

## Polimorfizm -643C/T genu *RANKL* i jego związek z osteoporozą u kobiet po menopauzie

-643C/T polymorphism of *RANKL* gene  
and its association with osteoporosis  
in postmenopausal women

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

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

### STRESZCZENIE

#### WSTĘP

RANKL jest kluczową cytokiną uczestniczącą w różnicowaniu osteoklastu ze swoich prekursorów oraz aktywacji i przeżyciu samych osteoklastów. Ponieważ wiąże się z RANK, obecność RANK na komórkach docelowych jest nieodzownym warunkiem kontroli komórek docelowych za pośrednictwem RANKL.

#### CEL PRACY

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

#### MATERIAŁY I METODY

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

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

#### WYNIKI

Uzyskane wyniki badań nie wykazały korelacji polimorfizmu C-643T genu *RANKL* ze zmniejszoną gęstością kości oraz zwiększonym ryzykiem występowania zmian osteoprotycznych po menopauzie.

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

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

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

#### ADRES DO KORESPONDENCJI:

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

Ann. Acad. Med. Siles. 2014, 68, 6, 415–423  
Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach  
eISSN 1734-025X  
[www.annales.sum.edu.pl](http://www.annales.sum.edu.pl)

**WNIOSKI**

Wydaje się, że homozygota TT polimorfizmu genu receptora RANKL może być czynnikiem zwiększonego ryzyka wystąpienia osteoporozy i jest powiązana ze wzrostem i masą urodzeniową.

**SŁOWA KLUCZOWE**

RANKL, polimorfizm, osteoporoza, kobieta, wiek

**ABSTRACT****INTRODUCTION**

RANKL is a key cytokine involved in osteoclast differentiation from its precursors, activation and survival of osteoclasts themselves. Because RANKL binds with RANK, the presence of RANK on target cells is a necessary condition of target cell control mediated by RANKL.

**AIM OF STUDY**

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

**MATERIAL AND METHODS**

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

**RESULTS**

The obtained results did not show a correlation of *RANKL* gene C-643T polymorphism with decreased bone density or increased risk of osteoporotic changes after menopause.

**CONCLUSIONS**

The homozygote of the TT polymorphism of the *RANKL* receptor gene seems to be an increased risk factor of osteoporosis development and is associated with growth and birth mass.

**KEY WORDS**

RANKL, polymorphism, osteoporosis, women, age

**WSTĘP**

Wiadomo, że osteoporoza jest chorobą uwarunkowaną obecnością licznych polimorfizmów tzw. genów kandydujących do rozwoju osteopenii i osteoporozy [1]. Ważna jest także interakcja między tymi genami. W poświęconych temu zagadnieniu badaniach ocenia się zmienność wspomnianych genów w populacjach ludzkich, opierając się przy tym na identyfikacji polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (*single nucleotide polymorphism* – SNP) mogących wpływać

na zmienność takich cech, jak gęstość mineralna kości [2]. Dlatego w celu poznania podłoża genetycznego rozwoju osteopenii i osteoporozy niezbędne może okazać się dokładne zbadanie polimorfizmów SNP, takich jak polimorfizmy osteoprotegeryny (OPG – *osteoprotegerin*), receptora RANK czy ligandu RANKL oraz innych genów, wpływających na fizjologię szkieletu kostnego człowieka [3,4,5,6]. Ligand RANK (RANKL), główny mediator resorpcji kości w stanach normalnych i patologicznych, ulega ekspresji jako związany z błoną lub rozpuszczalna forma w różnych tkankach, w tym w kości [7,8].

W prawidłowej przemianie kostnej i w przerzutach kostnych *RANKL* stymuluje tworzenie i aktywność komórek usuwających kość, czyli osteoklastów, przez wiązanie się z jego swoistym receptorem *RANK* na osteoklastach i ich komórkach progenitorowych. Procesy te są czasem zaburzane przez wiązanie *RANKL* z *OPG*, będącą rozpuszczalnym receptorem pułapkowym [9]. Synteza tych substancji jest uwarunkowana również genetycznie, a odpowiadające za nią geny wykazują polimorfizm.

