

POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W SZCZECINIE



Lek. Filip Przerwa

**ANALIZA WPLYWU
WYBRANYCH POLIMORFIZMÓW GENU OPG
W PATOGENEZIE OSTEOPOROZY POMENOPAUZALNEJ**

Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu

Dyscyplina nauki medyczne

Promotor: prof. dr hab. n. med. Bogusław Czerny

Promotor pomocniczy: dr n. med. Izabela Uzar

Szczecin 2023 r.

*Panu prof. dr hab. n. med. Bogusławowi Czerny
za wsparcie, opiekę merytoryczną i pomoc.*

Mamie i Tacie za daną szansę rozwoju i wyjątkową cierpliwość.

Serdecznie dziękuję

Spis treści

1. Wykaz stosowanych skrótów	5
2. Wstęp	8
2.1. Osteoporoza — historia i definicja	9
2.1.1. Osteoporoza — epidemiologia i farmakoekonomika leczenia	10
2.1.2. Starzenie się jako fizjologiczny proces związany z osteoporozą	11
2.1.3. Osteopenia jako stan poprzedzający osteoporozę	13
2.1.4. Klasyfikacja osteoporozy	13
2.1.5. Czynniki ryzyka osteoporozy i predykcja wiążących się z nią złamań	15
2.1.6. Genetyczne czynniki ryzyka osteoporozy	17
2.2. Układ kostny — budowa ogólna i histologiczna	19
2.2.1. Układ kostny — skład komórkowy i macierz kostna	21
2.2.2. Układ kostny — proces modelowania i przebudowy strukturalnej	23
2.3. Odkrycie kompleksu OPG/RANK/RANKL	26
2.3.1. Osteoprotegeryna	26
2.3.2. RANKL	27
2.3.3. RANK	30
2.3.4. Kolejny receptor dla RANKL — LGR4	30
2.3.5. Szlak sygnalizacyjny OPG/RANK/RANKL	31
2.3.6. Szlak sygnalizacyjny Wnt/ β -katenina	31
2.4. Osteoporoza postmenopauzalna	33
2.4.1. Hormony — udział w powstawaniu osteoporozy pomenopauzalnej	33
3. Cel pracy	36
4. Materiał i metody	37
4.1. Opis badanego materiału badawczego	37
4.2. Metody badawcze	38
4.2.1. Izolacja materiału genetycznego	38
4.2.2. Oznaczenie polimorfizmów genu OPG	39
4.3. Metody statystyczne służące prezentacji uzyskanych wyników	43
5. Wyniki	45
5.1. Charakterystyka pacjentek zakwalifikowanych do badania	45
5.1.1. Charakterystyka badanych wariantów genu <i>TNFRSF11B</i>	50
5.1.2. Allele Frequency1000Genomes(Europe)	50
5.1.3. Częstość występowania genotypów i alleli badanych polimorfizmów genu <i>TNFRSF11B</i> w badanych grupach	51
5.1.4. Grupy kontrolna i osteopenia	52
5.1.5. Analiza nierównowagi sprzężeń i częstości występowania haplotypów analizowanych wariantów genu <i>TNFRSF11B</i>	57
5.1.6. Asocjacje danych klinicznych z badanymi wariantami polimorficznymi	59
5.1.7. Korelacje danych densytometrycznych z wiekiem i BMI pacjentek	63
6. Dyskusja	65

6.1. Genetyczne uwarunkowania osteoporozy	65
6.2. Udział badanych polimorfizmów genu OPG w etiopatogenezie osteoporozy	66
6.3. Udział polimorfizmów genu OPG w patogenezie innych chorób.....	72
7. Wnioski	75
8. Streszczenie	76
9. Abstract	77
10. Piśmiennictwo.....	78
11. Spis tabel.....	95
12. Spis rycin.....	96

1. Wykaz stosowanych skrótów

- 95% CI — (ang. 95% confidence interval) — przedział ufności
- ACTH — (ang. *adrenocorticotropic hormone*) — hormon adrenokortykotropiny
- AIC — (ang. Akaike Information Criterion) — kryterium informacyjne Akaike
- AM — (ang. *age matched*) — średnia dla wieku
- ANOVA — (ang. *analysis of variance*) — jednoczynnikowa analiza wariancji dla zmiennych niepowiązanych
- BMD — (ang. *bone mineral density*) — gęstość mineralna kości
- BMI — (ang. *body mass index*) — wskaźnik masy ciała
- COLIA1 — (ang. *collagen type I alpha1*) — kolagenu typu I $\alpha 1$
- CSA — (ang. *total femoral cartilage cross-sectional area*) — poprzeczna powierzchnia mięśniowa uda
- DALY — (ang. *ang. disability-adjusted life years*) — lata życia skorygowane niesprawnością
- DKK1 — białko dickkopf-1
- DNA — (ang. *deoxyribonucleic acid*) — kwas deoksyrybonukleinowy
- DXA — (ang. *dual energy X-ray absorptiometry*) — densytometria
- EDTA — (ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*) — kwas wersenowy
- ER — (ang. *estrogen receptor*) — receptor estrogenowy
- FBF — (ang. *fibroblast growth factor*) — czynnik wzrostu fibroblastów
- FRAX — (ang. *Fracture Risk Assessment Tool*) — kalkulator ryzyka złamania
- GLP — (ang. *Good Laboratory Practice*) — dobra praktyka laboratoryjna
- GM-CSF — (ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) — czynnik stymulujący kolonie makrofagów
- GPR — (ang. *G-protein coupled receptor*) — receptor sprzężony z białkiem G
- GSK3 β — (ang. *glycogen synthase kinase-3 β*) — β kinaza syntazy glikogenu-3
- GWAS — (ang. *genome-wide association study*) — badania asocjacyjne całego genomu
- HWE — (ang. *Hardy-Weinberg equilibrium*) — równowaga Hardy'ego-Weinberga
- IGF — (ang. *insulin-like growth factor*) — insulinopodobny czynnik wzrostu
- IKK — (ang. *I κ B kinase*) — inhibitor kinazy NF κ B

- IL — (ang. *interleukin*) — interleukina
- JNK — (ang. *c-Jun N-terminal kinase*) — c-Jun N-terminalna kinaza
- LD — (ang. *linkage disequilibrium*) — nierównowaga sprzężeń
- LOD — (ang. *logarithm of the odds*) — logarytm szans
- LRP 5 — (ang. *low density lipoprotein receptor-related protein*) — białko związane z receptorem lipoprotein o niskiej gęstości 5
- LRP — (ang. *low density lipoprotein receptor*) — białko związane z receptorem lipoprotein o niskiej gęstości
- MAF — (ang. *minor allele frequency*) — częstość występowania alleli rzadszych
- max — (ang. *maximum*) wartość maksymalna
- Me — (ang. *Median*) mediana
- min — (ang. *minimum*) — wartość minimalna
- mRNA — (ang. *messenger RNA*) — matrycowy kwas rybonukleinowy
- n — liczebność
- NFAT-c1 — (ang. *nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1*) — czynnik jądrowy aktywowanych komórek T
- NF- κ B — (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) — aktywator receptora czynnika jądrowego kappa B
- NIH — (ang. *National Institutes of Health*) — Narodowy Instytut Zdrowia
- OPG — (ang. *osteoprotegerin*) — osteoprotegeryna
- OR — (ang. (ang. *odds ratio*)) — iloraz szans
- PCR — (ang. *polymerase chain reaction*) — łańcuchowa reakcja polimerazy
- PTH — Parathormon
- PTHrP — (ang. *parathyroid hormone-related protein*) — peptyd pokrewny PTH
- QALY — (ang. *quality-adjusted life year*) — lata życia skorygowane ich jakością
- QTL — (ang. *quantitative trait locus*) — locus cechy ilościowej
- RANK — (ang. *receptor activator of nuclear factor κ B*) — receptor aktywatora jądrowego czynnika κ B
- RANKL — (ang. *receptor activator of nuclear factor κ B ligand*) — ligand receptora aktywatora jądrowego czynnika κ B
- SD — (ang. *standard deviation*) — odchylenie standardowe
- SNP — (ang. *single nucleotide polymorphism*) — polimorfizm pojedynczych nukleotydów
- SPSK — Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny

- TGF — (ang. *transforming growth factor*) — transformujący czynnik wzrostu
- TNF — (ang. *tumor necrosis factor*) — czynnik martwicy nowotworów
- TRAF — (ang. *TNF receptor associated factor*) — czynnik związany z receptorem TNF
- TRAIL — (ang. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) — związany z czynnikiem martwicy nowotworu ligand aktywujący apoptozę
- TSH — (ang. *thyroid stimulating hormone*) — hormon tyreotropowy
- UE — Unia Europejska
- VDR — (ang. *vitamin D receptor*) — receptor witaminy D
- VNTR — (ang. *variable number of tandem repeats*) — powtórzenia tandemowe o zmiennej długości
- WHO — (ang. *World Health Organization*) — Światowa Organizacja Zdrowia
- \bar{x} — (ang. *Mean; intermediate value*) wartość średnia
- YA — (ang. *young adult*) — młody dorosły

2. Wstęp

Z pokolenia na pokolenie zwiększa się przeciętna przewidywana długość życia człowieka. Jest to efektem progresu technologicznego, zwiększającej się społecznej świadomości zdrowia a przede wszystkim, nieustannym rozwojem nauk medycznych. Rosnąca długość życia niesie ze sobą niestety również pewne trudności i wyzwania, z którymi współczesna medycyna musi się zmierzyć.

Osteoporoza jest ogólnoustrojową, wieloczynnikową chorobą metaboliczną tkanki kostnej, charakteryzującą się zanikaniem mikroarchitektury kości a w efekcie spadkiem ich masy. Skutkuje to zwiększoną kruchością oraz utratą stabilności i elastyczności kośćca, prowadzącą do złamań, nawet przy niewielkim obciążeniu mechanicznym (urazy niskoenergetyczne). Zanik kości spowodowany jest szybszym, względem kościotworzenia, rozkładem beleczek i tkanki łącznej kości. Złamania osteoporotyczne znacznie obniżają jakość życia chorych i wiążą się z dużą zachorowalnością, śmiertelnością i obciążeniem ekonomicznym.

Osteoporoza określana jest jako cicha epidemia XXI wieku. Szacuje się, że choruje na nią ponad 200 milionów kobiet na całym świecie. Złamanie osteoporotyczne zdarza się średnio co 3 sekundy, czego efektem jest ponad 8,9 miliona takich przypadków rocznie [1]. Dotyka 22,1% kobiet oraz 6,1% mężczyzn powyżej 50. roku życia. Z danych wynika, że w Polsce choruje około 1,7 miliona kobiet oraz 400 tys. mężczyzn [2]. Osteoporoza jest poważnym problemem, z którym mierzy się współczesna medycyna. Częstotliwość występowania oraz wieloletni przebieg, który nie daje na początku żadnych jawnych symptomów, zmniejszając wczesną wykrywalność a w efekcie opóźniając wdrożenie odpowiedniego leczenia, sprawia że znajdowanie nowych rozwiązań jest priorytetem.

Szkielet kostny jest pewnego rodzaju mechanicznym fundamentem dla tkanek i narządów. Dzięki połączeniu z mięśniami i ścięgnami możliwe jest przenoszenie ich siły a w efekcie utrzymanie właściwej postawy oraz poruszanie się. Kości takie jak czaszka, czy żebra, ochraniają narządy wewnętrzne przed uszkodzeniem. Tkanka kostna jest również zaangażowana w metabolizm wapnia, natomiast w szpiku kostnym odbywa się hematopoeza. Kości są żywą strukturą, nieustannie zmieniającą się w ciągu naszego życia. Biorąc pod uwagę zdolność układu kostnego do dostosowywania swojej morfologii do wymagań funkcjonalnych oraz zdolność do naprawiania, jest ona w rzeczywistości „inteligentnym” materiałem i przy-

kładem formy podążającej za funkcją. Przebudowa kości wiąże się dwoma przeciwstawnymi procesami: kościotworzeniem przez osteoblasty oraz resorpcją, za którą odpowiedzialne są osteoklasty [3]. Równowaga między tymi procesami jest kluczowa dla zachowania dobrego zdrowia oraz wysokiej jakości życia.

Kluczowym odkryciem w zrozumieniu przemiany kostnej było zaobserwowanie działania ścieżki sygnalizacyjnej RANK-RANKL-OPG. Jest to proces, który umożliwia regulację różnicowania linii osteoblastów i aktywności osteoklastów. Szlak ten obejmuje trzy główne komponenty:

1. Aktywator receptora czynnika jądrowego kappa B (NF- κ B) (RANK), który ulega ekspresji na powierzchni hemopoetycznych komórek prekursorowych (komórek prekursorowych osteoklastów) [4].
2. Ligand RANK (RANKL), czyli polipeptyd znajdujący się na powierzchni komórek osteoblastycznych, który następnie jest uwalniany proteolitycznie w postaci rozpuszczalnej [5].
3. Osteoprotegeryna (OPG) — receptor cytokinowy, uwalniany przez komórki osteoblastyczne, który jest w stanie skutecznie rozpoznać i związać RANKL, ale nie jest strukturalnie zdolny do dalszej sygnalizacji, hamując w ten sposób aktywację osteoklastów a w następstwie resorpcję kości [6].

2.1. Osteoporoza — historia i definicja

Termin „osteoporoza” pierwszy raz w literaturze pojawił się dopiero na początku XIX wieku, gdy został użyty przez francuskiego patologa Jeana Lobsteina w 1820 roku. Pojęcie wywodzi się z greckiego *osteon* — kość i *poros* — otwór, co w tłumaczeniu dokładnym znaczy porowatość kości, którą Lobstein zauważył u swoich pacjentów. W 1885 r. Gustav Pommer, niemiecki patolog, odróżnił:

1. Osteoporozę, w której występuje w pełni uwapniona tkanka kostna, jednak w zbyt małej ilości.
2. Osteomalację, gdzie występuje deficyt wapnia w samej tkance kostnej.
3. Krzywicę, występującą na skutek zmiękczenia i osłabienia kości z powodu zaburzenia gospodarki wapniowo-elektrolitowej [7].

W 1941 roku Anglik Fuller Albright oficjalnie zdefiniował osteoporozę jako: „zbyt małe tworzenie zwapniałej kości [8]”. W 1988 roku amerykański Narodowy Instytut Zdrowia (NIH) opublikował swoją pierwszą definicję, w której osteoporozę określono jako „stan, w którym masa kostna ulega zmniejszeniu, co zwiększa podatność kości na uszkodzenia” [7]. Problem tej definicji polega na tym, że obejmuje jedynie ilościowy aspekt choroby, nie

uwzględniając przy tym jakościowego. W 1994 r. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) zdefiniowała osteoporozę jako stan, w którym gęstość kości mierzona metodą densytometrii (DXA) wynosi 2,5 odchylenia standardowego poniżej średniej dla zdrowych kobiet w wieku 20–29 lat [9]. DXA (ang. *dual-energy X-ray absorptiometry*) jest narzędziem do pomiaru gęstości mineralnej kości (BMD, ang. *Bone Mineral Density*) z wykorzystaniem obrazowania radiologicznego. Na kości pacjenta kierowane są dwa promienie rentgenowskie o różnych poziomach energii. Po usunięciu zresorbowanych tkanek miękkich można określić gęstość mineralną kości na podstawie resorpcji każdego fragmentu kostnego [10].

Definicja osteoporozy określona przez WHO w 1994 r. pozostaje bez zmian do dnia dzisiejszego, natomiast NIH w roku 2001 zaktualizował swoją definicję — „osteoporoza to choroba całego szkieletu charakteryzująca się niską masą kostną i zmianami w mikroarchitekturze kości, które powodują kruchość kości, czego konsekwencją jest zwiększone ryzyko wystąpienia złamań” [11]. Są to definicje obowiązujące do dziś, starają się opisać znaczenie kliniczne i laboratoryjne choroby, a jednocześnie umożliwiają odróżnienie osteoporozy od innych pokrewnych chorób. Określają również wartości progowe utraty kości, po przekroczeniu których występują objawy kliniczne.

2.1.1. Osteoporoza — epidemiologia i farmakoekonomika leczenia

Według kryteriów diagnostycznych WHO szacuje się, że w 22 milionów kobiet i 5,5 miliona mężczyzn w UE choruje na osteoporozę. Co roku liczba nowych złamań w Unii Europejskiej to około 3,5 mln, na co składa się około 610 tys. złamań biodra, 520 tys. złamań kręgow, 560 tys. złamań przedramienia i 1,8 mln innych złamań. Dwie trzecie wszystkich przypadkowych złamań wystąpiło u kobiet. Ze względu na zmiany w demografii populacji, szacuje się, że roczna liczba złamań kruchych wzrośnie z 3,5 mln w 2010 r. do 4,5 mln w 2025 r., co odpowiada wzrostowi o 28% [12].

Osteoporoza i powstające w jej następstwie złamania wiążą się ze zwiększoną śmiertelnością w populacji [13]. Liczbę zgonów w UE, które były przyczynowo związane ze złamaniami, szacuje się na 43 000 rocznie. Około 50% zgonów związanych ze złamaniami u kobiet wynikało ze złamań biodra, 28% ze złamań kręgow a 22% z innych złamań [12]. W przypadku złamania biodra większość zgonów występuje w pierwszych 3–6 miesiącach po zdarzeniu, z czego 20–30% jest przyczynowo związane z samym zdarzeniem złamania. Przykładowo w Szwecji liczba zgonów, które są związane ze złamaniem biodra, stanowi ponad 1% wszystkich zgonów rejestrowanych w tym kraju. Jest to procent nieco większy niż liczba zgonów, za które odpowiedzialne są nowotwory trzustki [14].

Całkowite obciążenie zdrowotne, mierzone w QALY (wskaźnik stanu zdrowia osoby lub grupy, wyrażający długość życia skorygowaną o jego jakość) oszacowano dla Unii Europejskiej na 1 180 000. Wskaźnik ten stosowany jest do oceny ekonomicznej wartości interwencji medycznych. Jedna jednostka równa się jednemu rokowi w doskonałym zdrowiu.

Dwa razy więcej QALY utracono u kobiet niż u mężczyzn. W Europie osteoporoza spowodowała więcej utraconych lat życia i niepełnosprawności (DALY) niż np. reumatoidalne zapalenie stawów. W odniesieniu do chorób nowotworowych obciążenie osteoporozą było większe niż dla wszystkich nowotworów, z wyjątkiem raka płuc [15].

Koszty terapii osteoporozy, w tym interwencji farmakologicznych w Unii Europejskiej, oszacowano na 37 mld euro rocznie. Koszty leczenia złamań osteoporotycznych stanowiły 66% tych kosztów, profilaktyka farmakologiczna 5%, a długoterminowa opieka nad złamaniami 29%. Całkowitą wartość utraconych QALY w 2010 roku oszacowano na 61,4 miliardów euro [12].

W Polsce około 1 985 000 osób choruje na osteoporozę, z czego ponad 80% stanowią kobiety. Częstość występowania osteoporozy w całej populacji polskiej wynosi 4,8%. Roczna liczba zgonów związanych ze złamaniem osteoporotycznym oszacowano na 113 na 100 000, dla populacji w wieku 50 lat lub więcej. Liczba zgonów związanych ze złamaniami osteoporotycznymi w Polsce jest porównywalna lub przekracza liczbę zgonów spowodowanych niektórymi z najczęstszych przyczyn takich jak: cukrzyca, rak płuc, czy przewlekłe choroby dolnych dróg oddechowych. Przewiduje się, że do roku 2034 populacja chorych mężczyzn i kobiet w wieku 50 lat lub więcej wzrośnie o 16,6%.

Aktualnie bezpośredni roczny koszt leczenia złamań incydentalnych w Polsce wynosi ponad 1,5 mld zł. Do tego doliczane są koszty spowodowane długotrwałą niezdolnością do pracy z powodu wcześniejszych złamań, które wynoszą kolejne 1,6 mld zł. Koszty interwencji farmakologicznej wynoszą 62,1 mln zł. Zatem całkowity koszt bezpośredni wynosi ponad 3,1 mld zł rocznie. Koszty leczenia złamań osteoporotycznych w Polsce stanowiły około 2,2% wydatków na opiekę zdrowotną w 2022 roku [16].

2.1.2. Starzenie się jako fizjologiczny proces związany z osteoporozą

Starzenie się jest procesem fizjologicznym, polegającym na powolnym gromadzeniu się w komórkach i tkankach organizmu różnorodnych szkodliwych czynników i zmian, które ostatecznie zwiększają ryzyko zachorowania i śmierci. Wydolność organizmu ulega pogorszeniu, przemianie ulega również metabolizm, gdzie przewagę uzyskują procesy kataboliczne, prowadzące do rozkładu struktur, co z kolei zwiększa podatność na choroby [17]. Spośród

różnych teorii dotyczących przyczyn starzenia się, wyróżnia się dwie najważniejsze. Pierwsza z nich to teoria genetycznego programowania starzenia się, sugerująca, że starzenie się i długość życia organizmów są uwarunkowane genetycznie. Druga to teoria starzenia się związanego z uszkodzeniami na poziomie komórkowym, spowodowanymi szkodliwymi czynnikami, takimi jak np. stres oksydacyjny, wolne rodniki, mutacje, czy zaburzenia kontroli cyklu komórkowego [18]. Wraz z wiekiem homeostaza organizmu ulega stopniowemu zachwianiu. Zaburzenia jednego układu niosą za sobą negatywne zmiany w innych, co prowadzi ostatecznie do obniżenia sprawności fizjologicznej całego organizmu.

Wytrzymałość i objętość kości jest zachowana w miarę starzenia się dzięki stałej, zrównoważonej przebudowie szkieletu, jednak wraz z wiekiem równowaga między anabolizmem, a katabolizmem tkanki kostnej zostaje zaburzona. Zwiększa się ilość i aktywność osteoklastów, czyli komórek odpowiedzialnych za rozkład kości, natomiast aktywność osteoblastów odpowiedzialnych za kościotworzenie spada. Efektem tego jest obniżanie się masy kostnej, osłabienie beleczek kości gąbczastej, co w następstwie skutkuje również osłabieniem kości beleczkowatej i zwiększoną podatnością tkanki na złamania. Innymi czynnikami nasilającymi się wraz z wiekiem i wpływającymi negatywnie na masę kostną są m.in. spadek stężenia witaminy D, spadek absorpcji wapnia w przewodzie pokarmowym, spadek poziomu estrogenów oraz wzrost stężenia parathormonu [19].

Kobiety są szczególnie narażone na zjawisko osłabienia tkanki kostnej. Jest to spowodowane menopauzą i zmianami w organizmie. Jest to okres w życiu kobiety, w którym funkcja jajników stopniowo spowalnia, aby ostatecznie zupełnie zaniknąć, co w następstwie skutkuje brakiem menstruacji, niedoborem estrogenów oraz obniżonym wydzielaniem hormonu folikulotropowego, luteinizującego oraz gonadoliberyny [20].

Co ważne, dochodzi wtedy również do nasilonego katabolizmu kości, spowodowanego bezpośrednio znacznym spadkiem poziomu estrogenów. W okresie okołomenopauzalnym kobiety tracą 5–15% masy kostnej, przy czym 80% tej utraty stanowi istota gąbczasta, która jest bardziej aktywna metabolicznie niż istota zbita [21]. Natomiast po menopauzie dochodzi do znacznie szybszego rozkładu tkanki kostnej, po ukończeniu 65 r.ż. spadek wynosi już około 25% masy maksymalnej i w kolejnych latach niedobór się pogłębia [22]. Występuje również osłabienie, zależnego od estrogenów, jelitowego wchłaniania i nerkowej reabsorpcji kanalikowej wapnia. Dodatkowo u kobiet po menopauzie występuje zwiększona wrażliwość kości na parathormon, co skutkuje ich większą resorpcją [23].

2.1.3. Osteopenia jako stan poprzedzający osteoporozę

Wraz z wiekiem masa kostna fizjologicznie ulega stopniowemu zmniejszeniu. Jest to efektem upośledzenia procesów kościotwórczych oraz mineralizacji kośćca. Termin „osteopenia” został wprowadzony do słownictwa medycznego, aby określić stan, w którym masa kostna jest zmniejszona, ale jeszcze nie w sposób patologiczny. Koncepcyjnie, osteopenia jest analogiczna do upośledzonej tolerancji glukozy — nie jest to stan chorobowy, wskazuje jedynie na zwiększone ryzyko złamań w porównaniu z osobami zdrowymi [24]. Różnicowanie diagnostyczne pomiędzy osteopenią, a osteoporozą opiera się na pomiarze gęstości mineralnej kości.

Osteopenia została zdefiniowana przez Światową Organizację Zdrowia jako stan, w którym wartość T-score mieści się pomiędzy $-2,5$, a $-1,0$. Wskaźnik T-score, to gęstość mineralna kości w danym miejscu w porównaniu do „młodej normalnej średniej referencyjnej”, czyli porównanie gęstości mineralnej kości pacjenta do gęstości mineralnej zdrowego 30-latka.

Szacuje się, że między 10% a 20% osób dotkniętych łagodną osteopenią (T-score między $-1,01$ a $-0,49$) rozwinię w następstwie osteoporozę w ciągu 17 lat, umiarkowaną osteopenią (T-score między $-1,50$ a $-1,9$) w ciągu pięciu lat a zaawansowaną osteopenią (T-score między $-2,00$ a $-2,49$) w ciągu roku [25, 26].

2.1.4. Klasyfikacja osteoporozy

Osteoporoza jest klasyfikowana na podstawie stopnia zaawansowania choroby, etiologii lub lokalizacji zmian. tabela 1. przedstawia powyższy podział.

Klasyfikacja według stopnia zaawansowania choroby została przedstawiona w tabeli 1. Można ją podzielić na osteopenię, osteoporozę i osteoporozę ciężką, a podział opiera się na podstawie pomiaru BMD, dzięki któremu można ocenić wartość T-score pacjenta.

Tabela 1. Klasyfikacja osteopenii i osteoporozy wg WHO [27]

Interpretacja	T-score	Gęstość kości w mg/cm ²
Zdrowa kość	większy od $-1,0$	powyżej 833
Osteopenia	między $-1,0$ a $-2,5$	między 833 a 648
Osteoporoza	mniejszy od $-2,5$	poniżej 648
Osteoporoza ciężka	j.w + złamania osteoporotyczne	j.w + złamania osteoporotyczne

Klasyfikacja w oparciu o etiologię wyróżnia typ pierwotny i wtórny. Osteoporoza pierwotna wynika najczęściej z ubytków inwolucyjnych tkanki kostnej (tzw. osteoporoza inwolucyjna). Wyróżnia się dwa podstawowe typy osteoporozy pierwotnej, inwolucyjnej:

1. Osteoporoza pomenopauzalna, która stanowi około 80% przypadków, gdzie w związku z menopauzą i towarzyszącym jej zanikiem wydzielania estrogenów, tkanka kostna ulega nadmiernej resorpcji.
2. Osteoporoza starcza, której przyczyną jest zaburzenie równowagi między procesem kościotworzenia, a resorpcji tkanki kostnej. Dotyczy obu płci po 75 r.ż. i często występuje w postaci mieszanej z typem 1.

Drugą postacią osteoporozy pierwotnej jest osteoporoza idiopatyczna, o niejasnym podłożu. Występuje u kobiet przed menopauzą oraz u mężczyzn przed 75 r.ż., stąd nazywana jest czasem osteoporozą młodzieńczą [28].

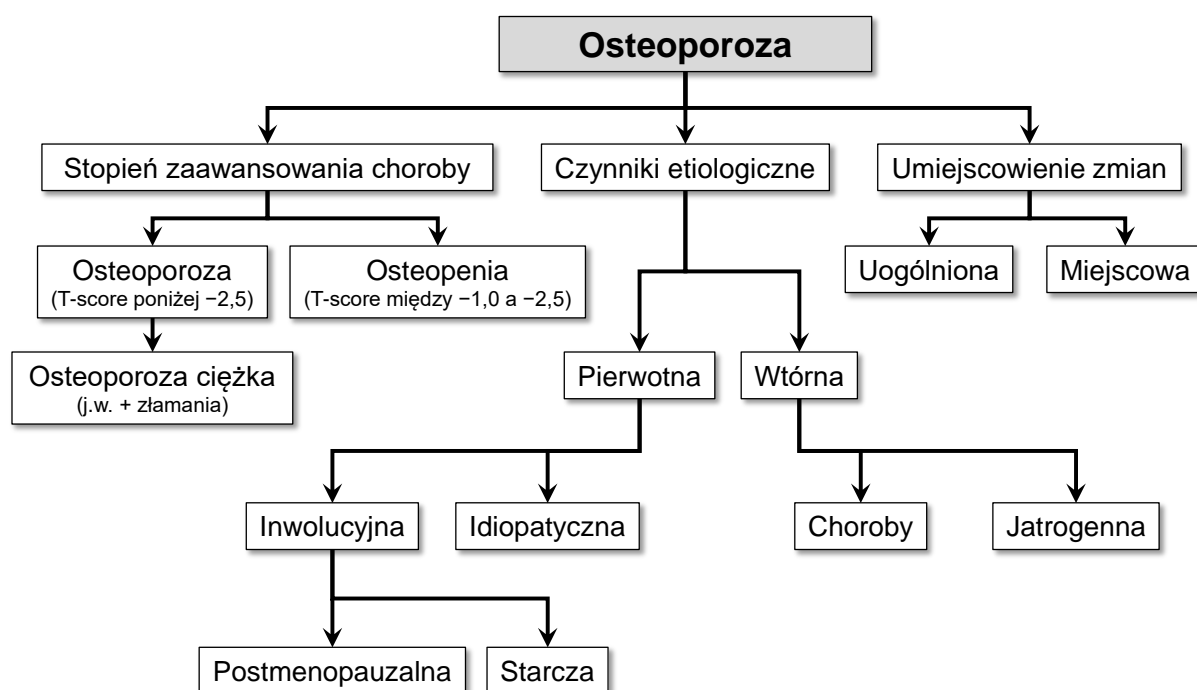
Osteoporoza, która jest spowodowana przez inne zaburzenia lub ekspozycję na leki jest określana jako osteoporoza „wtórna” [29]. Istnieje wiele przyczyn wtórnej osteoporozy, w tym hipogonadyzm, zaburzenia endokrynologiczne, transplantacje, choroby przewodu pokarmowego, predyspozycje genetyczne i leki. Najważniejsze przedstawiono w tabeli 2. Stanowią one około 20% przypadków występowania osteoporozy [30].

Tabela 2. Przyczyny osteoporozy wtórnej [30]

Choroby endokrynologiczne	Leki potencjalnie indukujące osteoporozę
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Nadczynność tarczycy ✓ Hipogonadyzm ✓ Nadczynność przytarczyc ✓ Cukrzyca ✓ Niedobór hormonu wzrostu i akromegalia 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Glikokortykosteroidy ✓ Hormony tarczycy ✓ Leki wywołujące hipogonadyzm np. inhibitory aromatazy ✓ Tiazolidinediony ✓ Leki przeciwdepresyjne ✓ Leki przeciwdrgawkowe ✓ Inhibitory kalcyneuryny ✓ Terapia antyretrowirusowa ✓ Heparyna ✓ Diuretyki pętlowe ✓ Inhibitory pompy protonowej
Choroby układu pokarmowego	
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Celiakia ✓ Zapalne choroby jelit ✓ Anoreksja ✓ Hemochromatoza i przewlekłe choroby wątroby 	
Choroby hematologiczne	
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hiperkalcuria idiopatyczna ✓ Kwasica kanalikowa w nerkach ✓ Przewlekła choroba nerek 	
Choroby nerek	
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Szpiczak mnogi ✓ Mastocytoza układowa ✓ Beta-talasemia 	
Choroby autoimmunologiczne	
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Reumatoidalne zapalenie stawów ✓ Toczeń rumieniowaty układowy ✓ Zesztywniające zapalenie stawów kręgosłupa ✓ Stwardnienie rozsiane 	

Klasyfikacja osteoporozy w oparciu o lokalizację wyróżnia osteoporozę uogólnioną i miejscową:

1. Osteoporoza uogólniona dotyczy całej tkanki kostnej organizmu. Jest efektem procesów inwolucyjnych, zaburzeń metabolicznych, ale może być również efektem przewlekłego unieruchomienia.
2. Osteoporoza miejscowa charakteryzuje się konkretną lokalizacją i przebiegiem związanym z czynnikiem chorobotwórczym. Przykładem takiego procesu może być zespół Sudecka, który jest przewlekłym schorzeniem bólowym charakteryzującym się hiperalgezią i allodynią, a także atrofią mięśni, ubytkiem kości i zeszywnieniem stawów. Często rozwija się po urazach kończyn lub zabiegach chirurgicznych [31]. Innym przykładem może być reumatoidalne zapalenie stawów, gdzie na skutek procesów zapalnych następuje również miejscowo zmniejszenie gęstości kości. Są to procesy organiczne, w których rozkład tkanki kostnej następuje wtórnie do procesu chorobowego [24].



Rycina 1. Klasyfikacja osteoporozy.

2.1.5. Czynniki ryzyka osteoporozy i predykcja wiążących się z nią złamań

Istnieje szereg czynników prowadzących do rozwoju osteoporozy i związanych z nią złamań. We wspomnianym już wcześniej okresie menopauzy następuje przyspieszenie tempa obrotu kostnego, skutkującego przewagą resorpcji tkanki nad kościotworzeniem, a w efekcie

zmniejszeniem gęstości i większą podatnością na złamania [32]. Zmiany mikroarchitektury kości są również ważnym czynnikiem wpływającym na ryzyko urazów [33].

Kolejnym czynnikiem ryzyka jest długość osi biodrowej, umownie definiowana jako odległość między podstawą krętarza wielkiego, a wewnętrznym brzegiem miednicy. Miara ta jest związana z ryzykiem złamania biodra u kobiet; porównywalne dane u mężczyzn są nieliczne [34].

Wykazano, że poprzeczna powierzchnia mięśniowa uda (ang. CSA), jak i osłabienie tych mięśni oraz grubość tkanki miękkiej w okolicy krętarza większego są również niezależnymi czynnikami ryzyka złamania biodra [35]. Czynniki ryzyka osteoporozy wtórnej w postaci chorób i przyjmowanych leków przedstawiono w tabeli 3., jednak znaczący wpływ mają też inne parametry, zwiększające ryzyko wystąpienia osteoporozy pierwotnej.

