

## Polimorfizm 1181G/C genu *OPG* i jego związek z osteoporozą u kobiet po menopauzie

Received: 29.10.2013  
Revised: 02.01.2014  
Accepted: 15.03.2014  
Published online: 31.12.2014

### 1181G/C polymorphism of *OPG* gene and its association with osteoporosis in postmenopausal women

Dariusz Boroń<sup>1</sup>, Ariel Plewka<sup>2</sup>, Przemysław Jędrusik<sup>3</sup>

#### STRESZCZENIE

##### WSTĘP

Osteoporoza jest układową chorobą układu kostnego, charakteryzującą się niską masą kostną i zaburzeniami mikroarchitektury kości, ze zwiększoną kruchością kości oraz podatnością na złamania. Istnieje istotny wkład genetyczny tak w gęstość kości, jak i jej przemianę. Sugeruje się, że polimorfizm *OPG* może wpływać na gęstość kości oraz jej przemianę.

##### CEL PRACY

Celem pracy było zbadanie częstości występowania polimorfizmu genu *OPG* oraz ocena jego związku z parametrami klinicznymi dotyczącymi obrotu kostnego i stopnia zaawansowania osteoporozy pomenopauzalnej.

##### MATERIAŁY I METODY

Badania przeprowadzono na grupie 570 kobiet w wieku postmenopauzalnym (404 kobiety) i rozrodczym (166 kobiet). Grupa w wieku postmenopauzalnym obejmowała kobiety z osteoporozą, osteopenią i zdrowe. Kobiety w wieku rozrodczym były zdrowe.

Zbadano częstość występowania polimorfizmu badanego genu w grupie pacjentek z oznaczoną gęstością mineralną kości (*bone mineral density* – BMD) oraz w grupie kontrolnej. Badanie przeprowadzono metodą RFLP-PCR.

##### WYNIKI

Wykazano korelację polimorfizmu G1181C genu *OPG* z masą ciała i masą urodzeniową oraz związek ze zmniejszoną BMD, a także zwiększonym ryzykiem powstawania osteoporozy pomenopauzalnej.

##### WNIOSKI

Genotypy homozygotyczne polimorfizmu G1181C genu *OPG* mogą mieć wpływ na masę urodzeniową kobiet i wzrost ryzyka wystąpienia osteoporozy.

##### SŁOWA KLUCZOWE

OPG, polimorfizm, osteoporoza, kobieta, wiek

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Histologii Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

<sup>2</sup>Centrum Dydaktyki i Symulacji Medycznej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

<sup>3</sup>Zakład Komputerowych Systemów Biomedycznych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach

##### ADRES DO KORESPONDENCJI:

Dr n. med. Dariusz Boroń  
Katedra i Zakład Histologii  
Wydziału Lekarskiego  
z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze  
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego  
w Katowicach  
ul. Jordana 19  
41-808 Zabrze  
tel. +48 32 272 28 42  
e-mail: dariusz@boron.pl

Ann. Acad. Med. Siles. 2014, 68, 6, 407–414  
Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny  
w Katowicach  
eISSN 1734-025X  
www.annales.sum.edu.pl

## ABSTRACT

**INTRODUCTION**

Osteoporosis is a systemic disease of the bone system, characterized by low bone mass and bone microarchitecture disturbances, increased bone brittleness and susceptibility to fracture. There is an essential genetic contribution to bone density, as well as its transformation. It is suggested that the *OPG* polymorphism may affect bone density and its transformation.

**AIM OF STUDY**

The aim of the study was to examine the incidence of *OPG* gene polymorphism and evaluate its association with the clinical parameters concerning bone turnover and the degree of postmenopausal osteoporosis development.

**MATERIAL AND METHODS**

The study was conducted among a group of 570 women at postmenopausal age (404) and reproductive age (166). The group at postmenopausal age included women with osteoporosis, osteopenia as well as healthy individuals. The women at reproductive age were healthy. The polymorphism incidence of the examined gene in a group of patients with determined bone mineral density (BMD) and in the control group was studied. The study was performed by means of the RFLP-PCR method.

**RESULTS** The correlation of the G1181 polymorphism of the *OPG* gene with body mass and birth mass was demonstrated as well as the association of decreased bone density and increased risk of postmenopausal osteoporosis development.

**CONCLUSIONS**

Homozygotic genotypes of the G1181C polymorphism of the *OPG* gene may affect women's birth mass and an increased risk of osteoporosis development.

**KEY WORDS**

OPG, polymorphism, osteoporosis, women, age

## WSTĘP

Osteoprotegeryna (*osteoprotegerin* – *OPG*) której nazwa w wolnym tłumaczeniu oznacza „ochroniacz kości”, została odkryta jako pierwsza z kompleksu *OPG/RANK/RANKL*. Jej zdolność do hamowania rozwoju osteoklastów potwierdzono zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* [1,2]. Po raz pierwszy cząsteczka *OPG* będąca sekrecyjnym czynnikiem hamującym różnicowanie i aktywność osteoklastów, została opisana pod koniec lat 90. ubiegłego wieku [2]. Osteoprotegeryna jest glikoproteiną należącą do rodziny TNF (*tumor necrosis factor* – czynnik martwicy nowotworu). W formie dojrzałej występuje w postaci homodimeru, który stanowi dominującą zewnątrzkomórkową postać tego białka. Powstanie homodimeru zależy od obecności wiązań disiarczkowych między resztami cysteinowymi w pozycji 400 łańcucha aminokwasowego, jednak przy braku dimeryzacji białko to zachowuje nadal swoją aktywność biologiczną [2,3].

