

Polimorfizm genu kodującego osteoprotegerynę a występowanie osteoporozy u kobiet po menopauzie

Polymorphism of osteoprotegerin gene and osteoporosis in postmenopausal women

Seremak-Mrozikiewicz Agnieszka¹, Tatuśko Joanna², Drews Krzysztof¹, Barlik Magdalena³, Krajewski Paweł⁴, Spaczyński Marek⁵, M. Mrozikiewicz Przemysław²

¹ Klinika Perinatologii i Chorób Kobięcych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

² Instytut Roślin i Przetworów Zielarskich w Poznaniu

³ Studenckie Koło Naukowe przy Klinice Perinatologii i Chorób Kobięcych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

⁴ Instytut Genetyki Roślin PAN

⁵ Katedra Ginekologii, Położnictwa i Onkologii Ginekologicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

Streszczenie

Wstęp: Białko osteoprotegeryna (OPG) pełni kluczową rolę w kontroli resorpcji kości blokując kompetencyjnie ligand jądrowego czynnika aktywującego receptor κ B (RANKL). Proces ten prowadzi do hamowania różnicowania i aktywności osteoklastów. Celem badania była ocena rozkładu genotypów polimorfizmów -163A>G oraz 1181G>C genu OPG, a także analiza związku genotypów z gęstością mineralną kości (BMD) oraz innych parametrów obrotu kostnego w populacji kobiet polskich po menopauzie.

Materiał i metoda: Badaniem objęto 310 niespokrewnionych kobiet rasy kaukaskiej (54,48±8,53 lata) po menopauzie (139 kobiet z osteoporozą, 107 kobiet z osteopenią, 64 zdrowych kobiet). Analizę genetyczną przeprowadzono przy pomocy reakcji PCR/RFLP. Pomiar BMD wykonano przy zastosowaniu metody podwójnej absorpcyjometrii rentgenowskiej (DXA).

Wyniki: W przypadku polimorfizmu -163A>G zauważono częstsze występowanie heterozygot AG (26,6 vs 18,7%, ns) oraz nieznacznie wyższą częstość występowania zmutowanego allela G (14,1 vs 10,9%, ns) w grupie kobiet z osteoporozą. Częstość występowania homozygot recesywnych CC oraz alleli C polimorfizmu 1181G>C nie wykazywała różnic pomiędzy badanymi podgrupami. Rozkład występowania poszczególnych haplotypów polimorfizmów -163A>G oraz 1181G>C we wszystkich podgrupach był podobny. Nie zaobserwowano korelacji pomiędzy wartościami badanych parametrów obrotu kostnego a częstością pojawiania się poszczególnych genotypów badanych polimorfizmów w analizowanych podgrupach.

Wnioski: Częstsze występowanie heterozygot AG oraz zmutowanego allela G polimorfizmu -163A>G genu OPG w grupie kobiet z osteoporozą może sugerować znaczenie tego wariantu w rozwoju osteoporozy. Wskazana jest szersza analiza wariantów genetycznych szlaku sygnałowego RANKL/RANK/OPG łącznie z badaniem modulacyjnego wpływu estrogenów, TNF- α oraz niektórych interleukin na rozwój osteoporozy.

Słowa kluczowe: osteoporoza / szlak sygnałowy RANKL/RANK/OPG / polimorfizm genetyczny /

Adres do korespondencji:

Agnieszka Seremak-Mrozikiewicz
Klinika Perinatologii i Chorób Kobięcych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu
ul. Polna 33, 60-535 Poznań
tel. 0618419613, fax: 0618474651
e-mail: asm@data.pl

Otrzymano: 15.12.2008

Zaakceptowano do druku: 27.03.2009

Summary

Introduction: Osteoprotegerin (OPG) plays a crucial role in the control of bone resorption through competitive inhibition of receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL). This process leads to inhibition of osteoclasts differentiation and activity. The aim of the following study was to evaluate the distribution of genotypes of -163A>G and 1181G>C polymorphisms in OPG gene, and analyze their relationship with bone mineral density (BMD) and other parameters of bone turnover in population of Polish postmenopausal women.

Material and method: The study included 310 postmenopausal Caucasian women (54,48±8,53 years); 139 women with osteoporosis, 107 with osteopenia and 64 healthy women. Genetic analysis was performed by PCR/RFLP reaction. BMD value was measured by dual energy X-ray absorptiometry (DXA).

Results: For -163A>G polymorphism the higher frequency of heterozygotes AG (26.6 vs. 18.7%, ns) and slight overrepresentation of mutated G allele (14,1 vs. 10,9%, ns) in the osteoporosis group was observed. The frequency of recessive CC homozygotes and C alleles of 1181G>C polymorphism did not differ among the investigated groups. The distribution of particular haplotypes of -163A>G and 1181G>C polymorphisms in all subgroups was similar. Correlation between values of investigated parameters of bone turnover and frequency of genotypes of investigated polymorphisms has not been observed.

