

Wpływ polimorfizmu genu interleukiny-6 i czynnika martwicy nowotworu α na gęstość mineralną kości kobiet po menopauzie

The influence of interleukin-6 and tumor necrosis factor α gene polymorphisms on bone mineral density in postmenopausal women

Kusek Justyna¹, Seremak-Mrozikiewicz Agnieszka², Drews Krzysztof², Mikołajczak Przemysław³, Czerny Bogusław⁴, Maciejewska Monika¹, Bogacz Anna¹, Derebecka-Hołyś Natalia¹, Barlik Magdalena⁵, Mrozikiewicz Przemysław M.¹

¹ Instytut Roślin i Przetworów Zielarskich w Poznaniu

² Klinika Perinatologii i Chorób Kobięcych, Katedra Perinatologii i Ginekologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

³ Katedra Farmakologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

⁴ Samodzielna Pracownia Toksykologii Leków i Farmakoekonomiki Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie

⁵ Studenckie Koło Naukowe przy Klinice Perinatologii i Chorób Kobięcych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

Streszczenie

Cytokiny prozapalne, interleukina-6 (IL-6) oraz czynnik martwicy nowotworów α (TNF- α) zaangażowane w osteoklastogenezę i odpowiedzialne za proces resorpcji kości, biorą istotny udział w patogenezie osteoporozy. W badaniach *in vitro* wykazano, że polimorfizmy typu pojedynczego nukleotydu genów IL-6 oraz TNF- α mogą wpływać na proces transkrypcji genów, a tym samym na poziom cytokin.

Cel: Ocena wpływu polimorfizmów -174G/C promotora genu IL-6 oraz -308G/A promotora genu TNF- α na wartości gęstości mineralnej kości (BMD) oraz oszacowanie ich związku z występowaniem osteoporozy w populacji kobiet z regionu Wielkopolski.

Materiał i metody: W grupie 267 kobiet w wieku po menopauzie (średnia wieku 58,5 \pm 5,9 lat, średni wiek wystąpienia ostatniej miesiączki 49,8 \pm 3,9 lat) dokonano pomiaru gęstości mineralnej kości w odcinku lędźwiowym kręgosłupa (L2 – L4) za pomocą metody podwójnej absorpcjometrii rentgenowskiej (DXA).

Oznaczenie częstości występowania genotypów przeprowadzono metodą reakcji łańcuchowej polimerazy z zastosowaniem polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (PCR/RFLP) przy użyciu odpowiednich enzymów restrykcyjnych Lwe I oraz Fag I.

Analizowano również związek polimorfizmów badanych genów z wartościami wskaźnika masy ciała (BMI), masy urodzeniowej, wieku wystąpienia pierwszej i ostatniej miesiączki oraz długości lat reprodukcyjnych.

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: 15.03.2008

Zaakceptowano do druku: 21.05.2008

Kusek J, et al.

Wyniki: Nie stwierdzono statystycznie istotnego związku pomiędzy badanymi wariantami genetycznymi a wartością gęstości mineralnej kości BMD w badanej grupie kobiet po menopauzie. Rozkład częstości genotypów był zgodny z prawem Hardy-Weinberga. Nie wykazano również statystycznie istotnych powiązań pomiędzy badanymi w pracy parametrami klinicznymi a występowaniem genotypów IL-6 i TNF- α .

Wnioski: Polimorfizm -174G/C genu IL-6 oraz -308G/A genu TNF- α nie wpływają na wartość gęstości mineralnej kości (BMD) w badanej populacji kobiet z regionu Wielkopolski.

Słowa kluczowe: **osteoporoza / gęstość mineralna kości / interleukina-6 /
/ czynnik martwicy nowotworu α / polimorfizm genetyczny /**

Summary

Proinflammatory cytokines, interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α), involved into osteoclastogenesis and responsible for bone resorption process, participate in the pathogenesis of the osteoporosis. In vitro studies have shown that single nucleotide polymorphisms of IL-6 and TNF- α genes could influence the transcription process of the genes and the cytokines level.

Aim: Assessment of the influence of IL-6 and TNF- α gene polymorphisms on bone mineral density (BMD) and evaluation of their connection with osteoporosis prevalence in women from Wielkopolska region.