Osteoprotegeryna jest zbudowana z 7 domen. Wiążąc *RANKL* cząsteczka ta warunkuje aktywność *OPG* jako inhibitora osteoklastogenezy [4,5]. Fragment C-końcowy *OPG* zawiera dwa regiony homologiczne z domenami śmierci (*death domain homologous region* – *DDH*) [6] i dlatego regiony te zostały określone mianem cytoplazmatycznych mediatorów apoptozy. Wspomniany fragment łańcucha aminokwasowego zawiera także domenę wiążącą heparynę [5,6].

U człowieka gen *OPG* zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu i stanowi pojedynczą kopię składającą się z pięciu eksonów [2,7]. Blokujące go mutacje mogą u człowieka przyczyniać się m.in. do wzmożonego obrotu kostnego, a konsekwencją tych zaburzeń może być młodzieńcza choroba Pageta czy deformacja kości oraz ich nieprawidłowe kostnienie [8]. Polimorfizm genu *OPG* jest skorelowany z gęstością mineralną odcinka lędźwiowego kręgosłupa u kobiet po menopauzie [9].

Na powierzchni komórkowych prekursorów osteoklastów obecny jest *RANK*. Receptor ten należy do receptorów nadrodziny TNF i jest białkiem przezłonowym typu I [5,8]. Produkowany przede wszystkim

przez komórki zrębu i osteoblasty peptyd RANKL jest ligandem dla RANK, określanym czasem jako ligand *OPG*. Związanie receptora z ligandem wpływa na przebieg osteoklastogenezy, regulując wszystkie jej etapy, w tym rekrutację i różnicowanie prekursorów, ich fuzję w wielojądrzaste osteoklasty, a także aktywację dojrzałych komórek kościogubnych i w konsekwencji nasilenie aktywności resorpcyjnej. Wytwarzana przez komórki osteoblastyczne *OPG* pełni rolę swoistego receptora wabika dla RANKL [10,11], blokuje ona bowiem wiązanie RANKL z RANK i w ten sposób przerywa przekazywanie sygnału między komórkami zrębu, osteoblastami a osteoklastami. Wpływ *OPG* na kość jest więc przeciwny do tego, jaki wywołuje interakcja RANKL–RANK, zapobiega bowiem utracie tkanki kostnej [5,12].

Celem pracy było zbadanie częstości występowania polimorfizmu *OPG* 1181G/C ze szlaku cytokinowego RANK/RANKL/*OPG* w grupie kobiet po menopauzie. Analizie poddano związek badanych wariantów genetycznych w powiązaniu z zaawansowaniem zmian kostnych, a także powiązanie z parametrami obrotu kostnego oraz ocena znaczenia badanych polimorfizmów genetycznych w etiopatogenezie osteoporozy.

## MATERIAŁ I METODY

### Grupa badana

Badaniami objęto grupę niespokrewnionych kobiet populacji kaukaskiej w wieku pomenopauzalnym (404 kobiety) i rozrodczym (166 kobiet), zamieszkujących region Wielkopolski (woj. zachodniopomorskie i wielkopolskie), które w latach 2002–2005 zgłosiły się do Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego Akademii Medycznej (GPSK AM). Grupa w wieku pomenopauzalnym obejmowała 268 kobiet z osteoporozą, 65 z osteopenią i 71 zdrowych. Pacjentki poddano badaniom densytometrycznym w Pracowni Densytometrii GPSK AM, w wyniku których oznaczono gęstość mineralną kości (*bone mineral density* – BMD) oraz parametry *T-score*, *Z-score*, a także wskaźniki średniej BMD w porównaniu ze średnią dla młodych dorosłych kobiet (*young adults* – YA) i średniej BMD w porównaniu ze średnią dla danego wieku (*age matched* – AM). Dodatkowo przeprowadzono pomiar masy ciała i wzrostu, w celu obliczenia wskaźnika masy ciała (*body mass index* – BMI) według odpowiedniego wzoru (masa ciała/wzrost). Z każdą pacjentką przeprowadzono szczegółowy wywiad na temat przebytych chorób, stosowanych leków, wieku wystąpienia pierwszej i ostatniej miesiączki, liczby ciąż, masy urodzeniowej i palenia tytoniu.

Do badań genetycznych zakwalifikowano kobiety, u których menopauza wystąpiła przynajmniej przed rokiem i które nie stosowały terapii mającej wpływ na masę kostną, w tym takich leków, jak: selektywne modulatory receptora estrogenowego – SERM (*selective estrogen-receptor modulator*), kalcytonina, bifosfoniany, heparyna, sterydy, hormony tarczycy, leki przeciwpadaczkowe, analogi GnRH (*gonadotropin-releasing hormone*), tibolon, oraz nie poddały się hormonalnej terapii zastępczej (HTZ). Z badań wykluczono pacjentki po zabiegu owariektomii obustronnej, a także kobiety cierpiące na zaburzenia endokrynologiczne i metaboliczne, schorzenia hematologiczne, chorobę nowotworową, choroby nerek, schorzenia autoimmunologiczne, choroby tkanki łącznej, ze względu na możliwość wpływu tych schorzeń na utratę masy kostnej. Dodatkowo zbadano grupę kobiet populacji kaukaskiej w wieku rozrodczym.