Ekspresja *RANKL* jest regulowana na poziomach transkrypcyjnym, translacyjnym i potranslacyjnym przez hormony (np. 1,25-dihydroksyvitaminę  $D_3$ ), czynniki wzrostu i peptydy (np. transformujący czynnik wzrostu  $\beta 1$ , czynnik wzrostu fibroblastów-2 oraz białko pokrewne z hormonem przytarczyc), cytokiny (np. interleukiny  $1\beta$  i 11) oraz inne czynniki [10, 11, 12]. *RANKL* zachowuje biologiczną aktywność w formie rozpuszczalnej o masie 31 kDa (w przeciwieństwie do formy 40–45 kDa związanej z błoną), która powstaje przez proteolityczne rozszczepienie lub alternatywne składanie. Analiza sygnalizacji *RANKL* ujawniła alternatywne transkrypty kodujące: związaną z błoną izoformę 287 aminokwasową, z krótką domeną wewnątrzkomórkową, i rozpuszczalne białko 199 aminokwasowe, pozbawione fragmentu transbłonowego oraz wewnątrzkomórkowych domen kanonicznego *RANKL* [11]. Mimo że wszystkie opisane izoformy *RANKL* mogą brać udział w osteoklastogenezie *in vitro*, to sądzi się, że izoforma najkrótsza w czasie ekspresji w komórkach z innymi izoformami ma działanie hamujące. Jest więc prawdopodobne, że regulowana ekspresja izoform *RANKL* może przyczynić się do kontrolowania rozwoju osteoklastów [12, 13].

Osteoblasty różnią się względną ekspresją *RANKL* w kwestii regulacji tworzenia osteoklastów i ich funkcji. Nadmiar *RANKL* wiąże się z *RANK* na prekursorach osteoklastów, umożliwiając niektórym czynnikom związanym z receptorem czynnika martwicy guza (*tumor necrosis factor receptor-associated factor* – *TRAF*) ich łączenie z *RANK* w domenie wewnątrzkomórkowej [14]. Szlaki te następnie regulują fuzję prekursorów osteoklastów, różnicowanie ich w dojrzałe osteoklasty oraz – w konsekwencji – ich aktywację i przeżycie. Nadmiar *OPG* wiąże *RANKL* i zapobiega jego interakcji z *RANK*, zmniejszając liczbę oraz czynność osteoklastów [15].

Brak dobrze opracowanych danych oraz wieloczynnikowy charakter osteoporozy wymagają dalszych badań w celu zarówno poszukiwania, jak i weryfikacji nowych czynników etiopatogenetycznych, a także retrospektywnej oceny istniejących danych. Analiza wyników dotychczasowych badań nie pozwala jeszcze na jednoznaczne określenie roli badanych cytokin w etiopatogenezie osteoporozy, dlatego w niniejszej

pracy postanowiono określić rolę powiązań badanego ligandu z procesem osteoporozy pomenopauzalnej, gęstością kości i innymi parametrami osobowymi i klinicznymi.

Celem pracy było zbadanie częstości występowania polimorfizmu *RANKL* -643C/T ze szlaku cytokinowego *RANK/RANKL/OPG* w grupie kobiet po menopauzie. Analizie poddano związek badanych wariantów genetycznych z zaawansowaniem zmian kostnych oraz parametrami obrotu kostnego, oceniono także znaczenie badanych polimorfizmów genetycznych w etiopatogenezie osteoporozy.

## MATERIAŁ I METODY

### Grupa badana

Badaniami objęto grupę 570 niespokrewnionych kobiet populacji kaukaskiej w wieku pomenopauzalnym (404 kobiety) i rozrodzonym (166 kobiet) zamieszkujących region Wielkopolski (woj. zachodniopomorskie i wielkopolskie), które zgłosiły się do Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego Akademii Medycznej (GPSK AM) w Poznaniu w latach 2002–2005. Grupa kobiet w wieku pomenopauzalnym obejmowała 268 kobiet z osteoporozą, 65 z osteopenią i 71 zdrowych. Wszystkie pacjentki poddano badaniom densytometrycznym w Pracowni Densytometrii GPSK AM, w wyniku których oznaczono gęstość mineralną kości (*bone mineral density* – *BMD*) oraz parametry *T-score* i *Z-score*, porównano także wskaźniki średniej *BMD* badanych za średnią *BMD* u młodych dorosłych kobiet (*young adults* – *YA*) oraz ze średnią dla danego wieku (*age matched* – *AM*). Dodatkowo dokonano pomiaru masy ciała i wzrostu w celu obliczenia wskaźnika masy ciała (*body mass index* – *BMI*) według wzoru: masa ciała/wzrost.