Material and methods: In the group of 267 postmenopausal women (average age 58,5 \pm 5,9 years, average age of last period 49,8 \pm 3,9 years) bone mineral density in lumbar spine (L2-L4) was performed using dual energy X-ray absorptiometry (DXA). Genotypes frequencies were determined by polymerase chain reaction with restriction fragment length polymorphism (PCR/RFLP) using restriction enzymes Lwe I and Fag I, respectively.

The connection between the polymorphisms of investigated genes and body mass index, age of menarche and menopause and length of reproductive age had been analyzed as well.

Results: No statistically significant association was found between examined genetic factors and the value of bone mineral density in the investigated group of postmenopausal women. The frequencies of investigated genotypes were in compliance with Hardy-Weinberg equilibrium. The correspondence between evaluated clinical parameters and IL-6 i TNF- α genotypes frequencies has not been proven.

Conclusions: The -174G/C polymorphism in the IL-6 and -308G/A polymorphism in TNF- α genes have no influence on bone mineral density value (BMD) in the investigated population of women from Wielkopolska region.

Key words: **osteoporosis / bone mineral density / interleukin-6 / tumor necrosis factor alpha /
/ genetic polymorphism /**

Wstęp

W związku z wydłużeniem przeciętnej długości życia ludzkiego, szczególnie w krajach Europy Zachodniej i USA, osteoporoza stała się obecnie dużym problemem medycznym i społecznym. Jednocześnie osteoporoza jest chorobą mającą złożone podłoże etiologiczne w którym, oprócz czynników hormonalnych i środowiskowych, istotną rolę pełnią także czynniki genetyczne. Niektóre więc strategie badawcze skupiają się na poszukiwaniu zależności pomiędzy fenotypowymi wyznacznikami osteoporozy a czynnikami genetycznymi [1]. Większość z tych badań koncentruje się na wpływie czynników genetycznych na wartość BMD [2, 3, 4, 5].

W patomechanizmie rozwoju osteoporozy sugeruje się, pośród wielu innych, duży udział czynników kontrolujących proces resorpcji kości. Cytokiny takie jak interleukina 6 (IL-6 – *interleukin 6*) i czynnik martwicy nowotworów alfa (TNF- α – *tumor necrosis factor*), zaangażowane bezpośrednio lub pośrednio we wszystkie etapy osteoklastogenezy, znane są jako jedne z najsilniejszych stymulatorów resorpcji kości [6]. Myszy po ooforektomii, u których wyłączono działanie genów

TNF- α oraz IL-6 nie wykazywały resorpcji kości w przeciwieństwie do zwierząt o niezmienionej funkcji tych genów. Podobnie, podawanie inhibitorów dla IL-6 lub TNF- α , bądź przeciwciał swoistych dla tych cytokin, chroniło gryzonie przed utratą masy kostnej [7]. Obecnie wiadomo już, że cytokiny te wpływają one zarówno na proliferację, jak i różnicowanie prekursorów osteoklastów, wzmagają ilość cykli resorpcji przeprowadzanych przez osteoklasty, mogą indukować osteoblastogenezę, a także zmieniać metabolizm osteoblastów, przyspieszając proces apoptozy [8].

Zarówno w genie IL-6, jak i w genie TNF- α opisane zostały polimorfizmy typu zamiany pojedynczego nukleotydu (SNPs), dla których sugeruje się możliwą korelację z wartością BMD. Szczególnie intensywnie badany jest polimorfizm -174G/C w regionie promotorowym genu kodującego IL-6 oraz miejsce polimorficzne -308G/A w regionie promotorowym genu TNF- α [9, 10]. Są to miejsca przyłączania czynników transkrypcyjnych: NF-IL6 (*nuclear factor*) i CRE (*cAMP response element*) w przypadku genu interleukiny 6 [11] oraz elementu AP-2 dla genu TNF- α [12].

Miejsca te są potencjalnie ważne dla regulacji procesu transkrypcji, podejrzewa się bowiem, iż związek obydwu polimorfizmów z patologią osteoporozy wynika z ich wpływu na stopień transkrypcji genów IL-6 oraz TNF- α , a w konsekwencji na poziom ekspresji i stężenie cyrkulacyjne IL-6 oraz TNF- α w osoczu [13, 14].