Od wszystkich pacjentek uzyskano zgodę na uczestnictwo w badaniach, o których zakresie i celu zostały szczegółowo poinformowane. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Akademii Medycznej w Poznaniu nr 1415/03 (158/06).

Gęstość mineralna kości została oznaczona w odcinku lędźwiowym kręgosłupa od kręgu L2 do L4, za pomocą metody podwójnej absorpcjometrii rentgenowskiej (*dual energy X-ray absorptiometry* – DXA). Badania densytometryczne przeprowadzono aparatem LUNAR DPX 100 (Lunar Corporation, Madison, USA).

Wyniki pomiarów BMD zostały wyrażone w  $\text{g/cm}^2$  i przedstawione za pomocą wskaźników *T-score* i *Z-score*, które odnoszą się do wartości średnich dla BMD w danej grupie wiekowej. Za prawidłową przyjęto wartość pomiaru BMD metodą DEXA, mieszczącą się między jednym odchyleniem standardowym od średniej wiekowej w odniesieniu do szczytowej masy kostnej (*T-score* od +1 do -1).

### Izolacja DNA

Badania genetyczne przeprowadzono w Zakładzie Badania Jakości Produktów Leczniczych i Suplementów Diety Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu oraz w Pracowni Farmakogenetyki Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, w celu określenia częstości występowania i rozkładu poszczególnych genotypów analizowanych polimorfizmów w grupie badanej i kontrolnej.

Materiałem biologicznym, z którego wyizolowano DNA, była krew obwodowa pobrana w ilości 5 ml z okolicy zgięcia łokciowego pacjentek i umieszczona w probówkach z solą sodową etylenodiaminotetraocjanu (EDTA-salt). Przed etapem izolacji DNA materiał przechowywano w temperaturze -20°C.

Do izolacji DNA zastosowano komercyjnie dostępny zestaw „QIAamp DNA Blood Mini Kit” (Qiagen).

Uzyskany materiał wykorzystano do dalszych badań. Analizę ilościową i jakościową DNA przeprowadzono mierząc absorbancję na spektrofotometrze Eppendorf. Preparaty rozcieńczono wodą w proporcji 2  $\mu$ l DNA na 98  $\mu$ l wody, wytrząsano i odwirowano. Do kalibracji spektrofotometru wykorzystano 100  $\mu$ l wody. Odczyt przeprowadzano przy trzech długościach fali elektromagnetycznej:

- 260 nm – maksimum absorpcji dla DNA,
- 280 nm – maksimum absorpcji dla białek,
- 320 nm – absorpcja dla drobin komórkowych (tzw. tło).

Do obliczeń posłużono się wartościami gęstości optycznej OD<sub>260</sub> i OD<sub>280</sub> po odjęciu wartości tła (OD<sub>320</sub>). Przyjmuje się, że wartość OD<sub>260</sub> równa jest 1 dla dsDNA o stężeniu 50  $\mu$ g/ml, ssDNA o stężeniu 33  $\mu$ g/ml oraz dla RNA o stężeniu 40  $\mu$ g/ml. Stężenie DNA obliczano według podanego poniżej wzoru:

$$\text{Stężenie DNA } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times 50 \times R$$

gdzie: R – krotność rozcieńczenia.

Wyznaczone wartości stężeń DNA mieściły się w granicach 75–100 ng/ $\mu$ l ekstraktu, przy wartościach współczynnika A260/A280 równych 1,7–2,0.

Jakość uzyskanego DNA sprawdzano na podstawie rozdziału elektroforetycznego w 0,8% żelu agarozowym w buforze TBE. W tym celu DNA w ilości 0,5  $\mu$ g po wcześniejszym zawieszeniu w końcowej objętości 10  $\mu$ l i po podaniu buforu obciążającego (3  $\mu$ l, 6x SB – *sodium-borate*) nanoszono na żel i rozdzielano elektroforetycznie przy napięciu 5 V/cm przez około 30 minut. Zgodnie z wymogami procedury, efekt rozdziału obserwowano w świetle UV. DNA genomowy był widoczny jako pojedynczy prążek.

### Reakcja łańcuchowej polimerazy (PCR – *polymerase chain reaction*)

W pracy przeprowadzono reakcję PCR w celu powielenia badanych fragmentów sekwencji genu *OPG*. Dla analizowanych fragmentów zaprojektowano odpowiednie pary starterów, które nie tworzyły wewnętrznych sparowań, homodimerycznych czy heterodimerycznych struktur typu spinka do włosów. Specyficzność starterów sprawdzono programem do projektowania starterów OLIGO oraz programem BLAST.

Sekwencje starterów dla: *OPG* 1181C/G

F: 5'-GTT TCC GGG GAC CAC AAT GAA CTA-3'  
R: 5'-TAG GGG AAG CAT GGC ATA ACT TGA-3'

Długość produktu amplifikacji: -220 pz

Reakcje PCR przeprowadzono w termocyklerze PTC-200 (MJ Research, USA).

Produkty reakcji PCR analizowano przez elektroforezę w żelu agarozowym o stężeniu 1,5%. W tym celu do 5  $\mu$ l produktu reakcji PCR dodano 3  $\mu$ l buforu obciążającego i prowadzono rozdział przy napięciu 70 V. Jakość produktów oceniano przez wizualizację w świetle UV, wykorzystując w tym celu system dokumentacji i komputerowej analizy obrazu UVI-KS4000/Image PC firmy Syngen Biotech Molecular Biology Instruments.

