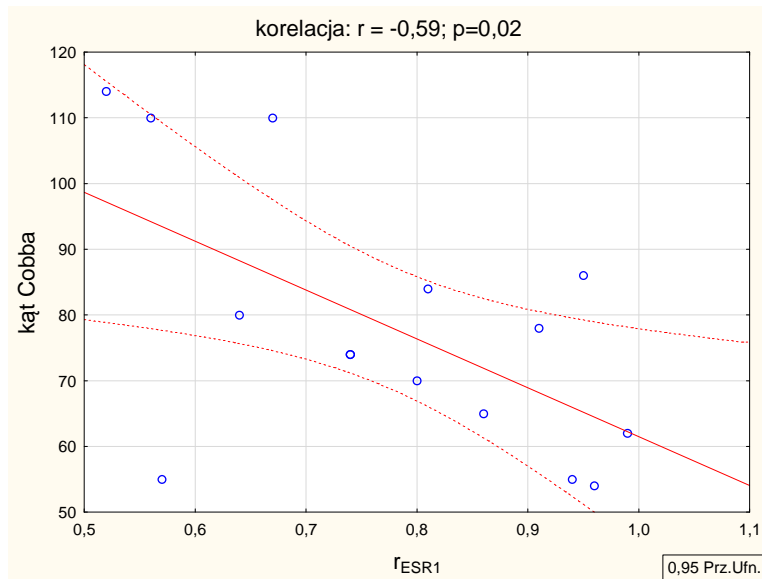
5.3.6.3. Ocena korelacji poziomu ekspresji genu *ESR1* z wartością kąta skoliozy według Cobba

Nie stwierdzono istotnej statycznie korelacji pomiędzy wartością kąta Cobba a poziomem ekspresji genu *ESR1* w mięśniach powierzchniowych ($p=0,1$), w mięśniach głębokich grzbietu po stronie wklęsłej ($p=0,5$), w mięśniach głębokich grzbietu po stronie wypukłej ($p=0,7$), ani wielkością asymetrii ekspresji ($p=0,6$).

Po dokonaniu podziału grupy A na dwie podgrupy w zależności od wartości ratio (r_{ESR1}) i wykonaniu ponownej analizy stwierdzono, że u pacjentów z wartością ratio (r_{ESR1}) ≥ 1 wystąpiła dodatnia korelacja liniowa $r=0,62$, $p=0,0097$ (rycina 5.19), a u pacjentów z wartością ratio < 1 wystąpiła silna ujemna korelacja liniowa $r = -0,59$, $p=0,0251$ (rycina 5.20).



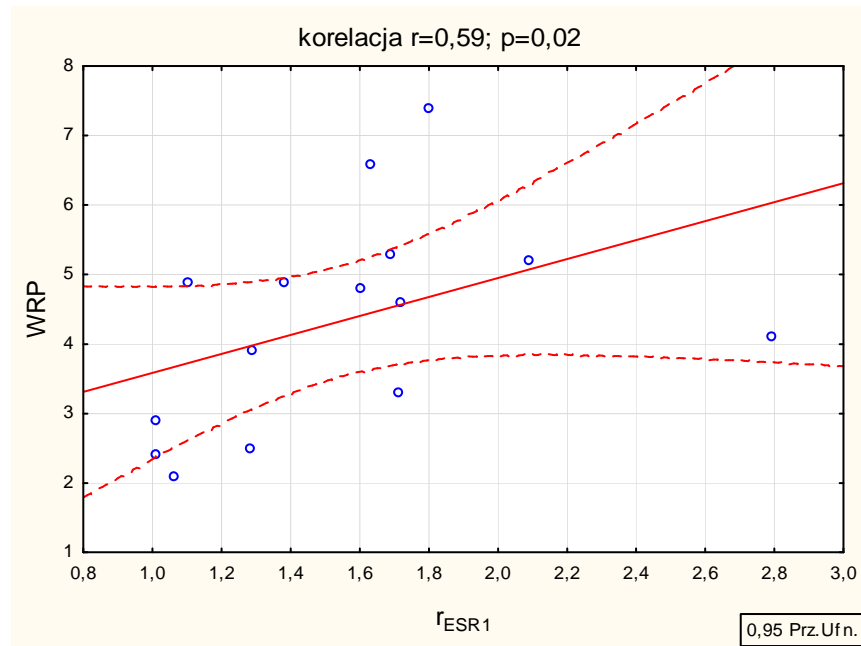
Rycina 5.19. Korelacja pomiędzy wskaźnikiem r_{ESR1} (ESR_{wyp}/ESR_{wkl}), a wartością kąta Cobba u pacjentek, u których $r_{ESR1} \geq 1$.



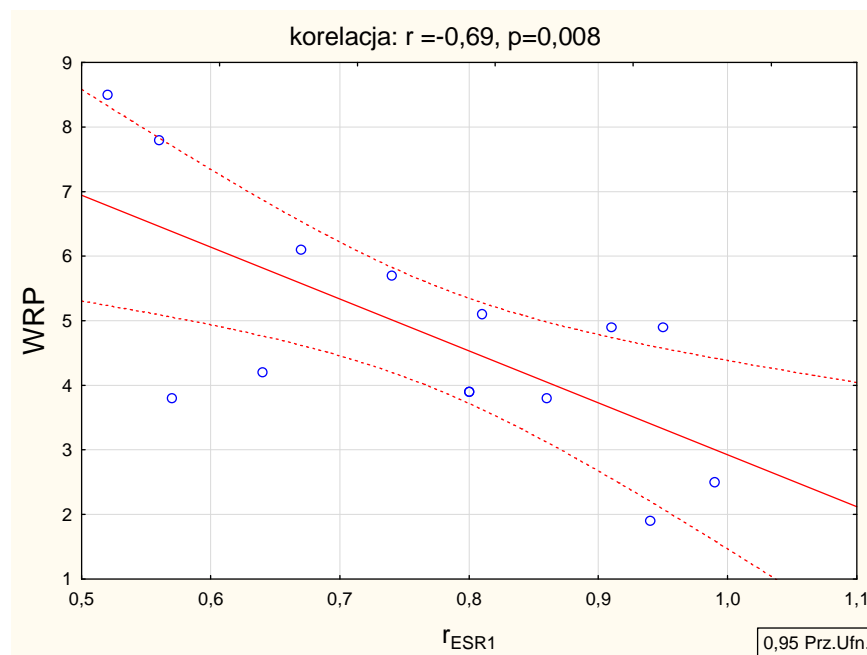
Rycina 5.20. Korelacja pomiędzy wskaźnikiem r_{ESR1} (ESR_{wyp}/ESR_{wkl}), a wartością kąta Cobba u pacjentek, u których $r_{ESR1} < 1$.

5.3.6.4. Ocena korelacji asymetrii ekspresji genu *ESR1* z wartością współczynnika ryzyka progresji (WRP)

- 1) Analiza korelacji pomiędzy wielkością asymetrii ekspresji genu *ESR1* mierzoną jako stosunek (ratio) poziomów ekspresji w mięśniach głębokich grzbietu po stronie wypukłej i wklęsłej a wartościami WRP nie wykazała istotności statystycznej ($p = 0,7397$) przy obliczeniu dla całej grupy A ($N = 33$).
- 2) Dla pacjentek z grupy A, u których ratio było ≥ 1 ($N = 15$) stwierdzono silną dodatnią korelację liniową ($r = 0,59$, $p = 0,02$), rycina 5.21.
- 3) Dla pacjentek z grupy A, u których ratio było < 1 ($N = 15$) stwierdzono silną ujemną korelację liniową ($r = -0,69$, $p = 0,008$), rycina 5.22.



Rycina 5.21. Korelacja pomiędzy wskaźnikiem r_{ESR1} (ESR_{wyp}/ESR_{wkl}), a wartością współczynnika ryzyka progresji (WRP) u pacjentek, u których $r_{ESR1} \geq 1$.



Rycina 5.22. Korelacja stosunku $ESR1_{wyp}/ESR1_{wkl}$ (r_{ESR1}) z współczynnikiem ryzyka progresji (WRP) u pacjentek, u których ratio < 1 .

5.3.7. Porównanie ekspresji *ESR2* z danymi klinicznymi i radiologicznymi pacjentek z grupy A (N=33)

5.3.7.1. Ocena poziomu ekspresji genu *ESR2* w zależności jaki upłynął pomiędzy wystąpieniem pierwszej miesiączki a operacją

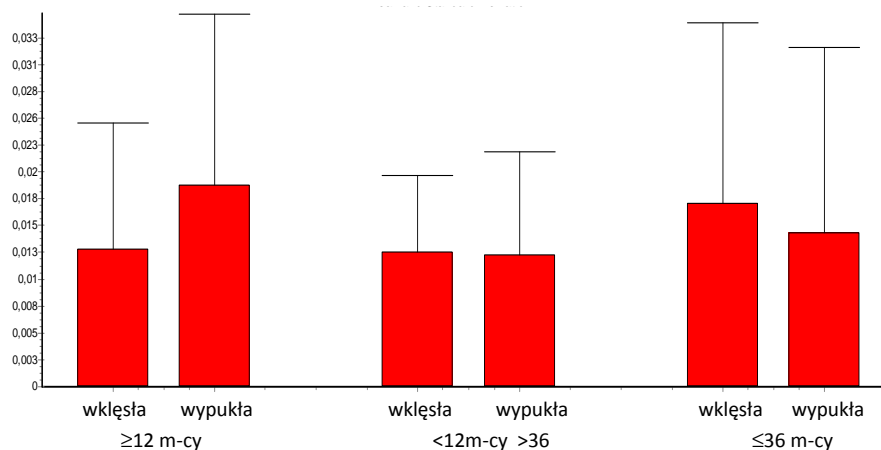
Średnie poziomu ekspresji genu *ESR2* dla podgrup pacjentek opisanych w podrozdziale 5.3.6.1 w trzech grupach mięśniowych przedstawia tabela 5.12.

Tabela.5.12. Średnie poziomu ekspresji genu *ESR2* w zależności od czasu jaki upłynął pomiędzy pierwszą miesiączką a operacją

grupa mięśni	okres od pierwszej miesiączki do operacji			p
	≤ 12 m-cy	>12 m-cy ≤36 m-cy	>36 m-cy	
głębokie po stronie wklęsłej	$13,1 \times 10^{-3} \pm 12,1 \times 10^{-3}$	$12,8 \times 10^{-3} \pm 7,2 \times 10^{-3}$	$17,4 \times 10^{-3} \pm 17,2 \times 10^{-3}$	0,9
głębokie po stronie wypukłej	$19,3 \times 10^{-3} \pm 15,3 \times 10^{-3}$	$12,5 \times 10^{-3} \pm 9,8 \times 10^{-3}$	$14,6 \times 10^{-3} \pm 17,6 \times 10^{-3}$	0,5
P	0,45	0,9	0,7	

oznaczenia: odch. stand. – odchylenie standardowe

Porównanie średnich poziomu ekspresji genu *ESR2* w obu podgrupach nie wykazało istotnej statystycznie różnicy rycina 5.23.



Rycina 5.23. Średnie i odchylenia standardowe poziomu ekspresji genu *ESR2* w badanych grupach mięśni u pacjentek z grupy A w zależności od czasu jaki upłynął od daty pierwszej miesiączki w chwili operacji.

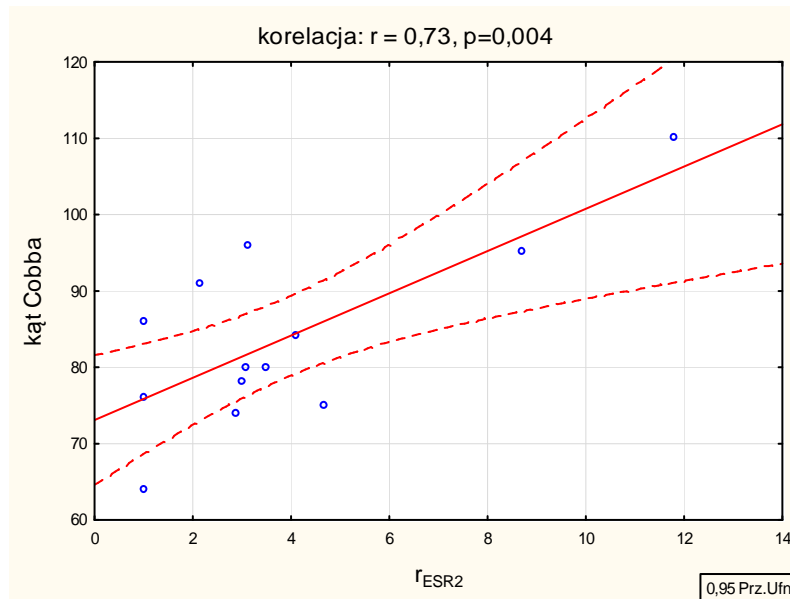
5.3.7.2. Ocena korelacji poziomu ekspresji genu *ESR2* z kątem rotacji tułowia (KRT) mierzonym skoliometrem Bunnella na szczycie głównego skrzywienia

Analiza korelacji pomiędzy wielkością asymetrii ekspresji genu receptora *ESR2* (ratio $r_{ESR2} = ESR2_{wyp}/ESR2_{wkl}$) w mięśniach głębokich grzbietu a KRT nie wykazała istotności statystycznej ($p = 0,37$).