Z każdą pacjentką przeprowadzono szczegółowy wywiad, dotyczący przebytych chorób, stosowanych leków, wieku wystąpienia pierwszej i ostatniej miesiączki, liczby ciąż, masy urodzeniowej i palenia tytoniu.

Do badań genetycznych zakwalifikowano kobiety, u których menopauza wystąpiła przynajmniej przed rokiem, i które nie stosowały terapii wpływającej na masę kostną, w tym takich leków, jak: selektywne modulatory receptora estrogenowego – *SERM* (*selective estrogen-receptor modulator*) kalcitonina, bifosfoniany, heparyna, sterydy, hormony tarczycy, leki przeciwpadaczkowe, analogi GnRH (*gonadotropin-releasing hormone*), tibolon, oraz nie poddały się hormonalnej terapii zastępczej (HTZ). Z badań wykluczono pacjentki po zabiegu owariektomii obu-

stronnej, a także cierpiące na zaburzenia endokrynologiczne i metaboliczne, schorzenia hematologiczne, chorobę nowotworową, choroby nerek, schorzenia autoimmunologiczne, choroby tkanki łącznej, ze względu na możliwość ich wpływu na utratę masy kostnej. Dodatkowo zbadano grupę kobiet populacji kaukaskiej w wieku rozrodczym.

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

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

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

### Izolacja DNA

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

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

Do izolacji DNA wykorzystano komercyjnie dostępny zestaw „QIAamp DNA Blood Mini Kit” (Qiagen). Analizę ilościową i jakościową DNA przeprowadzono mierząc absorbancję na spektrofotometrze Eppendorf. Preparaty rozcieńczono wodą w proporcji 2  $\mu\text{l}$  DNA na 98  $\mu\text{l}$  wody, wytrząsano i odwirowano. Do kalibracji spektrofotometru wykorzystano 100  $\mu\text{l}$  wody. Odczyt przeprowadzano przy trzech długościach fali elektromagnetycznej:

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

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

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

gdzie: R – krotność rozcieńczenia.

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

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

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

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

Sekwencje starterów dla: *RANKL* -643C/T

F: 5' - GGA TGC TTG CTT CTG GCT AC - 3'

R: 5' - ACC CTT CCT GTC CAA CCT CT - 3'

Długość produktu amplifikacji: -246 pz

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

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

### Analiza polimorfizmów techniką PCR-RFLP

Analiza długości fragmentów restrykcyjnych PCR-RFLP (*restriction fragments length polymorphisms* –

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

Enzym (polimorfizm)	Charakterystyka miejsca hydrolizy	Wielkości uzyskanych fragmentów restrykcyjnych badanego amplimeru
<i>TscAI</i> ( <i>TspRI</i> ) ( <i>RANKL</i> -643T/C)	enzym hydrolizuje, gdy występuje T  nie hydrolizuje, gdy występuje C	TT (196 pz, 50pz) CT (246 pz, 196 pz, 50pz) CC (246 pz)

– RFLP) pozwala wykryć różnice w sekwencji produktów PCR, polegające na obecności lub braku tzw. miejsca restrykcyjnego, rozpoznawanego przez endonukleazy restrykcyjne. Za pomocą techniki PCR-RFLP analizowano polimorfizm *RANKL* -643C/T. Do analizy restrykcyjnej zastosowano enzym *TscAI*. Sekwencje nukleotydowe rozpoznawane przez wykorzystane enzymy oraz długości fragmentów DNA uzyskane w wyniku hydrolizy enzymatycznej umieszczono w tabeli I.