### Analiza polimorfizmów techniką PCR-RFLP

Analiza długości fragmentów restrykcyjnych produktów amplifikacji PCR-RFLP (*restriction fragments length polymorphisms* – RFLP) pozwala wykryć różnice w sekwencji produktów PCR, polegające na obecności lub braku tzw. miejsca restrykcyjnego, rozpoznawanego przez endonukleazy restrykcyjne. Za pomocą techniki PCR-RFLP analizowano polimorfizm *OPG* 1181C/G. Do analizy restrykcyjnej zastosowano enzym *SpeI*. Sekwencje nukleotydowe rozpoznawane przez wykorzystane enzymy oraz długości fragmentów DNA uzyskane w wyniku hydrolizy enzymatycznej umieszczono w tabeli I.

Produkt reakcji PCR (15  $\mu$ l) inkubowano w obecności enzymu restrykcyjnego i buforu przez 16 godzin w temperaturze 37°C. Fragmenty DNA uzyskane po analizie restrykcyjnej analizowano podczas rozdziału elektroforetycznego w żelu agarozowym o stężeniu 2,75%, przy napięciu 70 V.

### Analiza polimorfizmów techniką *real-time* PCR

Analizę polimorfizmu genu *OPG* wykonano techniką *real-time* PCR. W tym celu posłużono się sondami hybrydazyjnymi (HybProbe), aparatem LightCycler® 480 do szybkiej i precyzyjnej łańcuchowej reakcji polimerazy oraz oprogramowaniem LightCycler® 480 Basic Softwar do analizy wyników. Do genotypowania, czyli wykrywania pojedynczo-nukleotydowych polimorfizmów badanych genów, wykorzystano pomiary fluorescencji dokonywane w trakcie analizy krzywej topnienia po PCR.

**Tabela I.** Charakterystyka enzymu restrykcyjnego zastosowanego do badania polimorfizmu  
Table I. Characteristics of restriction enzymes used for studied polymorphism

Enzym (polimorfizm)	Charakterystyka miejsca hydrolizy	Wielkości uzyskanych fragmentów restrykcyjnych badanego amplimeru
<i>SpeI</i> ( <i>OPG</i> 1181G/C)	enzym hydrolizuje, gdy występuje <b>G</b> nie hydrolizuje, gdy występuje <b>C</b>	<b>GG</b> (199 pz, 21 pz) <b>CG</b> (220 pz, 199 pz, 21 pz) <b>CC</b> (220 pz)

### Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wyników uzyskanych w pracy przeprowadzono za pomocą programu SPSS 17.0 PL dla Windows. W bazie danych zgromadzono parametry kliniczne pacjentek, częstości występowania poszczególnych genotypów i alleli badanych polimorfizmów.

Częstości genotypów obserwowane w niniejszej pracy porównano z wartościami oczekiwanymi dla rozkładu genotypów w stanie równowagi Hardy'ego-Weinberga za pomocą testu chi-kwadrat ( $\chi^2$ ). Posługiwano się wzorem  $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ . Wyniki podano z 95% przedziałem ufności (95% PU).

Zbadano wpływ badanych polimorfizmów na wartości wskaźników *T-score*, *Z-score*, L2–L4 AM, L2–L4 YA, L2–L4 BMD, BMI oraz innych parametrów klinicznych, przedstawionych za pomocą średniej arytmetycznej, odchylenia standardowego oraz błędu standardowego średniej. W tym celu zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA. Przyjęto wystąpienie istotności statystycznej dla  $p < 0,05$ .

### WYNIKI

Częstość występowania homozygotycznych genotypów GG i CC oraz heterozygotycznego GC w polimorfizmie 1181G/C (G1181C) genu *OPG* była porównywalna:

- w grupach kobiet z osteoporozą oraz bez osteoporozy (kobiety z osteopenią i zdrowe po menopauzie; tab. II), w obu tych grupach wyraźnie częściej występował heterozygotyczny genotyp GC;
- w grupie pacjentek z osteoporozą oraz w grupie kobiet zdrowych po menopauzie, nie zaobserwo-

wano między nimi różnic istotnych statystycznie, w grupie osteoporotycznej częściej występował heterozygotyczny GC, natomiast u kobiet zdrowych po menopauzie – homozygotyczny CC; w obydwu grupach wyraźnie częściej wykrywano heterozygotyczny genotyp GC (tab. II i III);

- w grupie kobiet z osteoporozą oraz w grupie kobiet zdrowych w wieku rozrodczym, przy czym nie zaobserwowano między nimi różnic istotnych statystycznie; heterozygotyczny genotyp GC był częstszy w grupie kobiet zdrowych (tab. II i III), a homozygotyczny genotyp CC ujawniano częściej u pacjentek z osteoporozą; w obydwu badanych grupach wyraźnie częstszy był heterozygotyczny genotyp GC;

Częstość występowania homozygotycznego genotypu GG w polimorfizmie 1181G/C (G1181C) genu *OPG* była także porównywalna:

- w grupach kobiet z osteopenią oraz zdrowych po menopauzie (tab. III); heterozygotyczny genotyp GC stwierdzano częściej w grupie kobiet z osteopenią (tab. III), a genotyp homozygotyczny CC był zdecydowanie częstszy u kobiet zdrowych po menopauzie; w obydwu grupach częściej występował heterozygotyczny genotyp GC;
- w grupach kobiet z osteopenią oraz zdrowych w wieku rozrodczym była porównywalna, przy czym nie zaobserwowano między nimi różnic istotnych statystycznie; u kobiet zdrowych w wieku rozrodczym częstszy był heterozygotyczny genotyp GC, a u kobiet z osteopenią – genotyp homozygotyczny CC; w obydwu grupach kobiet z większą częstością występował heterozygotyczny genotyp GC (tab. III i IV).