Cel pracy

Celem pracy było określenie częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmu -174G/C genu IL-6 oraz polimorfizmu -308G/A genu TNF- α oraz oszacowanie związku pomiędzy tymi polimorfizmami a wartością BMD i występowaniem osteoporozy w populacji kobiet z regionu Wielkopolski.

Materiał i metody

Grupa badana: Grupę badaną stanowiło 267 kobiet (średnia wieku 58,5 \pm 5,9 lat), u których menopauza wystąpiła przynajmniej przed rokiem, i które nie stosowały terapii hormonalnej (HT – *hormonal therapy*) oraz żadnych leków wpływających na masę kostną. Średnia wieku wystąpienia ostatniej miesiączki dla całej grupy wynosiła 49,8 \pm 3,9 lat. Wszystkie kobiety należały do rasy kaukaskiej i pochodziły z regionu Wielkopolski. Kobiety te zakwalifikowano do trzech grup ze względu na wartość współczynnika *t-score*: 110 kobiet z osteoporozą (*t-score* < -2,5), 95 kobiet z osteopenią (*t-score* pomiędzy -2,5 a -1) oraz 62 zdrowych kobiet (*t-score* > -1).

Z grupy badanej wyłączono pacjentki po przebytej operacji obustronnej ooforektomii oraz te, u których występowały choroby o potencjalnym wpływie na gęstość i utratę masy kostnej. Z pacjentkami przeprowadzono szczegółowy wywiad dotyczący występowania chorób, stosowania leków, wieku wystąpienia pierwszej i ostatniej miesiączki, liczby ciąż oraz masy urodzeniowej. Na podstawie wzrostu i masy ciała obliczano wskaźnik masy ciała (BMI – *body mass index*) ze standardowego wzoru. Po ocenie częstości występowania polimorfizmów badanych genów badano ich związek z wartościami BMI, masy urodzeniowej, wieku wystąpienia pierwszej i ostatniej miesiączki oraz długości lat reprodukcyjnych. Wszystkie pacjentki zostały poinformowane o celu i zakresie badań i wyraziły zgodę na uczestnictwo w badaniach. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

Analiza densytometryczna: Gęstość mineralną kości (BMD – *bone mineral density*) w odcinku lędźwiowym L2 do L4 kręgosłupa oznaczono za pomocą metody podwójnej absorpcjometrii rentgenowskiej (DXA – *dual energy X-ray absorptiometry*). Badania przeprowadzono za pomocą aparatu LUNAR DPX 100 (Lunar Corp., Madison, USA). Bezzględne wyniki pomiarów gęstości mineralnej kości podano w g/cm², a następnie przedstawiono za pomocą wskaźników *t-score* i *z-score*, które odnoszą się do wartości średnich dla BMD w danej grupie wiekowej. Oznaczono również wskaźniki średniej gęstości mineralnej kości badanych w porównaniu do średniej dla młodych dorosłych (YA – *young adults*) i średniej dla danego wieku (AM – *age matched*).

Analiza genetyczna:

Do oznaczenia częstości występowania genotypów obydwu badanych polimorfizmów: -174G/C w genie IL-6 oraz -308G/A w genie TNF- α wykorzystano reakcję łańcuchową

polimerazy (PCR – *polymerase chain reaction*) oraz reakcję polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP – *restriction fragment length polymorphism*). Badany DNA wyizolowany został z leukocytów krwi obwodowej pacjentek za pomocą kitu QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen Inc., Niemcy). Warunki reakcji PCR dla fragmentu promotora genu IL-6 i TNF- α oraz sekwencje starterów (Tib MolBiol, Polska) przedstawiono w tabeli I oraz II.

Do trawienia produktów reakcji PCR wykorzystano enzymy restrykcyjne: *LweI* dla oznaczenia polimorfizmu genu IL-6 (Fermentas, Litwa) oraz *FaqI* dla polimorfizmu genu TNF- α (Fermentas, Litwa). Próby inkubowano przez 16 godzin w temperaturze 37°C. Fragmenty otrzymane w wyniku trawienia przedstawiono w tabeli III.

