

Magdalena Silska-Dittmar

**Nieźrównoważenia sprzężeń genu *LRP5* a gęstość mineralna kości u
dzieci z zespołem nerczycowym leczonych glikokortykosteroidami**

Rozprawa doktorska

Promotor: Prof. dr hab.n.med. Danuta Ostalska-Nowicka

I Katedra Pediatrii

Klinika Kardiologii i Nefrologii Dziecięcej

Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego

w Poznaniu

Kierownik Katedry: Prof. dr hab.n.med. Aldona Siwińska

Poznań 2013

**Praca współfinansowana ze środków
Narodowego Centrum Badań i Rozwoju
Projekt Nefropedia.pl NR130033 10/2010**

**Pragnę złożyć serdeczne podziękowania
Prof. dr hab.n.med. Danucie Ostalskiej-Nowickiej
za okazaną pomoc i życzliwość, poświęcony czas
oraz inspirację do dalszego rozwoju naukowego,**

**Prof. dr hab.n.med. Aldonie Siwińskiej,
Prof. dr hab.n.med. Jackowi Zachwieji,
i Prof. dr hab.n.med. Maciejowi Zabłowi
za umożliwienie przeprowadzenia pracy badawczej,**

**Kolegom z Kliniki Kardiologii i Nefrologii Dziecięcej
oraz Katedry i Zakładu Histologii i Embriologii
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu
za serdeczną atmosferę i nieocenioną pomoc,**

**a także Mężowi i Rodzicom
za okazane wsparcie i wyrozumiałość**

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	6
1. WSTĘP	11
1.1. Kość	13
1.1.1. Budowa kości	13
1.1.2. Rozwój kości	13
1.1.3. Remodeling kości	15
1.2. AKTYWACJA OSTEOKLASTÓW	16
1.2.1. Ścieżka sygnałowa RANK/RANKL	16
1.3. ŚCIEŻKA SYGNAŁOWA WNT	17
1.3.1. Geny <i>Wng</i> i <i>Int-1</i>	17
1.3.2. Palmitoilacja białek Wnt	18
1.3.3. Receptor Frizzled	18
1.3.4. Ścieżka kanoniczna Wnt	19
1.3.5. Białko BMP2	19
1.4. BIAŁKO LRP5	20
1.4.1. Kompleks Wnt-FZD-LRP5-LRP6	20
1.4.2. Rola białka LRP5 w metabolizmie kostnym	20
1.4.3. <i>LRP5</i> i inne geny prekursorzy rozwoju osteoporozy	21
1.5. PODŁOŻE GENETYCZNE CHOROÓB	22
1.5.1. Choroby genetyczne uwarunkowane	22
1.5.2. Zmiany sekwencji DNA	23
1.5.3. Polimorfizm pojedynczego nukleotydu	24
1.5.4. Haplotypy	25
1.5.5. Znaczenie analizy SNP w praktyce klinicznej	26
1.6. CZYNNIKI ŚRODOWISKOWE RYZYKA ROZWOJU OSTEOPOROZY	27
1.6.1. Aktywność fizyczna	27
1.6.2. Dieta	28
1.7. CZYNNIKI HORMONALNE RYZYKA ROZWOJU OSTEOPOROZY	31
1.7.1. Androgeny i estrogeny	31
1.7.2. Parathormon	32
1.8. OSTEOPOROZA WTÓRNA	33
1.8.1. Choroby przewlekłe, a osteoporoza	33
1.8.2. Osteoporoza jatrogena – wpływ glikokortykosteroidów na kość	35
1.9. ZESPÓŁ NERCZYCOWY	37
1.10. DENSYTOMETRIA	38
2. CELE	41
3. PACJENCI I METODY	42
3.1. PACJENCI	42
3.1.1. Grupa badana	42
3.1.2. Grupa kontrolna	48
3.1.3. Materiał do badań	49
3.2. METODY	49
3.2.1. Ocena densytometryczna pacjentów z grupy badanej	49
3.2.2. Izolacja całkowitego genomowego DNA w krwi obwodowej	57
3.2.3. Pomiar stężenia DNA	59

3.2.4.	PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem sond typu TaqMan	59
3.3.	ANALIZA POLIMORFIZMÓW I METODA STATYSTYCZNA	63
3.4.	OCENA BLOKÓW HAPLOTYPOWYCH	64
4.	WYNIKI.....	65
4.1.	UZYSKANIE MATERIAŁU DO BADAŃ GENETYCZNYCH I OPRACOWANIE BAZY DANYCH.....	65
4.2.	ANALIZA POLIMORFIZMÓW SNP W GENIE <i>LRP5</i>	65
4.3.	ANALIZA NIEZRÓWNOWAŻENIA SPRZĘŻEŃ NA PODSTAWIE BLOKÓW HAPLOTYPOWYCH.....	80
5.	OMÓWIENIE WYNIKÓW I Dyskusja.....	83
6.	WNIOSKI	96
7.	PIŚMIENNICTWO.....	97
8.	STRESZCZENIE	107
9.	ABSTRACT	110
10.	ANEKS	113
10.1.	WYKAZ TABEL.....	113
10.2.	WYKAZ RYCIN.....	115
10.3.	WYKAZ ZAŁĄCZNIKÓW	116

Wykaz skrótów

ACTH	kortykotropina (ang. adrenocorticotropic hormone)
ACVR1	receptor aktywiny A typu I-ego (ang. activin A receptor, type I)
ADHD	zespół nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (ang. attention deficit hyperactivity disorder)
APC	białko gruczolakowatości polipowatej okrężnicy (ang. adenomatosis polyposis coli)
ASDII	ubytek w przegrodzie międzyprzedsionkowej serca typu II (ang. atrial septal defect type II)
BA	powierzchnia pomiaru kości (ang. bone area)
BMAD	obliczona gęstość mineralna kości (ang. bone mineral apparent density)
BMC	zawartość minerału w kości (ang. bone mineral contents)
BMD	gęstość mineralna kości (ang. bone mass density)
BMI	współczynnik masy ciała (ang. body mass index)
BMP2	morfogenetyczne białko kostne 2 (ang. bone morphogenetic protein 2)
BMU	jednostka przebudowy kostnej (ang. bone mineral unit)
CEPH	Fundacja Jean Dausset- Centrum Badań nad Polimorfizmami Genów Ludzkich (fr. Jean Dausset-Centre d'Etude du Polymorphisme Humain)
cFos	protoonkogen komórkowy czynnika transkrypcyjnego Fos (ang. cellular Finkel-Biskis-Jenkins Marine osteosarcoma)
COMT	katecholo-O-metylotransferaza (ang. catechol-O-methyl transferase)
COX-2	cyklooksygenaza 2 (ang. cyclooxygenase 2)
cFMS	homolog komórkowy protoonkogenu wirusa mięsaka kotów (ang. cellular homolog of the V-FMS oncogene product of the Susan McDonough strain of feline sarcoma virus)
CK1 α	kinaza kazeiny 1 α (ang. casein kinase 1 α)
c-Src	protoonkogenetyczna kinaza tyrozynowa komórek mięsaka (ang. cell sarcoma proto-oncogene tyrosine-protein kinase)
CYP	oksydaza cytochromu P450 (ang. cytochrome P450 oxidase)

DMP	rozlane mezangialne kłębuszkowe zapalenie nerek (ang. diffuse mesangial proliferation)
DVL-1	rozszczepiony homolog białka segmentalnej polaryzacji (ang. segment polarity protein dishevelled homolog 1)
DXA	absorpcjometria podwójnej wiązki energetycznej promieniowania rentgenowskiego (ang. dual X-ray absorptiometry)
EDTA	kwas etylenodwuaminotetraoctowy (ang. ethylenediaminetetraacetic acid)
EFPIA	Europejska Federacja Towarzystw Przemysłu Farmaceutycznego (ang. European Federation of Pharmaceutical Industry Associations)
EGF	naskórkowy czynnik wzrostowy (ang. epidermal growth factor)
ER α	receptor estrogenowy alfa (ang. estrogen receptor alpha)
FAM	karboksylfluoresceina (ang. carboxyfluorescein)
FAO	Organizacja Żywności i Rolnictwa (ang. Food and Agriculture Organization)
FoSTeS	model blokowania widełek i przełączania matrycy (ang. fork stalling and template switching,)
Fps	kinaza tyrozynowa fps (ang. tyrosine kinase fps)
FRA-1	antygen I czynnika transkrypcyjnego Fos (ang. Fos-related antigen 1)
FRETr	bezpromienisty rezonansowy transfer energii (ang. fluorescence resonance energy transfer)
FSGS	ogniskowe segmentalne stwardnienie kłębuszków nerkowych (ang. focal segmental glomerulosclerosis)
FZD	białko Frizzled
GFR	współczynnik przesączania kłębuszkowego (ang. glomerular filtration rate)
GPCRs	sprężone receptory białka G (ang. G protein coupled receptors)
GSK3	kinaza 3 syntazy glikogenu (ang. glycogen synthase kinase 3)
HWE	prawo niezrównoważenia Hardy-Weinberga (ang. Hardy-Weinberg Equilibrium)
IGF-1,2	insulinopodobny czynnik wzrostu-1,2 (ang. insulin-like growth factor-1,2)
INF-beta	interferon beta
Il-1	interleukina 1
Il-6	interleukina 6
Il-11	interleukina 11

Int-1	białko integracji 1(ang. Integration-1)
IOF	Międzynarodowa Fundacja Osteoporozy (ang. International Osteoporosis Foundation)
ISCD	Międzynarodowe Towarzystwo Densytometrii Klinicznej (ang. International Society for Clinical Densitometry)
ISKDC	Międzynarodowa Fundacja ds. Badań Chorób Nerek u Dzieci (ang. International Study for Kidney Diseases In Children)
ITGAV	integryna alfa V (ang. integrine alpha V)
IZN	idiopatyczny zespół nerczycowy
LAMC2	łańcuch lamininy podjednostki gamma 2 (ang. laminin subunit gamma-2 chain)
LD	niezrównoważenie sprzężeń (ang. linkage disequilibrium)
LDL	białko związane z receptorem lipoproteinowym niskiej gęstości (ang. low-density lipoprotein-receptor related proteins)
LRP5	białko związane z receptorem lipoproteiny 5 (ang. lipoprotein receptor-related protein 5)
LRP6	białko związane z receptorem lipoproteiny 6 (ang. lipoprotein receptor-related protein 6)
MATN3c	czynnik sygnałowy Matrilin 3 (ang. Matrilin-3)
mc.	masa ciała
MCD	submikroskopowe kłębuszkowe zapalenie nerek (ang. minimal changes disease)
M-CSF	czynnik stymulujący kolonie makrofagów (ang. macrophage colony stimulating factor)
MesGn	mezangialne kłębuszkowe zapalenie nerek (ang. mesangial glomerulonephritis)
MESP1	białko mesodermy tylnej 1 (ang. mesoderm posterior protein 1)
MH	prolifерacja mezangialna (ang. mesangial hypercellularity)
MITF	czynnik transkrypcyjny związany z małowoczem (ang. microphthalmia-associated transcription factor)
MMTV	mysi wirus nowotworu gruczołu sutkowego (ang. mouse mammary tumor virus)
NAHR	nie-alleliczna homologiczna rekombinacja (ang. non-allelic homologous recombination)

NFATC1	jądrowy czynnik aktywowanych limfocytów T, cytoplazmatyczny 1 (ang. nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1)
NF-κB	czynnik jądrowy akceleratora łańcuchów lekkich kappa aktywowanych limfocytów B (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
NHEJ	nie-homologiczne łączenie końców (ang. non-homologous end-joining)
OPG	osteoprotegeryna (ang. osteoprotegerin)
OPPG	zespół osteoporoza-pseudoglejak (ang. osteoporosis-pseudoglioma syndrome)
OPTA1	osteopetroza, typ 1 autosomalny recesywny (ang. osteopetrosis autosomal recessive 1)
OR	iloraz szans (ang. odds ratio)
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. polymerase chain reaction)
PO4	jon fosforanowy
PI-3K	kinaza 3 fosfatidyloinozytolu (ang. phosphatidylinositol 3-kinase)
PP2A	kinaza 3 fosfatazy (ang. phosphatase kinase 3).
PTHrP	białko związane z parathormonem (ang. parathyroid hormone-related protein)
PU.1	czynnik transkrypcyjny PU.1
QCT	ilościowa tomografia komputerowa (ang. quantitative computer tomography)
QUS	ilościowa ultrasonografia (ang. quantitative ultrasonography)
RANK	aktywator receptora czynnika jądrowego κ B (ang. receptor activator of nuclear factor κ B)
RANKL	ligand aktywatora receptora czynnika jądrowego κ B (ang. receptor activator of nuclear factor κ B ligand)
RGD	sekwencja peptydowa argininy-glicyny i kwasu asparaginowego
ROR2	receptor sierocy 2 kinazy tyrozynowej (ang. receptor tyrosine kinase orphan receptor 2)
RQ-PCR	reakcja ilościowa polimerazy łańcuchowej w czasie rzeczywistym (ang. real-time quantitative polymerase chain reaction)
RUNX-2	czynnik transkrypcyjny 2 (ang. runt-related transcription factor 2)
Ryk	receptor kinazy tyrozynowej (ang. receptor tyrosine kinase)
SNP	polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism)