**Tabela II.** Częstość występowania genotypów polimorfizmu 1181G/C genu *OPG* u kobiet z osteoporozą i bez osteoporozy (z osteopenią i zdrowe)  
**Table II.** Frequency of occurrence of 1181G/C *OPG* genotype polymorphism in women with osteoporosis and without osteoporosis (with osteopenia and healthy ones)

Genotyp <i>OPG</i>	Kobiety z osteoporozą			Kobiety bez osteoporozy		
	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)	95% PU	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)	95% PU
GG	58 (21,3)	20,6	16,6–26,3	23 (17,2)	18,2	13,2–23,5
GC	144 (52,6)	49,6	44,2–58,8	70 (52,8)	48,9	45,6–60,7
CC	71 (26,1)	29,8	27,3–37,8	39 (30,0)	32,5	25,5–36,7
Razem	273 (100)	100		132 (100)	100	

**Tabela III.** Częstość występowania genotypów polimorfizmu 1181G/C genu *OPG* u kobiet z osteopenią i zdrowych po menopauzie  
**Table III.** Frequency of occurrence of 1181G/C *OPG* genotype polymorphism in women with osteopenia and healthy after menopause

Genotyp <i>OPG</i>	Kobiety z osteopenią			Kobiety zdrowe		
	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)	95% PU	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)	95% PU
GG	16 (18,7)	19,3	15,0–25,2	10 (18,9)	16,5	13,7–26,2
GC	48 (53,6)	49,3	42,3–55,8	23 (47,3)	48,2	38,4–52,2
CC	24 (27,7)	31,4	25,8–35,0	17 (33,8)	35,3	32,1–40,1
Razem	88 (100)	100		50 (100)	100	

Porównywalna była także częstość występowania homozygotycznych genotypów GG i CC oraz heterozygotycznego genotypu GC w polimorfizmie 1181G/C (G1181C) genu *OPG* u kobiet z osteoporozą i w grupie pacjentek z osteopenią, w obu badanych grupach zdecydowanie częściej występował heterozygotyczny genotyp GC (tab. II i III).

Częstość występowania homozygotycznego genotypu GG w polimorfizmie 1181G/C (G1181C) genu *OPG* była porównywalna:

- u kobiet z grupy badawczej (kobiety z osteoporozą i osteopenią łącznie) oraz w grupie kobiet zdrowych po menopauzie (tab. III i IV), u kobiet chorych częściej był heterozygotyczny genotyp GC (tab. IV), a w grupie kobiet zdrowych po menopauzie – homozygotyczny genotyp CC, w obu badanych grupach wyraźnie częściej był heterozygotyczny genotyp GC;

- w grupie badawczej (kobiety z osteopenią i osteoporozą łącznie) oraz w grupie kobiet zdrowych w wieku rozrodczym, nie stwierdzono w tym przypadku różnic statystycznie znamiennej, u kobiet zdrowych w wieku rozrodczym częściej był genotyp heterozygotyczny GC, natomiast kobiety z osteoporozą i osteopenią łącznie zdecydowanie częściej reprezentowały homozygotyczny genotyp CC (tab. IV); w obu badanych grupach wyraźnie częściej był heterozygotyczny genotyp GC.

- w grupie kobiet zdrowych po menopauzie oraz w grupie kobiet zdrowych w wieku rozrodczym; w grupie kobiet zdrowych w wieku rozrodczym częściej był heterozygotyczny genotyp GC, a u kobiet zdrowych po menopauzie nieco częściej stwierdzano homozygotyczny genotyp CC (tab. III i IV), w obu badanych grupach zdecydowanie częściej był heterozygotyczny genotyp GC.

**Tabela IV.** Częstość występowania genotypów polimorfizmu 1181G/C genu *OPG* u kobiet z osteoporozą i osteopenią oraz kobiet w wieku rozrodczym  
**Table IV.** Frequency of occurrence of *OPG* 1181G/C genotype polymorphism in women with osteoporosis and osteopenia and healthy in reproductive age

Genotyp OPG	Osteoporoza z osteopenią			Kobiety w wieku rozrodczym		
	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)	95% PU	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)	95% PU
GG	65 (20,3)	20,3	13,8–24,6	31 (17,8)	29,1	13,3–22,0
GC	175 (54,7)	49,5	48,3–60,2	108 (63,2)	49,7	63,6–72,0
CC	80 (25,8)	30,2	25,7–35,0	32 (19,0)	21,2	18,5–28,4
<b>Razem</b>	320 (100)	100		171 (100)	100	

## DYSKUSJA

Osteoporoza jest chorobą zależną od wielu czynników, a jej zmienność populacyjną określają interakcje czynników genetycznych ze środowiskowymi [13]. Często jest ona dziedziczona niezgodnie z prawami Mendla, co wynika z tego, że np. w przypadku masy kostnej mutacja jednego genu może prowadzić do zniesienia wpływu innych genów warunkujących występowanie określonej cechy. Wykazano, że czynniki genetyczne odgrywają istotną rolę w regulacji BMD [14]. Podstawą do potwierdzenia tej tezy stały się m.in. pomiary wartości BMD w tzw. punktach krytycznych. Stwierdzono również, że pod względem BMD bliźnięta monozygotyczne są do siebie bardziej podobne niż heterozygotyczne. Sugeruje to wyraźny udział czynników genetycznych w realizacji stanu fizjologicznego organizmu. Mimo wielu badań przeprowadzonych na populacji kaukaskiej i azjatyckiej, uzyskane wyniki pozostają nadal dyskusyjne, nie pozwalając m.in. jednoznacznie określić wpływu polimorfizmów genu *OPG* na skłonność do wystąpienia osteoporozy.

