

Received: 29.10.2013
 Revised: 02.01.2014
 Accepted: 07.01.2014
 Published online: 27.08.2014

Polimorfizm 575C/T genu *RANK* i jego związek z osteoporozą u kobiet po menopauzie

575C/T polymorphism of *RANK* gene and its association with osteoporosis in postmenopausal women

Dariusz Boroń¹, Ariel Plewka², Przemysław Jędrusik³

STRESZCZENIE

¹Katedra i Zakład Histologii Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze oraz
²Centrum Dydaktyki i Symulacji Medycznej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
³Zakład Komputerowych Systemów Biomedycznych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach

WSTĘP

Osteoporoza jest szkieletowym zaburzeniem charakteryzującym się obniżeniem wytrzymałości kości, zwiększającym ryzyko złamania. Wykazano, że genetyczne wariacje w *RANK* mają związek z chorobami szkieletu kostnego.

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

MATERIAŁY I METODY

Badania przeprowadzono w grupie 570 kobiet w wieku postmenopauzalnym (404) i rozrodczym (166). 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

Uzyskane wyniki badań nie wykazały korelacji polimorfizmu *RANK* C575T ze zmniejszoną gęstością kości oraz zwiększonym ryzykiem występowania osteoporozy pomenopauzalnej.

WNIOSKI

Homozygota TT polimorfizmu genu receptora *RANK* nie jest czynnikiem zwiększonego ryzyka wystąpienia osteoporozy i jest powiązana z niższymi wartościami opisującymi BMD u kobiet z osteoporozą i osteopenią.

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, 4, 192–199
 Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
 eISSN 1734-025X

SŁOWA KLUCZOWE

RANK, polimorfizm, osteoporoza, kobieta, wiek

ABSTRACT

INTRODUCTION

Osteoporosis is a skeletal disturbance in which bone strength is at increased risk of fracture. It was demonstrated that genetic variations in RANK are associated with skeletal diseases.

AIM OF STUDY

The aim of the study is to examine the frequency of *RANK* gene polymorphism and evaluate its relation with clinical parameters concerning bone turnover and the degree of postmenopausal osteoporosis progress.

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 and healthy individuals. The women at reproductive age were healthy. The polymorphism incidence of the examined gene in a group of patients with a 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 obtained results did not show a correlation of *RANK* C575T polymorphism with decreased bone density or increased risk of postmenopausal osteoporosis incidence.

CONCLUSIONS

The TT polymorphism homozygote of the RANK receptor gene is not an increased risk factor of osteoporosis development and is associated with lower values describing bone density in women with osteoporosis and osteopenia.

KEY WORDS

RANK, polymorphism, osteoporosis, women, age

WSTĘP

Regulacja cyklu życiowego osteoklastów jest obecnie dobrze poznana [1]. Proces osteoklastogenezy z prekursorów hematopoetycznych wymaga czynnika stymulującego kolonię makrofagów (M-CSF), wydzielanego przez komórki zrębu, lecz kluczowymi cząsteczkami kontrolującymi różnicowanie, aktywację i przeżycie osteoklastów są RANK i jego swoisty ligand, nazywany ligandem RANKL, oraz osteoprotegeryna (OPG), produkowane i uwalniane przez komórki zrębu szpiku kostnego i osteoblasty [2].

RANKL zlokalizowany jest na powierzchni komórki i wiąże się ze swoistym receptorem RANK na powierzchni prekursorów osteoklastów. Jest to istotny proces w mechanizmie wytwarzania nowych osteoklastów [3]. Ponadto wiązanie RANKL do RANK na dojrzałych osteoklastach wspomaga ich przyleganie do kości i hamuje ich apoptozę. Osteoprotegeryna jest fizjologicznym receptorem pułapkowym dla RANKL, który wiąże zarówno rozpuszczalne, jak i związane z błoną cząsteczki RANKL, przez co kompetycyjnie

hamuje wiązanie RANKL z RANK na osteoklastach i ich prekursorach [4,5]. Wiązanie OPG z RANKL powoduje hamowanie różnicowania osteoklastów, blokuje aktywację dojrzałych osteoklastów i pozwala na apoptozę osteoklastów. RANKL i jego receptor, tj. RANK, stanowią zatem istotne determinanty resorpcji kości za pośrednictwem osteoklastów, a więc przemiany kostnej i remodelowania całego szkieletu [6].