Tabela 3. Czynniki ryzyka osteoporozy pierwotnej [36, 37, 38]

Czynnik ryzyka	Kryterium
Płeć	Żeńska
Wiek	>65 lat
Rasa	Kaukaska i azjatycka
Menopauza przed 45 r.ż.	Nieleczona
Niska masa ciała	BMI poniżej 20 kg/m ²
Występowanie osteoporozy w rodzinie	—
Przebyte złamania osteoporotyczne	—
Niska podaż lub osłabione wchłanianie wapnia	—
Niedobór witaminy D	—
Palenie tytoniu	—
Nadużywanie alkoholu	>3,5 jednostki dziennie
Mała aktywność fizyczna	—
Długotrwałe unieruchomienie	—

Głównym celem leczenia osteoporozy jest zmniejszenie ryzyka wystąpienia złamań. Dlatego zdolność do oceny ryzyka złamań ma kluczowe znaczenie w identyfikacji pacjentów, którzy kwalifikują się do interwencji. Jak przytoczono wyżej, osteoporoza jest oficjalnie definiowana przy BMD szyjki kości udowej o wartości T-score $-2,5$. Istnieje jednak kilka czynników, które sprawiają, że stosowanie wskaźnika T-score jako uniwersalnego progu interwencji jest problematyczne:

- stosunkowo niska czułość [39],
- próg interwencyjny T-score powinien różnić się w zależności od wieku [40],
- różne ryzyko złamań w zależności od kraju, stąd próg interwencyjny T-score powinien być teoretycznie ustanawiany w zależności od regionu [41].

W związku z tym w 2008 roku Światowa Organizacja Zdrowia opublikowała FRAX, czyli narzędzie do oceny ryzyka złamania służące do oszacowania indywidualnego 10-letniego prawdopodobieństwa wystąpienia dużych złamań osteoporotycznych (urazy biodra, kręgosłupa, przedramienia i proksymalnej części kości ramiennej) [42]. FRAX rozróżnia siedem najważniejszych klinicznych czynników ryzyka: wcześniejsze złamanie osteoporotyczne kości, złamanie biodra u rodziców, palenie tytoniu, stosowanie glikokortykoidów, nadmierne spożycie alkoholu, reumatoidalne zapalenie stawów i inne przyczyny osteoporozy wtórnej. Są to czynniki, które oprócz wieku i płci oraz wskaźnika masy ciała (BMI) przyczyniają się do oszacowania 10-letniego prawdopodobieństwa złamania, niezależnie od gęstości mineralnej kości [43].

Innym narzędziem do oceny ryzyka złamań osteoporotycznych jest QFracture, które opiera się na brytyjskim prospektywnym otwartym badaniu kohortowym z danych zbieranych z 357 gabinetów placówek leczniczych, dotyczących ponad 2 milionów mężczyzn i kobiet w wieku 30–85 lat [44]. QFracture również uwzględnia liczne czynniki ryzyka a wynikiem jest ocena 10 letniej zapadalności na 10 dużych złamań osteoporotycznych. Najważniejsza różnica między QFracture a FRAX polega na tym, że pierwsze ocenia jedynie 10 letnią kumulatywną zapadalność na urazy, natomiast drugie uwzględnia również ryzyko zgonu spowodowane chorobą. Dodatkowo FRAX jest narzędziem bardziej uniwersalnym, ponieważ QFracture jest skalibrowane głównie pod populację Wielkiej Brytanii [45].

2.1.6. Genetyczne czynniki ryzyka osteoporozy

Genetyka osteoporozy stanowi jedno z największych wyzwań i jeden z najbardziej aktywnych obszarów badań w zakresie biologii kości. Wiadomo, że zmienność gęstości kości, a co za tym idzie, podatność na zachorowanie na osteoporozę jest determinowana przez ludzkie geny. Istnieje wiele polimorfizmów genetycznych potencjalnie przyczyniających się do rozwoju choroby. Do najintensywniej badanych należą: gen receptora witaminy D (VDR), gen receptora estrogenowego- α ($ER\alpha$), gen OPG, gen kolagenu typu I $\alpha 1$ (COLIA1) oraz gen LRP5 związany ze szlakiem sygnałowym Wnt/ β -katenina [46, 47, 48].

Osteoprotegeryna (OPG) jest członkiem rodziny receptorów TNF, który działa jako ważny parakryny regulator przebudowy kości — wydzielany przez osteoblasty wiąże się

z receptorem RANK, blokując jego łączenie z RANKL, hamując w ten sposób rozkład kostny. Kodowana jest przez TNFRSF11B, czyli kłaster genów o pojedynczej kopii zlokalizowany na ludzkim chromosomie 8q24.2. Wpływ na rozwój osteoporozy wykazano zarówno w badaniach na zwierzętach [49], jak i na ludziach [50]. Za najważniejsze polimorfizmy tego genu uznaje się rs3134069, rs2073617, rs2073618, jednak od lat prowadzone są dalsze badania dotyczące wpływu tych i innych polimorfizmów tego genu na rozwój osteoporozy u ludzi, co jest również głównym tematem tej rozprawy.

Gen VDR moduluje transkrypcję genów docelowych zaangażowanych w wychwytywanie wapnia lub tworzenie kości, w tym białka wiążącego wapń — osteokalcyny. Gen VDR znajduje się na chromosomie 12q13–14 i posiada co najmniej 11 eksonów. Warianty alleliczne genu kodującego VDR są rozpoznawane przez endonukleazy restrykcyjne BsmI (allele B/b), ApaI (allele A/a), FokI (allele F/f) and TaqI (allele T/t) [51, 52]. Polimorfizm genu VDR — BsmI, genotyp bb wykazywał największy wpływ na gęstość kości w porównaniu z resztą alleli. Wiązał się z większą szybkością wchłaniania wapnia w porównaniu z osobami o genotypie BB. Ponadto wykazano, że gęstość kości jest również większa u kobiet z genotypem VDR bb [53]. Genotyp BB, w porównaniu z bb, miał też wyższą wartość dla rozpoczęcia zwrotnego hamowania PTH inicjowanego przez stężenie witaminy D oraz bardziej aktywną resorpcję kości i rozpad kolagenu typu I [54]. Polimorfizm BsmI może wpływać na ekspresję genu VDR i zmieniać gęstość kości poprzez różne mechanizmy, w tym zaburzenie miejsca cięcia dla transkrypcji mRNA VDR i osłabienie stabilności tego mRNA [55]. Natomiast w polimorfizmie TaqI genotyp TT miał niższy wskaźnik utraty masy kości niż osoby z innymi genotypami [56]. FokI jest polimorfizmem niezależnym, a genotyp FF wiąże się z wyższą gęstością kości w szyjce kości udowej, kręgosłupa i biodra. Osoby z genotypem FF miały większe wartości absorpcji wapnia i masy kostnej niż osoby z genotypami Ff i ff [57].

Osteoporoza może być również spowodowana mutacjami w genie kolagenu I $\alpha 1$ (COL1A1) [58]. Gęstość kości była większa dla genotypu z allelami SS niż dla genotypów Ss i ss. Wykazano również, że utrata gęstości kości kręgosłupa lędźwiowego była większa u osób o genotypach ss i Ss niż w genotypie SS [59].

Szlak sygnalizacyjny Wnt/ β -katenina odgrywa kluczową rolę w regulacji homeostazy szkieletu, zwłaszcza w różnicowaniu osteoblastów i późniejszym tworzeniu kości [60]. Zostało to po raz pierwszy wykazane przez wykrycie mutacji wpływających na gen LRP5, kodujący receptor lipoprotein o niskiej gęstości [61]. Ponadto, powszechnie występujące polimorfizmy pojedynczego nukleotydu w LRP5 są wielokrotnie stwierdzane u osób z obniżoną masą kostną. Mutacje powodujące zwiększoną aktywację LRP5 powodują jednak fenotyp z wysoką masą

kostną, w wyniku zwiększonej sygnalizacji Wnt/ β -katenina, w której pośredniczy zmniejszone hamowanie przez dickkopf-1 (DKK1) i sklerostynę [62, 63].

Receptory estrogenowe (ER) odgrywają również ważną rolę w utrzymaniu masy kostnej i kontroli wzrostu szkieletu. Dwa funkcjonalne ER α i ER β , są kodowane przez różne geny, jednak mają podobną strukturę oraz podobne ligandy. Gen ER α zlokalizowany jest na chromosomie 6q25, składa się z ośmiu eksonów. Gen ER β zlokalizowany jest na chromosomie 14q23–24.1 [64]. Polimorfizm powtórzeń TA znajduje się w obrębie regionu promotora 1,174 eksonu 1, który wpływa na masę kostną poprzez zmianę produkcji lub stabilności mRNA prowadząc do zmian liczby receptorów ER. Powiązanie dwóch intronowych polimorfizmów PvuII i XbaI z masą kostną było szeroko badane. Genotypy XX i pp były związane z większą BMD, w porównaniu z genotypami xx i PP [65].

Większość polimorfizmów genetycznych związanych z osteoporozą dotyczy genów kodujących ważne szlaki metabolizmu kostnego, w tym m.in. transformującego czynnika wzrostu- β 1 (TGF- β 1), interleukiny-6 (IL-6), kalcytoniny oraz receptora kalcytoniny.

Gen TGF- β 1 ma siedem eksonów, z których eksony 5–7 kodują aktywny TGF- β 1. Badano polimorfizm 509 C \rightarrow T u kobiet po menopauzie i znaleziono związek z masą kostną kręgosłupa lędźwiowego i całego ciała [66]. Dowiedziono, że polimorfizm T \rightarrow C intronu 5 był związany z masą kostną szyjki kości udowej [67].

Aktywacja ekspresji cytokin w kości jest u kobiet po menopauzie jednym z czynników, prowadzącą do ich rozkładu. IL-6 to cytokina o plejotropowym działaniu, pośredniczy w utracie kości związanej z niedoborem estrogenów u pacjentek [68]. W kilku badaniach wykazano związek polimorfizmów genu IL-6 z gęstością kostną [69, 70].

Kalcytonina jest polipeptydowym hormonem wydzielanym przez tarczycę, jednym z jego działań jest hamowanie resorpcji kości. W badaniu przeprowadzonym u kobiet po menopauzie polimorfizm enzymu restrykcyjnego AluI genu receptora kalcytoniny był związany z gęstością kostną kręgosłupa [71].

2.2. Układ kostny — budowa ogólna i histologiczna

Szkielet dorosłego człowieka składa się z 206 kości. Kość jest aktywną metabolicznie tkanką łączną, która zapewnia mechaniczne podparcie organizmu, umożliwia ruch oraz przemieszczanie się poprzez zapewnienie dźwigni dla mięśni. Zapewnia również ochronę ważnych struktur i narządów, jest rezerwuarem minerałów, czynników wzrostu, towarzysząc w regulacji homeostazy mineralnej i kwasowo-zasadowej. Natomiast szpik kostny to miejsce zachodzenia procesu hematopoezy.

Tkanka kostna ulega nieustannym przemianom, co jest przystosowaniem do ciągłych zmian nacisku na poszczególne kości przez zmieniającą się w ciągu życia postawę, masę ciała oraz przez nieuniknione powstawanie mikrourazów i uszkodzeń. Jest to proces, w którym biorą udział osteoblasty, czyli komórki odpowiedzialne za kościotworzenie oraz osteoklasty, których zadaniem jest resorpcja kośćca. Dlatego każde zachwianie balansu między aktywnością tych komórek prowadzi do nieuniknionych problemów zdrowotnych. Osteoporoza jest przykładem patologicznego procesu, w którym rozkład kości przebiega szybciej niż możliwa jest jej odbudowa.

Ogólna struktura kości składa się z jamy szpikowej otoczonej tkanką kostną i okostną. Pod względem histologicznym kość składa się z dwóch tkanek: tkanki drobnowłóknistej i grubowłóknistej. Tkanka grubowłóknista tworzy szkielet embrionalny i ostatecznie ulega resorpcji i jest zastępowana przez tkankę drobnowłóknistą. Rzadko utrzymuje się w szkielecie dorosłego człowieka, tworzy się w płytkach wzrostowych i we wczesnych etapach rozwoju kośćca, ale występuje także w miejscach przyczepu ścięgien do kości. Składa się z wielu grubych i nieregularnych pęczków włókien kolagenowych, co czyni ją elastyczną, ale stosunkowo słabą. Posiada duże ilości osteocytów i osteoidu.

Tkanka drobnowłóknista jest wysoce zorganizowana. Charakteryzuje się ściśle upakowanymi włóknami kolagenowymi tworzącymi blaszki. Jest to tkanka z równomiernym rozmieszczeniem osteocytów i macierzy kostnej. Tkanka drobnowłóknista całkowicie zastępuje tkankę grubowłóknistą w czasie wzrostu i w późniejszym etapie gojenia się złamań. Ze względu na swoją organizację, kość drobnowłóknista jest sztywna i mocna.

Dwa główne typy strukturalne tkanki drobnowłóknistej to istota zbita i istota gąbczasta. Chociaż oba rodzaje mają taki sam skład macierzy, różnią się znacząco pod trzema ważnymi względami: gęstością, trójwymiarową strukturą i aktywnością metaboliczną. Szkielet dojrzałej osoby dorosłej składa się w 80% masy z istoty zbitej, która zapewnia odporność na skręcanie, zginanie i nadaje kości wytrzymałość na ściskanie. Zbudowana jest ze ściśle ułożonych osteonów zawierających w środku naczynie krwionośne i nerw, jest to tzw. system Harvesa. Istota zbita tworzy trzony kości długich, a także zewnętrzną warstwę nasad i pozostałych kości.

Istota gąbczasta, stanowi tylko 20% masy szkieletu dorosłego człowieka i ma znacznie większą powierzchnię względem objętości. Składa się z blaszek kostnych tworzących beleczki, pomiędzy którymi znajduje się szpik kostny z naczyniami krwionośnymi. Charakteryzuje się również większą aktywnością metaboliczną i remodelingu, szybciej reaguje na bodźce mechaniczne, ponieważ komórki kostne znajdują się na jej powierzchni w bliskiej odległości

do krążących czynników wzrostu i cytokin. Podstawową funkcją mechaniczną istoty gąbczastej, dzięki jej elastyczności, jest umożliwianie lekkich odkształceń oraz absorpcja obciążeń. Jest zlokalizowana u nasady kości długich [3].

2.2.1. Układ kostny — skład komórkowy i macierz kostna

Komórki kostne stanowią około 10% całkowitej objętości kości. Powstają z dwóch linii komórkowych: komórek osteoprogenitorowych z komórek macierzystych mezenchymatycznych, które różnicują się w osteoblasty i osteocyty oraz osteoklasty, które są pochodzenia hematopoetycznego.

Komórki osteoprogenitorowe, przechodzące w komórki kościotwórcze, rezydują w kanałach kostnych, śródkostnej, okostnej i szpiku. Mogą one również być dostarczane przez perycyty naczyniowe. Osteoprogenitory pozostają niezróżnicowane, dopóki nie otrzymają sygnałów do migracji do danego miejsca, proliferacji i różnicowania się w osteoblasty. Występują częściej w rozwijających się kościach, gdzie aktywują etapy przebudowy kości. Z wiekiem organizm traci zdolność do syntezy a co z tym idzie, wykorzystywania większej ilości komórek osteoprogenitorowych. Dysfunkcja komórek osteoprogenitorowych może opóźniać kostnienie i prowadzić do spektrum chorób, takich jak np. karłowatość [72].

Osteoblasty znajdują się powierzchniach kości, są komórkami tworzącymi kość, uczestniczą także w procesie remodelingu. Syntetyzują i wydzielają osteoid, czyli organiczną macierz kostną, w której odkładają się następnie kryształy fosforanów wapnia. Podczas tworzenia kości, dojrzałe osteoblasty syntetyzują i wydzielają kolagen typu I, który stanowi największą część osteoidu oraz różne białka niekolagenowe, takie jak np. osteokalcyna, osteopontyna i sialoproteina kostna, pełniące różne istotne funkcje, w tym regulacja obrotu kostnego, kontrola odkładania minerałów kostnych oraz regulacja aktywności komórek kostnych [73]. Markerem aktywności osteoblastów jest fosfataza alkaliczna [74].

Osteoblasty syntetyzują również insulinopodobny czynnik wzrostu I (IGF-I), interleukinę-1 (IL-1), które kontrolują metabolizm komórek kostnych. Wykazano, że IGF-I wydzielany z osteoblastów w tkance kostnej jest silnym czynnikiem chemotaktycznym, który może odgrywać główną rolę w rekrutacji kolejnych osteoblastów podczas tworzenia kości [75]. Wykazano, że IL-1 może wpływać na proliferację i syntezę kolagenu, osteokalcyny oraz produkcję fosfatazy alkalicznej [76]. Osteoblasty wykazują ekspresję receptorów dla różnych hormonów w tym estrogenów, kalcytriolu (aktywna postać witaminy D), parathormonu i glikokortykoidów, które są zaangażowane w regulacji różnicowania i aktywności osteoblastów [77, 78].

Osteocyty to ostatecznie zróżnicowane komórki linii osteoblastów, stanowią około 90% wszystkich komórek kości. W miarę dojrzewania osteoblastów, około 20% z nich zostaje otoczonych macierzą zewnątrzkomórkową tworząc osteoid. Komórki znajdujące się w osteoidzie określane są jako osteocyty. W miarę dojrzewania komórek osteoid ulega mineralizacji [79]. W wyniku tego procesu powstaje grupa osteocytów, silnie ze sobą połączonych długimi wyrostkami komórkowymi. Lokalizacja osteocytów w obrębie macierzy nadaje im zdolność do wyczuwania naprężeń wywieranych na kość i odpowiedniego reagowania. Osteocyt reaguje na obciążenie mechaniczne poprzez wysyłanie sygnałów do osteoblastów i osteoklastów na powierzchni kości i modulowanie ich aktywności [80].

Osteoklasty to duże, wielojądrowe komórki, które rezydują w płytkich zagłębieniach na powierzchni kości, zwanych zatokami resorpcyjnymi, albo lukami Howshipa. Wywodzą się z linii komórek hematopoetycznych — monocytofagowych, z których powstają również komórki dendrytyczne [81]. Osteoklasty są komórkami rozkładającymi kości. Łączą się z macierzą kostną, a następnie ją rozpuszczają poprzez zakwaszenie, umożliwiając dalszą fagocytozę macierzy. Znanych jest wiele czynników i cytokin regulujących powstawanie i aktywność osteoklastów, w tym aktywator receptora NF- κ B ligand (RANKL), osteoprotegeryna (OPG), interleukina-1, interleukina-6, czynnik stymulujący kolonie makrofagów (GM-CSF), hormony przynależące do przynależności, aktywna forma witaminy D i kalcytonina [82].

Macierz kostna stanowi 90 procent całkowitej objętości kości. Składa się z czterech głównych składników: części mineralnej (65%), macierzy organicznej (20%), oraz lipidów i wody (15%). Nieorganiczna macierz kostna odpowiada za 99% magazynowania przez organizm wapnia, 85% fosforu oraz 40 do 60% zapasów magnezu i sodu.

Matryca nieorganiczna występuje głównie w postaci hydroksyapatytu i zapewnia kości sztywność, wytrzymałość i odporność na ściskanie. Usunięcie macierzy nieorganicznej sprawia, że kość staje się miękka, plastyczna i gąbczasta — przykładem jest osteomalacja lub krzywica wtórna do niedoboru witaminy D [83].

Macierz organiczna, wydzielana przez osteoblasty, składa się przede wszystkim z kolagenu typu I (90%), ale także z proteoglikanów, glikoprotein i czynników wzrostu, do których należą m.in. białka morfogenetyczne kości, interleukina-1, interleukina-6, osteokalcyna, osteonektyna i sialoproteina kostna. Wszystkie te czynniki odgrywają ważną rolę w osteogenezie, mineralizacji i przebudowie kości [84]. Część organiczna macierzy kostnej nadaje kościom formę i zapewnia odporność na rozciąganie.

2.2.2. Układ kostny — proces modelowania i przebudowy strukturalnej

Tkanka kostna jest stale poddawana modyfikacjom swojego kształtu przez procesy przebudowy, tzw. remodelingu oraz modelowania strukturalnego. Modeling kości rozpoczyna się wraz z rozwojem szkieletu i jest najbardziej aktywny do 20 r.ż., remodeling natomiast trwa przez całe życie. Tabela 4. przedstawia porównanie obu procesów.

Modelowanie kości jest definiowane jako uzyskiwanie przez kość odpowiedniego kształtu na danej powierzchni, poprzez kościotworzenie przez osteoblasty lub resorpcję przez osteoklasty. Podstawową funkcją modelowania jest zwiększenie masy kostnej i zmiana lub utrzymanie dotychczasowego kształtu kości. Modelowanie zawsze odbywa się na istniejącej wcześniej tkance, dlatego też początkowe etapy tworzenia kości nie są uważane za modeling. Proces modelowania przebiega w dwóch etapach: aktywacji i albo tworzenia, albo resorpcji. Aktywacja polega na rekrutacji komórek prekursorowych, które różnicują się w dojrzałe osteoblasty lub osteoklasty. Dodatkowo, komórki wyściełające kość mogą być stymulowane do różnicowania się w dojrzałe, aktywne osteoblasty, które zaczynają produkować macierz. Po aktywacji odpowiednich komórek zachodzą procesy tworzenia lub resorpcji, aż do momentu gdy zostanie dodana lub usunięta wystarczająca ilość masy kostnej. Proces modelowania kości jest najbardziej aktywny w młodości, podczas wzrostu i rozwoju organizmu i służy przede wszystkim do zmiany kształtu kości lub zmiany położenia jej kory w stosunku do osi centralnej. Szkielet dorosłego człowieka również ulega modelowaniu, ale przy braku patologii jest ono mniej widoczne [85].

Cykl przebudowy kości, czyli remodelingu, składa się z pięciu etapów: aktywacji, resorpcji, odwrócenia, mineralizacji i fazy spoczynku. Stanowi to kontrast do modelingu kości, w którym osteoblasty i osteoklasty są aktywne równocześnie. Podczas fizjologicznej przebudowy kości objętość kości nie ulega zmianie.

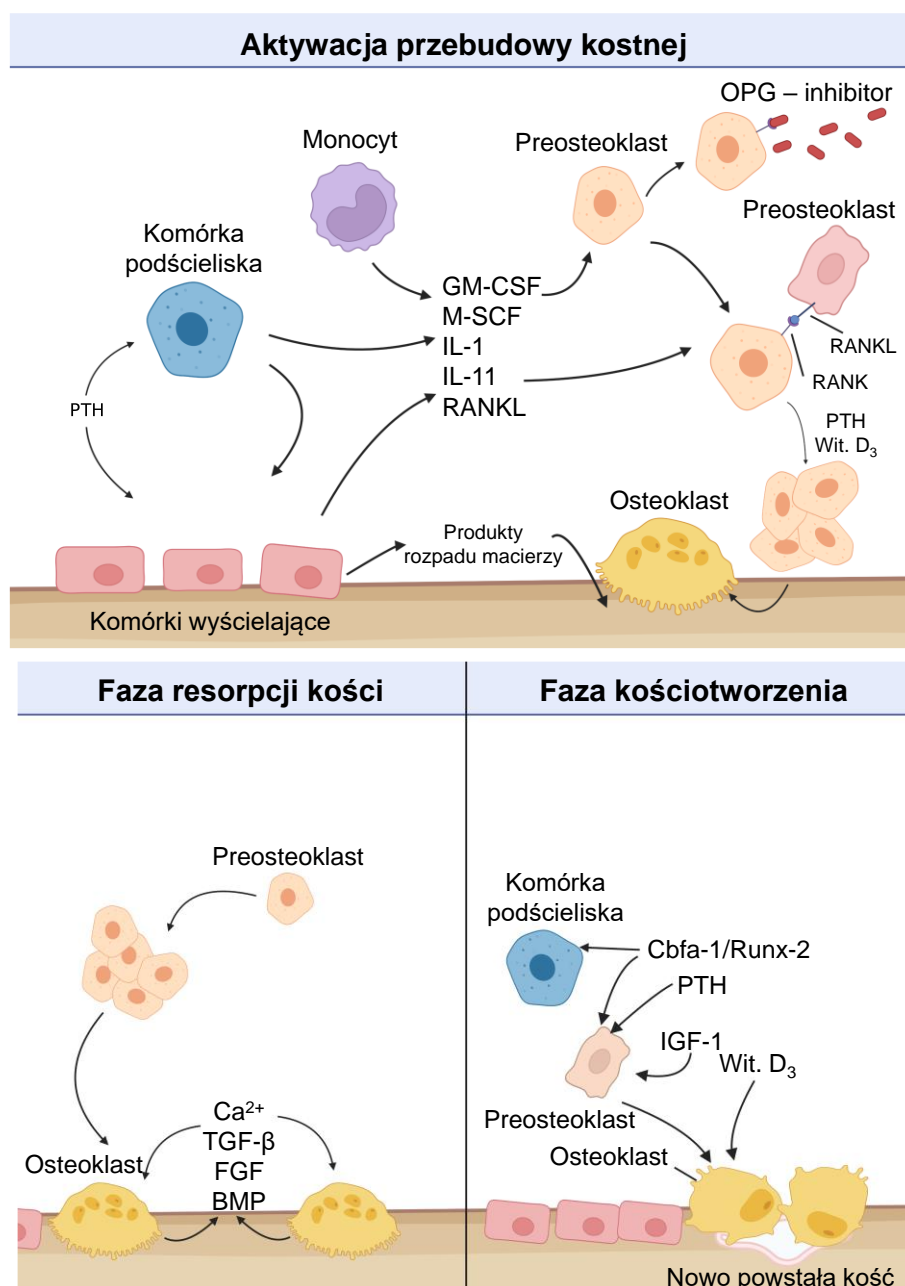
Aktywacja jest pierwszym etapem przebudowy kości. Sygnał inicjujący przebudowę jest wykrywany przez kość w fazie spoczynku. Sygnał ten może mieć charakter hormonalny (PTH lub estrogeny) lub być odpowiedzią na ogólnoustrojowe zmiany homeostazy. Mechaniczne obciążenie i mikrouszkodzenia szkieletu, wyzwalają również sygnały biologiczne, które są wykrywane przez osteocyty [86]. Po odebraniu sygnału komórki wyściełające kości cofają się, błona śródkostna jest trawiona przez kolagenazę, a prekursorzy osteoklastów (monocyty) aktywowane. Faza aktywacji trwa około kilkunastu dni, po czym przechodzi do fazy resorpcji kości. Osteoklasty migrują i przyczepiają się do powierzchni kości tworząc tzw. zatokę erozyjną, inicjując tym samym resorpcję macierzy kostnej poprzez wydzielanie jonów wodorowych, obniżając pH nawet do 4,5 oraz enzymów takich jak metaloproteinaza, czy katepsyna, trawiąc tym samym białka z których składa się macierz oraz uwalniając z niej jony wapnia. Jest to faza resorpcji, która trwa około 4–5 tygodni. Skutkuje

powstawaniem ubytków na powierzchni kostnej, nazywanymi lukami Howshipa. Osteoklasty następnie ulegają apoptozie kończąc fazę resorpcji [87].

Po resorpcji następuje faza odwrócenia. W ciągu kilku miesięcy do ubytków kostnych pozostałych po osteoklastach trafiają różne komórki, w tym monocyty, osteocyty i osteoblasty. Produkują one osteoid, wypełniając luki białkami macierzy kostnej, głównie kolagenem typu I. W miarę stopniowej mineralizacji macierz tworzy nową kość. Osteoblasty kontynuują kościotworzenie, dopóki nie przekształcą się w komórki podścieliska w stanie spoczynku, które całkowicie pokrywają nowo powstałą powierzchnię kości. Część osteoblastów zostaje zatopiona w nowo utworzonej macierzy kostnej, stając się osteocytami z rozbudowaną siecią kanalików łączących je z komórkami wyściełającymi powierzchnię kości, osteoblastami i innymi osteocytami. Po zakończeniu procesu tworzenia kości, od 50% do 70% osteoblastów ulega apoptozie, a reszta staje się osteocytami lub komórkami podścieliska kości. Komórki podścieliska zachowują zdolność do przeobrażenia się w osteoblasty pod wpływem odpowiednich bodźców, a także regulują wymianę jonów mineralnych do i z płynu zewnątrzkomórkowego kości [88]. Ostatnią fazą jest proces mineralizacji, który rozpoczyna się około 30 dni po utworzeniu osteoidu. W kości gąbczastej proces ten kończy się 90 dni po odłożeniu osteoidu, natomiast w kości zwartej kończy się po 130 dniach. Mineralna zawartość kości składa się głównie z kryształów hydroksyapatytu $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ oraz mniejszych ilości węglanów, cytrynianu sodu i magnezu oraz śladowych ilości innych pierwiastków. Zawartość minerałów w kości zapewnia sztywność mechaniczną i wytrzymałość na obciążenia, podczas gdy matryca organiczna nadaje kości elastyczność i sprężystość. Proces mineralizacji jest regulowany przez kinazy fosfoproteinowe i fosfatazę alkaliczną. Po mineralizacji, kość wchodzi w fazę spoczynku, a ilość utworzonej kości jest równa ilości zresorbowanej [89]. Rycina 2 przedstawia proces obrotu kostnego. Created with BioRender.com.

Tabela 4. Porównanie procesu remodelingu i modelowania strukturalnego kości

	Przebudowa	Modeling
Cel	Odnowienie kości	Kształtowanie i zwiększenie masy kostnej
Mechanizm	Aktywacja, resorpcja, odwrócenie, mineralizacja	Aktywacja — resorpcja lub aktywacja — formowanie
Komórki biorące udział	Osteoklasty, osteoblasty i ich prekursorzy	Osteoklasty lub osteoblasty i ich prekursorzy
Wpływ na masę kostną	Utrzymanie lub lekki spadek	Wzrost
Ramy czasowe	Całe życie	Głównie dzieciństwo



Rycina 2. Regulacja przebudowy kości wg. [90].

Stworzone w BioRender.com.

Osteoporoza pomenopauzalna charakteryzuje się zwiększoną aktywnością procesu przebudowy — tzn. w szkieletach osób cierpiących na tę chorobę zwiększa się ilość rozkładanej kości względem tworzenia nowej tkanki, czego wskaźnikiem są markery obrotu kostnego, takie jak np. osteokalcyna. Zwiększa się zarówno ilość osteoblastów jak i osteoklastów, jednak przez zwiększoną częstotliwość aktywacji remodelingu i zmniejszoną zdolność osteoblastów do kościotworzenia, masa kostna ulega zmniejszeniu, co przyczynia się do zmniejszenia wytrzymałości a w efekcie podatności na złamania kości [91].

2.3. Odkrycie kompleksu OPG/RANK/RANKL

Nieustannie od lat prowadzone są liczne badania dotyczące mechanizmu metabolizmu kostnego. Poznanie tych mechanizmów jest niezbędne do stworzenia nowych metod leczenia pacjentów z chorobami kości. W tym kontekście koniec XX wieku był przełomowy, gdyż udało się w tym okresie wyodrębnić trzy najważniejsze cząsteczki biorące udział w kontroli absorpcji kostnej. Odkrycie szlaku sygnalizacyjnego OPG/RANKL/RANK umożliwiło zrozumienie mechanizmu powstawania ubytków masy kostnej, a w następstwie pozwoliło rozpocząć intensywne badania nad metodami ich leczenia.

OPG zostało odkryte niespodziewanie w 1997 roku podczas badań mających na celu identyfikację cząsteczek związanych z czynnikiem martwicy nowotworów (TNF) o możliwej użyteczności terapeutycznej [82]. Niezależnie od siebie, badacze z Japonii poinformowali o swoim odkryciu identycznej cząsteczki, stosując metodę, polegającą na oczyszczeniu czynnika hamującego osteoklastogenezę z ludzkich fibroblastów embrionalnych. Uzyskali oni częściową sekwencję białka, a następnie sklonowali cDNA dla OPG [92]. Wykorzystując następnie OPG jako swego rodzaju sondę, obie grupy szybko zidentyfikowały jego ligand, który okazał się identyczny z innym członkiem rodziny ligandów TNF, który rok wcześniej został zidentyfikowany jako RANKL. Wkrótce po zidentyfikowaniu liganda, podczas sekwencjonowania cDNA z mieloidalnych komórek z ludzkiego szpiku kostnego, zidentyfikowano jego receptor — RANK [93].

2.3.1. Osteoprotegeryna

Osteoprotegeryna (OPG) jest receptorem cytokinowym należącym do grupy TNF, jednak w odróżnieniu od innych TNF nie posiada hydrofobowej domeny transmembranowej, dlatego jest wydzielana przez komórki jako rozpuszczalne białko. Pojawia się w literaturze po raz pierwszy pod koniec lat 90. XX wieku [94]. Jej nazwa pochodzi od funkcji — ochrony kości (łac: „*os*” — kość i „*protegere*” — chronić). OPG znana jest również jako czynnik hamujący osteoklastogenezę (OCIF) lub TNFRS1 1B, FDRC1 lub TR1. Ligandami OPG są RANKL i związany z czynnikiem martwicy nowotworu ligand aktywujący apoptozę (ang. TRAIL) [95]. Jej zdolność do hamowania wzrostu osteoklastów została potwierdzona zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* [6].

Gen kodujący OPG składa się z pięciu eksonów i znajduje się na długim ramieniu ósmego chromosomu. Osteoprotegeryna syntetyzowana jest jako propeptyd, z którego wyodrębniany jest krótki peptyd sygnałowy, tworząc dojrzałe 380 aminokwasowe homodime-

ryczne białko, które zawiera siedem domen: cztery bogate w cysteinę domeny N-końcowe (1–4), dwa regiony związane z apoptozą (5, 6) oraz C-końcowy region wiążący heparynę oraz C-końcową domenę wiążącą heparynę (7) [96]. Domeny 1–4 są strukturalnie związane z rodziną receptorów TNF i są wystarczające do zniesienia różnicowania osteoklastów. Natomiast domeny 5 i 6 mogą pośredniczyć w przekazywaniu sygnału cytotoksycznego, gdy są włączone do chimerycznego białka OPG-Fas, jednak ich funkcje fizjologiczne pozostają niejasne. Ostatnia domena posiada miejsce wiążące heparynę. Podobne domeny wiążące heparynę zaobserwowano w strukturze wielu innych białek, jak np. czynników wzrostu fibroblastów i ich receptorów, w których pełni ona liczne kluczowe funkcje (aktywacja, autofosforylacja, itp.) [97].

OPG oprócz osteoblastów, ulega ekspresji również w wielu innych tkankach: w sercu, nerkach, wątrobie, śledzionie i szpiku kostnym, a jej ekspresja jest regulowana przez większość czynników indukujących ekspresję RANKL przez osteoblasty. OPG chroni też duże naczynia krwionośne przed zwapnieniem, co wywnioskowano na podstawie obserwacji zwapnień nerek i aorty występujących u myszy pozbawionych OPG [49].

Osteoprotegeryna jest kluczowym regulatorem remodelingu tkanki kostnej. Chroni kości przed nadmierną resorpcją poprzez hamowanie końcowych etapów osteoklastogenezy, tłumienie aktywacji dojrzałych osteoklastów i dalszej indukcji ich apoptozy [98]. Zarówno OPG, jak i RANK są receptorami wykazującymi powinowactwo do tego samego liganda — RANKL. OPG jest antagonistycznym receptorem endogennym i po związaniu się z RANKL hamuje osteoklastogenezę, hamując sam proces resorpcji kości [99]. Potwierdzeniem tego może być fakt, że u transgenicznym myszy, u których usunięto gen OPG, szybko pojawiła się ciężka osteoporoza, obserwowano u nich spontaniczne złamania spowodowane nadmiernym tworzeniem kompleksu RANKL-RANK [92].