Conclusions: The overrepresentation of heterozygous AG genotype and mutated G allele of -163A>G polymorphism of OPG gene in the group of women with osteoporosis might suggest the significance of this variant in the development of osteoporosis. A more extensive analysis of genetic variants of RANKL/RANK/OPG signal pathways, joint with an investigation of modulated influence of estrogens, TNF- α or several interleukin influencing the development of osteoporosis is necessary.

Key words: **osteoporosis / RANKL/RANK/OPG pathway / genetic polymorphism /**

Wstęp

Osteoporoza jest przewlekłą, uogólnioną chorobą metaboliczną układu kostnego uwarunkowaną wieloczynnikowo. Jedną z przyczyn osteoporozy mogą być zaburzenia aktywności osteoklastów prowadzące do nasilonej resorpcji kości. Stosunkowo niedawno opisano, iż powstawanie i dojrzewanie osteoklastów regulowane jest w dużej mierze przez trzy czynniki należące do nadrodziny czynnika martwicy nowotworów. Są to aktywator receptora czynnika jądrowego kappa B (κ B) (RANK – receptor activator of nuclear factor kappa B), jego ligand (RANKL – receptor activator of nuclear factor – κ B ligand) oraz białko osteoprotegeryna (OPG – osteoprotegerin) [1, 2]. Obecnie uważa się, że szlak sygnałowy RANKL/RANK/OPG jest ściśle zaangażowany w proces resorpcji kości [3].

Białko RANKL ulega ekspresji na powierzchni komórek zrębu szpiku, limfocytów T i B oraz w tkankach limfoidalnych (węzłach chłonnych, śledzionie, grasicy, kępkach Peyera i wątrobie płodu) [4, 5]. W macierzy kostnej białko RANKL jest niezbędnym czynnikiem do różnicowania osteoklastów, odpowiedzialnym za ich rekrutację, fuzję w wielojądrzaste komórki kościogubne, aktywację form dojrziałych, a także hamowanie apoptozy osteoklastów. Receptorem dla RANKL jest transmembranowe białko RANK, którego obecność opisano na powierzchni hematopoetycznych komórek prekursorowych, dojrziałych osteoklastów, chondrocytów, komórek nabłonkowych gruczołu sutkowego oraz trofoblastu. Wynikiem połączenia RANK z RANKL na poziomie komórkowym jest różnicowanie preosteoklastów do form dojrziałych, nasilenie aktywności osteoklastów oraz zahamowanie ich apoptozy [1, 5]. Osteoprotegeryna, cytokina syntetyzowana i wydzielana poprzez zaktywowane osteoblasty, jest dimerycznym rozpuszczalnym białkiem i rodzajem receptora blokującego RANKL. OPG ma zdolność wiązania się z RANKL („receptor-pułapka” dla RANKL) co uniemożliwia wiązanie się RANKL

z RANK i w konsekwencji zatrzymuje cały szlak dojrzewania osteoklastów już na jego początkowych etapach. W tym mechanizmie OPG pełni rolę inhibitora resorpcji kości [6, 7] i funkcję czynnika regulującego masę kostną. Zmniejsza resorpcję kości poprzez hamowanie różnicowania osteoklastów, blokadę ich aktywności oraz indukowanie ich apoptozy [1, 7]. Zadaniem białka OPG jest więc zmniejszanie puli aktywnych osteoklastów i hamowanie resorpcji kości. Dynamiczna równowaga pomiędzy RANKL/RANK a poziomem biologicznie aktywnego białka OPG pozwala na regulację dojrzewania oraz aktywacji osteoklastów, a tym samym wpływa na metabolizm tkanki kostnej. Od momentu opisania szlaku RANKL/RANK/OPG udowodniono, iż OPG obok RANKL jest bezpośrednio zaangażowane zarówno w proliferację prekursorów osteoklastów, jak też w proces apoptozy dojrziałych komórek. Zaburzenia oddziaływań w systemie RANKL/RANK/OPG mogą być elementem etiopatogenezy osteoporozy pomenopauzalnej [8, 9] stąd wydaje się, iż geny kodujące każdy z tych trzech czynników są dobrze rokującymi genami kandydującymi, które mogą warunkować rozwój osteoporozy. Gen kodujący OPG zlokalizowany na chromosomie 8 (locus 8q23-24, 5 eksonów, 29 kilo par zasad), występuje w pojedynczej kopii [10]. W genie OPG do tej pory zidentyfikowano 12 polimorfizmów. Wiele spośród nich pozostaje w całkowitym sprzężeniu [11, 12].

Cel pracy

Celem pracy było zbadanie częstości występowania polimorfizmów -163A>G w rejonie promotorowym oraz 1181G>C w eksonie 1 genu kodującego osteoprotegerynę w grupie kobiet po menopauzie, ocena związku badanych wariantów genetycznych z parametrami obrotu kostnego i zaawansowania osteoporozy oraz ocena znaczenia badanych wariantów genetycznych w etiopatogenezie osteoporozy.