Genetyka osteoporozy należy do bardziej dynamicznie rozwijających się obszarów badań dotyczących biologii kości. Corocznie pojawia się wiele nowych publikacji w tym zakresie, dlatego niezbędne jest gromadzenie wszystkich danych pozwalających na podsumowanie wyników prób zidentyfikowania genetycznych czynników i interakcji stanowiących podłoże osteoporozy. Już na początku obecnego wieku powstały prace dotyczące roli genetycznych czynników wpływających na powstawanie osteoporozy oraz strategii ich poszukiwania.

Dostępne w literaturze wyniki badań czynników genetycznych rozwoju osteoporozy dotyczą w dużej mierze badań genów wpływających na metabolizm kości, szczególnie genu *VDR*. Poznanie funkcji układu *RANK/RANKL/OPG* w osteoklastogenezie wskazuje na jego rolę w patogenezie osteoporozy pomenopauzalnej [15,16]. Ostatnie badania dowiodły, że wzmożona ekspresja *RANKL* na komórkach szpiku kostnego indukowana niedoborem estrogenów u kobiet po menopauzie jest odpowiedzialna za resorpcję kości [17]. Blokując interakcję *RANKL* z *RANK in vivo*, *OPG* redukuje wyniki osteoresorpcyjne tego szlaku sygnalizacyjnego [18]. Co więcej, liczne badania

na myszach, którym usunięto jajniki (osteoporoza indukowana brakiem estrogenów), doprowadziły do wniosku, że nadmierna ekspresja OPG nie tylko zapobiega utracie kości, lecz wzmacnia również BMD, prowadząc do osteopetrozy [18,19,20]. Wykazano ponadto, że wstrzyknięcie pojedynczej dawki OPG kobietom po menopauzie powoduje szybką i głęboką redukcję przemian kostnych [21]. Osteoprotegeryna, podobnie jak RANK, należy do nadrodziny TNF i odgrywa kluczową rolę w regulacji osteoklastogenezy. Podstawowym działaniem biologicznym OPG jest inhibicja różnicowania osteoklastu. Stosunek RANKL/OPG jest głównym regulatorem różnicowania osteoklastu, jak się bowiem wydaje, reguluje on aktywację RANK w prekursorach osteoklastu. Wpływ na osteoklastogenezę poprzez regulację produkcji OPG i RANKL przez komórki osteoblastyczne wywiera także wiele innych cytokin i hormonów, takich jak TGF- $\beta$ , IL-1, PTH i 1,25(OH) $_2$ D $_3$  [22].

Związkami wchodzącymi w interakcję ze składnikami OPG/RANKL są m.in. hormony, cytokiny, czynniki wzrostu i witaminy. Do najbardziej istotnych hormonów uczestniczących w przemianie kostnej należą estrogeny. Wyniki różnych prac dotyczących ich interakcji ze szlakiem omawianych ligandów są jednak sprzeczne, ponieważ – jak wykazano – estrogen stymuluje wydzielanie OPG, ale obniża ekspresję RANKL [17,23,24].

W przypadku polimorfizmu G1181C zaobserwowano nieznacznie częstszą obecność genotypu CC u kobiet z prawidłowymi wartościami *T-score* tak w porównaniu z grupą pacjentek z osteoporozą i osteopenią łącznie, jak i w stosunku do grupy z osteoporozą. Genotyp GC był nieznacznie częstszy wśród kobiet z osteopenią oraz osteopenią i osteoporozą w porównaniu z grupą kobiet z prawidłowymi wartościami *T-score*.

Porównując ten sam genotyp w grupie pacjentek z osteoporozą i osteopenią oraz u kobiet przed menopauzą zaobserwowano w tej ostatniej nieznacznie wyższą częstość występowania heterozygot. Porównując badane polimorfizmy u kobiet z osteopenią i osteoporozą oraz w grupie kontrolnej kobiet przed menopauzą odnotowano nieznacznie częstsze pojawienie się homozygot recesywnych CC oraz allelu C, a także homozygot dominujących GG w grupie kobiet z osteoporozą/osteopenią.

Prezentowane w niniejszej pracy wyniki po raz pierwszy dotyczą populacji kobiet polskich. Oczywiście jest więc, że można je obecnie porównywać tylko z danymi uzyskanymi w innych krajach. W badaniach populacji kobiet duńskich wykazano np. statystyczną zmienność częstszego niż w grupie kontrolnej występowania zmutowanych homozygot GG u kobiet z osteoporozą [25]. Zaobserwowano również niższe

wartości BMD L2–L4 u kobiet z osteoporozą z allelem G w porównaniu z grupą kontrolną oraz niższą częstość występowania zmutowanego genotypu CC polimorfizmu G1181C w grupie z osteoporozą i złamaniami kości.