2.3.2. RANKL

Odkrycie liganda receptora aktywatora jądrowego czynnika κ B i jego receptora RANK zbiegło się mniej więcej w czasie z odkryciem OPG [100]. RANKL (znany również w literaturze jako OPGL, ODF i TRANCE), jest białkiem produkowanym przez osteoblasty i niektóre inne komórki, jak komórki zrębu, komórki synowialne, szpik kostny, aktywowane komórki T, komórki B, fibroblasty, komórki śródbłonna, chondrocyty oraz komórki nabłonka sutka. Ulega wysokiej ekspresji w obwodowych węzłach chłonnych i szpiku kostnym, grasicy, śledzionie, płamach Peyera, mózgu, sercu, skórze, mięśniach szkieletowych, nerkach, wątrobie, płucach i tkance sutkowej [101]. Jest ligandem dla RANK. Zadaniem RANKL jest stymulacja

różnicowania preosteoklastów, następnie promocja przylegania osteoklastów do tkanki kostnej a następnie ich aktywacja [4]. Ponadto cytokina ta uczestniczy również w tworzeniu gruczołów sutkowych i mieszków włosowych, regulacji temperatury ciała, metabolizmie mięśniowym, rozwoju nowotworów oraz ma znaczący udział w układzie odpornościowym organizmu [102].

Ludzki gen RANKL zlokalizowany jest na chromosomie 13 (13q14.11) i koduje glikoproteinę o długości 317 aminokwasów. Ekspresja RANKL jest regulowana wielopoziomowo. Czynniki wzrostu, peptydy, cytokiny oraz hormony mają wpływ na transkrypcję oraz translację tej cytokiny [103]. RANKL jest białkiem transmembranowym typu II z domeną zewnątrzkomórkową na C-końcu, która rozszczepiana jest przez enzymy takie jak metaloproteinazy macierzy i uwalniana do środowiska pozakomórkowego jako rozpuszczalny RANKL. Zarówno RANKL związany z błoną, jak i rozpuszczalny wiążą się z RANK, ale ten pierwszy wydaje się być obecnie bardziej istotny funkcjonalnie [104].

Interakcja RANKL i RANK jest kluczowym etapem w aktywacji osteoklastów. Po związaniu RANKL z RANK następuje rekrutacja czynnika związanego z receptorem TNF (TRAF). Choć kilka z tych białek (1–6) jest zaangażowanych w ścieżkę sygnalizacji RANK, TRAF-6 wydaje się być kluczowym białkiem dla sygnalizacji RANKL w osteoklastach [105]. Uważa się, że białka TRAF aktywują kilka innych szlaków sygnałowych, z których jeden obejmuje czynnik transkrypcyjny jądrowy kappa B (NF- κ B) i c-Jun. Aktywowany NF- κ B zwiększa ekspresję c-fos, który następnie oddziałuje z czynnikiem jądrowym aktywowanych komórek T (NFAT-c1), aby indukować transkrypcję genów osteoklastycznych. Krytyczna rola NFAT-c1 w pośredniczeniu w osteoklastogenezie doprowadziła do opisanego go jako kluczowego regulatora tego procesu. Inne szlaki sygnałowe pośredniczą w aktywacji i przeżyciu osteoklastów poprzez inne białka, takie jak Src, kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym, kinaza ERK, c-Jun N-terminalna kinaza (JNK), p38 i inhibitor kinazy NF- κ B (IKK) [106].

Zidentyfikowano również inne białka adaptorowe, np. białko wiążące receptor czynnika wzrostu-2, które również odgrywają ważną rolę w indukowanej przez RANKL osteoklastogenezie [107].

RANKL odgrywa ważną rolę na różnych etapach funkcjonowania i różnicowania osteoklastów. Wpływa na fuzję prekursorów osteoklastów w celu utworzenia komórek wielojądrzastych, różnicowanie do dojrzałych osteoklastów, adhezję osteoklastów do kości oraz aktywację resorpcji kości [4]. RANKL hamuje również apoptozę osteoklastów, prowadząc do przeżycia tych komórek [108]. Dominującą rolę RANKL w osteoklastogenezie wykazano u myszy z niedoborem genu *TNFSF11*. Myszy te chorowały na osteopetrozę spowodowaną

nadmiernym tworzeniem kości z powodu braku osteoklastów [109]. Kilka cytokin i hormonów reguluje poziomy RANKL, a zatem może kierować przebudową kości, w tym IL-1, IL-7, IL-17, TNF- α , parathormon (PTH), peptyd pokrewny PTH (PTHrP), glukokortykoidy, hormon wzrostu i witamina D hamują aktywność osteoklastów. Estrogeny, interferon G, transformujący czynnik wzrostu b (TGF-b) oraz IL-13 mają tendencję do hamowania osteoklastogenezy [110].

Zaburzenie równowagi RANKL/OPG na korzyść RANKL prowadzi do nasilenia osteoklastogenezy i w konsekwencji do zwiększenia utraty kości i osteoporozy. Innym ważnym czynnikiem ryzyka osteoporozy, szczególnie postaci pomenopauzalnej, jest niedobór estrogenów. Ochronnym wpływem estrogenów na kości jest wtórne zmniejszenie liczby osteoklastów przez zwiększenie częstotliwości apoptozy tych komórek oraz zmniejszenie zdolności osteoklastów do resorpcji kości [111]. Po odkryciu szlaku sygnalizacyjnego RANKL/RANK/OPG nastąpiły próby określenia jego związku z poziomem estrogenów i tym samym wyjaśnieniem jego roli w patogenezie osteoporozy pomenopauzalnej. Pierwsze dowody na istnienie związku pomiędzy estrogenami a poziomem RANKL w surowicy pochodziły z modeli zwierzęcych, w których u szczurów poddanych owariektomii stwierdzono podwyższony poziom RANKL [112]. Natomiast w badaniu z 2003 roku porównano poziom RANKL w szpiku kostnym pomiędzy kobietami przed menopauzą, nieleczonymi kobietami po menopauzie i kobietami po menopauzie na estrogenowej terapii zastępczej. Poziom RANKL był szacowany na 2–3 wyższy u kobiet po menopauzie z niedoborem estrogenów w porównaniu do pozostałych dwóch grup. Natomiast pomiędzy kobietami przed- i pomenopauzalnymi na terapii estrogenowej poziomy tej cytokiny były na podobnym poziomie. Ponadto, zwiększona ekspresja RANKL w szpiku kostnym bezpośrednio korelowała z podwyższonymi markerami resorpcji kości. Zauważono również, że komórki T wydają się mieć znaczący wpływ na poziom RANKL w szpiku kostnym, zatem wzrost RANKL w komórkach szpiku kostnego może być kluczową determinantą zwiększonej resorpcji kości indukowanej przez niedobór estrogenów [113].

Niedobór estrogenów powoduje również zwiększoną osteoklastogenezę wtórną do zwiększonej produkcji TNF-a i RANKL. Porównano liczbę osteoklastów, aktywność osteoklastów oraz poziomy TNF-a i RANKL w surowicy krwi pomiędzy pacjentkami z osteoporozą pomenopauzalną, a zdrowymi kobietami przed menopauzą. Hodowle niestymulowanych komórek jednojądrowych krwi obwodowej od pacjentek z osteoporozą pomenopauzalną produkowały więcej osteoklastów, a także wykazywały większą aktywność w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej. Poziomy RANKL i TNF były znacząco wyższe w populacji osteoporotycznej po menopauzie w porównaniu z grupą kontrolną [114].

2.3.3. RANK

Ludzki RANK jest homotrimerycznym peptydem, składającym się z 616 aminokwasów, N-końcowej domeny zewnątrzkomórkowej i dużej C-końcowej domeny cytoplazmatycznej, jak również 28-aminokwasowego peptydu sygnalizacyjnego i 21-aminokwasowej, krótkiej domeny transmembranowej [93]. RANK jest przede wszystkim ulega ekspresji w komórkach linii makrofagów/monocytów, w tym komórkach preosteoklastycznych, komórkach T i B, komórkach dendrytycznych i fibroblastach [5]. Oprócz tego ulega ekspresji w gruczołach sutkowych oraz niektórych komórkach nowotworowych, w tym raka piersi i prostaty [115, 116], są to dwa nowotwory o dużym potencjale przerzutowym do kości. Badanie przeprowadzone przez J Li et al. [4] wykazało, że myszy, u których usunięto gen RANK rozwinęły osteopetrozę i brak u nich było dojrzałych osteoklastów. Po odkryciu ligandu i jego receptora sygnalizacja RANKL/RANK została poddana intensywnym badaniom.

2.3.4. Kolejny receptor dla RANKL — LGR4

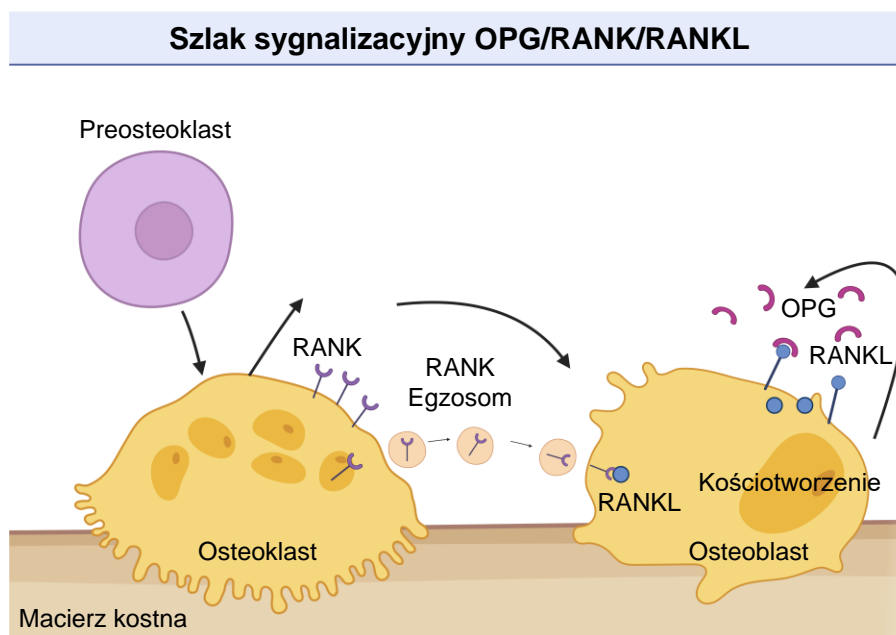
W 2016 roku odkryto kolejny receptor dla RANKL — LGR4, zwanym również receptorem sprzężonym z białkiem G (GPR) [117]. Receptor ten przeciwdziała osteoklastogenezie napędzanej przez RANKL, a także aktywuje szlak Wnt/ β -katenina [118]. Wpływa na tworzenie kości, ale może też niekorzystnie promować kalcyfikację naczyń krwionośnych. W badaniu na myszach usunięcie genu dla LGR4 spowodowało zwiększoną utratę masy kostnej i wzrost aktywności osteoklastów mierzony ich specyficznym markerem TRAP. Po związaniu RANKL, LGR4 aktywuje sygnalizację z udziałem białka G α q, aby ustabilizować beta kinazę syntazy glikogenu-3 (GSK3 β) i zapobiec jej fosforylacji skutkującej inaktywacją. GSK3 β to inhibitor różnicowania osteoklastów [119].

LGR4 bierze udział również na etapie kościotworzenia poprzez aktywację dojrzewania osteoblastów i ich mineralizację. Myszy pozbawione genu dla LGR4 rozwijały nieprawidłowości budowy kości w okresie embrionalnym i postnatalnym, występowało u nich również z opóźnienie w różnicowaniu i mineralizacji osteoblastów, zmniejszenie tworzenia osteoidu i wzrost aktywności osteoklastów [120]. Odkryto, że również u ludzi mutacja LGR4 jest silnie związana z niską gęstością mineralną kości i złamaniami osteoporotycznymi [121].

Jednak ze względu na relatywnie niedawne odkrycie, dokładny mechanizm działania, wszystkie funkcje oraz ich potencjał do wykorzystania klinicznego nie jest jeszcze poznany.

2.3.5. Szlak sygnalizacyjny OPG/RANK/RANKL

Szlak RANKL/RANK/OPG jest znany przede wszystkim ze swojej roli w dojrzewaniu osteoklastów, modelowaniu kości i ich remodelingu. Aktywator receptora NF- κ B (RANK), ligand aktywatora receptora NF- κ B (RANKL) i osteoprotegeryna (OPG) są głównymi składnikami tego systemu sygnalizacji. Prekursory osteoklastów wykazują ekspresję RANK, przez co rozpoznają RANKL wyrażony przez osteoblasty poprzez interakcję komórkową i różnicują się w osteoklasty w obecności M-CSF [122]. Osteoprotegeryna jest rozpuszczalnym receptorem dla RANKL, produkowanym głównie przez osteoblasty, który zapobiega tworzeniu osteoklastów i osteoklastycznej resorpcji kości poprzez hamowanie interakcji RANKL-RANK. Dojrzałe osteoklasty również wykazują ekspresję RANK, a RANKL zarówno wspiera przeżycie, jak i prowadzi do zwiększenia masy kostnej poprzez zapobieganie osteoklastycznej resorpcji kości. Proces ten przedstawiono na rycinie 3. W związku z tym, OPG i rozpuszczalny RANK były badane jako potencjalne cele terapeutyczne, a przeciwciało przeciwko ludzkiemu RANKL o nazwie denosumab jest stosowany w warunkach klinicznych w leczeniu osteoporozy i zaburzeń kostnych związanych z nowotworami [123].



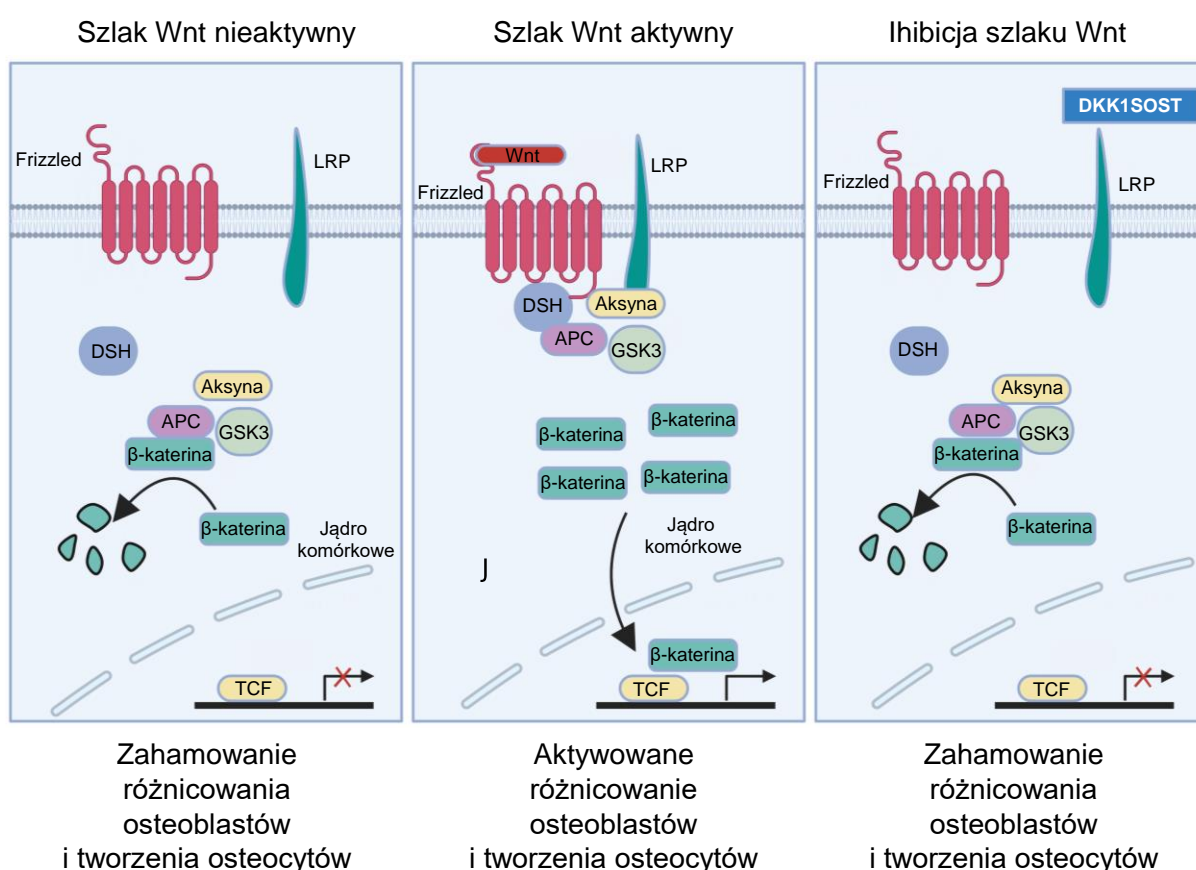
Rycina 3. Szlak sygnalizacyjny OPG/RANK/RANKL wg. [124]

Stworzone w BioRender.com

2.3.6. Szlak sygnalizacyjny Wnt/ β -katenina

Wnt/ β -katenina jest wewnątrzkomórkowym szlakiem sygnałowym, który odgrywa kluczową rolę w tworzeniu kości, regulując aktywność osteoblastów. Gdy szlak Wnt/ β -kate-

nina jest aktywowany, dochodzi do formowania kości, natomiast gdy jest hamowany, tworzenie kości zostaje zatrzymane [125]. Aktywacja szlaku Wnt/ β -katenina rozpoczyna się kiedy ligand Wnt wiąże się ze swoimi receptorami — Frizzled i białkiem związanym z receptorem lipoprotein o niskiej gęstości (LRP)5/6, inaktywując kinazę syntazy glikogenu 3 (GSK3) oraz stabilizując β -kateninę w cytoplazmie, powodując translokację β -kateniny do jądra a w następnym etapie inicjację transkrypcji genów kościotwórczych i regulowanie różnicowania preosteoblastów poprzez czynnik transkrypcyjny 2 (Runx2). W przypadku braku liganda Wnt, β -katenina jest fosforylowana przez GSK3, co prowadzi do jej zniszczenia unikając jej translokacji do jądra oraz dyferencjacji osteoblastów i tworzenia osteocytów. Inhibitorami szlaku Wnt/ β -katenina są m.in. Dickkopf1 (Dkk1) i sklerostyna, które wiążą się z receptorem LRP5/6 umożliwiając jego internalizację do cytoplazmy, oraz białka związane z Frizzled, które są w stanie blokować szlak Wnt/ β -katenina, hamując i zmniejszając odpowiednio różnicowanie i przeżywalność osteoblastów [126, 127]. Proces ten przedstawiony jest na rycinie 4.



Rycina 4. Szlak Wnt/ β -katenina wg. [128].

Stworzone w BioRender.com.

2.4. Osteoporoza postmenopauzalna

Kobiety po menopauzie charakteryzują się zwiększoną jednoczesną resorpcją i tworzeniem kości na poziomie tkankowym, co określa się mianem wysokiego obrotu kostnego. Jednak na poziomie komórkowym, resorpcja kości przewyższa ich tworzenie. Na podstawie biochemicznych markerów metabolizmu kostnego, pomenopauzalna resorpcja zwiększa się o 90%, podczas gdy tworzenie kości wzrasta tylko o 45%, co skutkuje zmniejszeniem masy kostnej na każdy cykl remodelingu [129]. Utrata kości u kobiet po menopauzie przebiega w dwóch głównych fazach: początkowa krótka faza trwająca 3–5 lat z szybką utratą kości bełczkowej (menopauzalny ubytek kości) oraz druga, dłuższa faza powolnej utraty, trwająca 10–20 lat występująca u obu płci (utrata kości związana z wiekiem) [130]. To wyjaśnia, dlaczego częstość występowania złamań u mężczyzn wzrasta około 10 lat później niż u kobiet.

Estrogeny działają jako hormony antyresorpcyjne, które ograniczają resorpcję i utratę masy kostnej. Regulują kompleks RANK/RANKL/OPG na kilku poziomach — zwiększają ekspresję RANKL w osteoblastach i indukują ekspresję OPG [131]. Co więcej, estrogeny zakłócają sygnalizację osteoklastów, hamując w ten sposób ich różnicowanie i promują apoptozę osteoklastów poprzez zwiększoną produkcję TGF β przez osteoblasty. W warunkach ostrego niedoboru estrogenów, różnicowanie i aktywność osteoklastów jest zwiększona przez wyższą ekspresję RANKL [132] i innych cytokin proosteoklastycznych, w tym TNF, IL-1 i IL-6 [133].

Ponadto kształt kości długich znacząco różni się u mężczyzn i kobiet. To również częściowo wyjaśnia, dlaczego kobiety są bardziej narażone na rozwój osteoporozy [134]. W okresie dojrzewania indukowane testosteronem tworzenie okostnej jest bardziej nasilone na zewnętrznej powierzchni kości u chłopców, co powoduje, że kości są szersze i mają grubszą korę, co skutkuje ich większą wytrzymałością. Od młodej dorosłości do okresu przed menopauzą remodeling kości korowej u kobiet polega na resorpcji kości, która jest w dużej mierze kompensowana przez zrosty okostnowe [135].

2.4.1. Hormony — udział w powstawaniu osteoporozy pomenopauzalnej

Wpływ hormonów na metabolizm zarówno osteoblastów, jak i osteoklastów nie ogranicza się jedynie do hormonów płciowych. Kilka innych hormonów, których poziomy zmieniają się wraz z wiekiem, może również wpływać na przemianę kostną.

Estrogeny to hormony oszczędzające kości, ich receptory znajdują się zarówno na osteoklastach jak i osteoblastach. Estrogeny są kluczowymi hormonami w kontrolowaniu długości życia komórek kostnych poprzez wywoływanie apoptozy pre-osteoklastów i osteoklastów, hamując jednocześnie apoptozę osteoblastów i osteocytów oraz zapobiegając nadmiernej resorpcji kości. Dlatego po menopauzie u kobiet, gdy poziom estrogenów spada, następuje wzrost liczby i przeżywalności osteoklastów, co prowadzi do zwiększonej resorpcji kości [136].

Androgeny mogą wpływać na metabolizm kości zarówno bezpośrednio, wiążąc się ze swoim specyficznym receptorem, jak i pośrednio, działając na receptor estrogenowy. Receptor androgenowy został zidentyfikowany w hodowanych ludzkich płodowych osteoblastach, gdzie promuje proliferację i różnicowanie komórek, hamując ich apoptozę poprzez działanie IL-1 β i czynnik wzrostu fibroblastów (FBF). Androgeny wydają się również pośrednio hamować proliferację osteoklastów, ponieważ hipogonadyzm będący konsekwencją orchiektomii prowadzi do proliferacji osteocytów. Hipotestosteronemia zwiększa również wydzielanie RANKL przez prekursorów osteoblastów, stymulując tym samym proliferację osteoklastów [137].

Parathormon jest hormonem wydzielanym przez przytarczyce, uczestniczy w utrzymaniu homeostazy wapnia w organizmie. Jest wydzielany w odpowiedzi na obniżony poziom wapnia w surowicy. Działa bezpośrednio na nerki i na kości, a pośrednio na jelita [138]. W kościach PTH wiąże się z receptorem na powierzchni osteoblastów i komórek podścieliska, które aktywują ekspresję czynnika stymulującego kolonię makrofagów (M-CSF), ligandu aktywatora jądrowego czynnika kappa B (RANKL) i interleukin, indukując różnicowanie i aktywację osteoklastów [82]. PTH zwiększa również nerkowe wchłanianie wapnia i stymuluje produkcję aktywnej witaminy D z nieaktywnego prekursora. Witamina D wpływa również na resorpcję kości, zwiększając wchłanianie wapnia z jelit i nerek. Zwiększa również ekspresję RANKL i M-CSF w osteoblastach. Pełni rolę ochronną w stosunku do tkanki kostnej, działając głównie na osteoblasty. Receptor witaminy D ulega ekspresji zarówno w osteocytach, jak i osteoblastach. W tych ostatnich pośredniczy we wzroście masy kostnej poprzez supresję resorpcji kości [139].

Glukokortykosteroidy wpływają na metabolizm kości, działając przede wszystkim na osteoblasty, zatem hamuje kościotworzenie [140]. W badaniu *in vitro* wykazano, że deksametazon hamował osteogenezę i ekspresję białek osteogennych (np. fosfatazy alkalicznej i osteokalcyny) poprzez obniżenie fosforylacji szlaku PI3K/Akt [141]. Ponadto glukokortykoidy mogą powodować osteonekrozę lub martwicę awaskularną poprzez indukcję

apoptozy osteoblastów oraz zmniejszenie przepływu krwi i nawilżenia kości. Ocena immunohistochemiczna wykazała, że osteocyty również ulegają autofagii lub apoptozie po ekspozycji na glukokortykoidy. Rzeczywiście, po inkubacji z glukokortykoidami, zaczynają one wydzielać katepsynę K, która usuwa kolagen typu I i inne białka z macierzy kostnej [142].

Odwrotnie, wykazano, że hormon adrenokortykotropowy (ACTH) ma działanie ochronne przed osteonekrozą wywołaną przez glukokortykoidy. W jednym z badań oceniano, czy inkubacja z ACTH może wpływać na różnicowanie ludzkich osteoblastów. Ekspozycja na ACTH powodowała nasilenie osteogenezy poprzez przyspieszenie ekspresji genów specyficznych dla kości (np. kolagenu I, biglikanu, receptora witaminy D i TGF- β) [143].

Tyreotoksykoza wiąże się z czasowym rozregulowaniem przebudowy kości, co prowadzi do zmniejszenia masy kostnej. Po raz pierwszy zajęły się tym wczesne badania in-vitro pokazujące wpływ hormonów tarczycy (T3 i T4) na resorpcję i tworzenie kości. Receptor hormonu tyreotropowego (TSH) ulega ekspresji zarówno w prekursorach osteoklastów, jak i osteoblastów. Spadek ekspresji TSHR o 50% powoduje osteoporozę i ogniskową osteosklerozę u badanych myszy. Ponadto stwierdzono, że TSH utrudnia tworzenie i przeżycie osteoklastów działając na sygnalizację JNC/c-jun i NF- κ B uruchamianą przez RANKL i TNF α , na co wskazują dane z hodowli osteoklastów lub osteoblastów inkubowanych z rhTSH. Hamuje on również różnicowanie osteoklastów, hamując sygnalizację Wnt- β -kateninia [144].

3. Cel pracy

W procesie badania zależności między fenotypem, a genotypem opisano i udokumentowano ponad 150 genów jako geny kandydujące, czyli związane z metabolizmem kości i potencjalnie zaangażowane w rozwój osteoporozy [145]. Liczne badania na osobach spokrewnionych potwierdziły silny udział czynników genetycznych w etiologii osteoporozy. Uważa się, że osteoporoza jest uwarunkowana wieloma wariantami licznych genów (QTL, ang. *quantitative trait loci*). QTL to regiony chromosomalne zawierające allele wpływające na wartości BMD i inne cechy fenotypowe kości. Markery genetyczne mogą obejmować powtórzenia tandemowe o zmiennej długości (VNTR) lub polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (SNP) [146]. Analizy korelacji wykonuje się w celu określenia i porównania częstości alleli genów polimorficznych w grupach chorych i kontrolnych. Jednym z najczęściej analizowanych genów jest gen OPG — osteoprotegeryny, zwanej także „protektorem kości”. OPG jest cytokiną należącą do rodziny receptorów czynnika martwicy nowotworów TNF i bierze udział w szlaku RANK/RANKL/OPG, który kontroluje przebudowę kości. RANK jest receptorem odpowiedzialnym za wiązanie RANKL. OPG uniemożliwia łączenie RANKL z RANK, hamując w ten sposób osteoklastogenezę i zmniejszając resorpcję kości.

Dotychczas opublikowano nieliczne szeroko zakrojone, długoterminowe badania oceniające wpływ czynników genetycznych na gęstość mineralną kości i częstość złamań. Brak systematycznych danych i wieloczynnikowy charakter osteoporozy wymagają dalszych badań w celu walidacji i zbadania nowych czynników sprawczych oraz retrospektywnej oceny istniejących danych. Dlatego też niniejsze badanie zostało zaprojektowane w celu określenia roli polimorfizmów genu OPG: rs3102735 (-163A>G), rs3134070 (-245 T>G), rs207361 (-950T>C), rs7844539 (A>C), rs2073618 (1181G>C) w występowaniu osteoporozy pomenopauzalnej.

Cele badania:

1. Określenie częstości występowania wybranych polimorfizmów genu kodującego OPG.
2. Ocena związku polimorfizmów genu OPG z klinicznymi parametrami obrotu kostnego i progresji osteoporozy.
3. Ocena badanych wariantów genetycznych genów OPG w etiopatogenezie osteoporozy.
4. Ocena związku polimorfizmów genu OPG z parametrami densytometrycznymi, częstością występowania osteoporozy i osteopenii w badanej populacji kobiet.

4. Materiał i metody

4.1. Opis badanego materiału badawczego

Do badań zakwalifikowano 802 niespokrewnionych kobiet rasy kaukaskiej, które zgłosiły się do szpitala SPSK 1 Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie. Wszystkie pacjentki przed włączeniem do badań zostały szczegółowo poinformowane o ich zakresie. Zakwalifikowane kobiety poddano badaniu densytometrycznemu w pracowni densytometrii w Szpitalu Klinicznym nr 1 Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie. Pacjentkom wykonano pomiar masy ciała oraz wzrostu, co umożliwiło wyliczenie wskaźnika masy ciała BMI (ang. *Body Mass Index*). Zastosowano wzór — masa ciała [kg]/wzrost² [m²]. Oznaczono również wskaźniki średniej gęstości mineralnej kości badanych w odniesieniu do średniej dla dorosłych młodych kobiet (YA — ang. *young adult*) oraz średniej gęstości mineralnej kości do średniej dla danego wieku (AM — ang. *age matched*).

Z pacjentkami zakwalifikowanymi do udziału w eksperymencie przeprowadzono dokładny wywiad medyczny dotyczący przebytych chorób, masy urodzeniowej, wieku pierwszej i ostatniej miesiączki oraz stosowanego leczenia farmakologicznego, ze szczególnym uwzględnieniem leczenia hormonalnego oraz preparatów z grupy leków oddziałujących na masę kostną.

Do eksperymentów zakwalifikowano kobiety z menopauzą, nie przyjmujące hormonalnej terapii zastępczej. Z eksperymentu wykluczono również pacjentki po obustronnej owariektomii, z zaburzeniami endokrynologicznymi, chorobami metabolicznymi oraz chorobami tkanki łącznej, gdyż mogłyby to wpływać na obniżenie masy kostnej. 802 kobiet w wieku pomenopauzalnym, zakwalifikowano do grup w zależności od współczynnika T-score:

- A. Grupa kontrolna — T-score $>-1,0$
- B. Osteopenia — T-score między $-1,0$ a $-2,5$

Badanie densytometryczne zakwalifikowanych kobiet przeprowadzono przy użyciu aparatu Lunar DPX100 (Lunar Corp. Madison USA) dokładność pomiaru wynosiła 0,5%. Oznaczono gęstość mineralną kości (BMD) w odcinku lędźwiowym od kręgu L1 do L4, przy pomocy metody podwójnej wiązki rentgenowskiej (DXA). Uzyskane wyniki pomiarów przyjęto jako wartości bezwzględne [BMD (g/cm²)] i odnoszono do wartości średniej w grupie

wiekowej. Następnie obliczono wartość współczynników T-score oraz Z-score, które pozwoliły na przyporządkowanie badanych kobiet do poszczególnych grup. Po przeanalizowaniu uzyskanych wyników wyłączone z badań pomiary, które mogłyby odpowiadać zmianom zwyrodnieniowym w odcinku lędźwiowym kręgosłupa.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę komisji bioetycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie. Wszystkie badania wykonano zgodnie z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej (GLP — ang. *Good Laboratory Practice*).

4.2. Metody badawcze

Badania genetyczne wykonano w Zakładzie Komórek Macierzystych i Medycyny Regeneracyjnej Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich — Państwowy Instytut Badawczy w Poznaniu.

4.2.1. Izolacja materiału genetycznego

U badanych kobiet pobrano 6 ml krwi żyłnej z okolicy zgięcia łokciowego. Pobrany materiał biologiczny przechowywano w próbkach z EDTA, w temperaturze -20°C . Wyizolowano wysokocząsteczkowy DNA o najwyższej jakości, oczyszczony z białek i inhibitorów enzymów. Do przeprowadzenia izolacji DNA użyto komercyjnie dostępne zestawy „QIAamp DNA kit Blood Mini Kit”(Qiagen). Do próbki, która zawierała 20 μl proteiny K dodano 200 μl krwi obwodowej a następnie dodawano 200 μl buforu do lizy (bufor AL). Po worteksowaniu zawartości próbki, inkubowano w temperaturze 56°C przez okres 20 minut. W następnym etapie wykonano krótkie wirowanie a następnie do próbki dodano 200 μl etanolu o stężeniu 96% i worteksowano przez około 15 sekund. Zawartość próbki przeniesiono na kolumnkę (QIAamp Mini Spin Column) i wirowano z prędkością 8000 rpm przez okres 1 minuty a następnie usunięto supernatant. Na kolumnkę dodano 500 μl buforu przemywającego AW1 i wirowano przez okres 1 minuty przy 8 000 rpm i ponownie usunięto supernatant. Czynność tą powtórzono przy użyciu buforu przemywającego AW2 a czas wirowania wynosił 3 minuty przy prędkości 12 000 rpm. W kolejnym etapie izolacji kolumnkę umieszczono w próbce typu eppendorf i dodano 200 μl buforu do elucji (bufor AE), po czym próbkę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Następnie próbkę zwirowano w warunkach 8000 rpm w czasie jednej minuty celem uwolnienia DNA ze złoża.

Do analizy ilościowej i jakościowej izolatu DNA wykorzystano spektrofotometr (DeNovix), co umożliwiło uzyskanie pomiarów absorpcji. Wyznaczone wartości stężenia DNA

mieściły się w granicach 30 do 120 mg na mikrolitr przy wartościach współczynnika A260/A280 równych 1,7 do 2,0.

