

Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie



Małgorzata Łuszczyńska

**Analiza wpływu polimorfizmów genu ECE1 i PPARG
na gęstość mineralną kości u kobiet
w okresie postmenopauzalnym**

Analysis of the influence of ECE1 and PPARG gene
polymorphisms on bone mineral density in postmenopausal
women

Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu

Dyscyplina nauki medyczne

Promotor: Dr hab. n. med. Anna Bogacz, prof. IWNiRZ

Promotor pomocniczy: dr n. med. Izabela Uzar

Szczecin 2022 r.

*Dziękuję Pani prof. Annie Bogacz
za pomoc merytoryczną, cenne wskazówki,
poświęcony czas i ogromną życzliwość*

SPIS TREŚCI

Wykaz stosowanych skrótów.....	4
I. WSTĘP.....	6
I.1. Osteoporoza — definicja i klasyfikacja jednostki chorobowej.....	6
I.1.1. Charakterystyka osteoporozy.....	8
I.1.2. Epidemiologia osteoporozy.....	10
I.1.3. Czynniki ryzyka rozwoju osteoporozy.....	12
I.2. Proces modelowania i przebudowy kości.....	12
I.3. Endoteliny i ich receptory.....	14
I.3.1. ECE-enzym konwertujący endotelinę.....	17
I.4. Receptory aktywowane przez proliferację peroksysomów (PPAR).....	19
I.4.1. Charakterystyka PPAR gamma.....	20
I.4.2. Ligandy dla PPARgamma.....	22
I.4.3. Znaczenie PPARgamma w immunomodulacji i osteogenezie.....	23
I.4.4. Rola PPARgamma w procesie nowotworowym.....	24
I.4.5. Polimorfizm PPARgamma.....	25
I.5. Stomatologia w osteoporozie.....	26
II. CELE PRACY.....	28
III. MATERIAŁ I METODY.....	29
III.1. Grupa badana.....	29
III.1.1. Izolacja DNA.....	30
III.1.2. Oznaczanie polimorfizmów genu ECE1 i PPARG.....	31
III.1.3. Analiza statystyczna.....	34
IV. WYNIKI.....	35
IV.1. Analiza parametrów klinicznych.....	35
IV.2. Analiza polimorfizmu Pro12Ala (C>G) genu PPARG.....	36
IV.3. Analiza polimorfizmu rs213045 (-338G>T) genu ECE1.....	38
IV.4. Analiza polimorfizmu rs213046 (-839A>C) genu ECE1.....	40
IV.5. Analiza korelacji genotypów polimorfizmu genu PPARG z parametrami klinicznymi pacjentek.....	42
IV.6. Analiza korelacji genotypów polimorfizmu rs213045 genu ECE1 z parametrami klinicznymi pacjentek.....	44
IV.7. Analiza korelacji genotypów polimorfizmu rs213046 genu ECE1 z parametrami klinicznymi pacjentek.....	46
V. DYSKUSJA.....	48
VI. WNIOSKI.....	54
VII. STRESZCZENIE.....	55
VIII. SUMMARY.....	56
IX. Piśmiennictwo.....	57
X. Spis tabel.....	66
XI. Spis rycin.....	67

Wykaz stosowanych skrótów

- ANGPLT4 — białko angiopoetynopodobne 4 (ang. *angiopotein-like 4*)
- ANOVA — analiza wariancji (ang. *analysis of variance*)
- BMD — gęstość mineralna kości (ang. *bone mineral density*)
- BMI — indeks masy ciała (ang. *body mass index*)
- BRU — miejsca aktywnej przebudowy (ang. *bone remodelling unit*)
- BSU — jednostki strukturalne kości (ang. *basic structural unit*)
- CD36 — receptor zmiatający CD36 (ang. *class B scavenger receptor*)
- CRP — białko C-reaktywne (ang. *C-reactive protein*)
- CSC — komórki macierzyste raka (ang. *cancer stem cells*)
- DEXA — podwójna absorpcja materii rentgenowskiej (ang. *dual energy x-ray absorptiometry*)
- DNA — kwas deoksyrybonukleinowy (ang. *deoxyribonucleic acid*)
- ECE — enzym konwertujący endoteliny (ang. *endothelin-converting enzyme*)
- EDNR-A — receptor A endoteliny (ang. *endothelin receptor type A*)
- EDNR-B — receptor B endoteliny (ang. *endothelin receptor type B*)
- ERRa — receptor alfa zależny od estrogenów (ang. *estrogen receptor a*)
- ET — endotelina (ang. *endothelin*)
- EVIT — przejście nabłonkowo-mezenchymalne (ang. *epithelial-mesenchymal transition*)
- FABP — białko wiążące kwasy tłuszczowe (ang. *fatty acid binding protein*)
- FGF21 — czynnik wzrostu fibroblastów 21 (ang. *fibroblast growth factor 21*)
- FSH — hormon folikulotropowy (ang. *folliclestimulating hormone*)
- Glut4 — transporter glukozy typu 4 (ang. *facilitated glucose transporter 4*)
- GnRH — gonadoliberyna (ang. *gonadotropin-releasing hormone*)
- HExxH — motyw wiążący cynk (ang. *zinc binding motif sequence of thermolysin*)
- HTZ — hormonalna terapia zastępcza
- IL — interleukina (ang. *interleukin*)
- INF — interferon

- iNOS — indukowalna syntaza tlenku azotu (ang. *nitric-oxide synthase*)
- IP-10 — białko 10 kDa indukowane przez interferon (ang. *interferon inducible protein*)
- LBD — domena wiążąca ligand (ang. *ligand binding domen*)
- LH — hormon luteinizujący (ang. *luteinizing hormon*)
- LPL — lipaza lipoproteinowa (ang. *lipoprotein lipaze*)
- MCP-1 — białko-1 chemoatraktant monocytów (ang. *monocyte chemoattractant protein 1*)
- MMP — metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej (ang. *matrix matalloproteinases*)
- MU — podstawowe jednostki wielokomórkowe (ang. *multicellular unit*)
- ns — nie istotne statystycznie (ang. *not significant*)
- PCJClb — koaktywator 1b PPAR
- PCR — reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*)
- PPAR — receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor*)
- PPARG — receptory gamma aktywowane przez proliferatory peroksysomów (ang. *peroxisome proliferator -activated receptor gamma*)
- ppET — preproendotelina (ang. *prepro endothelin*)
- RXR — receptor X retinoidów (ang. *retinoid x receptor*)
- SEM — standardowy błąd pomiaru (ang. *standard error of measurement*)
- SERM — selektywne modulatory receptora estrogenowego (ang. *selective estrogen receptor modulators*)
- SNP — polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. *single nucleotide plymorphism*)
- SRC — koaktywator PPAR (ang. *steroid receptor coactivator*)
- TNF — czynnik martwicy nowotworów (ang. *tumor necrosis factor*)
- TZD — tiazolidinediony (ang. *tiazolidendion*)
- VAT — trzewna tkanka tłuszczowa (ang. *visceral adipose tissue*)
- VSMC — miocyty gładkie naczyń krwionośnych (ang. *vascular smooth muscle cell*)
- \bar{x} — wartość średnia (ang. *mean; intermediate value*)

I. WSTĘP

Osteoporoza uważana jest za przewlekłą chorobę metaboliczną kości, która charakteryzuje się spadkiem gęstości mineralnej tkanki kostnej i dezorganizacją struktury przestrzennej kości. Schorzenie to stanowi ważny problem społeczny, gdzie Światowa Organizacja Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organization*) klasyfikuje osteoporozę jako chorobę cywilizacyjną. Wydłużający się styl życia człowieka przyczynia się na zwiększenie zachorowalności na tą jednostką chorobową, zwłaszcza wśród kobiet w wieku okołomenopauzalnym.

Zmiany chorobowe są wynikiem działania wielu czynników dziedzicznych i zależnych od stylu życia prowadzonego przez człowieka. Wpływ na ostateczną wartość masy kostnej mają zarówno czynniki wewnątrzpochodne (genetyczne, rasowe, płeć), ale również czynniki zewnątrzpochodne (przyjmowane leki, przewlekłe choroby) oraz możliwe do zmodyfikowania (dieta, aktywność fizyczna, stan odżywienia organizmu). Określenie czynników ryzyka osteoporozy jest istotnym elementem w profilaktyce i leczeniu choroby. Pozwala na wyróżnienie grup ryzyka osteoporozy i podjęcie stosownej profilaktyki. Badania nad genetycznym podłożem choroby dają możliwość uzyskania markerów genetycznych, które mogą być wykorzystane do oszacowania ryzyka złamań oraz opracowania nowych skutecznych leków mających zastosowanie w profilaktyce i leczeniu osteoporozy.

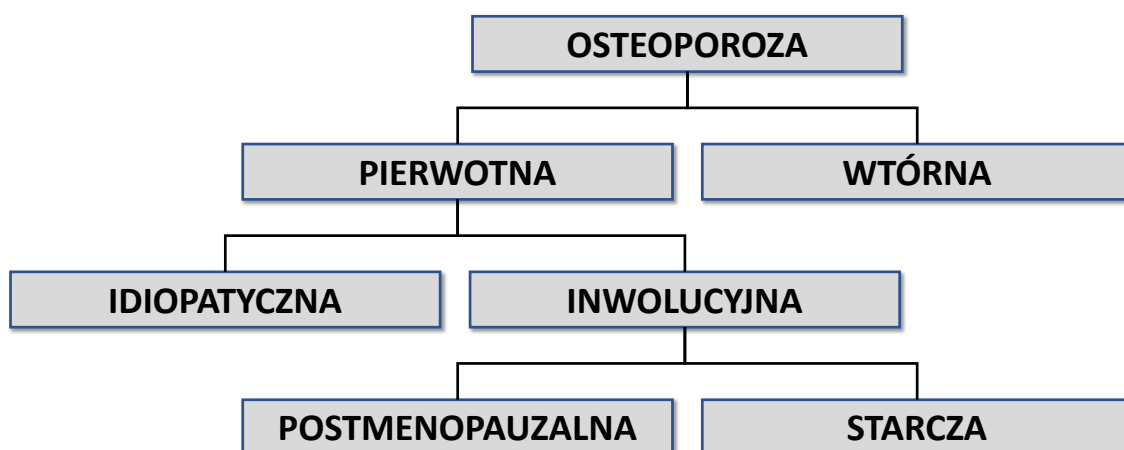
I.1. Osteoporoza — definicja i klasyfikacja jednostki chorobowej

Termin „osteoporoza” pochodzi z języka greckiego i oznacza „kość porowatą”. Już w XIX wieku opisano histologiczne różnice pomiędzy osteomalacją a osteoporozą [1–3]. Osteoporozę opisano, jako niedobór tkanki kostnej, jednak normalnie zmineralizowanej [4]. W latach 40. ubiegłego wieku pojawiła się kolejna hipoteza, która sugeruje, że osteoporoza jest konsekwencją niedoboru estrogenów. W kolejnych latach wykazano, że osteoporoza jest stanem patofizjologicznym, w którym ma miejsce utrata tkanki kostnej. W latach 80. ubiegłego wieku pojawiły się liczne doniesienia, że osteoporoza występuje w dwóch postaciach. Pierwsza, która pojawia się wraz

z niedoborem estrogenów, druga natomiast, wynikającej z wysokiej nadczynności przytarczyc [5].

W latach 90. ubiegłego wieku Riggs i wsp. [6] zaproponowali model wyjaśniający patofizjologię osteoporozy starczej (inwolucyjnej). Za główną przyczynę utraty tkanki kostnej u kobiet w wieku okołomenopauzalnym uznano niedobór estrogenów.

Osteoporozę dzieli się na pierwotną i wtórną, przy czym pierwotna obejmuje około 80% wszystkich zachorowań [rycina 1.]. Zalicza się do niej osteoporozę idiopatyczną (młodzieńczą), spowodowaną zbyt wolnym tempem rozwoju kośćca niż to wynika z norm wiekowych, z zachowaniem normalnej funkcji gonad przy braku zaburzeń hormonalnych. Za osteoporozę pierwotną uznaje się również osteoporozę typu I, występującą u kobiet po menopauzie i wywołaną niedoborem hormonów płciowych, szczególnie estrogenu oraz osteoporozę typu II (inwolucyjną, starczą). Osteoporoza starcza spowodowana jest utratą tkanki kostnej związaną z wiekiem i wywołaną głównie zmniejszeniem ilości i aktywności osteoblastów, w mniejszym stopniu zwiększeniem aktywności osteoklastów. Osteoporoza wtórna pojawia się natomiast wskutek przyjmowania leków steroidowych i immunosupresyjnych lub towarzyszy innej chorobie, w tym: nadczynności gruczołów tarczycy, kory nadnerczy i przytarczyc; reumatoidalnemu zapaleniu stawów, chorobom nerek, a także nowotworom złośliwym [7–9].



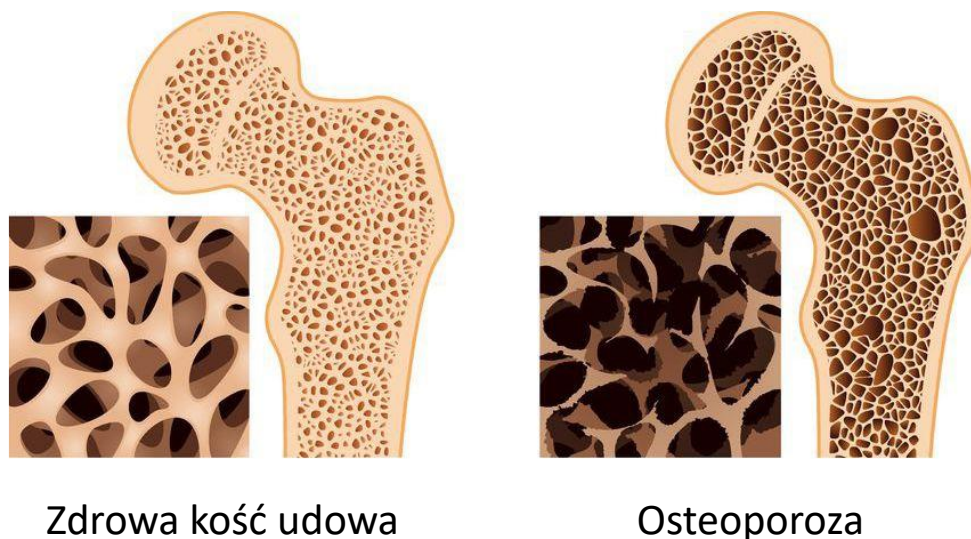
Rycina 1. Schemat podziału osteoporozy.

Definicje osteoporozy zmieniały się w zależności od analizowanych parametrów densytometrycznych. Obecnie według Światowej Organizacji Zdrowia osteoporoza jest

definiowana jako uogólniona choroba metaboliczna kości, która prowadzi do obniżenia masy kostnej i zaburzeń w mikroarchitekturze tkanki kostnej, przyczyniając się do zwiększonej jej łamliwości i podatności na złamania. Dodatkowo, definicja osteoporozy została uzupełniona o parametr T-score. Przyjęto, że wartość wskaźnika T-score, która świadczy o osteoporozie, jest niższa niż $2,5 \pm SD$ od średniej wyników dla szczytowej masy kostnej w wieku 20–29 lat. Według definicji WHO podstawowe znaczenie dla rozpoznania choroby ma gęstość mineralna kości — BMD. Oznaczana jest ona metodą absorpcjometrii promieniowania rentgenowskiego o podwójnej wiązce energetycznej (DXA, ang. *dual-energy X-ray absorptiometry*) [10–14].

1.1.1. Charakterystyka osteoporozy

Osteoporoza jest chorobą metaboliczną, która związana jest z ubytkiem masy kostnej, spowodowanym utratą związków wapnia. To natomiast jest powiązane ze zmianami aktywności hormonalnej, czynnikami genetycznymi czy też sposobem życia. W swoim przebiegu charakteryzuje się ona występowaniem różnych zaburzeń w mikroarchitekturze kości i zmianami w metabolizmie tkanki kostnej. Wygląd kości z osteoporozą przedstawiono na rycinie 2.



Rycina 2. Porównanie kości zdrowej i z osteoporozą¹.

Zbyt późne rozpoczęcie leczenia, przyczynia się zwykle do wystąpienia niebezpiecznych złamań. Jakkolwiek, rozwija się ona również u mężczyzn, to

¹ źródło: <https://www.spineuniverse.com/conditions/osteoporosis/osteoporosis-silent-thief>

osteoporoza dotyczy przede wszystkim kobiet w wieku około- i/lub pomenopauzalnym. Wzrost średniej długości życia sprzyja wzrostowi liczby chorych kobiet oraz mężczyzn w podeszłym wieku. Osteoporoza stanowi w związku z tym coraz bardziej istotny problem społeczny i dlatego też Światowa Organizacja Zdrowia zaliczyła osteoporozę do chorób cywilizacyjnych. Konsekwencją tego faktu jest opracowywanie programu dotyczącego profilaktyki osteoporozy. Szczególne perspektywy otwierają się między innymi dla metod biotechnologicznych mających za zadanie identyfikację polimorfizmów genów, określanych jako „geny kandydujące” czyli powiązane z tą chorobą. Pozwoli to na wskazanie osób narażonych na ewentualny rozwój osteopenii i/lub osteoporozy a tym samym umożliwi wyselekcjonowanie populacji ludzi zagrożonych wystąpieniem tej choroby [15].

Proces starzenia charakteryzuje się obniżeniem ogólnej wydolności fizjologicznej organizmu, przewagą procesów katabolicznych nad anabolicznymi oraz wzrostem podatności na choroby zarówno o przebiegu przewlekłym, jak i ciężkim [16]. Zmiany te wywołuje między innymi stres oksydacyjny, mutacje czy zaburzenia kontroli cyklu komórkowego. Co więcej, dysfunkcja jednego układu pociągają za sobą zmiany innych parametrów fizjologicznych. U zdrowych osób czynności fizjologiczne są utrzymywane na podstawowym poziomie. W miarę upływu czasu dochodzi do obniżania sprawności fizjologicznej. Konsekwencją tego są zaburzenia homeostazy [17, 18].

Ubocznym produktem metabolizmu oksydacyjnego są reaktywne formy tlenu, szczególnie niebezpieczne dla komórek naszego organizmu. Powodują one uszkodzenia DNA, lipidów czy białek. Uszkodzenia oksydacyjne w obrębie DNA przyczyniają się do rozwoju zmian nowotworowych poprzez redukcję funkcji genów supresorowych czy też aktywację promotorów onkogenów. Dochodzi też do uruchomienia procesów peroksydacji lipidów błonowych a tym samym do uszkodzenia zarówno błony komórkowej jak i błon wewnątrzkomórkowych. Komórki posiadają zdolność skutecznego zapobiegania tym uszkodzeniom. Jednak w starzejącym się organizmie procesy naprawcze i ochronne ulegają zaburzeniom, w wyniku czego dochodzi do uszkodzeń komórek i/lub ich śmierci [15, 19].

Starzenie się wiąże się ze zmianami strukturalnymi w obrębie obu typów kości, to jest zbitiej (korowej) i gąbczastej. Oba typy mają odmienne ułożenie blaszek, dlatego też, w przypadku spadku masy kostnej, beleczki kości gąbczastej mające delikatniejszą

strukturę, szybciej będą poddawane procesom resorpcyjnym co prowadzi do szybszego spadku objętości tego typu kości. Finalnie, dochodzi do rozwoju osteoporozy i wzrostu podatności na złamania. Redukcja masy szkieletu kostnego w trakcie starzenia się organizmu spowodowana jest między innymi spadkiem poziomu aktywnej witaminy D. Ponadto obserwuje się zaburzenia jelitowej absorpcji wapnia, wzrost poziomu parathormonu i wzrost aktywności osteoklastów oraz obniżenie poziomu estrogenów [20, 21].

W życiu kobiety momentem przełomowym tych zmian jest okres okołomenopauzalny i sama menopauza. Jest to okres charakteryzujący się stopniowym wygaszaniem i ostatecznym wyłączeniem funkcji jajników z jednej strony oraz zanikiem menstruacji z drugiej. W tym czasie organizm kobiety dostosowuje się do odmiennych warunków wynikających z niedoboru estrogenów i zaprzestania wydzielania przez podwzgórze gonadoliberyny (GnRH) a przez przysadkę hormonu folikulotropowego (FSH) i luteinizującego (LH) [22, 23].

Obniżenie wytwarzania estrogenów przyczynia się do wystąpienia zaburzeń w metabolizmie tkanki kostnej i rozwoju osteoporozy. Zwykle jest też przyczyną zwiększonego ryzyka pojawienia się chorób nowotworowych. W tym czasie u kobiety, w przeciągu kilku lat po wystąpieniu menopauzy, dochodzi do znacznej utraty masy kostnej. Po ukończeniu 65 roku życia spadek masy kostnej u kobiet wynosi około 25% maksymalnej jej wartości. Ostatecznie, w późniejszym okresie życia, spadek ten jest jednak znacznie wolniejszy [23, 24].