SRNS	steroidooporny zespół nerczycowy (ang. steroid resistant nephrotic syndrome)
SSLD	rdzeń niezrównoważenia sprzężeń (ang. solid spine of linkage disequilibrium)
SSNS	steroidowrażliwy zespół nerczycowy (ang. steroid sensitive nephrotic syndrome)
TAMRA	6-karboksylo-tetrametylorodamina
TBBMC/LBM	relatywny indeks wytrzymałości mechanicznej kości (ang. total body bone mineral contents/lumbar bone mass)
TCF/LEF	czynnik transkrypcyjny LEF (ang. transcription factor LEF)
TDGF1	teratocarcinoma-pochodny czynnik wzrostowy 1 (ang. teratocarcinoma-derived growth factor 1)
TGF-beta	transformujący czynnik wzrostu-beta (ang. transforming growth factor-beta)
Th17	limfocyt T pomocniczy 17 (ang. T helper cell 17)
TNF	czynnik martwicy nowotworów (ang. tumor necrosis factor)
TNFSF11	członek 11 nadrodziny czynników martwicy nowotworu (ang. tumor necrosis factor superfamily, member 11)
Tph1	hydroksylaza tryptofanu 1 (ang. tryptophan hydroxylase 1)
T-score	liczba odchyłeń standardowych masy kostnej pacjenta w odniesieniu do szczytowej masy kostnej odpowiadającej danej płci
Wnt	ścieżka sygnałowa beta-katenin (ang. wingless and Int1 pathway)
Wg	gen Wingless
VDR	receptor witaminy D (ang. vitamin D receptor)
VIC	barwnik reporterowy 5', nazwa zastrzeżona przez firmę ABI
XBP1	białko wiążące X-box 1 (ang. X-box binding protein 1)
ZIC2	białko palca cynkowego 2 (ang. zinc finger protein 2)
Z-score	liczba odchyłeń standardowych masy kostnej pacjenta w odniesieniu do masy kostnej równowiekowej grupy kontrolnej odpowiadającej danej płci
1, 25(OH)D3	kalcytriol
4GR	reguła czterech gamet (ang. four gamete rule)
25(OH)D3	kalcidiol

1. Wstęp

Osteoporoza, zgodnie z obowiązującą od 1993r. definicją ekspertów Światowej Organizacji Zdrowia (ang. World Health Organization, WHO), jest przewlekłym schorzeniem metabolicznym układu szkieletowego, charakteryzującym się obniżeniem masy kostnej i zaburzeniem mikroarchitektury kości, a co za tym idzie zmianami jej właściwości reologicznych [1,2]. Nowoczesna koncepcja osteoporozy oparta jest na opinii grupy badaczy National Osteoporosis Foundation i National Institutes of Health (USA) z roku 2001, która kładzie nacisk na upośledzenie wytrzymałości kości na działanie sił mechanicznych i wprowadza pojęcie zwiększonego ryzyka złamania. Wnioski te wysunięto na podstawie analizy retrospektywnej 2 449 doniesień literaturowych z lat 1995-1999 [3]. Obniżenie gęstości mineralnej kości prowadzi u dzieci i osób młodych w pierwszej kolejności do niekorzystnej przebudowy strukturalnej i wzrostu podatności na niskoenergetyczne złamania w odcinku lędźwiowym kręgosłupa, gdzie obserwujemy w warunkach fizjologicznych najwyższy obrót kostny.

Szacuje się, że osteoporoza może dotyczyć nawet ponad 75mln ludzi, żyjących w Stanach Zjednoczonych, Japonii i Europie [4,5]. Odsetek procentowy mężczyzn powyżej 50 roku życia dotkniętych tą chorobą wynosi ok. 10%. W przypadku populacji kobiet w wieku pomenopauzalnym liczba ta wzrasta do 30-40%. Łączna liczba złamań osteoporotycznych w populacji ogólnoswiatowej wynosi ok. 8.9 miliona przypadków na rok, a odsetek lat niepełnosprawności w grupie pacjentów z osteoporozą jest wyższy niż u chorych z reumatoidalnym zapaleniem stawów czy nadciśnieniem tętniczym [6]. Już dwie dekady temu liczbę złamań tylko bliższego końca kości udowej na świecie szacowano na ponad 1,2 mln przypadków rocznie [5]. W najbliższym dziesięcioleciu według szacunków WHO liczba ta ulegnie prawdopodobnie podwojeniu. Dane z wspólnego raportu International Osteoporosis Foundation (IOF) i European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA) z lipca 2011r., oparte na badaniach przeprowadzonych w sześciu europejskich krajach, wskazują, że co piąty mężczyzna i co trzecia kobieta powyżej 50 roku życia dozna złamania osteoporotycznego [7].

W grupie pacjentów w wieku rozwojowym znacznie rzadziej obserwujemy osteoporozę pierwotną, rozumianą jako idiopatyczną osteoporozę młodzieńczą, opisaną już

w latach 60-tych minionego stulecia przez Denta, prowadzącą do rozwoju deformacji kostnych, wad postawy i niedoboru wzrostu [8,9]. Jest to pierwotna choroba kości o nie do końca jasnej etiologii, którą wiąże się z zaburzeniami endokrynologicznymi, immunologicznymi i genetycznymi oraz z niedoborem witaminy D i ewentualnym wpływem czynników infekcyjnych. Dotyka ona pacjentów wcześniej zdrowych, zwykle w okresie przedpokwitaniowym, przy czym część dzieci zdrowieje samoistnie, podczas gdy u innych dochodzi do rozwoju trwałego kalectwa z osłabieniem siły mięśniowej, zaburzeniami chodu i złamaniami kręgow oraz przynasad kości długich. Znacznie częściej w literaturze opisywane są przypadki osteoporozy wtórnej u dzieci, wśród przyczyn której jako jeden z najczęstszych wymienia się czynnik jatrogeny pod postacią przewlekłej glikokortykosteroidoterapii (GKS) [10].

Udowodniono, że podaż dobową prednizonu w dawce większej/równej 7,5 mg przez okres co najmniej 3 miesięcy sprzyja spadkowi gęstości mineralnej kości i zaburzeń jej mikrostruktury [11]. Jest to efekt upośledzonego wchłaniania wapnia poprzez blokowanie receptorów witaminy D w nabłonku jelitowym, hamowania hydroksylacji nerkowej 1,25(OH)D₃, ograniczenia wchłaniania zwrotnego wapnia w nerkach z następczą hiperkalciurią i wzrostem stężenia PTH oraz bezpośredniej dezaktywacji i hamowania proliferacji osteoblastów, hamowania produkcji kolagenu i kostnych białek niekolagenowych oraz aktywacji osteoklastów przez GKS [11,12]. W populacji europejskiej szacuje się, że ok. 0,5% ludności przyjmuje przewlekle steroidy, z czego mniej niż 15% otrzymuje właściwą profilaktykę kostną.

Jednakże analiza doniesień literaturowych i doświadczenie własne każą stwierdzić, że stosowanie jednolitych schematów leczenia prednizonem z pozoru homogennych grup pacjentów, w tym dzieci w wieku przedpokwitaniowym, nie u wszystkich prowadzi do nasilonego rozwoju niekorzystnej przebudowy kostnej. Pozwala to domniemywać o istnieniu istotnego molekularnego podłoża, predysponującego w sposób niezależny od dodatkowych wpływów środowiskowych do rozwoju osteoporozy.

1.1. Kość

1.1.1. Budowa kości

Kość stanowi szczególny rodzaj tkanki łącznej, wyróżniający się unikatowym połączeniem takich cech jak twardość i elastyczność. Zachowanie stanu równowagi w obrębie mikroarchitektury struktur kostnych decyduje o ich wytrzymałości na odkształcenia. Kość tworzy istota międzykomórkowa organiczna i nieorganiczna oraz elementy komórkowe, takie jak osteoblasty, osteocyty i osteoklasty. W okresie życia płodowego jako pierwsza pojawia się kość grubowłóknista, zawierająca duże ilości komórek kostnych i osteoidu z grubymi pęczkami kolagenu typu I-ego. W miarę dojrzewania zastępuje ją kość drobnowłóknista beleczkowa i zbita [13]. Z pozostałościami kości grubowłóknistej spotykamy się u osób dorosłych w warunkach fizjologicznych wyłącznie w miejscach przyczepów ścięgien, szwach czaszkowych czy błędniku kostnym oraz każdorazowo w miejscach uszkodzeń i w przypadku zaburzeń remodelingu w niektórych chorobach kości.

Dojrzałą kość charakteryzuje obecność blaszek kostnych, utworzonych w głównej mierze z cienkich, 1-4 mikrometrowych włókien kolagenowych. We wnętrzu kości płaskich oraz nasadach i przynasadach kości długich blaszki kostne są zorganizowane przestrzennie w postaci bogatych w osteocyty beleczek otoczonych szpikiem kostnym [14]. Natomiast część zewnętrzną kości płaskich i trzony kości długich, ze względu na skupiające się na nich ogromne siły mechaniczne, tworzy kość zbita z systemami Haversa. Są to układy przestrzenne kilku-kilkudziesięciu blaszek kostnych, tworzących okręgi współśrodkowe, skupiające jamki kostne z osteocytami i otaczające kanał centralny prowadzący nerw i naczynie krwionośne. Całość od zewnątrz pokrywa łącznotkankowa okostna, z wnিকającymi do wnętrza kości kanałami Sharpey'a. Do procesu kościotworzenia dochodzi na podłożu mezenchymy jak ma to miejsce w przypadku kości mózgowcowej i twarzoczaszki oraz części kości obręczy barkowej, lub jak ma to miejsce w przypadku pozostałych kości, na podłożu chrząstki [15].

1.1.2. Rozwój kości

Komórki mezenchymy szpiku kostnego, w chwili rozpoczęcia produkcji kolagenu typu I-ego i proteoglikanów, przekształcają się w osteoblasty, tworzące poprzez połączenia typu

neksus, jednolitą warstwę na powierzchni nowo powstającej kości. Osteoblasty wydzielają dwie podstawowe glikoproteiny, odpowiedzialne za rozpoczęcie mineralizacji kości: osteonektynę, wiążącą wspólnie z kolagenem sole wapnia i hydroksyapatyty, oraz zależną od witaminy D i K osteokalcynę, siecującą jony wapniowe [16]. W miarę postępu procesu mineralizacji kości osteoblasty otaczają się rosnącą objętością macierzy pozakomórkowej i ulegają przekształceniu w osteocyty, lokujące się w nowo powstałych jamkach kostnych formujących się blaszek.

W przypadku kościotworzenia na podłożu chrzęstnym mamy do czynienia z powstawaniem formacji kostnych w oparciu o podochrzęstne elementy trzonu chrząstki szklistej, które przekształcają się w osteoblasty. Komórki chrzęstne wokół tworzącego się mankietu kostnego ulegają degeneracji, czemu towarzyszy intensywne wapnienie przy udziale chondrokalcyny [17]. Równocześnie do wnętrza struktury wnikają pęczki naczyniowo-komórkowe i chondroklasty, makrofagi chrząstki, odpowiedzialne za utworzenie wolnej przestrzeni dla rozwijających się beleczek kostnych. Obok pierwotnego punktu kostnienia w trzonie, dochodzi równocześnie do podziału komórek w obrębie przyszłych przynasad, co prowadzi do wzrostu kości na długość. W trakcie późniejszego życia płodowego i pozapłodowego tworzą się w obrębie śródchrzęstnej liczne wtórne punkty kostnienia odpowiadające za dalszy ostateczny rozwój kości.

Proces kościotworzenia jest wynikiem ciągłej kooperacji pomiędzy osteoklastami, a osteoblastami. Wzrost szkieletu, stymulowany przez wątrobowy hormon somatomedynę c (IGF-1), kończy się u kobiet około 18 r.ż., a u mężczyzn mniej więcej dwa lata później wraz z zanikiem płytek nasadowych i ostatecznym połączeniem trzonów i nasad kości długich. Szczytową masę kostną kobiety osiągają około 25, a mężczyźni 30 roku życia [18]. Nie oznacza to jednak przejścia kości w stan spoczynku metabolicznego. Dynamiczna współpraca komórek kościotwórczych i kościogubnych trwa przez całe życie organizmu, ale wraz z wiekiem jej ciężar przechyla się w stronę procesów resorpcji kostnej. Biorąc pod uwagę siły mechaniczne, działaniu których podlegają elementy szkieletu, chcąc zapewnić ich niezmienną funkcjonalność, organizm dorosłego człowieka dzięki procesom remodelingu kostnego wymienia w ciągu roku aż około 10% masy kostnej. Wartość ta wzrasta w pierwszych dwóch latach życia dziecka, w okresie jego najintensywniejszego wzrostu, pionizacji i rozwoju chodu do około 50% [19].

1.1.3. Remodeling kości

Modelowanie ma charakter następujących po sobie, zamkniętych cykli resorpcji i wtórnej odbudowy kości, celem naprawy mikrouszkodzeń i dostosowania poszczególnych elementów szkieletu do zmieniających się obciążeń oraz zapewnienia zrównoważonego bilansu w zakresie gospodarki wapniowo-fosforanowej ustroju [20,21]. Do niszczenia kości dochodzi w wyniku mechanizmów angiogenezy i związanej z tym migracji osteoklastów, resorpcji osteoklastycznej i lizy periosteocytarnej [22]. Mechanizmy te pozostają zależne od czynników genetycznych, humoralnych i środowiskowych. Promotorem resorpcji kostnej jest parathormon (PTH), którego wydzielanie w warunkach fizjologicznych jest w głównej mierze uwarunkowane stężeniem wapnia zjonizowanego w surowicy krwi. PTH stanowi supresor sklerostyny, antagonisty ścieżki sygnałowej Wnt [23,24].