Precyzyjna rola ścieżki sygnalizacyjnej OPG/RANKL/RANK w regulowaniu remodelowania kości i masy kostnej została udowodniona w badaniach ukierunkowanych na konkretny gen u myszy. Genetyczny brak *RANKL* lub jego receptora *RANK* powodował u myszy osteopetrozę ze względu na zupełny brak osteoklastów [7], natomiast myszy z genetycznym brakiem OPG wykazywały nadmierną osteoklastogenezę i osteoporozę [8], podczas gdy nadekspresja OPG powodowała wysoką masę kostną lub osteopetrozę.

Klonowanie receptora sygnalizującego RANKL, czyli RANK, zostało przeprowadzone w kilku laboratoriach niemalże równocześnie. Po raz pierwszy RANK skło-

nowano z biblioteki cDNA mieloidalnych komórek dendrytycznych pobranych ze szpiku kostnego, a później jako receptor sygnalizujący związany z różnicowaniem osteoklastów *in vitro* [9,10]. Ludzkie cDNA dla RANK koduje glikoproteinę transbłonową typu I zbudowaną z 616 aminokwasów, a mysie z 625 reszt. U człowieka zawiera ono 29-aminokwasowy peptyd sygnalizacyjny, 183-aminokwasową domenę pozakomórkową, 21-aminokwasową domenę transbłonową oraz dużą cytoplazmatyczną domenę zawierającą 383 aminokwasów. Jako że receptory TNF, takie jak FAS, TNF-R1 i TNF-R2, zazwyczaj łączą się w kompleksy trimeryczne na powierzchni komórki przed związaniem liganda, wywnioskowano, że trimeryzacja RANK jest wymagana do wiązania RANKL i transmisji sygnałów [11,12]. mRNA dla RANK występuje w dużych ilościach w komórkach dendrytycznych, komórkach kości, mięśniach szkieletowych, grasicy, wątrobie, okrężnicy, jelicie cienkim i nadnerczu [9,13]. Białko RANK wykrywane jest na powierzchni komórek dendrytycznych, komórek T CD4+ i CD8+ [14], komórek Langerhansa i na komórkach nabłonka gruczołu mlekowego, gdzie ekspresja jest regulowana przez cały czas trwania ciąży [15].

Celem pracy było zbadanie częstości występowania polimorfizmu RANK 575C/T ze szlaku cytokinowego RANK/RANKL/OPG u kobiet po menopauzie. Analizie został poddany 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 570 niespokrewnionych kobiet populacji kaukaskiej w wieku pomenopauzalnym (404) i rozrodczym (166), zamieszkujących region Wielkopolski (woj. zachodniopomorskie i wielkopolskie), które zgłosiły się do Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego Akademii Medycznej (GPSK AM) w Poznaniu w latach 2002–2005. Grupa w wieku pomenopauzalnym obejmowała 268 kobiet z osteoporozą, 65 z osteopenią oraz 71 zdrowych. Wszystkie pacjentki poddano badaniom densytometrycznym w Pracowni Densytometrii GPSK AM, w wyniku których oznaczono gęstość mineralną kości (BMD – *bone mineral density*) oraz parametry *T-score*, *Z-score*, a także wskaźniki średniej gęstości mineralnej kości badanych w porównaniu ze średnią dla młodych dorosłych kobiet (YA – *young adults*) oraz wskaźniki średniej BMD w porównaniu ze średnią dla danego wieku

(AM – *age matched*). Dodatkowo dokonano pomiaru masy ciała i wzrostu w celu obliczenia wskaźnika masy ciała (BMI – *body mass index*) według odpowiedniego wzoru (masa ciała/wzrost).

Przeprowadzono także szczegółowy wywiad z każdą pacjentką, dotyczący przebytych chorób, stosowanych leków, wieku wystąpienia pierwszej i ostatniej miesiączki, liczby ciąży, masy urodzeniowej i palenia tytoniu.