Produkty reakcji hydrolizy rozdzielano elektroforetycznie na żelu agarozowym (Sigma Aldrich, USA) z dodatkiem bromku etydyny (Sigma Aldrich, USA) oraz dokumentowano przy użyciu systemu UV1-KS4000i/Image PC.

Analiza statystyczna: Do statystycznego opracowania otrzymanych wyników zastosowano program statystyczny SPSS 12.5 PL dla Windows oraz program STATISTICA 5.1 PL dla Windows. Wpływ polimorfizmów genów IL-6 i TNF- α na wartości parametrów klinicznych badano stosując jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA. Szczegółową analizę danych post-hoc NIR (najmniejszych istotnych różnic) wykonywano za pomocą testu Bonferroniego, przy założeniu prawdopodobieństwa istotności różnic $p < 0,05$.

Wyniki

Parametry związane z gęstością kostną: BMD L2-L4, *t-score*, *z-score*, BMD L2-L4 YA (%) oraz BMD L2-L4 AM (%) różniły się znamiennej pomiędzy badanymi grupami kobiet z osteoporozą, osteopenią oraz z prawidłową masą kostną ($p < 0,001$).

Analiza częstości genotypów w poszczególnych grupach kobiet, podzielonych na pacjentki z osteoporozą, osteopenią i z prawidłową wartością *t-score* nie wykazała istotnych statystycznie różnic ($p = ns$). Obserwowano jedynie niewielkiego stopnia przewagę występowania genotypu zmutowanego AA polimorfizmu -308G/A genu TNF- α w grupie z osteopenią (4,2%) oraz z osteoporozą (2,7%) w porównaniu z grupą kontrolną (różnica nieistotna statystycznie). Rozkład częstości genotypów był zgodny z prawem Hardy-Weinberga. (Tabela IV).

Częstości poszczególnych alleli dla polimorfizmów genu IL-6 i TNF- α , nie odbiegały od częstości alleli prezentowanych w populacjach rasy kaukaskiej.

Jednocześnie jednoczynnikowa analiza ANOVA dla genotypów IL-6 i TNF- α nie wykazała istotnych statystycznie powiązań z badanymi w pracy parametrami klinicznymi.

Dyskusja

Wpływ polimorfizmów genów badanych w pracy cytokin wynika z ich możliwego wpływu na procesy związane z resorpcją kości. Możliwy związek polimorfizmu -174G/C genu IL-6 z rozwojem osteoporozy związany jest z regulacją transkrypcji genów poprzez przyłączanie do odcinka promotorego czynników transkrypcyjnych. Wpływa to na stopień transkrypcji cytokiny IL-6, a w konsekwencji na poziom ekspresji i stężenie cyrkulacyjne IL-6 w osoczu.

Kusek J, et al.

Tabela I. Warunki reakcji PCR dla badanych polimorfizmów: IL-6 oraz TNF- α .

Reakcja	Temperatura i czas dla TNF- α	Temperatura i czas dla IL-6	Ilość cykli
denaturacja wstępna	95°C; 2min.	94°C; 2min.	1
denaturacja	93°C; 1min.	94°C; 45sek.	30 cykli dla IL-6 35 cykli dla TNF- α
hybrydyzacja starterów	63,5°C; 30sek.	63°C; 45sek.	
elongacja	72°C; 30sek	72°C; 45sek.	
synteza końcowa	72°C; 7min.	72°C; 7min.	1

Tabela II. Zastosowane startery i długości produktów reakcji PCR.

Amplifikowany gen	Sekwencje starterów	Długość produktu amplifikacji
TNF- α	F:5'-AAATGGAGGCAATAGGTTTTGAGGGGCTTG-3' R:5'-TACCCCTCACACTCCCCATCCTCCCTGATC-3'	131pz
IL-6	F:5'-AATCTTTGTTGGAGGGTGAG-3' R:5'-ACATGCCAAGTGCTGAGTCA-3'	207pz

Tabela III. Warunki hydrolizy restrykcyjnej dla enzymów *FaqI* i *LweI*.