4.2.2. Oznaczenie polimorfizmów genu OPG

Analizowano pięć polimorfizmów genu OPG: 163A>G (rs3102735), 245T>G (rs3134069), 950 T>C (rs2073617), 6890A>C (rs7844639) oraz określono częstości ich występowania u badanych kobiet. Do analizy wykorzystano łańcuchową reakcję polimerazy w czasie rzeczywistym (real-time PCR, ang. *Polymerase Chain Reaction*). Metoda ta wykorzystuje sondy hybrydizacyjne znakowane barwnikiem fluorescencyjnym, które wiążą się z DNA w określonym miejscu. Dzięki tej metodzie na podstawie kolejnych pomiarów cyklu można określić ilość produktu w fazie jego wzrostu wykładniczego, dzięki czemu proces amplifikacji DNA może być monitorowany w czasie rzeczywistym. Do badań molekularnych wykorzystano aparat LightCycler®96 oraz LightCycler®96 Basic Software do analizy uzyskanych wyników. Zastosowano sondy hybrydizacyjne SimpleProbe znakowane barwnikami fluorescencyjnymi. Fluorescencja mierzona podczas analizy krzywej topnienia była wykorzystywana do genotypowania. Dla polimorfizmów dołączono startery i detektory specyficzne dla amplifikowanych fragmentów — użyto odczynniki LightSNiP rs3102735, LightSNiP rs3134069, LightSNiP rs2073617, LightSNiP rs7844639. Reakcje Real-time PCR przeprowadzano przez 45 cykli dla każdego badanego polimorfizmu (tab. 5.).

Tabela 5. Warunki termiczne real-time PCR dla wybranych polimorfizmów OPG

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

Na końcu każdej reakcji amplifikacji produkt jest topiony poprzez podniesienie temperatury do 95°C. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w tabeli 6.

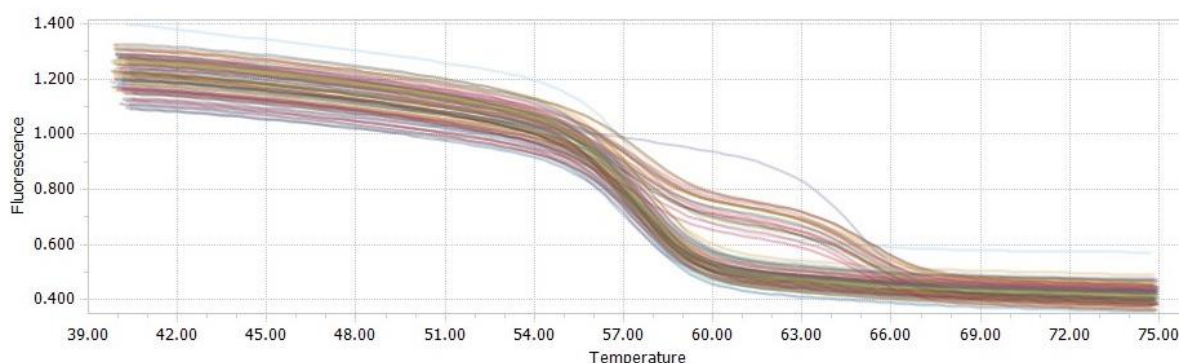
Tabela 6. Składniki reakcji real-time PCR dla badanych polimorfizmów genu OPG

Skład mieszaniny reakcyjnej	Ilość na próbkę (μl)
H ₂ O	6,7
LightSNiP	0,5
Genotyping Master Mix	1,0
MgCl ₂	0,8
DNA (50 ng)	1,0
Objętość końcowa	10,0

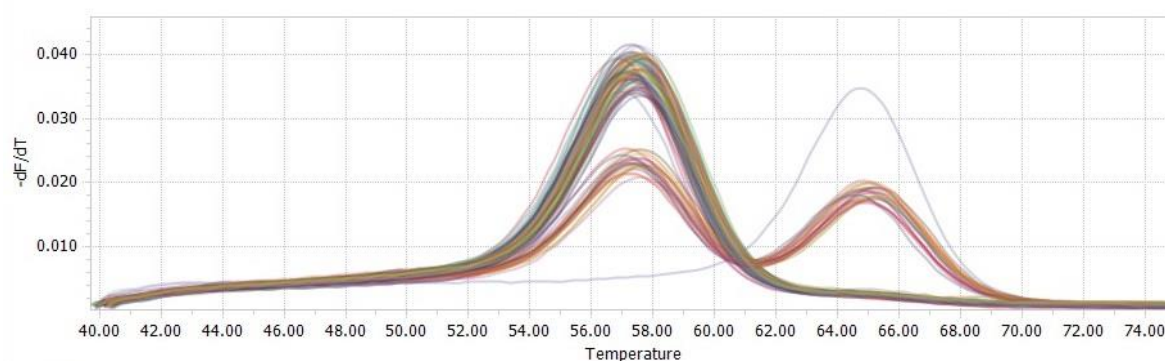
Każdy genotyp OPG analizowano na podstawie pików krzywej topnienia oraz krzywe topnienia wskazujących na specyficzność reakcji dla każdego z badanych polimorfizmów.

Badane polimorfizmy OPG

- rs3102735 (–163A>G)

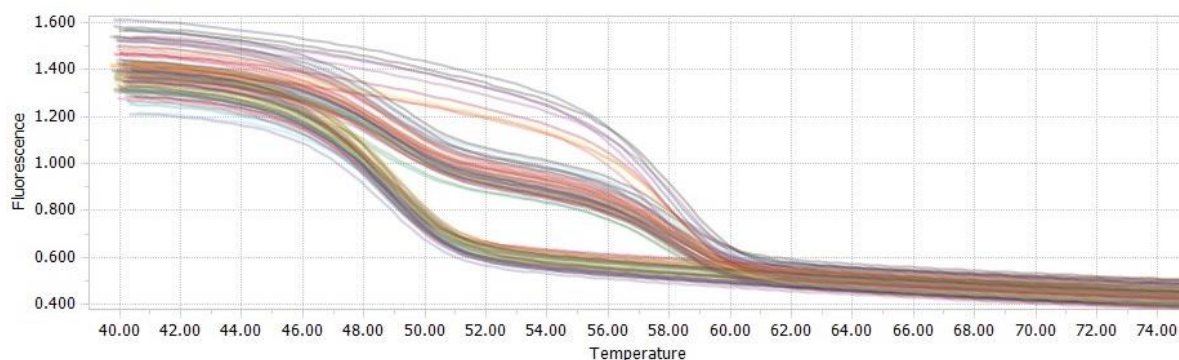


Rycina 5. Wyznaczanie temperatury topnienia dla OPG (rs3102735). Temperatura topnienia produktu amplifikacji dla allelu A $T_{m1}=57,5^{\circ}\text{C}$; allelu G $T_{m2}=64,5^{\circ}\text{C}$.

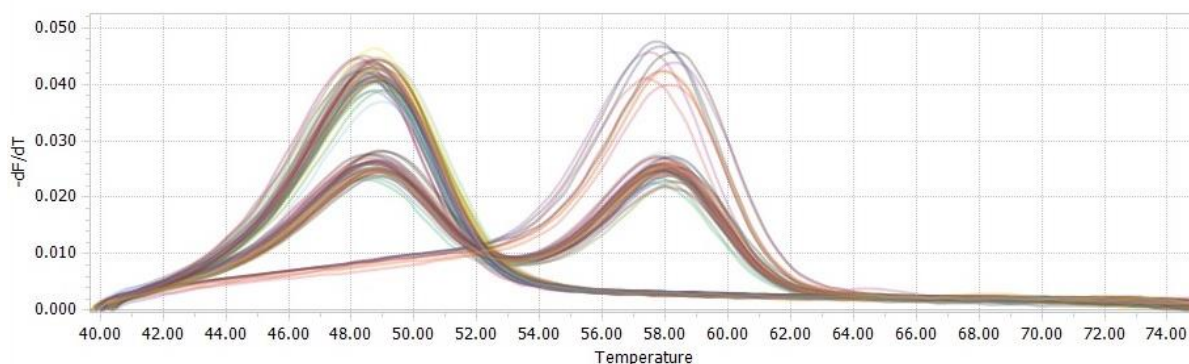


Rycina 6. Analiza topnienia amplifikowanego produktu dla OPG (rs3102735) — piki krzywych topnienia. Temperatura topnienia produktu dla allelu A $T_{m1}=57,5^{\circ}\text{C}$; allelu G $T_{m2}=64,5^{\circ}\text{C}$.

– rs3134070 (–245 T>G)

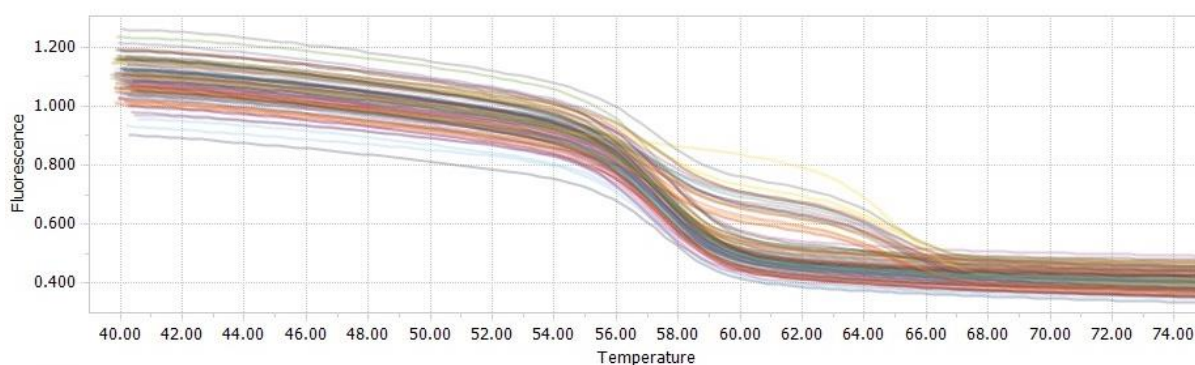


Rycina 7. Wyznaczanie temperatury topnienia dla OPG (rs3134070). Temperatura topnienia produktu amplifikacji dla allelu T $T_{m1}=49^{\circ}\text{C}$; allelu G $T_{m2}=58^{\circ}\text{C}$.

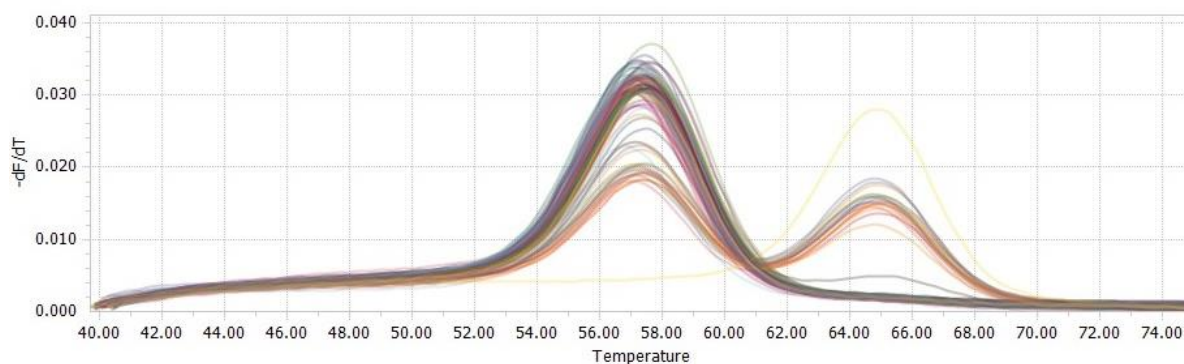


Rycina 8. Analiza topnienia amplifikowanego produktu dla OPG (rs3134070) — piki krzywych topnienia. Temperatura topnienia produktu dla allelu T $T_{m1}=49^{\circ}\text{C}$; allelu G $T_{m2}=58^{\circ}\text{C}$.

– rs207361 (–950 T>C)

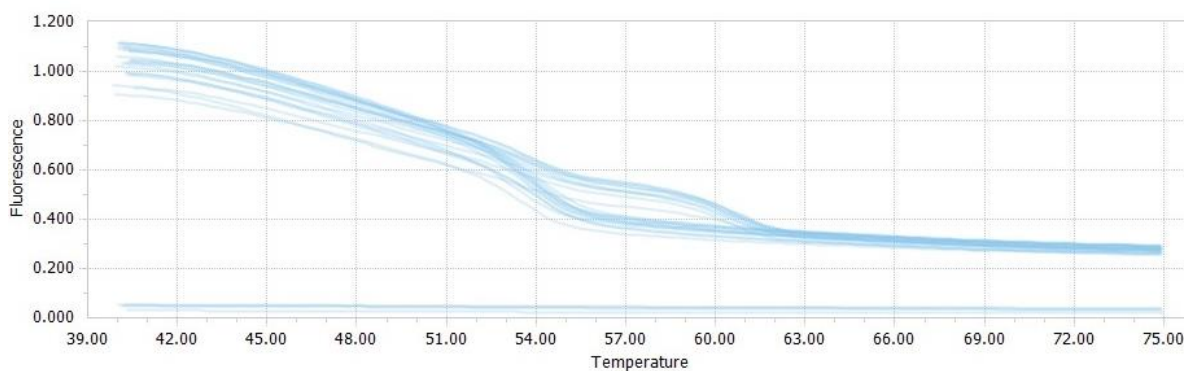


Rycina 9. Wyznaczanie temperatury topnienia dla OPG (rs207361). Temperatura topnienia produktu amplifikacji dla allelu T $T_{m1}=57,5^{\circ}\text{C}$; allelu C $T_{m2}=64,5^{\circ}\text{C}$.

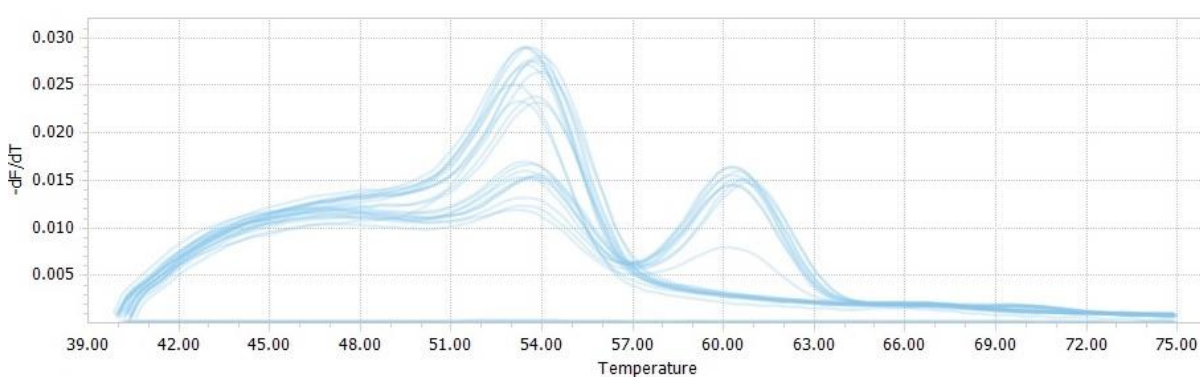


Rycina 10. Analiza topnienia amplifikowanego produktu dla OPG (rs207361) — piki krzywych topnienia. Temperatura topnienia produktu dla allelu T $T_{m1}=57,5^{\circ}\text{C}$; allelu C $T_{m2}=64,5^{\circ}\text{C}$.

— rs7844539 (A>C)

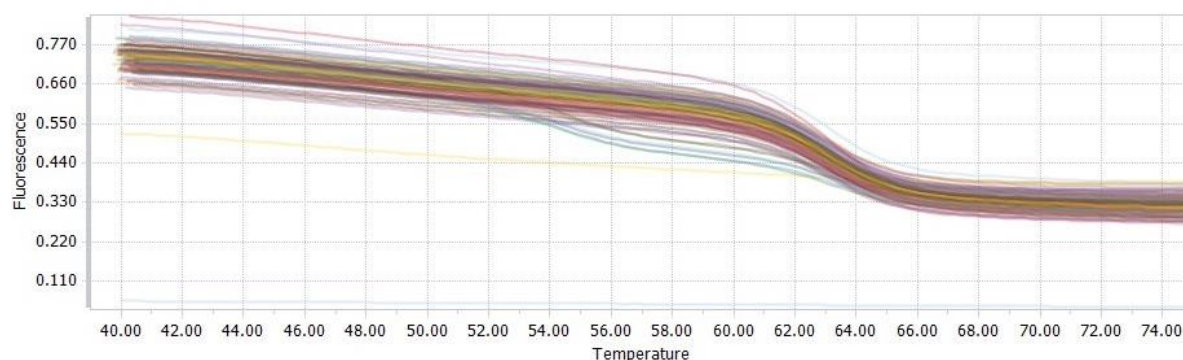


Rycina 11. Wyznaczanie temperatury topnienia dla OPG (rs7844539). Temperatura topnienia produktu amplifikacji dla allelu A $T_{m1}=53,5^{\circ}\text{C}$; allelu C $T_{m2}=60,5^{\circ}\text{C}$.

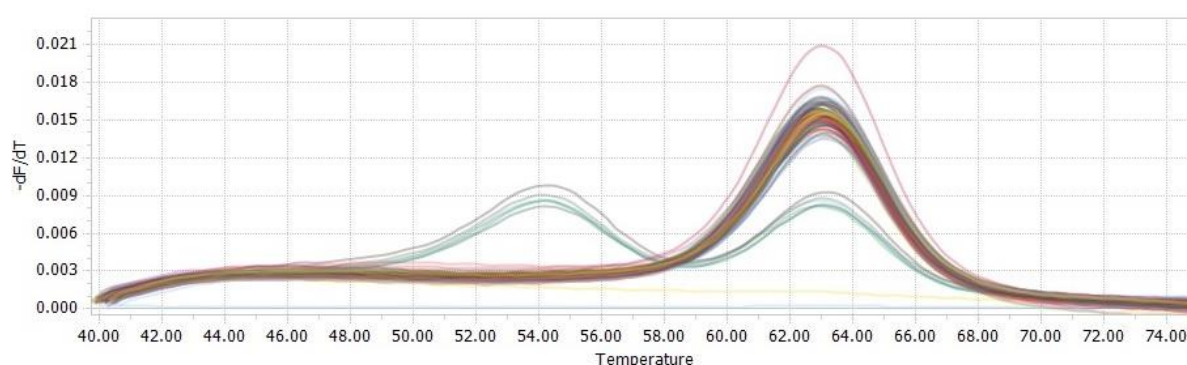


Rycina 12. Analiza topnienia amplifikowanego produktu dla OPG (rs7844539) — piki krzywych topnienia. Temperatura topnienia produktu dla allelu A $T_{m1}=53,5^{\circ}\text{C}$; allelu C $T_{m2}=60,5^{\circ}\text{C}$.

– rs2073618 (1181G>C)



Rycina 13. Wyznaczanie temperatury topnienia dla OPG (rs2073618). Temperatura topnienia produktu amplifikacji dla allelu G $T_{m1}=54,5^{\circ}\text{C}$; allelu C $T_{m2}=63^{\circ}\text{C}$.



Rycina 14. Analiza topnienia amplifikowanego produktu dla OPG (rs2073618) — piki krzywych topnienia. Temperatura topnienia produktu dla allelu G $T_{m1}=54,5^{\circ}\text{C}$; allelu C $T_{m2}=63^{\circ}\text{C}$.

4.3. Metody statystyczne służące prezentacji uzyskanych wyników

Analizę statystyczną wyników uzyskanych w pracy przeprowadzono wykorzystując program R (wersja 4.1.2) (R *Foundation for Statistical Computing*, Wiedeń, Austria) [147] oraz pakietu SNPassoc [148]. Dla zmiennych ilościowych przeprowadzono analizę zgodności z rozkładem Gaussa wykorzystując test normalności Shapiro-Wilka i przedstawiano je jako średnie±odchylenie standardowe (SD — ang. *standard deviation*). W przypadku zgodności rozkładu cechy z rozkładem normalnym, do oceny zależności między średnimi w badanych grupach zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji dla zmiennych niepowiązanych (ANOVA), a następnie posłużono się testem post-hoc Tukeya HSD. Zmienne katgoryczne zostały przedstawiane jako liczby (procenty i porównywano je w zależności od liczebności wartości oczekiwanych za pomocą testu χ^2 Pearsona bądź testu dokładnego Fishera. Wszystkie przeprowadzone testy statystyczne były obustronne. Za statystycznie istotne przyjęto wartości dwustronnego $p<0,05$. W przypadku gdy dwie analizowane cechy miały charakter ilościowy

do poszukiwania zależności między nimi wykorzystano korelację Pearsona z poprawką Holma na wielokrotne testowanie.

Sprawdzono za pomocą testu χ^2 Pearsona czy każdy z badanych wariantów genetycznych spełniał założenia równowagi Hardy’ego-Weinberga (HWE — ang. *Hardy-Weinberg Equilibrium*). Asocjacje badanych SNP z ryzykiem wystąpienia osteopenii i osteoporozy oceniano w pięciu modelach genetycznych (kodominujący, dominujący, recesywny, nad-dominujący i log-addytywny) za pomocą bezwarunkowej analizy regresji logistycznej i przedstawiano jako ilorazy szans (OR — ang. *odds ratio*) i związane z nimi 95% przedziały ufności (95% CI — ang. *95% confidence interval*). Najlepsze modele dziedziczenia wybrano za pomocą kryterium informacyjnego Akaike (AIC).

Obliczono parametry nierównowagi sprzężeń (LD — ang. *linkage disequilibrium*) pomiędzy badanymi SNP oraz częstości występowania haplotypów przy użyciu programu Haploview w wersji 4.2 [149]. Statystycznie istotne wartości p skorygowano stosując 10 000-krotny test permutacji.

5. Wyniki

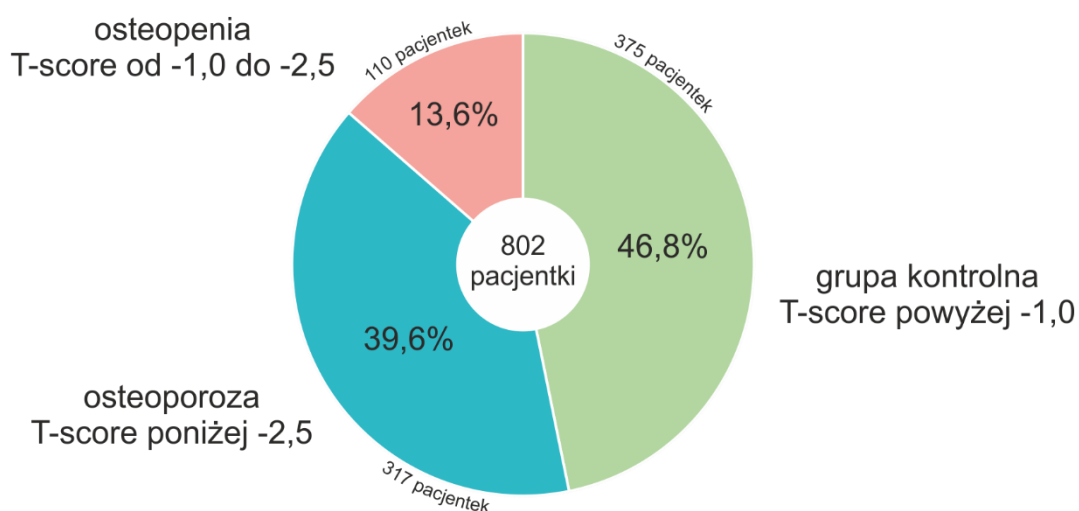
5.1. Charakterystyka pacjentek zakwalifikowanych do badania

W pracy analizie poddano łącznie 802 kobiety rasy kaukaskiej i narodowości polskiej. Średnia wieku całej zebranej grupy wynosiła $54,7 \pm 8,6$ lat (zakres 51–78 lat).

U wszystkich pacjentek wykonano pomiary gęstości mineralnej kości (BMD) w Pracowni Densytometrii, Szpitala Klinicznego nr 1 Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie. Na podstawie przeprowadzonych badań DEXA pacjentki zakwalifikowano do trzech grup:

- A. Grupa kontrolna — T-score większy od $-1,0$
- B. Osteopenia — T-score między $-1,0$ a $-2,5$
- C. Osteoporoza — T-score mniejszy od $-2,5$

Do grupy kontrolnej włączono 375 pacjentek (46,8%), u 110 kobiet (13,6%) stwierdzono osteopenię, a u 317 (39,6%) osteoporozę. Podział pacjentek włączonych do badania przedstawiono na ryc. 1.



Rycina 15. Podział pacjentek zakwalifikowanych do badania.

W tabeli 1. przedstawiono średnie wyników densytometrycznych pacjentek z grup wyszczególnionych w pracy. Średnia gęstość mineralna kości kręgosłupa lędźwiowego (L2-L4), w g/cm^2 wynosiła $1,20 \pm 0,10$ w grupie kontrolnej, $0,98 \pm 0,05$ u kobiet z osteopenią i $0,82 \pm 0,07$ u pacjentek z osteoporozą ($p < 0,001$). Wskaźniki średniej BMD w porównaniu ze

średnią dla młodych dorosłych kobiet (YA — ang. *young adults*) i średniej BMD w porównaniu ze średnią dla danego wieku (AM — ang. *age matched*) wynosiły odpowiednio w procentach: 100,45±8,03 i 108,52±10,23 w grupie kontrolnej, 81,71±4,43 i 89,24±6,62 w osteopenii i 68,26±5,34 oraz 78,10±7,15 w osteoporozie ($p<0,001$). Średnie wartości parametrów T-score i Z-score w grupie kontrolnej wynosiły 0,05±0,90 i 0,64±1,11, w osteopenii -1,80±0,43 i -0,84±0,66, oraz -3,16±0,54 i -1,62±0,72 w osteoporozie ($p<0,001$).

Tabela 7. Porównanie wyników densytometrycznych pacjentek

Parametr	A Grupa kontrolna (n=375)	B Osteopenia (n=110)	C Osteoporoza (n=317)	p (Anova)	p (Tukey HSD)
BMD L2–L4 (g/cm ²) $\bar{x}\pm SD$ Me (min–max)	1,20±0,10 1,19 (1,08–1,47)	0,98±0,05 0,97 (0,90–1,07)	0,82±0,07 0,83 (0,63–0,90)	<0,001	C–A–<0,001 B–A–<0,001 B–C–<0,001
BMD L2–L4 YA (%) $\bar{x}\pm SD$ Me (min–max)	100,45±8,03 99,00 (90,00–123,00)	81,71±4,43 81,00 (75,00–89,00)	68,26±5,34 69,00 (53,00–75,00)	<0,001	C–A–<0,001 B–A–<0,001 B–C–<0,001
BMD L2–L4 AM (%) $\bar{x}\pm SD$ Me (min–max)	108,52±10,23 107,00 (91,00–133,00)	89,24±6,62 89,00 (74,00–108,00)	78,10±7,15 78,00 (60,00–92,00)	<0,001	C–A–<0,001 B–A–<0,001 B–C–<0,001
T-score $\bar{x}\pm SD$ Me (min–max)	0,05±0,90 -0,17 (-0,97–3,13)	-1,80±0,43 -1,89 (-2,49)–(-1,05)	-3,16±0,54 -3,05 (-4,73)–(-2,50)	<0,001	C–A <0,001 B–A–<0,001 B–C–<0,001
Z-score $\bar{x}\pm SD$ Me (min–max)	0,64±1,11 0,56 (-1,85–2,65)	-0,84±0,66 -0,88 (-2,36–0,77)	-1,62±0,72 -1,62 (-3,13–0,98)	<0,001	C–A–<0,001 B–A–<0,001 B–C–<0,001

Analizując zebrane z dokumentacji medycznej i wywiadu z pacjentką dane kliniczne zaobserwowano, że średni wiek kobiet z osteoporozą był statystycznie istotnie wyższy od średnich w pozostałych grupach: 56,45±8,83 lata vs. 53,49±8,23 lata w grupie kontrolnej ($p=0,058$) oraz 53,19±8,20 lata u kobiet z osteopenią ($p=0,010$). Różnice statystycznie istotne obserwowano również dla wzrostu, masy ciała ($p<0,001$) oraz wskaźnika masy ciała BMI ($p=0,004$). Najniższą średnią wzrostu odnotowano w grupie z osteoporozą 160,18±5,12 cm vs. 162,81±5,02 cm w osteopenii ($p=0,002$) i 163,17±5,98 cm w grupie kontrolnej ($p=0,002$). Pacjentki z osteoporozą miały również najniższą średnią masę ciała 60,93±9,16 kg, a różnica była statystycznie istotna w porównaniu ze średnią kobiet z osteopenią ($p=0,011$) oraz grupą kontrolną ($p<0,001$). Średnia wskaźnika masy ciała w grupie kobiet z osteoporozą była

statystycznie istotnie niższa od średniej w grupie kontrolnej ($23,70 \pm 3,10 \text{ kg/m}^2$ vs. $25,84 \pm 4,55 \text{ kg/m}^2$, $p=0,003$). Nie zaobserwowano różnic statystycznie istotnych pomiędzy średnimi latami wystąpienia pierwszej i ostatniej miesiączki oraz wyliczonym na ich podstawie okresem reprodukcyjnym. W grupie z osteoporozą średnio upłynęło więcej lat od menopauzy, niż w pozostałych grupach: $10,63 \pm 5,75$ vs. $7,18 \pm 6,02$ w osteopenii ($p=0,013$), oraz $7,03 \pm 5,59$ w kontroli ($p=0,003$). Liczba przeżytych ciąż była bardzo podobna we wszystkich grupach (mediana — dwie ciążę, zakres od braku przebytej ciąży do 6 ciąż w grupach kontrolnej i osteopenii oraz 7 w grupie z osteoporozą). Natomiast średnia masa urodzeniowa ich dzieci była statystycznie istotnie najwyższa dla kontroli: $3628,95 \pm 480,75 \text{ g}$ vs. $3226,79 \pm 411,07 \text{ g}$ w osteopenii ($p=0,014$) i $3141,25 \pm 536,32 \text{ g}$ w osteoporozie ($p=0,009$) (tab. 8.).

Tabela 8. Porównanie danych klinicznych pacjentek

Parametr	A Grupa kontrolna (n=375)	B Osteopenia (n=110)	C Osteoporoza (n=317)	p (Anova)	p (Tukey HSD)
Wiek pacjentki (lata) $\bar{x}\pm SD$ me (min-max)	53,49±8,23 55,00 (51,00–71,00)	53,19±8,20 53,00 (52,00–77,00)	56,45±8,83 57,00 (51,00–78,00)	0,007	C–A–0,058 B–A–0,972 B–C–0,010
Wzrost (cm) $\bar{x}\pm SD$ me (min-max)	163,17±5,98 164,00 (152,00–180,00)	162,81±5,02 163,00 (150,00–175,00)	160,18±5,12 160,00 (150,00–175,00)	<0,001	C–A–0,002 B–A–0,905 B–C–0,002
Masa ciała (kg) $\bar{x}\pm SD$ me (min-max)	68,71±12,22 66,00 (50,00–100,00)	65,51±11,14 65,00 (41,00–114,00)	60,93±9,16 61,00 (43,00–85,00)	<0,001	C–A–<0,001 B–A–0,148 B–C–0,011
BMI (kg/m ²) $\bar{x}\pm SD$ me (min-max)	25,84±4,55 24,76 (18,33–37,18)	24,72±3,97 24,98 (17,30–43,43)	23,70±3,10 23,63 (17,10–31,63)	0,004	C–A–0,003 B–A–0,157 B–C–0,168
Pierwsza miesiączka (lata) $\bar{x}\pm SD$ me (min-max)	13,38±1,88 14,00 (9,00–16,00)	13,12±2,39 13,00 (9,00–18,00)	12,94±2,16 13,00 (9,00–18,00)	0,654	C–A–0,630 B–A–0,854 B–C–0,894
Ostatnia miesiączka (lata) $\bar{x}\pm SD$ me (min-max)	50,17±4,39 50,00 (41,00–58,00)	49,34±4,59 50,00 (38,00–60,00)	48,06±5,08 49,00 (34,00–60,00)	0,057	C–A–0,060 B–A–0,646 B–C–0,237
Okres reprodukcyjny (lata) $\bar{x}\pm SD$ me (min-max)	36,38±5,35 37,00 (27,00–48,00)	36,20±4,93 36,50 (23,00–49,00)	35,62±5,01 36,00 (24,00–48,00)	0,724	C–A–0,766 B–A–0,986 B–C–0,795

Parametr	A Grupa kontrolna (n=375)	B Osteopenia (n=110)	C Osteoporoza (n=317)	p (Anova)	p (Tukey HSD)
Lata od menopauzy $\bar{x}\pm SD$ me (min-max)	7,03±5,59 6,50 (1,00–23,00)	7,18±6,02 6,00 (0,00–25,00)	10,63±5,75 10,00 (1,00–22,00)	0,001	C–A–0,013 B–A–0,992 B–C–0,003
Liczba ciąż $\bar{x}\pm SD$ me (min-max)	1,94±1,22 2,00 (0,00–6,00)	1,84±1,13 2,00 (0,00–6,00)	1,92±1,31 2,00 (0,00–7,00)	0,852	C–A–0,994 B–A–0,867 B–C–0,902
Masa noworodka (g) $\bar{x}\pm SD$ me (min-max)	3628,95±480,75 3600 (2460–5100)	3226,79±411,07 3200 (2500–4500)	3141,25±536,32 3000 (2470–4500)	0,005	C–A–0,009 B–A–0,014 B–C–0,828

5.1.1. Charakterystyka badanych wariantów genu *TNFRSF11B*

W toku pracy przeanalizowano pięć polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP — ang. *single nucleotide polymorphism*) genu *TNFRSF11B* (TNF — ang. *receptor superfamily member 11b*) kodującym osteoprotegerynę. W tabeli 3 zestawiono nazwy zwyczajowe, numery identyfikacyjne rs, pozycje wariantów na chromosomie (wg. referencyjnego genomu GRCh38.p14) oraz ich funkcję i częstości występowania poszczególnych alleli w populacjach europejskich wg Projektu 1000 Genomów [150].

Tabela 9. Badane warianty genu *TNFRSF11B*

Nazwa zwyczajowa	Numer rs	Allele	Pozycja na chromosomie (GRCh38.p14)	Znaczenie	Częstość występowania alleli w populacji europejskiej
163A>G	rs3102735	T>C	chr8:118952831	2KB Upstream Variant	T=0,8678/ C=0,1322
245T>G	rs3134069	A>C	chr8:118952749	2KB Upstream Variant	A=0,9563/ C=0,0437
950T>C	rs2073617	G>A	chr8:118952044	2KB Upstream Variant	G=0,4891/ A=0,5109
1181G>C	rs2073618	G>C	chr8:118951813	Missense Variant	G=0,5328/ C=0,4672
6890A>C	rs7844539	T>G	chr8:118926486	Intron Variant	T=0,8777/ G=0,1223

5.1.2. Allele Frequency1000Genomes(Europe)

Po przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych metodą real-time PCR uzyskano wyniki dla 375 kontroli, 110 kobiet z osteopenią oraz 317 z osteoporozą. Częstości występowania genotypów analizowanych w pracy wariantów polimorficznych były dla wszystkich grup zgodne z prawem równowagi Hardy’ego-Weinberga (HWE — ang. *Hardy-Weinberg Equilibrium*). Częstość występowania alleli rzadszych (MAF — ang. *minor allele frequency*) dla danych grup oraz procent brakujących oznaczeń genotypów przedstawiono w tabeli 10.