Polimorfizm genu kodującego osteoprotegerynę a występowanie osteoporozy...

Materiał i metody

Badaniem objęto 310 niespokrewnionych kobiet rasy kaukaskiej po menopauzie (54,48±8,53 lata, mediana 54), które zgłosiły się do Pracowni Densytometrii Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu w latach 2004-2006. Pacjentki zakwalifikowano do trzech podgrup pod względem wartości współczynnika *t-score*: 139 kobiet z osteoporozą (*t-score* < -2,5, 56,06±8,83 lata, mediana 56), 107 kobiet z osteopenią (*t-score* pomiędzy -2,5 a -1, 53,27±8,09 lat, mediana 54), 64 zdrowych kobiet (*t-score* > -1, 53,38±8,22 lata, mediana 54). Kryterium kwalifikującym do badania było wystąpienie menopauzy co najmniej przed rokiem. Z badania wykluczono kobiety, u których wcześniej przeprowadzona została operacja obustronnego usunięcia jajników, kobiety przyjmujące leki mogące mieć wpływ na metabolizm kostny (hormonalna terapia, selektywne modulatory receptorów estrogenowych, kalcytonina, bisfosfoniany, hormony tarczycy, sterydy, heparyna, leki przeciwpadaczkowe, analogi GnRH, tibolon) oraz kobiety z chorobami wpływającymi na gęstość i utratę masy kostnej (zaburzenia endokrynologiczne i metaboliczne, choroby hematologiczne, nowotworowe, choroby nerek, autoimmunologiczne oraz tkanki łącznej).

Wszystkie kobiety zostały szczegółowo poinformowane o zakresie i celu prowadzonych badań i wyraziły zgodę na udział w badaniach. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (1426/04).

Na podstawie przeprowadzonych badań densytometrycznych (metoda podwójnej absorpcjometrii rentgenowskiej (DXA – *dual energy X-ray absorptiometry*), aparat LUNAR DPX 100, Lunar Corp., Madison, USA) obliczone zostały parametry opisujące stan tkanki kostnej: wartość gęstości mineralnej kości (BMD – *bone mineral density*) w odcinku lędźwiowym kręgosłupa L2-L4, a także współczynniki: *t-score* oraz *z-score*. Obliczono również wskaźniki średniej gęstości mineralnej kości w porównaniu do średniej dla młodych dorosłych (YA – *young adults*) oraz średniej gęstości mineralnej kości w porównaniu do średniej dla danego wieku (AM – *age matched*). Dodatkowo wyznaczono wskaźnik masy ciała (BMI – *body mass index*) na podstawie pomiaru masy ciała i wzrostu.

Częstość występowania polimorfizmów: -163A>G i 1181G>C genu OPG zbadano przy zastosowaniu reakcji łańcuchowej polimerazy oraz polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (PCR/RFLP – *polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism*). W celu amplifikacji wybranych fragmentów genów przeprowadzono reakcję PCR z zastosowaniem 2 starterów (Tib MolBiol, Polska). (Tabela I).

Warunki reakcji PCR dla obydwu badanych polimorfizmów genu OPG przedstawiono w tabeli II.

Uzyskane fragmenty genu osteoprotegeryny o wielkości 355 par zasad (pz) obejmującego rejon promotory oraz o wielkości 220 pz obejmujący ekson 1, poddawano hydrolizie enzymami restrykcyjnymi (odpowiednio: AseI i SpeI). W przypadku polimorfizmu -163A>G obecność genotypu AA rozpoznawano przy obecności prążków wielkości 147 oraz

Tabela I. Zastosowane startery i długości produktów PCR.

Polimorfizm	Sekwencje starterów*	Długość produktu po amplifikacji
-163A>G	F: 5' -CTT GAA CAC TTG GCC CTG AT-3' R: 5' -GCA GAG TGA AAA TTG GAC TGC-3'	355 pz
1181G>C	F: 5' -GTT TCC GGG GAC CAC AAT GAA CTA-3' R: 5' -TAG GGG AAG CAT GGC ATA ACT TGA-3'	220 pz

*startery zaprojektowano przy użyciu programu Oligo 4.0 (National Biosciences)

Tabela II. Warunki reakcji PCR.