1.1.2. Epidemiologia osteoporozy

Osteoporoza staje się poważnym problemem społecznym, głównie ze względu na proces starzenia się populacji. Szacuje się, że na świecie żyje obecnie około 323 mln mieszkańców powyżej 65. roku życia i liczba ta będzie wzrastać. Prognozuje się, że w roku 2050 wyniesie ona 1,55 mld. Dane epidemiologiczne wskazują, że na osteoporozę cierpi ponad 75 milionów mieszkańców Europy, Japonii i Stanów Zjednoczonych. Według prognoz Światowej Organizacji Zdrowia liczba występujących na świecie złamań może wzrosnąć z 1 600 000 w 1990 roku do 6 260 000 w roku 2050. Szacuje się, że w Polsce ponad 50% ludności po pięćdziesiątym roku życia narażona jest na złamania osteoporotyczne, przy czym znacznie częściej chorują kobiety, w szczególności

w starszym wieku. Ryzykiem rozwoju osteoporozy zagrożonych jest 5 milionów osób płci żeńskiej oraz około 4 milionów osób płci męskiej. Skalę zjawiska zobrazować mogą dane pochodzące z USA, gdzie u 54% (16,8 milionów) białych kobiet w wieku postmenopauzalnym występuje osteopenia, a 30% (9,4 milionów) choruje na osteoporozę [13, 25, 26]. Życiowe ryzyko wystąpienia złamania kości u kobiety w wieku 50 lat oszacowano aż na 39,7%. Najgroźniejsze w skutkach złamanie szyjki kości udowej, występujące z częstością 2,5 złamań na 1000 mieszkańców, jest trzecią co do częstości przyczyną zgonów w Polsce, po chorobach krążenia i nowotworowych [27, 28]. Około 5–20% ofiar tego złamania umiera w przeciągu roku, a ponad 50% osób, które przeżyły pierwszy rok pozostaje inwalidami. Ponadto, u około 40% występują powikłania ze strony układu oddechowego, sercowo-naczyniowego, moczowego, centralnego układu nerwowego, a także zmiany septyczne i odleżyny [29]. Drastyczna zmiana jakości życia skutkuje pogorszeniem stanu psychicznego pacjentów dotkniętych złamaniami, często też występuje niepokój i depresja uniemożliwiająca normalne funkcjonowanie.

Poważne w skutkach złamania kręgosłupa są przyczyną 52 000 hospitalizacji w Stanach Zjednoczonych oraz 2188 w Anglii i Walii. Dane te dotyczą pacjentów powyżej 45. roku życia [30]. Złamania kręgosłupa wywołują silne bóle pleców, zmniejszenie wzrostu, deformacje kości i inwalidztwo. Wraz z wydłużeniem się czasu między urazem a diagnozą złamania kręgosłupa następuje spadek szans na przeżycie pacjentów. W przypadku złamań kości udowej istnieje odwrotna zależność.

Przypuszcza się, że około 40% kobiet i 13% mężczyzn rasy białej w wieku 50 lat mieszkających w USA, przynajmniej raz w życiu doświadczy złamania kości. Szacuje się, że u kobiet powyżej 50. roku życia ryzyko to wzrośnie nawet do 70%. Jest ono większe w USA niż w Skandynawii, Wielkiej Brytanii i centralnej Europie. Szacuje się, że w Stanach Zjednoczonych występuje 1,5 mln. złamań rocznie, najczęstsze są złamania kręgosłupa, występujące w ilości 700 tys., złamania bliższego końca kości udowej (300 tys.) oraz dalszej części kości promieniowej (250 tys.). W Polsce, na podstawie badań 232 osób powyżej 50. roku życia, mieszkających w Warszawie, stwierdzono złamanie przedramienia u 14,6%, a złamanie kości udowej u 0,9% kobiet [31–33].

Osteoporoza została zaliczona przez Światową Organizację Zdrowia do głównych chorób cywilizacyjnych. Przy założeniu, że liczebność populacji ludzi starszych będzie wzrastać, a niezdrowy tryb życia się utrzymywać, skala problemu będzie

coraz większa. Wskazana jest w tej sytuacji odpowiednia diagnostyka osteoporozy i podjęcie profilaktyki choroby.

1.1.3. Czynniki ryzyka rozwoju osteoporozy

Osteoporoza jest chorobą, która rozwija się pod wpływem interakcji pomiędzy czynnikami wewnętrznymi a środowiska zewnętrznego. Kluczową rolę w tych interakcjach mają czynniki hormonalne i genetyczne. Co jest szczególnie ważne, są to te czynniki, które oddziałują na wartość BMD, przez co wpływają na ryzyko i częstość złamań. Środowiskowymi czynnikami mającymi wpływ na rozwój tej choroby są przede wszystkim czynniki żywieniowe. Należą do nich niedożywienie czy niedostateczna podaż wapnia czy też witaminy D. Ważny jest też styl życia a więc brak aktywności fizycznej czy też stosowanie różnych używek. Listę tę należy uzupełnić o ilość przebytych cięż, stany zapalne, zaburzenia dotyczące funkcjonowania szpiku kostnego, przebyte choroby czy zażywane leki [33].

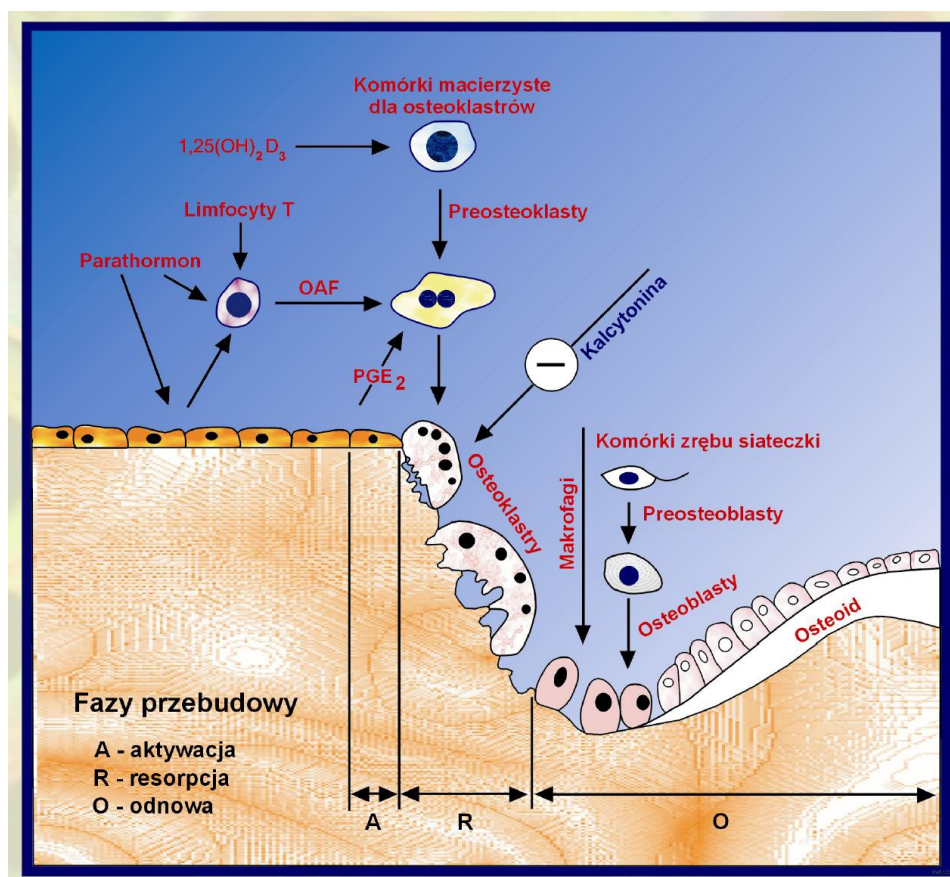
Wyniki licznych badań genetycznych przeprowadzonych na bliźniętach i rodzinach wielopokoleniowych ponad wszelką wątpliwość potwierdziły udział czynników genetycznych w rozwoju osteoporozy. Co więcej, sądzi się, że choroba ta nie jest zależna tylko od obecności polimorfizmów. Mogą one wpływać na wzrost człowieka, jego konstytucję kostną a co ważne ingerują w metabolizm tkanki kostnej. Ważne jest również prawidłowe funkcjonowanie układu hormonalnego. Dotyczy to szczególnie tych sytuacji kiedy wpływają one na gospodarkę wapniową organizmu. Badania genetyczne dotyczące osteoporozy sprowadzają się do analizy polimorfizmów genowych. Musimy jednak rozwijać te badania, które posiadają na przykład związek z masą kostną i/lub metabolizmem tkanki kostnej. W ten sposób będziemy bliżsi odkrycia czynników odpowiedzialnych za występowanie osteoporozy [34, 35].

1.2. Proces modelowania i przebudowy kości

Kości są nieustannie odnawiane w procesie modelowania i przebudowy tkanki kostnej. Modelowanie kości rozpoczyna się wraz z rozwojem szkieletu w życiu płodowym. Trwa do około 20 roku życia u kobiet i 25 lat u mężczyzny, kiedy wzrost szkieletu kostnego zostaje zakończony. W procesie modelowania kość uzyskuje

odpowiedni kształt. Jest formowany w miejscach resorpcji, co prowadzi do zmian tak w kształcie jak i mikroarchitekturze.

Przebudowa tkanki kostnej, czyli remodeling jest zarówno podstawowym jak i niezbędnym procesem dla zachowania właściwej kondycji tej tkanki. Jest on również niezbędny przy naprawie powstałych mikrouszkodzeń [36, 37]. Schemat przebudowy tkanki kostnej umieszczono na rycinie 3.



Rycina 3. Schemat przebudowy tkanki kostnej².

Przebudowa kości ma charakter cykliczny, umożliwia to utrzymanie mechanicznej spójności szkieletu. Jest to możliwe dzięki „rozpuszczaniu” przez osteoklasty zużytej tkanki kostnej i zastępowaniu jej nową, tworzoną przez osteoblasty [38, 39, 40]. Morfologiczne struktury obrotu kostnego nazywane są podstawowymi jednostkami wielokomórkowymi (BMU) lub miejscami aktywnej przebudowy (BRU). Jednostki te z chwilą zakończenia procesu przebudowy wewnętrznej kości, określane są jako jednostki strukturalne kości (BSU) [41].

² źródło: https://e-dukacja.pl/courses/ciagle_miekkie_patof_osteop/files/Fizjologia%20budowa%20i%20regulacja%20metabolizmu%20tkanki%20kostnej.pdf

Osteoklasty szczelnie otaczają powierzchnię kości. Zamykają w ten sposób przestrzeń wokół kości uniemożliwiając dostęp osteoblastom. W ten sposób hamują jej rozwój. Tak wytworzona kieszonka nazywana jest jamą lub zatoką resorpcyjną, erozyjną. Do jamy tej osteoklasty uwalniają jony wodorowe oraz enzymy proteolityczne. W takim środowisku, białka budujące macierz kostną i składniki mineralne są rozkładane [36]. Etap ten trwa od kilku do kilkunastu dni. Jest on zastępowany przez tzw. „fazę twórczą”. Dochodzi wówczas do ograniczenia erozji i usuwania z jamy resorpcyjnej osteoklastów. Powstawanie kości, poprzedza jej formowanie przez osteoblasty. Osteoblasty wypełniają powstałą wcześniej jamę resorpcyjną białkami macierzy, tworząc osteoid. Następnie dochodzi w tym miejscu do odkładania związków mineralnych czyli do procesu mineralizacji kości. Utworzona jama resorpcyjną stopniowo przez kilka miesięcy wypełnia się elementami nowej kości. Osteoblasty zmieniają kształt, stając się spłaszczonymi komórkami — osteocytami [34].

Kość gąbczasta w porównaniu ze zbitą jako bardziej aktywna metabolicznie, znacznie częściej poddawana jest przebudowie. W ciągu roku u osoby dorosłej ulega przemianie około 25% kości gąbczastej i tylko 3% kości zbitej. Spadek masy kostnej jest przede wszystkim konsekwencją wysokiej aktywności osteoklastów. Wzrost częstotliwości przebudowy kości w wyniku przewagi resorpcji nad odbudową kości to drugi mechanizm utraty kości, który towarzyszy rozwojowi pomenopauzalnej osteoporozy [36].

Obrót kostny zwiększa się wyraźnie podczas menopauzy. Wskazują na to liczne obserwacje kobiet zagrożonych osteoporozą. U tych osób dochodzi do szybszej utraty tkanki kostnej, prawdopodobnie poprzez zwiększoną aktywność żerną osteoklastów. W tworzeniu odpowiedniego schematu leczenia ważne są też markery biochemiczne. Pozwalają one na monitorowanie leczonych osób z jednej strony oraz identyfikację czynników ryzyka osteoporozy z drugiej [17].

I.3. Endoteliny i ich receptory

Endotelina (ET) jest substancją uważaną za hormon o działaniu parakrynnym, występujący w postaci trzech izoform: ET1, ET2 oraz ET3 różniących się strukturą. Są syntetyzowane przez wiele typów komórek, w tym komórki śródbłonka naczyń, nerek, jelita, gruczołów wydzielania wewnętrznego, endometrium, łożyska czy hepatocyty.

Ekspresja tego peptydu jest regulowana przez wiele różnorodnych czynników. I tak, wzrost jej wydzielania zachodzi pod wpływem katecholamin, kortyzolu, angiotensyny II, wazopresyny czy też insuliny. Uwalnianie omawianego peptydu odbywa się także przy udziale czynników fizykochemicznych takich jak: hipoksja, kwasica czy niedokrwienie. Za hamowanie odpowiada między innymi przedsiolkowy czynnik natriuretyczny. Miejscem ich rozpadu są przede wszystkim płuca, ale również wątroba czy też nerki [42, 43, 44].

Endoteliny zbudowane są z 21 aminokwasów. Ich struktura chemiczna jest podobna do sarafotoksyny — składnika jadu wielu węży. Peptydy te w bardzo krótkim czasie silnie zwężają światło naczyń krwionośnych. Skurcz ten jest nieoczekiwany i utrzymuje się przez 45 do 60 minut. Z farmakologicznego punktu widzenia reakcje wywołane przez endoteliny można podzielić na dwie klasy. Pierwszy typ reakcji obejmuje zwężenie naczyń i oskrzeli oraz równoczesną stymulację wydzielania aldosteronu. W tym typie reakcji silniej działają ET-1 i ET-2. Drugi typ reakcji obejmuje przejściowe rozszerzenie naczyń i pod tym względem wszystkie trzy ET mają prawie równą siłę działania. Jak dotąd, endotelina-1 jest najsilniejszym zidentyfikowanym czynnikiem zwężającym naczynia. Wydaje się, że żyły są bardziej wrażliwe na działanie ET-1 niż tętnice. Zróznicowaną wrażliwość wykazują łożyska naczyniowe poszczególnych narządów organizmu człowieka.

Endotelina po raz pierwszy została wyizolowana z hodowli komórek śródbłonka naczyń. Nie zauważono różnic międzygatunkowych między izoformami ET człowieka a wieloma gatunkami zwierząt. Uważa się, że u człowieka najbardziej znaczącą fizjologicznie izoformą jest ET-1, produkowana przede wszystkim przez komórki śródbłonka naczyń. Endoteliny działają poprzez dwa rodzaje receptorów związanych z białkami G. Są to, EDNR-A oraz EDNR-B. Synonimem nazw receptorów używanych równocześnie jest ET-A i ET-B. Receptor ET-A odpowiada za pierwszy typ reakcji i jest dominującym typem receptora w komórkach mięśniowych gładkich naczyń. Receptor ET-B odpowiada za drugi typ reakcji i znajduje się między innymi w błonie komórek śródbłonkowych [45, 46]. Receptory ET-B mają jednakowe powinowactwo do wszystkich trzech izoform endoteliny [47].

Synteza prepro-ET-1 jest pobudzana przez wiele czynników, takich jak: wazopresyna, angiotensyna II, adrenalina, interleukina-1, czynniki wzrostu, TNF- α ,

niedotlenienie, stres czy endotoksyny. Prekursor nie jest magazynowany w ziarnistościach wewnątrzkomórkowych. Czynna biologicznie postać endoteliny-1 jest produktem działania enzymu litycznego, którym jest błonowa metaloproteaza. Znaczenie ET-1 jako krążącego hormonu nie jest w pełni wyjaśniona. Z całą pewnością wykracza poza oddziaływania na układ sercowo-naczyniowy.

Obecnie wiadomo, że ET-1 w sposób parakryny bierze udział w zachowaniu optymalnego przepływu krwi w małych naczyniach oporowych. Pełni istotną funkcję w utrzymywaniu hemodynamicznej homeostazy [48, 49]. W ten sposób endotelinę-1 należy traktować raczej jako czynnik działający miejscowo niż hormon krążący. Dowód na to stanowi fakt, że ET-1 jest preferencyjnie uwalniana i transportowana zgodnie z wektorem w kierunku mięśniówki gładkiej naczynia, a nie w kierunku jego światła.

Synteza endotelin przebiega w kilku etapach. Są syntetyzowane pod postacią nieaktywnych preproendotelin (ppET) zbudowanych z 212 reszt aminokwasowych. Wewnątrzkomórkowo ulegają przekształceniu w proendoteliny (tzw. „duże endoteliny”) zawierające 38–39 (ET-1), 37–38 (ET-2), 41 (ET-3) aminokwasów. Przemiana „dużych endotelin” zachodzi zarówno wewnątrz- jak i zewnątrzkomórkowo przy udziale enzymu konwertującego endoteliny (ECE) zależnego od jonów cynku. Synteza endotelin przebiega już po około 10–15 minutach od pobudzenia komórki. Komórki nie mają zdolności do jej magazynowania [42, 44].

Jak już wspomniano, endoteliny działają poprzez dwa rodzaje receptorów związanych z białkami G. Połączenie z receptorem EDNR-A prowadzi do wzrostu śródkomórkowego stężenia jonów wapnia i warunkuje skurcz komórki mięśniowej gładkiej. Natomiast aktywacja receptora ET-B stymuluje syntezę tlenu azotu i zmniejsza wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapnia. Przeważa jednak efekt wazokonstrykcyjny endotelin. Ekspresja receptora ETA jest największa w błonie komórek mięśni gładkich i serca, natomiast ET-B w komórkach śródbłonna, mięśniowych, a także w nerce. Ponadto receptory dla endoteliny zlokalizowane są w płucach, ośrodkowym układzie nerwowym, nadnerczach oraz skórze [42, 43, 50]. Blokada EDNRA łagodzi nadciśnienie i poprawia czynność serca w przypadku jego niewydolności.

Najlepiej poznaną izoformą jest endotelina-1. Bierze ona udział w proliferacji i różnicowaniu komórek, utrzymywaniu równowagi kwasowo-zasadowej, prawidłowym funkcjonowaniu układu krążenia. Jest zaangażowana w procesy zapalne oraz procesy

gojenia ran. Zwiększone stężenie tego peptydu obserwuje się u chorych z zawałem serca, pierwotnym nadciśnieniem tętniczym, ostrą niewydolnością nerek czy astmą oskrzelową.

1.3.1. ECE-enzym konwertujący endotelinę

U człowieka zidentyfikowano trzy izoformy ECE: ECE1, ECE2 i ECE3 [51]. Najważniejsze są dwie pierwsze. Powstają one na bazie dwóch różnych genów. Każda z nich ma 4 warianty splicingu (a–d). ECE1 preferuje PH obojętne, a ECE2 kwaśne [52]. Oba enzymy *in vitro* katalizują konwersję dużych ET do aktywnej formy endoteliny. ECE1 jest szeroko rozpowszechniony w organizmie człowieka. Ekspresję tej formy wykazano w endotelium, ale także w innych komórkach np. miocytach gładkich naczyń krwionośnych (VSMC), makrofagach, neuronach, ale również w komórkach niektórych nowotworów. Wykazano, że w aorcie z rozwiniętą miażdżycą zarówno ECE1, jak i ET1 są podwyższone, z wyższą ekspresją i współlokalizacją w błonie wewnętrznej. Sugeruje to, że lokalna konwersja dużych ET1 w biologicznie aktywną ET1 przez ECE1 jest ważnym mechanizmem regulacyjnym [51]. ECE1 jest związana z błoną metaloproteazą typu II. Występuje ona jako dimer na powierzchni komórki [53]. ECE1 ma pojedynczą transbłonową helikalną domenę składającą się z 56-aminokwasowego ogona cytoplazmatycznego na końcu N i miejsca katalitycznego 681-aminokwasowego zlokalizowanego w zewnątrzkomórkowej domenie C-końcowej. ECE1 zawiera motyw HEXXH wiążący cynk. Jest to cecha wspólna z wieloma metaloproteazami. W przeciwieństwie do innych metaloproteaz, funkcjonalna forma ECE1 jest homodimerem dwóch monomerów ECE1 o masie ~130 kDa, połączonych pojedynczym wiązaniem disiarczkowym [53]. Poszczególne warianty splicingowe mają różną lokalizację. ECE1a lokalizuje się w błonie komórkowej i jądrowej, 1b w aparacie Golgiego na biegunie trans, 1c przede wszystkim w błonie komórkowej a 1d w błonie komórkowej, pęcherzykach endosomalnych i aparacie Golgiego. Obecność w ECE1b dwóch motywów dileucynowych umożliwia kierowanie tej formy do przedziału wewnątrzkomórkowego, zapobiegając wstawianiu i translokacji białka do błony komórkowej [51]. Warianty splicingowe mają porównywalną aktywność enzymatyczną i różnią się jedynie N-końcową sekwencją [51]. Aktywacja ET1 przez różne warianty ECE1 w różnych lokalizacjach komórkowych może mieć ważne konsekwencje

funkcjonalne. Polimorfizmy w ludzkim promotorze ECE1b, które zmieniają ekspresję ECE1b są związane z nadciśnieniem, miażdżycą, niedokrwieniem i rakiem żołądka.

Po 50. roku życia u jednej z dwóch kobiet dochodzi do złamania prowadzącego do niepełnosprawności a nawet przedwczesnej śmierci [54]. W Stanach Zjednoczonych, złamania spowodowały bezpośrednie koszty w wysokości kilkunastu miliardów dolarów w skali jednego roku a przewiduje się, że koszty te do 2050 roku wzrosną do 200% [55]. Szczytowa gęstość mineralna kości jest najważniejszym czynnikiem określającym ryzyko osteoporozy w ciągu całego życia i ma większy wpływ na ryzyko osteoporozy niż spadek BMD z powodu menopauzy lub wieku kobiety. Przewiduje się, że u 10% populacji wzrost szczytowej masy kostnej opóźni wystąpienie osteoporozy o około 15 lat [56]. Dwie trzecie szczytowej masy kostnej są uwarunkowane genetycznie, a na jedną trzecią mają wpływ inne czynniki, takie jak aktywność fizyczna, dieta czy używki [33, 57]. Ogólnie wiadomo, że podłoże genetyczne ma wpływ zarówno na szczytową masę kostną jak i późniejsze ryzyko wystąpienia osteoporozy. Jednak jak dotąd, udało się zidentyfikować tylko dwa geny zaangażowane w te procesy. Są to: gen receptora witaminy D, oraz gen receptora estrogenowego [58, 59]. Przewiduje się, że wzrost o 10% szczytowej masy kostnej u młodych kobiet zmniejszyłby o 50% ryzyko złamań przez całe życie. Te odkrycia pokazują, że uzyskanie i utrzymanie szczytowej masy kostnej ma kluczowe znaczenie w strategii zdrowia publicznego. Ostatecznym celem jest bowiem zmniejszenie ryzyka osteoporozy i złamań [60].