Tabela 10. Analiza SNP dla całej grupy

Numer rs	Grupa kontrolna n=375			Osteopenia n=110			Osteoporoza n=317		
	MAF	HWE p	Missing (%)	MAF	HWE p	Missing (%)	MAF	HWE p	Missing (%)
rs3102735	G=14,2	0,28	1,6	G=12,6	0,37	1,8	G=14,9	0,51	0,6
rs3134069	G=7,3	1,00	3,7	G=5,3	1,00	4,6	G=6,6	0,45	15,8
rs2073617	C=45,9	0,40	2,4	C=43,2	0,16	5,5	T=48,5	0,57	2,8
rs2073618	C=45,8	0,25	1,1	C=44,4	0,56	1,8	C=45,4	0,31	0,9
rs7844539	C=12,9	0,31	1,1	C=15,4	1,00	1,8	C=14,0	1,00	2,86

5.1.3. Częstość występowania genotypów i alleli badanych polimorfizmów genu *TNFRSF11B* w badanych grupach

Częstość występowania genotypów i alleli analizowanych w pracy wariantów genu *TNFRSF11B* w badanych grupach kobiet przedstawiono w tabeli 5. Przeprowadzona analiza testem chi kwadrat wykazała, różnice statystycznie istotne w częstości występowania alleli wariantu *950T>C* (rs2073617) pomiędzy grupami. Allel *C* występował u 43,2% pacjentek z osteopenią, 45,9% kontroli i 51,5% kobiet z osteoporozą ($p=0,047$).

Tabela 11. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmów genu *TNFRSF11B* w badanych grupach kobiet.

SNP/rs	Genotypy/allele	Grupa kontrolna n=375 n (%)	Osteopenia n=110 n (%)	Osteoporoza n=317 n (%)	p
163A>G rs3102735	AA	274 (74,3)	83 (77,6)	226 (71,7)	0,491
	AG	85 (23,0)	21 (19,6)	84 (26,7)	
	GG	10 (2,7)	3 (2,8)	5 (1,6)	
	Suma	369 (100,0)	107 (100,0)	315 (100,0)	
	AllelA	633 (85,8)	187 (87,4)	536 (85,1)	0,705
	AllelG	105 (14,2)	27 (12,6)	94 (14,9)	

SNP/rs	Genotypy/allele	Grupa kontrolna n=375 n (%)	Osteopenia n=110 n (%)	Osteoporoza n=317 n (%)	p
245T>G rs3134069	TT	310 (85,9)	93 (89,4)	238 (87,5)	0,827
	TG	49 (13,6)	11 (10,6)	32 (11,8)	
	GG	2 (0,6)	0 (0,0)	2 (0,7)	
	Suma	361 (100,00)	104 (100,00)	272 (100,00)	
	AllelT	669 (92,7)	197 (94,7)	508 (93,4)	0,580
	AllelG	53 (0,73)	11 (0,53)	36 (0,66)	
950T>C rs2073617	TT	111 (30,3)	37 (35,9)	75 (24,4)	0,137
	TC	174 (47,5)	43 (41,7)	149 (48,4)	
	CC	81 (22,1)	23 (22,3)	84 (27,3)	
	Suma	366 (100,0)	103 (100,0)	308 (100,0)	
	AllelT	396 (54,1)	117 (56,8)	299 (48,5)	0,047
	AllelC	336 (45,9)	89 (43,2)	317 (51,5)	
1181G>C rs2073618	GG	103 (27,8)	31 (29,0)	89 (28,3)	0,996
	GC	196 (52,8)	57 (53,3)	165 (52,5)	
	CC	72 (19,4)	19 (17,8)	60 (19,1)	
	Suma	371 (100,0)	107 (100,0)	314 (100,0)	
	Allel G	402 (54,2)	119 (55,6)	343 (54,6)	0,932
	Allel C	340 (45,8)	95 (44,4)	285 (45,4)	
6890A>C rs7844539	AA	282 (75,8)	76 (71,0)	217 (73,8)	0,964
	AC	84 (22,6)	29 (27,1)	71 (24,2)	
	CC	6 (1,6)	2 (1,9)	6 (2,0)	
	Suma	372 (100,0)	107 (100,0)	294 (100,0)	
	Allel A	648 (87,1)	181 (84,6)	505 (85,9)	0,803
	Allel C	96 (12,9)	33 (15,4)	83 (14,1)	

p=Chi-kwadrat

W kolejnym etapie pracy przeprowadzono szczegółową analizę częstości występowania genotypów i alleli pomiędzy grupą kontrolną i osteoporozą oraz grupą kontrolną i osteopenią. Obliczono współczynniki ryzyka dla 5 modeli genetycznych (kodominującego, dominującego, recesywnego, nad-dominującego oraz log-addytywnego).

5.1.4. Grupy kontrolna i osteopenia

W tabeli 6 porównano częstość występowania alleli omawianych w pracy wariantów polimorficznych u pacjentek z osteopenią i grupą kontrolną. Częstości występowania rzadszych

alleli tych SNP były porównywalne w obu grupach. Allele typu dzikiego wariantów rs3102735, rs3134069, rs2073617 oraz rs2073618 obserwowano częściej u kobiet z osteopenią w porównaniu do grupy kontrolnej. Tylko dla polimorfizmu rs7844539 rzadszy allel C występował u 15% pacjentek z osteopenią oraz u 13% w grupie kontrolnej (OR=1,23; 95%PU: 0,65–2,34; p=0,526).

Tabela 12. Częstość występowania alleli polimorfizmów genu *TNFRSF11B* w grupach kontrolnej i z osteopenią

SNP	grupa	Allele		Odsetek przebadanych osób	Chi ²	Pearson's p	OR (95% CI)
163A>G rs3102735		A	G	0,98	0,360	0,548	0,87 (0,55–1,37)
	osteopenia	187 (0,87)	27 (0,13)				
	kontrola	633 (0,86)	105 (0,14)				
245T>G rs3134069		T	G	0,96	1,061	0,302	0,70 (0,36–1,38)
	osteopenia	197 (0,95)	11 (0,05)				
	kontrola	669 (0,93)	53 (0,07)				
950T>C rs2073617		T	C	0,97	0,472	0,491	0,90 (0,66–1,22)
	osteopenia	117 (0,57)	89 (0,43)				
	kontrola	396 (0,54)	336 (0,46)				
1181G>C rs2073618		G	C	0,99	0,136	0,711	0,94 (0,70–1,28)
	osteopenia	119 (0,56)	95 (0,44)				
	kontrola	402 (0,54)	340 (0,46)				
6890A>C rs7844539		A	C	0,98	0,401	0,526	1,23 (0,65–2,34)
	osteopenia	181 (0,85)	33 (0,15)				
	kontrola	648 (0,87)	96 (0,13)				

W następnym etapie pracy zbadano asocjacje badanych SNP z ryzykiem wystąpienia osteopenii w pięciu modelach genetycznych (kodominujący, dominujący, recesywny, nad-dominujący i logarytmiczny) za pomocą bezwarunkowej analizy regresji logistycznej. Dla żadnego z modeli nie uzyskano statystycznie istotnych wyników (tab. 13.).

Tabela 13. Asocjacje wariantów genu *TNFRSF11B* z osteopenią

SNP	model	kontrola	osteopenia	OR (95%PU)	p	AIC	
163A>G rs3102735	AA	274 (74,3)	83 (77,6)	1,00	0,752	512,8	
	AG	85 (23,0)	21 (19,6)	0,82 (0,48–1,40)			
	GG	10 (2,7)	3 (2,8)	0,99 (0,27–3,68)			
		dominujący	95 (25,7)	24 (22,4)	0,83 (0,50–1,39)	0,482	510,8
		recesywny	359 (97,3)	104 (97,2)	1,04 (0,28–3,83)	0,958	511,3
		nad–dominujący	284 (77,0)	86 (80,4)	0,82 (0,48–1,39)	0,451	510,8
		log–addytywny	369 (77,5)	107 (22,5)	0,88 (0,57–1,36)	0,557	511,0
245T>G rs3134069	TT	310 (85,9)	93 (89,4)	1,00	0,704	498,6	
	TG	49 (13,6)	11 (10,6)	0,75 (0,37–1,50)			
	GG	2 (0,6)	0 (0,0)	—			
		dominujący	51 (14,1)	11 (10,6)	0,72 (0,36–1,44)	0,337	497,4
		recesywny	359 (99,4)	104 (100,0)	—	1,000	497,3
		nad–dominujący	312 (86,4)	93 (89,4)	0,75 (0,38–1,51)	0,413	497,6
		log–addytywny	361 (77,6)	104 (22,4)	0,70 (0,36–1,38)	0,704	497,2
950T>C rs2073617	TT	111 (30,3)	37 (35,9)	1,00	0,504	498,4	
	TC	174 (47,5)	43 (41,7)	0,74 (0,45–1,22)			
	CC	81 (22,1)	23 (22,3)	0,85 (0,47–1,54)			
		Dominujący	255 (69,7)	66 (64,1)	0,78 (0,49–1,23)	0,284	496,6
		Recesywny	285 (77,9)	80 (77,7)	1,01 (0,60–1,71)	0,966	497,8
		nad–dominujący	192 (52,5)	60 (58,3)	0,79 (0,51–1,23)	0,297	496,7
		log–addytywny	366 (78,0)	103 (22,0)	0,90 (0,67–1,22)	0,505	497,3
1181G>C rs2073618	GG	103 (27,8)	31 (29,0)	1,00	0,920	514,2	
	GC	196 (52,8)	57 (53,3)	0,97 (0,59–1,59)			
	CC	72 (19,4)	19 (17,8)	0,88 (0,46–1,67)			
		dominujący	268 (72,2)	76 (71,0)	0,94 (0,59–1,52)	0,807	512,3
		recesywny	299 (80,6)	88 (82,2)	0,90 (0,51–1,57)	0,700	512,2
		nad–dominujący	175 (47,2)	50 (46,7)	1,02 (0,66–1,57)	0,936	512,3
		log–addytywny	371 (77,6)	107 (22,4)	0,94 (0,68–1,29)	0,702	512,2
6890A>C rs7844539	AA	282 (75,8)	76 (71,0)	1,00	0,795	227,7	
	AC	84 (22,6)	29 (27,1)	1,28 (0,61–2,67)			
	CC	6 (1,6)	2 (1,9)	1,24 (0,11–14,02)			
		dominujący	90 (24,2)	31 (29,0)	1,28 (0,62–2,61)	0,499	225,7
		recesywny	366 (98,4)	105 (98,1)	1,16 (0,10–13,08)	0,903	226,1
		nad–dominujący	288 (77,4)	78 (72,9)	1,27 (0,61–2,65)	0,513	225,7
		log–addytywny	372 (36,7)	107 (63,3)	1,24 (0,64–2,38)	0,518	225,7

Grupy kontrolna i osteoporoza

Porównując częstość występowania alleli badanych wariantów genu *TNFRSF11B* w grupach kontrolnej i z osteoporozą zaobserwowano statystycznie istotną różnicę dla rs2073617. AllelC występował częściej u pacjentek z osteoporozą w porównaniu z grupą kontrolną 51% vs. 46%, $p=0,041$; $OR=1,249$; 95%PU: 1,008–1,548. Dla pozostałych wariantów polimorficznych nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w częstości występowania alleli pomiędzy grupą kontrolną i osteoporozą (tabela 8.).

Tabela 14. Częstość występowania alleli polimorfizmów genu *TNFRSF11B* w grupach kontrolnej i z osteoporozą

SNP	Grupa	Allele		Odsetek osób z niebrakującymi genotypami	Chi ²	Pearson's p	OR (95% CI)
		A	G				
163A>G rs3102735	osteoporoza	536(0,85)	94(0,15)	0,988	0,131	0,717	1,057 (0,782~1,428)
	kontrola	633(0,86)	105(0,14)				
245T>G rs3134069	osteoporoza	508(0,93)	36(0,07)	0,918	0,155	0,693	0,894 (0,514~1,556)
	kontrola	669(0,93)	53(0,07)				
950T>C rs2073617	osteoporoza	299 (0,49)	317 (0,51)	0,973	4,139	0,041	1,249 (1,008~1,548)
	kontrola	396 (0,54)	336 (0,46)				
1181G>C rs2073618	osteoporoza	343(0,55)	285(0,45)	0,989	0,026	0,870	0,982 (0,793~1,216)
	kontrola	402(0,54)	340(0,46)				
6890A>C rs7844539	osteoporoza	505 (0,86)	83 (0,14)	0,962	0,100	0,750	1,101 (0,606~2,002)
	kontrola	108 (0,87)	16 (0,13)				

Również w analizie asocjacji wariantów polimorficznych genu *TNFRSF11B* z ryzykiem wystąpienia osteoporozy najciekawsze wyniki uzyskano dla rs2073617. Zaobserwowano w modelu dominującym (*TT* vs. *TC+CC*) przewagę genotypów zawierający zmutowany allelC w grupie z osteoporozą 27,3% vs. 22,1% w kontroli ($OR=1,35$; 95%PU: 0,96–1,90; $p=0,083$; $AIC=930,4$). Najlepszym dla tego wariantu okazał się model log-addytywny $OR=1,24$; 95%PU: 1,00–1,53; $p=0,046$; $AIC=929,4$). Dla pozostałych SNP analiza pojedynczych loci nie wykazała statystycznie istotnych asocjacji z osteoporozą.

Tabela 15. Asocjacje wariantów genu *TNFRSF11B* z osteoporozą

SNP	Model	Kontrola	Osteoporoza	OR (95%PU)	p	AIC	
163A>G rs3102735	AA	274 (74,3)	226 (71,7)	1,00	0,358	947,9	
	AG	85 (23,0)	84 (26,7)	1,20 (0,84–1,70)			
	GG	10 (2,7)	5 (1,6)	0,61 (0,20–1,80)			
		dominujący	95 (25,7)	89 (28,3)	1,14 (0,81–1,59)	0,461	947,4
		recesywny	359 (97,3)	310 (98,4)	0,58 (0,20–1,71)	0,312	946,9
		nad-dominujący	284 (77,0)	231 (73,3)	1,21 (0,86–1,72)	0,273	946,8
		log-addytywny	369 (53,9)	315 (46,1)	1,06 (0,78–1,43)	0,718	947,8
245T>G rs3134069	TT	310 (85,9)	119 (87,5)	1,00	0,846	589,0	
	TG	49 (13,6)	16 (11,8)	0,85 (0,47–1,55)			
	GG	2 (0,6)	1 (0,7)	1,30 (0,12–14,50)			
		dominujący	51 (14,1)	17 (12,5)	0,87 (0,48–1,56)	0,635	587,1
		recesywny	359 (99,4)	135 (99,3)	1,33 (0,12–14,78)	0,820	587,3
		nad-dominujący	312 (86,4)	120 (88,2)	0,85 (0,46–1,55)	0,590	587,0
		log-addytywny	361 (72,6)	136 (27,4)	0,90 (0,52–1,55)	0,693	587,2
950T>C rs2073617	TT	111 (30,3)	75 (24,4)	1,00	0,135	931,4	
	TC	174 (47,5)	149 (48,4)	1,27 (0,88–1,83)			
	CC	81 (22,1)	84 (27,3)	1,53 (1,01–2,34)			
		dominujący	255 (69,7)	233 (75,6)	1,35 (0,96–1,90)	0,083	930,4
		recesywny	285 (77,9)	224 (72,7)	1,32 (0,93–1,88)	0,122	931,0
		nad-dominujący	192 (52,5)	159 (51,6)	1,03 (0,76–1,40)	0,829	933,3
		log-addytywny	366 (54,3)	308 (45,7)	1,24 (1,00–1,53)	0,046	929,4
1181G>C rs2073618	GG	103 (27,8)	89 (28,3)	1,00	0,985	950,8	
	GC	196 (52,8)	165 (52,5)	0,97 (0,69–1,38)			
	CC	72 (19,4)	60 (19,1)	0,96 (0,62–1,50)			
		dominujący	268 (72,2)	225 (71,7)	0,97 (0,70–1,36)	0,866	948,8
		recesywny	299 (80,6)	254 (80,9)	0,98 (0,67–1,44)	0,921	948,9
		nad-dominujący	175 (47,2)	149 (47,5)	0,99 (0,73–1,34)	0,941	948,9
		log-addytywny	371 (54,2)	314 (45,8)	0,98 (0,79–1,22)	0,866	948,8
6890A>C rs7844539	AA	282 (75,8)	217 (73,8)	1,00	0,948	290,4	
	AC	84 (22,6)	71 (24,2)	1,09 (0,55–2,15)			
	CC	6 (1,6)	6 (2,0)	1,30 (0,14–11,89)			
		dominujący	90 (24,2)	77 (26,0)	1,10 (0,57–2,14)	0,773	288,5
		recesywny	366 (98,4)	288 (98,0)	1,27 (0,14–11,59)	0,828	288,5
		nad-dominujący	288 (77,4)	223 (76,0)	1,08 (0,55–2,13)	0,821	288,5
		log-addytywny	372 (54,0)	294 (46,0)	1,10 (0,61–2,00)	0,750	288,4

5.1.5. Analiza nierównowagi sprzężeń i częstości występowania haplotypów analizowanych wariantów genu *TNFRSF11B*

Wykorzystano program Haploview 4.2 [151] do analizy nierównowagi sprzężeń (LD) pomiędzy badanymi wariantami genu *TNFRSF11B* oraz częstości występowania haplotypów badanych wariantów genu *TNFRSF11B*.

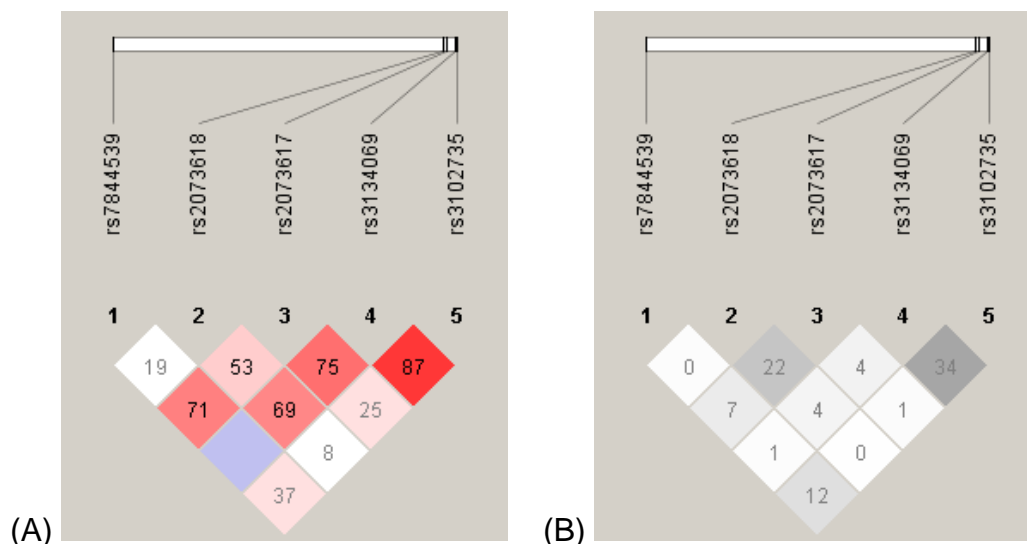
Tabela 16. Statystyki siły nierównowagi sprzężeń pomiędzy analizowanymi wariantami genu *TNFRSF11B*

SNP1	SNP2	D'	LOD	r ²	Odległość w pz
rs7844539	rs2073618	0,193	0,52	0,008	25327
rs7844539	rs2073617	0,712	6,47	0,077	25558
rs7844539	rs3134069	1,0	1,08	0,01	26263
rs7844539	rs3102735	0,373	8,5	0,124	26345
rs2073618	rs2073617	0,539	42,57	0,224	231
rs2073618	rs3134069	0,696	4,89	0,043	936
rs2073618	rs3102735	0,089	0,18	0,001	1018
rs2073617	rs3134069	0,751	9,3	0,048	705
rs2073617	rs3102735	0,254	2,25	0,012	787
rs3134069	rs3102735	0,876	41,12	0,346	82

Analizę nierównowagi sprzężeń przeprowadzono dla całej badanej grupy 802 pacjentek. Odległość pomiędzy analizowanymi SNP genu *TNFRSF11B* wynosi tylko 82 para zasad wariantów rs3134069 i rs3102735, natomiast rs7844539 i rs3102735 dzieli ponad 26 kbp (dokładnie 26345 par zasad). Uzyskane statystyki: D' Lewontina, logarytm szans (LOD — ang. *logarithm of the odds*) oraz współczynniki korelacji r² pomiędzy polimorficznymi wariantami zestawiono w tabeli 10 oraz przedstawiono na rycinie 2.

Asocjacje haplotypów genu *TNFRSF11B* z osteopenią i osteoporozą przeprowadzono dla czterech wariantów polimorficznych. Wariant rs7844539 został wyłączony z analizy ze względu na słabe sprzężenie z pozostałymi polimorfizmami. Uzyskane asocjacje przedstawia tabela 11, a litery w haplotypach oznaczają odpowiednio: pierwsza — allel polimorfizmu rs2073618, druga — rs2073617, trzecia — rs3134069 i czwarta — rs3102735. W grupie kontrolnej najczęściej występował haplotyp *CTTA*. Haplotyp *GCTA* występował u 32,4% pacjentek z grupy kontrolnej i u 40,7% z osteoporozą (p=0,0078). Natomiast haplotyp *GTTA* występował rzadziej w grupie pacjentek z osteoporozą w porównaniu z grupą kontrolną (7,6% vs. 12,1%, p=0,0171). Statystycznie istotne różnice zaobserwowano również w częstości

występowania haplotypu *CCTA* pomiędzy grupą kontrolą a osteopenią ($p=0,0083$) oraz osteoporozą ($p=0,0022$). Przeprowadzony został również test 10000 permutacji, który podniósł wartość poziomu istotności p . Uzyskane w tym teście wartości p zostały przedstawione w tabeli 11 w nawiasach przy odpowiednich statystycznie istotnych wartościach. Test potwierdził statystycznie istotne asocjacje haplotypów *CCTA* i *GCTA* z osteoporozą (odpowiednio $p=0,0132$ i $p=0,0467$).



Rycina 16. Analiza nierównowagi sprzężeń pomiędzy pięcioma analizowanymi w pracy SNP genu *TNFRSF11B* w całej grupie 802 pacjentek. Sprzężenie pomiędzy SNP oceniono na podstawie wartości D' i r^2 .

(A) wartości D' po lewej stronie. $D'=1$ oznacza pełne sprzężenie (linkagedisequilibrium), $D'=0$ oznacza brak sprzężenia czyli równowagę sprzężeń (linkageequilibrium). (B) r^2 po prawej stronie. $r^2=1$ oznacza pełne sprzężenie, $r^2>0,33$ oznacza silne sprzężenie, a $r^2=0$ równowagę sprzężeń.

Tabela 17. Wyniki asocjacji haplotypów genu *TNFRSF11B* z osteopenią i osteoporozą

haplotyp*	Frekwencja w grupie			Osteopenia vs, kontrola	Osteoporozą vs, kontrola
	grupa kontrolna	osteopenia	osteoporozą	Chi ² p	Chi ² p
CTTA	0,346	0,380	0,358	0,5531	0,7774
GCTA	0,324	0,352	0,407	0,5191	0,0078 (0,0467)
GTTA	0,121	0,143	0,076	0,3454	0,0171 (0,0981)
GTTG	0,063	0,041	0,062	0,4069	0,8409
CCTA	0,055	0,001	0,011	0,0083 (0,0608)	0,0022 (0,0132)
CCGG	0,048	0,060	0,064	0,6116	0,3317
GCTG	0,014	0,025	0,011	0,8498	0,5419

* rs2073618/rs2073617/rs3134069/rs3102735. W nawiasach wartość p po teście 10000 permutacji.

5.1.6. Asocjacje danych klinicznych z badanymi wariantami polimorficznymi

W tabeli 12 przedstawiono wyniki asocjacji średnich wartości danych klinicznych i densytometrycznych pacjentek dla poszczególnych genotypów badanych wariantów genu *TNFRSF11B* w wyodrębnionych ze względu na wartość T-score grupach kobiet.

Statystycznie istotne okazały się różnice pomiędzy średnimi masy urodzeniowej noworodków a genotypami wariantu *245T>G*(rs3134069) w grupie kobiet z osteoporozą ($p=0,028$; post hoc test: *TG-GG* $p=0,026$, *TT-GG* $p=0,030$, *TT-TG* $p=0,784$) oraz genotypami *1181G>C* (rs2073618) w grupie kontrolnej ($p=0,044$; post hoc test: *GC-GG* $p=0,035$, *GG-CC* $p=0,679$, *CC-GC* $p=0,430$).

Średnia wartość T-score u pacjentek z osteoporozą różniła się pomiędzy genotypami polimorfizmu *1181G>C* (rs2073618) i wynosiła średnio $1,21\pm 0,55$ dla genotypu *GG* oraz $1,83\pm 0,61$ dla heterozygot *GC* oraz $1,61\pm 0,92$ genotypu *CC* (Anova $p=0,020$, post hoc: *GC-GG* $p=0,015$, *GG-CC* $p=0,256$, *CC-GC* $p=0,545$).

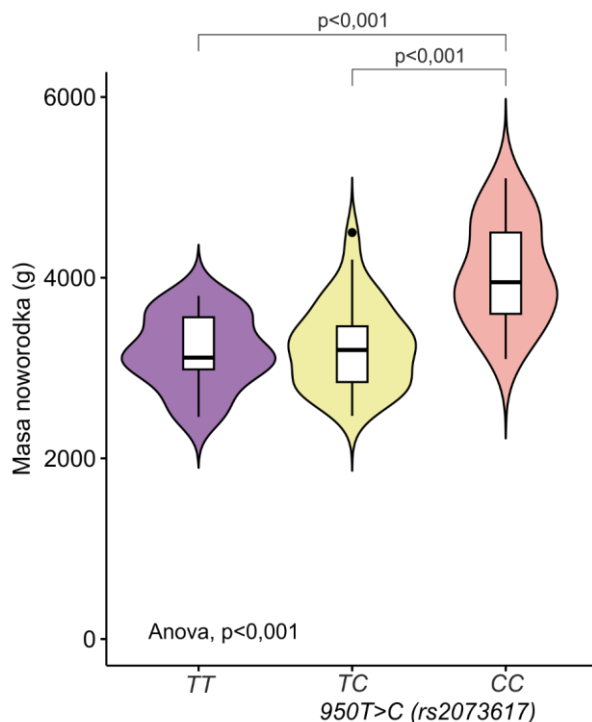
Jednak najciekawsze wyniki uzyskano dla rs3102735 (*950T>C*). Dla całej badanej populacji kobiet średnia masa urodzeniowa noworodków matek z genotypem *CC* wynosiła 4056,47 g i była znacząco statystycznie wyższa od średniej 3238,33 g kobiet z genotypem heterozygotycznym *TC* ($p<0,001$) oraz 3177,69 g z genotypem *TT* ($p<0,001$). Różnica pomiędzy średnimi dla genotypów *TC* i *TT* nie była statystycznie istotna i wynosiła $p=0,872$ (rycina 17.). Po podziale na grupy badane w pracy różnice zaobserwowano dla kobiet z osteoporozą (Anova $p=0,001$; post hoc test: *TC-CC* $p=0,0004$, *TT-CC* $p=0,002$, *TT-TC* $p=0,669$) oraz dla grupy kontrolnej (Anova $p=0,006$; post hoc test: *TC-CC* $p=0,033$, *TT-CC* $p=0,011$, *TT-TC* $p=0,457$). Dla pacjentek z osteopenią różnica nie była statystycznie istotna ($p=0,075$), jednak średnia masa noworodków matek z genotypem *CC* była również najwyższa wynosząc $3850,00\pm 705,34$ g, a z genotypem *TT* najniższa $3198,57\pm 349,90$ g (post hoc test: *TC-CC* $p=0,091$, *TT-CC* $p=0,066$, *TT-TC* $p=0,957$).

Tabela 18. Średnie±SD wartości danych klinicznych i densytometrycznych pacjentek dla poszczególnych genotypów polimorfizmów genu *TNFRSF11B* w badanych grupach

Grupa	Kontrola (n=375)				Osteopenia (n=110)				Osteoporoza (n=317)			
	AA (N=274)	AG (N=85)	GG (N=10)	p	AA (N=83)	AG (N=21)	GG (N=3)	p	AA (N=226)	AG (N=84)	GG (N=5)	p
163A>G rs3102735												
Masa ciała (kg)	67,61 ±11,77	74,64 ±14,68	76,80 ±10,38	0,091	65,68 ±9,87	64,67 ±15,50	61,33 ±5,69	0,764	60,89 ±9,16	61,95 ±8,75	61,33 ±13,87	0,900
BMI (kg/m ²)	25,62±4,56	27,31±4,93	28,45±4,11	0,276	24,64±3,35	24,81±5,81	23,16±1,93	0,793	23,62±3,04	24,25±3,16	24,59±5,10	0,661
Masa noworodka (g)	3806,11 ±515,61	3280,00 ±715,82	3250,00 ±700,71	0,089	3207,27 ±405,85	3270,00 ±427,78	3850,00 ±705,34	0,074	3274,29 ±547,52	2730,00 ±201,49	3700,00 ±1053,57	0,116
BMD L2–L4 (g/cm ²)	1,21±0,10	1,20±0,05	1,24±0,14	0,676	0,98±0,05	0,98±0,06	0,95±0,01	0,687	0,82±0,07	0,81±0,06	0,80±0,11	0,591
BMD L2–L4 YA (%)	100,60 ±8,48	99,70 ±4,55	103,60 ±11,78	0,684	81,81 ±4,34	81,89 ±5,10	79,67 ±1,53	0,710	68,72 ±5,19	67,38 ±5,31	66,67 ±8,50	0,531
BMD L2–L4 AM (%)	108,96 ±10,47	106,20 ±7,63	110,80 ±17,20	0,685	89,16 ±6,72	89,84 ±7,07	88,33 ±3,79	0,898	78,62 ±7,72	76,48 ±5,10	76,00 ±1,73	0,436
T-score	0,08±0,96	-0,08±0,45	0,36±1,17	0,669	-1,79±0,43	-1,80±0,50	-2,04±0,12	0,615	-3,11±0,53	-3,26±0,55	-3,34±0,87	0,445
Z-score	0,70±1,16	0,75±0,42	0,30±1,43	0,821	-0,81±0,68	-0,97±0,65	-0,77±0,04	0,714	-1,59±0,68	-1,73±0,84	-2,06±0,33	0,457
245T>G rs3134069												
Masa ciała (kg)	68,24 ±12,29	76,00 ±15,28	74,00 ±14,14	0,278	65,96 ±10,18	61,45 ±8,54	—	0,163	61,51 ±9,18	59,90 ±8,58	46,00 ±NA	0,222
BMI (kg/m ²)	25,70±4,50	27,25±6,14	26,34±2,34	0,704	24,83±3,55	23,57±3,24	—	0,265	23,91±3,08	22,92±3,26	19,14±NA	0,217
Masa noworodka (g)	3685,26 ±643,39	3356,00 ±617,80	4000,00 ±141,42	0,422	3214,62 ±398,90	3510,00 ±696,78	—	0,191	3192,00 ±582,57	2960,00 ±165,23	4800,00 ±NA	0,028

Grupa	Kontrola (n=375)				Osteopenia (n=110)				Osteoporoza (n=317)			
BMD L2–L4 (g/cm ²)	1,21±0,10	1,22±0,11	1,23±0,19	0,957	0,98±0,05	0,97±0,05	—	0,543	0,82±0,07	0,81±0,07	0,69±NA	0,151
BMD L2–L4 YA (%)	100,76 ±8,09	101,33 ±8,96	102,00 ±15,56	0,969	81,95 ±4,37	81,00 ±4,37	—	0,519	68,45 ±5,23	67,70 ±5,87	58,00 ±NA	0,147
BMD L2–L4 AM (%)	109,04 ±10,45	106,83 ±13,89	107,50 ±21,92	0,889	89,46 ±6,79	89,00 ±5,66	—	0,839	78,41 ±7,53	75,70 ±4,47	77,00 ±NA	0,540
T-score	0,10±0,92	0,04±0,86	0,22±1,56	0,970	-1,77±0,43	-1,92±0,41	—	0,304	-3,14±0,53	-3,25±0,60	-4,24±NA	0,118
Z-score	0,74±1,10	0,21±1,54	0,71±1,75	0,712	-0,84±0,68	-0,86±0,52	—	0,938	-1,64±0,68	-1,61±1,05	-1,74±NA	0,985
950T>C rs2073617	TT (n=111)	TC (n=174)	CC (n=81)	p	TT (n=37)	TC (n=43)	CC (n=23)	p	TT (n=75)	TC (n=149)	CC (n=84)	p
Masa ciała (kg)	64,13 ±8,68	70,77 ±13,65	72,00 ±12,79	0,155	65,08 ±10,25	66,42 ±11,52	67,00 ±12,23	0,791	62,30 ±9,95	62,23 ±7,89	57,10 ±9,15	0,090
BMI (kg/m ²)	24,36±2,56	26,68±5,42	26,34±4,46	0,277	24,90±3,41	24,86±4,36	24,72±4,40	0,985	24,16±3,43	24,22±2,79	22,34±2,80	0,067
Masa noworodka (g)	3065,00 ±676,93	3430,00 ±403,98	4009,17 ±553,10	0,006	3198,57 ±349,90	3244,67 ±460,67	3850,00 ±705,34	0,075	3197,50 ±375,57	3018,00 ±496,79	4650,00 ±212,13	0,001
BMD L2–L4 (g/cm ²)	1,19±0,05	1,20±0,11	1,25±0,11	0,152	0,98±0,05	0,97±0,06	0,99±0,05	0,568	0,82±0,08	0,82±0,05	0,81±0,07	0,618
BMD L2–L4 YA (%)	98,93±4,60	99,68±9,33	104,06±8,96	0,160	82,00±4,22	81,14±4,80	82,29±4,10	0,591	68,57±6,36	68,60±3,80	67,15±5,79	0,589
BMD L2–L4 AM (%)	104,71 ±7,86	108,24 ±10,47	112,00 ±13,03	0,180	89,17 ±7,13	88,89 ±6,62	91,12 ±5,74	0,504	78,50 ±8,24	77,00 ±5,50	78,45 ±8,02	0,679
T-score	-0,16±0,49	0,04±1,09	0,36±0,90	0,266	-1,81±0,41	-1,81±0,49	-1,77±0,36	0,944	-3,12±0,65	-3,13±0,38	-3,28±0,58	0,537
Z-score	0,56±0,73	0,53±0,89	0,81±1,48	0,809	-0,83±0,66	-0,98±0,67	-0,42±0,42	0,079	-1,65±0,69	-1,72±0,79	-1,49±0,76	0,635
1181G>C rs2073618	GG (n=103)	GC (n=196)	CC (n=72)	p	GG (n=31)	GC (n=57)	CC (n=19)	p	GG (n=89)	GC (n=165)	CC (n=60)	p
Masa ciała (kg)	71,25 ±11,54	68,65 ±13,17	67,69 ±12,47	0,645	66,17 ±10,52	64,73 ±10,06	65,89 ±14,72	0,828	58,35 ±10,17	62,78 ±8,05	60,32 ±9,88	0,170