Osteoklasty są komórkami pnia hematopoetycznego, wywodzącymi się z linii makrofagowo-monocytovej, których proliferacja i różnicowanie są zależne od szeregu białek takich jak PU.1, MITF, M-CSF, c-Src, PI-3K, cFMS, RANK, NFATc1, NF-κB, cFos/Fra-1 [25,26]. Fuzja prekursorów osteoklastów jest pobudzana przez witaminę D. Czynnikiem transkrypcyjnym PU.1 odpowiada bezpośrednio za wczesne nieswoiste różnicowanie monocytów [27].

Dalsza proliferacja i przeżywanie prekursorów osteoklastów oraz aktywność ich dojrzałych form podlegają regulacji ze strony należącego do rodziny MITF czynnika M-CSF (ang. macrophage colony stimulating factor) [28]. Receptorem dla M-CSF na prekursorach osteoklastów jest c-FMS, zależny od kinaz c-Src (ang. cellular sarcoma) i PI-3K (ang. phosphatidylinositol 3-kinase). Mutacje związane z M-CSF mogą powodować zaburzenia w zakresie ruchliwości i rozprzestrzeniania się komórek kościogubnych oraz charakterystycznej organizacji ich cytoszkieletu [29].

Postaci dojrzałe osteoklastów cechuje dwubiegunowość morfologiczna i czynnościowa, decydujące o powodzeniu resorpcji kostnej [30,31]. Biegun wierzchołkowy za pośrednictwem pierścienia aktynowego i podosomów kotwiczy komórkę osteoklasta w matriks kostnej. Ten naprzemienny równoległy i prostopadły do powierzchni kostnej układ punkcikowych struktur aktynowych jest prawdopodobnie specyficzny dla osteoklastów z linii monocytovej i zależny od takich protoonkogenów jak scr czy fps. Dodatkowymi białkami stabilizującymi cytoszkielet osteoklastów i umożliwiającymi ich adhezję do kości są fibryna,

aktynina-a i gelsolina, dominujące w fazie ruchu oraz vinkulina i talina, przeważające w momencie kotwiczenia do strefy resorpcji. Bezpośrednie połączenie integryn z białkami pozakomórkowymi zachodzi dzięki odczytaniu sekwencji RGD (Arg-Gly-Asp) [32].

Proces rozkładu hydroksyapatytów w obecności uwalnianych przez osteoklasty enzymów lizosomalnych, w tym katepsyn, ma miejsce w środowisku kwaśnym. Niskie pH w obszarze resorpcji kostnej jest wynikiem działania ATP-azowej pompy protonowej osteoklastów, wspomaganą przez kanał chlorkowy, zabezpieczający błonę przed nadmierną polaryzacją. Dodatkowe uwalnianie drogą pęcherzykową metaloproteaz zwiększa zakres pH, w którym zachodzi resorpcja [33].

1.2. Aktywacja osteoklastów

1.2.1. Ścieżka sygnałowa RANK/RANKL

Osteoklasty nie posiadają receptorów zarówno dla parathormonu jak i witaminy D i w związku z tym ich mobilizacja jest wtórna do interakcji powierzchniowego receptora glikoproteinowego RANK ze związaną z komórkami osteoblastów cytokiną RANKL, co wskazuje bezpośrednio na zależność pomiędzy procesami kościotworzenia i resorpcji kostnej [34]. Należąca do rodziny TNF (ang. tumor necrosis factor) cytokina RANKL (ang. receptor activator of NF-kappaB ligand), stanowiąca produkt białkowy genu *TNFSF11*, odgrywa kluczową rolę w aktywacji osteoklastów i ich prekursorów [35]. Połączenie RANK/RANKL skutkuje syntezą kluczowego czynnika transkrypcji cFos, promującego dalszą kaskadę produktów białkowych genów, stymulujących różnicowanie i aktywację osteoklastów [36].

Równocześnie jednak ścieżka sygnałowa RANKL odpowiada za indukcję interferonu-beta (INF-beta) w komórkach prekursorowych osteoklastów, który działa hamująco na zależną od RANKL syntezę czynnika transkrypcyjnego cFos. Synteza INF-beta związana z RANKL i cFos stanowi odrębny mechanizm regulacji, niezależny od syntezy interferonów związanej z infekcją wirusową [37]. Hamowanie syntezy osteoklastów poprzez działanie autokrynne związane z interferonem-beta wskazuje na znamienne rolę cytokiny RANKL w zachowaniu homeostazy metabolizmu kostnego. Potwierdzają to doświadczenia na myszach

z niedoborem w zakresie powyższej ścieżki sygnałowej, u których dochodziło do rozwoju osteopenii [38].

Ekspresja RANKL ma także miejsce na powierzchni komórek pomocniczych T i jest związana z dojrzewaniem komórek dendrytycznych i procesem apoptozy. Przypisuje się jej również znamioną rolę w kontroli progresji nowotworów złośliwych gruczołu piersiowego [39].

Istotne znaczenie dla obrotu kostnego na etapie RANKL-zależnym ma osteoprotegeryna (OPG) [40,41]. Produkowana przez osteoblasty rozpuszczalna OPG wiąże się z glikoproteiną błonową RANKL, uniemożliwiając wiązanie RANKL/RANK i w konsekwencji hamując dalszą proliferację osteoklastów, a tym samym proces resorpcji kostnej [42]. Także same produkty białkowe procesów kościogubnych mogą poprzez aktywację cyklooksygenazy COX-2 drogą szeregu prostaglandyn wzmacniać odpowiedź zarówno na RANKL jak i OPG [43]. Wiele hormonów kalcytropowych i cytokin, takich jak parathormon, witamina D, IL-11 czy prostaglandyna E2 pobudzają procesy resorpcji kostnej poprzez równoczesne hamowanie produkcji osteoprotegeryny i pobudzanie produkcji RANKL [44].

W chwili obecnej wiadomo jednak, że aktywacja czynników transkrypcyjnych osteoklastów takich jak NFATc1 (ang. nuclear factor of activated T-cells transcription complex 1), NFκB (ang. nuclear factor κB) czy wspomniany cFos/Fra1 (ang. cellular Finkel-Biskis-Jenkins-Marine osteosarcoma) i skierowanie komórek niezróżnicowanych na drogę osteoklastogenezy może zachodzić bez udziału RANKL. W zachowaniu prawidłowego tempa i kierunku obrotu kostnego istotną rolę odgrywają także elementy ścieżki sygnałowej Wnt (ang. canonical wingless and Int1 pathway), związanej z regulacją funkcji osteoblastów [45].

1.3. Ścieżka sygnałowa Wnt

1.3.1. Geny Wng i Int-1

Muszka owocówka (*Drosophila melanogaster*) dzięki swojemu niewielkiemu, składającemu się z ok. 14 tysięcy, w większości euchromatycznym, niejednokrotnie zbliżonych do ludzkich i stosunkowo łatwych do mapowania genów, pozostaje od wielu lat modelowym organizmem eukariotycznym do badań genetycznych. Genem odpowiedzialnym

za biegunowość segmentów ciała i rozwój odnóży owada jest gen *wingless (Wg)*, którego mutacje prowadzą do powstania form bezskrzydłych [46]. Analiza sekwencji aminokwasów produktów białkowych pozwoliła na stwierdzenie, iż gen *Wg* jest homologiem odkrytego ponad trzy dekady temu genu *Int1* (ang. Integration1) [47]. Gen *Int1* jest opisywany jako gen sąsiadujący z miejscami integracji genów mysiego wirusa raka gruczołu sutkowego *MMTV* (ang. mouse mammary tumor virus) [48]. Powiązanie ścieżki sygnałowej genu polaryzacji *Wg* u muszki owocówki z jego mysim homologiem *Int1* w grupie *MMTV* pozwoliło w roku 1987 na stworzenie prototypu modelu ścieżki sygnałowej Wnt. Produkty białkowe szlaku Wnt są postrzegane do dziś jako kluczowa klasa morfogenetycznych ligandów wydzielniczych, odpowiedzialnych za rozwój ciała kręgowców, w tym człowieka [49,50].

1.3.2. Palmitoilacja białek Wnt

Białka wchodzące w skład ścieżki sygnałowej Wnt stanowią grupę glikoprotein, odgrywających rolę ligandów, pośredniczących w przekazywaniu informacji od receptorów błonowych, poprzez cytoplazmę, aż do poziomu jądra komórkowego. Ich mechanizm działania jest związany ze zjawiskiem palmitoilacji białek, czyli posttranslacyjnej addycji palmitynianu do reszt cystynowych białka z wytworzeniem wiązania tioestrowego. Kotwiczenie palmitoilowe decyduje o zdolności protein ścieżki Wnt do określania kierunku ruchu cząsteczek oraz podziału i fuzji organelli wewnątrzkomórkowych. Unikatowe znaczenie tego zjawiska opiera się na łatwej jego odwracalności, która decyduje o dynamicznie zmieniających się możliwościach regulatorowych w zakresie embriogenezy, różnicowania i polaryzacji komórek, a w końcu także onkogenezy [51].

1.3.3. Receptor Frizzled

Wchodzące w skład rodziny Wnt białka *Wnt1*, *Wnt2*, *Wnt2b*, *Wnt3*, *Wnt3a*, *Wnt4*, *Wnt5a*, *Wnt5b*, *Wnt6*, *Wnt7a*, *Wnt7b*, *Wnt8a*, *Wnt8b*, *Wnt9a*, *Wnt9b*, *Wnt10a*, *Wnt10b*, *Wnt11* i *Wnt16* oddziałują poprzez trzy niezależne ścieżki sygnałowe: kanoniczną ścieżkę Wnt, niekanoniczną planarną ścieżkę polaryzacji komórkowej i niekanoniczną ścieżkę *Wnt/Ca²⁺* [52, 53]. Początek szlaku sygnałowego ma miejsce w chwili połączenia jednej z protein grupy Wnt z N-końcową pozakomórkową domeną cystynową białka Frizzled, stanowiącego receptor błonowy. Białka Frizzled należą do rodziny receptorów sprzężonych z

białkiem G (ang. G protein coupled receptors, GPCRs), dla których ligandy stanowią różnej wielkości molekuly takie jak cząstki zapachowe, feromony oraz neurotransmitery [54]. Po przyłączeniu ligandu do receptora Frizzled, następuje jego aktywacja i przesłanie sygnału do jednego z wybranych elementów cytoplazmatycznych tj. fosfoproteiny Dsh lub heterotrimerycznego białka G. O złożoności sygnałów wewnątrzkomórkowych decydują dalsze rozgałęzienia i różne drogi interakcji ścieżek heterodimerycznego białka G i trzech konserwatywnych domen Dsh: DIX, PDZ i DEP [55].

1.3.4. Ścieżka kanoniczna Wnt

Istota działania ścieżki kanonicznej Wnt, biorącej udział w regulacji zarówno procesów proliferacji jak i apoptozy komórek, opiera się na akumulacji na terenie cytoplazmy i translokacji do jądra komórkowego beta-katenin, jako koaktywatorów czynników transkrypcyjnych z rodziny TCF/LEF. W przypadku braku aktywacji szlaku Wnt dochodzi do rozpadu beta-katenin na drodze ich ubikwitynizacji i wtórnej proteolizy [56]. W skład odpowiedzialnego za to zjawisko kompleksu destrukcyjnego beta-katenin wchodzi takie proteiny jak aksyna, białko supresorowe APC (ang. adenomatosis polyposis coli), kinazy CK1 α (ang. casein kinase 1 α) i GSK3 (ang. glycogen synthase kinase 3) oraz fosfataza PP2A (ang. phosphatase kinase 3). Połączenie receptora Frizzled z ligandem Wnt powoduje fosforylację białka Dsh, a następnie poprzez kompleks APC-aksyna-konduktyna inhibicję cząstek kinazy 3 beta syntazy glikogenu i kinazy kazeiny 1 alfa. Efektem końcowym jest zahamowanie fosforylacji beta-kateniny, co uniemożliwia jej rozpoznanie przez beta-TrCP kompleksu ligazy ubikwitynowej E3 [57]. W przypadku ubikwitynizacji i braku akumulacji beta-kateniny, białko TCF/LEF przejmuje funkcję represora transkrypcji. Ścieżka niekanoniczna zależna od jonów wapniowych ma charakter antagonistyczny w stosunku do ścieżki kanonicznej poprzez ligand Wnt5a i jest niezależna od beta-katenin [58].

1.3.5. Białko BMP2

Ze szlakiem Wnt pozostają powiązane reakcje sygnałowe zależne nie tylko od beta-katenin, ale także białka BMP2 (ang. bone morphogenetic protein 2). Białka BMP, należące do rodziny TGF-beta, stanowią zróżnicowaną grupę wielofunkcyjnych czynników wzrostowych. Ich działanie oparte jest o receptory kinazowe serynowo-treoninowe [59].

BMP2 odgrywa istotną rolę nie tylko w mineralizacji i dojrzewaniu kości, różnicowaniu osteoblastów czy dodatniej regulacji aktywności fosfatazy zasadowej, ale wpływa również na rozwój chrząstki. Jest ponadto odpowiedzialne za różnicowanie i transformację komórek nsepitelialnych w mezenchymalne w obrębie serca i aktywację ścieżki sygnałowej SMAD dla limfocytów Th17 [60].

Polimorfizm genu BMP2_A125611G G/G uważa się za jeden z elementów decydujących o ryzyku rozwoju zmian osteoporotycznych, prowadzących do patologicznych złamań kręgow [61]. Opinia ta stoi w opozycji do badań skandynawskich na dużych populacjach kobiet w wieku 25 i 75 lat, wskazujących na wpływ BMP2 na jakość kości w rozumieniu jej mikroarchitektury, ale bez znaczenia dla jej gęstości mineralnej (ang. bone mass density, BMD) i rozwoju złamań patologicznych w podeszłym wieku [62].