Polimorfizm genu OPG jest ponadto związany z zachowaną masą kostną w kręgosłupie lędźwiowym u osobników homozygotycznych 1181CC, podczas gdy jednostki homozygotyczne 1181GG i heterozygotyczne 1181GC były częstsze u chorych ze zdiagnozowaną osteoporozą [242]. Kilku autorów nie zgłosiło jednak istotnego związku między genotypami OPG G1181C oraz BMD [26,27], co sugeruje, że przewaga genotypu polimorfizmu OPG G1181C i jego wpływu genotypowego na masę kostną może być różna w grupach etnicznych lub różnych krajach o tej samej etniczności. Niestety, mechanizm oddziaływania polimorfizmu OPG G1181C na BMD jest nieznan, aczkolwiek zmiana trzeciego aminokwasu OPG z podstawowej lizyny na asparaginę może wpłynąć na kinetykę wydzielniczą OPG [28].

W kontekście tezy postawionej w niniejszej pracy wydaje się konieczne oszacowanie wpływu polimorfizmów genów OPG i innych na parametry obrotu kostnego. W prezentowanych badaniach nie zaobserwowano statystycznie ważnych korelacji między częstością występowania zmutowanych genotypów badanych polimorfizmów a gęstością kości oraz innymi zależnościami.

Vidal i wsp. [27] zanotowali tendencję do częstszego niż w grupie kontrolnej pojawiania się homozygotycznych genotypów dzikiego typu GG w polimorfizmie G1181C u kobiet z obniżoną wartością BMD. Podobne wyniki uzyskali Langdah i wsp. [25], badając kobiety z osteoporozą. Stwierdzili statystyczne różnice między BMD dla genotypów GC i CC polimorfizmu G1181C. Maksymalne wartości BMD ujawniono dla homozygot CC, natomiast u kobiet z genotypem GG wartości BMD L2–L4 były niższe. W badaniach koreańskich wykazano, że BMD obszaru lędźwiowego kręgosłupa u kobiet z genotypem CC był znacznie wyższy niż u kobiet z genotypem GC lub GG [29]. W badaniach Choi i wsp. [30], w których wzrost BMD obserwowano razem ze wzrostem częstości allelu C, kobiety z genotypem CC miały wyższe BMD w dystalnej części kości promieniowej i wyższe w kości piętowej w niż grupa o genotypie GG.

Przeciwnie wyniki uzyskali Wynne i wsp. [31] w grupie kobiet po menopauzie, stwierdzając wartości BMD niższe o około 15% w trzonie kości udowej i w obszarze lędźwiowym kręgosłupa u kobiet z homozygotycznym CC lub heterozygotycznym genotypem GC polimorfizmu G1181C. Uzyskane rezultaty wydają się sugerować, że allel C może być czynnikiem ryzyka niższych wartości BMD.

## WNIOSKI

1. Prezentowane wyniki wskazują na brak wpływu polimorfizmu genotypu G1181C w eksonie pierwszym i przypuszczalnie słaby wpływ polimorfizmu A-163G w promotorze genu *OPG* na rozwój osteoporozy. Jednocześnie częstość występowania genotypów polimorfizmu A-163G i G1181C w grupie z prawidłowym *T-score* nie różni się zasadniczo od częstości tych genotypów w innych grupach populacji kaukaskiej [25,27,32]. Na podstawie danych literaturowych można sądzić, że w porównaniu z populacją azjatycką mogą się pojawić niewielkie różnice [30].

2. Regulacja układu RANKL/RANK/OPG jest związana z czynnikami zapalnymi, wzrostowymi oraz układem hormonalnym. Jej efektem w tkance kostnej jest nadmiar RANKL w stosunku do OPG, co zwykle prowadzi do zwiększonej aktywności osteoklastów. Nadmiar OPG z kolei hamuje resorpcję kości. Cytokiny te – wpływając na szlak RANKL/RANK/OPG – zmieniają wzajemne relacje wspomnianych białek i modulują w ten sposób resorpcję kości. Wykazano również zwiększoną ekspresję genu *OPG* i w konsekwencji biosyntezę białka *OPG* uzyskano pod wpływem estrogenów w doświadczeniach *in vitro* u ludzi i na osteoblastach szczurów [33,34].