Do badań genetycznych zakwalifikowano kobiety, u których menopauza wystąpiła przynajmniej przed rokiem i które nie stosowały terapii wpływającej na masę kostną, w tym leków takich 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 cierpiące na zaburzenia endokrynologiczne i metaboliczne, schorzenia hematologiczne, chorobę nowotworową, choroby nerek, schorzenia autoimmunologiczne i choroby tkanki łącznej, ze względu na możliwość ich wpływu 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 metodą podwójnej absorpcjometrii rentgenowskiej (DXA – *dual energy X-ray absorptiometry*). Badania densytometryczne przeprowadzono aparatem LUNAR DPX 100 (Lunar Corporation, Madison, USA).

Wyniki pomiarów BMD wyrażone zostały w 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 i umieszczona w probówkach zawierających sól sodową etylenodiaminotetraoctanu (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 µl DNA na 98 µl wody, wytrząsano i odwirowano. Do kalibracji spektrofotometru wykorzystano 100 µl wody. Odczyt przeprowadzono 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 OD₂₆₀ i OD₂₈₀, po odjęciu wartości tła (OD₃₂₀). Przyjmuje się, że wartość OD₂₆₀ równa jest 1 dla dsDNA o stężeniu 50 µg/ml, ssDNA o stężeniu 33 µg/ml oraz RNA o stężeniu 40 µg/ml. Stężenie DNA obliczano według 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/µl, przy wartościach współczynnika A₂₆₀/A₂₈₀ równych 1,7–2,0.

Jakość uzyskanego DNA sprawdzano techniką rozdziału elektroforetycznego w 0,8% żelu agarozowym w buforze TBE. W tym celu DNA w ilości 0,5 µg, po wcześniejszym zawieszeniu w końcowej objętości 10 µl i po podaniu buforu obciążającego (3 µl, 6x SB – *sodium-borate*), nanoszono na żel i rozdzielano elektroforetycznie przy napięciu 5 V/cm przez około 30 minut. Zgodnie z wymogami procedury, efekt roz-

działu obserwowano w świetle U; 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 *RANKL*. Dla analizowanych fragmentów zaprojektowano odpowiednie pary starterów, które nie tworzyły wewnętrznych sparowań, homodimerycznych czy heterodimerycznych struktur typu spinka do włosów. Specyficzność starterów sprawdzono za pomocą programu do projektowania starterów OLIGO oraz programu BLAST.

Sekwencje starterów dla: *RANK 575C/T*

F: 5'- CAT CAT GGG ACA GAG AAA TCC GAC G -3'

R: 5'- GAG AAT GAA ATA TTC AGC TGA CC-3'

Długość produktu amplifikacji: 250 pz

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

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

Analiza polimorfizmów techniką PCR-RFLP

Analiza długości fragmentów restrykcyjnych PCR-RFLP (RFLP – *restriction fragments length polymorphisms*) pozwala wykryć różnice w sekwencji produktów PCR, polegające na obecności lub braku tzw. miejsca restrykcyjnego, rozpoznawanego przez endonukleazy restrykcyjne. W pracy, za pomocą techniki PCR-RFLP, analizowano polimorfizm *RANK 575C/T*. Do analizy restrykcyjnej zastosowano enzym *Bst*UI. Sekwencje nukleotydowe rozpoznawane przez wykorzystane enzymy oraz długości fragmentów DNA uzyskane w wyniku hydrolizy enzymatycznej umieszczono w tabeli I.

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

Enzym (polimorfizm)	Charakterystyka miejsca hydrolizy	Wielkości uzyskanych fragmentów restrykcyjnych badanego amplimeru
<i>Bst</i> UI (BshI2361) <i>RANK 575C/T</i>	enzym hydrolizuje, gdy występuje C nie hydrolizuje, gdy występuje T	CC (225 pz, 25 pz) CT (250 pz, 225 pz, 250 pz) TT (250 pz)

Produkt reakcji PCR (15 μ 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 2,75% żelu agarozowym przy napięciu 70 V.