Grupa	Kontrola (n=375)				Osteopenia (n=110)				Osteoporoza (n=317)			
BMI (kg/m ²)	26,62±4,29	26,03±5,16	25,05±3,85	0,621	24,62±3,49	24,38±3,60	25,40±5,31	0,622	23,21±3,27	24,17±2,70	23,56±3,76	0,476
Masa noworodka (g)	3958,18 ±603,14	3364,55 ±503,71	3720,00 ±303,32	0,044	3166,00 ±273,82	3319,50 ±534,86	3254,29 ±366,87	0,801	3523,33 ±1017,17	3166,15 ±643,05	3226,00 ±382,92	0,697
BMD L2–L4 (g/cm ²)	1,24±0,10	1,18±0,10	1,20±0,08	0,095	0,98±0,06	0,98±0,05	0,98±0,05	0,956	0,84±0,06	0,81±0,06	0,81±0,08	0,411
BMD L2–L4 YA (%)	103,25±8,11	98,32±8,52	99,75±6,65	0,102	82,00±4,73	81,76±4,35	81,44±4,49	0,924	69,50±4,74	67,91±5,25	68,00±6,03	0,520
BMD L2–L4 AM (%)	111,42 ±10,80	106,60 ±11,19	106,00 ±8,69	0,203	89,04 ±8,01	89,62 ±6,39	88,61 ±5,75	0,846	80,30 ±7,92	77,18 ±6,31	77,47 ±7,60	0,243
T-score	0,33±0,81	0,09±1,03	0,09±0,69	0,194	1,75±0,44	1,81±0,44	1,86±0,42	0,703	3,02±0,47	3,21±0,52	3,15±0,63	0,430
Z-score	0,85±1,23	0,44±1,08	0,41±0,95	0,565	0,71±0,71	0,85±0,69	0,96±0,49	0,625	1,21±0,55	1,83±0,61	1,61±0,92	0,020
6890A>C rs7844539	AA (n=282)	AC (n=84)	CC (n=6)	p	AA (n=76)	AC (n=29)	CC (n=2)	p	AA (n=217)	AC (n=71)	CC (n=6)	p
Masa ciała (kg)	68,62 ±12,24	68,36 ±13,43	67,00 ±NA	0,990	66,16 ±11,96	64,38 ±9,59	62,00 ±4,24	0,697	61,34 ±9,18	58,83 ±8,08	69,33 ±14,01	0,172
BMI (kg/m ²)	25,74±4,541	26,32±5,30	26,17±NA	0,921	24,85±4,24	24,56±3,47	23,82±2,67	0,898	23,92±3,01	23,01±3,45	25,31±3,44	0,38
Masa noworodka (g)	3715,00 ±447,98	3388,00 ±537,88	3260 ±NA	0,200	3265,50 ±427,22	3336,00 ±587,41	3165,00 ±91,92	0,873	3359,29 ±660,11	2680,00 ±296,98	3250,00 ±777,82	0,407
BMD L2–L4 (g/cm ²)	1,20±0,11	1,20±0,06	1,38±NA	0,214	0,98±0,06	0,97±0,05	0,95±0,02	0,434	0,81±0,07	0,81±0,06	0,86±0,04	0,564
BMD L2–L4 YA (%)	100,39±8,84	99,62±4,99	115,00±NA	0,197	82,10±4,61	81,14±4,18	78,50±2,12	0,381	68,00±5,48	67,81±5,05	71,33±3,79	0,563
BMD L2–L4 AM (%)	109,22 ±10,61	105,92 ±8,92	125,00 ±NA	0,176	88,73 ±6,69	90,50 ±6,60	91,00 ±5,66	0,474	77,53 ±7,37	79,44 ±6,15	79,67 ±8,96	0,593
T-score	0,06±0,99	-0,08±0,51	1,47±NA	0,261	-1,77±0,45	-1,87±0,42	-2,11±0,20	0,367	-3,19±0,57	-3,17±0,50	-2,87±0,37	0,609
Z-score	0,63±1,21	0,70±0,73	0,67±NA	0,883	0,89±0,68	0,76±0,63	1,14±NA	0,710	1,64±0,75	1,59±0,66	1,80±0,86	0,900

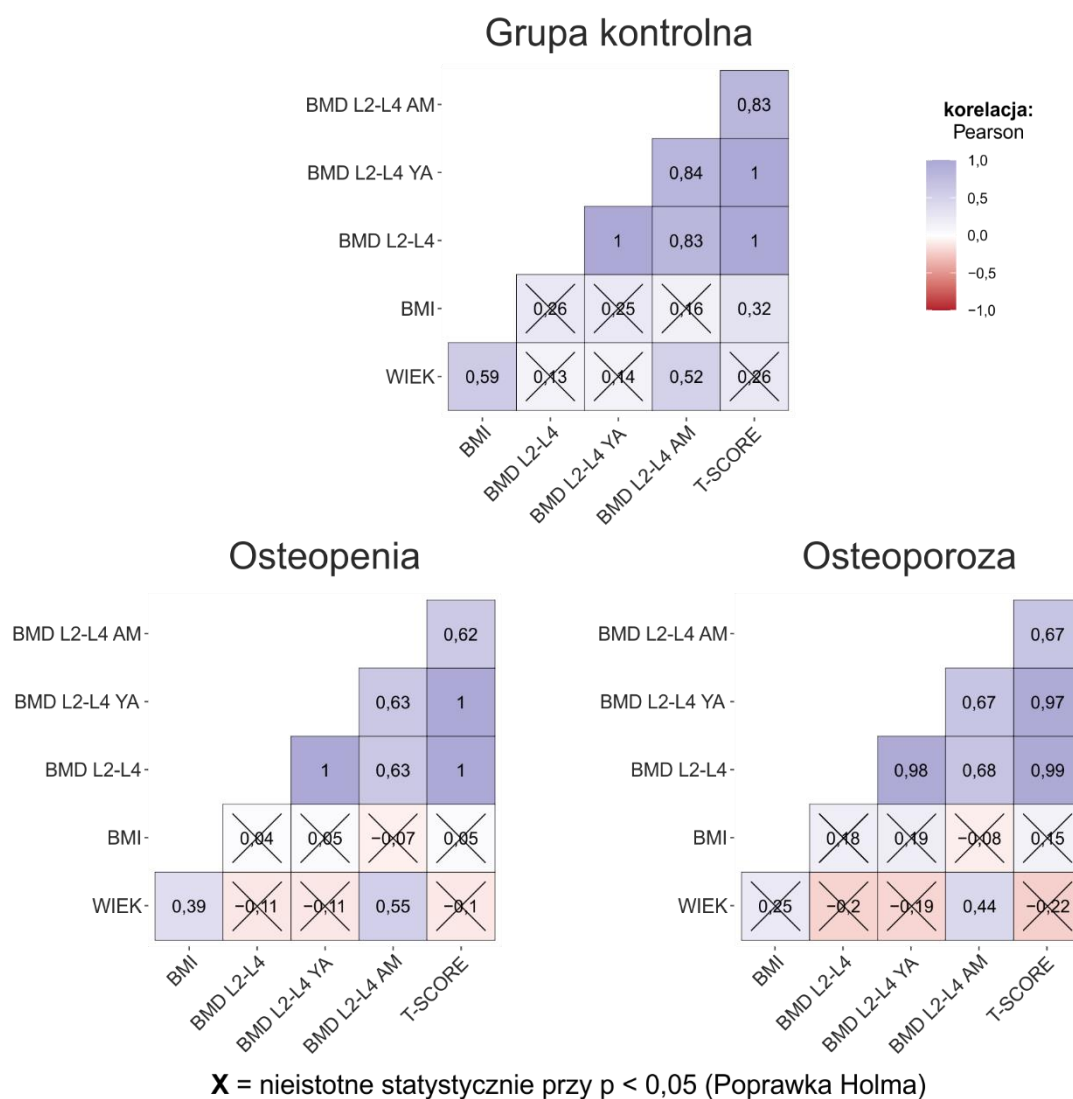


Rycina 17. Porównanie średnich mas noworodków w zależności od genotypów matek dla wariantu rs2073617(950T>C) dla całej badanej grupy kobiet.

5.1.7. Korelacje danych densytometrycznych z wiekiem i BMI pacjentek

W ostatnim etapie pracy oceniano korelacje wieku i BMI pacjentek z badanymi grupami z uzyskanymi w badaniu densytometrycznym parametrami. Stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy wiekiem i BMI kobiet z grupy kontrolnej ($r=0,59$; $p<0,001$), z osteopenią ($r=0,39$; $p<0,001$) oraz osteoporozą ($r=0,25$; $p=0,158$).

Wszystkie analizowane dane densytometryczne we wszystkich grupach wykazywały wzajemnie statystycznie istotne, jak również co oczywiste wartości BMD w porównaniu ze średnią dla danego wieku (BMD L2-L4 AM) wykazywały silną korelację z wiekiem pacjentek. Nie stwierdzono natomiast istotnych korelacji pomiędzy badanymi parametrami densytometrycznymi a wskaźnikiem masy ciała BMI. Jedyną statystycznie istotną obserwacją była korelacja pomiędzy BMI, a T-score w grupie kontrolnej ($r=0,32$; $p=0,046$) (Rycina 18.).



Rycina 18. Korelacje danych densytometrycznych z wiekiem i BMI pacjentek w poszczególnych grupach kobiet.

6. Dyskusja

6.1. Genetyczne uwarunkowania osteoporozy

Ryzyko wystąpienia złożonych, wieloczynnikowych schorzeń, jaką jest m.in. osteoporoza, jest silnie uwarunkowane genetycznie. Naukowcy w ostatnich dekadach poszukiwali, konkretnych genów predysponujących do tej choroby. Badania asocjacyjne całego genomu (ang. GWAS) zrewolucjonizowały podejście to tego tematu. Metoda bada cały genom w poszukiwaniu regionów, w których warianty sekwencji DNA wpływają na ryzyko wystąpienia choroby. Ustalenia GWAS mogą mieć kilka implikacji. Mogą być wykorzystane do identyfikacji osób, które są w grupie podwyższonego ryzyka wystąpienia osteoporozy albo rzucić światło na mechanizmy, które leżą u podstaw powstawania choroby. Daje to możliwość nie tylko poszerzenia wiedzy na temat choroby, ale może również potencjalnie przyczynić się do opracowania nowych metod leczenia. Informacje uzyskane z tych badań mogą również być wykorzystane do precyzyjnego dopasowania leku do pacjenta, w celu uzyskania lepszych efektów lub zmniejszenia działań niepożądanych [152].

Genom każdego człowieka jest inny. Różnice mogą polegać na istnieniu nadmiarowego fragmentu (insercja), brakujących fragmentów (delecja) lub mogą występować mutacje pojedynczych nukleotydów. Gdy dana mutacja występuje u więcej niż 1% populacji, nazywa się ją polimorfizmem pojedynczego nukleotydu. W dużym badaniu obejmującym 19 000 osób, Richards et al. ocenili 36 000 polimorfizmów pojedynczych nukleotydów w 150 enach kandydujących, czyli takich, które mogą być potencjalna przyczyną osteoporozy. Tylko dziewięć genów (TNFRSF11A, TNFRSF11B, ESR1, LRP5, SOST, LRP4, SPP1, ITGA1 i TNFSF11) wykazało silną korelację z gęstością mineralną szyjki kości udowej lub kręgosłupa lędźwiowego, a kolejne cztery geny (LRP5, SPP1, SOST, i TNFRSF11A) były związane z ryzykiem złamań [145].

Przedmiotem niniejszej pracy była analiza wpływu w patogenezie osteoporozy pięciu polimorfizmów genu OPG *TNFRSF11B* — 163A>G (rs3102735), 245 T>G (rs3134069), 950 T>C (rs2073617), 6890 A>C (rs7844639), znajdujących się w regionie promotora oraz 1181G>C (rs2073618), znajdującego się na pierwszym eksonie. Zbadano ich wpływ zarówno na osteoporozę, jak i osteopenię. Polimorfizmy 163A>G, 245 T>G, 950 T>C, 1181G>C występowały częściej u kobiet u których zaobserwowano osteopenię, jednak nie były to wyniki istotne statystycznie. Natomiast analizując dane zebrane od pacjentek chorujących na

osteoporozę zauważono istotną statystycznie różnicę dla polimorfizmu 950 T>C. Kobiety o genotypie CC i TC chorowały o 5% częściej od osób o genotypie TT. Z kolei sprawdzając potencjalnie asocjacje czterech haplotypów genu OPG wykazano istotne związki haplotypów CCTA i GCTA z występowaniem osteoporozy, gdzie litery oznaczają po kolei: pierwsza — allel polimorfizmu rs2073618, druga — rs2073617, trzecia — rs3134069 i czwarta — rs3102735. Dodatkowo statystycznie istotne różnice zaobserwowano również w częstości występowania haplotypu CCTA pomiędzy grupą kontrolą a osteopenią.

Analizując inne dane kliniczne uzyskane w badaniu zauważono również istotne statystycznie różnice pomiędzy średnimi masy urodzeniowej noworodków a genotypami wariantu 245 T>G w grupie kobiet z osteoporozą i genotypami 1181 G>C w grupie kontrolnej. Średnia wartość T-Score, u pacjentek z osteoporozą różniła się między genotypami wariantu 1181 G>C. Heterozygoty i homozygoty CC miały wyższą masę kostną, co wydaje się być zgodne z badaniami przeprowadzonymi przez Abdi et al. [153]. Natomiast nie występującą wcześniej w literaturze istotną statystycznie zależnością okazał się wpływ polimorfizmu 950 T>C na masę urodzeniową noworodków. Dzieci kobiet z genotypem CC miały znacząco większą masę urodzeniową w porównaniu z dziećmi matek o genotypie TC i TT.

6.2. Udział badanych polimorfizmów genu OPG w etiopatogenezie osteoporozy

Osteoporoza jest najpowszechniejszą chorobą kości charakteryzującą się zmniejszoną gęstością kości i zwiększonym ryzykiem złamań. Wiele badań wykazało, że genetyka jest jednym z najważniejszych czynników ryzyka tej choroby [154]. Gen OPG jest jednym z takich genów, który był badany pod kątem jego potencjalnego udziału w etiologii osteoporozy. OPG jest białkiem, które reguluje resorpcję kości poprzez hamowanie aktywności osteoklastów, czyli komórek, które rozkładają tkankę kostną. Polimorfizmy w genie OPG mogą zmieniać ekspresję lub funkcję białka OPG, co może wpływać na remodeling kości i potencjalnie prowadzić do osteoporozy.

W badaniu autorskim nie wykazano żadnego wpływu polimorfizmu 163A>G na frekwencję występowania osteopenii i osteoporozy. Wydaje się być to zgodne z badaniami przeprowadzonymi przez Wu et al., których badaną grupą były kobiety po menopauzie, ze szczególnym uwzględnieniem kobiet chorych na osteoporozę, zaobserwowali, że polimorfizm ten nie ma wpływu na masę kostną ani u kobiet z osteoporozą pomenopauzalną, ani u zdrowych kobiet po menopauzie [155]. Podobnie, w 2008 roku w Hiszpanii García-Unzueta et al. nie znaleźli zależności między polimorfizmem 163A>G a zmniejszoną masą kostną u kobiet [156].

W 2012 roku Brambila-Tapia et al. badali znaczenie polimorfizmu 163A>G w u meksykańskich kobiet z reumatoidalnym zapaleniem stawów i osteoporozą. Nie zaobserwowali żadnych istotnych statystycznie zależności [157]. Podobnie w polskich badaniach z 2015 roku przeprowadzonych przez Boroń et al., gdzie badano wpływ różnych polimorfizmów genów OPG na T-score, nie stwierdzono aby polimorfizm 163A>G miał wpływ na wyniki badanych kobiet [158]. Przedmiotem brazylijskich badań z 2014 roku był związek poziomu RANKL i OPG w surowicy ze złamaniami kręgow i gęstością mineralną kości u kobiet chorujących na toczeń rumieniowaty układowy. Dane uzyskane przez badaczy nie wykazały statystycznie istotnych zależności [159]. Z kolei z wyników badań przeprowadzonych w 2017 roku przez Mydlarova Blascakova et al. wykazano istotne różnice pomiędzy gęstością mineralną kości wśród badanych o genotypach AA i GG ($p<0,05$) w grupie kontrolnej oraz genotypami AA i AG ($p<0,01$) w grupie osteoporotycznej jednak nie stwierdzono istotności statystycznej w reprezentowanych genotypach pomiędzy grupą kontrolną a osteoporotyczną [160]. Podobnie, w 2021 r. Abdi et al. stwierdzili, że polimorfizm 163A>G nie jest potencjalnie czynnikiem ryzyka osteoporozy pomenopauzalnej, koreluje natomiast z BMD kobiet już chorych na osteoporozę [153].

Istnieje również szereg badań wskazujących na związek tego polimorfizmu z występowaniem osteoporozy. Pierwszymi były przeprowadzone na populacji duńskiej w 2002 roku przez Langdahl et al., gdzie badacze zasugerowali, że polimorfizm 163A>G może mieć wpływ zarówno na osteoporozę, jak i występowanie złamań, ponieważ występowanie tego polimorfizmu korelowało z masą kostną [161]. W innym badaniu duńskich kobiet po menopauzie z 2004 roku, Jorgensen et al. zauważyli istotny wpływ polimorfizmu 163A>G w regionie promotora OPG na masę kostną i ilość złamań, niezależnie od poziomu osteoprotegeryny w surowicy [162]. W 2006 roku nad problemem pochyliły się dwie grupy naukowców z Chin. Hsu et al. stwierdzili, że genotyp GG polimorfizmu 163A>G pozytywnie korelował z całkowitym BMD w badaniu populacyjnym, jednak było to badanie przeprowadzone wśród mężczyzn [163]. Pierwsze polskie badania na ten temat przeprowadzone zostały w 2009 roku przez Seremak-Mrozikiewicz et. al., w którym objęto 310 niespokrewnionych kobiet. Wnioskiem naukowców było to, że wariant może mieć znaczenie dla rozwoju osteoporozy w grupie osteoporotycznych kobiet, jednak sami badacze przyznali, że niezbędne są dalsze badania w tym kierunku, ze szczególnym uwzględnieniem potencjalnego wpływu innych czynników [164]. Natomiast badania wykonane na grupie 200 kobiet w tym 2012 roku w Egipcie przez Hussien et al. wskazały, że homozygotyczny genotyp GG występujący przy polimorfizmie 163A>G istotnie zwiększał ryzyko osteoporozy [165].

W 2016 roku w chorwackim badaniu stwierdzono, że kobiety po menopauzie z osteoporozą miały częściej genotyp AG niż kobiety bez osteoporozy, co może sugerować, że polimorfizm 163A>G ma wpływ na większą utratę masy kostnej u kobiet po menopauzie. Jednak jak sami autorzy zauważają, że liczba osób przez nich zbadanych jest zbyt mała aby móc wysnuć jednoznaczne wnioski [166].

Obszerna metaanaliza wykonana w 2022 roku przez Han et al., gdzie przeanalizowano wyniki większości powyższych badań jak i poprzednio wykonane metaanalizy wykazała, że wszystkie znaczące zależności między polimorfizmami OPG 163A>G a zwiększonym ryzykiem osteoporozy były raczej wynikami niejednoznaczными, co pokrywa się z wynikami uzyskanymi w przeprowadzonym eksperymencie [167].

W badaniu autorskim nie wykazano również wpływu polimorfizmu genu 245 T>G na występowanie osteoporozy i osteopenii. Podobne wnioski wyciągnęli Wu et al., którzy sprawdzili związek między ilością tkanki tłuszczowej, polimorfizmem 245 T>G a występowaniem osteoporozy. Zauważyli, że masa kostna kobiet po menopauzie chorych na osteoporozę była znacząco niższa niż kobiet zdrowych po menopauzie. Natomiast procent masy tłuszczowej ciała kobiet z osteoporozą był również znacząco niższy niż u kobiet zdrowych. Jednak sam polimorfizm 245 T>G nie ma żadnego wpływu na BMD zarówno u osteoporotycznych kobiet po menopauzie, jak i kobiet zdrowych [168]. Podobnie badania przeprowadzone przez Kim et al. na koreańskiej populacji kobiet wykazały brak wpływu tego polimorfizmu zarówno na masę kostną, jak i same poziomy osteoprotegeryny we krwi [169]. Również badania przeprowadzone w 2011 roku przez Mencej-Bedrac et al. nie wykazały wpływu 245 T>G na poziom OPG w surowicy. W badaniu tym wykazano również, że polimorfizm ten nie może być uznany za czynnik genetycznej podatności na osteoporozę pomenopauzalną i nie ma wpływu na gęstość mineralną kości [170]. W 2015 roku Zavala-Cerna et al. badali polimorfizm osteoprotegeryny 245 T>G w populacji meksykańskiej z reumatoidalnym zapaleniem stawów i osteoporozą, nie znajdując przy tym żadnej znaczącej statystycznie korelacji [171]. Cvijetic et al. również nie znaleźli żadnego wpływu tego polimorfizmu ani na masę kostną ani na częstotliwość występowania osteoporozy [166].

Istnieje również kilka publikacji wskazujących na związek tej zmiany z osteoporozą i związaną z nią złamaniami. W przypadku polimorfizmu 245 T>G, pierwszym badaczem szukającym korelacji ze zmniejszoną masą kostną i osteoporozą byli Langdahl et al. wykazał on że polimorfizm ten jest związany z występowaniem złamań osteoporotycznych [161]. Innymi badaniami, w których wykazano wpływ tego polimorfizmu na gęstość mineralną kości były te przeprowadzone przez Arko et al. [98] oraz Zajickova et al. [172]. Na uwagę zasługuje

większa częstość występowania polimorfizmu 245 T>G u chorych na toczeń rumieniowaty układowy z niską BMD w porównaniu z chorymi z prawidłową BMD. Bonfa et al. sugerują, że możliwym wyjaśnieniem jest to, że allel G może wywoływać dysfunkcję OPG z niekorzystnym wpływem na BMD, mimo prawidłowych stężeń OPG w surowicy, lub że polimorfizm ten może mieć jeszcze inny, nieodkryty wpływ na budowę i utrzymanie zdrowia kości [159].

Metaanaliza przeprowadzona w 2022 przez Han et al., biorąc pod uwagę wszystkie dotychczas przeprowadzone badania, również nie wykazała żadnego wpływu polimorfizmu osteoprotegeryny 245 T>G na występowanie osteoporozy, co pokrywa się z wnioskami uzyskanymi z przeprowadzonych badań [167].

W pracy stwierdzono istotną statystycznie różnicę pomiędzy występowaniem polimorfizmu 950 T>C między grupą kontrolną a grupą chorą na osteoporozę. Allel C występował częściej u pacjentów z osteoporozą w porównaniu grupą kontrolną. Ponadto, w analizie korelacji wariantów polimorficznych zaobserwowano w modelu dominującym (TT vs. TC+CC) przewagę genotypów zawierający zmutowany allel C w grupie z osteoporozą 27,3% vs. 22,1% w kontroli. Podobne wyniki otrzymali w 2005 roku Wu et al. którzy odkryli, że u kobiet z osteoporozą pomenopauzalną BMD szyjki kości udowej była istotnie niższa u osób z genotypem CC w porównaniu do osób z genotypem TT i TC. W grupie zdrowych kobiet po menopauzie nie stwierdzono istotnych różnic BMD pomiędzy tymi trzema genotypami, jednak sam polimorfizm nie wpływał na częstotliwość występowania osteoporozy [173]. Natomiast Boroń et al. wykazali w 2015 roku, że genotyp CC może być czynnikiem zwiększonego ryzyka szybszej utraty masy kostnej i wystąpienia osteoporozy u polskich kobiet po menopauzie. Autorzy sugerują, że polimorfizm ten może być potencjalnym markerem genetycznym odpowiedzialnym za rozwój osteoporozy [158].

Istnieje również wiele badań sugerujących brak związku tego polimorfizmem z osteoporozą. Pierwszymi doniesieniami sugerującymi wpływ tej zmiany na kości było szwedzkie badanie przeprowadzone w 1999 roku przez Brandstrom et al., gdzie zasugerowano jego wpływ na zmniejszoną masę kostną wśród mężczyzn [174]. Dwa lata później Langdahl et al. wykazali brak wpływu tego polimorfizmu zarówno na częstotliwość występowania osteoporozy i złamań z nią związanych. Co ciekawe, w tym samym badaniu wykazano, że genotyp CC był związany ze zwiększoną masą kostną w odcinku lędźwiowym kręgosłupa u pacjentów chorych na osteoporozę [161]. Inne badanie, przeprowadzone w tym samym roku przez Wynne et al. wykazało jednak brak wpływu tego polimorfizmu na masę kostną wśród populacji irlandzkich kobiet [175]. W badaniu Vidal et al. nie stwierdzono istotnego statystycznie związku pomiędzy 950 T>C a gęstością mineralną kości kobiet po menopauzie.

Jednak podobnie jak w badaniu przeprowadzonym przez Langdahl et al. [161], u homozygot CC stwierdzono wyższą BMD we wszystkich lokalizacjach anatomicznych, podczas gdy homozygoty TT miały ją relatywnie niższą [176]. Co ciekawe, w badaniu przeprowadzonym przez Zavala-Cerna et al., gdzie sprawdzano korelację polimorfizmów osteoprotegeryny w populacji meksykańskiej z reumatoidalnym zapaleniem stawów (RZS) i osteoporozą, wykazano związek allele C polimorfizmu C950T z RZS, jednak główne założenie tego badania nie zostało udowodnione [171]. Brak związku pomiędzy 950 T>C lub jego stężeniem w surowicy a występowaniem osteoporozy u starszych australijskich kobiet wykazali również Ueland et al. [177].

Lee et al. przeprowadzili w 2009 roku metaanalizę, która obejmowała osiem badań, a autorzy nie odnotowali żadnego związku między polimorfizmami T950C a gęstością mineralną kości [178]. Natomiast wyniki metaanalizy Guo et al. wskazały, że 163 A>G jest związany z ryzykiem rozwoju osteoporozy [179]. Kolejna metaanaliza dotycząca związku polimorfizmu genu OPG 950 T>C genu z ryzykiem osteoporozy została przeprowadzona w 2017 roku przez Li et al. i brała pod uwagę populację chińską. Na podstawie siedmiu badań, które obejmowały łącznie 1850 przypadków osteoporozy i 3074 kontrole, wykazano, że polimorfizm był istotnie związany z ryzykiem rozwoju osteoporozy pomenopauzalnej. Jednak sami autorzy przyznają, że ze względu na ograniczenia tego badania, przedstawione wyniki i wnioski należy interpretować ostrożnie [180]. Również metaanaliza z 2022 roku, przeprowadzona przez Han et al., biorąca pod uwagę 12 badań, w tym 1610 przypadków i 1234 kontrole i poprzednie metaanalizy, wykazała brak istotnej statystycznie korelacji między polimorfizmem 950 T>C a osteoporozą [167].

Zarówno rezultaty pojedynczych badań, jak i większych analiz, wydają się nie być ze sobą do końca zgodne. Wynik tej pracy wskazuje na asocjację polimorfizmu z chorobą, natomiast sprzeczne wyniki z innych prac mogą być wynikiem zmiennych takich jak np. rasa etniczna. Polimorfizm 163 A>G może być potencjalnie markerem genetycznym odpowiedzialnym za rozwój osteoporozy wśród osób rasy kaukaskiej.

Wyniki tego badania również nie wykazały wpływu polimorfizmu 1181 G>C na rozwój osteoporozy. Podobnie Wynne et al. stwierdzili brak istotnej korelacji między BMD kręgosłupa lędźwiowego w obecności alleli C [175]. Również badania przeprowadzone przez Vidal et al. dotyczące wpływu tego polimorfizmu na gęstość mineralną kości u kobiet po menopauzie na Malcie również nie dały żadnych istotnych statystycznie wyników [176]. Bonfa et al. badając wpływ 1181 G>C na złamania kręgów i gęstość mineralną kości u kobiet przed menopauzą chorujących na toczeń rumieniowaty układowy nie znalazł żadnych istotnych

statystycznie zależności [159]. W meksykańskim badaniu przeprowadzonym w 2017 roku przez Nava-Valdivia et al. nie stwierdzono powiązania między 1181 G>C a gęstością mineralną kości u kobiet chorujących na reumatoidalne zapalenie stawów [181]. Meksykańskie badania przeprowadzone przez Gonzalez-Mercado et al., których przedmiotem było ustalenie związku tego polimorfizmu z gęstością mineralną kości u kobiet po menopauzie, również wykazało brak związku między jednym a drugim. Co ciekawe, wyniki badania wskazały, że genotyp GG był istotnie związany z niższym BMI u kobiet z osteoporozą [182]. Zarówno w tej pracy, jak i w dużej ilości badań zauważono powiązanie allelu C z wyższą gęstością mineralną kości. W badaniu Langdahl et al. stwierdzono, że genotyp CC polimorfizmu 1181 G>C występował rzadziej u pacjentów z osteoporozą i był związany ze zmianami masy kostnej w odcinku lędźwiowym kręgosłupa. Osoby z genotypem GG miały wyższe BMD we wszystkich lokalizacjach niż osoby z genotypem GC, jednak jak sami autorzy podają, różnica ta nie była statystycznie istotna. Ponadto polimorfizm nie był znaczącym predyktorem złamań osteoporotycznych. Wyniki te nie dostarczyły jednoznacznych dowodów na rolę polimorfizmu 1181 G>C w patogenezie osteoporozy [161]. Podobnie Choi et al. wykazali, że 1181 G>C jest związany z BMD kości promieniowej i kości piętowej u Kóreek po menopauzie. Gęstość mineralna tych kości u kobiet z genotypem CC była wyższa niż u osób z genotypem GG [183]. Co ciekawe, Moffett et al. również znaleźli związek GG genotypu 1181 G>C z niższą BMD, ale jednocześnie występowało u tych osób niższe ryzyko złamania szyjki kości udowej i biodra [184]. Garcia-Uzueta et al. wskazali, że allel C polimorfizmu 1181 G>C jest związany z wyższą BMD na kręgosłupa lędźwiowego u kobiet. Badacze sugerują, że wpływa on w sposób bardziej istotny na kość beleczkową niż na kość zbitą, ponieważ nie ma istotnego związku z BMD bioder. Ponadto, ponieważ związek ten jest silniejszy u kobiet przed menopauzą, może być bardziej istotny dla szczytowej masy kostnej niż dla BMD bioder [156]. Z kolei Kim et al. badając związek między polimorfizmami genów osteoprotegeryny, RANK i RANKL a krążącym OPG, rozpuszczalnym RANKL i gęstością mineralną kości u koreańskich kobiet po menopauzie zauważyli, że 1181 G>C, w połączeniu z polimorfizmem RANKL rs2277438, okazał się zwiększać BMD kręgosłupa lędźwiowego, co sugeruje istotną interakcję gen–gen pomiędzy polimorfizmami OPG i RANKL [169].

Badania z 2004 roku przeprowadzone przez Arko et al. wzięły pod lupę osiem różnych polimorfizmów OPG, według ich analizy polimorfizm 1181 G>C jest związany z BMD i dlatego może być uważany za element genetycznej podatności na osteoporozę [98]. Natomiast wnioskiem z badania z 2011 roku przeprowadzonego przez Mencej-Bedrac et al. jest to, że ten polimorfizm może być uznany za czynniki ryzyka genetycznej podatności na osteoporozę

pomenopauzalną, nie mając równocześnie wpływu na poziom OPG w surowicy [170]. Wyniki Boroń et al. wskazały, że polimorfizm ten jest powiązany ze zmniejszoną gęstością kości i zwiększonym ryzykiem osteoporozy pomenopauzalnej, ale również z masą ciała i masą urodzeniową kobiet [158]. W badaniu przeprowadzonym w 2021 roku na populacji arabskich kobiet po menopauzie przez Abdi et al. stwierdzono istotną różnicę w dystrybucji allelicznej i genotypowej 1181 G>C wśród uczestników z i bez osteoporozy. Według badaczy, heterozygota CG była związana ze zmniejszonym ryzykiem osteoporozy pomenopauzalnej. Allel G miał efekt ochronny w odniesieniu do tej choroby, co jest sprzeczne z wyżej wymienionymi wyżej badaniami, gdzie stwierdzono, że kobiety z osteoporozą rzadziej posiadały allel C. Dodatkowo w tym samym badaniu Abdi et al. analiza polimorfizmu nie wykazała wpływu ani na stężenie OPG w surowicy, RANKL, ani na BMD [153].

Metaanaliza przeprowadzona przez Han et al. w 2022 roku, która przeanalizowała większość powyższych badań, dając w sumie 3,472 przypadków i 3,035 kontroli wykazała, że znaczące wyniki między polimorfizmem genu 1181G>C rs2073618 a ryzykiem osteoporozy były najprawdopodobniej wynikami fałszywie dodatnimi, zatem wykazano brak wpływu tej zmiany na wzrost zachorowalności na osteoporozę, co jest zgodne z wynikami uzyskanymi w tym eksperymencie [167].

Ilość innych badań dotyczących wpływu polimorfizmu 6890 A>C na gęstość mineralną kości i osteoporozę jest zdecydowanie najmniejsza, porównując z resztą zmian branych pod uwagę w tej pracy. Uzyskane wyniki nie wykazują żadnego istotnego wpływu tego polimorfizmu na wystąpienie osteoporozy, ani na inne czynniki sprawdzane w tym badaniu, co jest zgodne z wnioskami wyciągniętymi zarówno przez Langdahl et al. [161] oraz Choi et al. [183].

6.3. Udział polimorfizmów genu OPG w patogenezie innych chorób

Oprócz dobrze znanej roli w regulacji obrotu kostnego, stwierdzono, że OPG pełni w organizmie kilka innych funkcji. OPG jest zaangażowana w utrzymanie zdrowia naczyń krwionośnych poprzez regulację aktywności komórek śródbłonna, które wysięlają ich wnętrze. Wykazano, że OPG promuje przetrwanie komórek śródbłonna oraz hamuje stan zapalny i stres oksydacyjny, które są kluczowymi czynnikami w rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego [185]. Wykazano, również że OPG moduluje odpowiedź immunologiczną poprzez regulację aktywności komórek dendrytycznych, które pomagają w inicjowaniu i regulacji odpowiedzi immunologicznych. Osteoprotegeryna wpływa również na różnicowanie i aktywność komórek T, które odgrywają kluczową rolę w adaptacyjnej

odpowiedzi immunologicznej [186]. OPG ulega ekspresji w ośrodkowym układzie nerwowym i wykazano, że odgrywa rolę w rozwoju i funkcji neuronów. Sugeruje się również, że OPG ma działanie neuroprotektcyjne w niektórych chorobach neurologicznych, takich jak choroba Alzheimera [187].