1.4. Białko LRP5

1.4.1. Kompleks Wnt-FZD-LRP5-LRP6

Na poziomie oddziaływań pomiędzy białkami sygnałowymi Wnt, a ich receptorami Frizzled, istotną rolę odgrywają również związki takie jak białko związane z receptorem lipoproteiny 5 i 6 (ang. low density lipoprotein receptor-related protein 5 and 6, LRP5; LRP6), receptor kinazy tyrozynowej (ang. receptor tyrosine kinase, Ryk) czy białko ROR2 [63]. Kluczowe czynniki hamujące rozpad beta-katenin poprzez tworzenie kompleksu z ligandem Wnt i receptorem Frizzled i tym samym odpowiadające za stabilizację ścieżki sygnałowej Wnt kanonicznej, stanowią transbłonowe białka LRP5 i LRP6, należące do rodziny receptorów LDL (ang. Low-Density Lipoprotein-Receptor Related Proteins) [64]. Kompleks Wnt-FZD-LRP5-LRP6 stanowi czynnik wyzwalający ścieżkę sygnałową beta-katenin poprzez agregację rybosomalnych kompleksów receptor-ligand. Wtórna rekrutacja polimerazy DVL1 w błonie plazmatycznej powoduje fosforylację i rozpad beta-katenin.

1.4.2. Rola białka LRP5 w metabolizmie kostnym

Przebłonowa lipoproteina LRP5 odgrywa kluczową rolę w proliferacji, różnicowaniu, adhezji i migracji wielu komórek ustroju, w tym osteoblastów oraz rozwoju szkieletu,

poprzez transdukcję sygnału szeregu białkowego Wnt z otoczenia do wnętrza komórki, jako koreceptor dla białek z rodziny Frizzled [65]. Jej wewnątrzkomórkowa domena odpowiada za wiązanie aksyny, białka strukturalnego, sieciującego między innymi ACP, Gsk3 czy wspomnianą wyżej beta-kateninę. Od dawna obserwowano skłonność do niekorzystnej przebudowy mikroarchitektury kostnej u osób z rodzinną witreoretinopatią wysiękową, związaną z ponad 15 różnymi mutacjami w genie *LRP5*. Brak prawidłowego produktu białkowego genu *LRP5* skutkuje w grupie tych pacjentów nie tylko brakiem prawidłowego różnicowania komórek nabłonka barwnikowego siatkówki i jej właściwego unaczynienia, ale również obniżeniem gęstości mineralnej kości [66]. Polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism, SNP) regionu 5' *LRP5* przy zaburzeniach regulacji czynności transkrypcyjnych RUNX2-zależnych, może odpowiadać za niekorzystne zmiany gęstości mineralnej kości w odcinku lędźwiowym kręgosłupa [67, 68,69].

Badania nad wpływem zmienności genetycznych i czynników środowiskowych takich jak wysiłek fizyczny na zmiany gęstości mineralnej kości, wskazują na polimorfizm genu *LRP5*, zlokalizowanego na chromosomie 11q13.4, jako na możliwy czynnik predykcyjny obniżenia wartości BMD. Niektórzy autorzy tłumaczą dodatkowo wpływ białek LRP5 na metabolizm kostny, ich działaniem hamującym ekspresję *Tph1*, czynnika hamującego sekrecję serotoniny w dwunastnicy [70]. Mutacje genu *LRP5* skutkują szeregiem chorób układu kostnego, wśród których należy wymienić recesywną postać osteoporosis-pseudoglioma syndrome (OPPG) czy autosomalną dominującą postać ostosklerozy z charakterystycznym przedwczesnym zgrubieniem śródkostnej kości długich i elongacją żuchwy [71,72]. Nieprawidłowości w zakresie genu *LRP5* są związane także z ostrą płodową i niemowlęcą oraz łagodnie przebiegającą w okresie dojrzewania autosomalną recesywną postacią osteopetrozy. Przypisuje się im również rolę czynnika sprawczego, dziedziczonej w sposób autosomalny dominujący osteopetrozy (OPTA1), związanej z zaburzeniami resorpcji niedojrzałych kości [73].

1.4.3. *LRP5* i inne geny prekursorzy rozwoju osteoporozy

Obok genu *LRP5*, do grona najczęściej wymienianych w literaturze potencjalnych genów kandydatów rozwoju osteoporozy należą *LAMC2* (1q25-q31), *MATN3* (2p24- p23), *ITGAV* (2q31-q32), *ACVR1* (2q23-q24), *TDGF1* (3p21.31), *EGF* (4q25), *IGF1* (12q22-q23), *ZIC2*

(13q32) i *BMP2* (20p12) [74]. Dotychczas najwyższy stopień asocjacji wykazano pomiędzy polimorfizmem genu *MATN3* (vs10178256), a zmianami gęstości mineralnej kości w obrębie krętarza kości udowej. Mutacja w obszarze allelu mniejszego G genu *MATN3* prowadzi do rozszczepienia wiązania pomiędzy czynnikami transkrypcyjnymi MESP1 i MESP2, odgrywającymi istotną rolę nie tylko w ścieżce sygnałowej Notch i formowaniu mezodermy serca, ale również w homeostazie kości [75]. Podobną korelację wykazano pomiędzy BMD całego szkieletu, a polimorfizmem pojedynczego nukleotydu rs6214 *IGF1*, którego allele mniejsze G mogą odpowiadać za dodatkowe miejsca wiązania dla regulatora reakcji stresowej w retikulum endoplazmatycznym XBP1. Jednym z najczęściej opisywanych polimorfizmów związanych z rozwojem osteoporozy, szczególnie w obrębie kości beleczkowej odcinka lędźwiowego kręgosłupa, jest również polimorfizm Fok I genu *VDR* receptora witaminy D, gdzie najniższe wartości BMD obserwowano w grupie homozygot [76]. Szacuje się, że niekorzystna zmienność gęstości mineralnej kości, aż w około 80% może wynikać ze zmian na podłożu genowym.

1.5. Podłoże genetyczne chorób

1.5.1. Choroby genetycznie uwarunkowane

Pod pojęciem chorób genetycznie uwarunkowanych rozumie się określone, niekorzystne zmiany fenotypowe, wynikające z nieprawidłowości w obrębie sekwencji kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA) tworzącego genom lub stanowiące konsekwencję zaburzeń na poziomie dalszej transmisji zawartych w kodzie genetycznym informacji [77,78]. Trzeciorzędowa struktura podwójnej helisy DNA w jądrze metafazowym w połączeniu z białkami histonowymi tworzy charakterystyczny dla danego gatunku zestaw chromosomów czyli kariotyp [79]. Zapis sekwencji DNA u człowieka zorganizowany jest w postaci 22 par chromosomów autosomowych i pojedynczej pary chromosomów płci. Zgodnie z terminologią mendlowską dziedziczenie odbywa się za pomocą chromosomów płci i autosomów w sposób recesywny lub dominujący, co w połączeniu z mechanizmem jedno- lub wielogenowym dziedziczenia decyduje o podziale chorób genetycznie uwarunkowanych [80].

Obok chorób uwarunkowanych wieloczynnikowo, związanych z interakcją wielu różnych genów na poziomie różnych loci, tworzących predyspozycję do wystąpienia choroby, wymagającą dodatkowego, środowiskowego czynnika spustowego, istnieje grupa genetycznych chorób jednogenowych, które cechuje prawie stuprocentowa korelacja pojedynczej mutacji ze zmienionym chorobowo fenotypem [81,82]. Liczbę tych schorzeń szacuje się na ok. 10.000, a ich częstość w populacji sięga 2,5%. Charakterystyka chorób monogenowych zdecydowała ponad 20 lat temu o rozwoju diagnostyki prenatalnej na poziomie tworzenia map sprzężeń genetycznych opartych na ocenie polimorfizmów długości odcinków restrykcyjnych, podczas gdy diagnostyka genetyczna chorób uwarunkowanych wieloczynnikowo wymaga oceny różnych genów jak i ich wzajemnych oddziaływań [83]. Jednakże ze względu na istnienie takich zjawisk jak mutacje dynamiczne, mozaikowość somatyczna czy piętnowanie rodzicielskie, w wielu przypadkach chorób monogenowych nie obowiązują mendlowskie zasady dziedziczenia.

Istotnym elementem utrudniającym diagnostykę chorób genetycznie uwarunkowanych jest współwystępowanie oddziałujących na siebie wzajemnie mutacji w różnych genach, modyfikujących końcowy efekt na poziomie fenotypu pacjenta oraz obecność mechanizmów epigenetycznych [84].

1.5.2. Zmiany sekwencji DNA

O różnorodności fenotypowej organizmów decydują obok czynników środowiskowych i behawioralnych zmiany ilościowe i strukturalne sekwencji DNA, czyli tzw. rearanżacje genomowe, prowadzące do zmian od poziomu nieistotnych klinicznie polimorfizmów po mutacje skutkujące rozwojem stanów chorobowych o ciężkim przebiegu [85,86]. Te ostatnie określane są mianem zaburzeń genomowych, a częstość ich występowania może różnić się w poszczególnych populacjach badanych [87,88]. W przypadku wariantów rzadkich częstość ich występowania w populacji jest mniejsza niż 5%, a w przypadku polimorfizmów nie mniejsza niż 1%. O istotności danego wariantu genetycznego decyduje skład genowy i częstość jego występowania w danej populacji. Nieprawidłowości obejmujące duże fragmenty genomu widoczne w mikroskopie świetlnym, stanowią tzw. aberracje chromosomowe. Stanowią one zwykle efekt zaburzeń w procesie podziału zarówno komórek płciowych jak i somatycznych. Najczęściej spotykane są przypadki

aneuploidii, wynikającej ze zjawiska nondysjunkcji par chromosomów lub chromatyd. Oprócz zmian ilościowych pod postacią aneuploidii lub poliploidii, wyróżniamy zmiany struktury takie jak translokacje, insercje, inwersje, duplikacje czy delecje [89]. Zmiany są często efektem złożonych cech struktury całego genomu i zaburzeń na poziomie mechanizmów pośredniczących. Ze względu na mechanizm powstawania zmian w sekwencji DNA, przekształcenia genomowe podzielono na trzy modele: nie-homologiczne łączenie końców (ang. non-homologous end-joining, NHEJ), nie-alleliczna homologiczna rekombinacja (ang. non-allelic homologous recombination, NAHR) i model blokowania widełek i przełączania matrycy (ang. Fork stalling and template switching, FoSTeS) [90]. Dla sprawnego funkcjonowania genomu znaczenie mają także zmiany związane z matrycowym kwasem rybonukleinowym mRNA (ang. messenger RNA).

1.5.3. Polimorfizm pojedynczego nukleotydu

O zmienności ludzkiego genomu w blisko 80% przypadków decydują polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism, SNP), rozprzestrzenione w całym genomie z częstością co 100-300 nukleotydów, w łącznej ilości ponad 10 milionów [91,92]. Pojęcie SNP odpowiada zmienności sekwencji DNA na poziomie zamiany pojedynczego nukleotydu, pomiędzy dwoma osobnikami tego samego gatunku lub dwoma odpowiadającymi sobie chromosomami tego samego osobnika. Dotyczą one odcinków kodujących i niekodujących genów oraz regionów międzygenowych. SNP stanowią efekt mutacji, selektywnie utrwalonych w danej populacji, z którą pozostają w ścisłym związku w zakresie częstości występowania określonych alleli. Związek ten może być na tyle silny, iż przynależność do określonej populacji determinuje możliwość wystąpienia określonych wariantów SNP. Ponadto częstość występowania SNP jest powiązana ze zjawiskiem losowego dryfu genetycznego jak i stanowi efekt presji ewolucyjnej. Identyfikacja genotypów i haplotypów powiązanych z określonymi chorobami pozwoliła na wyselekcjonowanie wybranych polimorfizmów pojedynczego nukleotydu istotnych dla podatności na zachorowanie. W opozycji do nich stoją poznane SNP, którym przypisuje się w literaturze rolę czynników ochronnych [93].

Badania, odnoszące się do znaczenia SNP w ryzyku wystąpienia stanu chorobowego, opierają się na ocenie różnic w częstości występowania alleli określonego polimorfizmu

między grupą osób klinicznie przejawiających cechy danej choroby, a zdrową w jej zakresie grupą kontrolną [94]. W ocenie podłoża genetycznego chorób bierze się zatem pod uwagę zarówno bezpośredni związek przyczynowo-skutkowy pomiędzy określoną mutacją, a wystąpieniem danej choroby, jak i podatność na zachorowanie, wynikającą z obecności określonych SNP w danej populacji. Znaczenie ma nie tylko analiza pojedynczych polimorfizmów danego genu, ale również wskazanie na ich ewentualne współdziedziczenie, wynikające ze zjawiska sprzężenia genetycznego, co pozwala dopiero na całościową ocenę znaczenia struktury genu. Udowodniono, że kosegregacja czyli wspólne dziedziczenie SNP występujących w sekwencji danego genu, często charakterystyczne dla danej populacji, może decydować o podatności na zachorowanie.

1.5.4. Haplotypy

Grupa sąsiadujących ze sobą polimorfizmów pojedynczego nukleotydu dziedziczonych wspólnie jako zestaw sprzężonych ze sobą alleli określana jest nazwą haplotypu. Skłonność do współdziedziczenia sprzężonych genetycznie loci nosi miano niezrównoważenia sprzężeń (ang. linkage disequilibrium, LD) i dla danej populacji stanowi miarę współwystępowania określonych alleli genu w dwóch wybranych loci z częstością większą niż w przypadku innych losowo wybranych loci w genomie [95,96].