Enzym	Rozpoznawana sekwencja	Wielkości uzyskanych fragmentów
<i>LweI</i> (dla genu IL-6)	5'-GCATC (N) ₅ ' - 3' 3'-CGTAG (N) ₉ ' - 5'	homozygota dominująca (114pz, 93pz) heterozygota (207pz, 114pz, 93pz) homozygota recesywna (207pz)
<i>FaqI</i> (dla genu TNF- α)	5'-GGGAC (N) ₁₀ ' - 3' 3'-CCCTG (N) ₁₄ ' - 5'	homozygota dominująca (82pz, 49pz) heterozygota (131pz, 82pz, 49pz) homozygota recesywna (131pz)

We wcześniejszych publikacjach wykazano, że transkrypcja genu IL-6 w komórkach HeLa jest zmniejszona w obecności allele C w miejscu promotorowym -174 [15]. Jednakże uzyskane wyniki w tym zakresie są niejednoznaczne i wymagają dalszego wyjaśnienia [12]. W przypadku genu TNF- α przyłączenie do odcinka promotorowego czynnika transkrypcyjnego m.in. elementu AP-2 [11], w przypadku nosicielstwa rzadko występującego allele A w miejscu -308, wiąże się z obecnością wyższego poziomu TNF- α w osoczu [16].

Wyniki niniejszej pracy sugerują, iż obydwa polimorfizmy: w miejscu -174 promotora genu IL-6 oraz w miejscu -308 genu TNF- α nie wpływają na wartość BMD w odcinku

lędźwiowym kręgosłupa oraz na wartość innych parametrów kostnych (*t-score*, *z-score*, L2-L4 AM, L2-L4 YA) w całej badanej grupie kobiet, jak również w poszczególnych grupach pacjentek, wydzielonych pod względem wskaźnika *t-score*. Porównanie częstości genotypów pomiędzy grupą kobiet z prawidłowym *t-score* a grupą kobiet z osteopenią i osteoporozą wskazuje na brak wpływu polimorfizmu genu IL-6 na wystąpienie osteoporozy. Podobnie w pracach innych autorów odnotowano, iż różnice w wartościach BMD pomiędzy pacjentkami nosicielkami różnych genotypów IL-6 są nieistotne statystycznie, w przeciwieństwie do wyników, jakie otrzymano dla markerów resorpcji kości.

Wpływ polimorfizmu genu interleukiny-6...

Tabela IV. Porównanie częstości występowania genotypów polimorfizmu -174G/C dla genu IL-6 oraz polimorfizmu -308G/A dla genu TNF- α w grupie kobiet z osteoporozą, osteopenią i w grupie kobiet z prawidłowym *t-score*.

Genotypy	Osteoporoza		Osteopenia		Prawidłowa wartość <i>t-score</i>	
	Wartość obserwowana n (%)	Wartość oczekiwana (%)	Wartość obserwowana n (%)	Wartość oczekiwana (%)	Wartość obserwowana n (%)	Wartość oczekiwana (%)
-174G/C IL-6						
GG	24 (21,8)	25,5	30 (31,6)	27,7	12 (19,4)	23,4
GC	63 (57,3)	50,0	40 (42,1)	49,9	36 (58,1)	49,9
CC	23 (20,9)	24,5	25 (26,3)	22,4	14 (22,6)	26,6
-308G/A TNF-α						
GG	81 (73,0)	72,5	67 (69,8)	68,6	40 (66,7)	68,1
GA	27 (24,3)	25,3	25 (26,0)	28,5	19 (31,7)	28,9
AA	3 (2,7)	2,2	4 (4,2)	2,9	1 (1,7)	3,1

Zauważono jednak tendencję do współwystępowania wyższych wartości BMD u kobiet z genotypem zmutowanym CC, w porównaniu do pacjentek o genotypie homozygotycznym GG i heterozygotycznym GC. Ponadto zależność pomiędzy wartościami BMD a genotypami dla polimorfizmu -174G/C wzrastała wraz z wiekiem pacjentek [10, 17]. Jednak po skorygowaniu danych względem wzrostu pacjentek i zmiany masy ciała, różnice nie były statystycznie istotne [17]. Obecnie sugeruje się, że wpływ polimorfizmu -174G/C genu IL-6 na wartość BMD może być ograniczony do określonych subpopulacji, np. kobiet w późnym wieku po menopauzie bądź kobiet nieprzyjmujących suplementów wapnia i niestosujących terapii hormonalnej [18]. Opinie na temat wpływu genotypów IL-6 na gęstość mineralną kości u mężczyzn nadal pozostają sprzeczne [10, 19].