Analiza polimorfizmów techniką *real-time* PCR

Analiza polimorfizmu genu *RANKL* została wykonana techniką *real-time* PCR. W tym celu posłużono się sondami hybrydacyjnymi (HybProbe), aparatem LightCycler® 480 przeznaczonym 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.

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 (χ^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

Analiza częstości występowania homozygotycznych genotypów CC i TT oraz heterozygotycznego CT w polimorfizmie 575C/T (C575T) genu *RANK* wykazała, że były one porównywalne w grupach kobiet z osteoporozą oraz bez osteoporozy, która obejmowała kobiety z osteopenią i zdrowe po menopauzie (tab. II).

W obu tych badanych grupach genotypem występującym z większą częstością był heterozygotyczny genotyp CT.

Analiza częstości występowania homozygotycznych genotypów CC i TT oraz heterozygotycznego CT w polimorfizmie 575C/T (C575T) genu *RANK* wykazała, że były one porównywalne w grupach kobiet z osteoporozą oraz w grupie kobiet zdrowych po menopauzie i nie zaobserwowano między nimi różnic istotnych statystycznie. W obu grupach kobiet genotypem występującym z wyraźnie większą częstością był heterozygotyczny genotyp CT (tab. II i III).

Częstość występowania homozygotycznych genotypów CC i TT oraz heterozygotycznego CT w polimorfizmie 575C/T (C575T) genu *RANK* była porównywalna u kobiet z grupy badawczej (kobiety z osteoporozą) oraz w grupie kobiet zdrowych w wieku rozrodczym. Nie zaobserwowano w tym przypadku różnic statystycznie znamiennej. W tej grupie kobiet częstość występowania heterozygotycznego genotypu CT była znacznie wyższa niż pozostałych genotypów (tab. II i III).

Częstość występowania homozygotycznych genotypów CC i TT oraz heterozygotycznego CT w polimorfizmie 575C/T (C575T) genu *RANK* była w grupach kobiet z osteopenią oraz w grupie kobiet zdrowych po menopauzie porównywalna, nie obserwowano różnic statystycznie znamiennej. W obu badanych grupach genotypem wyraźnie częstszym był heterozygotyczny genotyp CT.

Analiza częstości występowania homozygotycznych genotypów CC i TT oraz heterozygotycznego CT w polimorfizmie 575C/T (C575T) genu *RANK* w grupach kobiet z osteopenią oraz w grupie kobiet zdrowych w wieku reprodukcyjnym wykazała porównywalne wartości. Nie obserwowano różnic statystycznie znamiennej (tab. III i IV). W obu grupach kobiet częstszym genotypem był heterozygotyczny genotyp CT.

Analiza częstości występowania homozygotycznych genotypów CC i TT oraz heterozygotycznego genotypu CT w polimorfizmie 575C/T (C575T) genu *RANK* w grupie kobiet z osteoporozą i w grupie kobiet z osteopenią wykazała porównywalne wyniki (tab. II i III). W obu grupach heterozygotyczny genotyp CT występował częściej niż oba pozostałe genotypy.

Analiza częstości występowania homozygotycznych genotypów CC i TT oraz heterozygotycznego genotypu CT w zakresie polimorfizmu 575C/T (C575T) genu *RANK* w grupach kobiet, które tworzyły grupę badawczą obejmującą kobiety z osteopenią i z osteoporozą łącznie, oraz w grupie kobiet zdrowych po menopauzie wykazała porównywalne wyniki (tab. II i IV). W obu grupach genotypem występującym częściej był heterozygotyczny genotyp CT.

Tabela II. Częstość występowania genotypów polimorfizmu *RANK* 575C/T u kobiet z osteoporozą i bez osteoporozы (z osteopenią i zdrowe)
Table II. Occurance frequency of *RANK* 575C/T genotype polymorphism in women with osteoporosis and without osteoporosis (with osteopenia and healthy ones)

Genotyp <i>RANK</i>	Kobiety z osteoporozą			Kobiety bez osteoporozы		
	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)	95% PU	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)	95% PU
CC	59 (23,2)	23,8	19,0–25,7	35 (23,9)	22,9	16,4–24,2
CT	127 (50,3)	50,0	46,8–59,0	77 (52,1)	49,9	48,7–62,7
TT	67 (26,5)	26,2	16,7–29,2	36 (24,0)	27,2	21,2–28,4
Razem	253 (100)	100	–	148 (100)	100	–