5.3.7.3 Ocena korelacji poziomu ekspresji genu *ESR2* z wartością kąta według Cobba

Nie stwierdzono istotnej statystycznie korelacji pomiędzy wartością kąta Cobba a poziomem ekspresji genu *ESR2* w mięśniach powierzchniowych ($p = 0,11$), w mięśniach głębokich grzbietu po stronie wklęsłej ($p = 0,86$), w mięśniach głębokich grzbietu po stronie wypukłej ($p=0,22$), ani wielkością asymetrii ekspresji ($p=0,28$).

Po dokonaniu podziału grupy A na dwie podgrupy w zależności od wartości ratio (r_{ESR2}) i wykonaniu ponownej analizy stwierdzono, że u pacjentów z wartością ratio (r_{ESR2}) ≥ 1 wystąpiła silna dodatnia korelacja liniowa $r=0,73$, $p=0,004$ (rycina 5.24) a u pacjentów z wartością ratio < 1 nie wystąpiła korelacja liniowa $r = -0,36$, $p=0,27$.



Rycina 5.24. Korelacja pomiędzy wskaźnikiem r_{ESR2} (ESR_{wyp}/ESR_{wkl}), a wartością kąta Cobba u pacjentek u których $r_{ESR1} \geq 1$.

5.3.7.4. Ocena korelacji poziomu ekspresji genu *ESR2* z wartością współczynnika ryzyka progresji (WRP)

- 1) Analiza korelacji pomiędzy wielkością asymetrii ekspresji genu *ESR2* mierzoną jako stosunek (ratio) poziomów ekspresji w mięśniach głębokich grzbietu po stronie wklęsłej i wypukłej a wartościami WRP nie wykazała istotności statystycznej ($p=0,2$),
- 2) Dla pacjentek z grupy A, u których ratio było ≥ 1 ($N = 20$) stwierdzono znamiennej statystycznie dodatnią korelację liniową $r=0,47$ ($p=0,041$),
- 3) Dla pacjentek z grupy A, u których ratio było < 1 ($N = 13$) nie stwierdzono znamiennej statystycznie korelacji liniowej $r=-0,48$ ($p=0,11$).

6. DYSKUSJA

W prezentowanej pracy przy pomocy techniki odwrotnej transkrypcji i łańcuchowej reakcji polimerazy DNA z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym, techniki western blot i techniki immunohistochemicznej zidentyfikowano receptory estrogenowe ESR1 i ESR2 w komórkach mięśniowych mięśni grzbietu u dzieci ze skoliozą idiopatyczną, skoliozą wodzoną oraz deformacjami kręgosłupa w przebiegu: karłowatości wykrzywiającej, zakotwiczenia rdzenia, dysplazji kręgosłupowo-nasadowej i dysplazji kostnej twarzowo-sercowo-czaszkowej. Według danych uzyskanych z bazy PubMed jest to pierwsze badanie wykazujące obecność obu typów receptorów estrogenowych zarówno na poziomie matrycowego RNA jak i na poziomie białkowym w mięśniach grzbietu pacjentów ze skoliozą idiopatyczną. Dotychczas opublikowane badania, wykazujące obecność receptorów estrogenowych w tkance mięśniowej mięśni szkieletowych, przeprowadzone były na małych grupach badawczych. Lemoine i wsp. [67] stwierdzili u 7 badanych obecność mRNA receptorów ESR1 w mięśniu piersiowym większym, mięśniu naramiennym oraz mięśniówce macicy. Wiik i wsp. [120] zbadali tkankę mięśniową pobraną w czasie biopsji z mięśnia obszernego bocznego od 6 dorosłych osób. Przy pomocy techniki qPCR zidentyfikowali mRNA receptorów ESR1 i ESR2, a przy pomocy techniki immunohistochemicznej wykryli białko receptora estrogenowego ESR2. Ten sam zespół w kolejnym badaniu obejmującym 12 osób zidentyfikował białko receptora estrogenowego ESR1 w mięśniu obszernym bocznym [118].

Niniejsze badanie zostało przeprowadzone na zdecydowanie większej próbie, bowiem jej liczebność wynosiła 48 pacjentów, w tym 41 dziewcząt i 7 chłopców. Większa liczebność badanej próby dała większe możliwości przeprowadzenia analizy statystycznej pod kątem oceny ilościowej i jakościowej ekspresji receptorów oraz powiązania ich z parametrami klinicznymi i radiologicznymi opisującymi skoliozę idiopatyczną. Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że jest to największe pod względem liczebności próby badanie dotyczące obecności receptorów estrogenowych w tkance mięśniowej mięśni szkieletowych. Ponadto po raz pierwszy opisano receptory ESR1 i ESR2 w mięśniach powierzchniowych i głębokich grzbietu. Kolejnym novum jest użycie techniki western blot, która w powyżej przytoczonych badaniach nie była stosowana.

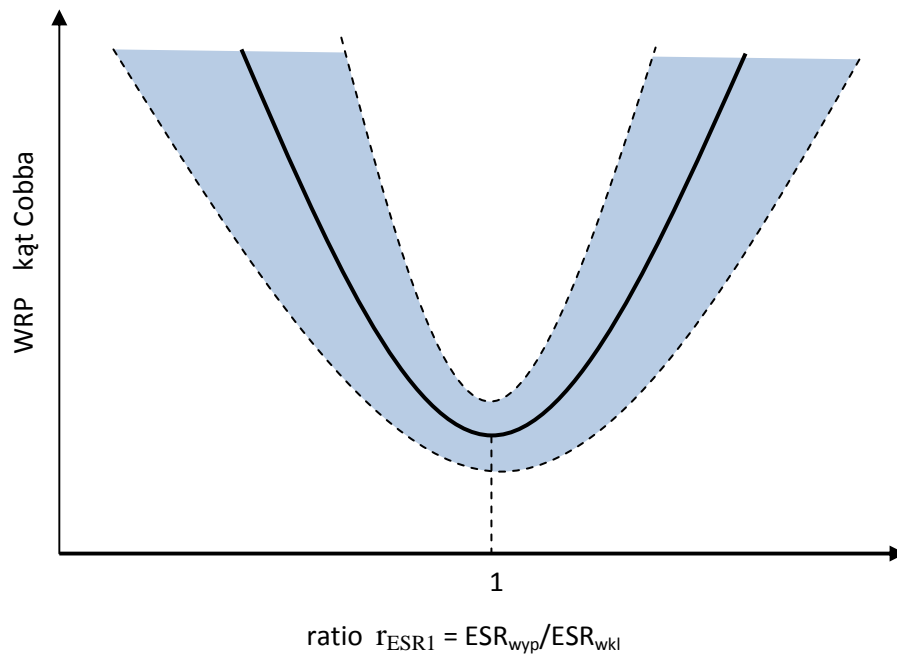
Z wyjściowej liczby 62 pacjentów, u których pobierano po trzy fragmenty tkankowe, do ostatecznych analiz wykorzystano dane uzyskane z badań molekularnych jedynie dla 48 pacjentów. U pozostałych 14 stwierdzono bardzo niskie poziomy genu referencyjnego *HPRT*, co wskazuje na degradację mRNA w badanej tkance mięśniowej i w konsekwencji skutkuje brakiem możliwości oceny ekspresji receptorów ESR1 i ESR2 w technice qPCR. Należy podkreślić, że fakt niewykrycia receptorów estrogenowych nie jest równoznaczny z ich rzeczywistym brakiem, bowiem mRNA może ulec degradacji w procesie utrwalania i przechowywania materiału tkankowego. Ponadto podczas pobierania próbek z mięśni grzbietu obserwowano, że po stronie wklęsłej skrzywienia w strukturze tkanki mięśniowej występowało więcej elementów włóknistych, co mogło być przyczyną trudności w izolacji całkowitego RNA. Zaobserwowane makroskopowo zmiany w strukturze tkanki mięśniowej po stronie wklęsłej skrzywienia stanowiły potwierdzenie zmian opisywanych w skoliozie idiopatycznej w badaniach histologicznych [79, 81] oraz w obrazie jądrowego rezonansu magnetycznego [128].

Badanie techniką odwrotnej transkrypcji i qPCR umożliwiło ilościowe oznaczenie poziomu ekspresji receptorów estrogenowych. W grupie pacjentek leczonych operacyjnie z powodu skoliozy idiopatycznej (grupa A, N=33) badanie wykazało istotnie mniejszy poziom ekspresji receptora estrogenowego ESR1 w mięśniach powierzchniowych niż w mięśniach głębokich grzbietu zarówno po stronie wklęsłej jak i wypukłej skrzywienia kręgosłupa. W odniesieniu do receptora estrogenowego ESR2 takiej różnicy nie stwierdzono. Zaobserwowana różnica w poziomie ekspresji receptora ESR1 między mięśniami powierzchniowymi a głębokimi może wynikać z ich różnej budowy histologicznej, bowiem w mięśniach głębokich przeważają włókna wolnokurczliwe tlenowe, natomiast w mięśniach powierzchniowych – włókna szybkokurczliwe [81, 60]. Natomiast brak różnicy w odniesieniu do receptora ESR2 może wynikać z jego mniejszej aktywności transkrypcyjnej niż receptora ESR1 [25]. W publikacji z 2003 roku Wiik i wsp. podali, że w badanym mięśniu obszernym bocznym poziom ekspresji receptora ESR1 w stosunku do ESR2 był 180 razy większy [120]. W odróżnieniu od tych autorów, w niniejszym badaniu w analizowanych grupach mięśni grzbietu nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy w poziomie ekspresji receptora estrogenowego ESR1 w stosunku do ESR2.

Jednym z celów badania była analiza symetrii ekspresji receptorów estrogenowych w mięśniach głębokich (właściwych) grzbietu, leżących po obu stronach okolicy szczytowej skoliozy idiopatycznej. W grupie pacjentek ze skoliozą idiopatyczną stwier-

dzono asymetrię ekspresji obu typów receptorów estrogenowych u poszczególnych pacjentów, przy czym asymetria ta nie miała charakteru jednokierunkowego. U 18 pacjentów poziom ekspresji ESR1 był wyższy po stronie wypukłej, a u 15 po stronie wklęsłej. W odniesieniu do receptora ESR2 poziom ekspresji u 15 pacjentów był wyższy po stronie wypukłej, u 13 po wklęsłej, a u 5 był symetryczny. Należy uznać, że poziom ekspresji analizowanych receptorów nie wykazuje stałego wzoru asymetrii, która mogłaby być związana z zaobserwowanymi asymetrami mięśni głębokich grzbietu wykazanymi na podstawie badań mikroskopowych [79, 81] oraz elektrofizjologicznych [4, 18, 19]. Należy dodać, że zaznaczyła się tendencja (bez statystycznej istotności) do wyższego poziomu ekspresji receptorów estrogenowych po stronie wypukłej w porównaniu do strony wklęsłej u młodszych pacjentek, to znaczy takich, które były operowane wkrótce po pierwszej miesiączce (w ciągu 12 miesięcy). Można przypuszczać, że mechaniczne przeciążenie mięśni strony wypukłej, które stanowią w pewnym stopniu mechanizm hamujący postęp skrzywienia kręgosłupa, jest większe w okresie aktywnej progresji skoliozy idiopatycznej, w porównaniu z sytuacją późniejszą, gdy występuje już stabilizacja skrzywienia. Dlatego logicznym wydaje się, że aktywność mięśni głębokich grzbietu jest bardziej asymetryczna u dziewcząt młodszych niż u starszych. W niniejszej pracy nie było możliwości prześledzenia tych zjawisk ze względu na wiek, w jakim wykonywano leczenie operacyjne skoliozy. U większości chorych nie był to wiek czynnej progresji, ale wiek po zakończonym okresie rośnięcia szkieletu, co wynikało z przyczyn organizacyjnych w postaci opóźnionego przyjmowania chorych ze skoliozą idiopatyczną na leczenie operacyjne.