Faza reakcji PCR	Temp. i czas - polimorfizm -163A>G	Temp. i czas - polimorfizm 1181G>C	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	95°C, 4 min.	95°C, 4 min.	1
Denaturacja	95°C, 40 sek.	95°C, 40 sek.	35
Hybrydyzacja starterów	63°C, 30 sek.	62°C, 35 sek.	
Elongacja	72°C, 1 min.	72°C, 1 min.	
Końcowa elongacja	72°C, 5 min.	72°C, 4 min.	1

208 pz, genotyp heterozygotyczny AG przy wielkości prążków 355, 208 oraz 147 pz, natomiast genotyp GG w obecności prążka wielkości 355 pz. Dla polimorfizmu 1188C>G obecność genotypu CC rozpoznawano przy obecności prążka wielkości 220 pz, genotyp heterozygotyczny GC 220 pz, 199 pz, 21 pz, natomiast genotyp GG w obecności dwóch prążków wielkości 199 pz, 21 pz. Analizę otrzymanych fragmentów restrykcyjnych przeprowadzono przy pomocy elektroforezy w żelu agarozowym (odpowiednio 2,5% oraz 3% żel agarozowy, napięcie około 70V). Produkty rozdziatu elektroforetycznego oceniano poprzez wizualizację w świetle UV, wykorzystując w tym celu system dokumentacji i komputerowej analizy obrazu UVI – KS4000/ Image PC firmy Syngen Biotech Molecular Biology Instruments.

Do analizy statystycznej otrzymanych w pracy wyników częstości występowania genotypów i polimorficznych alleli badanych genów, zastosowano program statystyczny SPSS 14.0 PL dla Windows. Za statystycznie istotną przyjęto wartość $p < 0,05$. W celu oceny częstości występowania haplotypów polimorfizmów genu osteoprotegeryny zastosowano program PHASE.

Wyniki

W badanej populacji kobiet po menopauzie wiek pomiędzy podgrupami z osteoporozą, osteopenią oraz prawidłową masą kostną nie różnił się istotnie. Obserwowano natomiast różnice statystycznie istotne w stosunku do masy ciała i wzrostu ($p < 0,001$) oraz wskaźnika BMI ($p = 0,004$). Również parametry związane z gęstością kostną: BMD L2-L4, BMD L2-L4 YA (%), BMD L2-L4 AM (%), *t-score*, *z-score*, różniły się statystycznie istotnie ($p < 0,001$).

Tabela III. Porównanie częstości występowania genotypów polimorfizmów -163A>G oraz 1181G>C dla genu OPG w grupie kobiet z osteopenią, osteoporozą i w grupie kobiet z prawidłowym t-score.

Genotyp	Grupa kobiet z osteoporozą n=139		Grupa kobiet z osteopenią n=107		Grupa kobiet z osteopenią/ osteoporozą n=246		Grupa kobiet z prawidłowym t-score n=64	
	Wartość obserwowana n (%)	Wartość oczekiwana (%)	Wartość obserwowana n (%)	Wartość oczekiwana (%)	Wartość obserwowana n (%)	Wartość oczekiwana (%)	Wartość obserwowana n (%)	Wartość oczekiwana (%)
polimorfizm -163A>G								
AA	101 (72,7)	73,8	82 (76,6)	75,5	183 (74,4)	74,6	51 (79,7)	79,4
AG	37 (26,6)	24,2	22 (20,6)	22,8	59 (24,0)	23,5	12 (18,7)	19,4
GG	1 (0,7)	2,0	3 (2,8)	1,7	4 (1,6)	1,9	1 (1,6)	1,2
Allele								
A	239 (85,9)	-	186 (86,9)	-	425 (86,4)	-	114 (89,1)	-
G	39 (14,1)	-	28 (13,1)	-	67 (13,6)	-	14 (10,9)	-
polimorfizm 1181G>C								
Genotyp								
GG	27 (19,4)	20,9	18 (16,8)	19,3	45 (18,3)	20,2	12 (18,8)	20,5
GC	73 (52,5)	49,6	58 (54,2)	49,3	131 (53,2)	49,5	34 (53,1)	49,6
CC	39 (28,1)	29,5	31 (29,0)	31,4	70 (28,5)	30,3	18 (28,1)	29,9
Allele								
G	127 (45,7)	-	94 (43,9)	-	221 (44,9)	-	58 (45,3)	-
C	151 (54,3)	-	120 (56,1)	-	271 (55,1)	-	70 (54,7)	-

W przypadku polimorfizmu -163A>G zauważono częstsze występowanie heterozygot AG w grupie kobiet z osteoporozą (26,6% vs 18,7% w grupie z prawidłową wartością t-score, ns), a także mniej częste występowanie homozygot dominujących AA (72,7 vs 79,7%, ns) w porównaniu do grupy kobiet z prawidłowym t-score. Częstość występowania zmutowanego allele G była nieznacznie wyższa w podgrupie z osteoporozą (14,1 vs 10,9%, ns). (Tabela III).

Dla polimorfizmu 1181G>C nie stwierdzono różnic w występowaniu heterozygotycznego genotypu GC (52,5% oraz 54,2% vs 53,1% w grupie z prawidłową wartością t-score, ns), homozygotycznego genotypu CC (28,1% oraz 29,0% vs 28,1%, ns) oraz zmutowanego allele C (54,3 oraz 56,1 vs 54,7%, ns) pomiędzy badanymi grupami kobiet z osteoporozą, osteopenią oraz kontrolną. We wszystkich analizowanych przypadkach wartości obserwowane były zgodne z wartościami oczekiwanymi wyliczonymi na podstawie prawa Hardy-Weinberga. (Tabela III).