W grupie kobiet z osteopenią zaobserwowano występowanie wyższych wartości dla masy urodzeniowej u osób z genotypem -174GC genu IL-6 w porównaniu do osób z genotypem -174CC ($p = 0,05$). Zauważono słabą tendencję do późniejszego występowania ostatniej miesiączki u kobiet z genotypem -308GG w porównaniu do kobiet nosicielek genotypu -308GA genu TNF- α ($p = 0,067$) w grupie z osteoporozą. Poza tym, nie stwierdzono innych zależności w żadnej z pozostałych grup badanych. W niniejszej pracy nie zaobserwowano także związku pomiędzy zmutowanymi genotypami -174CC genu IL-6 oraz genotypem -308AA genu TNF- α a występowaniem wyższych wartości BMI, mimo iż takie zależności wskazywano już wcześniej w niektórych pracach [20]. W niniejszej pracy zaobserwowano istotny statystycznie wpływ genotypu w pozycji -308 genu TNF- α na wartości *t-score*, w grupie kobiet zdrowych ($p = 0,002$). Jednakże wyniki te są niereprezentatywne ze względu na małą ilość prób (dla genotypu -308AA, $n = 1$). Nie stwierdzono znamiennych statystycznie różnic dla wartości innych badanych parametrów kostnych.

Niniejsze rezultaty pozostają w zgodzie z wynikami uzyskanymi przez innych badaczy [21, 22]. Można przypuszczać, iż brak potwierdzenia tych rezultatów wynika z niedostatecznej ilości analizowanych pacjentek lub braku takiego związku w badanej populacji.

Dyskusyjnym jest również, czy sam pomiar BMD jest wystarczający do oszacowania wpływu polimorfizmów genów IL-6 i TNF- α na procesy resorpcji kości w osteoporozie [17]. Uważa się, iż 5% różnica w wartościach BMD, spowodowana wpływem różnych wariantów polimorfizmu -174G/C, może się uwidocznić dopiero po około 10 latach od momentu wykrycia zmian stężenia markerów resorpcji kości sugerujących istnienie zmian w tkance kostnej. Jest to zgodne z hipotezą, iż proces resorpcji tkanki kostnej wiąże się z niszczeniem sieci elementów kostnych, które nie są wykrywane przez pomiar BMD [23]. W tym kontekście, metodyka zastosowana w niniejszej pracy może być niewystarczająca do jednoznacznego wykluczenia wpływu polimorfizmów: -174G/C w genie IL-6 oraz -308G/A w genie TNF- α na ryzyko zachorowalności na osteoporozę.

Należy również podkreślić, iż badanie wpływu pojedynczych polimorfizmów na patogenezę chorób jest niewystarczające, gdyż mogą one pozostawać w sprzężeniu z miejscami polimorficznymi tego samego lub innych genów [4, 5]. Polimorfizmy bowiem mogą oddziaływać wspólnie, a ogólny wpływ na poziom transkrypcji jest wypadkową synergistycznych oddziaływań poszczególnych wariantów genowych [1, 4].

Wnioski

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy sugerują, że polimorfizm -174G/C genu interleukiny-6 oraz polimorfizm -308G/A genu czynnika martwicy nowotworu a nie wpływają na wartości gęstości mineralnej kości. Ponadto nie stwierdzono statystycznie istotnego związku badanych polimorfizmów

Kusek J, et al.

z zachorowalnością na osteoporozę. Niniejsze rezultaty wymagają dalszego potwierdzenia wśród innych populacji, celem oszacowania wpływ badanych wariantów genetycznych na parametry kostne i oceny ich związku z patogenezą osteoporozy.