Obliczenia matematyczne oparte na testach D, DO i R² pozwalają na ocenę wartości LD. W przypadku, gdy jest ona wysoka dla danych SNP oznacza to, że dziedziczą się one prawie zawsze wspólnie. Wartość tych testów zależy od częstości alleli par SNP [97,98]. Najczęściej wykorzystywanym testem jest pochodna korelacji R², wyrażająca stosunek zmienności w pojedynczym SNP względem innego SNP lub odnosząca się do stosunku obserwacji przy wspólnym występowaniu dwóch określonych par ich alleli [97,99]. Analiza haplotypów, rozumianych jako zbiory wspólnie dziedziczonych SNP, pozwala na ocenę wpływu wybranych wariantów genowych, uwzględniających tzw. polimorfizmy znacznikowe i ich wzajemną kosegregację, na zmiany fenotypowe i związaną z nimi podatność na zachorowanie. Przy czym należy mieć na uwadze, że struktura haplotypu odpowiada za dalsze przekazywanie cechy chorobowej w kolejnych pokoleniach. Znajomość haplotypów pozwala zatem na ograniczenie analizy do oceny wybranych wariantów SNP znacznikowych (ang. tag SNP) oraz na dokładne określenie wpływu poszczególnych wariantów określonego

genu na zmienność fenotypową. Dodatkowo to właśnie stabilna struktura haplotypu odpowiada za utrwalenie i przekazywanie danej cechy z pokolenia na pokolenie [100]. Wpływ zmian w zakresie polimorfizmu pojedynczego nukleotydu na podatność na zachorowanie w przypadku schorzeń wieloczynnikowych jest trudniejszy do udowodnienia niż w przypadku chorób monogenowych. Dotychczasowa wiedza dotycząca haplotypów jest dostępna w publicznej bazie danych ludzkiego genomu HapMap [101].

1.5.5. Znaczenie analizy SNP w praktyce klinicznej

Obecne trendy w badaniach genetycznych zmierzają w kierunku prób całościowej oceny patomechanizmu wzajemnych oddziaływań poszczególnych genów i ich produktów białkowych, powiązanych z określonym fenotypem chorobowym. Klasyczne metody sekwencjonowania fragmentów genomu w poszukiwaniu markerów molekularnych białek regulatorowych i ścieżek sygnalizacyjnych są wysoce czasochłonne. Wobec wzrastających oczekiwań poprawy w zakresie powszechnej dostępności diagnostyki na poziomie molekularnym, w chwili obecnej na pierwszy plan obok identyfikacji genów i analizy mutacji wysuwa się ocena polimorfizmów pojedynczego nukleotydu z wykorzystaniem macierzy DNA [102]. Testy oceniające występowanie poszczególnych SNP w sekwencjach kodujących genu oraz w jego odcinkach regulatorowych i ich związek z podatnością na zachorowanie zalicza się do grupy testów diagnostyczno-prognostycznych, przy czym w przypadku chorób wieloczynnikowych analiza taka wymaga szczegółowej oceny wielu polimorfizmów z uwzględnieniem ich specyfiki populacyjnej. W celu oznaczenia obecności poszczególnych SNP wykorzystuje się techniki mapowania asocjacyjnego (ang. genome-wide association study, GWAS) z wykorzystaniem tradycyjnych markerów i mikromacierzy [103]. Szczególnie przydatne w celach detekcji pojedynczych mutacji oraz monitorowaniu ekspresji i mapowaniu genów są metody mikromacierzy oligonukleotydowych (10-80pz) [104]. Dalsze zawężanie zakresu badań do wybranych SNP znacznikowych opiera się na ocenie haplotypów. Obecnie wiemy, że zależność zmian fenotypu od wariantów genowych jest zdeterminowana nie tyle przez pojedyncze SNP, ale przez ich zbiory i kosegragację, a więc na drodze oceny haplotypów [105]. Struktura haplotypu odpowiada za przekazywanie zmienionego wariantu genowego z pokolenia na pokolenie, przy czym zależność pomiędzy fenotypem, a haplotypem jest znacznie wyraźniejsza w przypadku chorób monogenowych.

Różnorodność fenotypowa populacji stanowi jednak ostatecznie wypadkową zróżnicowania genetycznego i efektu działania czynników środowiskowych i behawioralnych.

1.6. Czynniki środowiskowe ryzyka rozwoju osteoporozy

1.6.1. Aktywność fizyczna

Wśród najczęściej wymienianych modyfikowalnych czynników ryzyka rozwoju osteoporozy wymienia się brak aktywności fizycznej. Wysiłek fizyczny poprzez mechaniczne obciążenie kości stymuluje rozwój prawidłowej gęstości mineralnej w jej obrębie, ale optymalizacja doboru ćwiczeń celem poprawy właściwości reologicznych układu kostnego pozostaje nierozstrzygnięta. Sugeruje się, że intensywny aerobic i trening wytrzymałościowy korelują w najwyższym stopniu z poprawą w zakresie wartości BMD, podczas gdy nie udowodniono, aby umiarkowany wysiłek fizyczny w postaci regularnego chodzenia miał w jakikolwiek sposób zapobiegać rozwojowi osteoporozy w grupie kobiet w wieku pomenopauzalnym [106]. Badania sugerują, że u osób w wieku podeszłym, które przez wiele lat systematycznie uprawiały sport rekreacyjnie, wzrost gęstości mineralnej kości w stosunku do osób niećwiczących, ma równomierne rozłożenie w całym szkielecie, tymczasem u osób młodych, trenujących intensywnie określone grupy mięśniowe, obserwuje się wybiórczy wzrost BMD w wybranych obszarach ciała [107]. Regularne i odpowiednio nasilone obciążenie mechaniczne, z kluczową dla rozwoju kości siłą ciężenia, stanowi element stymulujący aktywność osteoblastów. Najlepszy efekt w postaci przyrostu kości na grubość i wzrostu ich gęstości mineralnej do wartości przekraczających średnią populacyjną obserwowano w grupie dziewcząt i dorosłych kobiet, u których regularny wysiłek sportowy miał miejsce od okresu poprzedzającego dojrzewanie płciowe i był kontynuowany w kolejnych latach, podczas gdy podobne próby aktywacji fizycznej podejmowane w grupie młodych dorosłych kobiet w okresie od 9 do 12 miesięcy obserwacji nie poprawiały w sposób istotny parametrów kostnych [108]. Powyższy stan rzeczy tłumaczy się zmianami dotyczącymi resorpcji kostnej, nieadekwatnością wysiłku fizycznego w zakresie jego intensywności i częstotliwości w stosunku do potrzeb wiekowych oraz wcześniejszym osiągnięciem szczytowej masy kostnej. Pomimo powyższych stwierdzeń w wielu niezależnych badaniach klinicznych obserwowano pozytywny wpływ aktywności fizycznej na poprawę

gęstości mineralnej kości, nawet w przypadku pacjentów z grup podwyższonego ryzyka rozwoju osteoporozy, jak w przypadku grupy dorosłych kobiet z niedoborem witaminy D [109]. Badania u kobiet w okresie pomenopauzalnym muszą uwzględniać ograniczone zdolności adaptacyjne szkieletu do obciążenia mechanicznego związanego z ćwiczeniami fizycznymi, wynikające ze zmienionego stanu hormonalnego i niedostatecznego spożycia wapnia w diecie.

Należy pamiętać, że nadmierny wysiłek fizyczny, zwłaszcza u kobiet w okresie dojrzewania płciowego, indukujący zaburzenia w obrębie pętli sprzężeń zwrotnych podwzgórze-przysadka-gonady, może prowadzić do stanów ryzyka rozwoju osteoporozy takich jak zaburzenia miesiączkowania. Za najistotniejszy czynnik modyfikujący ścieżkę sygnałową w obrębie podlegających obciążeniu mechanicznemu kości, uważa się estrogeny. Badania genetyczne wskazują, że polimorfizm val158met genu katecholo-O-metylotransferazy (ang. catechol-O-methyl transferase, *COMT*), odpowiadającej za szlak degradacji estrogenów, może aż o 60-70% zmieniać ich aktywność enzymatyczną w kościach. Powyższy polimorfizm genu *COMT* wpływa niekorzystnie na gęstość mineralną kości u osób wykazujących małą aktywność fizyczną [110].

1.6.2. Dieta

Jednym z kluczowych czynników, determinujących rozwój osteoporozy jest niedożywienie i związany z tym niedobór białek, wapnia i witamin D, A, B6, C i K. Istotne dla prawidłowego rozwoju macierzy kostnej są również związki cynku, potasu, fluoru, chromu i magnezu [111]. Badania amerykańskie populacji dziecięcej z zaburzeniami odżywiania bez klinicznie uchwytne niedoboru masy ciała sugerują jednoznacznie negatywny wpływ niedożywienia na wartość BMD w odcinku lędźwiowym kręgosłupa [112]. Podobnych obserwacji dokonano odnośnie pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna czy anoreksją. Podstawowym źródłem wapnia o najlepszych parametrach biodostępności w diecie są produkty mleczne. W kontekście powyższego stwierdzenia znaczenie nabiera szacowana nawet na 2-30% w populacji kaukaskiej grupa pacjentów cierpiących na nietolerancję laktozy. Równie istotne w diecie ze względu na dostarczanie kofaktorów procesów kościotworzenia takich jak witaminy K czy A są zielone warzywa liściaste, nasiona roślin strączkowych, czerwone mięso i drób oraz kasze.

Jednym z głównych składników mineralnych kości, niezbędnym dla ich prawidłowego funkcjonowania na wszystkich etapach życia jest wapń. W celu oszacowania dobowego zapotrzebowania na wapń, pozwalającego na osiągnięcie optymalnej szczytowej masy kostnej, obok oceny przyrostu masy kostnej i tempa obrotu kostnego, bierze się także pod uwagę zmiany w zakresie jego absorpcji i wydalania [113]. W licznych badaniach retrospektywnych udowodniono związek pomiędzy podażą dobową wapnia w diecie, zalecaną dla osób dorosłych w granicach ok. 800-1000mg, a wartością BMD. Jego udział procentowy w rocznym przyroście gęstości mineralnej kości szacuje się na ok. 1,1% [114].

Zgodnie z obecną wiedzą, najistotniejsza wydaje się suplementacja wapnia w diecie w okresie pierwszych dwóch lat życia dziecka ze względu na jego właściwości anty-resorpcyjne i spowalniające obrót kostny. Podaż soli wapnia wpływa korzystnie na remodeling kostny, a związki wapnia zawarte w mleku dodatkowo oprócz poprawy parametrów mineralizacji kostnej promują wzrost kości na długość [115]. Jak donoszą raporty FAO/WHO dotyczące spożycia substancji mineralnych i witamin, istnieje zależność pomiędzy podażą wapnia w diecie, a wartością BMD i BMC (ang. bone mineral concentration), ale nie można jej w sposób uniwersalny odnosić do ryzyka złamania patologicznego, bez kontekstu etnicznego i geograficznego [116]. W krajach o niskim populacyjnym odsetku złamań niskoenergetycznych codzienne spożycie wapnia w diecie nie przewyższa, a często wręcz jest niższe w stosunku do krajów Europy Zachodniej czy Stanów Zjednoczonych. Jednakże to właśnie w krajach lepiej rozwiniętych o znacząco wyższym wskaźniku zapadalności na osteoporozę wykazano związek pomiędzy niską zawartością wapnia w diecie, poniżej 400mg/24h, a zwiększonym ryzykiem złamania patologicznego w grupie kobiet i mężczyzn powyżej 50 roku życia. Związku tego nie udowodniono w sposób jednoznaczny w odniesieniu do dzieci i młodych osób dorosłych, gdzie dodatkowym czynnikiem determinującym, szczególnie u dziewcząt, jest okres skoku przedpokwitaniowego i dojrzewanie płciowe. W każdym wieku odpowiednio wysoka podaż wapnia w diecie może redukować stężenie parathormonu w surowicy krwi i obniżyć tempo remodelingu kostnego, równocześnie poprawiając odpowiedź na leczenie antyresorpcyjne, szczególnie u kobiet w okresie pomenopauzalnym [117].

Zarówno zawarta w organizmach roślinnych i drożdżach witamina D₂ czyli ergokalcysterol jak i występująca w organizmach zwierzęcych witamina D₃ nazywana

cholekalcyferolem, stanowią pochodne cholesterolowe i są pierwotnie pozbawione aktywności biologicznej. Szacuje się, że ok. 80-100% zapotrzebowania dobowego na cholekalcyferol jest pokrywane przez syntezę w keratynocytach warstwy rozrodczej naskórka pod wpływem promieniowania słonecznego UV o długości fali 290-315nm, a jedynie szczątkowe zasoby witaminy D3 mają pochodzenie egzogenne. Szczególnie bogate w pochodne witaminy D są oleje rybne. Do aktywacji cholekalcyferolu konieczna jest podwójna hydroksylacja atomu węgla w pozycji 25 i 1, mająca miejsce odpowiednio w wątrobie i w nerkach, w czym bierze czynny udział kompleks cytochromu P450 (CYP27A1, CYP3A4, CYP2R1). 1,25(OH)₂D₃ czyli kalcytriol bierze udział w regulacji homeostazy wapnia i fosforanów. Głównymi narządami efektorowymi działania witaminy D są jelita i kości, ale w ostatnich latach stwierdzono obecność receptorów VDR w większości tkanek organizmu, z których część posiada mechanizmy enzymatyczne zdolne do przekształcania formy krążącej, czyli kalcidiolu, w podwójnie hydroksylovaną formę aktywną [118]. W obecności kalcytriolu dochodzi do zwiększenia efektywności wchłaniania jelitowego i resorpcji nerkowej wapnia. Poprawie ulega również wchłanianie jelitowe fosforanów. Bez udziału witaminy D zaledwie 15% wapnia i 60% fosforanów ulega absorpcji z produktów dostarczanych w diecie, podczas gdy z udziałem kalcytriolu wartości te wzrastają dla wapnia do 30-40% i dla fosforanów do 80% [119]. W populacji europejskiej ze względu na niską zawartość witaminy D w produktach żywnościowych i długie okresy słabego nasłonecznienia istnieje stała tendencja zarówno u osób dorosłych jak i u dzieci do utrzymywania się niedostatecznie niskiego stężenia witaminy D w ustroju [120]. W badaniach amerykańskich szacuje się, że blisko 50% dziewcząt rasy kaukaskiej w okresie przedpokwitaniowym ma stężenie witaminy D we krwi obwodowej poniżej 20ng/ml [121].