ET1 powoduje u ludzi niekontrolowany wzrost kości w przypadku przerzutów do kości, a blokada jej receptora A (EDNRA) *in vivo* zapobiega wzrostowi w kości przerzutów raka piersi. Rola zależnej od ECE1 sygnalizacji ET1 w prawidłowej fizjologii kości jest stosunkowo słabo zbadana. Jak dotąd, tylko w kilku laboratoriach badano sygnalizację ET w warunkach fizjologicznych [61, 62]. Zidentyfikowano dwa geny *Ece1* i *Bmd7* odpowiedzialne za 40% zmienności wielkości kości, ich gęstości i wydajności biomechanicznej [63]. Warto zaznaczyć, że w jednym z badań w obrębie badanego genomu zidentyfikowano aż 8 polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP), które były powiązane ze zdrowiem kości.

E2F2 jest jednym z czynników transkrypcyjnych należących do rodziny E2F. Reguluje on wzrost, różnicowanie i przeżycie komórek. Konstrukty reporterowe zawierające polimorfizm ECE1 C-338A wykazały zwiększony poziom transkrypcji

wariantu ECE1b. Ablacja genu E2F2 u myszy prowadzi do zmniejszenia wewnątrzkomórkowych poziomów ECE1b i wzrostu poziomów błonowych wariantów EC1b. Ablacja E2F2 u obu płci powoduje spadek ogólnej aktywności ECE1, oraz zwiększone skurcze tętnic i podwyższone ciśnienie krwi w porównaniu z dzikim typem. Dane te sugerują, że wzrost produkcji ECE1b, wewnątrzkomórkowej postaci ECE1, spowodowany przez polimorfizm 338 (C/A) zmienia stosunek wewnątrzkomórkowego do błonowego ECE. Na podstawie badań wydaje się, że wariant ECE1b reguluje ciśnienie krwi i może pośrednio regulować ekspresję innych wariantów ECE 1 .

ET1 jest silnym czynnikiem zwężającym naczynia. SNP w promotorze ludzkiego wariantu ECE1b u kobiet po menopauzie jest powiązany z nadciśnieniem. Niezależne badania kliniczne wykazały, że polimorfizmy genu *ECE1b* w regionie regulatorowym (ECE1b -338 (C/A) i ECE1b -839 (G/T) (rs213045 i rs213046) są również powiązane z nadciśnieniem u kobiet, ale nie u mężczyzn. Testy wykazały, że polimorfizm ECE1 C-338A zwiększa również wiązanie E2F2 z regionem regulatorowym ECE1b i transkrypcję ECE1b. Efekt ten był zwiększony w obecności polimorfizmu -839 T.

I.4. Receptory aktywowane przez proliferację peroksosomów (PPAR)

Białka PPAR należą do nadrodziny receptorów jądrowych. U ludzi do tej rodziny należy około 50 receptorów [64]. Poza PPAR należą tu też: receptory: hormonów tarczycy, hormonów steroidowych, witaminy D3 czy kwasu retinowego [65]. Receptory jądrowe regulują ważne procesy związane z rozwojem, fizjologią, reprodukcją i homeostazą. Są one jednocześnie indukowanymi przez ligandy czynnikami transkrypcyjnymi [64]. Białka PPAR składają się z 4 domen (A/B, C, D i E/F). Obszar A/B jest zlokalizowany na N-końcu cząsteczki, jest obszarem aktywnym funkcjonalnie i różni się w zależności od izoformy, jest niezależny od liganda. Region C jest domeną wiążącą DNA zawierającą dwa motywy palca cynkowego. Obszar D jest domeną zawiasową łączącą C z E/F. Na końcu C zlokalizowana jest domena E/F odpowiadająca za wiązanie liganda (LBD) i zawiera zależny od niego obszar aktywacji transkrypcji [66]. Biologiczne działanie białek PPAR zależy od ich ligandów oraz obecności różnych białek, które działają jako koaktywatory lub korepresory a ich obecność może znacznie zmieniać ekspresję genów [67]. U ssaków podrodzina PPAR liczy 3 członków: alfa,

wcześniej określany jako receptor sierocy, beta i gamma. Te 3 podtypy różnią się ekspresją tkankową. PPAR alfa podlega ekspresji głównie w kardiomiocytach, hepatocytach, komórkach nabłonka jelit i kanalików nerkowych. Forma ta bierze udział w metabolizmie kwasów tłuszczowych, glukozy i lipidów [67]. Aktywacja tej formy indukuje ekspresję genów biorących udział w metabolizmie lipidów i lipoprotein, w utlenianiu kwasów tłuszczowych, w desaturacji acyloCoA, metabolizmie HDL, syntezie ketonów [67]. Aktywny PPAR α stymuluje ekspresję genu FGF21 i genu białka 4 podobnego do angiopoetyny (ANGPLT4) [67]. Forma beta jest obecna w wielu tkankach [68]. Najwyższą ekspresję stwierdzono w układzie pokarmowym: przełyku, jelitach i wątrobie a także nerkach, mięśniach szkieletowych i sercu. Pełni kluczową rolę w utlenianiu kwasów tłuszczowych. Poprawia też profil lipidowy i cholesterolowy. Chroni przed rozwojem otyłości. Reguluje poziom glukozy we krwi, chroni serce przed uszkodzeniami wywołanymi przez ischemię i reperfuzję [68].

1.4.1. Charakterystyka PPAR gamma

Formy gamma są powiązane z takimi chorobami jak cukrzyca, otyłość czy miażdżycy [69]. Występują głównie w tkance tłuszczowej, w mniejszej ilości w jelitach, wątrobie, nerkach, siatkówce, układzie odpornościowym (szpik kostny czerwony, makrofagi, limfocyty) i w bardzo niewielkich ilościach w mięśniach szkieletowych [65, 66]. Są kodowane przez gen PPARG. Gen ten u człowieka jest zlokalizowany na chromosomie 3p25.2 (chromosom 3, pozycja p25.2) [64]. PPAR gamma są głównym regulatorem biologii tkanki tłuszczowej. Ludzki gen składa się z 9 eksonów, na bazie których powstają 4 warianty mRNA (PPARGI-4) a poprzez zastosowanie różnych promotorów i alternatywnego splicingu tworzone są 2 białkowe izoformy [64]. Na bazie transkryptów mRNA PPAR1, PPAR3 i PPAR4 powstaje białkowa izoforma PPAR γ 1 składająca się z 477 aminokwasów. Ulega ekspresji w tkance tłuszczowej, wątrobie, jelicie grubym, sercu, różnych nabłonkach, mięśniach szkieletowych, i w komórkach układu odpornościowego (makrofagi, komórki dendrytyczne, limfocyty T. W oparciu o transkrypt PPARG2 powstaje izoforma PPAR γ 2, która na N-końcu posiada dodatkowe u myszy 28 a u człowieka 30 aminokwasów. Ta izoforma ulega ekspresji głównie w tkance tłuszczowej. Ta izoforma podlega również ekspresji w komórkach urotelium czyli wysoce wyspecjalizowanych komórkach nabłonka przejściowego wyścielającego

moczowody, pęcherz moczowy i w regulatorowych limfocytach T (Treg) oraz innych limfocytach T chociaż ekspresja jest w nich stosunkowo niska [64]. Niedawno u ludzi opisano trzecią i czwartą izoformę PPAR γ . Oznaczono je jako PPAR γ 1 Δ 5 i PPAR γ 2 Δ 5. PPAR γ 2 Δ 5 ulega ekspresji w tkance tłuszczowej i z powodu fizjologicznego pominięcia eksonu 5 nie zawiera domeny wiążącej ligand. Wykazano dodatnią korelację między endogenną ekspresją PPAR γ 1 Δ 5 a BMI pacjentów z nadwagą lub otyłością i cukrzycą typu 2. Naturalnie występujące izoformy PPAR γ 1 Δ 5 zaburzają potencjał adipogeny komórek będących prekursorami adipocytów poprzez dominujące hamowanie aktywności PPAR γ co przyczynia się do dysfunkcji tej tkanki w otyłości [64]. Endogennymi ligandami PPAR γ są prostaglandyny, eikozanoidy i kwasy tłuszczowe [65]. W PPAR γ w przeciwieństwie do innych receptorów jądrowych, domena wiążąca ligand może przystosowywać się do różnych zarówno naturalnych jak syntetycznych ligandów [70]. W ciągu ostatnich lat wykazano, że białka PPAR są kluczowymi regulatorami odpowiedzi zapalnej i odpornościowej. Fakt ten otwiera nowe obszary dla rozwoju leków użytecznych w przewlekłych chorobach zapalnych takich jak miażdżycy, oporność na insulinę indukowana otyłością czy też choroby degeneracyjne. Białka PPAR podlegają regulacji przez szereg syntetycznych związków takich jak fibraty np. kloflbrat czy fenofibrat. Są one ligandami formy alfa, są powszechnie stosowane klinicznie w hipertriglicydemii. Tiazolidinediony (TZD) są ligandami PPAR γ stosowanymi w cukrzycy typu 2 [71]. Po interakcji z agonistą kompleks jest transportowany do jądra i dochodzi do utworzenia heterodimeru z innym jądrowym receptorem, receptorem X retinoidów (RXR). RXR tworzy heterodimery również z innymi receptorami np. z receptorem hormonów tarczycy. Funkcja PPAR jest modyfikowana przez liczne koaktywatory i korepresory, które mogą stymulować lub hamować funkcję receptora [65].

W organizmie ssaków występują trzy rodzaje adipocytów: białe (żółte), brunatne i beżowe. Te 3 rodzaje komórek powstają z różnych prekursorów i różnią się morfologią i funkcją. Na różnych etapach funkcjonowania tych komórek kluczową rolę ma PPAR γ [72]. Ostatnio w gruczołach mlekowych ciężarnych myszy opisano nowy typ adipocytów: adipocyty różowe [64]. W czasie laktacji podskórne adipocyty białe gruczołów mlekowych gryzoni ulegają transróżnicowaniu do nabłonkowych komórek

gruczołowych produkujących mleko a brunatne w komórki mioepitelialne. Przemiana ta jest odwracalna [73].

W organizmie człowieka, PPAR γ jest głównym regulatorem różnicowania adipocytów, pełni ważną rolę w metabolizmie lipidów i homeostazie glukozy, moduluje metabolizm i procesy zapalne w komórkach odpornościowych jak też kontroluje proces proliferacji komórek [74]. PPAR γ ulega indukcji podczas różnicowania preadipocytów do adipocytów. Brak tkanki tłuszczowej u myszy pozbawionych PPAR γ jest dowodem na udział tego białka w procesie różnicowania adipocytów. PPAR γ również aktywuje wiele genów związanych z magazynowaniem w adipocytach tłuszczów [74]. Kontroluje ekspresję licznych czynników wydzielanych przez tę tkankę. Czynniki te — adipokiny zwiększają np. adiponektyna, leptyna lub zmniejszają np. rezystyna czy TNF α wrażliwość na insulinę. Poza aktywnością adipogeniczną, PPAR γ jest również ważny w regulacji metabolizmu lipidów, ma wpływ na geny kodujące białka biorące udział w uwalnianiu, transporcie i magazynowaniu kwasów tłuszczowych takie jak lipaza lipoproteinowa (LPL) i transporter kwasów tłuszczowych CD36 [65]. PPAR γ jest silnym modulatorem aktywności nie tylko tkanki tłuszczowej, ale również komórek endotelialnych i naczyniowych miocytów gładkich. W komórkach endotelialnych reguluje zadania związane ze stanami zapalnymi i miażdżycą [65]. PPAR γ bezpośrednio moduluje ekspresję genów związanych z homeostazą glukozową np. zwiększa ekspresję transportera glukozy typu 4 (Glut4). Ulega również ekspresji w różnych typach komórek powiązanych z odpornością, szczególnie w komórkach prezentujących antygeny takich jak makrofagi czy komórki dendrytyczne. W tych komórkach, PPAR γ aktywuje nie tylko geny powiązane z metabolizmem lipidów, ale również geny związane z odpornością i procesami zapalnymi [74].

1.4.2. Ligandy dla PPAR γ

Ligandy PPAR γ hamują w różnych typach komórek np. w monocytach/makrofach, komórkach nabłonkowych, miocytach gładkich, endotelium, komórkach dendrytycznych i limfocytach produkcję wielu zapalnych mediatorów i cytokin [71]. Działanie przeciwzapalne ligandów PPAR γ wykazano również w modelach chorobowych: miażdżycy, otyłości indukowanej opornością na insulinę, alergicznego zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego, Parkinsona, Alzheimer, łuszczycy, chorób

zapalnych jelit i artretyzmu. Badania kliniczne wskazują, że ujemna regulacja ekspresji genów jest prawdopodobnie przyczyną uwrażliwiania na insulinę obserwowanego u cukrzyków stosujących rozyglitazon. Podawanie pacjentom z cukrzycą typu-2 tego leku obniża takie markery zapalne jak CRP, metaloproteinazę (MMP-9/żelatynazę B) i TNF- α . W makrofagach/ monocytych ligandy PPAR γ hamują upregulację indukowalnej syntazy tlenku azotu (iNOS), INF- α , IL-1 β , IL-12, i MMP-9. Wykazano, że PPAR γ hamuje również ekspresję i aktywność MMP-9 w miocytach gładkich, ale również ekspresję białka-1 chemoatraktanta monocytów (MCP-I), INF- γ , białka 10 kDa (IP-10) indukowanego przez INF i monokiny indukowanej przez INF- γ w komórkach endotelium, indukowaną przez LPS/INF- γ produkcję TNF- α and iNOS w komórkach mikrogleju. Ligandy PPAR γ hamują tworzenie IP-10, Rantes, białka zapalnego makrofagów (MIP)-1 α i IL-12 w komórkach dendrytycznych. Warto też przypomnieć, że nie tylko PPAR γ wpływa na produkcję cytokin również cytokiny regulują ekspresję PPAR γ w makrofagach i innych komórkach odpornościowych. Dla przykładu w makrofagach IL-4 silnie podwyższa, natomiast IFN- γ silnie obniża ekspresję PPAR γ [71].

1.4.3. Znaczenie PPAR γ w immunomodulacji i osteogenezie

PPAR γ reguluje zarówno różnicowanie jak i klasyczną i alternatywną aktywację makrofagów [75]. Kontroluje też metabolizm lipidów w wielu typach komórek odpornościowych oraz spełnia funkcję immunomodulatora. PPAR γ w komórkach odpornościowych, podobnie jak dzieje się to w adipocytach przez bezpośrednie wiązanie do DNA prawdopodobnie aktywuje transkrypcję docelowych genów. Ekspresja PPAR γ jest indukowana podczas różnicowania monocytów do makrofagów, ale również w kilku podtypach komórek dendrytycznych [64]. PPAR γ jest również aktywatorem genów w limfocytach T. Limfocyty T dzielimy na cytotoksyczne, pomocnicze i regulatorowe a pomocnicze możemy dalej podzielić na Th1, Th2 i Th17. Mniej scharakteryzowane są Th9 i Th22. Bez względu na typ limfocyty T aktywacja PPAR γ jest związana z ekspresją genów powiązanych z metabolizmem lipidów (CD36 i FABPs). Na specjalną uwagę zasługują limfocyty Treg rezydujące w trzewnej tkance tłuszczowej (VAT Tregs), w tym przypadku PPAR γ jest zaangażowany w ich rozwój i funkcję. VAT Tregs reprezentują unikalny podtyp komórek w których ekspresja PPAR γ dodatnio koreluje z ekspresją

genów chemokin i ich receptorów (Ccr2, Cxc13, and Cxcr6) odpowiedzialnych za regulację migracji i infiltracji leukocytów, metabolizm lipidów i IL10. Po aktywacji w limfocytach Treg trzewnej tkanki tłuszczowej izoformy PPAR γ 1 i PPAR γ 2 indukują te same geny (głównie powiązane z metabolizmem lipidów), ale obniżają ekspresję różnych genów. PPAR γ osłabiają również migrację komórek dendrytycznych do węzłów chłonnych [44].

Przeprowadzone badania wskazują na udział PPAR γ w procesach osteogenezy. Wykazano jego działanie proosteoklastogenne. Jest ono osiągnięte przez aktywację złożonej sieci transkrypcyjnej c-fos, PGClb i ERRA. Aktywacja przez PPAR γ osteoklastogenezy odbywa się przy udziale koaktywator α -PGClb, natomiast aktywacja adipogenezy i supresja osteoblastogenezy jest częściowo mediowana przez SRC-2. W hemopoetycznych i mezenchymalnych liniach komórkowych w celu regulacji rozwoju osteoklastów i adipocytów PPAR γ wykorzystuje, więc odrębne kofaktory transkrypcyjne [69].

PPAR γ z tkanki tłuszczowej ma ochronne działanie w stosunku do nietłuszczowych tkanek i utrzymuje prawidłową funkcję niektórych narządów (wątroba, mięśnie szkieletowe) [65].

Izoformy PPAR, a w szczególności forma gamma biorą czynny udział w regulacji ciśnienia krwi. Mutacja PPAR γ (V290M and P467L) nie tylko powoduje cukrzycę i oporność na insulinę, ale również ciężkie nadciśnienie. Mutacje spowodowały nie tylko utratę podstawowej aktywności transkrypcyjnej, ale również ze względu na ich dominujący charakter hamowały aktywność typu dzikiego PPAR γ [76].

1.4.4. Rola PPARgamma w procesie nowotworowym

PPAR γ moduluje nie tylko procesy metaboliczne i przeciwzapalne, ale również w wielu typach komórek nowotworowych procesy proliferacji i apoptozy. PPAR γ ulega ekspresji w wielu guzach, w tym płuc, sutka, okrężnicy, prostaty i pęcherza moczowego. Szereg naturalnych i syntetycznych aktywatorów PPAR γ hamuje wzrost komórek nowotworowych zarówno *in vitro* jak i w zwierzęcych modelach, więc PPAR γ może być celem w nowych terapiach antynowotworowych [74] a ich ligandy mogą stać się nowymi modyfikatorami w terapii skierowanej na nowotwór i jego mikrośrodowisko.

PPAR γ wpływają na makrofagi związane z guzem, jego unaczynienie i znacząco ograniczają jego progresję [65]. Rola PPAR γ w procesach nowotworzenia jest plejotropowa [77]. Większość dowodów sugeruje w różnych rakach w tym raku jelita grubego, płuc, trzustki, prostaty i sutka działanie antynowotworowe będące wynikiem aktywacji ścieżki PPAR γ / RXR α . Dochodzi tu do hamowania wzrostu komórek, spadku inwazyjności i redukcji produkcji prozapalnych cytokin. Poza tym stosowanie niektórych ligandów zwiększało wrażliwość na chemioterapię poprzez obniżenie ekspresji genów metalotioneiny i/ lub endotrofiny [64].

Kilka badań wskazuje na pronowotworową rolę PPAR γ , w odniesieniu do takich raków jak rak pęcherza, nerki, hemangioma, lipoma, fibrosarkoma skóry, adenocarcinoma sutka czy guzy wątroby. Wśród różnych mechanizmów aktywowanych przez ligandy PPAR γ należy podkreślić aktywację lub supresję różnych ścieżek i czynników związanych z proliferacją, apoptozą, metastazą i angiogenezą przez regulatory cyklu komórkowego, modulatory układu odpornościowego, czynniki migracji czy metastazy. Komórki macierzyste raka (CSC) są uważane za zasadniczy impuls do inicjacji guza i przerzutów. Komórki te są możliwym celem terapeutycznym szczególnie w traktowaniu antymetastatycznym czy antynowotworowym. Wykazano, że PPAR γ jest zaangażowany w regulację EMT — przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego w CSC. Jednak precyzyjny mechanizm pozostaje jak dotąd nieznany [78].

1.4.5. Polimorfizm PPARgamma

Najbardziej powszechnym genotypem PPAR γ 2 jest Pro12Ala (rs1801282). Dochodzi w nim do zamiany proliny na alaninę. Był to pierwszy poznany w 1997 polimorfizm PPAR γ w populacji kaukaskiej. W tej populacji wymieniony polimorfizm występuje w około 25% [79]. Allel Ala12 ma mniejszą aktywność transkrypcyjną w porównaniu z formą dziką. Klinicznie wiąże się go z ze zwiększoną wrażliwością na insulinę, a tym samym zmniejszonym ryzykiem cukrzycy typu 2. Wykazano związek polimorfizmu rs1801282 z niższym BMI. Występowanie Pro12Ala powiązane jest także z podatnością na niektóre nowotwory np. raka jelita grubego, sutka czy też z zespołem policystycznych jajników, chorobą Alzheimera, chorobami serca [80].