Polimorfizm genu OPG 163A>G pojawia się w literaturze również w kontekście innych dziedzin medycyny. W badaniu przeprowadzonym przez Ney et al. zasugerowano, istnieje związek tego polimorfizmu z podatnością na rozwój raka piersi [188], natomiast w badaniu przeprowadzonym w 2022 roku przez Hayat et al., stwierdzono zwiększone ryzyko powstania przerzutów do kości tego nowotworu u chorych z polimorfizmem 163A>G [189]. W badaniu przeprowadzonym przez Zheng et al. stwierdzono, że polimorfizm ten jest nie tylko skorelowany z rozwojem wrzodziejącego zapalenia jelita cienkiego, ale także z ciężkością przebiegu tej choroby [190]. Zhao et al. wykryli z kolei zależność z występowaniem i ciężkością udaru niedokrwienego spowodowanego miażdżycą dużych tętnic [191].

W metaanalizie przeprowadzonej w 2020 roku przez Wu et al. [192] wykazano, związek 245 T>G ze zwiększonym ryzykiem udaru niedokrwienego mózgu wśród Chińczyków. Wykazano, że polimorfizm ten może być zaangażowany w progresję zmian miażdżycowych [193]. Wykazano również, że polimorfizm ten był skorelowany z gorszym wynikiem u pacjentów z udarem mózgu z miażdżycą dużych tętnic [194]. Sugeruje się również, że 245 T>G może mieć wpływ zarówno na ryzyko wystąpienia cukrzycy [195], jak i zwiększenia frekwencji występowania jej późniejszych powikłań pod postacią retinopatii [196] i stopy cukrzycowej [197, 198]. Inne badanie wskazuje również, że kombinacja 245 T>G rs3134069 i 1181G>C rs2073618 może zwiększać ryzyko wystąpienia retinopatii cukrzycowej.

Z badań dotyczących wpływu polimorfizmu 950 T>C na przypadłości inne niż osteoporoza, ciekawymi wydają się być wyniki otrzymane przez Wu et al. w 2019 roku, którzy sugerują że osoby o genotypie CC mają większe ryzyko do przewlekłego zakażenia HCV, w porównaniu z osobami o genotypie TT [199]. Natomiast badania z 2022 przeprowadzone przez Youssry et al. sugerują, związek tego polimorfizmu z chorobą kostną występujących u dzieci cierpiących na beta-talasemię zależną od transfuzji, jednak sami autorzy zauważają, że jest to pierwsze badanie w tym kierunku i jego wyniki należy interpretować z ostrożnością [200]. Wyniki uzyskane przez Chen et al. sugerują z kolei, że polimorfizm 950 T>C koreluje z podatnością na osteonekrozę głowy kości udowej [201].

Polimorfizm 1181 G>C pojawia się również w literaturze w związku z innymi przypadłościami. Metaanaliza z 2022 roku przeprowadzona przez Xu et al. wykazała, że genotyp CC zwiększa ryzyko peri-implantitis, czyli wywołany przez bakterie proces zapalny

w tkankach wokół implantów dentystycznych [202]. Dwa badania, przeprowadzone przez Corso et al. przeprowadzone w 2019 i 2021 roku sugerują, że zmiana ta może być markerem ryzyka wystąpienia ankylozy stawu skroniowo-żuchwowego, czyli przypadłości związanej ze zeszywnieniem tego stawu, co skutkuje brakiem lub znacznym ograniczeniem ruchomości [203, 204]. Z kolei wyniki metaanalizy z 2020 roku, przeprowadzonej przez Bouzid et al. wskazały na powiązanie tej zmiany z otosklerozą, czyli chorobą kosteczek słuchowych ucha środkowego [205]. Wyniki Omar et al. sugerują powiązanie polimorfizmu z rozwojem raka piersi [206], natomiast Hertz et al. zasugerowali, że osoby z tą zmianą mogą być w grupie zwiększonego ryzyka wystąpienia toksyczności związanej z leczeniem tego nowotworu inhibitorami aromatazy [207]. Badanie Mankuc Ramus et al. wskazuje, że kombinacja 1181G>C rs2073618 i 245 T>G rs3134069 może zwiększać ryzyko wystąpienia retinopatii cukrzycowej [208]. Natomiast polskie badania przeprowadzone w 2018 roku przez Mrozkiewicz-Rakowską et al. sugeruje wpływ tego polimorfizmu zarówno na powstawanie retinopatii, jak i stopy cukrzycowej u chorych cierpiących na cukrzycę typu 2 [209]. Natomiast konkluzją badania przeprowadzonego przez Liu et al. było to, że polimorfizm 1181G>C jest odpowiedzialny za zwiększone ryzyko udaru krwotocznego [210].

7. Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników można wyciągnąć następujące wnioski:

1. Badanie polimorfizmów genu OPG wskazało, że polimorfizm rs2073617 wpływa istotnie statystycznie na występowanie osteoporozy pomenopauzalnej.
2. Uzyskane wyniki badań wskazują na brak zależności między polimorfizmami rs3102735, rs3134069, rs7844639, rs2073618 a występowaniem osteoporozy pomenopauzalnej.
3. W niniejszych badaniach stwierdzono, że allel C polimorfizmu rs2073618 zwiększa gęstość mineralną kości.
4. Polimorfizm rs2073617 może mieć potencjalne znaczenie diagnostyczne w monitorowaniu rozwoju osteoporozy pomenopauzalnej.

8. Streszczenie

Osteoporoza pomenopauzalna jest najczęstszą metaboliczną chorobą kości o silnym podłożu genetycznym, a jej zmienność populacyjna jest uwarunkowana interakcją czynników genetycznych i środowiskowych. Poznanie różnych wariantów genetycznych biorących udział w patogenezie osteoporozy pozwoli na personalizację leczenia objawowego, jak również wczesną prewencję osteoporozy.

Celem pracy było:

1. Określenie częstości występowania wybranych polimorfizmów genu kodującego OPG.
2. Ocena związku polimorfizmów genu OPG z klinicznymi parametrami obrotu kostnego i progresji osteoporozy.
3. Ocena badanych wariantów genetycznych genów OPG w etiopatogenezie osteoporozy.
4. Ocena związku polimorfizmów genu OPG z parametrami densytometrycznymi, częstością występowania osteoporozy i osteopenii w badanej populacji kobiet.

Badania przeprowadzono na materiale pobranym od 802 niespokrewnionych kobiet, rasy kaukaskiej i narodowości polskiej. Średnia wieku całej zebranej grupy wynosiła $54,7 \pm 8,6$ lat (zakres 51–78 lat). U wszystkich pacjentek wykonano pomiary gęstości mineralnej kości (BMD) w Pracowni Densytometrii, Szpitala Klinicznego nr 1 Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie. Określono następujące parametry: gęstość mineralną kości (BMD), T-score, Z-score, wskaźniki średniej BMD w porównaniu ze średnią dla młodych dorosłych kobiet (YA — ang. *young adults*) i średniej BMD w porównaniu ze średnią dla danego wieku (AM — ang. *age matched*). Dokonano również pomiarów wzrostu, masy ciała, wyznaczono BMI i zebrano informacje na temat daty wystąpienia pierwszej i ostatniej miesiączki, liczby przebytych ciąż i masy urodzeniowej dzieci.

Metodą real-time PCR zbadano częstość występowania poszczególnych polimorfizmów genu OPG w grupie pacjentek zdrowych w wieku menopauzalnym, pacjentek z osteopenią, osteoporozą i w grupie kontrolnej.

Uzyskane wyniki badań będących tematem niniejszej pracy nie wykazały statystycznie istotnych zależności pomiędzy żadnym z polimorfizmów, a występowaniem osteopenii. Natomiast dla polimorfizmu rs207361 zaobserwowano statystycznie istotny związek z występowaniem osteoporozy, co może wskazywać na udział polimorfizmu w patogenezie tej choroby. Polimorfizm ten może być jednym z potencjalnych markerów genetycznych odpowiedzialnych za nasiloną utratę masy kostnej.

9. Abstract

Postmenopausal osteoporosis is the most common metabolic bone disease with a strong genetic basis, and its population variability is determined by the interaction of genetic and environmental factors. Learning about the different genetic variants involved in the pathogenesis of osteoporosis will allow personalization of symptomatic treatment, as well as early prevention of osteoporosis.

The aim of this study was to determine the prevalence of the gene encoding OPG, assess the association of OPG polymorphism with clinical parameters of bone turnover and progression of osteoporosis, evaluate the studied genetic variants of OPG genes rs3102735 (-163A>G), rs3134070 (-245 T>G), rs207361 (-950T>C), rs7844539 (A>C), rs2073618 (1181G>C) in the etiology of osteoporosis, and to evaluate the association of these polymorphisms with densitometric parameters, incidence of osteoporosis and osteopenia in the study population of women.

The study was conducted on material collected from 802 unrelated women, Caucasian and Polish nationality. The mean age of the entire collected group was 54.7 ± 8.6 years (range 51–78 years). Bone mineral density (BMD) was measured in all patients at the Densitometry Laboratory, Clinical Hospital No. 1 of the Pomeranian Medical University in Szczecin, and the following parameters were determined: bone mineral density (BMD), T-score, Z-score, indices of mean BMD compared to the mean for young adult women (YA — ang. *youngadults*) and mean BMD compared to the mean for age (AM — ang. *agematched*). Height, weight and BMI were also measured, and information was collected on the date of first and last menstrual periods, number of pregnancies and birth weight of their children.

Using real-time PCR, the prevalence of individual OPG polymorphisms was investigated in a group of healthy menopausal patients, patients with osteopenia, osteoporosis and a control group.

The results of the studies that are the subject of this work showed no correlation between any of the polymorphisms and the occurrence of osteopenia. However, for the 950T>C polymorphism, a statistically significant coincidence with the occurrence of osteoporosis was observed, which may indicate the involvement of this polymorphism in the pathogenesis of this disease, suggesting that it may be one of the potential genetic markers responsible for increased bone breakdown.

10. Piśmiennictwo

1. T. J. de Villiers i S. R. Goldstein, „Bone health 2022: an update”, *Climacteric J. Int. Menopause Soc.*, t. 25, nr 1, s. 1–3, luty 2022, doi: 10.1080/13697137.2021.1965408.
2. „NFZ o zdrowiu. Osteoporoza - ezdrowie.gov.pl”. <https://ezdrowie.gov.pl/5583?modId=37203>
3. „Zarys fizjologii i patofizjologii układu ruchu człowieka Cz. 1 Kości i stawy. - - K. Spodaryk - AZ”
4. J. Li *i in.*, „RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, t. 97, nr 4, s. 1566–1571, luty 2000, doi: 10.1073/pnas.97.4.1566.
5. H. Hsu *i in.*, „Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, t. 96, nr 7, s. 3540–3545, mar. 1999.
6. P. J. Kostenuik i V. Shalhoub, „Osteoprotegerin: a physiological and pharmacological inhibitor of bone resorption”, *Curr. Pharm. Des.*, t. 7, nr 8, s. 613–635, maj 2001, doi: 10.2174/1381612013397807.
7. G. N. Grob, *Aging Bones: A Short History of Osteoporosis*. JHU Press, 2014.
8. „THE PARATHYROID GLANDS AND METABOLIC BONE DISEASE - PMC”. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2480026/>
9. „WHO_TRS_843.pdf” . Dostępne na: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39142/WHO_TRS_843.pdf?sequence=1
10. A. El Maghraoui i C. Roux, „DXA scanning in clinical practice”, *QJM Int. J. Med.*, t. 101, nr 8, s. 605–617, sie. 2008, doi: 10.1093/qjmed/hcn022.
11. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, „Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy”, *JAMA*, t. 285, nr 6, s. 785–795, luty 2001, doi: 10.1001/jama.285.6.785.
12. E. Hernlund *i in.*, „Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA)”, *Arch. Osteoporos.*, t. 8, nr 1, s. 136, 2013, doi: 10.1007/s11657-013-0136-1.
13. C. Cooper, E. J. Atkinson, S. J. Jacobsen, W. M. O’Fallon, i L. J. Melton, „Population-based study of survival after osteoporotic fractures”, *Am. J. Epidemiol.*, t. 137, nr 9, s. 1001–1005, maj 1993, doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a116756.

14. J. A. Kanis, A. Oden, O. Johnell, C. De Laet, B. Jonsson, i A. K. Oglesby, „The components of excess mortality after hip fracture”, *Bone*, t. 32, nr 5, s. 468–473, maj 2003, doi: 10.1016/s8756-3282(03)00061-9.
15. O. Johnell i J. A. Kanis, „An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures”, *Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA*, t. 17, nr 12, s. 1726–1733, grudz. 2006, doi: 10.1007/s00198-006-0172-4.
16. E. Czerwinski *i in.*, „Epidemiology and economic burden of osteoporosis in Poland”, 2022.
17. „Aging: Prospects for further increases in the functional life span | SpringerLink”. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02435819>.
18. „Asbury: Diseases of the nervous system: clinical... - Google Scholar”. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Diseases+of+the+Nervous+System-Clinical+Neurobiology&author=MA+Albert&author=HH+Funkenstein&publication_year=1992.
19. S. Roberts *i in.*, „Ageing in the musculoskeletal system”, *Acta Orthop.*, t. 87, nr Suppl 363, s. 15–25, grudz. 2016, doi: 10.1080/17453674.2016.1244750.
20. G. A. Greendale, N. P. Lee, i E. R. Arriola, „The menopause”, *The Lancet*, t. 353, nr 9152, s. 571–580, luty 1999, doi: 10.1016/S0140-6736(98)05352-5.
21. B. L. Riggs i L. J. Melton, „Involutional osteoporosis”, *N. Engl. J. Med.*, t. 314, nr 26, s. 1676–1686, cze. 1986, doi: 10.1056/NEJM198606263142605.
22. R. Müller, „Long-term prediction of three-dimensional bone architecture in simulations of pre-, peri- and post-menopausal microstructural bone remodeling”, *Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA*, t. 16 Suppl 2, s. S25-35, mar. 2005, doi: 10.1007/s00198-004-1701-7.
23. B. E. C. Nordin *i in.*, „A longitudinal study of bone-related biochemical changes at the menopause”, *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, t. 61, nr 1, s. 123–130, lip. 2004, doi: 10.1111/j.1365-2265.2004.02066.x.
24. „Osteoporoza - Badurski J., Sawicki A., Boczoń S. - 2 - Ambulans Literatura i sprzęt”, [ambulans.com.pl](https://www.ambulans.com.pl/reumatologia/4378-osteoporoza.html). <https://www.ambulans.com.pl/reumatologia/4378-osteoporoza.html>
25. M. L. Gourlay *i in.*, „Bone-density testing interval and transition to osteoporosis in older women”, *N. Engl. J. Med.*, t. 366, nr 3, s. 225–233, sty. 2012, doi: 10.1056/NEJMoal107142.
26. S. A. Frost, N. D. Nguyen, J. R. Center, J. A. Eisman, i T. V. Nguyen, „Timing of repeat BMD measurements: development of an absolute risk-based prognostic model”, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, t. 24, nr 11, s. 1800–1807, lis. 2009, doi: 10.1359/jbmr.090514.

27. J. A. Kanis, L. J. Melton, C. Christiansen, C. C. Johnston, i N. Khaltsev, „The diagnosis of osteoporosis”, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, t. 9, nr 8, s. 1137–1141, sie. 1994, doi: 10.1002/jbmr.5650090802.
28. B. L. Riggs, S. Khosla, i L. J. Melton, „A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men”, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, t. 13, nr 5, s. 763–773, maj 1998, doi: 10.1359/jbmr.1998.13.5.763.
29. F. Mirza i E. Canalis, „SECONDARY OSTEOPOROSIS: PATHOPHYSIOLOGY AND MANAGEMENT”, *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.*, t. 173, nr 3, s. R131–R151, wrz. 2015, doi: 10.1530/EJE-15-0118.
30. E. Stein i E. Shane, „Secondary osteoporosis”, *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, t. 32, nr 1, s. 115–134, vii, mar. 2003, doi: 10.1016/s0889-8529(02)00062-2.
31. S.-S. Taylor *i in.*, „Complex Regional Pain Syndrome: A Comprehensive Review”, *Pain Ther.*, t. 10, nr 2, s. 875–892, grudz. 2021, doi: 10.1007/s40122-021-00279-4.
32. T. Vilaca, F. Gossiel, i R. Eastell, „Bone Turnover Markers: Use in Fracture Prediction”, *J. Clin. Densitom.*, t. 20, nr 3, s. 346–352, lip. 2017, doi: 10.1016/j.jocd.2017.06.020.
33. N. Vilayphiou, S. Boutroy, E. Sornay-Rendu, B. Van Rietbergen, i R. Chapurlat, „Age-related changes in bone strength from HR-pQCT derived microarchitectural parameters with an emphasis on the role of cortical porosity”, *Bone*, t. 83, s. 233–240, luty 2016, doi: 10.1016/j.bone.2015.10.012.
34. R. A. Brownbill i J. Z. Ilich, „Hip geometry and its role in fracture: What do we know so far?”, *Curr. Osteoporos. Rep.*, t. 1, nr 1, s. 25–31, cze. 2003, doi: 10.1007/s11914-003-0005-8.
35. S. Malkov *i in.*, „Hip Fractures Risk in Older Men and Women Associated With DXA-Derived Measures of Thigh Subcutaneous Fat Thickness, Cross-Sectional Muscle Area, and Muscle Density”, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, t. 30, nr 8, s. 1414–1421, sie. 2015, doi: 10.1002/jbmr.2469.
36. „Overview | Osteoporosis: assessing the risk of fragility fracture | Guidance | NICE”, 8 sierpień 2012. <https://www.nice.org.uk/guidance/cg146>
37. I. Korczowska i J. K. Łacki, „pathogenesis of osteoporosis”, *Nowa Med.*, dostępne na: <https://www.czytelniamedyczna.pl/1539,etiopatogeneza-osteoporozy.html>
38. J.-Y. Reginster, „Prevention of postmenopausal osteoporosis with pharmacological therapy: practice and possibilities”, *J. Intern. Med.*, t. 255, nr 6, s. 615–628, 2004, doi: 10.1111/j.1365-2796.2004.01292.x.
39. A. Cranney, S. A. Jamal, J. F. Tsang, R. G. Josse, i W. D. Leslie, „Low bone mineral density and fracture burden in postmenopausal women”, *CMAJ Can. Med. Assoc. J. J. Assoc. Medicale Can.*, t. 177, nr 6, s. 575–580, wrz. 2007, doi: 10.1503/cmaj.070234.

40. H. Johansson *i in.*, „FRAX- vs. T-score-based intervention thresholds for osteoporosis”, *Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA*, t. 28, nr 11, s. 3099–3105, lis. 2017, doi: 10.1007/s00198-017-4160-7.
41. J. A. Kanis, E. V. McCloskey, N. C. Harvey, H. Johansson, i W. D. Leslie, „Intervention Thresholds and the Diagnosis of Osteoporosis”, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, t. 30, nr 10, s. 1747–1753, paź. 2015, doi: 10.1002/jbmr.2531.
42. K. Ja, „Assessment of osteoporosis at the primary health-care level. Technical Report”, <http://www.shef.ac.uk/FRAX>, 2008, dostępne na:
<https://cir.nii.ac.jp/crid/1572543024192846208>
43. J. A. Kanis, O. Johnell, A. Oden, H. Johansson, i E. McCloskey, „FRAX and the assessment of fracture probability in men and women from the UK”, *Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA*, t. 19, nr 4, s. 385–397, kwi. 2008, doi: 10.1007/s00198-007-0543-5.
44. „QFracture”. <https://qfracture.org/>
45. J. A. Kanis *i in.*, „SIGN Guidelines for Scotland: BMD Versus FRAX Versus QFracture”, *Calcif. Tissue Int.*, t. 98, nr 5, s. 417–425, maj 2016, doi: 10.1007/s00223-015-0092-4.
46. C. M. Bunce, G. Brown, i M. Hewison, „Vitamin D and hematopoiesis”, *Trends Endocrinol. Metab. TEM*, t. 8, nr 6, s. 245–251, sie. 1997, doi: 10.1016/s1043-2760(97)00066-0.
47. N. A. Morrison, R. Yeoman, P. J. Kelly, i J. A. Eisman, „Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, t. 89, nr 15, s. 6665–6669, sie. 1992, doi: 10.1073/pnas.89.15.6665.
48. M. R. Walters, „Newly identified actions of the vitamin D endocrine system”, *Endocr. Rev.*, t. 13, nr 4, s. 719–764, lis. 1992, doi: 10.1210/edrv-13-4-719.
49. N. Bucay *i in.*, „osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification”, *Genes Dev.*, t. 12, nr 9, s. 1260–1268, maj 1998, doi: 10.1101/gad.12.9.1260.
50. T. Sun, M. Chen, X. Lin, R. Yu, Y. Zhao, i J. Wang, „The influence of osteoprotegerin genetic polymorphisms on bone mineral density and osteoporosis in Chinese postmenopausal women”, *Int. Immunopharmacol.*, t. 22, nr 1, s. 200–203, wrz. 2014, doi: 10.1016/j.intimp.2014.06.023.
51. N. A. Morrison *i in.*, „Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles”, *Nature*, t. 367, nr 6460, s. 284–287, sty. 1994, doi: 10.1038/367284a0.
52. Y.-Z. Liu, Y.-J. Liu, R. R. Recker, i H.-W. Deng, „Molecular studies of identification of genes for osteoporosis: the 2002 update”, *J. Endocrinol.*, t. 177, nr 2, s. 147–196, maj 2003, doi: 10.1677/joe.0.1770147.
53. M. Willing *i in.*, „Bone mineral density and its change in white women: estrogen and vitamin D receptor genotypes and their interaction”, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, t. 13, nr 4, s. 695–705, kwi. 1998, doi: 10.1359/jbmr.1998.13.4.695.

54. B. Dawson-Hughes, S. S. Harris, i S. Finneran, „Calcium absorption on high and low calcium intakes in relation to vitamin D receptor genotype”, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, t. 80, nr 12, s. 3657–3661, grudz. 1995, doi: 10.1210/jcem.80.12.8530616.
55. D. Nestic, J. Cheng, i L. E. Maquat, „Sequences within the last intron function in RNA 3'-end formation in cultured cells”, *Mol. Cell. Biol.*, t. 13, nr 6, s. 3359–3369, cze. 1993, doi: 10.1128/mcb.13.6.3359-3369.1993.
56. H. Arai *i in.*, „A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women”, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, t. 12, nr 6, s. 915–921, cze. 1997, doi: 10.1359/jbmr.1997.12.6.915.
57. K. Zajícková, I. Zofková, R. Bahbouh, i A. Krepelová, „Vitamin D receptor gene polymorphisms, bone mineral density and bone turnover: FokI genotype is related to postmenopausal bone mass”, *Physiol. Res.*, t. 51, nr 5, s. 501–509, 2002.
58. B. N. H. Tran, N. D. Nguyen, J. R. Center, J. A. Eisman, i T. V. Nguyen, „Enhancement of absolute fracture risk prognosis with genetic marker: the collagen I alpha 1 gene”, *Calcif. Tissue Int.*, t. 85, nr 5, s. 379–388, lis. 2009, doi: 10.1007/s00223-009-9296-9.
59. M. A. Brown, M. A. Haughton, S. F. Grant, A. S. Gunnell, N. K. Henderson, i J. A. Eisman, „Genetic control of bone density and turnover: role of the collagen 1 alpha 1, estrogen receptor, and vitamin D receptor genes”, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, t. 16, nr 4, s. 758–764, kwi. 2001, doi: 10.1359/jbmr.2001.16.4.758.
60. K. Maeda *i in.*, „The Regulation of Bone Metabolism and Disorders by Wnt Signaling”, *Int. J. Mol. Sci.*, t. 20, nr 22, s. 5525, lis. 2019, doi: 10.3390/ijms20225525.
61. K. I. Pinson, J. Brennan, S. Monkley, B. J. Avery, i W. C. Skarnes, „An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice”, *Nature*, t. 407, nr 6803, s. 535–538, wrz. 2000, doi: 10.1038/35035124.
62. W. Balemans *i in.*, „The binding between sclerostin and LRP5 is altered by DKK1 and by high-bone mass LRP5 mutations”, *Calcif. Tissue Int.*, t. 82, nr 6, s. 445–453, cze. 2008, doi: 10.1007/s00223-008-9130-9.
63. T. A. Yorgan *i in.*, „The Anti-Osteoanabolic Function of Sclerostin Is Blunted in Mice Carrying a High Bone Mass Mutation of Lrp5”, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, t. 30, nr 7, s. 1175–1183, lip. 2015, doi: 10.1002/jbmr.2461.
64. L. Gennari *i in.*, „Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetics of osteoporosis: a HuGE review”, *Am. J. Epidemiol.*, t. 161, nr 4, s. 307–320, luty 2005, doi: 10.1093/aje/kwi055.
65. N. Kobayashi *i in.*, „Estrogen receptor alpha polymorphism as a genetic marker for bone loss, vertebral fractures and susceptibility to estrogen”, *Maturitas*, t. 41, nr 3, s. 193–201, mar. 2002, doi: 10.1016/s0378-5122(01)00287-0.

66. Y. Yamada, A. Miyauchi, Y. Takagi, M. Tanaka, M. Mizuno, i A. Harada, „Association of the C-509-->T polymorphism, alone or in combination with the T869-->C polymorphism, of the transforming growth factor-beta1 gene with bone mineral density and genetic susceptibility to osteoporosis in Japanese women”, *J. Mol. Med. Berl. Ger.*, t. 79, nr 2–3, s. 149–156, kwi. 2001, doi: 10.1007/s001090100190.
67. R. W. Keen *i in.*, „Evidence of association and linkage disequilibrium between a novel polymorphism in the transforming growth factor beta 1 gene and hip bone mineral density: a study of female twins”, *Rheumatol. Oxf. Engl.*, t. 40, nr 1, s. 48–54, sty. 2001, doi: 10.1093/rheumatology/40.1.48.
68. S. H. Ralston, „Analysis of gene expression in human bone biopsies by polymerase chain reaction: evidence for enhanced cytokine expression in postmenopausal osteoporosis”, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, t. 9, nr 6, s. 883–890, cze. 1994, doi: 10.1002/jbmr.5650090614.
69. K. Tsukamoto *i in.*, „Association of radial bone mineral density with CA repeat polymorphism at the interleukin 6 locus in postmenopausal Japanese women”, *J. Hum. Genet.*, t. 44, nr 3, s. 148–151, 1999, doi: 10.1007/s100380050132.
70. R. E. Murray, F. McGuigan, S. F. Grant, D. M. Reid, i S. H. Ralston, „Polymorphisms of the interleukin-6 gene are associated with bone mineral density”, *Bone*, t. 21, nr 1, s. 89–92, lip. 1997, doi: 10.1016/s8756-3282(97)00081-1.
71. V. Braga *i in.*, „Association of CTR and COLIA1 alleles with BMD values in peri- and postmenopausal women”, *Calcif. Tissue Int.*, t. 67, nr 5, s. 361–366, lis. 2000, doi: 10.1007/s002230001160.
72. A. Nahian i D. D. Davis, *Histology, Osteoprogenitor Cells*. StatPearls Publishing, 2022. Dostępne na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559160/>
73. P. Ducy, T. Schinke, i G. Karsenty, „The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance”, *Science*, t. 289, nr 5484, s. 1501–1504, wrz. 2000, doi: 10.1126/science.289.5484.1501.
74. S. Vimalraj, „Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization”, *Gene*, t. 754, s. 144855, wrz. 2020, doi: 10.1016/j.gene.2020.144855.
75. M. Nakasaki, K. Yoshioka, Y. Miyamoto, T. Sasaki, H. Yoshikawa, i K. Itoh, „IGF-I secreted by osteoblasts acts as a potent chemotactic factor for osteoblasts”, *Bone*, t. 43, nr 5, s. 869–879, lis. 2008, doi: 10.1016/j.bone.2008.07.241.
76. C.-H. Kim *i in.*, „IL-1beta regulates cellular proliferation, prostaglandin E2 synthesis, plasminogen activator activity, osteocalcin production, and bone resorptive activity of the mouse calvarial bone cells”, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, t. 24, nr 3, s. 395–407, sie. 2002, doi: 10.1081/iph-120014725.

77. B. F. Boyce, D. E. Hughes, K. R. Wright, L. Xing, i A. Dai, „Recent advances in bone biology provide insight into the pathogenesis of bone diseases”, *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.*, t. 79, nr 2, s. 83–94, luty 1999.
78. A. B. Khalid i S. A. Krum, „Estrogen receptors alpha and beta in bone”, *Bone*, t. 87, s. 130–135, cze. 2016, doi: 10.1016/j.bone.2016.03.016.
79. „Osteocyte: An Endocrine Cell ... and More | Endocrine Reviews | Oxford Academic”. <https://academic.oup.com/edrv/article/34/5/658/2354663>
80. L. Qin, W. Liu, H. Cao, i G. Xiao, „Molecular mechanosensors in osteocytes”, *Bone Res.*, t. 8, nr 1, Art. nr 1, cze. 2020, doi: 10.1038/s41413-020-0099-y.
81. M. G. Sørensen *i in.*, „Characterization of osteoclasts derived from CD14+ monocytes isolated from peripheral blood”, *J. Bone Miner. Metab.*, t. 25, nr 1, s. 36–45, 2007, doi: 10.1007/s00774-006-0725-9.
82. W. J. Boyle, W. S. Simonet, i D. L. Lacey, „Osteoclast differentiation and activation”, *Nature*, t. 423, nr 6937, s. 337–342, maj 2003, doi: 10.1038/nature01658.
83. V. Heath, „Vitamin D deficiency implicated in bone mineralization defects”, *Nat. Rev. Endocrinol.*, t. 5, nr 11, Art. nr 11, lis. 2009, doi: 10.1038/nrendo.2009.183.
84. M. F. Young, „Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis”, *Osteoporos. Int.*, t. 14, nr 3, s. 35–42, mar. 2003, doi: 10.1007/s00198-002-1342-7.
85. P. Rowe, A. Koller, i S. Sharma, „Physiology, Bone Remodeling”, w *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. Dostępne na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499863/>
86. L. Maïmoun i C. Sultan, „Effects of physical activity on bone remodeling”, *Metabolism*, t. 60, nr 3, s. 373–388, mar. 2011, doi: 10.1016/j.metabol.2010.03.001.
87. G. R. Mundy, *Bone Remodelling and its Disorders*. CRC Press, 1999.
88. H. C. Anderson, „Matrix vesicles and calcification”, *Curr. Rheumatol. Rep.*, t. 5, nr 3, s. 222–226, cze. 2003, doi: 10.1007/s11926-003-0071-z.
89. M. Lind, B. Deleuran, K. Thestrup-Pedersen, K. Søballe, E. F. Eriksen, i C. Bünger, „Chemotaxis of human osteoblasts. Effects of osteotropic growth factors”, *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, t. 103, nr 2, s. 140–146, luty 1995.
90. R. Lindsay, „Bone loss after cardiac transplantation”, *N. Engl. J. Med.*, t. 350, nr 8, s. 751–754, luty 2004, doi: 10.1056/NEJMp038240.
91. U. H. Lerner, „Bone Remodeling in Post-menopausal Osteoporosis”, *J. Dent. Res.*, t. 85, nr 7, s. 584–595, lip. 2006, doi: 10.1177/154405910608500703.
92. H. Yasuda *i in.*, „Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro”, *Endocrinology*, t. 139, nr 3, s. 1329–1337, mar. 1998, doi: 10.1210/endo.139.3.5837.

93. D. M. Anderson *i in.*, „A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function”, *Nature*, t. 390, nr 6656, s. 175–179, lis. 1997, doi: 10.1038/36593.
94. W. S. Simonet *i in.*, „Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density”, *Cell*, t. 89, nr 2, s. 309–319, kwi. 1997, doi: 10.1016/S0092-8674(00)80209-3.
95. X. Feng, „RANKing intracellular signaling in osteoclasts”, *IUBMB Life*, t. 57, nr 6, s. 389–395, cze. 2005, doi: 10.1080/15216540500137669.
96. S. Théoleyre *i in.*, „Characterization of osteoprotegerin binding to glycosaminoglycans by surface plasmon resonance: Role in the interactions with receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) and RANK”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, t. 347, nr 2, s. 460–467, sie. 2006, doi: 10.1016/j.bbrc.2006.06.120.
97. V. P. Eswarakumar, I. Lax, i J. Schlessinger, „Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors”, *Cytokine Growth Factor Rev.*, t. 16, nr 2, s. 139–149, kwi. 2005, doi: 10.1016/j.cytogfr.2005.01.001.
98. B. Arko, J. Prezelj, A. Kocijancic, R. Komel, i J. Marc, „Association of the osteoprotegerin gene polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal women”, *Maturitas*, t. 51, nr 3, s. 270–279, lip. 2005, doi: 10.1016/j.maturitas.2004.08.006.
99. A. R. Pettit *i in.*, „TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis”, *Am. J. Pathol.*, t. 159, nr 5, s. 1689–1699, lis. 2001, doi: 10.1016/S0002-9440(10)63016-7.
100. N. Nakagawa *i in.*, „RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, t. 253, nr 2, s. 395–400, grudz. 1998, doi: 10.1006/bbrc.1998.9788.
101. T. Wada, T. Nakashima, N. Hiroshi, i J. M. Penninger, „RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease”, *Trends Mol. Med.*, t. 12, nr 1, s. 17–25, sty. 2006, doi: 10.1016/j.molmed.2005.11.007.
102. T. Ono, M. Hayashi, F. Sasaki, i T. Nakashima, „RANKL biology: bone metabolism, the immune system, and beyond”, *Inflamm. Regen.*, t. 40, s. 2, luty 2020, doi: 10.1186/s41232-019-0111-3.
103. J. M. Brown, J. Zhang, i E. T. Keller, „Opg, RANK1, and RANK in cancer metastasis: expression and regulation”, *Cancer Treat. Res.*, t. 118, s. 149–172, 2004, doi: 10.1007/978-1-4419-9129-4_7.
104. T. Nakashima, M. Hayashi, i H. Takayanagi, „New insights into osteoclastogenic signaling mechanisms”, *Trends Endocrinol. Metab. TEM*, t. 23, nr 11, s. 582–590, lis. 2012, doi: 10.1016/j.tem.2012.05.005.
105. A. Naito *i in.*, „Severe osteopetrosis, defective interleukin-1 signalling and lymph node organogenesis in TRAF6-deficient mice”, *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.*, t. 4, nr 6, s. 353–362, cze. 1999, doi: 10.1046/j.1365-2443.1999.00265.x.