W przypadku alkoholu czynnikiem decydującym o jego wpływie na układ szkieletowy jest dawka. Spożywany w niewielkich ilościach pobudza osteoblasty, ale długotrwała podaż dużych ilości alkoholu powoduje istotne zaburzenia metabolizmu kostnego z przewagą procesów resorpcji kostnej. Efekt ten ulega wzmocnieniu poprzez wtórne efekty toksycznego działania alkoholu takie jak niewydolność wątroby, spadek stężenia hormonów płciowych czy niedożywienie [122]. Również nadmierne spożycie kawy, prawdopodobnie w mechanizmie nasilenia kalciurii i wtórnego do spadku stężenia wapnia w surowicy krwi wzrostu syntezy parathormonu, może skutkować natężeniem procesów niszczenia kości. Tymczasem zawarte

w herbacie, szczególnie zielonej, flawony, jako pochodne fitoestrogenów mają oddziaływać pozytywnie na receptory estrogenowe na powierzchni osteoblastów.

1.7. Czynniki hormonalne ryzyka rozwoju osteoporozy

1.7.1. Androgeny i estrogeny

Pozostając w ścisłej zależności z uwarunkowaniami genetycznymi i środowiskowymi, głównym czynnikiem regulatorowym metabolizmu kostnego pozostaje układ hormonalny. Kluczowe mechanizmy utrzymujące homeostazę kostną są w dużej mierze zależne od hormonów płciowych tj. androgenów i estrogenów. Te drugie u obu płci stanowią element decydujący o zamykaniu się nasad kości długich i tym samym zakończeniu wzrostu organizmu. W odróżnieniu od protekcyjnej roli estrogenów z ich TGF-beta zależnym efektem promującym apoptozę komórek kościogubnych, w świetle najnowszych badań, androgeny odpowiadają za hamowanie apoptozy osteocytów i spadek liczby osteoblastów [123]. Jest to związane z ich wpływem na indukcję ekspresji takich modulatorów procesu kościotworzenia jak TGF-beta (ang. transforming growth factor-beta) i IGFs (ang. insuline-like growth factors). Równocześnie androgeny mają wpływ hamujący na ekspresję IL-6 i podjednostek białkowych gp80 i gp130 jej receptora błonowego, odgrywających istotną rolę w procesie osteoklastogenezy, a ich niedobór może prowadzić do rozwoju osteoporozy wtórnej [124]. Receptory androgenowe są obecne w większości komórek kostnych. Testosteron oddziałuje na kości, zarówno za pośrednictwem receptora androgenowego jak i w wyniku aromatyzacji, za pośrednictwem receptora estrogenowego, przy czym krytyczne znaczenie dla wzrostu kości na długość mają receptory ER α . Rozbudowa okostnej i rozwój kości są promowane poprzez aktywację receptora androgenowego, podczas gdy aktywacja ER α ma dla powyższych procesów znaczenie hamujące. Udowodniono, że spadek stężenia testosteronu w surowicy krwi, obserwowany u starszych mężczyzn, koreluje ze wzrostem liczby przypadków osteoporozy i złamańiskoenergetycznych [125].

Mechanizm działania estrogenów na tkankę kostną najlepiej prześledzono w grupie kobiet w wieku pomenopauzalnym, u których dochodzi do ustania funkcji jajników. Na podstawie analiz przeprowadzonych w tej grupie pacjentek, stwierdzono hamujący wpływ estrogenów na tempo obrotu kostnego poprzez ich receptory ER obecne zarówno w

osteoblastach jak i osteoklastach [126]. W badaniach na dużych populacjach kobiet udowodniono, że menopauza indukuje nierównomierny wzrost markerów obrotu kostnego, wynoszący ok. 45% dla markerów kościotworzenia netto i aż 90% dla markerów resorpcji kostnej [127]. Ponadto niedobór estrogenów zwiększa wrażliwość kości na działanie parathormonu. Powstały w ten sposób w okresie menopauzy wtórny hiperparatyroidyzm prowadzi do uruchomienia mechanizmów kompensacyjnych, mających za zadanie chronić homeostazę płynów zewnątrzkomórkowych przed narastającą na skutek resorpcji kostnej hiperkalcemią. Prowadzi to do zwiększenia wydalania wapnia z moczem i zmniejszenia jego wchłaniania jelitowego, przy równocześnie utrzymującym się początkowo prawidłowym lub wręcz nieznacznie obniżonym stężeniu PTH [128]. W miarę trwania powyższego stanu stężenie PTH zaczyna stopniowo wzrastać, co jest szczególnie wyraźne w grupie pacjentek z niedoborem postaci aktywnej witaminy D.

1.7.2. Parathormon

W warunkach fizjologicznych parathormon uwalnia wapń z rezerwuaru kostnego i działa antagonistycznie w stosunku do kalcytoniny. Jego wpływ na osteoklasty i procesy resorpcji kostnej ma charakter pośredni, poprzez wiązanie z osteoblastami i wzrost ekspresji RANKL oraz hamowanie ekspresji osteoprotegeryny. Związanie osteoprotegeryny z RANKL uniemożliwia jego interakcję z RANK. Wiązanie RANKL z RANK jest ułatwione przez zmniejszenie ilości osteoprotegeryny, dostępnej dla wiązania nadmiaru RANKL, co w efekcie nasila resorpcję kości. W chwili obecnej analog parathormonu, podawany w sposób okresowy, jest wykorzystywany jako preparat proanaboliczny, mający za zadanie zapobiegać rozwojowi osteoporozy, jak również substancja ingerująca w zakres gospodarki tkankowej oraz w celu przyspieszenia gojenia się złamań. Stosowany homolog ludzkiego PTH, PTHrP typu 1-ego, wchodzi w interakcję z osteoblastami, zwiększając przyrost masy kostnej, ale w odróżnieniu od naturalnego prototypu, działa bez dodatkowego uruchomienia i stymulacji procesów resorpcji kostnej i nasilania hiperkalcemii [129]. Zwraca się także uwagę na znaczenie niedoboru witaminy D w obniżeniu wrażliwości obwodowych narządów efektorowych, w tym kości, na działanie parathormonu, mogące prowadzić do rozwoju osteoporozy. Mechanizm tych zaburzeń nie jest do końca poznany, ale część autorów wiąże go z dodatkowym czynnikiem spustowym w postaci hipomagnezemii, co ma znajdować

potwierdzenie w relatywnie niskim stężeniu magnezu w surowicy krwi osób o obniżonej wartości BMD [130].

1.8. Osteoporoza wtórna

Osteoporozę dzielimy na postać pierwotną, w obrębie której wyróżniamy osteoporozę idiopatyczną inwolucyjną postmenopauzalną i starczą, oraz osteoporozę wtórna. Pod pojęciem osteoporozy wtórnej rozumiemy niekorzystne obniżenie gęstości mineralnej i zaburzenia mikroarchitektury kości, a co za tym idzie zmiany jej właściwości reologicznych, prowadzące do upośledzenia wytrzymałości kości na działanie sił mechanicznych i zwiększonego ryzyka złamania, powstające w przebiegu chorób przewlekłych, mających wpływ na mineralizację kośćca lub jako efekt uboczny farmakoterapii i długotrwałego unieruchomienia. Osteoporoza wtórna stanowi wypadkową zwiększonej utraty masy kostnej i niedostatecznej jej wartości szczytowej, prowadząc do rozwoju takich objawów jak ból, obniżenie siły mięśniowej, a w konsekwencji złamania i deformacje kostne. W grupie najczęściej wymienianych schorzeń, mogących prowadzić do rozwoju osteoporozy wymienia się zaburzenia wchłaniania, choroby nerek, tkanki łącznej, nowotworowe, układu oddechowego i szpiku kostnego oraz zaburzenia hormonalne. W grupie pacjentów małych lat ok. 80% przypadków osteoporozy ma charakter zmian wtórnych [131].

1.8.1. Choroby przewlekłe, a osteoporoza

Wśród zaburzeń endokrynologicznych na szczególną uwagę, ze względu na wzrastającą liczbę chorych, zasługuje cukrzyca. Badania epidemiologiczne ostatnich lat wskazują na podwyższone ryzyko złamania patologicznego w obrębie szyjki kości udowej, kości ramiennej i kości śródstopia u osób w podeszłym wieku, cierpiących na cukrzycę typu 2. Wynik analiz jest o tyle zaskakujący, że dotychczas umiarkowany spadek gęstości mineralnej kości obserwowano u młodych pacjentów z cukrzycą typu 1, podczas gdy w grupie diabetyków z cukrzycą typu 2 wartości BMD były prawidłowe lub wręcz wysokie [132]. Wpływ utrzymującej się hiperglikemii na kość ma charakter złożony, związany często z otyłością, hiperinsulinemią, przewlekłym stanem zapalnym, mikroangiopatią, odkładaniem

się we włóknach kolagenowych depozytów końcowych produktów glikozylacji oraz spadkiem IGF-1, a także hiperkalciurią i cukrzycową chorobą nerek. Optymalna kontrola glikemii i agresywne leczenie oraz profilaktyka powikłań naczyniowych mogą mieć kluczowe znaczenie w zapobieganiu rozwojowi osteoporozy u osób z cukrzycą typu 1. W cukrzycy typu 2 dodatkowe znaczenie dla ograniczenia ryzyka złamań ma kwestia poprawy jakości wzroku i sprawności fizycznej pacjentów [133].

Lepiej poznane pozostają mechanizmy zrzesotnienia kości w przebiegu chorób gruczołu tarczowego. Nadmierny wyrzut hormonów tarczycowych prowadzi do niekontrolowanego wzrostu tempa obrotu kostnego, szczególnie w obrębie kości beleczkowej, ze zdecydowaną przewagą fazy resorpcji nad procesami kościotworzenia [134]. Jest to efekt zwiększenia pod wpływem tyroksyny liczby jednostek przebudowy kostnej BMU z równoczesnym skróceniem cyklu przebudowy, co skutecznie zmniejsza możliwości efektywnego działania komórek kościotwórczych, powoduje ścięczenie beleczek kostnych i wzrost ryzyka złamania patologicznego. Zmiany te są bardziej nasilone w grupie pacjentów starszych w stosunku do osób młodych [135]. W nadczynności tarczycy dochodzi do przewlekłej reabsorpcji kostnej z nieznaczną hiperkalcemią i hiperfosfatemią, czemu towarzyszy wzrost kalciurii, zmniejszenie jelitowego wchłaniania wapnia i spadek hydroksylacji nerkowej witaminy D do jej formy aktywnej [136]. Skuteczne leczenie nadczynności tarczycy w ciągu 4-6 tygodni przynosi normalizację parametrów laboratoryjnych gospodarki wapniowo-fosforanowej, a w dalszej konsekwencji wzrost gęstości mineralnej kości [137]. Jednakże długoterminowe obserwacje wskazują na trwałe pogorszenie właściwości biomechanicznych i utrzymujące się podwyższone ryzyko złamania patologicznego, szczególnie w obrębie przynasady bliższej kości udowej. W przypadku niedoczynności tarczycy obserwujemy znaczne spowolnienie procesów przebudowy kostnej z 50% spadkiem tempa mineralizacji, co jest wynikiem zahamowania powstawania i dojrzewania komórek kostnych. Wydalanie wapnia z moczem, stężenie osteokalcyny i fosfatazy alkalicznej w surowicy krwi maleje. Wpływ tych procesów na wartość BMD pozostaje niejednoznaczny. Wydaje się, że niekorzystny wpływ niedoczynności tarczycy dotyczy u osób dorosłych głównie obszarów odpowiadających kości korowej, a w populacji dziecięcej kości powstałej na podłożu chrzęstnym, z towarzyszącym zahamowaniem wzrostu kości na długość i opóźnionym dojrzewaniem szkieletu [138].

Szczególny przypadek pacjentów z osteoporozą wtórną stanowią osoby cierpiące na jadłowstręt psychiczny. Oprócz oczywistych niedoborów żywieniowych, w tym niedostatecznej podaży wapnia w diecie i zbyt drastycznego wysiłku fizycznego podejmowanego przez dziewczęta chorujące na anoreksję, należy zwrócić uwagę na obecne u znacznej części z nich zaburzenia miesiączkowania lub wtórny brak miesiączki. Udowodniono istnienie zależności pomiędzy czasem trwania braku miesiączki, a wartością gęstości mineralnej kości, przy czym najcięższe zaburzenia o charakterze niejednokrotnie nieodwracalnym obserwowano w przypadku kobiet, u których brak miesiączki wystąpił przed ukończeniem pełnoletniości [139].