I.5. Stomatologia w osteoporozie

Osteoporoza dotykająca struktur twarzoczaszki oraz jamy ustnej odgrywa dużą rolę w utracie struktur zarówno przyzębia jak i zębów. Mechanizm ten nie został jednak do końca wyjaśniony. Istnieją badania wskazujące, że postępujący proces dotyczący zaniku wyrostka zębodołowego może stanowić manifestacją osteoporozy. Stwierdzono zależność pomiędzy liczbą zębów a stopniem zaawansowania procesu chorobowego, który jest mierzony dzięki badaniom densytometrycznym. Dlatego też podczas utrzymania optymalnego zdrowia pacjentów bardzo ważny jest wzrost znaczenia wzajemnej współpracy pomiędzy lekarzem prowadzącym oraz lekarzem dentystą. Opracowana metodyka badawcza umożliwia ocenę procesu chorobowego manifestującego się obrębie twarzoczaszki. W metodyce tej zostały uwzględnione następujące badania:

- badania densytometryczne żuchwy,
- pomiary na zdjęciach pantomograficznych.

Połączenie obydwu umożliwia ocenę zmian miejscowych w korelacji do wyników badań stosowanych rutynowo. Istnieją doniesienia literaturowe wykazujące związek pomiędzy pomiarem żuchwy z BMD kręgosłupa oraz szyjki kości udowej i przedramienia. Może to wskazywać, że badanie żuchwy odzwierciedla proces ogólnoustrojowego zaniku tkanki kostnej. Niestety wykonywanie densytometrycznych badań żuchwy jest możliwe tylko w przypadku całkowitego braku uzębienia, a czas badania jest długi. Dodatkowym czynnikiem ograniczającym możliwość wykonywania tych badań jest ich mała dostępność oraz wysoki koszt aparatury. Druga metoda diagnostyczna jest powszechnie wykorzystywana w praktyce stomatologicznej. Głównie w żuchwie pacjentów bezzębnych, zanim zostanie podjęta decyzja dotycząca wykonania protez całkowitych. Pomiary na zdjęciach pantomograficznych żuchwy mogą stanowić przydatne narzędzie do oceny zagrożenia osteoporozą. Jednakże dane literaturowe na ten temat są sprzeczne [81].

Istnieją doniesienia literaturowe sugerujące związek pomiędzy terapią lekami z grupy bisfosfonianów a powstającymi zmianami w obrębie kości szczęki. Pacjenci stosujący długoterminową terapię doustną bisfosfonianami, a także stosujący leki dożylnie znajdują się w grupie ryzyka opóźnionego gojenia ran po ekstrakcji, a uszkodzenie tkanek miękkich może prowadzić do wewnątrzustnych obnażeń kości. Ich

objawami są szczelinowatość oraz trudno gojące rany. Jedną z komplikacji, rzadką, ale bardzo poważną, która jest związana z przyjmowaniem bisfosfonianów, jest osteonekroza (proces powodujący zniszczenie kości szczęk.

Osteonekroza jest diagnozowana u pacjentów, którzy przyjmowali bisfosfoniany, nie poddawali się radioterapii w obrębie głowy i szyi i jednocześnie u których w badaniu klinicznym stwierdzono obecność obnażenia kości, które trwało dłużej niż 8 tygodni. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi od 2003 roku wzrasta liczba przypadków pacjentów z bolesnym obnażeniem kości szczęki, którzy przyjmowali dożylnie zolendronian i pamidronian. Doustna terapia bisfosfonianami związana jest mniejszym ryzykiem wystąpienia martwicy [82].

II. CELE PRACY

1. Analiza częstości występowania polimorfizmów rs213045 (-338G>T) i rs213046 (-839A>C) genu ECE1 oraz polimorfizmu rs1801282 (Pro12Ala, C>G) genu PPARG u kobiet w wieku pomenopauzalnym z osteoporozą i osteopenią oraz z prawidłową wartością T-score.
2. Ocena zależności pomiędzy występowaniem polimorfizmów rs213045 (-338G>T) i rs213046 (-839A>C) genu ECE1 oraz polimorfizmu rs1801282 (Pro12Ala, C>G) genu PPARG a gęstością mineralną kości (BMD).
3. Określenie zależności badanych polimorfizmów rs213045 (-338G>T) i rs213046 (-839A>C) genu ECE1 oraz polimorfizmu rs1801282 (Pro12Ala, C>G) genu PPARG z ryzykiem wystąpienia osteoporozy.

III. MATERIAŁ I METODY

III.1. Grupa badana

Niespokrewnione kobiety rasy kaukaskiej (n=606), które zgłosiły się do Szpitala Klinicznego nr 1 przy Pomorskim Uniwersytecie Medycznym w Szczecinie zostały włączone do badania w oparciu o zgodę Komisji Bioetycznej PUM nr KB-0012/100/15. Wszystkie pacjentki poinformowano o celu i zakresie przeprowadzonego badania.

Zakwalifikowane kobiety poddano analizie densytometrycznej w Laboratorium Densytometrii w Szpitalu Klinicznym nr 1 przy PUM w Szczecinie. Dla badania wykonano oznaczenie gęstości mineralnej kości (BMD) oraz parametrów T-score i Z-score. Oznaczono również wskaźniki średniej gęstości mineralnej kości badanych w odniesieniu do średniej dla młodych dorosłych (YA — ang. *young adults*) i średniej gęstości mineralnej kości w odniesieniu do średniej dla danego wieku (AM — ang. *age matched*). Pomiar masy ciała i wzrost wykorzystano do obliczenia wskaźnika masy ciała (BMI — ang. *body mass index*). Wywiad z każdą pacjentką pozwolił na uzyskanie dodatkowych informacji dotyczących m.in. liczby ciąż, masy urodzeniowej, stosowanych leków, wieku wystąpienia pierwszej i ostatniej miesiączki.

Badaniem objęto kobiety z menopauzą, które nie przyjmowały leków wpływających na masę kostną i nie stosowały hormonalnej terapii zastępczej. Pacjentki po zabiegu owariektomii obustronnej oraz z zaburzeniami endokrynologicznymi i metabolicznymi, chorobami tkanki łącznej zostały wykluczone z badania z powodu możliwości wpływu wymienionych chorób na obniżenie masy kostnej.

Podczas analizowanych polimorfizmów genu *ECE1* i *PPARG* przeanalizowano dane pochodzące od 606 kobiet w wieku pomenopauzalnym, które zaklasyfikowano do trzech grup w zależności od współczynnika T-score:

- 109 kobiet z osteopenią ($-2,5 < \text{T-score} < -1$)
- 328 kobiety chore na osteoporozę ($\text{T-score} < -2,5$)
- 169 kobiet z prawidłowym T-score ($\text{T-score} > -1$).

Pomiar gęstości mineralnej kości (BMD) wykonano w odcinku lędźwiowym kręgosłupa od kręgu L1 do L4, z wykorzystaniem podwójnej absorpcjometrii rentgenowskiej (DXA — ang. *dual energy X-ray absorptiometry*). Wyniki pomiarów

gęstości mineralnej kości zostały przedstawione w g/cm^2 i wyrażone za pomocą wskaźników T-score i Z-score, które pozwoliły na zróżnicowanie badanych kobiet na poszczególne grupy.

III.1.1. Izolacja DNA

Badania genetyczne związane z oznaczaniem badanych polimorfizmów genów ECE1 i PPARG zostały przeprowadzone w Zakładzie Komórek Macierzystych i Medycyny Regeneracyjnej w Instytucie Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu.

Materiałem biologicznym, z którego wyizolowano DNA była krew obwodowa pobrana w ilości 6 ml z okolicy zgięcia łokciowego pacjentek i umieszczona w probówkach zawierających etylenodwuaminoczeroctan (EDTA). Przed etapem izolacji DNA materiał przechowywano w temperaturze -20°C .

Celem izolacji było uzyskanie wysokocząsteczkowego DNA o jak najwyższej jakości, oczyszczonego z białek i inhibitorów enzymów. Do izolacji DNA wykorzystano komercyjnie dostępny zestaw „QIAamp DNA Blood Mini Kit” (Qiagen). Do próbki zawierającej 20 μl proteinazy K dodano 200 μl krwi obwodowej, po czym do próby dodano 200 μl buforu do lizy (bufor AL). Zawartość próbki worteksowano a następnie inkubowano w temperaturze 56°C przez okres 20 minut. W kolejnym etapie wykonano krótkie wirowanie a następnie do próbki dodano 200 μl etanolu o stężeniu 96% i worteksowano przez około 15 sekund. Następnie zawartość próbki przeniesiono na kolumnkę (QIAamp Mini spin kolumn) umieszczoną w próbówce o pojemności 2 ml i wirowano z prędkością 8 000 rpm przez okres 1 minuty, po czym usunięto supernatant. Na kolumnkę dodano 500 μl buforu przemywającego AW1 i wirowano przez 1 minutę, przy 8 000 rpm, po czym ponownie usunięto supernatant. Procedurę tę powtórzono przy użyciu buforu przemywającego AW2, przy czym czas wirowania wynosił 3 min., a prędkość 12 000 rpm. W końcowym etapie izolacji kolumnkę umieszczono w próbówce typu eppendorf i na złoże podano 200 μl buforu do elucji (bufor AE), po czym próbę inkubowano w temperaturze pokojowej w czasie 5 minut. Następnie próbkę zwirowano w warunkach 8 000 rpm w czasie 1 minuty w celu uwolnienia DNA ze złoża.

Analizę ilościową i jakościową izolatów DNA przeprowadzono poprzez pomiar absorbancji na spektrofotometrze (DeNovix). Wyznaczone wartości stężeń DNA mieściły się w granicach 30–120 ng/μl, przy wartościach współczynnika A_{260}/A_{280} równych 1,7–2,0.

III.1.2. Oznaczanie polimorfizmów genu ECE1 i PPARG

W przeprowadzonych badaniach do amplifikacji wybranych fragmentów DNA, charakterystycznych dla miejsca występowania polimorfizmów rs213045 (–338G>T) i rs213046 (–839 A>C) genu *ECE1* oraz rs1801282 (Pro12Ala, C>G) genu *PPARG*, wykorzystano technikę real-time PCR. Metoda ta polega na wykorzystaniu znakowanych barwnikami fluorescencyjnymi sond hybrydacyjnych, które łączą się z DNA. Dzięki temu na podstawie odczytów w kolejnych cyklach można oznaczyć ilość produktu w fazie jego wykładniczego wzrostu, oraz śledzić proces amplifikacji DNA w czasie rzeczywistym. Do badań molekularnych wykorzystano aparat LightCycler®96 oraz oprogramowanie LightCycler®96 Basic Software w celu analizy otrzymanych wyników. Zastosowano sondy hybrydacyjne typu SimpleProbe znakowane barwnikami fluorescencyjnymi. Do genotypowania wykorzystano pomiary fluorescencji przeprowadzane w trakcie analizy krzywych topnienia. Dla polimorfizmów genów *ECE1* i *PPARG* wykorzystano zestawy LightSNiP *ECE1* rs213045, LightSNiP *ECE1* rs213046 i LightSNiP *PPARG* rs1801282 zawierające odpowiednie stężenia starterów oraz sond specyficznych dla amplifikowanego fragmentu. Reakcja real-time PCR została przeprowadzona w 45 cyklach dla każdego badanego polimorfizmu (tabela 1.).

Tabela 1. Warunki termiczne reakcji real-time PCR dla badanych polimorfizmów genów *ECE1* i *PPARG*

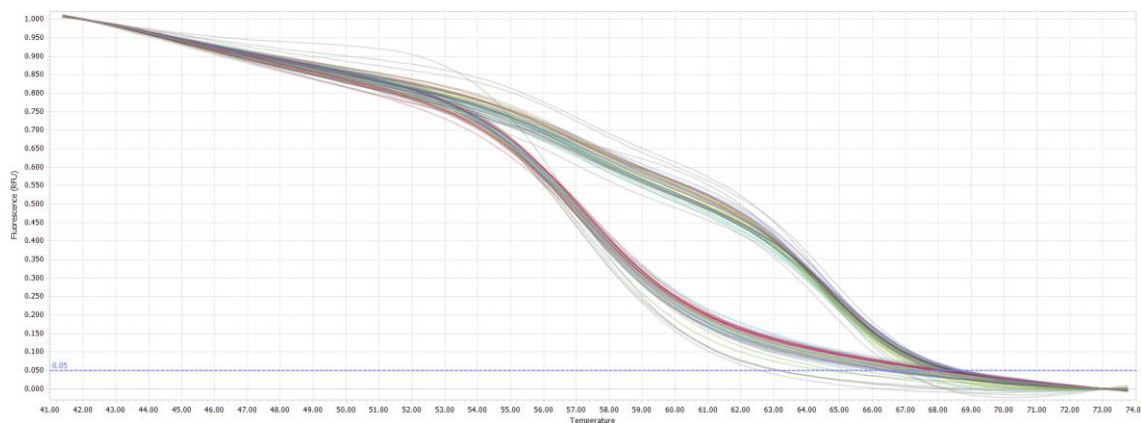
Reakcja	Temperatura	Czas	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	95°C	10 min.	1
Denaturacja	95°C	10 sek.	45
Przyłączanie starterów	60°C	10 sek.	
Elongacja	72°C	15 sek.	

Na koniec każdej reakcji amplifikacji następowało topnienie produktów z powodu wzrostu temperatury do wartości 95°C. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawia tabela 2.

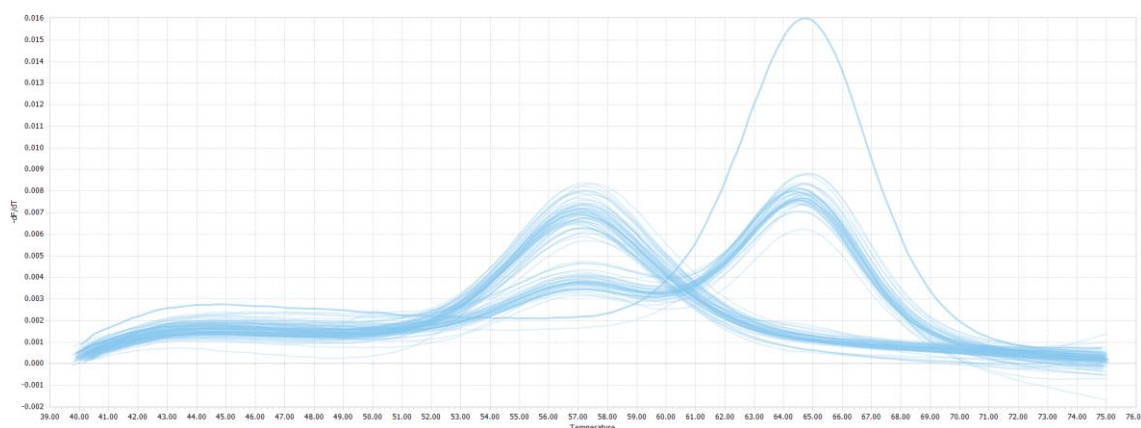
Tabela 2. Składniki reakcji dla przeprowadzenia real-time PCR dla badanych polimorfizmów genów *ECE1* i *PPARG*

Składniki reakcji	Ilość na próbkę (μl)
H ₂ O	6,7
Mieszanina reakcyjna (LightSNiP)	0,5
LightCycler 480 Genotyping Master	1,0
MgCl ₂ (25 mM)	0,8
DNA (50 ng)	1,0
Objętość końcowa	10,0

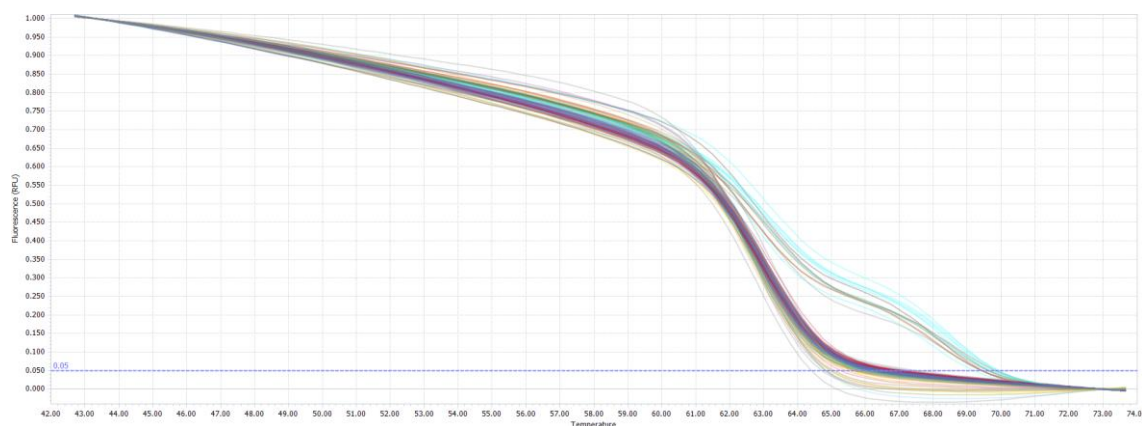
Poszczególne genotypy dla *ECE1* i *PPARG* zostały przeanalizowane w oparciu o piki krzywych topnienia oraz krzywe topnienia, które świadczą o specyficzności reakcji dla poszczególnych badanych polimorfizmów.



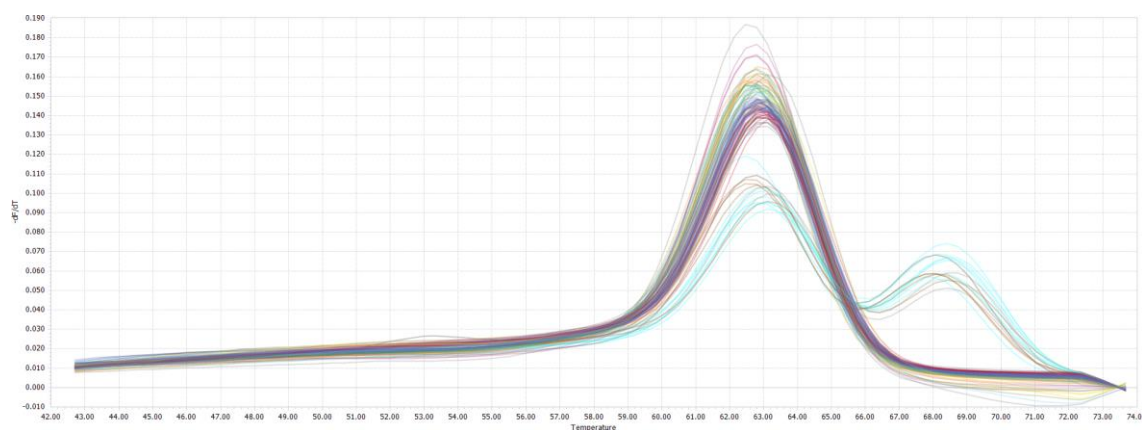
Rycina 4. Profil temperaturowy topnienia produktu dla poszczególnych genotypów polimorfizmu rs213045 genu *ECE1* w reakcji real-time PCR. Krzywe topnienia produktu dla allelu T $T_{m1}=57,45$; allelu G $T_{m2}=65,05$.



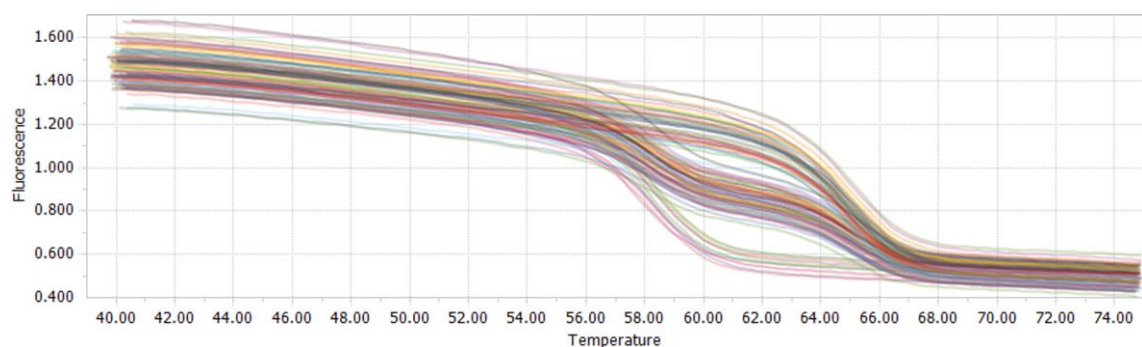
Rycina 5. Piki krzywych topnień dla poszczególnych genotypów polimorfizmu rs213045 genu *ECE1*. Temperatura topnienia dla allelu T $T_{m1}=57,45$; allelu G $T_{m2}=65,05$.



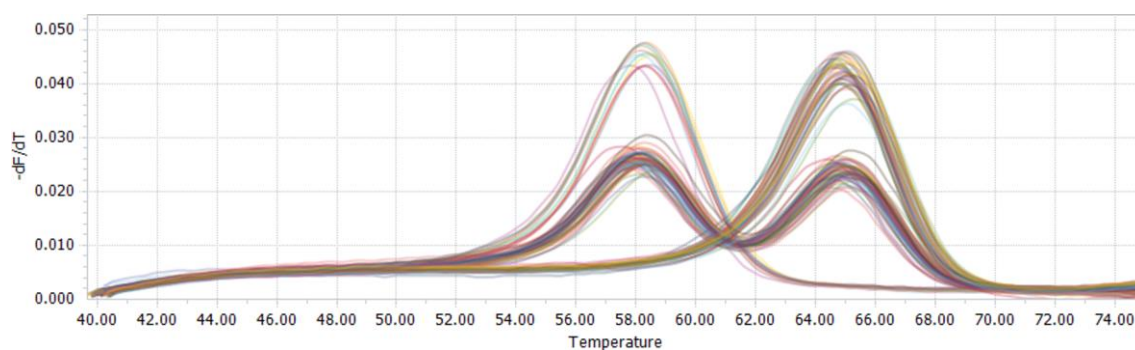
Rycina 6. Profil temperaturowy topnienia produktu dla poszczególnych genotypów polimorfizmu rs213046 genu ECE1 w reakcji real-time PCR. Krzywe topnienia produktu dla allelu A $T_{m1}=63,05$; allelu C $T_{m2}=68,45$.



Rycina 7. Piki krzywych topnień dla poszczególnych genotypów polimorfizmu rs213046 genu ECE1. Temperatura topnienia dla allelu A $T_{m1}=63,05$; allelu C $T_{m2}=68,45$.