Oprócz badania częstości występowania pojedynczych polimorfizmów genu białka OPG podjęto próbę całościowego spojrzenia na wzajemne relacje polimorfizmów -163A>G oraz 1181G>C w badanej grupie poprzez ocenę częstości występowania haplotypów. Częstości występowania poszczególnych haplotypów w badanych podgrupach były podobne i nie różniły się statystycznie istotnie. (Tabela IV).

Dokonano również porównania średnich wartości parametrów obrotu kostnego dla poszczególnych genotypów badanych polimorfizmów -163A>G oraz 1181G>C genu białka OPG.

W żadnej z podgrup kobiet z osteoporozą, osteopenią oraz z prawidłową wartością t-score nie zaobserwowano korelacji

pomiędzy wartościami badanych parametrów a częstością pojawiania się genotypów zawierających zmutowane allele. (Tabela V i VI).

Dyskusja

W zrozumieniu patomechanizmów powstawania osteoporozy istotny aspekt badawczy stanowić może diagnostyka obecności polimorfizmów genetycznych, bądź też ich wpływu na wartości parametrów określających stan tkanki kostnej u kobiet po menopauzie [13, 14].

Wpływ obecności polimorfizmów -163A>G oraz 1181G>C genu OPG na gęstość mineralną kości nadal pozostaje niejasny. W przypadku polimorfizmu 1181G>C sugeruje się, że zamiana trzeciego aminokwasu w kodonie białka OPG z zasadowej lizyny na polarną asparaginę może powodować zmiany w kinetyce wydzielania tej proteiny. Ekson 1, w którym występuje ten polimorfizm koduje peptyd sygnałowy dla OPG niezbędny dla prawidłowego przebiegu jego sekrecji. Wspomniana substytucja aminokwasowa w łańcuchu białkowym może więc powodować upośledzenie sekrecji białka OPG [1, 6].

W niniejszej pracy rozkład częstości występowania genotypów polimorfizmu -163A>G oraz 1181G>C nie wykazał statystycznie istotnych różnic w badanych podgrupach kobiet z osteoporozą, osteopenią oraz z prawidłowymi wartościami t-score. Jedynie w zakresie polimorfizmu -163A>G obserwowaliśmy przewagę heterozygot AG oraz zmutowanego allele G w grupie kobiet z osteoporozą. Wyniki te wyznaczone są w populacji kobiet polskich po raz pierwszy, stąd na obecnym etapie trudno się jednoznacznie do nich ustosunkować.

Polimorfizm genu kodującego osteoprotegerynę a występowanie osteoporozy...

Tabela IV. Ilościowe zestawienie obserwowanych haplotypów -163/1181 polimorfizmów genu osteoprotegeryny oszacowane za pomocą programu PHASE.

Haplotyp	Grupa kobiet z osteopenią	Grupa kobiet z osteoporozą	Grupa kobiet z prawidłowym t-score
AC	0,4370	0,4859	0,4663
AG	0,4171	0,3848	0,3922
GC	0,0837	0,0747	0,0766
GG	0,0621	0,0546	0,0648

Tabela V. Porównanie wartości średnich parametrów klinicznych dla poszczególnych genotypów polimorfizmu -163A>G genu OPG w badanych grupach kobiet.

	Grupa kobiet z osteoporozą n=139			Grupa kobiet z osteopenią n=107			Grupa kobiet z prawidłowym t-score n=64		
	AA	AG	GG	AA	AG	GG	AA	AG	GG
-163A>G									
n	101	37	1	82	22	3	51	12	1
t-score	-3,11 ±0,53	-3,26 ±0,56	-4,24	-1,79 ±0,42	-1,81 ±0,48	-2,04 ±0,11	0,08 ±0,95	-0,08 ±0,45	1,47
z-score	-4,34 ±18,65	-1,70 ±0,84	-1,74	-0,80 ±0,68	-0,97 ±0,65	-0,77 ±0,04	0,70 ±1,16	0,75 ±0,42	-
masa ciała (kg)	60,89 ±9,16	61,8 ±8,95	46,0	65,68 ±9,87	63,95 ±15,49	61,33 ±5,69	67,61 ±11,77	74,64 ±14,68	67,0
wzrost (cm)	160,2 ±5,04	160,35 ±5,49	155,0	163,27 ±5,25	161,27 ±4,31	162,67 ±1,15	162,65 ±5,65	165,18 ±7,59	160,0
BMI (kg/m ²)	23,69 ±3,14	24,01 ±3,01	19,15	24,61 ±3,35	24,57 ±5,79	23,17 ±1,93	25,59 ±4,48	27,31 ±4,93	26,17
BMD L2-L4 (g/cm ²)	0,82 ±0,07	0,81 ±0,07	0,69	0,98 ±0,05	0,98 ±0,05	0,96 ±0,02	1,21 ±0,10	1,20 ±0,06	1,38
BMD L2-L4 YA (%)	68,72 ±5,19	67,4 ±5,44	58,0	81,81 ±4,34	81,8 ±4,98	79,6 ±1,52	100,6 ±8,48	99,7 ±4,55	115,0
BMD L2-L4 AM (%)	78,62 ±7,71	76,6 ±5,20	77,0	89,16 ±6,72	89,6 ±6,97	88,33 ±3,79	108,96 ±10,47	106,2 ±7,63	125,0

Tabela VI. Porównanie wartości średnich parametrów klinicznych dla poszczególnych genotypów polimorfizmu 1181G>G genu OPG w badanych grupach kobiet.