Tabela III. Częstość występowania genotypów polimorfizmu *RANK* 575C/T u kobiet z osteopenią i zdrowych po menopauzie
Table III. Occurance frequency of *RANK* 575C/T genotype polymorphism in women with osteopenia and healthy women after menopause

Genotyp <i>RANK</i>	Kobiety z osteopenią			Kobiety zdrowe		
	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)	95% PU	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)	95% PU
CC	20 (22,0)	22,7	18,5–22,1	10 (22,1)	23,3	17,5–23,6
CT	49 (53,6)	49,9	49,0–61,6	25 (55,0)	49,9	46,3–57,7
TT	23 (24,4)	27,4	20,2–30,1	11 (22,9)	26,8	21,3–27,5
Razem	92 (100)	100	–	46 (100)	100	–

Tabela IV. Częstość występowania genotypów polimorfizmu *RANK* 575C/T u kobiet z osteoporozą i osteopenią oraz kobiet w wieku rozrodczym
Table IV. Occurance frequency of *RANK* 575C/T genotype polymorphism in women with osteoporosis and osteopenia and healthy in reproductive age

Genotyp <i>RANK</i>	Osteoporozа z osteopenią			Kobiety w wieku rozrodczym		
	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)	95% PU	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)	95% PU
CC	79 (25,2)	23,5	19,7–26,6	51 (23,0)	23,4	18,6–27,3
CT	161 (51,2)	50,0	48,3–59,0	115 (51,9)	50,0	42,4–56,2
TT	75 (23,6)	26,5	21,6–30,3	55 (25,1)	26,6	23,7–30,8
Razem	315 (100)	100	–	221 (100)	100	–

Analiza częstości występowania homozygotycznych genotypów CC i TT oraz heterozygotycznego genotypu CT w przypadku polimorfizmu 575C/T (C575T) genu *RANK* w grupach kobiet, które tworzyły grupę badawczą obejmującą kobiety z osteopenią i z osteoporozą łącznie, oraz w grupie kobiet zdrowych w wieku rozrodczym także wykazała porównywalne wyniki (tab. IV). Nie stwierdzono różnic statystycznych. W grupach tych częściej był heterozygotyczny genotyp CT.

Częstość występowania homozygotycznych genotypów CC i TT oraz heterozygotycznego genotypu CT w polimorfizmie 575C/T (C575T) genu *RANK* w grupie badawczej (kobiety zdrowe po menopauzie) oraz w grupie kobiet zdrowych w wieku rozrodczym była porównywalna (tab. III i IV). Nie stwierdzono w różnic statystycznych. W grupach tych częściej występował heterozygotyczny genotyp CT.

DYSKUSJA

Jak wiadomo, masa kostna gromadzi się w ciągu pierwszych dwóch dekad życia. U zdrowych osób szczyt masy kostnej zależy przede wszystkim od czynników genetycznych i masy ciała [16,17]. Choroby i niedobory żywnościowe w okresie dzieciństwa i obniżona ekspozycja na steroidy płciowe w okresie dojrzewania często zmniejszają gromadzenie się szczytowej masy ciała, predysponując do osteoporozы w wieku późniejszym.

Rozwój genetyki i biologii molekularnej przyczynił się do poznania podłoża genetycznego wielu chorób, w tym osteoporozы, co przyczyniło się do lepszego zrozumienia etiologii i czynników ryzyka choroby. Poznanie różnych genotypów leżących u podłoża osteoporozы umożliwi, być może, w przyszłości pro-

wadzenie leczenia ukierunkowanego na konkretnego pacjenta i pozwoli na skuteczną i aktywną prewencję. Jak dotąd, nie określono jednoznacznego wpływu badanych genów na rozrost masy kostnej. Podejmowane są jednak próby znalezienia dowodów związku między określonym fenotypem i polimorfizmem markerów genetycznych. Genetyczne markery, które znalazły zastosowanie w badaniach nad osteoporozą, są polimorficznymi regionami DNA, analizowanymi za pomocą technik PCR.