Rycina 8. Profil temperaturowy topnienia produktu dla poszczególnych genotypów polimorfizmu rs1801282 genu PPARG w reakcji real-time PCR. Krzywe topnienia produktu dla allelu C $T_{m1}=58,25$; allelu G $T_{m2}=64,85$.



Rycina 9. Piki krzywych topień dla poszczególnych genotypów polimorfizmu rs1801282 genu PPARG. Temperatura topnienia dla allelu C $T_{m1}=58,25$; allelu G $T_{m2}=64,85$.

III.1.3. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono przy wykorzystaniu programu SPSS Statistics 17.0 dla systemu Windows. Zaobserwowane częstości porównano z częstościami oczekiwanymi i przetestowano według prawa Hardy'ego-Weinberga. Oczekiwane wyniki zostały przedstawione z 95% przedziałami ufności (CI). Obliczono iloraz szans (OR) dla genotypów oraz alleli. Następnie oceniono wpływ polimorfizmów genów ECE1 oraz PPARG na L2L4AM, L2L4YA, L2L4BMD, T-score, Z-score, BMI i inne parametry kliniczne. Analizę korelacji między genotypami i parametrami klinicznymi przeprowadzono wykorzystując jednoczynnikową analizę ANOVA. Za statystycznie istotną uznano wartość $p < 0,05$.

IV. WYNIKI

IV.1. Analiza parametrów klinicznych

W tabeli 3. przedstawione zostały parametry kliniczne kobiet zaklasyfikowanych do grupy kontrolnej oraz grup z osteoporozą i osteopenią. Różnice w wartościach T-score i Z-score pomiędzy grupami były następujące: grupa kontrolna: T-score: $0,08 \pm 0,11$, Z-score: $0,64 \pm 0,20$; osteoporoza T-score: $-3,16 \pm 0,06$, Z-Score: $-3,57 \pm 1,95$; osteopenia: T-score: $1,83 \pm 0,04$, Z-score: $0,84 \pm 0,08$. Analiza badań wykazała korelację pomiędzy BMI pacjentów a badanymi grupami: osteoporoza: $23,79 \pm 0,32$, osteopenia: $24,65 \pm 0,36$ vs grupa kontrolna: $25,88 \pm 0,56$ ($p < 0,05$). Podobna korelacja została zaobserwowana dla masy urodzeniowej: osteoporoza: $3141,25 \pm 134,08$ g, osteopenia: $3226,79 \pm 77,69$ g vs grupa kontrolna: $3628,95 \pm 110,29$ g ($p < 0,05$). Pozostałe parametry kliniczne nie wykazały istotnych różnic między grupami.

Tabela 3. Charakterystyka kobiet z osteopenią, osteoporozą i prawidłowym T-score

		$\bar{x} \pm \text{SEM}$	95% CI	
			Min	Max
T-score*	Osteopenia	-1,83 ± 0,04	-2,49	-1,05
	Osteoporoza	-3,16 ± 0,06	-4,73	-2,50
	Kontrola	0,08 ± 0,11	-0,97	3,13
Z-score*	Osteopenia	-0,85 ± 0,08	-2,36	0,77
	Osteoporoza	-3,57 ± 1,95	-4,25	0,98
	Kontrola	0,64 ± 0,20	-1,85	2,65
Masa ciała* [kg]	Osteopenia	65,17 ± 0,10	41,00	114,00
	Osteoporoza	61,21 ± 0,94	43,00	85,00
	Kontrola	68,73 ± 1,50	50,00	100,00
Wysokość [cm]	Osteopenia	162,63 ± 0,45	150,00	175,00
	Osteoporoza	160,25 ± 0,53	155,00	172,00
	Kontrola	163,08 ± 0,74	152,00	180,00
BMI* [kg/m ²]	Osteopenia	24,65 ± 0,36	17,30	43,43
	Osteoporoza	23,79 ± 0,32	17,10	31,63
	Kontrola	25,88 ± 0,56	18,33	37,18
Wiek [lata]	Osteopenia	53,24 ± 0,74	30,00	77,00
	Osteoporoza	56,06 ± 0,75	21,00	78,00
	Kontrola	53,38 ± 1,01	28,00	71,00

		$\bar{x} \pm \text{SEM}$	95% CI	
			Min	Max
Masa urodzeniowa [g]	Osteopenia*	3226,79 ± 77,69	2500,00	4500,00
	Osteoporoza	3141,25 ± 134,08	2470,00	4500,00
	Kontrola	3628,95 ± 110,29	2460,00	5100,00
Lata reprodukcji	Osteopenia	36,20 ± 0,64	23,00	49,00
	Osteoporoza	35,62 ± 0,62	24,00	48,00
	Kontrola	36,38 ± 0,62	27,00	48,00
Wiek wystąpienia pierwszej miesiączki	Osteopenia	13,12 ± 0,31	9,00	18,00
	Osteoporoza	12,94 ± 0,27	9,00	18,00
	Kontrola	13,38 ± 0,33	9,00	16,00
Wiek wystąpienia ostatniej miesiączki	Osteopenia	49,21 ± 0,50	38,00	60,00
	Osteoporoza	48,16 ± 0,55	34,00	60,00
	Kontrola	50,17 ± 0,69	41,00	58,00
Ilość ciąży	Osteopenia	1,89 ± 0,10	0,00	6,00
	Osteoporoza	1,96 ± 0,14	0,00	7,00
	Kontrola	1,94 ± 0,15	0,00	6,00
Lata po menopauzie	Osteopenia*	7,18 ± 0,78	0,00	25,00
	Osteoporoza	10,63 ± 0,71	1,00	22,00
	Kontrola	7,03 ± 0,99	1,00	23,00
BMD L2–L4 [g/cm ²]	Osteopenia	0,97 ± 0,02	0,00	1,47
	Osteoporoza	0,98 ± 0,20	0,66	1,38
	Kontrola	0,97 ± 0,02	0,67	1,30
BMD L2–L4 YA [%]	Osteopenia	80,90 ± 1,72	0,00	123,00
	Osteoporoza	81,28 ± 1,24	55,00	115,00
	Kontrola	81,02 ± 1,77	58,00	108,00
BMD L2-L4 AM [%]	Osteopenia	89,13 ± 1,83	0,00	133,00
	Osteoporoza	89,50 ± 1,23	60,00	131,00
	Kontrola	89,78 ± 1,94	64,00	125,00

*p<0,05 — porównanie grup z osteopenią/osteoporozą i prawidłowym T-score (jednokierunkowa ANOVA),

BMI — wskaźnik masy ciała,

BMD — gęstość mineralna kości,

SEM — standardowy błąd pomiaru,

\bar{x} — wartość średnia.

IV.2. Analiza polimorfizmu Pro12Ala (C>G) genu PPARG

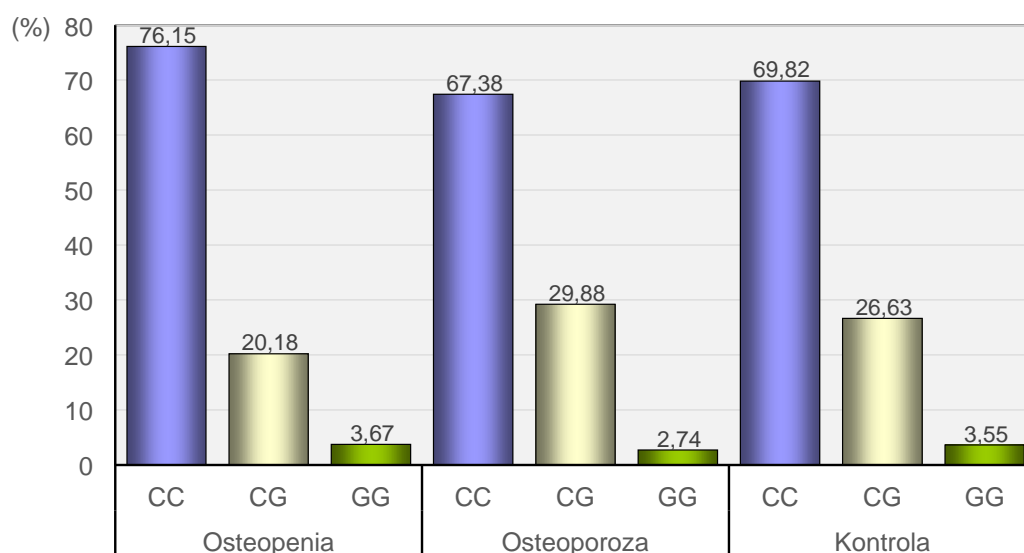
Analiza polimorfizmu rs1801282 (Pro12Ala, C>G) genu PPARG została oparta o krzywe topnienia produktów PCR. Rozkład genotypu polimorfizmu PPARG (rs1801282) między grupami został przedstawiony w tabeli 4. oraz na rycinie 7. Homozygoty CC (polimorfizm rs1801282) występowały częściej u kobiet z osteopenią niż w grupie kontrolnej (76,1% vs 69,8%, p>0,05). Natomiast heterozygoty CG w grupie z osteoporozą pojawiały się częściej w porównaniu do grupy kontrolnej (29,9% vs 26,6%,

$p > 0,05$). Analizując genotypy polimorfizmu genu PPARG, zarówno w grupie kontrolnej jak i badanej, nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy w otrzymanych wynikach. Nie odnotowano korelacji pomiędzy rozwojem osteoporozy a danym genotypem. Wartości oczekiwane oraz obserwowane zostały przedstawione na rycinie 7.

Tabela 4. Analiza polimorfizmu rs1801282 genu PPARG w grupie kobiet z osteopenią, osteoporozą oraz w grupie kontrolnej.

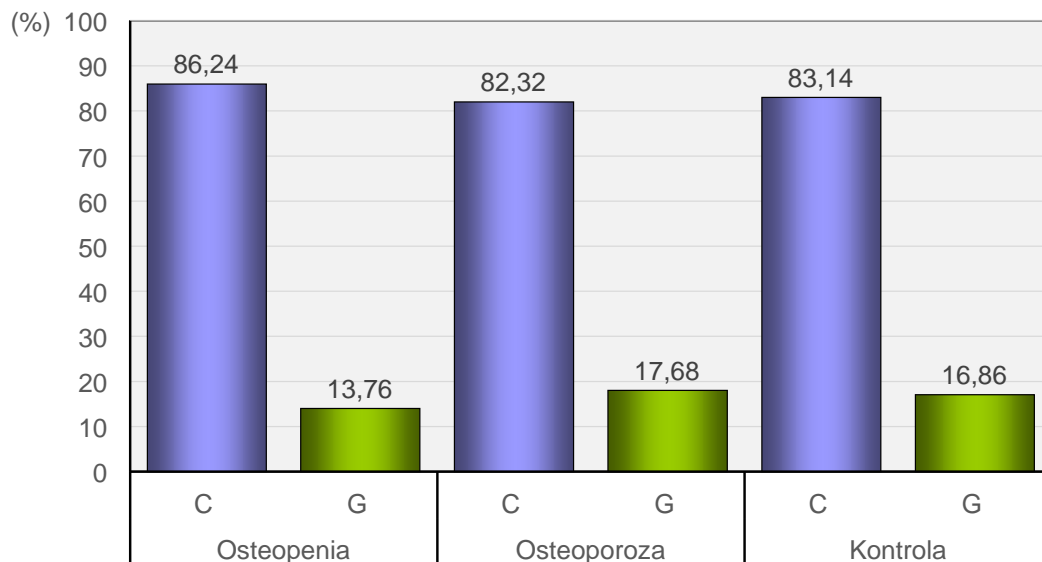
	Osteopenia		Osteoporoza		Kontrola	
	Wartość obserwowana n (%)	Wartość oczekiwana (%)	Wartość obserwowana n (%)	Wartość oczekiwana (%)	Wartość obserwowana n (%)	Wartość oczekiwana (%)
Genotyp						
CC	83 (76,15)	74	221 (67,38)	87	118 (69,82)	85
CG	22 (20,18)	24	98 (29,88)	13	45 (26,63)	15
GG	4 (3,67)	2	9 (2,74)	0	6 (3,55)	0
Razem	109 (100,00)	100	328 (100,00)	100	169 (100,00)	100
Allele						
C	188 (86,24)	—	540 (82,32)	—	281 (83,14)	—
G	30 (13,76)	—	116 (17,68)	—	57 (16,86)	—
Razem	218 (100,00)	—	656 (100,00)	—	338 (100,00)	—

Porównanie częstości genotypów pomiędzy grupą kobiet z osteopenią a grupą kontrolną — test chi-kwadrat $p = 0,042$. Porównanie częstości genotypów pomiędzy grupą kobiet z osteoporozą a grupą kontrolną — test chi-kwadrat $p = 0,085$.



Rycina 10. Rozkład procentowy częstości występowania genotypów polimorfizmu rs1801282 PPARG w badanych grupach.

Na rycinie 8. przedstawiono rozkład częstości alleli polimorfizmu rs1801282 genu PPARG. Najczęściej występującym allelem w każdej grupie był prawidłowy allel C (tabela 4., rycina 8.).



Rycina 11. Rozkład procentowy częstości występowania alleli polimorfizmu rs1801282 PPARG w badanych grupach.

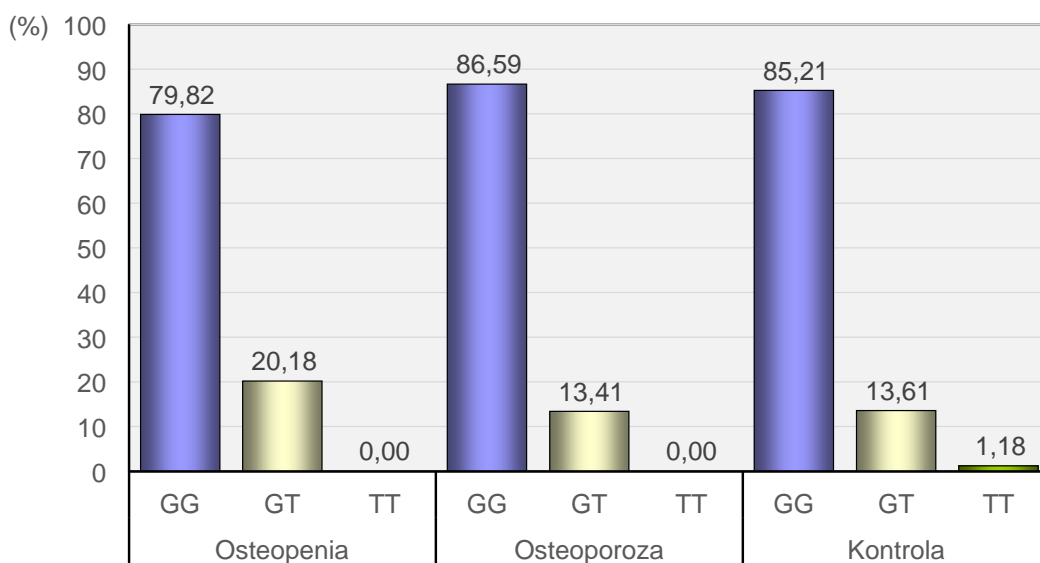
IV.3. Analiza polimorfizmu rs213045 (-338G>T) genu ECE1

Wyniki otrzymanych genotypów dla polimorfizmu rs213045 (-338G>T) genu ECE1 w grupie kontrolnej i badanej zostały zamieszczone w Tabeli 5 oraz Rycinie 9. U kobiet z osteopenią (polimorfizm rs213045) częściej występował genotyp GT niż w grupie kontrolnej (20,2% vs 13,6%, $p>0,05$). Natomiast w grupie z osteoporozą homozygota GG występowała częściej niż miało to miejsce w grupie kontrolnej (86,6% vs 85,2%, $p>0,05$). Genotyp TT nie wystąpił w badanych grupach, a w grupie kontrolnej osiągnął wartość 2%. W każdej z grup nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy rozkładu badanych genotypów. Nie wykazano również związku pomiędzy rozwojem osteoporozą a danym genotypem. Odnotowano jedynie, że prawidłowy allel G wystąpił najczęściej w badanym polimorfizmie (tabela 5., rycina 10.).

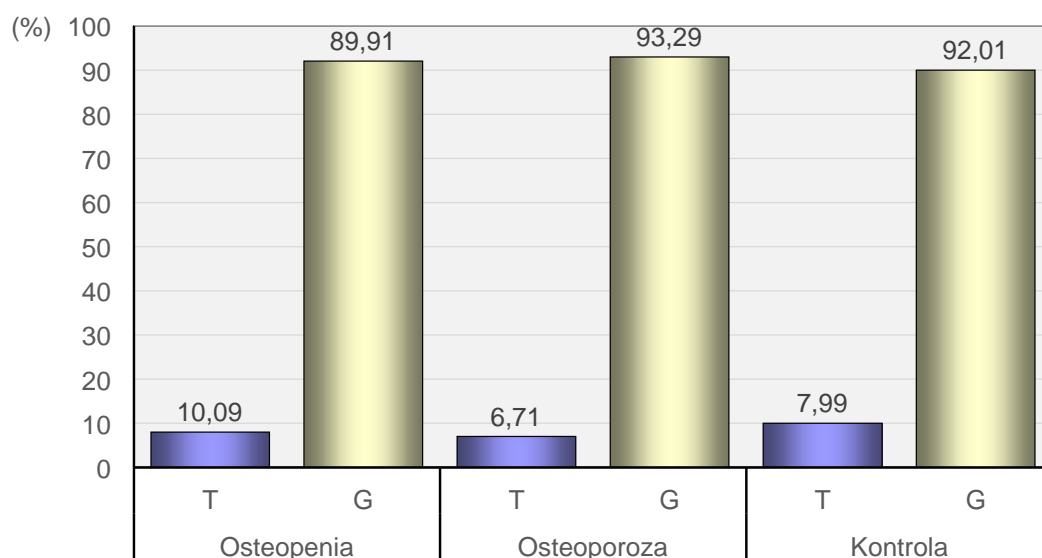
Tabela 5. Analiza polimorfizmu rs213045 genu ECE1 w grupie kobiet z osteopenią, osteoporozą oraz w grupie kontrolnej

	Osteopenia		Osteoporoza		Kontrola	
	Wartość obserwowana n (%)	Wartość oczekiwana (%)	Wartość obserwowana n (%)	Wartość oczekiwana (%)	Wartość obserwowana n (%)	Wartość oczekiwana (%)
Genotyp						
GG	87 (79,82)	81	284 (86,59)	87	144 (85,21)	85
GT	22 (20,18)	18	44 (13,41)	13	23 (13,61)	15
TT	0 (0,00)	1	0 (0,00)	0	2 (1,18)	0
Razem	109 (100,00)	100	328 (100,00)	100	169 (100,00)	100
Allele						
G	196 (89,91)	—	612 (93,29)	—	311 (92,01)	—
T	22 (10,09)	—	44 (6,71)	—	27 (7,99)	—
Razem	218 (100,00)	—	656 (100,00)	—	338 (100,00)	—

Porównanie częstości genotypów pomiędzy grupą kobiet z osteopenią a grupą kontrolną — test chi-kwadrat $p=0,052$. Porównanie częstości genotypów pomiędzy grupą kobiet z osteoporozą a grupą kontrolną — test chi-kwadrat $p=0,083$.



Rycina 12. Rozkład procentowy częstości występowania genotypów polimorfizmu rs213045 ECE1 w badanych grupach.



Rycina 13. Rozkład procentowy częstości występowania alleli polimorfizmu rs213045 ECE1 w badanych grupach.

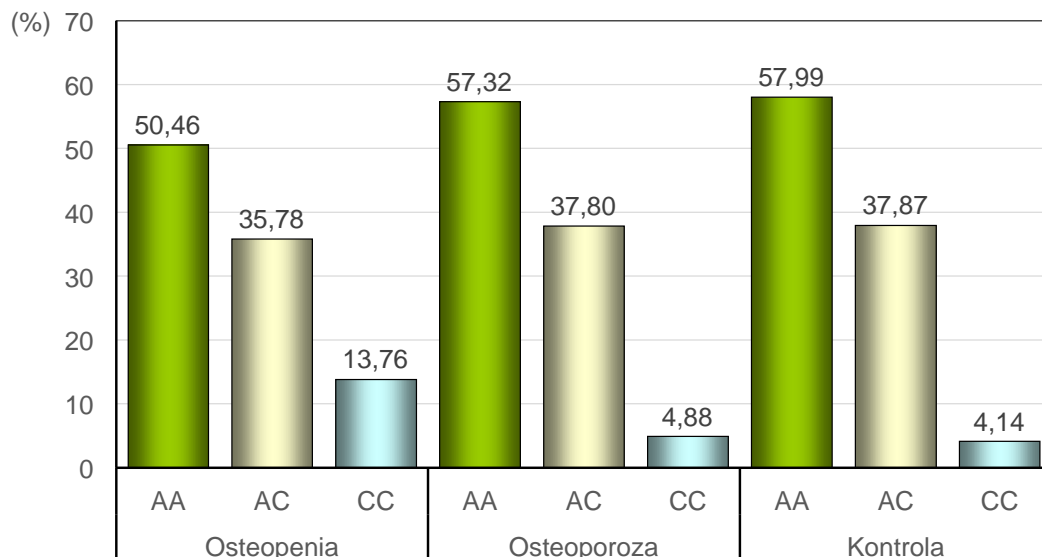
IV.4. Analiza polimorfizmu rs213046 (-839A>C) genu ECE1

Wyniki dla polimorfizmu rs213046 (-839 A>C) genu ECE1 zostały przedstawione w Tabeli 6 oraz na Rycinie 11. W grupie kobiet z osteopenią najczęściej występowała homozygota CC (13,8% — grupa z osteopenią vs 4,1 % — grupa kontrolna, $p > 0,05$). Nie zaobserwowano istotnie statystycznie różnicy w uzyskanych wynikach, a także nie wykazano korelacji pomiędzy rozwojem osteoporozy a danym genotypem. Najczęściej występującym allelem był prawidłowy allel A (tabela 6., rycina 12.).