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

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

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

#### Analiza statystyczna

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

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

Zbadano wpływ badanych polimorfizmów na wartości wskaźników *T-score*, *Z-score*, L2–L4 AM, L2–L4 YA, L2–L4 BMD, BMI oraz innych parametrów

klinicznych, przedstawionych za pomocą średniej arytmetycznej, odchylenia standardowego oraz błędu standardowego średniej. W tym celu zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA. Przyjęto wystąpienie istotności statystycznej dla  $p < 0,05$ .

### WYNIKI

W tabelach II–IV zamieszczono dane dotyczące częstości występowania badanego polimorfizmu (C-643T) genu kodującego ligand RANK (*RANKL*) w grupach kobiet zakwalifikowanych do badań.

Częstość występowania homozygotycznych genotypów CC i TT oraz heterozygotycznego CT w polimorfizmie -643C/T (C-643T) genu *RANKL* była porównywalna:

- u kobiet z osteoporozą oraz bez osteoporozy (kobiety z osteopenią i zdrowe po menopauzie; tab. II), w obu tych grupach częstszy był heterozygotyczny genotyp CT;
- u kobiet z osteoporozą oraz u kobiet zdrowych po menopauzie, nie zaobserwowano między nimi różnic istotnych statystycznie, w obu grupach wyraźnie częstszy był heterozygotyczny genotyp CT (tab. II i III);
- u kobiet z osteoporozą oraz u kobiet zdrowych w wieku reprodukcyjnym, nie zaobserwowano między nimi różnic istotnych statystycznie, w obu grupach wyraźnie częstszy był heterozygotyczny genotyp CT (tab. II i IV);

Częstość występowania homozygotycznych genotypów CC oraz TT w polimorfizmie -643C/T (C-643T) genu *RANKL* była porównywalna:

- u kobiet z osteopenią oraz u kobiet zdrowych po menopauzie, nie obserwowano między nimi różnic statystycznie znamiennych (tab. III), w przypadku heterozygoty CT ujawniono nieco częstszą obecność tego genotypu u kobiet zdrowych, w obu badanych grupach kobiet częstszy był heterozygotyczny genotyp CT;
- u kobiet z osteopenią oraz u kobiet zdrowych w wieku rozrodczym (tab. III i IV), w obu grupach częstszy był heterozygotyczny genotyp CT.

Częstość występowania homozygotycznych genotypów CC i TT oraz heterozygotycznego CT w polimor-

fizmie -643C/T (C-643T) genu *RANKL* była porównywalna:

- u kobiet z osteoporozą oraz u kobiet z osteopenią (tab. II i III), w obu grupach heterozygotyczny genotyp CT wykrywano częściej niż oba pozostałe genotypy;
- w grupie badawczej (łącznie kobiety z osteopenią i z osteoporozą) oraz w grupie kobiet zdrowych po menopauzie (tab. III i IV), w obu grupach częściej stwierdzano heterozygotyczny genotyp CT.

– w grupie badawczej (łącznie kobiety z osteopenią i z osteoporozą) oraz w grupie kobiet zdrowych w wieku rozrodczym (tab. IV), nie stwierdzono między nimi różnic znamiennej statystycznych, w grupach tych wyraźnie częściej był heterozygotyczny genotyp CT.

– w grupie kobiet zdrowych po menopauzie i w grupie kobiet w wieku reprodukcyjnym (tab. III, IV), w obu grupach heterozygotyczny genotyp CT był częściej niż oba pozostałe genotypy.

**Tabela II.** Częstość występowania genotypów polimorfizmu *RANKL* -643C/T u kobiet z osteoporozą i bez osteoporozy (z osteopenią i zdrowe)  
**Table II.** Frequency of occurrence of *RANKL* -643C/T genotype polymorphism in women with osteoporosis and without osteoporosis (with osteopenia and healthy ones)

Genotyp <i>RANKL</i>	Kobiety z osteoporozą			Kobiety bez osteoporozy		
	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)	95% PU	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)	95% PU
CC	40 (18,5)	22,3	20,0–27,3	19 (17,5)	21,5	20,8–32,2
CT	123 (56,9)	49,8	45,3–63,6	61 (57,2)	49,7	50,8–67,6
TT	53 (24,6)	27,9	15,5–21,1	27 (25,3)	28,8	16,6–18,9
Razem	216 (100)	100		107 (100)	100	