Najcięższy przebieg osteoporozy przypisuje się pacjentom z hipogonadyzmem, nadczynnością przytarczyc i zespołem Cushinga o najczęściej jatrogennym podłożu.

1.8.2. Osteoporoza jatrogena – wpływ glikokortykosteroidów na kość

Wśród leków o działaniu indukującym zmiany osteoporotyczne wymienia się między innymi tak powszechnie stosowane preparaty jak antykoagulanty w postaci heparyny i pochodnych acenokumarolu, hormony tarczycowe, metotreksat czy doustne środki antykoncepcyjne. Jednakże czołową pozycję wśród leków odpowiedzialnych za rozwój niekorzystnych zmian kostnych od lat zajmują niezmiennie glikokortykosteroidy.

W warunkach fizjologicznych glikokortykosteroidy są produkowane w warstwie pasmowatej i siatkowatej kory nadnerczy pod wpływem kortykotropiny (ACTH) i odpowiadają za regulację szeregu przemian metabolicznych białek, węglowodanów i tłuszczów oraz homeostazę wodno-elektrolitową ustroju. Glikokortykosteroidy egzogenne stanowią podstawową grupę leków o działaniu immunosupresyjnym, przeciwzapalnym i przeciwalergicznym. Szacuje się, że w populacji europejskiej ok. 0,5-1% ludności przyjmuje przewlekle glikokortykosteroidy, z czego mniej niż 15% otrzymuje właściwą profilaktykę kostną. W Wielkiej Brytanii liczba pacjentów leczonych przewlekle steroidami sięga 250 tysięcy rocznie, w Polsce dane te nie są dokładnie sprecyzowane. Szacuje się, że liczba ta wynosi dla populacji polskiej około 200 tysięcy osób rocznie, z czego od 30 do 50% z nich dotyka problem złamańiskoenergetycznych [140,141]. O niekorzystnym wpływie glikokortykosteroidów na gęstość mineralną kości możemy mówić w przypadku leczenia

prednizonem w dawce większej/równej 7,5 mg na dobę przez okres co najmniej 3 miesięcy [11]. Oddziaływanie glikokortykosteroidów na tempo i kierunek obrotu kostnego jest złożone. Zmiany zachodzące w kościach mają najbardziej dynamiczny przebieg w okresie pierwszych 12 miesięcy leczenia. Bezpośredni wpływ steroidów na ekspresję genów zachodzi poprzez ich cytoplazmatyczne i jądrowe receptory typu drugiego obecne w osteoblastach i ich komórkach prekursorowych oraz poprzez ich wpływ na poziomie receptorowym i kanałów jonowych na błonę komórek docelowych. Mechanizm oddziaływania steroidów na osteoklasty nie jest do końca jasny. Sterydozależna aktywacja osteoklastów jest wtórna do hamowania syntezy osteoprotegeryny i pochodzącego z linii makrofagowej inhibitora osteoklastogenezy [142]. Ponadto GKS są promotorami syntezy receptora RANK oraz związanego z osteoblastami, odpowiadającego mu ligandu tj. cytokiny RANKL, a także hamują proliferację i różnicowanie osteoblastów, prowadząc w konsekwencji do ich apoptozy [143]. Równocześnie badania brytyjskie prowadzone na osteoklastach uzyskanych z kości długich noworodków szczurów wskazują na zależne od stosowanej dawki leków skrócenie przeżycia osteoklastów i spadek ich liczby o ok. 25% pod wpływem hydrokortyzonu i deksametazonu, co miało przełożenie na tempo resorpcji kostnej [144]. Analiza ta wskazywała również na antagonistyczne w stosunku do osteoklastów, a równocześnie nie wpływające na czas ich przeżycia, działanie progesteronu. Wśród najważniejszych mechanizmów oddziaływania steroidów na metabolizm kostny należy również wymienić blokowanie syntezy osteokalcyny w mechanizmie transrepresji. Niekorzystny wpływ glikokortykosteroidów na gęstość mineralną kości stanowi także rezultat ich aktywności endokrynej wyrażającej się w hamowaniu sekrecji gonadotropin, zarówno androgenów jak i estrogenów. Ponadto przewlekła steroidoterapia prowadzi do inhibicji syntezy IGF-1 i testosteronu, zmian w mechanizmie sekrecji parathormonu w przytarczycach z pulsacyjnego w kierunku tonicznego, co powoduje hamowanie efektów jego działania na poziomie narządów efektorowych. Jak wynika z powyższego wpływ glikokortykosteroidów na kość jest wieloczynnikowy, a jego efekt pośredni stanowi wypadkową spadku wchłaniania jonów wapnia z przewodu pokarmowego na skutek blokowania receptorów witaminy D w nabłonku jelitowym, hamowania nerkowej hydroksylacji witaminy D do postaci aktywnej $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, zmniejszenia nerkowej reabsorpcji zwrotnej wapnia z następczą hiperkalciurią oraz utrzymującego się podwyższonego stężenia parathormonu w surowicy krwi [145].

1.9. Zespół nerczycowy

Znaczący odsetek pacjentów leczonych kortykosteroidami w grupie wiekowej poniżej 18 roku życia stanowią dzieci z idiopatycznym zespołem nerczycowym, który to zespół objawów, wynika ze zwiększenia przepuszczalności błony filtracyjnej kłębuszków nerkowych w przebiegu pierwotnych i wtórnych kłębuszkowych zapaleń nerek [146]. Wśród objawów klinicznych i odchyleń laboratoryjnych dominują: białkomocz większy/równy 50mg/kgmc./24h, hipoproteinemia i hipogammaglobulinemia z hypoalbuminemią, obrzęki, hiperlipidemia i zaburzenia krzepnięcia krwi, mogące prowadzić do wtórnych powikłań zakrzepowo-zatorowych oraz zwiększona skłonność do infekcji, a także zaburzenia metaboliczne takie jak hipokalcemia czy hipotyroidyzm [147]. Idiopatyczny zespół nerczycowy stanowi najczęstszą przyczynę białkomoczu u dzieci, przy czym to właśnie białkomocz jest obecnie uważany za najbardziej niekorzystny czynnik uszkodzający strukturę nerek, indukujący proces zapalny w obrębie miąższu nerkowego, prowadzący do postępu przewlekłej choroby nerek [148]. Najczęstszą odmianą histologiczną idiopatycznego zespołu nerczycowego (IZN) u dzieci są zmiany o charakterze zmian minimalnych i ogniskowe segmentalne stwardnienie kłębuszków nerkowych [149]. Znacznie rzadziej w biopsatach nerkowych u dzieci z IZN diagnozuje się zmiany o typie proliferacji mezangialnej (ang. mesangial hypercellularity, MH) [150].

Wobec wieloczynnikowej etiologii schorzenia z dominującą komponentą immunologiczną i defektem genów kodujących białka cytoszkieletu podocyta, zgodnie z wytycznymi Międzynarodowej Federacji ds. Leczenia Chorób Nerek u Dzieci (International Study for Kidney Diseases In Children, ISKDC) kluczowym leczeniem pierwszego rzutu w fazie ostrej choroby pozostają glikokortykosteroidy w postaci podawanego doustnie prednizonu w dawce 2mg/kg/24h przez okres 6 tygodni, działającego jednocześnie przeciwzapalnie i stabilizująco na błonę podstawną kłębuszka nerkowego [151]. Stopniowa redukcja dawki prednizonu, aż do całkowitego odstawienia leku jest powolna i obejmuje okres od 4 do 6 miesięcy. Aktualne doniesienia jednoznacznie wskazują, że ponad 90% pacjentów pediatrycznych z idiopatycznym zespołem nerczycowym odpowiada na steroidoterapię (steroidowrażliwy ZN), czego wyrazem jest uzyskanie remisji w okresie 8 tygodni leczenia. Efekt terapeutyczny jest wynikiem działania przeciwzapalnego steroidów, obecnego zarówno

we wczesnej fazie reakcji zapalnej (rozszerzenie naczyń włosowatych, migracja fagocytów, obrzęk) jak i towarzyszącego zmianom późniejszym (rozrost, proliferacja fibroblastów, tworzenie włókien kolagenowych i bliznowacenie). Glikokortykosteroidy pomimo swojej skuteczności nie pozostają obojętne wobec ustroju narażonego na ich długotrwałą podaż w dawce terapeutycznej. Do najczęściej wymienianych działań niepożądanych GKS należą osteoporoza i zahamowanie wzrostu u dzieci.

1.10. Densytometria

Zgodnie z opinią ekspertów Światowej Organizacji Zdrowia, pomimo wątpliwości jakie budzi obecność złamań niskoenergetycznych w grupie pacjentów z wysokimi wartościami gęstości mineralnej kości, wciąż podstawową metodą diagnostyczną, służącą ocenie nasilenia zmian osteoporotycznych i wynikającego z nich ryzyka złamania kości, pozostaje pomiar BMD (ang. bone mass density) metodą absorpcjometrii promieniowania rentgenowskiego o podwójnej wiązce energetycznej (ang. dual X-ray absorptiometry – DXA) czyli densytometria kości [152]. Metoda ta opiera się na opisanym przez Lambert'a-Beer'a zjawisku pochłaniania wiązki promieniowania jonizującego przechodzącego przez ośrodek, w tym przypadku kość, natężenie którego w sposób odwrotnie proporcjonalny do zawartości minerałów w kości, jest odbierane przez detektor, a następnie przetwarzane na poziomie danych liczbowych, odpowiadających wartościom bezwzględny, określającym gęstość mineralną kości w g/cm² na podstawie zawartości składników mineralnych w kości (ang. bone mineral content, BMC) wyrażonej w gramach na danej powierzchni. Metodą referencyjną dla oceny BMD w odcinku lędźwiowym kręgosłupa, bliższym odcinku kości udowej, części dystalnej przedramienia czy oceny całego szkieletu pozostaje technika z wykorzystaniem podwójnej energii promieniowania rentgenowskiego, podczas gdy technika pojedynczej wiązki może jedynie służyć ocenie gęstości minerału kostnego w lokalizacjach obwodowych, bez możliwości rozróżnienia struktury bełczkowej od korowej. Ze względu na niską dawkę ekspozycyjną promieniowania rentgenowskiego, badanie densytometryczne uważa się za bezpieczne, a dzięki zastosowaniu metody Fan Beam czyli wachlarza detektorów, czas ekspozycji uległ znacznemu skróceniu przy powtarzalności pomiaru rzędu 1%. W przypadku pacjentów z osteoporozą posterydową zaleca się ocenę odcinka lędźwiowego kręgosłupa ze względu na obecność kości bełczkowej, która w tej grupie

chorych ulega w pierwszej kolejności niekorzystnej przebudowie. Obecnie na rynku są dostępne aparaty trzech firm GE Lunar, Hologic i Norland, oferujące stosunkowo szeroki asortyment. Należy jednak mieć na uwadze niedoskonałości metody, wynikające z braku uwzględnienia trójwymiarowości badanych obiektów.

Oceny masy kostnej u osób dorosłych dokonuje się poprzez odniesienie wartości BMD pacjenta do wartości szczytowej masy kostnej dla danej płci, wyrażonej jako liczba odchyień standardowych (T-score) [153]. W populacji kobiet w wieku pomenopauzalnym wartość T-score pomiędzy -1,0, a -2,5 odpowiada osteopenii, poniżej -2,5 osteoporozie [154]. Kryteria te nie powinny być stosowane u mężczyzn poniżej 64 roku życia, z wyjątkiem osób, u których istnieją czynniki ryzyka rozwoju wtórnej osteoporozy takie jak hipogonadyzm, nadczynność przytarczyc czy steroidoterapia. W grupie osób poniżej 20-ego roku życia nie należy stosować wskaźnika T-score, a rozpoznanie osteoporozy nie może opierać się wyłącznie na parametrach densytometrycznych. U dzieci wykorzystuje się ocenę masy kostnej pacjenta w odniesieniu do masy kostnej równowiekowej grupy kontrolnej odpowiadającej danej płci czyli wskaźnik Z-score. Wartość Z-score poniżej -2,0 odpowiada w grupie pacjentów pediatrycznych wartościom poniżej referencyjnych to znaczy tzw. niskiej masie kostnej w odniesieniu do wieku. Przy czym w ocenie densytometrycznej dzieci i młodzieży należy brać pod uwagę wyłącznie badanie całego szkieletu i odcinka lędźwiowego kręgosłupa [155,156].

Ocena ryzyka złamaniaiskoenergetycznego u pacjentów w wieku rozwojowym jest utrudniona ze względu na toczące się procesy wzrostu i reorganizacji kości. Stąd podejmowane próby wykorzystania badania densytometrycznego do oceny zależności pomiędzy tkanką mięśniową i kostną w odniesieniu do wysokości ciała [157]. Opracowywane dla danego wieku standardowe dane normatywne, przedstawiane w postaci średniej i odchylenia standardowego w poszczególnych grupach, nie spełniają w przypadku populacji dziecięcej kryteriów wiarygodności. Wiadomo bowiem, że interpretacja wyników badania densytometrycznego w okresie wzrostu i rozwoju powinna uwzględniać nie tylko wiek, ale także rozmiary ciała pacjenta. Dane skategoryzowane są łatwe do zastosowania, ale powodują błędy interpretacyjne, stąd wielu autorów celem dokładnego obliczenia wartości Z-score, także dla pacjentów z pogranicza przedziałów referencyjnych, opracowuje dla danej populacji odpowiadające jej w zakresie wieku, płci, masy i wzrostu, normy ciągłe gęstości

kości [158]. Podobne próby są czynione celem oceny składu tkanek miękkich i ich korelacji z kośćmi czyli oceny tzw. mechanostatu.