Analiza zależności między wskaźnikiem ryzyka progresji (WRP) Lonsteina i Carlsona a asymetrią poziomu ekspresji receptora ESR1 wykazała, że wraz ze wzrostem wartości WRP wzrasta asymetria między poziomem ekspresji receptora po stronie wypukłej a poziomem po stronie wklęsłej. Stwierdzona, istotna statystycznie silna korelacja między wartościami WRP i wskaźnika ratio (r_{ESR1}) układa się w charakterystyczny sposób, zilustrowany na rycinie 6.1. Najmniejsze wartości WRP występują dla wskaźnika ratio=1, co odpowiada symetrycznej ekspresji receptorów. W miarę oddalania się wartości ratio od 1 (w miarę nasilania się asymetrii ekspresji receptorów) wzrasta wartość WRP. Analogiczną zależność uzyskano dla kąta Cobba.



Rycina 6.1. Ilustracja zależności wykrytych pomiędzy asymetrią poziomów ekspresji receptora ESR1 a współczynnikiem ryzyka progresji Lonsteina i Carlsona. Minimum wartości współczynnika WRP występuje dla symetrycznej ekspresji receptora (ratio=1). Analogiczną zależność uzyskano dla kąta Cobba.

O tym, że zaobserwowana asymetria ekspresji receptora ESR1 może być efektem różnicy w obciążeniach mechanicznych, którym poddawane są mięśnie znajdujące się po dwóch stronach skrzywienia kręgosłupa, świadczą badania nad zmianami sygnalizacji biochemicznej komórki pod wpływem sił mechanicznych [38, 54], które mogą polegać na efekcie tak zwanej mechanotransdukcji. Zjawisko to może zachodzić w komórkach mięśniowych i polega na zamianie energii mechanicznej na sygnały chemiczne, które mogą powodować modyfikację ekspresji niektórych genów, w tym genu *ESR1*. Doniesień na ten temat występowania zjawiska mechanotransdukcji w mięśniach grzbietu w kontekście deformacji kręgosłupa nie znaleziono, co zachęca do podejmowania dalszych badań. Dotychczasowy stan wiedzy nie pozwala na jednoznaczne stwierdzenie czy opisane zmiany mają charakter pierwotny czy wtórny w stosunku do rozwijającej się deformacji rosnącego kręgosłupa.

W grupie dziewcząt, u których w chwili operacji upłynęło więcej niż trzy lata od wystąpienia pierwszej miesiączki, stwierdzono niższy poziom ekspresji receptorów ESR1 w mięśniach powierzchniowych i głębokich grzbietu, w porównaniu z grupą pacjentek, u których nie upłynął rok od wystąpienia pierwszej miesiączki, przy czym róż-

nica dla mięśni powierzchniowych grzbietu osiągnęła wymagany poziom statystycznej istotności ($p=0,03$). Zaobserwowana i omówiona powyżej tendencja polegająca na wyższym poziomie ekspresji genu *ESR1* po stronie wypukłej niż wklęsłej w grupie dziewcząt młodszych (mniej niż 1 rok po pierwszej miesiączce) zanikała w grupie dziewcząt starszych (≥ 3 lata po pierwszej miesiączce) i nie jest jasne, czy opisane różnice poziomu ekspresji receptora *ESR1* zależą od wieku czy też powiązane są z progresującym skrzywieniem kręgosłupa. W świetle sprzecznych doniesień na temat zawartości estrogenów w surowicy dziewcząt z młodzieńczą skoliozą idiopatyczną [98, 64], zmiany w poziomie ekspresji receptorów estrogenowych w mięśniach grzbietu mogłyby tłumaczyć przyspieszenie progresji skoliozy w okresie pokwitaniowym.

Nie stwierdzono korelacji między wielkością kąta rotacji tułowia mierzonego skoliometrem Bunnella a wielkością asymetrii ekspresji receptorów estrogenowych, mimo że taka korelacja wystąpiła dla kąta Cobba i współczynnika WRP. Wiadomo, że na wczesnych etapach rozwoju skoliozy idiopatycznej wzrasta wartość kąta Cobba towarzyszy równoległy wzrost wartości kąta rotacji tułowia [63]. Natomiast przy dużych wartościach kąta Cobba (powyżej ok. 60°) nie obserwuje się już dalszego, równoległego wzrastania wartości kąta rotacji tułowia, bowiem nasila się zjawisko torsji kręgosłupa i torsji klatki piersiowej, które ma charakter procesu skierowanego w stronę przeciwną do wyjściowego kierunku rotacji osiowej kręgów i żeber [62]. W badanej grupie większość pacjentek charakteryzowała się wysokimi wartościami kąta Cobba (powyżej 70°), co może wyjaśniać brak wystąpienia korelacji dla KRT przy istnieniu korelacji dla kąta Cobba.

W dostępnym piśmiennictwie znaleziono dwa badania o podobnej konstrukcji metodologicznej jak badanie przeprowadzone dla potrzeb niniejszej pracy. Przedmiotem tych badań była asymetria ekspresji takich czynników jak kalmodulina, melatonina i receptory melatoninowe w mięśniach głębokich grzbietu pacjentów ze skoliozą idiopatyczną. Acaroglu i wsp. [1] w grupie 20 pacjentów (18 dziewcząt i 2 chłopców) stwierdzili istotnie statystycznie większy poziom kalmoduliny w mięśniach przykręgosłupowych po stronie wypukłej skoliozy w porównaniu z poziomem po stronie wklęsłej. Jednocześnie nie potwierdzili podobnej asymetrii dla melatoniny. Wcześniejsze doświadczenia na modelu zwierzęcym wskazywały na związek niedoboru melatoniny z rozwojem i progresją skoliozy [74]. Jednakże badania u chorych na skoliozę idiopatyczną nie wykazały obniżonych poziomów melatoniny w surowicy [10] i mięśniach grzbietu [1]. O ile poziom melatoniny w mięśniach po obu stronach skrzywienia nie wykazywał

asymetrii [1], badania nad receptorami melatoninowymi przyniosły zgoła odmienne wyniki. Qiu i wsp. [96] stwierdzili u 20 pacjentów (17 dziewcząt i 3 chłopców) ze skoliozą idiopatyczną wyższy poziom ekspresji receptora melatoninowego typu drugiego (MT2) w głębokich mięśniach grzbietu po stronie wklęsłej w porównaniu ze stroną wypukłą. W niniejszej pracy wykazano korelację wartości kąta Cobba oraz współczynnika WRP ze stopniem asymetrii ekspresji receptora estrogenowego ESR1. Nie udowodniono istotnej statystycznie jednostronnej przewagi ekspresji receptora po stronie wklęsłej bądź wypukłej. Brak zgodności wyników badań Qiu i wsp. nad asymetrią receptora melatoninowego MT2 i badań własnych nad asymetrią receptorów estrogenowych ESR1 i ESR2 może świadczyć o różnej odpowiedzi komórek mięśni głębokich grzbietu na obciążenia mechaniczne pojawiające się w skoliozie idiopatycznej. Można też przypuszczać, że podczas gdy w osteoblastach obserwuje się krzyżowanie dróg sygnałowych melatoniny i estrogenów [68], to w komórkach mięśniowych występują prawdopodobnie inne, bardziej złożone oddziaływania. Warto nadmienić, że w niniejszej pracy rozszerzono zakres badań w porównaniu do badań Qiu i wsp. oraz Acaroglu i wsp. poprzez włączenie grupy powierzchniowych mięśni grzbietu oraz przez użycie trzech niezależnych technik molekularnych identyfikujących receptory estrogenowe.

Interesującym zagadnieniem, leżącym jednak poza zasadniczym tematem niniejszej pracy, jest polimorfizm genów receptorów estrogenowych ESR1 i ESR2. Dotychczas zidentyfikowano jednonukleotydowe zmiany sekwencji (SNP) w obrębie genów kodujących receptory ESR1 i ESR2. Stwierdzono, że niektóre SNP (XbaI, ØK) genów *ESR1* i *ESR2* mogą być związane z podwyższonym ryzykiem zachorowania na skoliozę idiopatyczną [33, 123, 126]. Zdaniem autorów tych doniesień opisane polimorfizmy mogłyby skutkować zmianą struktury i właściwości niektórych receptorów estrogenowych i mieć udział w patogenezie skoliozy idiopatycznej.

W badaniu immunohistochemicznym zaobserwowano ekspresję receptora estrogenowego ESR1 nie tylko w jądrze komórki, lecz również w błonie komórkowej. Może to wskazywać na obecność zakotwiczonych w błonie komórkowej klasycznych receptorów jądrowych. Taka lokalizacja receptorów w komórkach mięśniowych mięśni szkieletowych sugeruje możliwość działania estrogenów na drodze mechanizmu niegenowego. Ponadto wskazuje się na możliwe istnienie rodzaju receptora estrogenowego związanego z błonowym białkiem G, określanego niekiedy jako tak zwany trzeci receptor estrogenowy (GPR30) [88]. Miałby on również uczestniczyć w niegenomowym sposobie oddziaływania estrogenów na komórki, którego przykładem jest wspomniana wcze-

śniej interakcja estrogenów i melatoniny. Wydaje się, że ocena poziomu ekspresji receptora GPR30 mogłaby stanowić cenne uzupełnienie przeprowadzonych badań własnych.

Przeprowadzone badania immunohistochemiczne mogą być przyczynkiem do rozważania roli receptorów estrogenowych znajdujących się w mięśniach głębokich grzbietu poza samymi włóknami mięśniowymi, to znaczy w śródbłonku naczyń włosowatych mięśni. W jądrach komórkowych komórek endotelialnych kapilar znajdują się receptory ESR1, i jak wykazały badania Wiik i wsp., mogą one stanowić 25% wszystkich pozytywnie wybarwionych jąder komórkowych badanej tkanki mięśniowej [118]. Sieć naczyń włosowatych tkanki mięśniowej jest dobrze rozbudowana, szczególnie w mięśniach intensywnie pracujących [75, 43]. Lokalizacja receptorów estrogenowych w komórkach endotelialnych jest istotna, gdyż komórki te są źródłem między innymi czynnika wzrostu śródbłonka naczyń (VEGF). Rezultatem działania tego czynnika jest wzrost ukrwienia mięśnia, a co za tym idzie wzrost jego siły [43]. Gen kodujący VEGF zawiera w swoim regionie miejsce, do którego przyłączają się receptory ESR1 i ESR2, a dodatkowo wzrostowi poziomu ekspresji genów *ESR1* i *ESR2* w tkance mięśniowej poddanej obciążeniu mechanicznemu towarzyszy wzrost poziomu ekspresji genu VEGF [121]. Można zatem przypuszczać, że receptory estrogenowe stymulują w mechanizmie genomowym powstawanie VEGF w komórkach śródbłonka naczyń tkanki mięśniowej, a co za tym idzie, stymulują wzrost siły mięśniowej. W świetle powyższych zależności identyfikacja receptorów estrogenowych w komórkach mięśni głębokich grzbietu pacjentek chorych na skoliozę idiopatyczną może przybliżyć do zrozumienia złożonych mechanizmów tworzenia się i progresji skoliozy.

7. WNIOSKI

1. Za pomocą trzech niezależnych technik: (a) reakcji odwrotnej transkrypcji i łańcuchowej polimerazy DNA z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym, (b) western blot i (c) immunohistochemicznej potwierdzono obecność receptorów estrogenowych ESR1 i ESR2 w mięśniach głębokich i powierzchniowych grzbietu u chorych ze skoliozą idiopatyczną. Przeprowadzone badania umożliwiły ilościowe określenie poziomu ekspresji receptorów estrogenowych ESR1 i ESR2 w badanych tkankach.
2. W mięśniach głębokich występuje większy poziom ekspresji receptora estrogenowego ESR1 niż w mięśniach powierzchniowych. Podobnej zależności nie stwierdzono dla receptora estrogenowego ESR2.
3. W badanych mięśniach nie występuje różnica w poziomie ekspresji pomiędzy receptorem ESR1 i ESR2.
4. W mięśniach głębokich grzbietu występuje asymetria ekspresji receptorów estrogenowych ESR1 i ESR2 . U części pacjentek ekspresja receptorów estrogenowych była większa po stronie wklęsłej skoliozy, a u części po stronie wypukłej. Wprowadzenie współczynnika ratio (r_{ESR1} i r_{ESR2}) umożliwiło ilościowe określenie stopnia asymetrii.
5. Występuje istotna statystycznie zależność pomiędzy stopniem asymetrii poziomu ekspresji receptorów estrogenowych ESR1 i ESR2 a wartością kąta Cobba i współczynnikiem ryzyka progresji. Oba te parametry przyjmowały najmniejszą wartość w przypadku symetrii ekspresji receptorów estrogenowych a wzrastały w miarę zwiększania się asymetrii.