**Tabela III.** Częstość występowania genotypów polimorfizmu *RANKL* -643C/T u kobiet z osteopenią i zdrowych po menopauzie  
**Table III.** Frequency of occurrence of *RANKL* -643C/T genotype polymorphism in women with osteopenia and healthy after menopause

Genotyp <i>RANKL</i>	Kobiety z osteopenią			Kobiety zdrowe		
	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)	95% PU	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)	95% PU
CC	10 (20,1)	21,6	15,8–24,7	7 (14,8)	21,3	18,6–31,2
CT	27 (53,2)	49,7	47,9–64,2	30 (62,8)	49,7	56,0–73,3
TT	14 (26,7)	28,7	21,5–35,0	11 (22,4)	29,0	10,4–17,9
Razem	51 (100)	100		48 (100)	100	

**Tabela IV.** Częstość występowania genotypów polimorfizmu *RANKL* -643C/T u kobiet z osteoporozą i osteopenią oraz kobiet w wieku rozrodczym  
**Table IV.** Frequency of occurrence of *RANKL* -643C/T genotype polymorphism in women with osteoporosis and osteopenia and healthy in reproductive age

Genotyp <i>RANKL</i>	Osteoporoza z osteopenią			Kobiety w wieku rozrodczym		
	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)	95% PU	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)	95% PU
CC	55 (17,9)	22,1	18,9–28,2	29 (19,3)	22,0	19,8–29,3
CT	176 (56,7)	49,8	54,5–69,0	87 (58,0)	49,8	44,4–65,2
TT	78 (25,4)	28,1	12,0–20,3	34 (22,7)	28,2	12,8–27,6
Razem	309 (100)	100		150 (100)	100	

## DYSKUSJA

Prawidłowy stan szkieletu po zakończeniu jego wzrostu utrzymuje się dzięki sprzężonym procesom resorpcji i tworzenia kości, nazywanym ich remodelowaniem [16]. Różne choroby, leki i anomalie metaboliczne naruszają stan zdrowotny kości, przyczyniając się do rozwoju osteoporozy. Istotnym czynnikiem

w patogenezie utraty masy kostnej oraz złamań jest aktywacja osteoklastycznej resorpcji kości [17]. Ma wówczas miejsce względnie szybka utrata kości z towarzyszącą destrukcją mikroarchitektury tkanki kostnej [18].

Analizy molekularne osteoporozy należą do najbardziej dynamicznie rozwijających się obszarów badań związanych z biologią kości. Znane są zarówno doniesienia, w których określa się rolę czynników gene-

tycznych wpływających na powstawanie osteoporozy, jak i strategie poszukiwania genów odpowiedzialnych za to schorzenie. W dwudziestym wieku – na podstawie wielu badań z zakresu genetyki molekularnej kości oraz dzięki zastosowaniu statystycznej genetyki w identyfikowaniu genów dotyczących cech złożonych – opisano metody poszukiwania genu(ów) powiązanych z osteoporozą.

Badania nad osteoporozą to klasyczny przykład wykorzystania metod molekularnych do identyfikowania polimorfizmów genów, które byłyby związane z rozwojem osteopenii i osteoporozy. Analiza zmienności „genów kandydujących” w populacjach ludzkich opiera się na identyfikacji polimorfizmów SNP, które oznaczają równoczesne występowanie w danej populacji różnych form allelicznych danego genotypu analizowanego genu.

Mezenchymalne komórki zrębu pełnią ważną rolę w różnicowaniu osteoklastów i ścisłej interakcji z prekursorami hematopoetycznymi [19]. Komórki zrębu i dojrzałe osteoblasty uwalniają cytokiny oraz czynniki wzrostu, niezbędne do rozpoczęcia i wsparcia różnicowania osteoklastu. Błonowy czynnik stymulujący kolonie makrofagów (M-CSF) oraz rozpuszczalny RANKL są niezbędne do indukcji osteoklastogenezy [20].