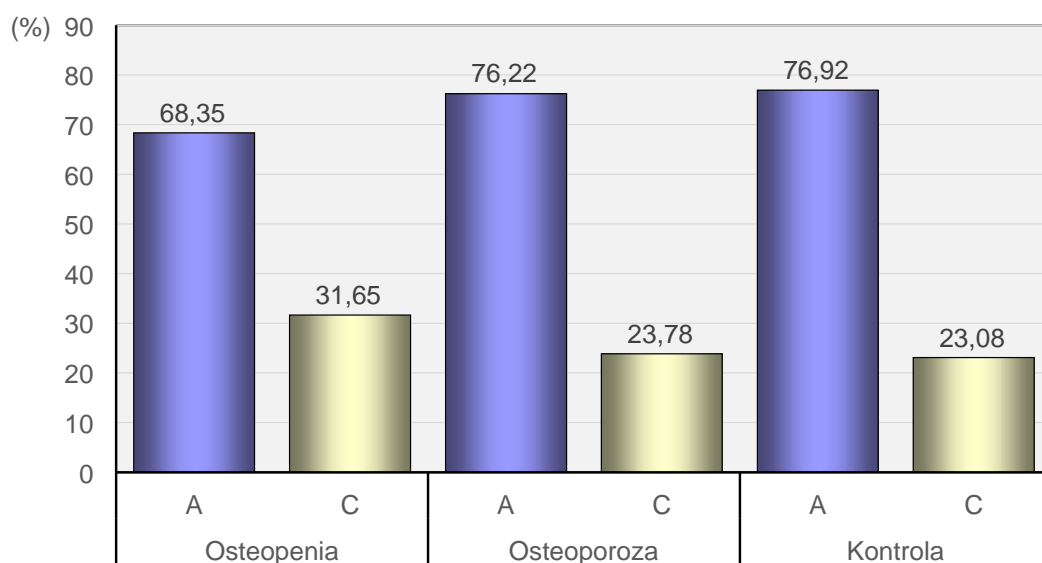
Tabela 6. Analiza polimorfizmu rs213046 genu ECE1 w grupie kobiet z osteopenią, osteoporozą oraz w grupie kontrolnej

	Osteopenia		Osteoporoz		Kontrola	
	Wartość obserwowana n (%)	Wartość oczekiwana (%)	Wartość obserwowana n (%)	Wartość oczekiwana (%)	Wartość obserwowana n (%)	Wartość oczekiwana (%)
Genotyp						
AA	55 (50,46)	46	188 (57,32)	87	98 (57,99)	85
AC	39 (35,78)	43	124 (37,80)	13	64 (37,87)	15
CC	15 (13,76)	11	16 (4,88)	0	7 (4,14)	0
Razem	109 (100,00)	100	328 (100,00)	100	169 (100,00)	100
Allele						
A	149 (68,35)	—	500 (76,22)	—	260 (76,92)	—
C	69 (31,65)	—	156 (23,78)	—	78 (23,08)	—
Razem	218 (100,00)	—	656 (100,00)	—	338 (100,00)	—

Porównanie częstości genotypów pomiędzy grupą kobiet z osteopenią a grupą kontrolną — test chi-kwadrat $p=0,012$. Porównanie częstości genotypów pomiędzy grupą kobiet z osteoporozą a grupą kontrolną — test chi-kwadrat $p=0,094$.



Rycina 14. Rozkład procentowy częstości występowania genotypów polimorfizmu rs213046 ECE1 w badanych grupach.



Rycina 15. Rozkład procentowy częstości występowania alleli polimorfizmu rs213046 ECE1 w badanych grupach.

IV.5. Analiza korelacji genotypów polimorfizmu genu PPARG z parametrami klinicznymi pacjentek

Rozkład genotypów polimorfizmu rs1801282 genu PPARG został przedstawiony w tabeli 7. Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy badanym genotypem a wartościami T-score, Z-score, masie i wzroście pacjentek, współczynnika BMI, wieku, masy urodzeniowej, lat reprodukcji, wieku pierwszej oraz ostatniej miesiączki, liczbie ciąż, lat, które minęły od pojawienia się menopauzy, współczynników BMD, BMDYA i BMDAM w grupie pacjentek z osteopenią, osteoporozą oraz grupie kontrolnej.

Tabela 7. Analiza parametrów klinicznych i polimorfizmu rs1801282 genu PPARG u kobiet po menopauzie z prawidłowym T-score, osteopenią i osteoporozą

Analizowane zmienne	Polimorfizm PPARG								
	Osteopenia			Osteoporoza			Kontrola		
Genotyp	CC	CG	GG	CC	CG	GG	CC	CG	GG
T-score									
\bar{x}	-1,8	-1,88	-1,56	-3,17	-3,17	-3,49	0,08	0,07	0,21
Dolna granica	-1,89	-2,06	-2,45	-3,31	-3,39	-6,17	-0,19	-0,49	-1,21
Górna granica	-1,70	-1,70	-0,67	-3,03	-2,94	-0,82	0,35	0,63	10,63
Z-score									
\bar{x}	-0,81	-0,88	-1,18	-1,4	-1,48	-3,13	0,73	0,25	2,62
Dolna granica	-1,00	-1,33	-3,74	-3,93	-1,99	-1,89	0,27	-0,56	-0,45
Górna granica	-0,63	-0,42	1,38	1,14	-0,98	-0,95	1,20	1,06	1,02
Masa									
\bar{x}	65,91	62,59	70,75	60,32	63,22	63,33	68,39	68,84	77,00
Dolna granica	63,49	57,44	55,25	57,92	59,68	25,71	64,39	63,27	51,59
Górna granica	68,34	67,74	86,25	62,72	66,76	100,95	72,39	74,42	102,41
Wzrost									
\bar{x}	163,09	161,73	164,00	160,15	160,00	163,00	162,39	163,42	161,00
Dolna granica	162,00	159,27	156,65	158,78	157,88	147,49	160,40	161,29	122,88
Górna granica	164,17	164,19	171,35	161,52	162,12	178,51	164,38	165,55	199,12
BMI									
\bar{x}	24,80	23,92	26,20	23,43	24,78	23,61	25,95	25,85	29,71
Dolna granica	23,93	22,04	22,67	22,64	23,44	13,46	24,50	23,60	25,45
Górna granica	25,67	25,79	29,73	24,21	26,13	33,76	27,40	28,11	33,96
Wiek									
\bar{x}	53,07	53,09	59,75	56,77	56,42	54,00	54,02	52,53	57,00
Dolna granica	51,31	49,5	41,40	54,99	53,06	41,07	51,63	48,19	-82,77
Górna granica	54,83	56,68	78,10	58,54	59,78	66,93	56,42	56,86	196,77

Analizowane zmienne	Polimorfizm PPARG								
	Osteopenia			Osteoporoza			Kontrola		
Genotyp	CC	CG	GG	CC	CG	GG	CC	CG	GG
Masa urodzeniowa									
\bar{x}	3256,67	3064,29	3426,67	3153,33	3250,00	3320,00	3663,33	3570,00	3440,00
Dolna granica	3075,37	2883,22	1101,46	2774,03	2604,6	2740	3288,97	3362,24	3200,00
Górna granica	3437,96	3245,35	5751,87	3532,64	3895,4	3626	4037,7	3777,76	3800,00
Lata reprodukcji									
\bar{x}	35,69	38,42	35	35,22	36,41	39	37,62	32,6	48
Dolna granica	34,20	35,46	24,17	33,66	34,02	38	35,69	29,09	48
Górna granica	37,18	41,38	45,83	36,77	38,8	40	39,55	36,11	48
Wiek pierwszej miesiączki									
\bar{x}	13,07	13	14,33	13,2	12,24	11	13,24	13,8	12
Dolna granica	12,37	11,22	9,16	12,54	11,25	10	12,3	12,74	10
Górna granica	13,77	14,78	19,5	13,85	13,22	12	14,18	14,86	14
Wiek ostatniej miesiączki									
\bar{x}	48,81	51,13	50,75	47,84	48,15	50,5	51,63	47,58	50
Dolna granica	47,49	49,55	44,74	46,44	45,91	44,15	50,22	44,65	48
Górna granica	50,14	52,71	56,76	49,23	50,39	56,85	53,04	50,52	52,00
Liczba ciąż									
\bar{x}	1,85	1,95	1,50	1,81	2,30	2,33	1,95	1,95	2,50
Dolna granica	1,59	1,61	-0,55	1,54	1,55	-1,46	1,53	1,48	-3,85
Górna granica	2,11	2,3	3,55	2,09	3,06	6,13	2,37	2,42	8,85
Lata po menopauzie									
\bar{x}	7,58	6,33	4,67	10,54	11,18	12,00	6,00	8,10	18,00
Dolna granica	5,72	2,54	-5,37	8,85	8,02	10,00	3,86	3,51	18,00
Górna granica	9,43	10,13	14,71	12,24	14,33	14,00	8,14	12,69	18,00
BMD									
\bar{x}	0,95	1,01	0,94	1,00	0,95	0,99	0,95	1,06	0,77
Dolna granica	0,9	0,91	0,65	0,96	0,89	0,84	0,9	0,96	0,70
Górna granica	1,00	1,10	1,22	1,04	1,00	1,14	1,00	1,16	0,85
BMD YA									
\bar{x}	79,61	83,8	78,00	83,05	78,95	82,33	79,39	87,92	65,00
Dolna granica	74,9	76,11	54,8	79,64	74,47	68,65	75,24	79,66	64,00
Górna granica	84,31	91,49	101,21	86,46	83,42	96,01	83,55	96,17	66,00
BMD AM									
\bar{x}	88,09	91,05	83,75	91,09	87,89	91,67	87,97	97,83	80,00
Dolna granica	83,16	82,9	64,2	87,65	83,64	62,87	83,7	87,47	78,00
Górna granica	93,01	99,2	103,3	94,54	92,14	120,46	92,24	108,2	82,00

ns — nie wykazano istotności statystycznej dla badanych parametrów w odniesieniu do genotypów,

\bar{x} — wartość średnia.

IV.6. Analiza korelacji genotypów polimorfizmu rs213045 genu ECE1 z parametrami klinicznymi pacjentek

Rozkład genotypów polimorfizmu rs213045 genu ECE1 został przedstawiony w tabeli 8. Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy badanym genotypem a parametrami takimi jak: T-score, Z-score, masie i wzroście pacjentek, współczynnika BMI, wieku, masy urodzeniowej, lat reprodukcji, wieku pierwszej oraz ostatniej miesiączki, liczbie ciąży, lat, które minęły od pojawienia się menopauzy, współczynników BMD, BMDYA i BMDAM w każdej zbadanych grup.

Tabela 8. Analiza parametrów klinicznych i polimorfizmu rs213045 genu ECE1 u kobiet po menopauzie z prawidłowym T-score, osteopenią i osteoporozą

Analizowane zmienne	Polimorfizm ECE1 RS213045						
	Osteopenia		Osteoporoza		Kontrola		
GENOTYP	GG	GT	GG	GT	GG	GT	TT
T-score							
\bar{x}	-1,79	-1,87	-3,19	-3,08	0,04	0,29	0,45
Dolna granica	-1,88	-2,05	-3,32	-3,45	-0,23	-0,49	-0,34
Górna granica	-1,69	-1,69	-3,07	-2,72	0,30	1,07	0,98
Z-score							
\bar{x}	-0,83	-0,89	-3,85	-1,88	0,58	1,58	1,22
Dolna granica	-1,03	-1,26	-8,38	-2,34	0,17	-1,63	0,23
Górna granica	-0,63	-0,52	0,68	-1,42	0,99	2,79	1,65
Masa							
\bar{x}	64,84	67,68	61,15	61,70	69,94	63,44	58,00
Dolna granica	62,48	62,49	58,97	56,86	66,61	53,8	56,00
Górna granica	67,19	72,88	63,32	66,54	73,27	73,09	62,00
Wzrost							
\bar{x}	162,64	163,64	160,24	160,00	162,90	160,78	167,00
Dolna granica	161,59	161,15	159,01	157,57	161,40	155,13	165,00
Górna granica	163,69	166,12	161,47	162,43	164,41	166,42	169,00
BMI							
\bar{x}	24,53	25,24	23,79	23,84	26,43	24,40	20,79
Dolna granica	23,68	23,45	23,07	21,96	25,13	21,76	19,34
Górna granica	25,37	27,04	24,52	25,73	27,73	27,04	21,64
Wiek							
\bar{x}	52,99	54,64	56,76	55,44	54,42	50,67	41,00
Dolna granica	51,15	51,77	55,04	51,91	52,44	41,22	40,00
Górna granica	54,83	57,5	58,48	58,98	56,40	60,11	43,00

Analizowane zmienne	Polimorfizm ECE1 RS213045						
	Osteopenia		Osteoporoza		Kontrola		
GENOTYP	GG	GT	GG	GT	GG	GT	TT
Masa urodzeniowa							
\bar{x}	3252,86	3148,57	3195,71	2850,00	3630,56	3600,00	3400,00
Dolna granica	3049,98	2873,11	2876,80	2780,00	3384,58	3400,00	3200,00
Górna granica	3455,74	3424,04	3514,63	2990,00	3876,53	3800,00	3600,00
Lata reprodukcji							
\bar{x}	36,32	35,77	35,84	33,88	35,87	44,00	36,00
Dolna granica	34,95	32,16	34,55	28,39	33,99	32,82	32,00
Górna granica	37,69	39,38	37,13	39,36	37,74	43,82	38,00
Wiek pierwszej miesiączki							
\bar{x}	13,17	12,92	12,70	14,38	13,47	12,00	11,00
Dolna granica	12,46	11,50	12,12	12,97	12,75	10,00	10,00
Górna granica	13,88	14,35	13,27	15,78	14,18	14,00	12,00
Wiek ostatniej miesiączki							
\bar{x}	49,40	49,38	48,18	46,70	50,06	53,25	52,00
Dolna granica	48,21	46,78	47,01	42,05	48,61	48,5	48,00
Górna granica	50,59	51,97	49,34	51,35	51,50	58,00	54,00
Liczba ciąż							
\bar{x}	1,87	1,82	1,97	1,90	2,04	1,56	2,00
Dolna granica	1,62	1,44	1,67	0,98	1,69	0,78	1,00
Górna granica	2,12	2,20	2,27	2,82	2,39	2,33	3,00
Lata po menopauzie							
\bar{x}	7,26	6,92	10,57	11,88	6,73	11,50	8,00
Dolna granica	5,5	3,01	9,05	6,54	4,72	11,09	6,00
Górna granica	9,01	10,84	12,09	17,21	8,75	12,09	10,00
BMD							
\bar{x}	0,95	1,01	0,98	0,97	0,96	1,03	1,23
Dolna granica	0,90	0,90	0,94	0,91	0,91	0,88	0,82
Górna granica	1,00	1,11	1,02	1,03	1,01	1,18	1,44
BMD YA							
\bar{x}	79,73	83,71	81,7	80,81	80,03	86,00	103,00
Dolna granica	75,46	74,66	78,71	75,94	76,03	73,41	92,00
Górna granica	84,00	92,75	84,7	85,68	84,02	98,59	108,00
BMD AM							
\bar{x}	87,44	92,94	90,39	87,69	89,21	93,00	120,00
Dolna granica	83,01	83,50	87,44	82,45	85,07	75,69	94,00
Górna granica	91,88	102,38	93,33	92,92	93,35	110,31	128,00

ns — nie wykazano istotności statystycznej dla badanych parametrów w odniesieniu do genotypów.

\bar{x} — wartość średnia.

IV.7. Analiza korelacji genotypów polimorfizmu rs213046 genu ECE1 z parametrami klinicznymi pacjentek

Podobnie jak w poprzednich badanych polimorfizmach, korelacja pomiędzy genotypami badanego polimorfizmu rs213046 genu ECE1, a parametrami klinicznymi nie wykazała istotnej statystycznie różnicy (tabela 9.).

Tabela 9. Analiza parametrów klinicznych i polimorfizmu rs213046 genu ECE1 u kobiet po menopauzie z prawidłowym T-score, osteopenią i osteoporozą

Analizowane zmienne	Polimorfizm ECE1 RS213046								
	Osteopenia			Osteoporoza			Kontrola		
Genotyp	AA	AC	CC	AA	AC	CC	AA	AC	CC
T-score									
\bar{x}	-1,81	-1,78	-1,86	-3,27	-3,03	-3,10	0,11	-0,06	0,24
Dolna granica	-1,93	-1,93	-2,07	-3,43	-3,24	-3,60	-0,23	-0,46	-0,56
Górna granica	-1,69	-1,62	-1,65	-3,11	-2,83	-2,60	0,45	0,35	1,05
Z-score									
\bar{x}	-0,69	-0,93	-1,10	-1,61	-1,05	-2,08	0,69	0,54	0,54
Dolna granica	-0,97	-1,20	-1,42	-1,87	-1,86	-2,89	0,18	-0,33	0,48
Górna granica	-0,41	-0,66	-0,77	-1,35	4,35	-1,28	1,20	1,41	0,68
Masa									
\bar{x}	63,8	66,37	68,93	61,1	60,75	64,33	68,87	70,82	63,57
Dolna granica	61,07	62,26	62,94	58,62	56,80	56,78	64,99	64,07	52,71
Górna granica	66,53	70,47	74,93	63,58	64,70	71,89	72,74	77,58	74,43
Wzrost									
\bar{x}	162,60	162,29	165,13	160,90	158,93	160,33	163,24	160,76	164,14
Dolna granica	161,15	160,79	162,50	159,42	156,90	157,88	161,46	157,86	157,57
Górna granica	164,05	163,79	167,76	162,39	160,96	162,79	165,01	163,66	170,71
BMI									
\bar{x}	24,13	25,23	25,23	23,42	24,33	24,60	25,88	27,45	23,47
Dolna granica	23,22	23,65	23,26	22,63	22,93	21,57	24,37	25,02	20,86
Górna granica	25,05	26,81	27,19	24,2	25,72	27,62	27,39	29,88	26,08
Wiek									
\bar{x}	53,02	53,97	52,87	56,96	56,00	56,11	54,37	54,76	47,14
Dolna granica	50,6	51,24	50,41	55,15	52,85	48,51	51,89	50,80	37,33
Górna granica	55,43	56,7	55,32	58,77	59,15	63,72	56,84	58,73	56,95
Masa urodzeniowa									
\bar{x}	3310,00	3202,00	3101,67	3348,33	3100,00	2700,00	3610,00	3702,50	3600,00
Dolna granica	3009,86	2906,05	2810,73	2859,68	2596,12	2600,00	3489,89	1966,66	3500,00
Górna granica	3610,14	3497,95	3392,60	3836,99	3603,88	2800,00	3730,11	5438,34	3700,00
Lata reprodukcji									
\bar{x}	36,82	35,45	36,10	36,03	35,04	35,00	35,91	37,11	40,00
Dolna granica	34,69	33,80	31,94	34,24	33,06	27,5	33,67	32,18	38,00

Analizowane zmienne	Polimorfizm ECE1 RS213046								
	Osteopenia			Osteoporoza			Kontrola		
Genotyp	AA	AC	CC	AA	AC	CC	AA	AC	CC
Górna granica	38,95	37,11	40,26	37,82	37,03	42,5	38,15	42,04	42,00
Wiek pierwszej miesiączki									
\bar{x}	13,07	13,50	12,40	12,75	12,78	14,6	13,23	13,89	12,00
Dolna granica	12,11	12,39	11,04	12,05	11,81	12,03	12,29	12,99	10,00
Górna granica	14,03	14,61	13,76	13,45	13,76	17,17	14,16	14,79	14,00
Wiek ostatniej miesiączki									
\bar{x}	49,21	50,07	48,42	48,31	47,78	46,5	50,07	50,36	54,50
Dolna granica	47,59	48,48	44,95	46,86	45,76	39,61	48,47	47,19	22,73
Górna granica	50,82	51,67	51,88	49,77	49,79	53,39	51,68	53,53	86,27
Liczba ciąż									
\bar{x}	1,80	2,11	1,47	2,06	1,68	2,50	1,92	2,29	1,43
Dolna granica	1,49	1,72	1,00	1,71	1,13	1,40	1,52	1,64	0,53
Górna granica	2,11	2,49	1,93	2,41	2,23	3,6	2,32	2,94	2,33
Lata po menopauzie									
\bar{x}	8,25	6,23	6,30	10,67	11,09	9,6	6,73	8,00	5,00
Dolna granica	5,83	3,67	1,95	8,77	8,55	0,79	4,59	2,13	4,00
Górna granica	10,67	8,78	10,65	12,57	13,63	18,41	8,87	13,87	6,00
BMD									
\bar{x}	0,97	0,96	0,92	0,98	0,97	1,03	0,97	0,93	1,11
Dolna granica	0,92	0,87	0,8	0,93	0,92	0,87	0,91	0,86	0,82
Górna granica	1,03	1,06	1,03	1,02	1,02	1,19	1,03	1,00	1,4
BMD YA									
\bar{x}	81,78	80,38	76,2	81,32	81,00	86,00	81,41	77,54	92,75
Dolna granica	76,83	72,78	66,25	77,79	76,68	72,53	76,54	71,55	68,78
Górna granica	86,74	87,97	86,15	84,85	85,32	99,47	86,29	83,52	116,72
BMD AM									
\bar{x}	89,66	88,45	84,8	89,45	89,5	96,00	89,59	88,46	102,25
Dolna granica	84,73	80,23	74,11	86,10	85,12	81,08	84,43	82,05	67,77
Górna granica	94,59	96,67	95,49	92,80	93,88	110,92	94,74	94,87	136,73

ns — nie wykazano istotności statystycznej dla badanych parametrów w odniesieniu do genotypów.

\bar{x} — wartość średnia.