8. PIŚMIENICTWO

1. Acaroglu E, Akel I, Alanay A et al.: Comparison of the melatonin and calmodulin in paravertebral muscle and platelets of patients with or without adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 2009; 34: 659-63.
2. Andersen MO, Thomsen K, Kyvik KO et al.: Adolescent Idiopathic Scoliosis in Twins. A Population-Based Survey. *Spine* 2007; 32: 927-930.
3. Arsic N, Zacchigna S, Zentilin L et al.: Vascular endothelial growth factor stimulates skeletal muscle regeneration *in vivo*. *Mol Ther* 2004; 10: 844-854.
4. Avikainen VJ, Rezasoltani, A Kauhanen HA et al.: Asymmetry of paraspinal EMG-time characteristics in idiopathic scoliosis. *J Spinal Disord* 1999; 12: 61-7.
5. Azeddine B, Letellier K, Wang da Set al.: Molecular determinants of melatonin signaling dysfunction in adolescent idiopathic scoliosis. *Clin Orthop Relat Res* 2007; 462: 45-52.
6. Barros RP, Gabbi C, Morani A et al.: Participation of ERalpha and ERbeta in glucose homeostasis in skeletal muscle and white adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 297: 124-33.
7. Barros RP, Morani A, Moriscot A et al.: Insulin resistance of pregnancy involves estrogen-induced repression of muscle GLUT4. *Mol Cell Endocrinol* 2008; 295: 24-31.
8. Bochenek A, Reicher M. (red.): *Anatomia człowieka*. PZWL, Warszawa 1997.
9. Boudreau M, Courtenay SC, MacLachy DL et al.: Utility of morphological abnormalities during early-life development of the estuarine mummichog, *Fundulus heteroclitus*, as an indicator of estrogenic and antiestrogenic endocrine disruption. *Environ Toxicol Chem* 2004; 23: 415-425.
10. Brodner W, Krepler P, Nicolakis M et al. Melatonin and adolescent idiopathic scoliosis. *J Bone Joint Surg Br* 2000; 82: 399-403.
11. Brown M, Ferreira JA, Foley AM et al.: A rehabilitation exercise program to remediate skeletal muscle atrophy in an estrogen-deficient organism may be ineffective. *Eur J Appl Physiol* 2012; 112: 91-104.
12. Burwell RG: Aetiology of idiopathic scoliosis: current concepts. *Pediatr Rehabil* 2003; 6: 137-70.
13. Carr AJ: Adolescent idiopathic scoliosis in identical twins. *J. Bone Joint Surg. Br.* 1990; 72: 1077.

14. Carreau S, Bourguiba S, Lambard S et al.: Reproductive system: aromatase and estrogens. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 193: 137-143.
15. Cemeroglu AP, Barkan AL, Kletter GB et al.: Changes In serum immunoreactive and bioactive growth hormone concentrations in boys with advancing puberty and response to a 20-hour estradiol infusion. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 2166-71.
16. Chan V, Fong GC, Luk K.D et al.: A Genetic Locus for Adolescent Idiopathic Scoliosis Linked to Chromosome 19p13.3. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 401–406.
17. Cheng JC, Guo X, Sher AH et al.: Correlation between curve severity, somatosensory evoked potentials, and magnetic resonance imaging in idiopathic scoliosis. *Spine* 1999; 24: 1679–84.
18. Cheung J, Halbertsma JP, Veldhuizen AG et al.: A preliminary study on electromyographic analysis of the paraspinal musculature in idiopathic scoliosis. *Eur Spine J* 2005; 14: 130–7.
19. Cheung J, Veldhuizen AG, Halberts JP et al.: Geometric and electromyographic assessments in the evaluation of curve progression in idiopathic scoliosis. *Spine* 2006; 31: 322-9.
20. Cheung KM, Wang T, Poon AM et al.: The effect of pinealectomy on scoliosis development in young nonhuman primates. *Spine* 2005; 30: 2009-13.
21. Chow J, Tobias JH, Colston KW et al.: Estrogen maintains trabecular bone volume in rats not only by suppression of bone resorption but also by stimulation of bone formation. *J Clin Invest* 1992; 89: 74–78.
22. Chu WC, Lam WW, Chan YL et al.: Relative shortening and functional tethering of spinal cord in adolescent idiopathic scoliosis? Study with multiplanar reformat magnetic resonance imaging and somatosensory evoked potential. *Spine* 2006; 31: 19–25.
23. Cobb JR: Outline for the study of scoliosis. In *Instructional Course Lectures*. AAOS 1948; 5: 261-75.
24. Cowell HR, Hall JN, MacEwen GD et al.: Genetic aspects of idiopathic scoliosis: Nicholas Andry Award essay, 1970. *Clin Orthop* 1972; 86: 121–31.
25. Cowley SM, Hoare S, Mosselman S et al.: Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA. *J Biol Chem* 272:19858–19862.
26. DeSmet AA: *Radiology of spinal curvatures*. Mosby 1985; p 45.

27. Dębska S, Potemski P: Budowa I funkcja receptorów hormonalnych oraz mechanizm ich współdziałania z receptorami dla czynników wzrostu. *Współcz Onkol* 2010; 14: 347-354.
28. Dickson RA, Lawton JO, Archer IA et al.: The pathogenesis of idiopathic scoliosis. Biplanar spinal asymmetry. *J Bone Joint Surg* 1984; 66: 8–15.
29. Drop SL, De Waal WJ, De Muinck Keizer-Schrama SM et al.: Sex steroid treatment of constitutionally tall stature. *Endocr Rev* 1998; 19: 540–558.
30. Dubouset J.: Premier examen d'un enfant scoliotic. [w:] Duparc J., (red.) *Ortho- pediatrie 1*. Paris: Expansion Scientifique Francaise 1991:1-11.
31. Enmark E, Gustafsson JA: Oestrogen receptors-an overview. *J Intern Med* 1999; 246: 133-138.
32. Enmark E, Pelto-Huikko M , Grandien K et al.: Human estrogen receptor betagene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 4258-65.
33. Esposito T, Ucello R, Caliendo R et al. Estrogen receptor polymorphism, estrogen content and idiopathic scoliosis in human: A possible genetic linkage. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009; 116: 56–60.
34. Fox EM, Andrade J, Shupnik MA.: Novel actions of estrogen to promote proliferation: integration of cytoplasmic and nuclear pathways. *Steroids* 2009; 74: 622-627.
35. Gao X, Gordon D, Zhang D et al.: CHD7 gene polymorphisms are associated with susceptibility to idiopathic scoliosis. *Am J Hum Genet* 2007; 80: 957–65.
36. Głowacki M, Kotwicki T, Pucher A et al.: Skrzywienie kręgosłupa. [w:] Wiktor Degi *Ortopedia i Rehabilitacja*, Marciniak W, Szulc A (red.). PZWL Warszawa 2003.
37. Gohel A, McCartt MB, Gronowicz G: Estrogen prevents glucocorticoid-induced apoptosis in osteoblasts in vivo and in vitro. *Endocrinology* 1999; 140: 5339–5347.
38. Goldmann WH. Mechanical aspects of cell shape regulation and signaling. *Cell Biol Int* 2002; 26(4):313-7.
39. Grivas TB, Vasiliadis E, Mouzakis V et al.: Association between adolescent idiopathic scoliosis prevalence and age at menarche in different geographic latitudes. *Scoliosis* 2006; 1: 9.

40. Guo X, Chau WW, Chan YL et al.: Relative anterior spinal overgrowth in adolescent idiopathic scoliosis. Results of disproportionate endochondral-membranous bone growth. *J Bone Joint Surg Br* 2003; 85: 1026-31.
41. Guo X, Chau WW, Hui-Chan C et al.: Balance control in adolescents with idiopathic scoliosis and disturbed somatosensory function. *Spine* 2006; 31: 437–40.
42. Gurnett CA, Alae F, Bowcock A et al.: Genetic Linkage Localizes an Adolescent Idiopathic Scoliosis and Pectus Excavatum Gene to Chromosome 18 q. *Spine* 2009; 34: 94–100.
43. Gustafsson T, Kraus WE: Exercise-induced angiogenesis-related growth and transcription factors in skeletal muscle, and their modification in muscle pathology. *Front Biosci* 2001; 6: 75-89.
44. Hadley MN: Spine update: genetics of familial idiopathic scoliosis. *Spine* 2000; 25: 2416–18.
45. Hawes MC, O'Brien JO: The transformation of spinal curvature into spinal deformity: pathological processes and implications for treatment. *Scoliosis* 2006; 1: 3.
46. Helguero LA, Faulds MH, Gustafsson JA et al.: Estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) differentially regulate proliferation and apoptosis of the normal murine mammary epithelial cell line HC11. *Oncogene*. 2005; 24: 6605-16.
47. Hughes DE, Dai A, Tiffie JC et al.: Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat Med* 1996; 2: 1132–1136.
48. Hyde JS, Delamater JD: *Understanding Human Sexuality*. McGraw-Hill Humanities/Social Sciences/Language 2010.
49. Hyder SM, Nawaz Z, Chiapetta C et al.: Identification of functional estrogen response elements in the gene coding for the potent angiogenic factor vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 2000; 60: 3183-3190.
50. Improta-Brears T, Whorton AR, Codazzi F et al.: Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase requires mobilization of intracellular calcium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 4686–4691.
51. Inoue M, Minami S, Nakata Y et al.: Prediction of curve progression in idiopathic scoliosis from gene polymorphic analysis. *Stud Health Technol Inform* 2002; 91: 90–96.

52. Ishii H, Shoda Y, Yomogida K et al.: Identification of C-terminally and N-terminally truncated estrogen receptor α variants in the mouse. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011; 124: 38-46.
53. Justice CM, Miller NH, Marosy B et al.: Familial Idiopathic Scoliosis Evidence of an X-Linked Susceptibility Locus. *Spine* 2003; 28: 589–594.
54. Kaazempur Mofrad MR, Abdul-Rahim NA, Karcher H et al.: Exploring the molecular basis for mechanosensation, signal transduction, and cytoskeletal remodeling. *Acta Biomater* 2005; 1: 281-93.
55. Kalita K, Lewandowski S, Skrzypczak M et al.: Receptory estrogenowe. w: Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału. Red. Nowak J.Z., Zawilska J.B., PWN, Warszawa 2004; 604-616.
56. Kelly MJ, Wagner EJ: Estrogen modulation of G-protein-coupled receptors. *Trends Endocrinol Metab* 1999; 10: 369-374.
57. Kesling KL, Reinker KA: Scoliosis in twins. A meta-analysis of the literature and report of six cases. *Spine* 1997; 22: 2009–14; discussion 2015.
58. Khosla LJ, Melton LJ 3rd, Atkinson EJ et al.: Relationship of serum sex steroid levels to longitudinal changes in bone density in young versus elderly men, *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 3555–3561.
- 58a. Kim HP, Lee JY, Jeong JK et al.: Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor alpha localized in caveolae. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 16: 257-62.
59. Kindsfater K, Lowe T, Lawellin D et al.: Levels of platelet calmodulin for the prediction of progression and severity of adolescent idiopathic scoliosis. *J Bone Joint Surg Am.* 1994; 76: 1186-92.
60. Konturek S.J. (red.). *Fizjologia człowieka*. Urban&Partner 2007.
61. Kotwicki T: Improved accuracy in Risser sign grading with lateral spine radiography. *Eur Spine J* 2008; 17: 1676 – 1685.
62. Kotwicki T, Napiontek T: Intervertebral deformation in idiopathic scoliosis. *J Pediatr Orthop* 2008; 28: 225-229.
63. Krawczyński A, Kotwicki T, Szulc A et al.: Clinical and radiological assessment of vertebral rotation in idiopathic scoliosis. *Ortop Traumatol Rehabil* 2006; 8: 602-607.
64. Kulis A, Zarzycki D, Jaśkiewicz J.: Concentration of estradiol in girls with idiopathic scoliosis. *Ortop Traumatol Rehabil* 2006; 8: 455–459.