Skoro główną rolą RANKL jest regulowanie metabolizmu kości przez kontrolowanie rozwoju osteoklastów, to większość badań polimorfizmu genu *RANKL* skupia się na związku między genetyczną wariacją RANKL i chorobami kości, takimi jak osteoporoza. RANKL eksponowany na powierzchni komórek preosteoblastycznych wiąże się z RANK na komórkach prekursora osteoblastów. Ligand RANK jest niezmiernie ważny dla różnicowania, a następnie fuzji do komórek wielojądrzastych, a także do aktywacji i przeżycia komórek osteoblastycznych. Zdolność preosteoblastycznych komórek do podtrzymywania rozwoju osteoklastów jest silnie zaburzona podczas różnicowania osteoblastu, głównie z powodu *down regulation* ze strony RANKL [21]. Należy pamiętać, że osteoblasty produkują OPG, która jest receptorem wabikowym dla RANKL.

W niniejszej pracy analizowano związek polimorfizmów z patomechanizmem osteoporozy na podstawie rozkładu częstości poszczególnych genotypów w celu znalezienia genotypu, który mógłby warunkować wystąpienie choroby kości. Oceniono również wpływ częstości badanych polimorfizmów na określone parametry osobiste i kliniczne u kobiet w wieku pomenopauzalnym.

Jedną z przyczyn osteoporozy są zaburzenia w metabolizmie kostnym, które podlegają regulacji przez trzy peptydy, tj. RANK, RANKL oraz OPG, tworzące szlak sygnałowy RANK/RANKL/OPG. Poznanie polimorfizmów genetycznych wymienionych genów – traktowanych jako kandydujące – może ułatwić

zrozumienie mechanizmu powstawania choroby kości, a przez to umożliwić wczesne diagnozowanie i skuteczne leczenie.

Porównując częstość polimorfizmu *RANKL* C-643T w grupie pacjentek z osteoporozą i w grupie kobiet o prawidłowych wartościach *T-score* z parametrami kostnymi nie wykazano jego istotnego związku z wystąpieniem choroby. Nie zaobserwowano także wpływu badanego polimorfizmu na BMD.

W grupie kobiet o prawidłowych wartościach *T-score* zaobserwowano istotne statystycznie zależności między genotypem a niektórymi parametrami klinicznymi. W przypadku polimorfizmu *RANKL* C-643T wykazano istotną statystycznie zależność między poszczególnymi genotypami a masą ciała oraz BMI w grupie kobiet z osteoporozą. Kobiety o genotypie CC cechowała niższa masa ciała oraz niższe wartości wskaźnika masy ciała BMI.

W badaniu polimorfizmu *RANKL* C-643T stwierdzono częstsze występowanie genotypu TT oraz niższą frekwencję genotypu CT zarówno w grupie kobiet chorych na osteoporozę w porównaniu z kobietami zdrowymi w wieku pomenopauzalnym, jak i zestawiając łącznie grupę kobiet chorych na osteopenię i osteoporozę z grupą o prawidłowych wartościach *T-score*. Ponadto porównując częstości genotypów TT i CT w grupie pacjentek ze zdiagnozowaną osteopenią oraz w grupie kobiet w wieku rozrodczym nie znotowano znaczących różnic, przy czym nadal u chorych kobiet po menopauzie genotyp TT był częstszy, a heterozygota CT rzadsza. W wyniku analizy częstości występowania alleli zaobserwowano, że allel T pojawiał się częściej zarówno w grupie kobiet z osteoporozą, jak i ogólnie w grupie pacjentek z *T-score* < -1 w porównaniu z osobami, u których wartości tego współczynnika były prawidłowe. W zestawieniu grupy osób chorych po menopauzie (*T-score* < -1) z grupą kontrolną w wieku reprodukcyjnym allel T również był częstszy.

Przegląd danych literaturowych pozwala wnioskować, że nie ma jednoznacznych wyników opisujących wpływ badanych polimorfizmów *RANKL* na BMD i ewentualne wystąpienie osteoporozy. Uzyskany w pracy rozkład częstości genotypów polimorfizmu *RANKL* C-643T jest jednak analogiczny z rozkładem uzyskanym w badaniach innych populacji kaukaskich [22,23,24].