V. DYSKUSJA

Osteoporoza jest chorobą związaną z niską masą kostną, a także ze zwiększonym ryzykiem złamań. Pomimo trwających wielu badań, nadal niewiele wiadomo na temat wpływu czynników genetycznych na wzrost i tworzenie kości. W celu dokładniejszego poznania mechanizmów molekularnych, nadal poszukuje się polimorficznych wariantów genów mogących wpływać na zwiększone ryzyko wystąpienia osteoporozy [83]. W przeprowadzonych badaniach przeanalizowano wpływ polimorfizmów rs213045 i rs213046 genu ECE1 oraz rs1801282 genu PPARG na wystąpienie osteoporozy. Na podstawie rozkładu częstości występowania poszczególnych genotypów i alleli podjęto pracę w celu określenia genotypu lub allelu mającego wpływ na wystąpienie tej choroby.

Izoformy PPARG podlegają ekspresji w różnych narządach i tkankach, ale szczególnie w tkance tłuszczowej. Badania zarówno *in vivo* jak i *in vitro* wykazały ich udział w regulacji procesów różnicowania adipocytów i promowaniu akumulacji tłuszczów w tkance tłuszczowej [80]. PPARG w makrofagach jest związany z hamowaniem produkcji prozapalnych cytokin i zwiększa wrażliwość na insulinę. W mięśniach szkieletowych negatywnie reguluje podstawowy metabolizm glukozy. W wątrobie jest powiązany z ogólnoustrojową kontrolą metabolizmu glukozy i lipidów. Wpływ PPARG na działanie insuliny wykazuje wiele badań molekularnych nad polimorfizmami występującymi w obrębie genu PPARG, takimi jak: Pro12Ala, Pro115Gln, Cys114Arg, Val290Met, Pro388Leu. Wśród tych polimorfizmów najwyższą częstość występowania ma Pro12Ala. Odkrycie tego wariantu zapoczątkowało prace nad wpływem allelu Ala12 na metabolizm. Pierwsze badania wykazały jego związek ze spadkiem funkcji transaktywacyjnej PPARG i niższą wartością BMI. Dalsze badania, które objęły różne populacje etniczne, zwróciły uwagę na bardziej złożony charakter tego problemu. Związek allelu Ala12 ze zmniejszeniem otyłości potwierdzono w przypadku populacji Afroamerykanów, natomiast u białych Amerykanów obserwowano efekt przeciwny — wzrost BMI [75]. Na podstawie przeprowadzonych metaanaliz przyjmuje się, że w populacji kaukaskiej u osób z genotypem Pro12Ala lub Ala12Ala obserwuje się wzrost BMI.

Analizując polimorfizm rs1801282 genu PPAR γ genotyp CG był częstszy w grupie osteoporozy, a genotyp CC występował częściej w grupie osteopenii w porównaniu z grupą kontrolną. Nie zaobserwowano zależności między genotypem a badanymi parametrami klinicznymi, które wskazywałyby na predyspozycje do zwiększonego ryzyka wystąpienia osteoporozy. PPAR γ występuje głównie w białej tkance tłuszczowej i bierze udział w końcowym różnicowaniu preadipocytu w dojrzały adipocyt [84]. Hipoteza, że PPAR γ może brać udział w metabolizmie kości wynika z faktu, że osteoblasty i adipocyty mają wspólną komórkę prekursorową [84, 85]. Pomimo tego, że dokładny wniosek nie jest nadal poznany istnieje wiele badań nad rolą PPAR γ w różnicowaniu i aktywności osteoblastów. Wyniki uzyskane przez Akune i wsp. podczas badań nad aktywacją PPAR γ w osteoblastogenezie na heterozygotycznych myszach z niedoborem PPAR γ (PPAR γ \pm) wykazują 50% redukcję ekspresji PPAR γ . Niedobór PPAR γ spowodował zwiększenie masy kostnej poprzez stymulację osteoblastogenezy z komórek progenitorowych szpiku kostnego co potwierdza negatywną rolę aktywacji PPAR γ w tworzeniu kości [86]. Aby móc wyciągnąć precyzyjne wnioski wyniki te muszą zostać potwierdzone w dobrze kontrolowanych randomizowanych badaniach na ludziach. Mbalaviele i wsp. wykazali, że aktywacja szlaku PPAR γ przez endogenne ligandy PPAR γ blokuje działanie liganda OPG, a tym samym hamuje tworzenie i aktywność osteoklastów w ludzkich mezenchymalnych komórkach macierzystych poprzez hamowanie aktywowanego przez receptor NF- κ B (RANKL) szlaku NF- κ B [87]. OPG jest krążącym receptorem bez domeny transbłonowej i hamuje różnicowanie osteoklastów, działając jako receptor wabikowy dla RANK, który jest wyrażany na powierzchni prekursora osteoklastów i zakłóca oddziaływanie RANK z RANKL [88, 89, 90]. Biorąc pod uwagę, że szlak NF- κ B jest zaangażowany w mechanizm hamujący cytokiny w różnicowaniu adipocytów poprzez obniżanie ekspresji PPAR γ oraz wspomniany wcześniej mechanizm agonisty PPAR γ hamującego różnicowanie osteoklastów poprzez hamowanie NF- κ B transkrypcji do hamowania sygnalizacji RANKL, możemy założyć, że hamowanie osteoklastogenezy przez OPG może mieć bezpośredni związek z aktywacją PPAR γ [91]. Najczęściej występującym polimorfizmem PPAR γ jest substytucja prolina na alaninę (Pro12Ala) w eksonie B genu PPAR γ 2 (rs1801282). W badaniu przeprowadzonym przez Eun-Jung Rhee i wsp. średni poziom OPG w surowicy był znacząco niższy, a całkowita ALP

w surowicy była istotnie wyższa w grupie z genotypem Pro12Ala w porównaniu z grupą z genotypem Pro12Pro, nawet po uwzględnieniu innych czynników zakłócających, a Pro12Ala był istotnym wyznacznikiem poziomu OPG w surowicy w analizie regresji wielokrotnej. W analizie haplotypów przeprowadzonej w związku z polimorfizmem C161T, osoby z polimorfizmami wykazywały istotnie niższe poziomy OPG w surowicy, co sugeruje negatywny wpływ tych polimorfizmów na poziom OPG w surowicy. Jeśli obniżony poziom OPG w surowicy odzwierciedla jedynie stan osteoklastogenny, to wynik ten wskazuje, że obecność polimorfizmów zmniejszyła osteoklastogenezę, a poziom OPG w surowicy został obniżony, co sugeruje, że polimorfizmy są istotnym efektem resorpcji kości. Jednak ten wniosek nie został potwierdzony korelacją pomiędzy innymi badanymi parametrami klinicznymi [92].

Istnieją dane literaturowe na temat innego badanego wariantu genu PPAR γ w zakresie procesu kościotworzenia. Jest to polimorfizm rs12497191, który jest związany z metabolicznymi predyktorami cukrzycy typu 2 i otyłości u Indian Pima. Analiza funkcjonalna z konstruktem reporterowym lucyferazy wykazała, że allel A w tym genotypie ma zwiększoną aktywność transkrypcyjną w porównaniu z allelem G [93]. Wyniki Dragojevica i wsp. pokazują, że nosiciele allelu G rs12497191 mieli mniejsze ryzyko złamania szyjki kości udowej. Niższa aktywność transkrypcyjna allelu G może prowadzić do niższych poziomów PPAR γ 2, a zatem do niższej adipogenezy, co może zwiększyć osteoblastogenezę. Autorzy sugerują, że polimorfizm promotora PPAR γ może być jednym z markerów genetycznych o wartości predykcyjnej dla nieurazowego ryzyka złamania szyjki kości udowej u osób starszych [94]. Harsløf i wsp. zbadali skutki zmienności genetycznej w genie PPAR γ oraz ich wpływ na złamania kości w badaniu kliniczno-kontrolnym obejmującym pacjentów z osteoporozą i grupę kontrolną. Allel G promotora SNP rs12497191 wiązał się ze zwiększonym ryzykiem złamań kręgow [95], co jest sprzeczne z ustaleniami Dragojevica i współpracowników. Rozbieżności wyników mogą wynikać z różnych miejsc złamań w obu badaniach (złamania kręgow vs. złamania szyjki kości udowej), ponieważ kręgi i szyjka kości udowej mają różny stosunek kości beleczkowej i korowej [94]. Oprócz badania kliniczno-kontrolnego Harsløf i wsp. oceniali również związki SNP genu PPAR γ ze złamaniami w prospektywnym badaniu badającym wpływ terapii hormonalnej, jednak allel G promotora SNP rs12497191 nie był związany z ryzykiem złamań kręgow w tej grupie badawczej, a autorzy przypisali

różnice między grupami interakcji gen-środowisko [95]. Ackert-Bicknell i wsp. wykazali interakcję między kilkoma SNP w genie PPARG a spożyciem tłuszczu w diecie, co może wpływać na BMD i być skorelowane z ryzykiem złamań [96]. Obecność co najmniej jednego haplotypu GCC była również związana ze zmniejszonym ryzykiem nieurazowego złamania szyjki kości udowej z powodu obecności allelu G rs12497191. Pozostałe dwa haplotypy nie były związane z ryzykiem złamania. W badaniu Dragojevica i wsp. żaden z badanych SNP ani ich najczęstszych haplotypów nie był związany z BMD. Inne doniesienia literaturowe wskazują, że allel Ala rs1801282 był związany z wyższym BMD-1 u chińskich kobiet po menopauzie [97], a allel T rs3856806 był wcześniej związany z niższym BMD u japońskich kobiet po menopauzie [98] i przed menopauzą [99]. Różnice między badaniami mogą wynikać z różnych ras uczestników. W badaniu Dragojevica i wsp. allel G rs12497191 SNP i haplotyp GCC były związane z wyższym RANKL w surowicy. Haplotyp GCC był powiązany z wyższym RANKL ze względu na obecność allelu G rs12497191. Przebudowa kości zachodzi na powierzchni kości, a podwyższony RANKL w badaniu Dragojevica i wsp. może pochodzić z kości o większej zawartości beleczkowania a tym samym o wyższym współczynniku przebudowy, takich jak kręgi. Ta niezgodność może również wynikać z faktu, że RANKL ulega ekspresji w wielu różnych komórkach i tkankach i może nie odzwierciedlać tylko procesów zachodzących w kości [94]. Nie zaobserwowano innych związków między markerami biochemicznymi w tym stosunkiem RANKL/OPG, genotypami i haplotypami. Istnieje kilka badań łączących polimorfizmy rs1801282 i/lub rs3856806 genu PPARG z BMD, jednak większość z nich była wykonywana na populacji azjatyckiej i niestety wykazywały sprzeczne wyniki [100–102]. W badaniach na grupie azjatyckich kobiet polimorfizmy rs1801282 i rs3856806 zostały powiązane z poziomami OPG [100, 102].

W przypadku polimorfizmu rs213045 genu ECE1 genotyp GT był częstszy w grupie osteopenii w porównaniu z grupą kontrolną, a genotyp GG był częstszy w grupie osteoporozy. Nie zaobserwowano także wystąpienia genotypu TT w badanych grupach, a w grupie kontrolnej wystąpił w 2%. Dla polimorfizmu ECE1 rs213046 u kobiet z osteopenią obserwowano wyższą częstość występowania homozygot CC w porównaniu z grupą kontrolną. Nie zaobserwowano korelacji między badanymi genotypami a parametrami klinicznymi, które wskazywałyby na predyspozycje do rozwoju

osteoporozy. Około 2/3 szczytowej masy kostnej jest uwarunkowane genetycznie [103]. Endotelina 1 (ET1) jest 21-aminokwasowym, wywodzącym się ze śródbłonna, wydzielanym, wazoaktywnym peptydem powiązany z nadciśnieniem i zdarzeniami niedokrwiennymi [104, 105]. ET1 jest wydzielany jako 39-aminokwasowy nieaktywny prekursor, który musi być aktywowany podczas reakcji proteolitycznej. Enzym konwertujący endotelinę 1 (ECE1) to związana z błoną proteaza zewnątrzkomórkowa, która katalizuje tę reakcję. ET1 promuje sygnalizację Wnt w celu zwiększenia niekontrolowanego wzrostu kości [104]. Hansen i wsp. wykazali, że sygnalizacja ET1 zależna od ECE1 wpływa na fizjologię kości w badaniach *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo*. Dodanie egzogennej ET1 do pożywki hodowlanej unieśmiertelnionych mysich osteoblastów zwiększyło mineralizację i zmniejszyło produkcję sklerostyny poprzez regulację mikroRNA 126-3p [107, 108]. Wykazali też, że genotyp CC genu ECE1 w polimorfizmie rs213046 wiązał się z mniejszą liczbą złamań, podczas gdy genotyp AC był związany z osteoporozą [107–109]. Myszy kongeniczne, posiadające identyczne allele we wszystkich loci z wyjątkiem regionu otaczającego *Ece1*, wykazywały zmienność w wielkości i wytrzymałości kości [110]. Ponadto ablacja receptora endoteliny A w osteoblastach germinalnych zmniejszyła gęstość mineralną kości (BMD) u 12-tygodniowych myszy [111]. Hu i wsp. [112] stwierdzili, że dodanie ET1 do mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących ze szpiku kostnego zwiększyło osteogenezę *in vitro* i *in vivo*. U kobiet po menopauzie Mestek i wsp. [113] stwierdzili odwrotną zależność między BMD kręgosłupa a rozszerzającą naczyń reakcją na blokadę receptora endoteliny A. W badaniach asocjacyjnych całego genomu człowieka (GWAS) dla BMD i złamań, polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP) rs7521902, zlokalizowany blisko ECE1 na chromosomie 1p36.12, był istotnie związany z BMD i złamaniami kręgosłupa lędźwiowego i szyjki kości udowej u kobiet [113]. Te doniesienia literaturowe potwierdzają rolę sygnalizacji ET1 w procesie kościotworzenia. Na podstawie wcześniejszych badań Hansen i wsp. postawili hipotezę, że polimorfizmy promotora izoformy b ECE1 w ECE1 b 2338 (G/T) i ECE1 b 2839 (A/C) mogą wiązać się z BMD i być związane z rozpoznaniem osteoporozy i klinicznymi złamaniami u kobiet po menopauzie. W badaniach przeprowadzonych na myszach Johnson i wsp. wykazali, że zmienność w regionie genomowym zawierającym allel *Ece1* wpływa na wielkość

kości i odpowiada za 40% zmienności biomechaniki kości i BMD w krzyżówce zrekombinowanych szczepów kongenicznych HcB-8 i HcB-23 [107–109].

Podsumowując, na podstawie dostępnych danych literaturowych wyciągnięcie jednoznacznych wniosków jest niemożliwe. Nasze badania nie wykazały związku pomiędzy badanymi genotypami a zwiększonym ryzykiem wystąpienia osteoporozy oraz jej rozwoju. Jednakże wszelkie badania w tej dziedzinie cechują się ogromnym potencjałem, ponieważ zrozumienie mechanizmów mogących mieć wpływ na rozwój osteoporozy może pozwolić w przyszłości na stworzenie skutecznych terapii. Wczesne rozpoznanie choroby, jeszcze przed wystąpieniem objawów, oraz wdrożenie odpowiednich leków dostosowanych do genotypu pacjenta może spowolnić lub zahamować jej dalszy rozwój.

VI. WNIOSKI

1. Nie stwierdzono zależności pomiędzy częstością występowania polimorfizmów rs213045 (-338G>T) i rs213046 (-839A>C) genu ECE1 oraz polimorfizmu rs1801282 (Pro12Ala, C>G) genu PPARG w grupie kobiet w wieku pomenopauzalnym z osteoporozą i osteopenią oraz z prawidłową wartością T-score.
2. Analiza zależności pomiędzy występowaniem badanych polimorfizmów genu ECE1 i PPARG a gęstością mineralną kości (BMD) nie wykazała istotnych statystycznie różnic w badanych grupach.

VII. STRESZCZENIE

Wzrostowi średniej długości życia towarzyszy wzrost liczby chorych na choroby przewlekłe, np. nadciśnienie czy choroby degeneracyjne. Jedną z takich chorób jest osteoporoza. Dotyczy ona głównie kobiet i jest główną chorobą tkanki łącznej. Choroba ta stanowi globalny problem zdrowia publicznego. Liczne badania mają na celu określenie wczesnych markerów wystąpienia tej choroby i stworzenie leków pozwalających zahamować, spowolnić jej postęp. Rozwój tej choroby związany jest z czynnikami genetycznymi, hormonalnymi (estrogeny, kalcytonina, czynniki wzrostu) i środowiskowymi. W wielu badaniach podkreślono, że czynniki genetyczne mogą odgrywać ważną rolę w regulację gęstości mineralnej kości (BMD). Celem badania była analiza wpływu polimorfizmów rs213045 (338C>T) i rs213046 (839A>C) genu ECE1 oraz polimorfizmu rs1801282 (G>C) genu PPARG na BMD i ryzyko występowania osteoporozy u kobiet w wieku postmenopauzalnym. Analiza wariantów genetycznych badanych polimorfizmów ECE1 i PPARG została przeprowadzona stosując technikę real-time PCR.

Przeprowadzone badania nie wykazały związku pomiędzy badanymi polimorfizmami rs213045 i rs213046 genu ECE1 oraz rs1801282 genu PPARG a zwiększonym ryzykiem wystąpienia osteoporozy oraz jej rozwoju. Jednakże wszelkie badania w tej dziedzinie cechują się ogromnym potencjałem, ponieważ zrozumienie mechanizmów mogących mieć wpływ na rozwój osteoporozy może pozwolić w przyszłości na stworzenie skutecznych terapii. Wczesne rozpoznanie choroby, jeszcze przed wystąpieniem objawów, oraz wdrożenie odpowiednich leków dostosowanych do genotypu pacjenta może spowolnić lub zahamować jej dalszy rozwój.

VIII. SUMMARY

The increase in life expectancy is accompanied by an increase in the number of patients suffering from chronic diseases, such as hypertension or degenerative diseases. One of these diseases is osteoporosis. It mainly affects women and is the main disease of connective tissue. This disease is a global public health problem. Numerous studies are aimed at determining the early markers of this disease and at creating drugs that will help to inhibit and slow down its progress. The development of osteoporosis is associated with genetic, hormonal and environmental factors. Many studies have emphasized that genetic factors may play an important role in the regulation of bone mineral density (BMD). The aim of the study was to analyze the influence of rs213045 (338C>T) and rs213046 (839A>C) polymorphisms in the ECE1 gene and the rs1801282 polymorphism (G>C) of the PPARG gene on BMD and the risk of osteoporosis in postmenopausal women. The analysis of genetic variants of the studied ECE1 and PPARG polymorphisms was performed using the real-time PCR technique.

The conducted studies did not show any relationship between the rs213045 and rs213046 polymorphisms of the ECE1 gene and rs1801282 of the PPARG gene and an increased risk of osteoporosis and its development. However, any research in this field has great potential, as understanding the mechanisms that may influence the development of osteoporosis may allow for the development of effective therapies in the future. Early diagnosis of the disease, even before the onset of symptoms, and the implementation of appropriate drugs adapted to the patient's genotype may slow down or inhibit its further development.

IX. Piśmiennictwo

1. Nordin Ch. Nutrition and osteoporosis. *Br. Menopause Soc. J.* 2000; 6(2): 48–53.
2. Aspray TJ, Hill TR. Osteoporosis and the Ageing Skeleton. *Subcell Biochem.* 2019; 91: 453–476.
3. Khani Jeihooni A, Hidarnia A, Kaveh MH, Hajizadeh E. The effect of a prevention program based on health belief model on osteoporosis. *J Res Health Sci.* 2015; 15(1): 47–53.
4. O’Flaherty E. Normal aging bone loss, with consideration of bone loss in osteoporosis. *Toxicol. Sci.* 2000; 55: 171–188.
5. Peruzzi B, Teti A. The Physiology and Pathophysiology of the Osteoclast. *Clinic Rev Bone Miner Metab.* 2012; 10:71–97.
6. Riggs BL. Endocrine causes of age-related bone loss and osteoporosis. *Novartis Found Symp.* 2002; 242: 247–259.
7. Heaney RP, Abrams S, Dawson-Hughes B, Looker A, Marcus R, Matkovic V, et al. Peak bone mass. *Osteoporos Int.* 2000; 11: 985–1009.
8. Robbins JA, Schott AM, Garnero P, Delmas PD, Hans D, Meunier PJ. Risk factors for hip fracture in women with high BMD: EPIDOS study. *Osteoporos Int.* 2005; 16: 149–154.
9. Dufresne TE, Chmielewski PA, Manhart MD, Johnson TD, Borah B. Risedronate preserves bone architecture in early postmenopausal women in 1 year as measured by three-dimensional microcomputed tomography. *Calcif Tissue Int* 2003; 73: 423–432.
10. Lips P. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev.* 2001; 22: 477–501.
11. Marshall D, Johnell O, Wedel H. Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. *BMJ.* 1996; 312: 1254–1259.
12. Muller R. Long-term prediction of three - dimensional bone architecture in simulations of pre-, peri- and post-menopausal microstructural bone remodeling. *Osteoporos Int.* 2005; 16 (Suppl 2): 25–35.
13. Torpy JM, Cassio L, Glass R. Osteopenia and Preventing Fractures. *JAMA.* 2006; 296(21): 2644.
14. Katz S. Prevention, Detection, and Treatment of Osteopenia and Osteoporosis. *Gastroenterol Hepatol (N Y).* 2013; 9(3): 176–178.
15. Kanis JA. Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. *Lancet.* 2002; 359: 1929–1936.