65. Lalancette C, Miller D, Li Yet al.: Paternal contributions: new functional insights for spermatozoal RNA. *J Cell Biochem* 2008; 104: 1570-1579.
66. Leboeuf D, Letellier K, Alos N et al.: Do estrogens impact adolescent idiopathic scoliosis? *Trends Endocrinol Metab* 2009; 20: 147-52.
67. Lemoine S, Granier P, Tiffoche C et al.: Estrogen Receptor Alpha mRNA in Human Skeletal Muscles. *Med Sci Sports Exerc* 2003; 35: 439-43.
- 67a. Lenke L, Edwards C, Bridwell K: The Lenke classification of adolescent idiopathic scoliosis: how it organizes curve patterns as a template to perform selective fusions of the spine. *Spine* 2003; 28: 199–207.
68. Letellier K, Azzedine B, Parent S et al.: Estrogen cross-talk with the melatonin signaling pathway in human osteoblasts derived from adolescent idiopathic scoliosis patients. *J Pineal Res* 2008; 45: 383-93.
69. Litwiniuk M, Bręborowicz J: Receptory estrogenowe β w raku piersi. *Współczesna Onkologia*, 2004; 8: 478-482.
70. Livak KJ, Schmittgen TD.: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 2001; 25: 402-408.
71. Lonstein JE, Carlson J.M. The prediction of curve progression in untreated idiopathic scoliosis during growth. *J Bone Joint Surg Am.* 1984,66:1061-71.
72. Lowe T, Lawellin D, Smith D: Platelet calmodulin levels in adolescent idiopathic scoliosis: do the levels correlate with curve progression and severity? *Spine* 2002; 27: 768-75.
73. Lowe TG, Edgar M, Margulies JY et al.: Etiology of idiopathic scoliosis: current trends in research. *J Bone Joint Surg* 2000; 82: 1157–68.
74. Machida M, Dubousset J, Satoh T et al.: Pathologic mechanism of experimental scoliosis in pinealectomized chickens. *Spine* 2001; 26: 385 – 91.
75. Maeda S, Miyauchi T, Sakai S et al.: Prolonged exercise causes an increase in endothelin-1 production in the heart in rats. *Am J Physiol* 1998; 275: 2105-12.
76. Majeska RJ, Ryaby JT, Einhorn TA et al.: Direct modulation of osteoblastic activity with estrogen. *J Bone Joint Surg Am* 1994; 76: 713–721.
77. Malinowska-Kołodziej I., Marcol W., Lewin-Kowalik J.: Czym jeszcze zaskoczą nas estrogeny? *Wiad Lek*, 2006; 59: 527-533.
78. Man GC, Wang WW, Yeung BH et al: Abnormal proliferation and differentiation of osteoblasts from girls with adolescent idiopathic scoliosis to melatonin. *J Pineal Res* 2010; 49: 69-77.

79. Mannion AF, Meier M, Grob D et al.: Paraspinal muscle fibre type alterations associated with scoliosis: an old problem revisited with new evidence. *Eur Spine J* 1998; 7: 289-93.
80. Manolagas S.C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000; 21: 115–137.
- 80a. Matthews J, Gustafsson JA: Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv* 2003; 3: 281-92.
81. Meier MP, Klein MP, Krebs et al.: Fiber transformations in multifidus muscle of young patients with idiopathic scoliosis. *Spine* 1997; 22: 2357-64.
82. Miller NH: Genetics of Familial Idiopathic Scoliosis. *Clin Orthop Relat Res* 2007; 462: 6-10.
83. Morcuende JA, Minhas R, Dolan L et al.: Allelic variants of human melatonin 1A receptor in patients with familial adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 2003; 28: 2025-8; discussion 2029.
84. Moreau A, Wang DS, Forget S, et al.: Melatonin signaling dysfunction in adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 2004; 29: 1772-81.
85. Mosselman S, Polman J, Dijkema R: ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 1996; 392: 49-53.
86. Mueller MD, Vigne JL, Minchenko A.: Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors alpha and beta. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 10972-10977.
87. Nilsson O, Chrysis D, Pajulo O et al.: Localization of estrogen receptors-alpha and - beta and androgen receptor in the human growth plate at different pubertal stages. *J Endocrinol* 2003; 177: 319–326.
88. Olde B, Leeb-Lundberg LM. GPR30/GPER1: searching for a role in estrogen physiology. *Trends Endocrinol Metab* 2009; 20: 409-16.
89. Ogilvie JW, Braun J, Argyle V: The search for idiopathic scoliosis genes. *Spine* 2006; 31: 679–681.
90. Parent S, Newton PO, Wenger DR: Adolescent idiopathic scoliosis: etiology, anatomy, natural history, and bracing. *Instr Course Lect* 2005; 54: 529-36.
91. Phillips SK, Gopinathan K, Meehan S et al.: Muscle strength changes during the menstrual cycle in human adductor pollicis. *J Physiol* 1993; 473: 125.

92. Porter RW: Can a short spinal cord produce scoliosis? *Eur Spine J* 2001; 10: 2–9.
93. Psarra AM, Sekeris CE: Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: regulatory molecules in a new environment. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783: 1-11.
94. Qiu XS, Tang NL, Yeung HY et al: Melatonin receptor 1B (MTNR1B) gene polymorphism is associated with the occurrence of adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 2007; 32: 1748-53.
95. Qiu Y, Sun X, Qiu X, Li W et al.: Decreased circulating leptin level and its association with body and bone mass in girls with adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 2007; 32: 2703-10.
96. Qiu Y, Wu L, Wang B et al.: Asymmetric expression of melatonin receptor mRNA in bilateral paravertebral muscles in adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 2007; 32: 667–672.
97. Qu Q, , Perälä-Heape M, Kapanen A et al.: Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture. *Bone* 1998; 22: 201–209.
98. Raczkowski JW: The concentrations of testosterone and estradiol in girls with adolescent idiopathic scoliosis. *Neuroendocrinol Lett* 2007; 28: 302–304.
99. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ 3rd: Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev* 2002; 23: 279-302.
100. Risser JC: The iliac apophysis. An invaluable sign in the management of scoliosis. *Clin Orthop Relat Res* 1958; 11: 111–119.
101. Rogala P: Aspekty neurologiczne etiopatogenezy młodzieńczej skoliozy idiopatycznej w oparciu o badanie kliniczne, radiologiczne i neurofizjologiczne. Wydawnictwo UAM w Poznaniu. Poznań 2010.
102. Salehi LB, Mangino M, De Serio S et al.: Assignment of a locus for autosomal dominant idiopathic scoliosis (IS) to human chromosome 17p11. *Hum Genet* 2002; 111: 401–404.
103. Sanders JO , Browne RH, McConnell SJ et al. Maturity assessment and curve progression in girls with idiopathic scoliosis. *J. Bone Joint Surg. Am.* 89, 64–73,200753
104. Sarwar R, Niclos BB, Rutherford OM: The effect of the menstrual cycle on the human quadriceps strength, contractile properties and fatigability. *J Physiol* 1995; 483: 128-132.

105. Sarwark J, Aubin CE: Growth considerations of the immature spine. *J Bone Joint Surg Am* 2007; 89: 8–13.
106. Steensberg A, Keller C, Hillig T et al.: Nitric oxide production is a proximal signaling event controlling exercise-induced mRNA expression in human skeletal muscle. *Faseb J* 2007; 21: 2683-2694.
107. Stirone C, Duckles SP, Krause DN et al.: Estrogen increases mitochondrial efficiency and reduces oxidative stress in cerebral blood vessels. *Mol Pharmacol* 2005; 68: 959-965.
108. Stokes IAF, Burwell RG, Dangerfield PH.: Biomechanical spinal growth modulation and progressive adolescent scoliosis – a test of a ‘vicious cycle’ pathogenetic hypothesis: Summary of an electronic focus group debate of the IBSE. *Scoliosis* 2006; 1: 16.
109. Świtalska M, Strządała L: Niegenomowe działanie estrogenów. *Postępy Hig Med Dośw* 2007; 61: 541-547.
110. Taylor AH, Al.-Azzawi F: Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissue. *J Mol Endocrinol.* 2000; 24: 145-55.
111. Tkaczyk M., Kalita K.: Receptor estrogenowy β - budowa, regulacja i funkcja. *Post. Bioch.*, 2001; 47: 72-79.
112. Tylman D.: Patomechanika bocznych skrzywień kręgosłupa. Severus, Warszawa 1997.
113. van Rhijn LW, Jansen EJ, Plasmans CM et al.: Changing curve pattern in infantile idiopathic scoliosis: Family report with a follow-up of 15 years. *Spine* 2001; 26: 373–376.
114. Villemure I, Aubin CE, Dansereau J et al.: Biomechanical simulations of the spine deformation process in adolescent idiopathic scoliosis from different pathogenesis hypotheses. *Eur Spine J* 2004; 13: 83-90.
115. Wang S, Qiu Y, Ma Z et al.: Expression of Runx2 and type X collagen in vertebral growth plate of patients with adolescent idiopathic scoliosis. *Connect Tissue Res* 2010;51: 188-96.
116. Weinstein SL, Dolan LA, Cheng JCY et al.: Adolescent idiopathic scoliosis. *Lancet* 2008; 371: 1527–37.
117. Weise M, De-Levi S, Barnes KM et al.: Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 6871–6876.

118. Wiik A, Ekman M, Johansson O et al.: Expression of both oestrogen receptor alpha and beta in human skeletal muscle tissue. *Histochem Cell Biol* 2009; 131: 181–189.
119. Wiik A, Ekman M, Morgan G et al.: Oestrogen receptor b is present in both muscle fibres and endothelial cells within human skeletal muscle tissue. *Histochem Cell Biol* 2005; 124: 161–165.
120. Wiik A, Glenmark B, Ekman M et al.: Oestrogen receptor β is expressed in adult human skeletal muscle both at mRNA and protein level. *Acta Physiol Scand* 2003; 179: 381-387.
121. Wiik A, Gustafsson T, Esbjornsson M et al.: Expression of estrogen receptor α and β is higher in skeletal muscle of highly endurance – trained than of moderately active men. *Acta Physiol Scand* 2005; 184: 105 – 112.
122. Wise PM: Minireview. Neuroprotective effects of estrogen-new insights into mechanisms of action. *Endocrinology* 2001; 142: 969-973.
123. Wu J, Qiu Y, Zhang L, Sun Q et al.: Association of estrogen receptor gene polymorphisms with susceptibility to adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 2006; 31: 1131-6.
124. Ylikoski, M. Height of girls with adolescent idiopathic scoliosis. *Eur. Spine J* 2003; 12: 288–291.
125. Zallone A. Direct and indirect estrogen actions on osteoblasts and osteoclasts. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1068: 173–179.
126. Zhang HQ, Lu SJ, Tang MX, Chen LQ et al.: Association of estrogen receptor beta gene polymorphisms with susceptibility to adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 2009; 34: 760-4.
127. Zhu F, Qiu Y, Yeung HY.: Histomorphometric study of the spinal growth plates in idiopathic scoliosis and congenital scoliosis. *Pediatr Int* 2006; 48: 591–8.
128. Zoabli G, Mathieu PA, Aubin CE et al.: Back muscles biometry in adolescent idiopathic scoliosis. *Spine J* 2007; 7: 338–344.

9. STRESZCZENIE

Skolioza idiopatyczna (SI) jest rozwojowym zniekształceniem kręgosłupa i tułowia charakteryzującym się strukturalnym, bocznym i rotacyjnym skrzywieniem kręgosłupa. SI pojawia się i ulega progresji głównie u dziewcząt w trakcie dojrzewania płciowego. Pomimo licznych badań etiopatogeneza skoliozy idiopatycznej pozostaje nieznana. Mięśnie grzbietu leżące wzdłuż kręgosłupa (mięśnie głębokie, właściwe grzbietu) mają funkcję mięśni posturalnych, zdolnych do długotrwałych wysiłków, rozwijających stosunkową niewielką siłę, o małej szybkości skracania się włókien, wysokiej kapilaryzacji i niskiej zawartości glikogenu. Asymetrię w aktywności mięśni głębokich grzbietu u chorych z SI stwierdzono w badaniach elektromiograficznych i rezonansu magnetycznego.

Estrogeny, żeńskie hormony płciowe, hamują przebudowę tkanki kostnej zapewniając prawidłowy stosunek pomiędzy tworzeniem i resorpcją tkanki kostnej. Wystąpienie pierwszych trzeciorzędowych cech płciowych pod postacią powiększenia gruczołów sutkowych dziewczynek (S2 w skali Tannera), uważane przez Duval-Beaupere za punkt zwrotny w przebiegu skoliozy idiopatycznej, zapoczątkowujący okres szybkiej progresji, zbiega się z pierwszym zauważalnym wzrostem stężenia estradiolu w osoczu. Kwestią sporną pozostaje, czy stężenia hormonu w tym okresie u pacjentek z młodzieńczą skoliozą idiopatyczną różnią się od stężeń u osób zdrowych.