	Grupa kobiet z osteoporozą n=139			Grupa kobiet z osteopenią n=107			Grupa kobiet z prawidłowym t-score n=64		
	GG	GC	CC	GG	GC	CC	GG	GC	CC
1181G>G									
n	27	73	39	18	58	31	14	33	17
t-score	-3,15 ±0,63	-3,21 ±0,54	-3,05 ±0,47	-1,9 ±0,39	-1,79 ±0,45	-1,75 ±0,44	-0,14 ±0,55	-0,08 ±1,027	0,32 ±0,82
z-score	-9,53 ±31,61	-1,79 ±0,61	-1,15 ±0,52	-0,97 ±0,49	-0,85 ±0,69	-0,71 ±0,71	0,26 ±0,63	0,51 ±1,09	0,85 ±1,23
masa ciała (kg)	60,32 ±9,88	62,68 ±8,22	57,58 ±9,83	66,56 ±14,85	64,54 ±10,07	66,17 ±10,52	66,55 ±12,54	67,23 ±12,81	71,83 ±11,44
wzrost (cm)	160,0 ±5,01	160,86 ±4,27	158,79 ± 6,8	161,61 ±4,43	162,74 ±5,15	163,9 ±5,16	163,54 ±5,73	162,6 ±6,45	163,70 ±5,77
BMI (kg/m ²)	23,57 ±3,76	24,19 ±2,70	22,77 ±3,14	25,44 ±5,45	24,36 ±3,58	24,60 ±3,48	24,83 ±4,11	25,49 ±5,00	26,80 ±4,01
BMD L2-L4 (g/cm ²)	0,81 ±0,08	0,81 ±0,07	0,83 ±0,06	0,97 ±0,048	0,98 ±0,05	0,98 ±0,06	1,19 ±0,06	1,18 ±0,10	1,24 ±0,10
BMD L2-L4 YA (%)	68,0 ±6,03	67,95 ±5,37	69,21 ±4,69	81,0 ±4,20	81,9 ±4,42	82,0 ±4,73	99,3 ±5,08	98,46 ±8,41	103,22 ± 8,30
BMD L2-L4 AM (%)	77,47 ±7,6	77,33 ±6,42	80,47 ±8,1	88,35 ±5,82	89,69 ±6,34	89,04 ±8,01	105,7 ±6,18	106,58 ±10,54	111,60 ±11,00

W badaniach przeprowadzonych w populacjach kobiet maltańskich, koreańskich oraz hiszpańskich z osteoporozą nie wykazano statystycznie istotnych różnic w częstości pojawiania się badanego polimorfizmu $-163A>G$ genu OPG [15, 16, 17, 18]. Natomiast w badaniu Langdahl i wsp. przeprowadzonym w populacji duńskich kobiet wykazano statystycznie istotnie częstsze występowanie zmutowanych homozygot GG , jak również allele G w grupie kobiet z osteoporozą w porównaniu do grupy kontrolnej. Jednocześnie wykazano występowanie statystycznie niższych wartości BMD L2-L4 u kobiet z osteoporozą z wariantem allele G w porównaniu do grupy kontrolnej. W pracy tej wykazano również mniej częste występowanie zmutowanego genotypu CC polimorfizmu $1181G>C$ w grupie pacjentek z osteoporozą i złamaniami kości [11].

Nie mniej istotna jest ocena wpływu polimorfizmów genu OPG na parametry obrotu kostnego. W naszym badaniu nie obserwowaliśmy istotnej statystycznie korelacji częstości występowania zmutowanych genotypów badanych polimorfizmów z gęstością mineralną kości oraz innymi współczynnikami. W badaniach przeprowadzonych przez Vidal i wsp. w zakresie polimorfizmu $1181G>C$ odnotowano częstsze występowanie ($p=ns$) homozygotycznego genotypu typu dzikiego GG w grupie osób o obniżonym wskaźniku BMD w stosunku do grupy kontrolnej z normalnymi jego wartościami [15].