## PIŚMIENNICTWO

- Kostenuik P.J., Shalhoub V. Osteoprotegerin: a physiological and pharmacological inhibitor of bone resorption. *Curr. Pharm. Des.* 2001; 7: 613–635.
- Schoppert M., Preissner K.T., Hofbauer L.C. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002; 22: 549–553.
- Schneeeweis L.A., Willard D., Milla M.E. Functional dissection of osteoprotegerin and its interaction with receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 41155–41164.
- Th  oleyre S., Kwan Tat S., Vusio P. et al. Characterization of osteoprotegerin binding to glycosaminoglycans by surface plasmon resonance: role in the interactions with receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL) and RANK. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006; 347: 460–467.
- Kapczuk K., Sowińska-Przepiera E., Friebe Z. Układ osteoprotegeryna/RANKL/ RANK w aspekcie terapii osteoporozy pomenopauzalnej. *Ginekol. Pol.* 2003; 74: 323–328.
- Aubin J.E., Bonny E. Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Osteoporos. Int.* 2000; 11: 905–913.
- Liu X.H., Kirschenbaum A., Yao S., Levine A.C. Cross-talk between the interleukin-6 and prostaglandin E(2) signaling systems results in enhancement of osteoclastogenesis through effects on the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B (RANK) ligand/RANK system. *Endocrinology* 2005; 146: 1991–1998.
- Arko B., Prezeli J., Kocijancic A., Kornel R., Matv J. Association of the osteoprotegerin gene polymorphism with bone mineral density in postmenopausal women. *Maturitas* 2005; 51: 270–279.
- Zhano H.Y., Liu J.M., Ning G. et al. The influence of Lys3Asn polymorphism in the osteoprotegerin gene on bone mineral density in Chinese postmenopausal women. *Osteoporos. Int.* 2005; 16: 1519–1524.
- Udagawa N., Takahashi N., Yasuda H. et al. Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology* 2000; 141: 3478–3484.
- Theill L.E., Boyle W.J., Penninger J.M. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu. Rev. Immunol.* 2002; 20: 795–823.
- Suda T., Kobayashi K., Jimi E., Udagawa N., Takahashi N. The molecular basis of osteoclast differentiation and activation. *Novartis Found Symp.* 2001; 232: 235–247.
- Peacock M., Turner C.H., Econs M.J., Foroud T. Genetics of osteoporosis. *Endocr. Rev.* 2002; 23: 303–326.
- McCabe L.D., Martin B.R., McCabe G.P., Johnston C.C., Weaver C.M., Peacock M. Dairy intakes affect bone density in the elderly. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004; 80: 1066–1074.
- Vega D., Maalouf N.M., Sakhae K. The role of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B (RANK) /RANK ligand/osteoprotegerin: clinical implications. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007; 92: 4514–4521.
- Hamdy N.A.T. Osteoprotegerin as a potential therapy for osteoporosis. *Curr. Rheumatol. Reports.* 2006; 8: 50–54.
- Eghbali-Fatourehchi G., Khosla S., Sanyal A., Boyle W.J., Lacey D.L., Riggs B.L. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J. Clin. Invest.* 2003; 111: 1221–1230.
- Kostenuik P.J., Capparelli C., Morony S. et al. OPG and PTH-(1-34) have additive effects on bone density and mechanical strength in osteopenic ovariectomized rats. *Endocrinology* 2001; 142: 4295–4304.
- Bolon B., Carter C., Daris M. et al. Osteoprotegerin (OPG) gene therapy in animal models of osteoarticular disease. *Arthritis Res.* 2001; 3: 5.
- Hofbauer L.C., Khosla S., Dunstan C.R., Lacey D.L., Spelsberg T.C., Riggs B.L. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 1999; 140: 4367–4370.
- Bekker P.J., Holloway D., Nakanishi A., Arrighi M., Leese P.T., Dunstan C.R. The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women. *J. Bone Miner. Res.* 2001; 16: 348–360.
- Boyce B.F., Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch. Biochem. Biophys.* 2008; 473: 139–146.
- Bord S., Ireland D.C., Beavan S.R., Compston J.E. The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts. *Bone* 2003; 32: 136–141.
- Khosla S., Atkinson E.J., Dunstan C.R., O’Fallon W.M. Effect of estrogen versus testosterone on circulating osteoprotegerin and other cytokine levels in normal elderly men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002; 87: 1550–1554.
- Langdahl B.L., Carstens M., Stenkjaer L., Eriksen E.F. Polymorphisms in the osteoprotegerin gene are associated with osteoporotic fractures. *J. Bone Mineral. Res.* 2002; 17: 1245–1255.
- Ohmori H., Makita Y., Funamizu M., Hirooka K., Hosoi T., Orimo H. Linkage and association analyses of the osteoprotegerin gene locus with human osteoporosis. *J. Hum. Genet.* 2002; 47: 400–406.
- Vidal C., Brincat M., Xuereb Anastasi A. TNFRSF11B gene variants and bone mineral density in postmenopausal women in Malta. *Maturitas* 2006; 53: 386–395.
- Arnold A., Horst S.A., Gardella T.J., Baba H., Levine M.A., Kronenberg H.M. Mutation of the signal peptide encoding region of the preproparathyroid hormone gene in familial isolated hypoparathyroidism. *J. Clin. Invest.* 1990; 86: 1084–1087.
- Kim J.G., Kim J.H., Kim J.Y. et al. Association between osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B (RANK), and RANK ligand (RANKL) gene polymorphisms and circulating OPG, soluble RANKL levels, and bone mineral density in Korean postmenopausal women. *Menopause* 2007; 14: 913–918.
- Choi J.Y., Shin A., Park S.K. et al. Genetic polymorphisms of OPG, RANK, and ESR1 and bone mineral density in Korean postmenopausal women. *Calcif. Tissue Int.* 2005; 77: 152–159.
- Wynne F., Drummond F., O’Sullivan K. et al. Investigation of the genetic influence of the OPG, VDR (FokI), and COL1A1 Sspl polymorphisms on BMD in the Irish population. *Calcif. Tissue Int.* 2002; 71: 26–35.
- Garcia-Unzueta M.T., Riancho J.A., Zarrabeitia M.T. et al. Association of the 163A/G and 1181G/C osteoprotegerin polymorphism with bone mineral density. *Horm. Metab. Res.* 2008; 40: 219–224.
- Tanaka Y., Nakayamada S., Okada Y. Osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling and inflammation. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* 2005; 4: 325–328.
- Weitzmann M.N., Pacifici R. Estrogen regulation of immune cell bone interactions. *Ann. NY Acad. Sci.* 2006; 1068: 256–274.