W organizmie człowieka występują dwa typy receptorów estrogenowych: pierwszy (ESR1), zwany także receptorem alfa i drugi (ESR2) zwany receptorem beta. Efektem działania estrogenów poprzez receptory estrogenowe jest aktywacja ekspresji genu. Wiadomo, że w mięśniach szkieletowych występują oba typy receptorów. W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono prac stwierdzających występowanie receptorów estrogenowych w mięśniach grzbietu ani prac wiążących asymetrię występującą w skoliozie idiopatycznej z poziomem ekspresji genów receptorów estrogenowych.

Założenia pracy

Zakłada się, że w obrębie komórek mięśni grzbietu chorych ze skoliozą idiopatyczną istnieją receptory dla estrogenów oraz że może występować różnica poziomu ekspresji genów receptorów estrogenowych pomiędzy poszczególnymi grupami mięśniowymi. Ponadto zakłada się, że opisane różnice poziomu ekspresji genów receptorów estrogenowych mogą skutkować różnicą, na przykład asymetrią, w zakresie funkcjonowania mięśni głębokich grzbietu i w ten sposób przyczyniać się do powstania lub rozwoju skoliozy idiopatycznej.

Cele pracy

Celem pracy było: (1) Potwierdzenie obecności receptorów estrogenowych trzema niezależnymi technikami: (a) reakcji odwrotnej transkrypcji i łańcuchowej polimerazy DNA z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym (qPCR), (b) analizą western blot i (c) immunohistochemiczną z jednoczesnym ilościowym określeniem poziomu ekspresji genów receptorów estrogenowych w badanych mięśniach. (3) Zbadanie ekspresji genów receptorów estrogenowych w mięśniach właściwych grzbietu (głębokich, przykręgosłupowych) w porównaniu do mięśni powierzchniowych (mięśni obręczy kończyny górnej). (4) Porównanie poziomu ekspresji genu *ESR1* do poziomu ekspresji genu *ESR2*. (5) Porównanie symetrii ekspresji genów receptorów estrogenowych to znaczy poziomu ekspresji w mięśniach głębokich strony wklęsłej i strony wypukłej skoliozy. (6) Zbadanie związku pomiędzy poziomem ekspresji genów receptorów estrogenowych w mięśniach grzbietu a wybranymi parametrami klinicznymi i radiologicznymi skoliozy.

Materiał

Zbadano 48 chorych leczonych operacyjnie w obrębie kręgosłupa w Klinice Ortopedii i Traumatologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu w latach 2008 – 2011. Wyróżniono trzy grupy chorych: 33 dziewczęta operowane z powodu skoliozy idiopatycznej, (grupa A, właściwa grupa badawcza), 8 dziewcząt leczonych operacyjnie z powodu innych niż skolioza idiopatyczna schorzeń kręgosłupa lub reoperowanych z powodu skoliozy idiopatycznej (grupa B) oraz 7 chłopców operowanych z powodu różnych deformacji kręgosłupa, (grupa C). Średnia wieku pacjentek w grupie A wynosiła 15lat i 6mies. \pm 26 mies. Rozpoznano skoliozę idiopatyczną młodzieńczą (AIS) u 11 dziewczynek i skoliozę o wczesnym początku (EOIS) u 22 dziewczynek.

Metodyka

U wszystkich chorych wykonano badanie kliniczne, radiologiczne i molekularne. Wszyscy chorzy przeszli operację kręgosłupa z dostępu tylnego z użyciem implantów kręgosłupowych. Badania molekularne zostały wykonane na podstawie materiału tkankowego mięśni przykręgosłupowych pobranego w czasie operacji. Na prowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu.

Badanie ortopedyczne składało się z badania podmiotowego, które obejmowało wywiad oceniający przebyte choroby, występowanie skolioz w rodzinie i datę pierwszej miesiączki, oraz badania przedmiotowego obejmującego ocenę kompensacji tułowia za pomocą pionu i pomiaru kąta rotacji tułowia skoliometrem Bunnella.

Badanie radiologiczne polegało na pomiarze kąta Cobba i ocenie dojrzałości kostnej w skali Rissera na radiogramach całego kręgosłupa wykonanych na długich kliszach w pozycji stojącej w projekcji przednio-tylnej. Obliczono także współczynnik ryzyka progresji skoliozy (WRP) według wzoru podanego przez Lonsteina i Carlsona.

Do badań molekularnych pobrano trzy fragmenty tkanki mięśniowej, o wielkości około 1cm³ każdy, w tym dwa z mięśni głębokich grzbietu na poziomie szczytu skrzywienia (po stronie wklęsłej i wypukłej) oraz jeden z mięśni powierzchniowych grzbietu.

W celu oceny poziomu ekspresji genów receptora estrogenowego ESR1 posłużono się techniką reakcji odwrotnej transkrypcji i łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR) z zastosowaniem sond hydrolizujących TaqMan. Ocenę poziomu ekspresji receptora ESR2 wykonano w technice qPCR SYBRGreen a zgodność produktu reakcji potwierdzano przez rozdział elektroforetyczny. Wykonano badanie immunohistochemiczne, a po izolacji ekstraktów białkowych z pobranych tkanek wykonano badanie western blot celem potwierdzenia obecności białek receptorów ESR1 i ESR2.

Następnie obliczono: (1) względny poziom ekspresji genów *ESR1* i *ESR2* dla każdej z trzech lokalizacji, (2) średnią ekspresję genów w mięśniach głębokich, (3) stosunek (ratio) poziomu ekspresji genów w mięśniach strony wypukłej do strony wklęsłej.

Wyniki porównano z parametrami klinicznymi i poddano analizie statystycznej.

Wyniki

W grupie A pion spuszczonej z wyrostka kolczystego C7 padał centralnie na szparę pośladkową u 7 pacjentek, u 7 padał w stronę lewą (od 1 do 6cm), a u 19 w stronę prawą (od 0,5 do 3cm). Kąt rotacji tułowia mierzony skoliometrem Bunnella wynosił od 5° do 30°. Kąt Cobba skrzywienia głównego wynosił od 50° do 114°. Wartość współczynnika WRP wyniosła 4,4 ± 1,7.

Obecność produktu reakcji ilościowej PCR (qPCR) potwierdzono dla każdej próbki tkanki mięśniowej. Analiza poziomów ekspresji receptorów ESR1 i ESR2 wykazała, że:

- 1) poziom ekspresji *ESR1* w mięśniach powierzchniowych był wyższy w stosunku do poziomu ekspresji w mięśniach głębokich grzbietu u wszystkich pacjentów, ($p=0,006$),
- 2) poziom ekspresji *ESR1* w mięśniach głębokich grzbietu u wszystkich pacjentów pomiędzy stroną wklęsłą a wypukłą nie różnił się w sposób istotny statystycznie ($p>0,05$),
- 3) poziom ekspresji *ESR2* wyznaczony dla wszystkich badanych pacjentów nie wykazał znamienych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami mięśni ($p>0,05$),
- 4) w grupie pacjentów A poziom ekspresji *ESR1* w mięśniach powierzchniowych był znacznie niższy niż w mięśniach głębokich zarówno strony wklęsłej ($p<0,05$) jak i strony wypukłej ($p<0,01$),

- 5) w grupie pacjentów A poziom ekspresji *ESR1* w mięśniach głębokich po stronie wypukłej był większy niż po stronie wklęsłej, jednak różnica nie była istotna statystycznie ($p > 0,05$),
- 6) względny poziom ekspresji *ESR1* w mięśniach powierzchniowych pomiędzy grupami A, B i C różnił się w sposób istotny statycznie $p = 0,049$ a poziom ekspresji *ESR1* u pacjentów grupy C (chłopców) był znamienne niższy niż u pacjentów grupy A i B (dziewcząt) ($p < 0,05$),
- 7) nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic poziomu ekspresji genu *ESR2* pomiędzy badanymi grupami mięśni ($p = 0,4$),
- 8) poziom ekspresji *ESR2* pomiędzy grupami A, B i C różnił się w sposób istotny statycznie w odniesieniu do mięśni powierzchniowych ($p = 0,027$) oraz głębokich ($p = 0,028$),
- 9) znamienne wyższy był poziom ekspresji *ESR2* u pacjentów grupy B niż u pacjentów grupy A i C, a różnice średnich poziomu ekspresji receptora *ESR2* pomiędzy grupami A i C nie były istotne statystycznie ($p > 0,05$),
- 10) istotną statystycznie różnicę pomiędzy poziomami ekspresji *ESR2* mięśni powierzchniowych u pacjentów z SI i innymi rozpoznaniem ($p = 0,035$),
- 11) stwierdzono większą ekspresję genu *ESR1* w mięśniach powierzchniowych dziewcząt, u których upłynęły więcej niż dwa lata od pierwszej miesiączki w porównaniu z grupą dziewcząt u których nie upłynął rok od wystąpienia pierwszej miesiączki,
- 12) u pacjentek z wartością ratio receptora $ESR1 \geq 1$ wystąpiła silna dodatnia korelacja liniowa pomiędzy ratio a kątem Cobba, $r = 0,62$ ($p = 0,0097$),
- 13) u pacjentek z wartością ratio receptora $ESR1 < 1$ wystąpiła silna ujemna korelacja liniowa między wartościami kąta Cobba a ratio, $r = -0,59$ ($p = 0,0251$),
- 14) u pacjentek z wartością ratio receptora $ESR1 \geq 1$ stwierdzono silną dodatnią korelację liniową pomiędzy współczynnikiem WRP a ratio, $r = 0,59$ ($p = 0,02$),
- 15) u pacjentek z wartością ratio receptora $ESR1 < 1$ stwierdzono silną ujemną korelację liniową pomiędzy współczynnikiem WRP a ratio $r = -0,69$ ($p = 0,008$),
- 16) u pacjentek z grupy A, u których ratio ≥ 1 , stwierdzono dodatnią korelację liniową pomiędzy ratio dla receptora *ESR2* a WRP, $r = 0,47$ ($p = 0,041$),

Badanie techniką western blot wykonane dla 10 losowo wybranych pacjentek wykazało we wszystkich badanych próbkach tkanki mięśniowej obecność białkowych receptorów estrogenowych *ESR1* i *ESR2* o wielkości odpowiednio 66 i 67 kDa.

Badanie immunohistochemiczne wykonane dla 10 losowo wybranych pacjentów wykazało obecność receptorów estrogenowych *ESR1* i *ESR2* w tkance mięśniowej.

Wnioski

1. Za pomocą trzech niezależnych technik: (a) reakcji odwrotnej transkrypcji i łańcuchowej reakcji polimerazy DNA z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym, (b) western blot (c) immunohistochemicznej potwierdzono obecność receptorów estrogenowych ESR1 i ESR2 w mięśniach głębokich i powierzchniowych grzbietu u chorych ze skoliozą idiopatyczną. Przeprowadzone badania umożliwiły ilościowe określenie poziomu ekspresji receptorów estrogenowych ESR1 i ESR2 w badanych tkankach.
2. W mięśniach głębokich stwierdzono większy poziom ekspresji receptora estrogenowego ESR1 niż w mięśniach powierzchniowych. Podobnej zależności nie stwierdzono dla receptora estrogenowego ESR2.
3. W badanych mięśniach nie stwierdzono różnicy w poziomie ekspresji pomiędzy receptorem ESR1 i ESR2.
4. Stwierdzono asymetrię ekspresji receptorów estrogenowych ESR1 i ESR2 w mięśniach głębokich grzbietu. U części pacjentek ekspresja receptorów estrogenowych była większa po stronie wklęsłej skoliozy, a u części po stronie wypukłej. Wprowadzenie współczynnika ratio (r_{ESR1} i r_{ESR2}) umożliwiło ilościowe określenie stopnia asymetrii.
5. Stwierdzono istotną statystycznie zależność pomiędzy stopniem asymetrii poziomu ekspresji receptorów estrogenowych ESR1 i ESR2 a wartością kąta Cobba i współczynnikiem ryzyka progresji. Oba te parametry przyjmowały najmniejszą wartość w przypadku symetrii ekspresji receptorów estrogenowych a wzrastały w miarę zwiększania się asymetrii.

10. ABSTRACT

Idiopathic Scoliosis (IS) is a deformity of the spine and trunk. It is characterized by structural, lateral and rotational curvature of the spine. Idiopathic scoliosis develops and progress in girls during puberty. Deep paravertebral muscles present the ability to maintain the erect body position. These muscles are capable of performing long lasting physical effort and they have very good blood supplies by number of small capillaries. Muscle fibers have also low glycogen levels. Electromyography and nuclear magnetic resonance show asymmetry in shape and activity of deep paravertebral muscles.