16. Straub RH, Cutolo M, Zietz B, Scholmerich J. The process of aging changes the interplay of the immune, endocrine and nervous systems. *Mech Ageing Dev.* 2001; 122: 591–611.
17. Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest.* 2005; 115: 3318–3325.
18. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev.* 2002; 23: 279–302.
19. Tilg H, Moschen AR, Kaser A, Pines A, Dotan I. Gut, inflammation and osteoporosis: basic and clinical concepts. *Gut.* 2008; 57: 684–694.
20. Ni W, Jiang Y. Evaluation on the cost-effective threshold of osteoporosis treatment on elderly women in China using discrete event simulation model. *Osteoporos Int.* 2017; 28(2): 529–538.
21. Lips P, van Schoor NM. The effect of vitamin D on bone and osteoporosis. *Best Practice Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011; 25: 585–591.
22. Lukes A. Evolving issues in the clinical and managed care settings on the management of menopause following the women's health initiative. *Manag Care Pharm.* 2008; 14 (Suppl 3): 7–13.
23. Friedlander AH. The physiology, medical management and oral implications of menopause. 2002; 133(1): 73–81.
24. Arden NK, Spector TD. Genetic influences on muscle strength, lean body mass, and bone mineral density: a twin study. *J Bone Miner Res.* 1997; 12: 2076–2081.
25. Black DM, Thompson DE, Bauer DC, et al. Fracture Risk Reduction with Alendronate in Women with Osteoporosis.: The Fracture Intervention Trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000; 85(11): 18–24.
26. Tucker KL. Osteoporosis prevention and nutrition. *Curr Osteoporos Rep.* 2009; 7(4): 111–117.
27. Cooper C. Epidemiology and public health impact of osteoporosis. *Baillière's Clin. Rheumatol.* 1993; 7: 459–477.
28. Cauley JA. Public health impact of osteoporosis. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2013; 68(10): 1243–1251.
29. Pawłowski W, Goniewicz K, Goniewicz M, Lasota D. Public health impact of osteoporosis in older age. *J. Pre. Clin. Clin. Res.* 2018; 12(3): 106–109.
30. Eddy DM, Johnston CC, Cummings S.R, et al.: Osteoporosis: Review of the evidence for prevention, diagnosis, and treatment and cost-effectiveness analysis. 1998; 8: 1–82.
31. Reid IR, Horne A,M, Mihov B, et al.: Fracture Prevention with Zoledronate in Older Women with Osteopenia. *N Engl J Med.* 2018; 379(25): 2407–2416.

32. Rabiega D, Woźniak J, Olejniczak T, Opala T. Osteoporoza — epidemiologia, patogeneza, diagnostyka i leczenie. *Przew Lek.* 2000; 9: 39–46.
33. Stetkiewicz T, Połać I, Jędrzejczyk S, Stachowiak G, Surkont G, Pertyński T. Osteoporoza - diagnostyka i terapia. *Przegl. Menopauz.* 2004; 2: 73–81.
34. Stewart TL, Ralston SH. Role of genetic factors in the pathogenesis of osteoporosis. *J. Endocrinol.* 2000; 166: 235–245.
35. Tang P, Xiong Q, Ge W, Zhang L. The role of microRNAs in osteoclasts and osteoporosis. *RNA Biol.* 2014; 11(11): 1355–1363.
36. Watts NB. Postmenopausal osteoporosis. *Obstet Gynecol Surv.* 1999; 54(8): 532–538.
37. Black DM, Rosen CJ. Clinical Practice. Postmenopausal Osteoporosis. *N Engl J Med.* 2016; 74(3): 254–262.
38. Matkovic V. Calcium metabolism and calcium requirements during skeletal modelling and consolidation of bone mass. *The Am. J. Clin. Nutrit.* 1991; 54(I): 245S–260S.
39. Abrams SA. Calcium turnover and nutrition through the life cycle. *Proc. Nutrit. Soc.* 2001; 60(2): 283–289.
40. Skowrońska-Jóźwiak E, Jaworski M, Grzywa A, Lorenc R, Lewiński R. Influence of calcium intake on bone mineral density and incidence of fractures in treatment-naive women from Lodz urban area — a part of EPOLOS study. *Ann Agric Environ Med.* 2014; 21(1): 201–204.
41. Parfitt AM. The bone remodeling compartment: a circulatory function for bone lining cells. *J Bone Miner Res.* 2001; 16: 1583–1585.
42. Häkkinen LM, Vuolteenaho OJ, Leppäluoto JP, Laatikainen TJ. Endothelin in maternal and umbilical cord blood in spontaneous labor and at elective cesarean delivery. *Obstet Gynecol.* 1992; 80: 72–75.
43. Kim YJ, Park HS, Lee HY, Ha EH, Suh SH, Oh SK, Yoo HS. Reduced L-arginine level and decreased placental eNOS activity in preeclampsia. *Placenta.* 2006; 27: 438–444.
44. Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, et al. Endothelil nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension.* 1998; 32: 3–8.
45. Escudero C, Puebla C, Westermeier F, Sobrevia L. Potential cell signaling mechanisms involved in differential placental angiogenesis in mild and severe preeclampsia. *Curr Vasc Pharmacol.* 2009; 7: 475–485.
46. Ihara M, Noguchi K, Saeki T, et al. Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ETA receptor. *Life Sci.* 1992; 50: 247–255.

47. Shoji M, Tsutaya S, Saito R, Takamatu H, Yasujima M. Positive association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism with hypertension in northern, Japan Life Sci. 2000; 66: 2557–2562.
48. Lüscher TF, Yang Z, Tschudi M, et al. Interaction between endothelin-1 and endothelin-derived relaxing factor in human arteries and veins. *Circ. Res.* 1990; 60: 1088–1094.
49. Schiff E, Ben-Baruch G, Peleg E, Rosenthal T, Alcalay M, Devir M, Mashlach S. Immunoreactive circulating endothelin-1 in normal and hypertensive pregnancies. *Am J. Obstet Gynecol.* 1992; 166: 624–628.
50. Irzmański R, Serwa-Stępień E, Barylski M, Banach M, Kowalski J, Pawlicki L. Zaburzenia równowagi śródbłonkowej w nadciśnieniu tętniczym. Rola peptydów natriuretycznych i endoteliny. *Kardiol Pol.* 2005, 63: 457–461.
51. Julio C Tapia, Ignacio Niechi. Endothelin-converting enzyme-1 in cancer aggressiveness *Cancer Letters* 2019; 452, 152–157.
52. Houde M, Desbiens L, D'Orléans-Juste P. Endothelin-1: Biosynthesis, Signaling and Vasoreactivity, *Advances in Pharmacology*, 201; 77, 143–175.
53. Kuruppu S, Smith AI. Endothelin Converting Enzyme-1 phosphorylation and trafficking, *FEBS Letters* 2012; 586, 2212–2217.
54. Mazzocchi G, Correr M, Bianco G, et al. Age-related changes of neuro-endocrine-immune interactions in healthy humans. *J Biol Regul Homeost Agents.* 1997; 11(4): 143–147.
55. Kanis JA, Johnell O, Black DM, Downs RW, Sarkar S, Fuerst T, Seckman RJ, Pavo I. Effect of raloxifene on the risk of new vertebral fracture in postmenopausal women with osteopenia or osteoporosis: a reanalysis of the multiple outcomes of raloxifene evaluation trial. *Bone.* 2003; 33: 293–300.
56. Kanis JA, Burlet N, Cooper C, Delmas PD, Reginster JY, Borgstrom F, Rizzoli R. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO).* *Osteoporos Int.* 2008; 19: 399–428.
57. Woodis CB. Hormone therapy for the management of menopausal symptoms: pharmacotherapy update. *J Pharm Pract.* 2010; 23(6): 540–547.
58. Rachner TD, et al. Osteoporosis: now and the future. *Lancet.* 2011; 377(9773): 1276–1287.
59. Xu XH, Dong SS, Guo Y, et al. Molecular genetic studies of gene identification for osteoporosis: the 2009 update. *Endocr Rev.* 2010; 31(4): 447–505.
60. Seymour K. *Prevention, Detection, and Treatment of Osteopenia and Osteoporosis.* *Gastroenterol Hepatol (NY).* 2013; 9(3): 176–178.

61. Otani S, Usuki S, Saitoh T. Comparison of endothelin-1 concentrations in normal and complicated pregnancies. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1991, 17, 308–312.
62. Pupek-Musialik D. Wpływ terapii ACE-inhibitorem na stężenie endoteliny i wybrane parametry metaboliczne u młodych osób z nadciśnieniem tętniczym. *Pol. Merk. Lek.*, 2006, 122, 174–176.
63. Khimji AK, Rockey DC. Endothelin--biology and disease. *Cell Signal.* 2010, 22, 1615–1625.
64. Hernandez-Quiles M, Broekema MF, Kalkhoven E. PPARgamma in Metabolism, Immunity, and Cancer: Unified and Diverse Mechanisms of Action. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021; 12: 624112.
65. Grygiel-Górniak B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications –a review. *Nutrition Journal.* 2014; 13:1–10.
66. Wu L, Guo C, Wu J. Therapeutic potential of PPAR γ natural agonists in liver diseases. *J Cell Mol Med.* 2020; 24: 2736–2748.
67. Vitale SG, Laganà AS, Nigro A, et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Modulation during Metabolic Diseases and Cancers: Master and Minions. Hindawi Publishing Corporation PPAR. Research. 2016; 9.
68. Neels JG, Grimaldi PA. Physiological Functions Of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor. *Physiol Rev*, 2014; 94: 795–858.
69. Wan Y. PPAR γ in bone homeostasis. *Trends in Endocrinology and Metabolism.* 2010; 21: 722–728.
70. Jones DC, Ding X, Daynes RA. Nuclear Receptor Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ) Is Expressed in Resting Murine Lymphocytes the PPAR γ in T and B lymphocytes is both transactivation and transrepression Competent. *The journal of biological chemistry.* 2002; 277(9): 6838–6845.
71. Ricote M, Glass CK. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochimica et Biophysica Acta* 2007; 1771: 926–935.
72. Maurer S, Harms M, Boucher J. The colorful versatility of adipocytes: white-to-brown transdifferentiation and its therapeutic potential in humans. *The FEBS Journal* 2021; 288: 3628–3646.
73. Giordano A, Smorlesi A, Frontini A, Barbatelli G, Cinti S. Mechanisms In Endocrinology. White, and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. *European Journal of Endocrinology* 2014; 170: 159–171.
74. Wanga L, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, et al. Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): a review. *Biochemical Pharmacology.* 2014; 92: 73–89.

75. Yao Y, Xu XH, Jin L. Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. *Frontiers in Immunology*. www.frontiersin.org. 2019; 10.
76. Fang S, Livergood MC, Nakagawa P, et al. Role of the Peroxisome Proliferator Activated Receptors in Hypertension. *Circulation Research*. 2021; 128: 1021–1039.
77. De Lellis L, Cimini A, Veschi S. The Anticancer Potential of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Antagonists. *ChemMedChem*. 2018; 13: 209–219.
78. Yousefniaa S, Momenzadehb S, Forootanb FS, et al. The influence of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) ligands on cancer cell tumorigenicity. *Gene*. 2018; 649: 14–22.
79. Kuliczowska J, Filus A, Trzmiel A, et al. PPAR- γ 2 Pro12Ala polymorphism in the population of obese and non-obese men of the city of Wrocław. *Polimorfizm PPAR- γ 2 Pro12Ala w populacji otyłych i nieotyłych mężczyzn z populacji Wrocławia. Endokrynologia Polska/Polish Journal of Endocrinology*. 2008; 59(4).
80. He W. PPAR γ 2Pro12Ala Polymorphism and Human Health. Hindawi Publishing Corporation. *PPAR Research*. 2009; 849538: 15.
81. Pluskiewicz W, Drozdowska B, Hüpsch H. Miejsce stomatologa w diagnozowaniu chorych z osteoporozą. *Terapia*. 2006; 3: 53–57.
82. Zdziemborska A, Deszczyńska K, Fidecki M. Osteoporoza – Bisfosfoniany – Dentysta. Część I. *Borgis - Nowa Stomatologia*. 2012; 2: 50–53.
83. Witkowska-Zimny M, Wróbel E, Przybylski J. Najważniejsze czynniki transkrypcyjne procesu osteoblastogenezy. *Postępy Biologii Komórki*. 2009; 36(4): 695–705.
84. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferators-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*. 1999; 20: 649–88.
85. Thomas T, Gori F, Khosla S, Jensen MD, Burguera B, Riggs BL. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology*. 1999; 140: 1630–8.
86. Akune T, Ohba S, Kamekura S, Yamaguchi M, et al. PPAR γ insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J Clin Invest*. 2004; 113: 846–55.
87. Mbalaviele G, Abu-Amer Y, Meng A, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma pathway inhibits osteoclast differentiation. *J Biol Chem*. 2000; 275: 14388–93.
88. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997; 89: 309–19.

89. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, et al. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 1998; 39: 1329–37
90. Woo KM, Choi Y, Ko SH, Ko JS, Oh KO, Kim KK. Osteoprotegerin is present on the membrane of osteoclasts isolated from mouse long bones. *Exp Mol Med* 2002; 34: 347–52
91. Chae GN, Kwak SJ. NF-kappaB is involved in the TNF-alpha induced inhibition of the differentiation of 3T3-L1 cells by reducing PPARgamma expression. *Exp Mol Med*. 2003; 35: 431–7.
92. Eun-Jung Rhee, Ki-Won Oh¹, Eun-Joo Yun, et al. The association of Pro12Ala polymorphism of peroxisome proliferator-activated receptor- γ gene with serum osteoprotegerin levels in healthy Korean women. *Experimental and Molecular Medicine*. 2007; 39: 696–704.
93. Muller YL, Bogardus C, Beamer BA, et al. A functional variant in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 promoter is associated with predictors of obesity and type 2 diabetes in Pima Indians. *Diabetes*. 2003; 52: 1864–71.
94. Dragojevič J, Ostanek B, Mencej-Bedrač S, et al. PPARG gene promoter polymorphism is associated with non-traumatic hip fracture risk in the elderly Slovenian population: A pilot study. *Clinical Biochemistry*. 2011; 44: 1085–1089.
95. Harsløf T, Tofteng CL, Husted LB, et al. Polymorphisms of the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) gene are associated with osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2010; doi:10.1007/s00198-010-1491-z
96. Ackert-Bicknell CL, Demissie S, Marín de Evsikova C, et al. PPARG by dietary fat interaction influences bone mass in mice and humans. *J Bone Miner Res*. 2008; 23: 1398–408.
97. Yue H, He JW, Zhang H, Hu WW, Hu YQ, Li M, et al. No association between polymorphisms of peroxisome [corrected] proliferator-activated receptor-gamma gene and peak bone mineral density variation in Chinese nuclear families. *Osteoporos Int*. 2010; 21: 873–82.
98. Ogawa S, Urano T, Hosoi T, Miyao M, et al. Association of bone mineral density with a polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene: PPARgamma expression in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 260: 122–6.
99. Tamaki J, Iki M, Morita A, Ikeda Y, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma polymorphism is related to peak bone mass: the JPOS study. *Osteoporos Int*. 2010; 21: 321–9.

100. Rhee EJ, Oh KW, Yun EJ, Jung CH, et al. The association of Pro12Ala polymorphism of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene with serum osteoprotegerin levels in healthy Korean women. *Exp Mol Med*. 2007; 39: 696–704.
101. Yue H, He JW, Zhang H, Hu WW, et al. No association between polymorphisms of peroxisome [corrected] proliferator-activated receptor-gamma gene and peak bone mineral density variation in Chinese nuclear families. *Osteoporos Int*. 2010; 21: 873–82.
102. Rhee EJ, Oh KW, Lee WY, Kim SY, et al. The effects of C161–NT polymorphisms in exon 6 of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene on bone mineral metabolism and serum osteoprotegerin levels in healthy middle-aged women. *Am J Obstet Gynecol*. 2005; 192: 1087–93.
103. Bogl LH, Latvala A, Kaprio J, Sovijärvi O, et al. An investigation into the relationship between soft tissue body composition and bone mineral density in a young adult twin sample. *J Bone Miner Res*. 2011; 26(1): 79–87. 2.
104. Funalot B, Courbon D, Brousseau T, et al. Genes encoding endothelin-converting enzyme-1 and endothelin-1 interact to influence blood pressure in women: the EVA study. *J Hypertens*. 2004; 22(4): 739–743.
105. Ahmed M, Rghigh A. Polymorphism in endothelin-1 gene: an overview. *Curr Clin Pharmacol*. 2016; 11(3): 191–210.
106. Sun P, Xiong H, Kim TH, Ren B, Zhang Z. Positive inter-regulation between beta-catenin/T cell factor-4 signaling and endothelin-1 signaling potentiates proliferation and survival of prostate cancer cells. *Mol Pharmacol*. 2006; 69(2): 520–531.
107. Johnson MG, Konicke K, Kristianto J, Gustavson A, et al. Endothelin signaling regulates mineralization and posttranscriptionally regulates SOST in TMOB cells via miR 126-3p. *Physiol Rep*. 2017; 5(4): 5.
108. Johnson MG, Kristianto J, Yuan B, Konicke K, Blank R. Big endothelin changes the cellular miRNA environment in TMOB osteoblasts and increases mineralization. *Connect Tissue Res*. 2014; 55: 113–116.
109. Hansen K, Johnson M, Carter T, et al. The –839(A/C) Polymorphism in the ECE1 Isoform b Promoter Associates With Osteoporosis and Fractures. *J Endocr Soc*. 2019; 15: 2041–2050.
110. Wang Z, Kristianto J, Yen Ooi C, Johnson MG, et al. Blood pressure, artery size, and artery compliance parallel bone size and strength in mice with differing ece1 expression. *J Biomech Eng*. 2013; 135(6): 61003–61009.
111. Clines GA, Mohammad KS, Grunda JM, Clines KL, et al. Regulation of postnatal trabecular bone formation by the osteoblast endothelin A receptor. *J Bone Miner Res*. 2011; 26(10): 2523–2536.

112. Hu LW, Wang X, Jiang XQ, Xu LQ, Pan HY. In vivo and in vitro study of osteogenic potency of endothelin-1 on bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res.* 2017; 357(1): 25–32.
113. Mestek ML, Weil BR, Greiner JJ, Westby CM, et al. Osteopenia and endothelin-1- mediated vasoconstrictor tone in postmenopausal women. *Bone.* 2010; 47(3): 542–545.

X. Spis tabel

Tabela 1.	Warunki termiczne reakcji real-time PCR dla badanych polimorfizmów genów ECE1 i PPARG	31
Tabela 2.	Składniki reakcji dla przeprowadzenia real-time PCR dla badanych polimorfizmów genów ECE1 i PPARG	32
Tabela 3.	Charakterystyka kobiet z osteopenią, osteoporozą i prawidłowym T-score.....	35
Tabela 4.	Analiza polimorfizmu rs1801282 genu PPARG w grupie kobiet z osteopenią, osteoporozą oraz w grupie kontrolnej.....	37
Tabela 5.	Analiza polimorfizmu rs213045 genu ECE1 w grupie kobiet z osteopenią, osteoporozą oraz w grupie kontrolnej.....	39
Tabela 6.	Analiza polimorfizmu rs213046 genu ECE1 w grupie kobiet z osteopenią, osteoporozą oraz w grupie kontrolnej.....	40
Tabela 7.	Analiza parametrów klinicznych i polimorfizmu rs1801282 genu PPARG u kobiet po menopauzie z prawidłowym T-score, osteopenią i osteoporozą.....	42
Tabela 8.	Analiza parametrów klinicznych i polimorfizmu rs213045 genu ECE1 u kobiet po menopauzie z prawidłowym T-score, osteopenią i osteoporozą.....	44
Tabela 9.	Analiza parametrów klinicznych i polimorfizmu rs213046 genu ECE1 u kobiet po menopauzie z prawidłowym T-score, osteopenią i osteoporozą.....	46

XI. Spis rycin

Rycina 1.	Schemat podziału osteoporozy.	7
Rycina 2.	Porównanie kości zdrowej i z osteoporozą.....	8
Rycina 3.	Schemat przebudowy tkanki kostnej.	13
Rycina 5.	Piki krzywych topnień dla poszczególnych genotypów polimorfizmu rs213045 genu ECE1. Temperatura topnienia dla allelu T $T_{m1}=57,45$; allelu G $T_{m2}=65,05$	32
Rycina 6.	Profil temperaturowy topnienia produktu dla poszczególnych genotypów polimorfizmu rs213046 genu ECE1 w reakcji real-time PCR. Krzywe topnienia produktu dla allelu A $T_{m1}=63,05$; allelu C $T_{m2}=68,45$	33
Rycina 7.	Piki krzywych topnień dla poszczególnych genotypów polimorfizmu rs213046 genu ECE1. Temperatura topnienia dla allelu A $T_{m1}=63,05$; allelu C $T_{m2}=68,45$	33
Rycina 8.	Profil temperaturowy topnienia produktu dla poszczególnych genotypów polimorfizmu rs1801282 genu PPARG w reakcji real-time PCR. Krzywe topnienia produktu dla allelu C $T_{m1}=58,25$; allelu G $T_{m2}=64,85$	33
Rycina 9.	Piki krzywych topnień dla poszczególnych genotypów polimorfizmu rs1801282 genu PPARG. Temperatura topnienia dla allelu C $T_{m1}=58,25$; allelu G $T_{m2}=64,85$	34
Rycina 10.	Rozkład procentowy częstości występowania genotypów polimorfizmu rs1801282 PPARG w badanych grupach.....	37
Rycina 11.	Rozkład procentowy częstości występowania alleli polimorfizmu rs1801282 PPARG w badanych grupach.....	38
Rycina 12.	Rozkład procentowy częstości występowania genotypów polimorfizmu rs213045 ECE1 w badanych grupach.....	39
Rycina 13.	Rozkład procentowy częstości występowania alleli polimorfizmu rs213045 ECE1 w badanych grupach.....	40
Rycina 14.	Rozkład procentowy częstości występowania genotypów polimorfizmu rs213046 ECE1 w badanych grupach.....	41
Rycina 15.	Rozkład procentowy częstości występowania alleli polimorfizmu rs213046 ECE1 w badanych grupach.....	41