Godne uwagi są słoweńskie badania kobiet po menopauzie [23], w których również nie znotowano związku między BMD w odcinku lędźwiowym kręgosłupa oraz biodra a polimorfizmem C-643T. Znotowano jednak wyższą wartość BMD szyjki kości udowej w przypadku genotypu TT w porównaniu z genotypem CC. Grupa słoweńska oprócz polimorfizmu *RANKL* C-643T analizowała również polimorfizmy C-290T, G-693C i G-1594A w rejonie promotorowym genu *RANKL*. W przypadku polimorfizmu C-290T

obserwowano jego związek z BMD szyjki kości udowej. Genotyp CC tego polimorfizmu badacze wiązali z niższą wartością BMD w porównaniu z genotypem TT. Natomiast istotne zmiany w BMD szyjki kości udowej i stawu biodrowego zarejestrowali w przypadku polimorfizmu G-693C w grupie kobiet po menopauzie, które nie stosowały terapii i zabiegów modyfikujących masę kości. Wyniki te sugerują, że genotypy TT z polimorfizmu RANKL C-290T i C-643T oraz genotyp CC polimorfizmu G-693C mogą wiązać się z większym tempem utraty masy kostnej [23]. Porównanie wyników badań populacji polskiej oraz słoweńskiej [22,25] wykazuje u kobiet słoweńskich w wieku pomenopauzalnym z osteopenią lub osteoporozą tendencję do częstszego niż u kobiet zdrowych po menopauzie występowania homozygoty TT. Porównanie wyników badań polskiej populacji użytych w niniejszej pracy z rozkładem genotypów w populacji słoweńskiej [25] wskazują na większe u pacjentek słoweńskich różnice w częstości genotypu RANKL TT między grupami z osteopenią i/lub osteoporozą po menopauzie a kobietami w wieku rozrodczym. Z kolei w populacji polskiej zanotowano większe różnice w częstości genotypu TT między grupą

kobiet z osteopenią a grupą kobiet zdrowych w wieku pomenopauzalnym [25].

Wpływ polimorfizmów RANKL na metabolizm kostny, BMD oraz częstość występowania złamań u kobiet po menopauzie badali również autorzy węgierscy. Przedmiotem analizy było kilka polimorfizmów ligandu RANK, w tym polimorfizm rs9533156 (C-643T). Wszystkie badane genotypy SNP były w stanie równowagi Hardy-Weinberga i wykazały korelację z BMD. W niniejszej pracy potwierdzono doniesienia Mencej i wsp. [22,23] o związku polimorfizmu C-643T genu RANKL z BMD biodra oraz odcinka lędźwiowego kręgosłupa, co obserwowano w badaniu węgierskim [24].

Dong i wsp. [26] przebadali amerykańską populację białych kobiet w USA w celu określenia powiązań szlaku RANKL/RANK/OPG ze wskaźnikiem kompresji kości udowej, który jest parametrem integrującym gęstość i masę kości oraz szerokość szyjki kości udowej, a także pomagającym w ocenie ryzyka złamań biodra. Znalezione trzy polimorfizmy genu RANKL istotnie związane z ryzykiem wystąpienia złamania stawu biodrowego. Badania te sugerują, że polimorfizmy genu RANKL mogą podwyższać ryzyko złamania biodra [26].