106. B. F. Boyce i L. Xing, „Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin”, *Arthritis Res. Ther.*, t. 9, nr 1, s. S1, cze. 2007, doi: 10.1186/ar2165.
107. M. Matsumoto, T. Sudo, T. Saito, H. Osada, i M. Tsujimoto, „Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in osteoclastogenesis mediated by receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL)”, *J. Biol. Chem.*, t. 275, nr 40, s. 31155–31161, paź. 2000, doi: 10.1074/jbc.M001229200.
108. D. L. Lacey *i in.*, „Osteoprotegerin Ligand Modulates Murine Osteoclast Survival in Vitro and in Vivo”, *Am. J. Pathol.*, t. 157, nr 2, s. 435–448, sie. 2000.
109. Y. Y. Kong *i in.*, „OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis”, *Nature*, t. 397, nr 6717, s. 315–323, sty. 1999, doi: 10.1038/16852.
110. D. H. Jones, Y.-Y. Kong, i J. M. Penninger, „Role of RANKL and RANK in bone loss and arthritis”, *Ann. Rheum. Dis.*, t. 61 Suppl 2, nr Suppl 2, s. ii32-39, lis. 2002, doi: 10.1136/ard.61.suppl_2.ii32.
111. S. C. Manolagas, S. Kousteni, i R. L. Jilka, „Sex steroids and bone”, *Recent Prog. Horm. Res.*, t. 57, s. 385–409, 2002, doi: 10.1210/rp.57.1.385.
112. T. Miyazaki, T. Matsunaga, S. Miyazaki, S. Hokari, i T. Komoda, „Changes in receptor activator of nuclear factor-kappaB, and its ligand, osteoprotegerin, bone-type alkaline phosphatase, and tartrate-resistant acid phosphatase in ovariectomized rats”, *J. Cell. Biochem.*, t. 93, nr 3, s. 503–512, paź. 2004, doi: 10.1002/jcb.20201.
113. G. Eghbali-Fatourehchi, S. Khosla, A. Sanyal, W. J. Boyle, D. L. Lacey, i B. L. Riggs, „Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women”, *J. Clin. Invest.*, t. 111, nr 8, s. 1221–1230, kwi. 2003, doi: 10.1172/JCI17215.
114. P. D’Amelio *i in.*, „Estrogen deficiency increases osteoclastogenesis up-regulating T cells activity: a key mechanism in osteoporosis”, *Bone*, t. 43, nr 1, s. 92–100, lip. 2008, doi: 10.1016/j.bone.2008.02.017.
115. M. Infante, A. Fabi, F. Cognetti, S. Gorini, M. Caprio, i A. Fabbri, „RANKL/RANK/OPG system beyond bone remodeling: involvement in breast cancer and clinical perspectives”, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, t. 38, nr 1, s. 12, sty. 2019, doi: 10.1186/s13046-018-1001-2.
116. N. Giuliani *i in.*, „Human myeloma cells stimulate the receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) in T lymphocytes: a potential role in multiple myeloma bone disease”, *Blood*, t. 100, nr 13, s. 4615–4621, grudz. 2002, doi: 10.1182/blood-2002-04-1121.
117. J. Luo *i in.*, „LGR4 is a receptor for RANKL and negatively regulates osteoclast differentiation and bone resorption”, *Nat. Med.*, t. 22, nr 5, s. 539–546, maj 2016, doi: 10.1038/nm.4076.
118. W. de Lau *i in.*, „Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling”, *Nature*, t. 476, nr 7360, s. 293–297, lip. 2011, doi: 10.1038/nature10337.

119. H. D. Jang *i in.*, „Inactivation of glycogen synthase kinase-3 β is required for osteoclast differentiation”, *J. Biol. Chem.*, t. 286, nr 45, s. 39043–39050, lis. 2011, doi: 10.1074/jbc.M111.256768.
120. J. Luo *i in.*, „Regulation of bone formation and remodeling by G-protein-coupled receptor 48”, *Dev. Camb. Engl.*, t. 136, nr 16, s. 2747–2756, sie. 2009, doi: 10.1242/dev.033571.
121. U. Styrkarsdottir *i in.*, „Nonsense mutation in the LGR4 gene is associated with several human diseases and other traits”, *Nature*, t. 497, nr 7450, s. 517–520, maj 2013, doi: 10.1038/nature12124.
122. T. Suda, N. Takahashi, N. Udagawa, E. Jimi, M. T. Gillespie, i T. J. Martin, „Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families”, *Endocr. Rev.*, t. 20, nr 3, s. 345–357, cze. 1999, doi: 10.1210/edrv.20.3.0367.
123. E. D. Deeks, „Denosumab: A Review in Postmenopausal Osteoporosis”, *Drugs Aging*, t. 35, nr 2, s. 163–173, luty 2018, doi: 10.1007/s40266-018-0525-7.
124. N. Udagawa *i in.*, „Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways”, *J. Bone Miner. Metab.*, t. 39, nr 1, s. 19–26, sty. 2021, doi: 10.1007/s00774-020-01162-6.
125. B. T. MacDonald, K. Tamai, i X. He, „Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases”, *Dev. Cell*, t. 17, nr 1, s. 9–26, lip. 2009, doi: 10.1016/j.devcel.2009.06.016.
126. P. V. N. Bodine *i in.*, „The Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 is a negative regulator of trabecular bone formation in adult mice”, *Mol. Endocrinol. Baltim. Md*, t. 18, nr 5, s. 1222–1237, maj 2004, doi: 10.1210/me.2003-0498.
127. Y.-W. Qiang, B. Barlogie, S. Rudikoff, i J. D. Shaughnessy, „Dkk1-induced inhibition of Wnt signaling in osteoblast differentiation is an underlying mechanism of bone loss in multiple myeloma”, *Bone*, t. 42, nr 4, s. 669–680, kwi. 2008, doi: 10.1016/j.bone.2007.12.006.
128. N. Carrillo-López *i in.*, „Role of the RANK/RANKL/OPG and Wnt/ β -Catenin Systems in CKD Bone and Cardiovascular Disorders”, *Calcif. Tissue Int.*, t. 108, nr 4, s. 439–451, kwi. 2021, doi: 10.1007/s00223-020-00803-2.
129. P. Garnero, E. Sornay-Rendu, M. C. Chapuy, i P. D. Delmas, „Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis”, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, t. 11, nr 3, s. 337–349, mar. 1996, doi: 10.1002/jbmr.5650110307.
130. S. C. Manolagas, C. A. O’Brien, i M. Almeida, „The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease”, *Nat. Rev. Endocrinol.*, t. 9, nr 12, s. 699–712, grudz. 2013, doi: 10.1038/nrendo.2013.179.
131. L. C. Hofbauer i M. Schoppet, „Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases”, *JAMA*, t. 292, nr 4, s. 490–495, lip. 2004, doi: 10.1001/jama.292.4.490.

132. M. N. Weitzmann i R. Pacifici, „Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale”, *J. Clin. Invest.*, t. 116, nr 5, s. 1186–1194, maj 2006, doi: 10.1172/JCI28550.
133. T. Nakashima *i in.*, „Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression”, *Nat. Med.*, t. 17, nr 10, s. 1231–1234, wrz. 2011, doi: 10.1038/nm.2452.
134. J.-P. Bonjour i T. Chevalley, „Pubertal timing, bone acquisition, and risk of fracture throughout life”, *Endocr. Rev.*, t. 35, nr 5, s. 820–847, paź. 2014, doi: 10.1210/er.2014-1007.
135. P. Szulc, E. Seeman, F. Duboeuf, E. Sornay-Rendu, i P. D. Delmas, „Bone fragility: failure of periosteal apposition to compensate for increased endocortical resorption in postmenopausal women”, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, t. 21, nr 12, s. 1856–1863, grudz. 2006, doi: 10.1359/jbmr.060904.
136. S. A. Krum *i in.*, „Estrogen protects bone by inducing Fas ligand in osteoblasts to regulate osteoclast survival”, *EMBO J.*, t. 27, nr 3, s. 535–545, luty 2008, doi: 10.1038/sj.emboj.7601984.
137. K. M. Wiren, X.-W. Zhang, D. A. Olson, R. T. Turner, i U. T. Iwaniec, „Androgen prevents hypogonadal bone loss via inhibition of resorption mediated by mature osteoblasts/osteocytes”, *Bone*, t. 51, nr 5, s. 835–846, lis. 2012, doi: 10.1016/j.bone.2012.08.111.
138. D. Goltzman, „Physiology of Parathyroid Hormone”, *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, t. 47, nr 4, s. 743–758, grudz. 2018, doi: 10.1016/j.ecl.2018.07.003.
139. Y. Nakamichi *i in.*, „VDR in Osteoblast-Lineage Cells Primarily Mediates Vitamin D Treatment-Induced Increase in Bone Mass by Suppressing Bone Resorption”, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, t. 32, nr 6, s. 1297–1308, cze. 2017, doi: 10.1002/jbmr.3096.
140. C. Yh *i in.*, „Different susceptibilities of osteoclasts and osteoblasts to glucocorticoid-induced oxidative stress and mitochondrial alterations”, *Chin. J. Physiol.*, t. 62, nr 2, kwi. 2019, doi: 10.4103/CJP.CJP_7_19.
141. J.-M. Pan, L.-G. Wu, J.-W. Cai, L.-T. Wu, i M. Liang, „Dexamethasone suppresses osteogenesis of osteoblast via the PI3K/Akt signaling pathway in vitro and in vivo”, *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, t. 39, nr 1, s. 80–86, luty 2019, doi: 10.1080/10799893.2019.1625061.
142. N. E. Lane, „Glucocorticoid-Induced Osteoporosis: New Insights into the Pathophysiology and Treatments”, *Curr. Osteoporos. Rep.*, t. 17, nr 1, s. 1–7, luty 2019, doi: 10.1007/s11914-019-00498-x.
143. I. L. Tourkova *i in.*, „Adrenocorticotrophic hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D3 enhance human osteogenesis in vitro by synergistically accelerating the expression of bone-specific genes”, *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.*, t. 97, nr 9, s. 1072–1083, wrz. 2017, doi: 10.1038/labinvest.2017.62.
144. E. Abe *i in.*, „TSH Is a Negative Regulator of Skeletal Remodeling”, *Cell*, t. 115, nr 2, s. 151–162, paź. 2003, doi: 10.1016/S0092-8674(03)00771-2.

145. J. B. Richards *i in.*, „Collaborative meta-analysis: associations of 150 candidate genes with osteoporosis and osteoporotic fracture”, *Ann. Intern. Med.*, t. 151, nr 8, s. 528–537, paź. 2009, doi: 10.7326/0003-4819-151-8-200910200-00006.
146. S. H. Ralston, „Genetic control of susceptibility to osteoporosis”, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, t. 87, nr 6, s. 2460–2466, cze. 2002, doi: 10.1210/jcem.87.6.8621.
147. „R: The R Project for Statistical Computing”. <https://www.r-project.org/>
148. „SNPassoc.pdf”. Dostępne na:
<https://cran.r-project.org/web/packages/SNPassoc/SNPassoc.pdf>
149. J. C. Barrett, B. Fry, J. Maller, i M. J. Daly, „Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps”, *Bioinforma. Oxf. Engl.*, t. 21, nr 2, s. 263–265, sty. 2005, doi: 10.1093/bioinformatics/bth457.
150. „Homo sapiens (ID 257713) – BioProject – NCBI”.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJEB6930>.
151. „Haploview”, *Broad Institute*, 16 maj 2008.
<https://www.broadinstitute.org/haploview/haploview>
152. J. B. Richards, H.-F. Zheng, i T. D. Spector, „Genetics of osteoporosis from genome-wide association studies: advances and challenges”, *Nat. Rev. Genet.*, t. 13, nr 8, Art. nr 8, sie. 2012, doi: 10.1038/nrg3228.
153. S. Abdi *i in.*, „Association of RANKL and OPG Gene Polymorphism in Arab Women with and without Osteoporosis”, *Genes*, t. 12, nr 2, s. 200, sty. 2021, doi: 10.3390/genes12020200.
154. G. S. Kim *i in.*, „Association of the OSCAR Promoter Polymorphism With BMD in Postmenopausal Women: OSCAR POLYMORPHISM AND BMD”, *J. Bone Miner. Res.*, t. 20, nr 8, s. 1342–1348, sie. 2005, doi: 10.1359/JBMR.050320.
155. W. Zhao-zhong, „The effect of low-body weight combined with T~(149)-C and A~(163)-G polymorphism of osteoprotegerin promoter region on osteoporosis”, 2006. Dostępne na:
<https://www.semanticscholar.org/paper/The-effect-of-low-body-weight-combined-with-and-of-Zhao-zhong/2047cda0a4b8c90d2c3213c8e2a6fccfeace202a>
156. M. T. García-Unzueta *i in.*, „Association of the 163A/G and 1181G/C Osteoprotegerin Polymorphism with Bone Mineral Density”, *Horm. Metab. Res.*, t. 40, nr 3, s. 219–224, mar. 2008, doi: 10.1055/s-2008-1046793.
157. A. J. L. Brambila-Tapia *i in.*, „MTHFR C677T, MTHFR A1298C, and OPG A163G Polymorphisms in Mexican Patients with Rheumatoid Arthritis and Osteoporosis”, *Dis. Markers*, t. 32, s. 109–114, NaN/NaN/NaN, doi: 10.3233/DMA-2011-0868.
158. D. Boroń, D. Kotrych, J. Bartkowiak-Wieczorek, I. Uzar, A. Bogacz, i A. Kamiński, „Polymorphisms of OPG and their relation to the mineral density of bones in pre- and postmenopausal women”, *Int. Immunopharmacol.*, t. 28, nr 1, s. 477–486, wrz. 2015, doi: 10.1016/j.intimp.2015.07.015.

159. A. C. Bonfá, L. P. C. Seguro, V. Caparbo, E. Bonfá, i R. M. R. Pereira, „RANKL and OPG gene polymorphisms: associations with vertebral fractures and bone mineral density in premenopausal systemic lupus erythematosus”, *Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA*, t. 26, nr 5, s. 1563–1571, maj 2015, doi: 10.1007/s00198-015-3029-x.
160. M. Mydlárová Blaščáková i in., „Relationship between A163G osteoprotegerin gene polymorphism and other osteoporosis parameters in Roma and non-Roma postmenopausal women in eastern Slovakia”, *J. Clin. Lab. Anal.*, t. 31, nr 5, s. e22093, wrz. 2017, doi: 10.1002/jcla.22093.
161. B. L. Langdahl, M. Carstens, L. Stenkjaer, i E. F. Eriksen, „Polymorphisms in the osteoprotegerin gene are associated with osteoporotic fractures”, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, t. 17, nr 7, s. 1245–1255, lip. 2002, doi: 10.1359/jbmr.2002.17.7.1245.
162. H. L. Jørgensen, P. Kusk, B. Madsen, M. Fenger, i J. B. Lauritzen, „Serum osteoprotegerin (OPG) and the A163G polymorphism in the OPG promoter region are related to peripheral measures of bone mass and fracture odds ratios”, *J. Bone Miner. Metab.*, t. 22, nr 2, s. 132–138, 2004, doi: 10.1007/s00774-003-0461-3.
163. Y.-H. Hsu i in., „Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men”, *Hum. Genet.*, t. 118, nr 5, s. 568–577, sty. 2006, doi: 10.1007/s00439-005-0062-4.
164. M. Spaczyński i in., „Polymorphism of osteoprotegerin gene and osteoporosis in postmenopausal women”, *Ginekol. Pol.*, t. 80, nr 5, Art. nr 5, 2009, Dostępne na: https://journals.viamedica.pl/ginekologia_polska/article/view/46611
165. Y. M. Hussien, A. Shehata, R. A. Karam, S. S. Alzahrani, H. Magdy, i A. M. El-Shafey, „Polymorphism in vitamin D receptor and osteoprotegerin genes in Egyptian rheumatoid arthritis patients with and without osteoporosis”, *Mol. Biol. Rep.*, t. 40, nr 5, s. 3675–3680, maj 2013, doi: 10.1007/s11033-012-2443-9.
166. S. Cvijetic, S. Grazio, P. Kosovic, M. Uremovic, T. Nemcic, i J. Bobic, „Osteoporosis and polymorphisms of osteoprotegerin gene in postmenopausal women - a pilot study”, *Reumatologia*, t. 54, nr 1, s. 10–13, 2016, doi: 10.5114/reum.2016.58755.
167. X. Han, L. Zheng, Y.-Y. Mu, H.-Z. Li, i X.-F. He, „Association between OPG polymorphisms and osteoporosis risk: An updated meta-analysis”, *Front. Genet.*, t. 13, 2022, Dostępne na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2022.1032110>
168. Z. Wu i in., „The relationship between body fat ratio combined with G209-A and T245-G polymorphism of osteoprotegerin promoter region and osteoporosi”, s. 2409–2413.

169. J. G. Kim *i in.*, „Association between osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK), and RANK ligand (RANKL) gene polymorphisms and circulating OPG, soluble RANKL levels, and bone mineral density in Korean postmenopausal women”, *Menopause N. Y. N.*, t. 14, nr 5, s. 913–918, 2007, doi: 10.1097/gme.0b013e31802d976f.
170. S. Mencej-Bedrač, J. Preželj, i J. Marc, „TNFRSF11B gene polymorphisms 1181G > C and 245T > G as well as haplotype CT influence bone mineral density in postmenopausal women”, *Maturitas*, t. 69, nr 3, s. 263–267, lip. 2011, doi: 10.1016/j.maturitas.2011.02.010.
171. M. G. Zavala-Cerna *i in.*, „Osteoprotegerin Polymorphisms in a Mexican Population with Rheumatoid Arthritis and Generalized Osteoporosis: A Preliminary Report”, *J. Immunol. Res.*, t. 2015, s. 376197, 2015, doi: 10.1155/2015/376197.
172. K. Zajíčková, A. Zemanová, M. Hill, i I. Žofková, „Is A163G polymorphism in the osteoprotegerin gene associated with heel velocity of sound in postmenopausal women?”, *Physiol. Res.*, t. 57 Suppl 1, s. S153–S157, 2008, doi: 10.33549/physiolres.931500.
173. W. Zhao, „Relationships among single T~(950) -C mutation polymorphism in the promoter region of the osteoprotegerin gene, bone mineral density and metabolism”, *Chin. J. Gerontol.*, 2005, Dostępne na: <https://www.semanticscholar.org/paper/Relationships-among-single-T~%28950%29-C-mutation-in-of-Zhao/f6e0ee46957b51141c23a5096502cba2cb62b096>
174. N. Vidal, H. Brandstrom, K. Jonsson, i C. Ohlsson, „Osteoprotegerin mRNA is expressed in primary human osteoblast-like cells: down-regulation by glucocorticoids”, *J. Endocrinol.*, t. 159, nr 1, s. 191–195, paź. 1998, doi: 10.1677/joe.0.1590191.
175. F. Wynne *i in.*, „Investigation of the genetic influence of the OPG, VDR (Fok1), and COLIA1 Sp1 polymorphisms on BMD in the Irish population”, *Calcif. Tissue Int.*, t. 71, nr 1, s. 26–35, lip. 2002, doi: 10.1007/s00223-001-2081-z.
176. C. Vidal, M. Brincat, i A. Xuereb Anastasi, „TNFRSF11B gene variants and bone mineral density in postmenopausal women in Malta”, *Maturitas*, t. 53, nr 4, s. 386–395, mar. 2006, doi: 10.1016/j.maturitas.2005.11.003.
177. T. Ueland *i in.*, „No associations between OPG gene polymorphisms or serum levels and measures of osteoporosis in elderly Australian women”, *Bone*, t. 40, nr 1, s. 175–181, sty. 2007, doi: 10.1016/j.bone.2006.06.022.
178. Y. H. Lee, J.-H. Woo, S. J. Choi, J. D. Ji, i G. G. Song, „Associations between osteoprotegerin polymorphisms and bone mineral density: a meta-analysis”, *Mol. Biol. Rep.*, t. 37, nr 1, s. 227–234, sty. 2010, doi: 10.1007/s11033-009-9637-9.
179. L. Guo, K. Tang, Z. Quan, Z. Zhao, i D. Jiang, „Association between seven common OPG genetic polymorphisms and osteoporosis risk: a meta-analysis”, *DNA Cell Biol.*, t. 33, nr 1, s. 29–39, sty. 2014, doi: 10.1089/dna.2013.2206.

180. S. Li, H. Jiang, i N. Du, „Association between osteoprotegerin gene T950C polymorphism and osteoporosis risk in the Chinese population: Evidence via meta-analysis”, *PLoS ONE*, t. 12, nr 12, s. e0189825, grudz. 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0189825.
181. C. A. Nava-Valdivia *i in.*, „Polymorphism rs2073618 of the TNFRSF11B (OPG) Gene and Bone Mineral Density in Mexican Women with Rheumatoid Arthritis”, *J. Immunol. Res.*, t. 2017, s. 7680434, 2017, doi: 10.1155/2017/7680434.
182. A. González-Mercado *i in.*, „Association of polymorphisms of the TNFRSF11B and TNFSF11 genes with bone mineral density in postmenopausal women from western Mexico”, *Arch. Med. Sci. AMS*, t. 15, nr 5, s. 1352–1356, wrz. 2019, doi: 10.5114/aoms.2019.87410.
183. J. Y. Choi *i in.*, „Genetic polymorphisms of OPG, RANK, and ESR1 and bone mineral density in Korean postmenopausal women”, *Calcif. Tissue Int.*, t. 77, nr 3, s. 152–159, wrz. 2005, doi: 10.1007/s00223-004-0264-0.
184. S. P. Moffett *i in.*, „Osteoprotegerin Lys3Asn Polymorphism and the Risk of Fracture in Older Women”, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, t. 93, nr 5, s. 2002–2008, maj 2008, doi: 10.1210/jc.2007-1019.
185. P. D’Amelio, G. Isaia, i G. C. Isaia, „The osteoprotegerin/RANK/RANKL system: a bone key to vascular disease”, *J. Endocrinol. Invest.*, t. 32, nr 4 Suppl, s. 6–9, sty. 2009.
186. M. C. Walsh i Y. Choi, „Biology of the RANKL–RANK–OPG System in Immunity, Bone, and Beyond”, *Front. Immunol.*, t. 5, 2014, Dostępne na:
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2014.00511>
187. E. Emanuele *i in.*, „Plasma osteoprotegerin as a biochemical marker for vascular dementia and Alzheimer’s disease”, *Int. J. Mol. Med.*, t. 13, nr 6, s. 849–853, cze. 2004, doi: 10.3892/ijmm.13.6.849.
188. J. T. Ney *i in.*, „Genetic polymorphism of the OPG gene associated with breast cancer”, *BMC Cancer*, t. 13, s. 40, sty. 2013, doi: 10.1186/1471-2407-13-40.
189. F. Hayat, N. U. Khan, A. U. Khan, I. Ahmad, A. M. Alamri, i B. Iftikhar, „Risk association of RANKL and OPG gene polymorphism with breast cancer to bone metastasis in Pashtun population of Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan”, *PLOS ONE*, t. 17, nr 11, s. e0276813, lis. 2022, doi: 10.1371/journal.pone.0276813.
190. X. Zheng *i in.*, „Associations of the decoy receptor and osteoprotegerin gene polymorphisms with ulcerative colitis in Chinese patients.”, *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, t. 53, nr 7, s. 521–526, lip. 2014.
191. H. Zhao, Y. Cao, H. Chen, W. Xu, X. Sun, i X. Pan, „The association between OPG rs3102735 gene polymorphism, microembolic signal and stroke severity in acute ischemic stroke patients”, *Gene*, t. 613, s. 25–29, maj 2017, doi: 10.1016/j.gene.2017.02.029.
192. J. Wu, X. Li, F. Gao, S. Gao, J. Lyu, i H. Qiang, „Osteoprotegerin SNP associations with coronary artery disease and ischemic stroke risk: a meta-analysis”, *Biosci. Rep.*, t. 40, nr 10, s. BSR20202156, paź. 2020, doi: 10.1042/BSR20202156.

193. X. Xiong *i in.*, „Significant Association between OPG/TNFRSF11B Variant and Common Complex Ischemic Stroke”, *J. Stroke Cerebrovasc. Dis. Off. J. Natl. Stroke Assoc.*, t. 27, nr 6, s. 1683–1691, cze. 2018, doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.01.029.
194. M. Wang *i in.*, „TNFRSF11B polymorphisms predict poor outcome after large artery atherosclerosis stroke”, *Gene*, t. 743, s. 144617, cze. 2020, doi: 10.1016/j.gene.2020.144617.
195. N. Pérez-Hernández, R. Posadas-Sánchez, G. Vargas-Alarcón, B. G. Cazarín-Santos, A. Miranda-Duarte, i J. M. Rodríguez-Pérez, „Genetic Variants and Haplotypes in OPG Gene Are Associated with Premature Coronary Artery Disease and Traditional Cardiovascular Risk Factors in Mexican Population: The GEA Study”, *DNA Cell Biol.*, t. 39, nr 11, s. 2085–2094, lis. 2020, doi: 10.1089/dna.2020.5949.
196. H. Xu *i in.*, „The association of OPG polymorphisms with diabetic retinopathy in Chinese population”, *Ophthalmic Genet.*, t. 42, nr 6, s. 659–663, grudz. 2021, doi: 10.1080/13816810.2021.1946702.
197. B. Mrozikiewicz-Rakowska *i in.*, „Selected RANKL/RANK/OPG system genetic variants in diabetic foot patients”, *J. Diabetes Metab. Disord.*, t. 17, nr 2, s. 287–296, grudz. 2018, doi: 10.1007/s40200-018-0372-4.
198. J. Zhao, L.-X. Zhang, Y.-T. Wang, Y. Li, i H.-L. Chen Md, „Genetic Polymorphisms and the Risk of Diabetic Foot: A Systematic Review and Meta-Analyses”, *Int. J. Low. Extrem. Wounds*, t. 21, nr 4, s. 574–587, grudz. 2022, doi: 10.1177/1534734620977599.
199. J. J. Wu *i in.*, „Association between TNFRSF11A and TNFRSF11B gene polymorphisms and the outcome of hepatitis C virus infection.”, *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi Zhonghua Liuxingbingxue Zazhi*, t. 40, nr 10, s. 1291–1295, paź. 2019, doi: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2019.10.022.
200. I. Youssry *i in.*, „Bone health in pediatric transfusion-dependent beta-thalassemia: Circulating osteoprotegerin and RANKL system”, *Pediatr. Blood Cancer*, t. 69, nr 1, s. e29377, sty. 2022, doi: 10.1002/pbc.29377.
201. B. Chen *i in.*, „Association of Variant Interactions in RANK, RANKL, OPG, TRAF6, and NFATC1 Genes with the Development of Osteonecrosis of the Femoral Head”, *DNA Cell Biol.*, t. 38, nr 7, s. 734–746, lip. 2019, doi: 10.1089/dna.2019.4710.
202. M. Xu, C. Zhang, Y. Han, Z. Yue, C. Shu, i J. Hou, „Association between Osteoprotegerin rs2073618 polymorphism and peri-implantitis susceptibility: a meta-analysis”, *BMC Oral Health*, t. 22, nr 1, s. 598, grudz. 2022, doi: 10.1186/s12903-022-02657-6.
203. P. F. Corso *i in.*, „Mutations in the osteoprotegerin-encoding gene are associated with temporomandibular joint ankylosis”, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.*, t. 133, nr 3, s. 308–314, mar. 2022, doi: 10.1016/j.oooo.2021.08.017.

-
204. P. F. C. de L. Corso *i in.*, „Examination of OPG, RANK, RANKL and HIF1A polymorphisms in temporomandibular joint ankylosis patients”, *J. Cranio-Maxillo-fac. Surg. Off. Publ. Eur. Assoc. Cranio-Maxillo-fac. Surg.*, t. 47, nr 5, s. 766–770, maj 2019, doi: 10.1016/j.jcms.2019.01.024.
205. A. Bouzid *i in.*, „Osteoprotegerin gene polymorphisms and otosclerosis: an additional genetic association study, multilocus interaction and meta-analysis”, *BMC Med. Genet.*, t. 21, nr 1, s. 122, cze. 2020, doi: 10.1186/s12881-020-01036-8.
206. H. S. Omar, O. G. Shaker, Y. H. Nassar, S. A. Marzouk, i M. S. ElMarzouky, „The association between RANKL and Osteoprotegerin gene polymorphisms with breast cancer”, *Mol. Cell. Biochem.*, t. 403, nr 1–2, s. 219–229, maj 2015, doi: 10.1007/s11010-015-2352-z.
207. D. L. Hertz *i in.*, „Further Evidence That OPG rs2073618 Is Associated With Increased Risk of Musculoskeletal Symptoms in Patients Receiving Aromatase Inhibitors for Early Breast Cancer”, *Front. Genet.*, t. 12, s. 662734, 2021, doi: 10.3389/fgene.2021.662734.
208. S. Mankoč Ramuš, T. Kumše, M. Globočnik Petrovič, D. Petrovič, i I. Cilenšek, „SNP rs2073618 of the osteoprotegerin gene is associated with diabetic retinopathy in Slovenian patients with type 2 diabetes”, *BioMed Res. Int.*, t. 2013, s. 364073, 2013, doi: 10.1155/2013/364073.
209. B. Mrozikiewicz-Rakowska *i in.*, „Genetic predictors associated with diabetic retinopathy in patients with diabetic foot”, *Pol. Arch. Intern. Med.*, t. 128, nr 1, s. 35–42, sty. 2018, doi: 10.20452/pamw.4144.
210. W. Liu *i in.*, „Polymorphisms in three genes are associated with hemorrhagic stroke”, *Brain Behav.*, t. 5, nr 11, s. e00395, lis. 2015, doi: 10.1002/brb3.395.

11. Spis tabel

Tabela 1. Klasyfikacja osteopenii i osteoporozy wg WHO [27]	13
Tabela 2. Przyczyny osteoporozy wtórnej [30]	14
Tabela 3. Czynniki ryzyka osteoporozy pierwotnej [36, 37, 38]	16
Tabela 4. Porównanie procesu remodelingu i modelowania strukturalnego kości	24
Tabela 5. Warunki termiczne real-time PCR dla wybranych polimorfizmów OPG	39
Tabela 6. Składniki reakcji real-time PCR dla badanych polimorfizmów genu OPG	40
Tabela 7. Porównanie wyników densytometrycznych pacjentek	46
Tabela 8. Porównanie danych klinicznych pacjentek	48
Tabela 9. Badane warianty genu <i>TNFRSF11B</i>	50
Tabela 10. Analiza SNP dla całej grupy	51
Tabela 11. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmów genu <i>TNFRSF11B</i> w badanych grupach kobiet.	51
Tabela 12. Częstość występowania alleli polimorfizmów genu <i>TNFRSF11B</i> w grupach kontrolnej i z osteopenią	53
Tabela 13. Asocjacje wariantów genu <i>TNFRSF11B</i> z osteopenią	54
Tabela 14. Częstość występowania alleli polimorfizmów genu <i>TNFRSF11B</i> w grupach kontrolnej i z osteoporozą	55
Tabela 15. Asocjacje wariantów genu <i>TNFRSF11B</i> z osteoporozą	56
Tabela 16. Statystyki siły nierównowagi sprzężeń pomiędzy analizowanymi wariantami genu <i>TNFRSF11B</i>	57
Tabela 17. Wyniki asocjacji haplotypów genu <i>TNFRSF11B</i> z osteopenią i osteoporozą	58
Tabela 18. Średnie±SD wartości danych klinicznych i densytometrycznych pacjentek dla poszczególnych genotypów polimorfizmów genu <i>TNFRSF11B</i> w badanych grupach	60

12. Spis rycin

Rycina 1.	Klasyfikacja osteoporozy.....	15
Rycina 2.	Regulacja przebudowy kości wg. [90].....	25
Rycina 3.	Szlak sygnalizacyjny OPG/RANK/RANKL wg. [124].....	31
Rycina 4.	Szlak Wnt/ β -katenina wg. [128].....	32
Rycina 5.	Wyznaczanie temperatury topnienia dla OPG (rs3102735). Temperatura topnienia produktu amplifikacji dla allelu A $T_{m1}=57,5^{\circ}\text{C}$; allelu G $T_{m2}=64,5^{\circ}\text{C}$	40
Rycina 6.	Analiza topnienia amplifikowanego produktu dla OPG (rs3102735) — piki krzywych topnienia. Temperatura topnienia produktu dla allelu A $T_{m1}=57,5^{\circ}\text{C}$; allelu G $T_{m2}=64,5^{\circ}\text{C}$	40
Rycina 7.	Wyznaczanie temperatury topnienia dla OPG (rs3134070). Temperatura topnienia produktu amplifikacji dla allelu T $T_{m1}=49^{\circ}\text{C}$; allelu G $T_{m2}=58^{\circ}\text{C}$	41
Rycina 8.	Analiza topnienia amplifikowanego produktu dla OPG (rs3134070) — piki krzywych topnienia. Temperatura topnienia produktu dla allelu T $T_{m1}=49^{\circ}\text{C}$; allelu G $T_{m2}=58^{\circ}\text{C}$	41
Rycina 9.	Wyznaczanie temperatury topnienia dla OPG (rs207361). Temperatura topnienia produktu amplifikacji dla allelu T $T_{m1}=57,5^{\circ}\text{C}$; allelu C $T_{m2}=64,5^{\circ}\text{C}$	41
Rycina 10.	Analiza topnienia amplifikowanego produktu dla OPG (rs207361) — piki krzywych topnienia. Temperatura topnienia produktu dla allelu T $T_{m1}=57,5^{\circ}\text{C}$; allelu C $T_{m2}=64,5^{\circ}\text{C}$	42
Rycina 11.	Wyznaczanie temperatury topnienia dla OPG (rs7844539). Temperatura topnienia produktu amplifikacji dla allelu A $T_{m1}=53,5^{\circ}\text{C}$; allelu C $T_{m2}=60,5^{\circ}\text{C}$	42
Rycina 12.	Analiza topnienia amplifikowanego produktu dla OPG (rs7844539) — piki krzywych topnienia. Temperatura topnienia produktu dla allelu A $T_{m1}=53,5^{\circ}\text{C}$; allelu C $T_{m2}=60,5^{\circ}\text{C}$	42
Rycina 13.	Wyznaczanie temperatury topnienia dla OPG (rs2073618). Temperatura topnienia produktu amplifikacji dla allelu G $T_{m1}=54,5^{\circ}\text{C}$; allelu C $T_{m2}=63^{\circ}\text{C}$	43

Rycina 14. Analiza topnienia amplifikowanego produktu dla OPG (rs2073618) — piki krzywych topnienia. Temperatura topnienia produktu dla allelu G $T_{m1}=54,5^{\circ}\text{C}$; allelu C $T_{m2}=63^{\circ}\text{C}$	43
Rycina 15. Podział pacjentek zakwalifikowanych do badania.	45
Rycina 16. Analiza nierównowagi sprzężeń pomiędzy pięcioma analizowanymi w pracy SNP genu TNFRSF11B w całej grupie 802 pacjentek. Sprzężenie pomiędzy SNP oceniono na podstawie wartości D' i r^2	58
Rycina 17. Porównanie średnich mas noworodków w zależności od genotypów matek dla wariantu rs2073617(950T>C) dla całej badanej grupy kobiet.	63
Rycina 18. Korelacje danych densytometrycznych z wiekiem i BMI pacjentek w poszczególnych grupach kobiet.	64