Czynnik stymulujący błonę makrofagów (M-CSF) indukuje ekspresję receptora dla RANKL w osteoblastach i ekspresję RANK w prekursorach osteoklastu, inicjując różnicowanie tych komórek w osteoklasty w obecności RANKL [18]. RANKL eksponowany na powierzchni komórek preosteoblastycznych wiąże się z RANK na komórkach prekursora osteoblastów [19]. Ligand RANK jest niezmiernie ważny dla różnicowania oraz fuzji do komórek wielojądrzastych, a także aktywacji i przeżycia komórek osteoblastycznych.

Analizując polimorfizm *RANK C575T* we wszystkich badanych grupach kobiet w wieku pomenopauzalnym, stwierdzono częstsze występowanie homozygoty CC oraz heterozygoty CT w grupie kobiet ze zdiagnozowaną osteoporozą. W sumarycznej grupie kobiet obejmującej chore na osteopenię i osteoporozę z grupą pacjentek o prawidłowych wartościach *T-score*, ujawniono podobną obserwację. Porównanie częstości genotypów CC i CT w grupie kobiet z osteopenią oraz w grupie kobiet w wieku rozrodczym nie wykazało opisanych zależności.

Na podstawie danych z piśmiennictwa można stwierdzić, że rozkład częstości genotypów polimorfizmu *RANK C575T* jest różny w badanych populacjach. Należy przy tym zaznaczyć, że wyniki w populacji polskiej wyraźnie różnią od wyników populacji koreańskiej czy chińskiej, co znaczy, że zależnie od grupy etnicznej rozkład genotypów polimorfizmu *C575T* jest odmienny [20,21].

Należy pamiętać, że dane literaturowe odnośnie do wpływu polimorfizmu *RANK C575T* na parametry kostne są niejednoznaczne. Wyniki badań uzyskane w niniejszej pracy, dotyczącej populacji polskiej,

raczej potwierdzają wyniki Kim i wsp. [22], na podstawie których wykazano, że polimorfizm *RANK C575T* nie wydaje się czynnikiem genetycznym związanym z BMD odcinka lędźwiowego kręgosłupa u koreańskich kobiet w wieku pomenopauzalnym [22,23].

W innym badaniu koreańskim z udziałem kobiet w okresie pomenopauzalnym zaobserwowano wpływ polimorfizmu *C575T* na BMD kości piętowej [20]. Autorzy ci wykazali również, że genotyp TT tego polimorfizmu ma związek z wyższą wartością BMD w kości piętowej niż u kobiet z genotypem CC. Sugerują też, że allel T można uznać za ochronny w stosunku do tkanki kostnej. Biorąc pod uwagę wyniki przedstawionych badań, można przyjąć tezę, że genetyczne zróżnicowanie w obrębie genu *RANK* może mieć wpływ na obrót kostny [20].

Hsu i wsp. [21] porównując chińską populację pacjentów, u których stwierdzono niską masę kostną, z osobami z wysoką BMD, jako grupą kontrolną, wykazali związek omawianego polimorfizmu z BMD.

W populacji chińskiej zaobserwowano związek jednego z polimorfizmów *RANK* z BMD odcinka lędźwiowego kręgosłupa oraz stawu biodrowego [24]. Ta sama grupa stwierdziła, że geny *RANK* i *RANKL* wykazują związek z wiekiem wystąpienia pierwszej miesiączki i wiekiem wystąpienia naturalnej menopauzy u białych kobiet w Stanach Zjednoczonych. Trzy polimorfizmy genu *RANK* miały związek z wystąpieniem pierwszej miesiączki, natomiast dwa SNP tego genu wykazały związek z wiekiem wystąpienia menopauzy. Ponadto polimorfizmy genu *RANK* miały również istotny statystycznie związek z wiekiem pierwszej miesiączki i początkiem menopauzy [25].

WNIOSKI

Homozygota TT polimorfizmu genu receptora RANK nie jest czynnikiem zwiększonego ryzyka wystąpienia osteoporozy i jest powiązana z niższymi wartościami opisującymi BMD u kobiet z osteoporozą i osteopenią.