Piśmiennictwo

1. Ralston S. Genetic control of susceptibility to osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002, 87, 2460-2466.
2. Thakkinstian A, D'Este C, Eisman J, [et al.]. Meta-analysis of molecular association studies: vitamin D receptor gene polymorphisms and BMD as a case study. *J Bone Miner Res.* 2004, 19, 419-428.
3. Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Dańska A, [et al.]. Polimorfizm genu kodującego receptor witaminy D w grupie kobiet w okresie pomenopauzalnym z niską gęstością mineralną kości. *Ginekol Pol.* 2004, 75, 367-372.
4. Drews K, Seremak-Mrozikiewicz A, Bartkowiak-Wieczorek J, [et al.]. Polimorfizm genetyczny receptora estrogenowego alfa-czynnik ryzyka osteoporozy? *Ginekol Pol.* 2006, 77, 72-78.
5. Horst-Sikorska W, Kalak R, Wawrzyniak A, [et al.]. Association analysis of the polymorphisms of the VDR gene with bone mineral density and the occurrence of fractures. *J Bone Miner Metab.* 2007, 25, 310-319.
6. Rachoń D. Rola czynnika martwicy nowotworu i interleukiny 6 w patogenezie późnych następstw menopauzy. Wpływ hormonalnej terapii zastępczej na ich ekspresję. *Pol Merkur Lekarski.* 2005, 17, 724-727.
7. Pfeilschifter J, Koditz R, Pfohl M, [et al.]. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocr Rev.* 2002, 23, 90-119.
8. Manolagas S. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2000, 21, 115-137.
9. Mundy G. Osteoporosis and inflammation. *Nutr Rev.* 2007, 65, 147-151.
10. Ferrari S, Karasik D, Liu J, [et al.]. Interactions of interleukin-6 promoter polymorphisms with dietary and lifestyle factors and their association with bone mass in men and women from the Framingham Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res.* 2004, 19, 552-559.
11. Abraham L, Kroeger K. Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease. *J Leukoc Biol.* 1999, 66, 562-566.
12. Terry C, Loukaci V, Green F. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem.* 2000, 275, 24, 18138-18144.
13. Haddy N, Sass C, Maumus S, [et al.]. Biological variations, genetic polymorphisms and familial resemblance of TNF-alpha and IL-6 concentrations: STANISLAS cohort. *Eur J Hum Genet.* 2005, 13, 109-117.
14. Hegedus C, Skibola C, Bracci P, [et al.]. Screening the human serum proteome for genotype-phenotype associations: an analysis of the IL6 -174G/C polymorphism. *Proteomics.* 2007, 7, 548-557.
15. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, [et al.]. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest.* 1998, 102, 1369-1376.
16. Bouma G, Crusius J, Oudkerk Pool M, [et al.]. Secretion of tumour necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol.* 1996, 43, 456-463.
17. Garnero P, Sornay-Rendu E, Duboeuf F, [et al.]. Markers of bone turnover predict postmenopausal forearm bone loss over 4 years: the OFELY study. *J Bone Miner Res.* 1999, 14, 1614-1621.
18. Kalak R, Horst-Sikorska W, Słomski R. Podłoże genetyczne osteoporozy. Aktualny stan badań. *Postępy Biologii Komórki.* 2000, 27, 53-71.
19. Lorentzon M, Lorentzon R, Nordström P. Interleukin-6 gene polymorphism is related to bone mineral density during and after puberty in healthy white males: a cross-sectional and longitudinal study. *J Bone Miner Res.* 2000, 15, 1944-1949.
20. Herrmann S, Ricard S, Nicaud V, [et al.]. Polymorphisms of the tumor necrosis factor-alpha gene, coronary heart disease and obesity. *Eur J Clin Invest.* 1998, 28, 59-66.
21. Wennberg P, Nordstrom P, Lorentzon R, [et al.]. TNF-alpha gene polymorphism and plasma TNF-alpha levels are related to lumbar spine bone area in healthy female Caucasian adolescents. *Eur J Endocrinol.* 2002, 146, 629-634.
22. Chen H, Chen W, Hsu C, [et al.]. Tumor necrosis factor alpha, CYP 17, urokinase, and interleukin 10 gene polymorphisms in postmenopausal women: correlation to bone mineral density and susceptibility to osteoporosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005, 122, 73-78.
23. Parfitt A. Age-related structural changes in trabecular and cortical bone: cellular mechanisms and biomechanical consequences. *Calcif Tissue Int.* 1984, 36, Suppl 1, 123-128.