Estrogens, female sex hormones, suppress bone remodeling and provide correct relationship between bone formation and resorption. First elevation of estrogen blood concentration appears during puberty and it correlates with rapid scoliosis progression. Studies on levels of circulating estrogens in girls with idiopathic scoliosis and healthy girls are inconsistent.

There are two known human estrogen receptors: estrogen receptor 1 (ESR1) previously called “alpha” and estrogen receptor 2 (ESR2), previously called “beta”. Both receptors have transcriptional activity and both were identified in muscle tissue. There is no surveys concerning presence and asymmetrical expression of estrogen receptors in back muscles of girls with idiopathic scoliosis.

Study assumptions

Estrogen receptors are present in back muscle cells of girls with idiopathic scoliosis. There is significant difference between level of estrogen receptors genes expression in superficial and deep paravertebral muscles. There is correlation between asymmetrical estrogen receptors expression and clinical and radiological parameters.

Aims of the study

The aim of this study was: (1) confirmation of estrogen receptors presence with three independent techniques: quantitative polymerase chain reaction, (b) western blot technique, (c) immunohistochemistry and quantitative evaluation of estrogen receptor expression in harvested muscle tissue samples.(2) Investigation of estrogen receptors genes expression in deep paravertebral muscles in comparison to superficial muscles (muscles of the shoulder girdle). (3) Comparison of ESR1 gene expression level to ESR2 gene expression level. (4) Comparison of estrogen receptors expression level in deep paravertebral muscle on concave side of the curve to convex

side. (5) Investigation of connection between level of estrogen receptors expression in back muscles with selected clinical and radiological parameters.

Material

The study consist of 48 patients who underwent posterior spinal surgery in Department of Pediatric Orthopedics and Traumatology University of Medical Sciences in Poznan between 2008 – 2011. All patients were examined. There were three groups of patients: 33 girls with idiopathic scoliosis (group A – proper study group), 8 girls with diagnosis other than idiopathic scoliosis or with idiopathic scoliosis who underwent another surgery (group B) and 7 boys with the different spinal problems who underwent posterior spinal surgery. Avarage patients age in group A was 15 years and 6 months \pm 26 months. The adolescent idiopathic scoliosis (AIS) was diagnosed in 11 girls and early onset idiopathic scoliosis (EOIS) was diagnosed in 22 girls.

Methods

The clinical examination, radiological examination and molecular analysis were performed in each patient, who underwent posterior spinal surgery with spinal implants application. The molecular tests were performed on paravertebral muscle tissue samples harvested during spinal surgery. Bioethical approval was obtained.

Orthopaedic examination consists of: (1) interview which concerned previous diseases, menarche and development of scoliosis in the family and (2) clinical examination, including trunk compensation and angle of trunk rotation assessment with Bunnel's scoliometer.

Radiological examination consist of Cobb's angle measurement and bone maturity evaluation based on Risser sign. All radiographs was made on long films in standing position in anterior – posterior projection. The Lonstein – Carlson's progression risk factor was calculated.

For molecular tests three muscle samples 1 cm³ big were harvested. Samples were taken from deep paravertebral muscles on concave and covex side (2 samples) at the apical level and one sample from superficial muscles.

Quantitative polymerase chain (qPCR) reaction with TaqMan hydrolysis probes was used to assess estrogen receptors 1 gene expression. Evaluation of estrogen receptor 2 gene expression was made with qPCR SYBRGreen teqnique and product concordance was confirmed with electrophoretic separation. After protein isolation from tissue samples, western blot and immunohisochemistry were made to confirm ESR's protein presence.

Following calculations were made: (1) levels of ESR1 and 2 gene expression for each localization, (2) average genes expression in deep paravertebral muscles, (3) level of expression

ratio convex to concave side. Results were compared with clinical data and statistical analysis was performed.

Results

In group A plumb line dropped down centrally on gluteal cleft in 7 patients, on the left to gluteal cleft in 7 patients (from 1 to 6cm) and on the right to gluteal cleft in 19 patients. Trunk rotation angle was 5 to 30. Cobb's angle of the main thoracic curve was from 50° to 114°. Progression risk factor was $4,4 \pm 1,7$.

Each sample reveal presence of qPCR product. Analysis of estrogen receptors expression showed:

- 1) estrogen receptor 1 expression level was significantly higher in superficial muscles than in deep paravertebral muscles ($p=0,006$)
- 2) there was no difference between levels of ESR1 and ESR2 genes expression in deep paravertebral muscles on convex and concave side
- 3) there was no difference between level of ESR1 gene expression and level of ESR2 gene expression in deep and superficial muscles
- 4) in group A level of *ESR1* gene expression in superficial muscles was significantly lower than level of expression in deep paravertebral muscles ($p<0,01$)
- 5) in group C level of *ESR1* gene expression in superficial muscles was significantly lower than level of expression in superficial muscles in group A and B ($p<0,05$)
- 6) level of ESR2 gene expression in patients in group B was significantly higher than level in group A and C
- 7) there was no difference between levels of ESR1 gene expression in superficial and deep paravertebral muscles in patients with idiopathic scoliosis and patients with other spinal deformation.
- 8) level of ESR2 gene expression in superficial muscles of patients with idiopathic scoliosis was significantly higher than level in superficial muscles of non-scoliotic patients ($p=0,035$)
- 9) there was no correlation between ESR1 and ESR2 ratio ($ESR1 \text{ ratio} = ESR1_{\text{convex}}/ESR1_{\text{concave}}$) and trunk rotation angle
- 10) patients with ESR1 ratio ≥ 1 had strong positive correlation between ESR1 ratio and Cobb's angle
- 11) patients with ESR1 ratio < 1 had strong negative correlation between ESR1 ratio and Cobb's angle
- 12) patients with ESR1 ratio ≥ 1 had strong positive correlation between ESR1 ratio and progression risk factor

- 13) patients with ESR1 ratio <1 had strong negative correlation between ESR1 ratio and progression risk factor
- 14) patients with ESR2 ratio ≥ 1 had strong positive correlation between ESR2 ratio and Cobb's angle
- 15) patients with ESR2 ratio ≥ 1 had strong positive correlation between ESR1 ratio and progression risk factor
- 16) level of ESR1 gene expression in superficial muscle of girls who were 2 years after menarche was significantly higher than level in group of girls who were less than 12 months after menarche

Western blot analysis, performed on tissue samples obtained from 10 randomly chosen patients, revealed presence of estrogen receptor 1 and 2 protein in all samples. Size of the protein was 66kD and 67kD respectively.

Immunohistochemical reaction performed on tissue samples obtained from 10 randomly chosen patients revealed presence of estrogen receptors ESR1 and 2 in the muscles.

Conclusions

1. Three independent techniques: (a) quantitative polymerase chain reaction (b) western blot analysis and (c) immunohistochemistry confirmed presence of estrogen receptors 1 and 2 in superficial and deep paravertebral muscles of patients with idiopathic scoliosis. Analysis allowed to quantitatively evaluate level of estrogen receptors ESR1 and ESR2.
2. Level of estrogen receptor ESR1 expression in deep paravertebral muscles was higher than level of ESR1 expression in superficial muscles.
3. There was no difference in expression levels of estrogen receptor ESR1 and ESR2.
4. There was asymmetrical expression of both ESR1 and ESR2 estrogen receptors in deep paravertebral muscles. Some patients had higher expression on convex side of the curve and some had higher expression on concave side of the curve. Introduction of ESR1 and ESR2 ratio allowed quantitative evaluation of asymmetry level.
5. There was significant correlation between level of estrogen receptors expression asymmetry and two radiological parameters: Cobb's angle and progression risk factor. Both parameters had the smallest values when there was no expression asymmetry (ESR ratio = 1) and they increased parallel with increase of expression asymmetry.

SPIS RYCIN

- Rycina 1.1. Schemat budowy receptorów estrogenowych. A-F – kolejne domeny receptora;
AF-1 – fragment odpowiedzialny za aktywacja transkrypcji niezależną od liganda; AF-2 – fragment odpowiedzialny za aktywację transkrypcji zależną od przyłączenia liganda; DNA – domena wiążąca DNA; H – rejon zawiasowy, LIGAND – miejsce przyłączenia liganda.
- Rycina 1.2. Zmiany ilości wydalanych w moczu estrogenów u kobiet w zależności od wieku. Schemat według Hyde i Delamater, we własnej modyfikacji [48].
- Rycina 1.3. Schemat budowy mięśni powierzchownych (A) i głębokich (B) grzbietu: 1 – mięsień czworoboczny, 2 – mięsień najszerszy grzbietu, 3 – mięsień prostownik grzbietu. Zmodyfikowane.
- Rycina 3.1. Liczba pacjentek z poszczególnymi typami skrzywień wg Lenke [67a].
- Rycina.3.2 Procentowy udział podgrup pacjentek według czasu jaki upłynął pomiędzy pierwszą miesiączką a datą operacji.
- Rycina 4.1. Częstość występowania progresji u chorych na SI (w procentach) w zależności od wielkości współczynnika ryzyka progresji; schemat na podstawie badania Lonsteina i Carlsona [71], zmodyfikowany.
- Rycina 4.2. Miejsce pobrania tkanki z mięśni głębokich grzbietu po stronie wklęsłej skrzywienia.
- Rycina 4.3. Miejsce pobrania tkanki z mięśni głębokich grzbietu po stronie wypukłej skrzywienia.
- Rycina 4.4. Miejsce pobrania tkanki z mięśni powierzchniowych grzbietu.
- Rycina 4.5. Poziom pobrania tkanki mięśniowej z mięśni głębokich grzbietu do badań histochemicznych i molekularnych.
- Rycina 4.6. Krzywe amplifikacji genu metabolizmu podstawowego HPRT dla reakcji użytej do oceny poziomu ekspresji *ESR1* przy pomocy sond hydrolizujących (rycina A) i dla reakcji SYBR Green wykonanej dla oceny poziomu ekspresji *ESR2* (rycina B).
- Rycina 4.7. Krzywe topnienia dla produktów genu *ESR2* (A) oraz genu referencyjnego *HPRT* (B) pacjentki P.W. Oznaczenia: mięsień powierzchniowy - kolor ciemnozielony, mięśnie głębokie po stronie wklęsłej - kolor brązowy, mięśnie głębokie po stronie wypukłej - kolor niebieski, endometrium - kolor fioletowy, kontrola negatywna (płaska linia) - kolor zielony.

- Rycina 4.8. A. Rozdział elektroforetyczny potwierdzający obecność produktu amplifikacji DNA otrzymanego w reakcji qPCR dla receptora ESR2 u czterech pacjentek (kolumna pierwsza, trzecia, czwarta i piąta). W kolumnie drugiej produkt amplifikacji DNA receptora ESR2 z tkanki endometrium. W kolumnie trzeciej marker wielkości produktu, dodatkowo przedstawiony w części B (Nova 100bp Novazym); pz – pary zasad.
- Rycina 5.1. Procentowy udział chorych w grupie A według miejsca padania pionu z wyrostka kolczystego kręgu C7 względem szpary pośladkowej.
- Rycina 5.2. Procentowy udział chorych w grupie B według miejsca padania pionu z wyrostka kolczystego kręgu C7 względem szpary pośladkowej.
- Rycina 5.3. Procentowy udział chorych w grupie C według miejsca padania pionu z wyrostka kolczystego kręgu C7 względem szpary pośladkowej.
- Rycina 5.4. Poziom kręgu szczytowego w grupie A. Znak / oznacza krążek międzykręgowy między danymi kręgami.
- Rycina 5.5. Procentowy rozkład wartości testu Rissera w grupie A, B i C.
- Rycina 5.6. Przykładowe krzywe amplifikacji genu *ESR1* (A) i *ESR2* (B) dla pacjentki P.W.
- Rycina 5.7. Badanie techniką western blot dla dwóch pacjentek (A i B) potwierdzające obecność w badanej tkance mięśniowej białka ESR1 o masie 66 kDa. Po stronie prawej kontrola (endometrium).
- Rycina 5.8. Badanie techniką western blot dla dwóch pacjentek (A i B) potwierdzające obecność w badanej tkance mięśniowej białka ESR2 o masie 67 kDa. Po prawej kontrola (endometrium).
- Rycina 5.9. Badanie immunohistochemiczne tkanki mięśniowej pacjentki D.O.
 A – barwienie hematoksyliną i eozyną, przekrój poprzeczny,
 B – barwienie hematoksyliną i eozyną, przekrój podłużny,
 C – obecność receptora ESR1 (fioletowe wybarwienie) w pobliżu błony komórkowej i jądrach włókien mięśniowych,
 D – obecność receptora ESR2 (fioletowe wybarwienie) w jądrach włókien mięśniowych,
 E – kontrola pozytywna (tkanka endometrium),
 F – kontrola negatywna (tkanka mięśniowa).
- Rycina 5.10. Względny poziom ekspresji genu *ESR1* w badanych grupach mięśni u pacjentek z grupy A.
- Rycina 5.11. Porównanie względnego poziomu ekspresji genu *ESR1* w mięśniach powierzchniowych pomiędzy pacjentami grupy A, B i C. Wynik dla grupy C znacznie niższy niż dla grup A i B.