Podobne wyniki uzyskano także w badaniach Langdahl i wsp. gdzie statystycznie istotne okazały się różnice pomiędzy BMD dla genotypów GC oraz CC polimorfizmu $1181G>C$ – najwyższe wartości BMD odnotowano dla homozygot CC podczas gdy u kobiet będących nosicielkami genotypu GG rejestrowano niższe wartości BMD L2-L4 [11]. Podobną zależność odnotowali Kim i wsp. którzy wykazali, że BMD w odcinku lędźwiowym kręgosłupa u kobiet z genotypem CC było znacząco wyższe niż u kobiet z genotypem GC lub GG [16].

W badaniach przeprowadzonych przez Choi i wsp., gdzie obserwowano wzrost wartości BMD wraz ze zwiększeniem częstości allele C (uzyskano statystycznie istotny wynik, także po skorygowaniu danych względem wieku oraz BMI), kobiety z genotypem CC miały o 7% wyższe BMD w dystalnej części kości promieniowej i 10% wyższe BMD w kości piętowej w porównaniu do grupy z genotypem GG [17]. W sprzeczności z powyższymi danymi pozostają wyniki uzyskane przez Wynne i wsp. gdzie w grupie kobiet po menopauzie allele C wydaje się być czynnikiem ryzyka dla niskich wartości BMD. W badaniach tych wykazano występowanie o 14,4% niższych wartości BMD w szyjce kości udowej oraz o 14,8% niższego BMD w odcinku lędźwiowym kręgosłupa w grupie kobiet nosicielek genotypu homozygotycznego CC lub heterozygotycznego GC polimorfizmu $1181G>C$ [19].

Zaprezentowane w naszej pracy wyniki dotyczące populacji kobiet polskich wskazują na brak wpływu polimorfizmu $1181G>C$ w eksonie 1 oraz możliwy, słaby wpływ polimorfizmu $-163A>G$ w promotorze genu OPG na rozwój osteoporozy. Jednocześnie częstość występowania genotypów polimorfizmu $-163A>G$ oraz $1181G>C$ w grupie kontrolnej z prawidłowym t -score nie odbiegała zasadniczo od częstości alleli prezentowanych w innych populacjach rasy kaukaskiej [11, 15, 18]. Nieznaczące różnice pojawiały się jedynie w porównaniu do rasy azjatyckiej [17].

Brak różnic statystycznie istotnych w częstości występowania badanych polimorfizmów genu OPG w powyższym badaniu może wynikać z niedostatecznie dużej grupy badanych kobiet lub braku takiego związku w badanej populacji. Należy również zauważyć, iż osteoporoza jest chorobą o złożonej etiologii, dlatego też efekty badanych polimorfizmów mogą być maskowane przez działanie innych polimorfizmów genetycznych lub działanie hormonów i cytokin zaangażowanych w proces przebudowy kości [20].

Różnorodne cytokiny ($TNF-\alpha$, $IL-1$, $IL-11$, $IL-17$) przejawiają zdolność wpływania na homeostazę tkanki kostnej poprzez zwiększanie resorpcji kości. Stwierdzono, że regulacja działania systemu sygnałowego RANKL/RANK/OPG jest ściśle powiązana z mediatorami stanów zapalnych, czynnikami wzrostowymi i układem hormonalnym.

W tkance kostnej efektem tej regulacji jest nadmiar RANKL w stosunku do OPG, który wiodzie do wzmożonej aktywności osteoklastów lub odwrotnie nadmiar OPG hamujący procesy resorpcji kostnej. Cytokiny te wpływają więc na szlak RANKL/RANK/OPG zmieniając wzajemny stosunek tych białek i modulując w ten sposób resorpcję kości. Stwierdzono również zwiększoną ekspresję genu oraz biosyntezę białka OPG pod wpływem estrogenu w eksperymentach *in vitro* w osteoblastach ludzkich i szczurzych [21, 22].

Wnioski

Zaobserwowane częstsze występowanie heterozygot AG oraz zmutowanego allele G polimorfizmu $-163A>G$ genu OPG w grupie kobiet z osteoporozą może sugerować znaczenie tego wariantu w rozwoju osteoporozy. Wskazana jest szersza analiza wariantów genetycznych szlaku sygnałowego RANKL/RANK/OPG łącznie z badaniem modulacyjnego wpływu estrogenów, $TNF-\alpha$ oraz niektórych interleukin na rozwój osteoporozy.

Piśmiennictwo

1. Uemura H, Yasui T, Miyatani Y, [et al.]. Circulating profiles of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in postmenopausal women. *J Endocrinol Invest.* 2008, 31, 163-168.
2. Ferrari S. Human genetics of osteoporosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2008, 22, 723-735.
3. Rogers A, Eastell R. Circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor kappaB ligand: clinical utility in metabolic bone disease assessment. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005, 90, 6323-6331.
4. Raisz L. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest.* 2005, 115, 3318-3325.
5. Alvarez-Hernandez D, Naves M, Diaz-Lopez J, [et al.]. Influence of polymorphisms in VDR and COLIA1 genes on the risk of osteoporotic fractures in aged men. *Kidney Int.* 2003, Suppl, 14-18.
6. Delmas P. Treatment of postmenopausal osteoporosis. *Lancet.* 2002, 359, 2018-2026.
7. Simonet W, Lacey D, Dunstan C, [et al.]. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* 1997, 89, 309-319.
8. Qin L, Au SK, Leung P, [et al.]. Baseline BMD and bone loss at distal radius measured by peripheral quantitative computed tomography in peri- and postmenopausal Hong Kong Chinese women. *Osteoporos Int.* 2002, 13, 962-970.
9. Kapczuk K, Sowińska-Przepiera E, Friebe Z. Układ osteoprotegeryna/RANKL/RANK w aspekcie terapii osteoporozy pomenopauzalnej. *Ginekol Pol.* 2003, 74, 323-331.