PIŚMIENNICTWO

1. Tilg H., Moschen A.R., Kaser A., Pines A., Dotan I. Gut, inflammation and osteoporosis: basic and clinical concepts. *Gut* 2008; 57: 684–694.
2. Boyle W.J., Simonet W.S., Lacey D.L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 423: 337–342.
3. Blair J.M., Zheng Y., Dunstan C.R. Molecules in focus. RANK ligand. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007; 39: 1077–1081.
4. Schoppet 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.
5. 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.
6. Trouvin A.P., Goeb V. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin: maintaining the balance to prevent bone loss. *Clin. Interv. Aging.* 2010; 5: 345–354.
7. Jones D.H., Kong Y.Y., Penninger J.M. Role of RANKL and RANK in bone loss and arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2002; 61(Suppl 2): 32–39.
8. Collin-Osdoby P. Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin. *Circ. Res.* 2004; 95: 1046–1057.
9. 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.
10. Sordillo E.M., Pearse R.N. RANK-Fc: a therapeutic antagonist for RANK-L in myeloma. *Cancer* 2003; 97(3 Suppl): 802–812.

11. Chan K.F., Siegel M.R., Lenardo J.M. Signaling by the TNF receptor superfamily and T cell homeostasis. *Immunity* 2000; 13: 419–422.
12. Locksley R.M., Killeen N., Lenardo M.J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001; 104: 487–501.
13. Williamson E., Bilsborough J.M., Viney J.L. Regulation of mucosal dendritic cell function by receptor activator of NF- κ B (RANK)/RANK ligand interactions: impact on tolerance induction. *J. Immunol.* 2002; 169: 3606–3612.
14. Yu Q., Gu J.X., Kovacs C., Freedman J., Thomas E.K., Ostrowski M.A. Cooperation of TNF family members CD40 ligand, receptor activator of NF- κ B ligand, and TNF- α in the activation of dendritic cells and the expansion of viral specific CD8⁺ T cell memory responses in HIV-1-infected and HIV-1-uninfected individuals. *J. Immunol.* 2003; 170: 1797–1805.
15. Gonzalez-Suarez E., Branstetter D., Armstrong A., Dinh H., Blumberg H., Dougall W.C. RANK over expression in transgenic mice with mouse mammary tumor virus promoter controlled RANK increases proliferation and impairs alveolar differentiation in the mammary epithelia and disrupts lumen formation in cultured epithelial acini. *Mol. Cell Biol.* 2007; 27: 1442–1454.
16. Abrams S.A. Normal acquisition and loss of bone mass. *Horm. Res.* 2003; 60 Suppl 3: 71–76.
17. Heaney R.P., Abrams S., Dawson-Hughes B. i wsp. Peak bone mass. *Osteoporos. Int.* 2000; 11: 985–1009.
18. Leibbrandt A., Penninger J.M. RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann. NY Acad. Sci.* 2008; 1143: 123–150.
19. Wada T., Nakashima T., Hiroshi N., Penninger J.M. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol. Med.* 2006; 12: 17–25.
20. Choi J.Y., Shin A., Park S.K. i wsp. Genetic polymorphisms of OPG, RANK, and ESR1 and bone mineral density in Korean postmenopausal women. *Calcif Tissue Int.* 2005; 77: 152–159.
21. Hsu Y.H., Niu T., Terwedow H.A. i wsp. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men. *Hum. Genet.* 2006; 118: 568–577.
22. Kim J.G., Kim J.H., Kim J.Y. i wsp. Association between osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear factor- κ 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.
23. Koh J.M., Park B.L., Kim D.J. i wsp. Identification of novel RANK polymorphisms and their putative association with low BMD among postmenopausal women. *Osteoporos. Int.* 2007; 18: 323–331.
24. Liu J.M., Zhang M.J., Zhao L. i wsp. Analysis of recently identified osteoporosis susceptibility genes in Han Chinese Women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2010; 95: 112–120.
25. Lu Y., Liu P., Recker R.R., Deng H.W., Dvornyk V. TNFRSF11A and TNFSF11 are associated with age at menarche and natural menopause in white women. *Menopause* 2010; 17: 1048–1054.