- Rycina 5.12. Porównanie względnego poziom ekspresji genu *ESR1* w mięśniach głębokich po stronie wklęsłej pomiędzy pacjentami grupy A, B i C.
- Rycina 5.13. Porównanie względnego poziom ekspresji genu *ESR1* w mięśniach głębokich po stronie wypukłej pomiędzy pacjentami grupy A, B i C.
- Rycina 5.14. Poziom ekspresji genu *ESR2* w badanych grupach mięśni u pacjentek z grupy A. Brak różnic istotnych statystycznie
- Rycina 5.15. Porównanie względnego poziom ekspresji genu *ESR2* w mięśniach powierzchniowych pomiędzy pacjentami grupy A, B i C.
- Rycina 5.16. Porównanie względnego poziom ekspresji genu *ESR2* w mięśniach głębokich po stronie wklęsłej pomiędzy pacjentami grupy A, B i C.
- Rycina 5.17. Porównanie względnego poziomu ekspresji *ESR2* w badanych grupach mięśniowych u pacjentów ze skoliozą idiopatyczna (SI) w stosunku do pacjentów ze skoliozami nieidiopatycznymi (SNI).
- Rycina 5.18. Średnie i odchylenia standardowe poziomu ekspresji genu *ESR1* w badanych grupach mięśni u pacjentek z grupy A w zależności od czasu jaki upłynął od daty pierwszej miesiączki w chwili operacji.
- Rycina 5.19. Korelacja pomiędzy wskaźnikiem r_{ESR1} (ESR_{wyp}/ESR_{wkl}), a wartością kąta Cobba u pacjentek u których $r_{ESR1} \geq 1$.
- Rycina 5.20. Korelacja pomiędzy wskaźnikiem r_{ESR1} (ESR_{wyp}/ESR_{wkl}), a wartością kąta Cobba u pacjentek u których $r_{ESR1} < 1$.
- Rycina 5.21. Korelacja pomiędzy wskaźnikiem r_{ESR1} (ESR_{wyp}/ESR_{wkl}), a wartością współczynnika ryzyka progresji (WRP) u pacjentek u których $r_{ESR1} \geq 1$.
- Rycina 5.22. Korelacja stosunku $ESR1_{wyp}/ESR1_{wkl}$ (r_{ESR1}) z współczynnikiem ryzyka progresji (WRP) u pacjentek, u których $ratio < 1$.
- Rycina 5.23. Średnie i odchylenia standardowe poziomu ekspresji genu *ES21* w badanych grupach mięśni u pacjentek z grupy A w zależności od czasu jaki upłynął od daty pierwszej miesiączki w chwili operacji
- Rycina 5.24. Korelacja pomiędzy wskaźnikiem r_{ESR2} (ESR_{wyp}/ESR_{wkl}), a wartością kąta Cobba u pacjentek u których $r_{ESR1} \geq 1$.
- Rycina 6.1. Ilustracja zależności wykrytych pomiędzy asymetrią poziomów ekspresji receptora *ESR1* a współczynnikiem ryzyka progresji Lonsteina i Carlsona. Minimum wartości współczynnika WRP występuje dla symetrycznej ekspresji receptora ($ratio=1$). Analogiczną zależność uzyskano dla kąta Cobba.

SPIS TABEL

- Tabela 1.1. Ryzyko progresji skoliozy idiopatycznej (w %) w zależności od wartości kątownej i od wieku w chwili wykrycia skrzywienia według Nachemsona i wsp. (cytowane za [36])
- Tabela 3.1. Podstawowe dane kliniczne pacjentek z grupy B
- Tabela 3.2. Dane kliniczne pacjentów grupy C
- Tabela 4.1. Składniki wykorzystane do przeprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji
- Tabela 4.2. Charakterystyka starterów wykorzystanych do analizy poziomu ekspresji dla obu receptorów
- Tabela 4.3. Charakterystyka starterów użytych do analizy ekspresji genu *HPRT*
- Tabela 4.4. Charakterystyka mieszaniny reakcyjnej qPCR dla *ESR1*
- Tabela 4.5. Charakterystyka mieszaniny reakcyjnej qPCR dla *ESR2*
- Tabela 4.6. Profil temperaturowy reakcji PCR dla *ESR1* oraz *HPRT*
- Tabela 4.7. Profil temperaturowy reakcji PCR dla *ESR2* oraz *HPRT*
- Tabela 5.1. Względny poziom ekspresji genów *ESR1* oraz *ESR2* w mięśniach powierzchniowych i głębokich grzbietu (N=48)
- Tabela 5.2. Porównanie poziomu ekspresji genu receptora *ESR1* i genu receptora *ESR2* obliczonego przy pomocy wzoru delta/delta
- Tabela 5.3. Względny poziom ekspresji genu *ESR1* w grupie pacjentek A (N=33)
- Tabela 5.4. Względny poziom ekspresji genu *ESR1* w grupie pacjentek B (N=8)
- Tabela 5.5. Względny poziom ekspresji genu *ESR1* w grupie pacjentów C (N=5)
- Tabela 5.6. Względny poziom ekspresji genu *ESR2* u pacjentek w grupie A (N=33)
- Tabela 5.7. Względny poziom ekspresji genu *ESR2* pacjentek w grupie B (N=8)
- Tabela 5.8. Względny poziom ekspresji genu *ESR2* u pacjentów grupy C (N=7)
- Tabela 5.9. Poziom ekspresji *ESR1* w mięśniach grzbietu dla pacjentów ze skoliozą idiopatyczną (N=40) oraz pacjentów ze skoliozami nieidiopatycznymi (N=8)
- Tabela 5.10. Poziom ekspresji *ESR2* w mięśniach grzbietu dla pacjentów ze skoliozą idiopatyczną oraz pacjentów ze skoliozami nieidiopatycznymi
- Tabela 5.11. Średnie poziomu ekspresji genu *ESR1* w zależności od czasu, jaki upłynął pomiędzy pierwszą miesiączką a operacją
- Tabela.5.12. Średnie poziomu ekspresji genu *ESR2* w zależności od czasu jaki upłynął pomiędzy pierwszą miesiączką a operacją

FORMULARZ ŚWIADOMEJ ZGODY NA UDZIAŁ W PROJEKCIE BADAWCZYM

Wyrażam zgodę, aby moje dziecko uczestniczyło w badaniach zatytułowanych:

Ocena ekspresji receptorów estrogenowych w mięśniach przykręgosłupowych dzieci ze skolioza idiopatyczną.

1. Potwierdzam, że przeczytałem/am i zrozumiałem/am arkusz informacyjny zamieszczony na odwrocie formularza dotyczący powyższych badań i miałem możliwość zadawania pytań.
2. Rozumiem, że mój udział jest dobrowolny i że mogę się wycofać w każdej chwili, bez podawania przyczyny, przy czym nie będzie to miało wpływu na opiekę medyczną nad moim dzieckiem.
3. W ramach powyższego badania wszelkie dane dotyczące mojej rodziny będą podawane anonimowo (bez podania nazwiska). dane powyższe będą wykorzystywane przez badaczy wyłącznie do celów naukowych.
4. Aby zapewnić poprawne prowadzenie badania wyrażam zgodę na udostępnianie danych mojej rodziny upoważnionemu przedstawicielowi organu nadzorującego badanie. Pozwolenie jest wiążące wyłącznie w odniesieniu dla danych istotnych dla powyższego badania.
5. Badacz i przedstawiciel organu nadzorującego są zobowiązani do tajemnicy zawodowej.
6. W przypadku opublikowania wyników badania poufność danych personalnych mojej rodziny zostanie zagwarantowana.
7. Wyniki badania zostaną przesłane na podany niżej adres.
8. Wyrażona przeze mnie zgoda obejmuje udział mojego dziecka we wszystkich przewidzianych (opisanych na odwrocie formularza zgody) w projekcie badawczym procedurach.
-wyrażam zgodę na pobranie materiału tkankowego (fragment mięśnia) w czasie operacji skoliozy
-wyrażam zgodę, aby materiał tkankowy pozyskany w trakcie operacji skoliozy został wykorzystany do oceny ekspresji genów receptora estrogenowego
-wyrażam zgodę na wykonanie badań molekularnych polimorfizmu genu receptora estrogenowego typu alfa i beta.

Zgodę na udział w badaniach potwierdzam własnoręcznym podpisem.

Kopia powyższego oświadczenia została mi przekazana.

Dane dziecka

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

Dane rodzica

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

Kontakt

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

.....
.....

Podpis Rodzica

Podpis lekarza

Informacja dla pacjenta

Ocena ekspresji receptorów estrogenowych w tkance przykręgosłupowej dzieci chorych na skoliozę idiopatyczną.

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

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

1) **Dlaczego te badania są prowadzone?**

Obecnie istnieją pewne sposoby przewidywania, czy dana skolioza w okresie dojrzewania ulegnie raportowemu pogorszeniu, czy też pozostanie stabilna. W ostatnich latach przeprowadzono badania wskazujące na rolę czynników genetycznych oraz hormonalnych w powstawaniu i rozwoju skoliozy. Badacze oczekują, że przeprowadzone badania umożliwią ustalenie asymetrii ekspresji receptorów estrogenowych co związane jest z występowaniem i progresją skoliozy idiopatycznej.

2) **Jaki jest cel tego badania?**

Celem badania jest poznanie i zrozumienie biologii i progresji skolioz co pozwoli na wyodrębnienie spośród dzieci i młodzieży z małymi skoliozami i niedokończonym dojrzewaniem grupy dzieci o zwiększonym ryzyku progresji skoliozy.

3) **Jakie procedury obejmuje projekt badawczy?**

-Pobranie niewielkiego fragmentu tkanki mięśniowej przykręgosłupowej (1cm) rutynowo usuwanej w trakcie operacji skoliozy.

- Badania molekularne pobranego fragmentu tkanki przeprowadzone w Katedrze i Zakładzie Biologii Komórki Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

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

4) **Pacjentka nie może uczestniczyć w takich badaniach jeśli nie wyraziła świadomej zgody**

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

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

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

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

7) **Do kogo możesz zatelefonować jeśli będziesz miał/a jakiegokolwiek pytania i problemy?**

Jeśli ma Pan/Pani jakiegokolwiek pytania proszę skontaktować się z dr hab. med. Tomaszem Kotwickim telefonując pod nr tel.:602613054

8) **Jakie informacje traktujemy jako poufne?**

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

9) **Co jeszcze powinien Pan/Pani wiedzieć?**

Badania te finansowane są przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego

Badania Koordynuje:

Dr hab. med. Tomasz Kotwicki

Klinika ortopedii i Traumatologii Dziecięcej Uniwersytetu medycznego im. Karola Marcinkowskiego, 61 – 545 Poznań, ul 28 Czerwca 1956r 135/147; Tel 602613054, fax 0618310173, kotwicki@ump.edu.pl

Karta pacjenta

Imię i nazwisko:

Data badania:

Data urodzenia:

Nr. Historii:

ROZPOZNANIE:

TYP SKRZYWIENIA: wg LENKE:

wg KINGA:

Tanner:

Data i miesiączki:

Inne choroby:

Leczenie gorsetowe: od.....do.....

Skoliozy występujące w rodzinie:

Cechy progresji:

Skolioza o ciężkim przebiegu/skolioza łagodna*

RTG

Zdjęcie AP na stojąco	Parameter	proxTh Cobb	Th Cobb	ThL/L Cobb
	Poziom			
	Wartość			
Data wcześniejszego RTG	Wartość (poprzednie rtg)			

Krąg szczytowy głównego skrzywienia piersiowego:

Objaw Rissera:

SKOLIOMETR

Poziom	ProxTh	Th	Th/L	L
Wartość				

Test Marshalla:

Spirometria: FEV1: VC: wg wzrostu..... wg. ramion.....

PION

C7 L(-) - 0 - P(+) ___ cm

Inne:

*niepotrzebne skreślić