Polimorfizm genu kodującego osteoprotegerynę a występowanie osteoporozy...

10. Morinaga T, Nakagawa N, Yasuda H, [et al.]. Cloning and characterization of the gene encoding human osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor. *Eur J Biochem.* 1998, 254, 685-691.
11. Langdahl B, Carstens M, Stenkjaer L, [et al.]. Polymorphisms in the osteoprotegerin gene are associated with osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res.* 2002, 17, 1245-1255.
12. Ohmori H, Makita Y, Funamizu M, [et al.]. Linkage and association analyses of the osteoprotegerin gene locus with human osteoporosis. *J Hum Genet.* 2002, 47, 400-406.
13. Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K. Genetyczne czynniki ryzyka osteoporozy - polimorfizm genu receptora witaminy D. *Ginekol Pol.* 2004, 75, 404-411.
14. Drews K, Seremak-Mrozikiewicz A, Bartkowiak-Wieczorek J, [i wsp.]. Polimorfizm genetyczny receptora estrogenowego α - czynnik ryzyka osteoporozy? *Ginekol Pol.* 2006, 77, 72-78.
15. Vidal C, Brincat M, Xuereb Anastasi A. TNFRSF11B gene variants and bone mineral density in postmenopausal women in Malta. *Maturitas.* 2006, 53, 386-395.
16. Kim J, Kim J, Kim J, [et al.]. Association between osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear faktor - kappa B (RANK), and RANKL ligand (RANKL) gene polymorphisms and circulating OPG, soluble RANKL levels, and bone mineral density in Korean postmenopausal women. *Menopause.* 2007, 14, 913-918.
17. Choi J, Shin A, Park SK, [et al.]. Genetic polymorphisms of OPG, RANK, and ESR1 and bone mineral density in Korean postmenopausal women. *Calcif Tissue Int.* 2005, 77, 152-159.
18. Garcia-Unzueta M, Rancho J, Zarrabellia M, [et al.]. Association of the 163A/G and 1181G/C Osteoprotegerin Polymorphism with Bone Mineral Density. *Horm Metab Res.* 2008, 40, 219-224.
19. Wynne F, Drummond F, O'Sullivan K, [et al.]. Investigation of the genetic influence of the OPG, VDR (Fok1), and COL1A1 Sp1 polymorphisms on BMD in the Irish population. *Calcif Tissue Int.* 2002, 71, 26-35.
20. Recker R. Genetic research in osteoporosis: Where are we? Where should we go next? *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2004, 4, 86-90.
21. Tanaka Y, Nakayamada S, Okada Y. Osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling and inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2005, 4, 325-328.
22. Weitzmann M, Pacifici R. Estrogen regulation of immune cell bone interactions. *Ann N Y Acad Sci.* 2006, 1068, 256-274.

Mazurska Szkoła USG i Ginekologii



Kursy USG

PLANOWANE KURSY
W MAZURSKIEJ SZKOLE USG I GINEKOLOGII
W 2009 ROKU

23-25.04	Patologia i choroby sutka
03-08.05	USG w ginekologii i położnictwie dla początkujących. Teoria i praktyka.
13-16.05	USG z zastosowaniem technik dopplerowskich w ginekologii i położnictwie
21-23.05	Kolposkopia dla początkujących
03-06.06	Poradnictwo seksuologiczne i antykoncepcyjne w gabinecie ginekologa
18-20.06	Patologia ciąży
26-29.08	Diagnostyka USG w położnictwie dla zaawansowanych
06-11.09	USG w ginekologii i położnictwie dla początkujących. Teoria i praktyka.
17-20.09	Wybrane zagadnienia opieki nad kobietą po 60 roku życia
01-03.10	Kolposkopia dla zaawansowanych
15-18.10	Diagnostyka prenatalna (11-13 tyg. ciąży) z elementami echokardiografii płodu
18-21.11	Diagnostyka USG w położnictwie dla zaawansowanych

ZAPRASZAMY

Mazurska Szkoła USG i Ginekologii
Gemelli S.C., ul. Leśna 18, 12-200 Pisz

Wszelkie informacje oraz zapisy na kursy:

tel.: **0-504 075 804**

www.usg.pisz.pl

e-mail: usg@usg.pisz.pl