## PIŚMIENNICTWO

1. Ralston S.H. Genetics of osteoporosis. *Proc. Nutr. Soc.* 2007; 66: 158–165.
2. Eghbali-Fatourehchi G., Khosla S., Sanyal A., Boyle W.J., Lacey D.L., Riggs B.L. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J. Clin. Invest.* 2003; 111: 1221–1230.
3. Takahashi N., Udagawa N., Suda T. A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OPGL/TRANSE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999; 256: 449–455.
4. Lacey D.L., Tan H.L., Lu J., Kaufman S. et al. Osteoprotegerin ligand modulates murine osteoclast survival in vitro and in vivo. *Am. J. Pathol.* 2000; 157: 435–448.
5. Chen X.W., Garner S.C., Anderson J.J. Isoflavones regulate interleukin-6 and osteoprotegerin synthesis during osteoblast cell differentiation via an estrogen-receptor-dependent pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; 295: 417–422.
6. Bord S., Ireland D.C., Beavan S.R., Compston J.E. The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts. *Bone* 2003; 32: 136–141.
7. Fleurence R.L., Iglesias C.P., Johnson J.M. The cost effectiveness of bisphosphonates for the prevention and treatment of osteoporosis: a structured review of the literature. *Pharmacoeconomics* 2007; 25: 913–933.
8. Boonen S., McClung M.R., Eastell R., El-Hajj Fuleihan G., Barton I.P., Delmas P. Safety and efficacy of risenedronate in reducing fracture risk in osteoporotic women aged 80 and older: implications for the use of antiresorptive agents in the old and oldest old. *J. Am. Geriatr. Soc.* 2004; 52: 1832–1839.
9. Fili S., Karalaki M., Schaller B. Therapeutic implications of osteoprotegerin. *Cancer Cell Int.* 2009; 12: 9–26.
10. Brown J.M., Zhang J., Keller E.T. OPG, RANKL, and RANK in cancer metastasis: Expression and regulation. *Cancer Treat. Res.* 2004; 118: 149–172.
11. Ikeda T., Kasai M., Utsuyama M., Hirokawa K. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology* 2001; 142: 1419–1426.
12. Suzuki J., Ikeda T., Kuroyama H. et al. Regulation of osteoclastogenesis by three human RANKL isoforms expressed in NIH3T3 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 314: 1021–1027.
13. Ikeda T., Kasai M., Suzuki J. et al. Multimerization of the receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL) isoforms and regulation of osteoclastogenesis. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 47217–47222.
14. Feng X. RANKing intracellular signaling in osteoclasts. *IUBMB Life* 2005; 57: 389–395.
15. Blair J.M., Zhou H., Seibel M.J., Dunstan C.R. Mechanisms of disease: Roles of OPG, RANKL and RANK in the pathophysiology of skeletal metastasis. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 2006; 3: 41–49.
16. Raisz L.G. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J. Clin. Invest.* 2005; 115: 3318–3325.
17. Robbins J.A., Schott A.M., Garner P., Delmas P.D., Hans D., Meunier P.J. Risk factors for hip fracture in women with high BMD: EPIDOS study. *Osteoporos. Int.* 2005; 16: 149–154.
18. Dufresne T.E., Chmielewski P.A., Manhart M.D., Johnson T.D., Borah B. Risedronate preserves bone architecture in early postmenopausal women in 1 year as measured by three-dimensional microcomputed tomography. *Calcif. Tissue. Int.* 2003; 73: 423–432.
19. Lyritis G.P., Georgoulas T., Zafeiris C.P. Bone anabolic versus bone antitabolic treatment of postmenopausal osteoporosis. *Ann. NY Acad. Sci.* 2010; 1205: 277–283.
20. Hodge J.M., Kirkland M.A., Nicholson G.C. Multiple roles of M-CSF in human osteoclastogenesis. *J. Cell. Biochem.* 2007; 102: 759–768.
21. Gori F., Hofbauer L.C., Dunstan C.R., Spelsberg T.C., Khosla S., Riggs B.L. The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally regulated. *Endocrinology* 2000; 141: 4768–4776.
22. Mencej S., Albagha O.M., Prezelj J., Kocjan T., Marc J. Tumour necrosis factor superfamily member 11 gene promoter polymorphisms modulate promoter activity and influence bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *Mol. Endocrinol.* 2008; 40: 273–279.
23. Mencej S., Prezelj J., Kocijancic A., Ostanek B., Marc J. Association of NFSF11 gene promoter polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal women. *Maturitas* 2006; 55: 219–226.
24. Takacs I., Lazary A., Kosa J.P. et al. Allelic variations of RANKL/OPG signaling system are related to bone mineral density and in vivo gene expression. *Eur. J. Endocrinol.* 2010; 162: 423–431.



**25.** Mencej-Bedrac S., Prezelj J., Kocjan T. et al. The combinations of polymorphisms in vitamin D receptor, osteoprotegerin and tumour necrosis factor superfamily member 11 genes are associated with bone mineral density. *J. Mol. Endocrinol.* 2009; 42: 239–247.

**26.** Dong S.S., Liu X.G., Chen Y. et al. Association analyses of *RANKL/RANK/OPG* gene polymorphisms with femoral neck compression strength index variation in Caucasians. *Calcif. Tissue Int.* 2009; 85: 104–112.