Odpowiednio interpretowane wyniki badania densytometrycznego pozwalają śledzić stan układu kostnego pacjenta w kolejnych miesiącach i latach. Okres rozdzielający następujące po sobie pomiary densytometryczne powinien wynosić minimum jeden rok od czasu wdrożenia stosownego leczenia lub jego modyfikacji. W przypadku osób, u których wcześniej obserwowano pozytywny wpływ określonej farmakoterapii czas ten powinien ulec nawet wydłużeniu. Wyjątkiem od powyższej reguły jest grupa pacjentów z obserwowanym szybkim spadkiem wartości gęstości mineralnej kości, co może mieć miejsce w przypadku intensywnej steroidoterapii. Wówczas odstępy pomiędzy kolejnymi kontrolami densytometrycznymi powinny wynosić w przybliżeniu ok. 6 miesięcy. Nie zaleca się częstszej oceny BMD metodą DEXA [159,162]. Obecnie szacuje się, że u około 50% pacjentów leczonych steroidami dochodzi do spadku gęstości mineralnej kości w zakresie do 15% rocznie, a u co trzeciego pacjenta do patologicznego złamania kręgu. Jednak według danych z piśmiennictwa i obserwacji własnych wynika, iż mimo stosowania jednolitego standardu leczenia prednizonem, nie u wszystkich pacjentów w wieku przedpokwitaniowym dochodzi do rozwoju niepożądanych zmian kostnych. Pomimo powszechnie stosowanej profilaktyki jak suplementacja jonów wapnia i aktywnej formy witaminy D, u niektórych pacjentów dochodzi do dalszego postępu choroby, szczególnie w odcinku lędźwiowym L2-L4 kręgosłupa, podczas gdy u około dwóch trzecich dzieci leczonych kortykosteroidami nie stwierdza się obniżenia wartości BMD w badaniu densytometrycznym i zwiększonego ryzyka złamania patologicznego. Nasuwa się zatem uzasadnione pytanie o istnienie niezależnego od czynników środowiskowych i nie podlegającego modyfikacji podłoża molekularnego zmian kostnych.

2. Cele

Celami niniejszej pracy były:

- 2.1. analiza wybranych polimorfizmów pojedynczego nukleotydu genu *LRP5* i tworzonych przez nie bloków haplotypowych jako domniemanych predyktorów rozwoju niekorzystnych zmian gęstości mineralnej kości w grupie dzieci w wieku przedpokwitaniowym z zespołem nerczycowym leczonych glikokortykosteroidami z obniżoną i prawidłową gęstością mineralną kości oraz u zdrowych osób z grupy kontrolnej
- 2.2. analiza wybranych polimorfizmów pojedynczego nukleotydu genu *LRP5* i tworzonych przez nie bloków haplotypowych jako domniemanych czynników protekcyjnych, chroniących przed rozwojem niekorzystnych zmian gęstości mineralnej kości w grupie dzieci w wieku przedpokwitaniowym z zespołem nerczycowym leczonych glikokortykosteroidami z obniżoną i prawidłową gęstością mineralną kości oraz u zdrowych osób z grupy kontrolnej
- 2.3. określenie przydatności badań genetycznych w aspekcie genu *LRP5* u dzieci z zespołem nerczycowym w trakcie leczenia glikokortykosteroidami

3. Pacjenci i Metody

3.1. Pacjenci

Badania przeprowadzono na grupie 141 pacjentów, w wieku od 5 do 12 lat, hospitalizowanych w latach 2007-2013 w Klinice Kardiologii i Nefrologii Dziecięcej oraz Klinice Otolaryngologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, wśród których 14 osób stanowili pacjenci z idiopatycznym zespołem nerczycowym i obniżoną gęstością mineralną kości, 26 pacjenci z idiopatycznym zespołem nerczycowym i prawidłowym wynikiem badania densytometrycznego kości oraz 101 dzieci, u których nie stwierdzono chorób nerek i układu kostno-stawowego, tworzących grupę kontrolną. Pobranie krwi obwodowej od małoletnich pacjentów celem izolacji DNA towarzyszyło rutynowej kontroli laboratoryjnej, wynikającej ze schorzenia podstawowego lub planowanego zabiegu operacyjnego i było każdorazowo poprzedzone udzieleniem szczegółowej informacji opiekunom prawnym dzieci, dotyczącej celowości i potencjalnych korzyści, płynących z prowadzonych badań. Oprócz rozmowy z osobą prowadzącą badanie, informacja dla opiekunów prawnych przekazywana była w formie pisemnej, zamieszczonej na oświadczeniu świadomej zgody na udział w badaniach genetycznych. Zgoda na udział w badaniach DNA z wykorzystaniem krwi obwodowej pacjentów była każdorazowo indywidualnie potwierdzona podpisem opiekuna prawnego dziecka (załącznik 1). Na prowadzone badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (Uchwała nr 592/12, załącznik 2).

3.1.1. Grupa badana

Grupę badaną stanowiło 40 dzieci, 22 chłopców (55%) i 18 dziewcząt (45%), w wieku przedpokwitaniowym od 5 do 12 lat (średnia wieku $8,38 \pm 2,52$ lat), z idiopatycznym zespołem nerczycowym, hospitalizowanych w Klinice Kardiologii i Nefrologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu pod kierownictwem profesor A. Siwińskiej w latach 2007-2013.

Pod pojęciem zespołu nerczycowego zdefiniowano zespół objawów chorobowych wywołany nadmierną, nieskompensowaną utratą białka z moczem w ilości większej/równej 50mg/kgmc./24h. U 33 z 40 pacjentów zgodnie z wytycznymi Międzynarodowego

Towarzystwa Chorób Nerek u Dzieci wykonano biopsję nerki [151]. Na podstawie oceny histopatologicznej bioptatu, zgodnie z definicją WHO, stwierdzo u 10 pacjentów zmiany minimalne (ang. minimal change disease, MCD), u 17 rozsiarne mezangialne kłębuszkowe zapalenie nerek (ang. diffuse mesangial proliferation, DMP), u 4 ogniskowe segmentalne stwardnienie kłębuszków nerkowych (ang. focal segmental glomerulosclerosis, FSGS), u 2 mezangialne kłębuszkowe zapalenie nerek (ang. mesangial glomerulonephritis, MesGN) (Tabl.1).

Tabela 1. Charakterystyka grupy badanej

Parametr (surowica)	Grupa badana		ZN+ Z-score≤-1,00		ZN+Z-score≥-1,00	
Liczba badanych	40		14		26	
Płeć	♀ 18		♀ 7		♀ 11	
	♂ 22		♂ 7		♂ 15	
Wiek zachorowania na ZN	Średnia±SD 3,45±2,39	Mediana 2	Średnia±SD 3,21±1,67	Mediana 2,5	Średnia±SD 3,57±2,73	Mediana 2
Biopsja nerki (liczba pacjentów)	MCD - 10		MCD - 5		MCD - 5	
	DMP - 17		DMP - 5		DMP -12	
	MesGN - 2		MesGN - 1		MesGN - 1	
	FSGS - 4		FSGS - 1		FSGS - 3	
Odpowiedź na GKS	SSNS 23		SSNS 11		SSNS 12	
	SRNS 17		SRNS 3		SRNS 14	

DMP	rozlane mezangialne kłębuszkowe zapalenie nerek (ang. diffuse mesangial proliferation)
GKS	glikokortykosteroidy
MCD	submikroskopowe kłębuszkowe zapalenie nerek (ang. minimal changes disease)
MesGN	mezangialne kłębuszkowe zapalenie nerek (ang. mesangial glomerulonephritis)
FSGS	ogniskowe segmentalne stwardnienie kłębuszków nerkowych (ang. focal segmental glomerulosclerosis)
SRNS	steroidooporny zespół nerczycowy (ang. steroid resistant nephrotic syndrome)
SSNS	steroidowrażliwy zespół nerczycowy (ang. steroid sensitive nephrotic syndrome)
ZN	zespół nerczycowy
Z-score	liczba odchyłeń standardowych masy kostnej pacjenta w odniesieniu do masy kostnej równowiekowej grupy kontrolnej odpowiadającej danej płci

Wszyscy pacjenci z grupy badanej leczenia byli prednizonem doustnie w dawce przekraczającej 7,5mg/24h przez okres nie krótszy niż 3 miesiące. Standardowa steroidoterapia w przypadku pierwszego rzutu choroby i późnego nawrotu tj. powyżej roku trwania remisji, obejmowała podaż prednizonu p.o. w dawce 2mg/kg mc./24h przez okres 6 tygodni, a następnie 1.3mg/kg mc./48h od 7 do 12 tygodnia leczenia włącznie [151]. Dalsza podaż prednizonu, w okresie od 4 do 6 miesiąca leczenia, była stopniowo redukowana, średnio o 5mg tygodniowo, aż do całkowitego odstawienia leku.

W trakcie steroidoterapii wszyscy pacjenci otrzymywali w ramach profilaktyki zmian osteoporotycznych suplementację wapnia w dawce 500-1000mg/24h i preparaty witaminy D w postaci alfakalcydolu w dawce 0,25ug/24h u dzieci o masie ciała poniżej 20 kg i od 0,25 do 0,5ug/24h w przypadku dzieci o masie ciała od 20 do 40 kg. Od chwili przyjęcia do szpitala w odstępach 3 miesięcznych monitorowano stężenie wapnia całkowitego i wapnia zjonizowanego, fosforanów, magnezu, witaminy 25OHD3, fosfatazy alkalicznej oraz parathormonu (Tabl.2).

Tabela 2. Ocena średnich wartości parametrów laboratoryjnych w grupie badanej u pacjentów z obniżoną i prawidłową wartością Z-score po 3-6 miesiącach steroidoterapii

Parametr (surowica)	Grupa badana	ZN+ Z-score≤-1,00	ZN+Z-score≥-1,00
Ca [mmol/l]	2,41±0,02	2,44±0,17	2,39±0,06
Ca2+ [mmol/l]	1,18±0,05	1,18±0,05	1,17±0,05
PO4 [mg/dl]	4,61±0,67	4,62±0,77	4,61±0,61
Mg [mg/l]	20,16±2,01	19,87±1,93	20,33±2,08
25(OH)D3 [ng/ml]	18,58±11,48	17,22±11,48	19,44±11,67
	mediana 15,5	mediana 13,8	mediana 15,6
ALP [U/l]	204,58±75,64	186,92±83,03	215,52±70,54
PTH [pg/ml]	31,66±15,85	28,53±12,28	33,71±17,80

ALP	fosfataza zasadowa
Ca	wapń całkowity
Ca2+	wapń zjonizowany
Mg	magnez
PO4	jon fosforanowy
PTH	parathormon
ZN	zespół nerczycowy
Z-score	liczba odchyień standardowych masy kostnej pacjenta w odniesieniu do masy kostnej równowiekowej grupy kontrolnej odpowiadającej danej płci
25(OH)D3	kalcidiol

W celu wykluczenia dodatkowych, nie związanych ze steroidoterapią, czynników ryzyka rozwoju osteoporozy, w grupie badanej oceniano ponadto wykładniki biochemiczne funkcji nerek, tarczycy oraz odczyny zapalne (Tab.3).

Wartość filtracji kłębuszkowej oceniano z wykorzystaniem skorygowanego wzoru Schwartz [148]: $GFR = 0,413 \times \frac{\text{wzrost [cm]}}{\text{stężenie kreatyniny w surowicy krwi } [\frac{\text{mg}}{\text{dl}}]}$.

Ocena funkcji gruczołu tarczowego obejmowała oznaczenie stężenia hormonu tyreotropowego (TSH), wolnej trójiodotyroniny (FT3) i tyroksyny (FT4). Wyniki badań wskazywały na eutyreozę i kształtowały się jak w tabeli poniżej. Za wykładnik ostrego stanu zapalnego przyjęto podwyższone stężenie białka C-reaktywnego.

Tabela 3. Ocena średnich wartości wybranych parametrów laboratoryjnych w grupie badanej u pacjentów z obniżoną i prawidłową wartością Z-score

Parametr (surowica)	Grupa badana	ZN+ Z-score≤-1,00	ZN+Z-score≥-1,00
Kreatynina [mg/dl]	0,47±0,12	0,44±0,10	0,49±0,12
Mocznik [mg/dl]	28,55±10,71	25,57±7,60	30,29±11,97
GFR [ml/min/1.73m ²] (wzór Schwartz)	117,12±30,53	120,32±33,42	115,18±29,24
TSH [uIU/ml]	3,49±2,29	3,12±2,04	3,66±2,44
FT3 [ng/dl]	2,96±0,59	3,15±0,71	2,85±0,50
FT4 [ng/dl]	0,99±0,20	1,01±0,25	0,97±0,16
CRP [mg/dl]	0,43±0,51	0,38±0,30	0,46±0,60

CRP	białko C-reaktywne
GFR	wartość filtracji kłębuszkowej
FT3	trójiodotyronina
FT4	tyroksyna
TSH	hormon tyreotropowy
ZN	zespół nerczycowy
Z-score	liczba odchyłeń standardowych masy kostnej pacjenta w odniesieniu do masy kostnej równoległej grupy kontrolnej odpowiadającej danej płci

Parametry biochemiczne stanu odżywienia pacjentów obejmowały ocenę stężenia hemoglobiny, cholesterolu całkowitego i białka całkowitego oraz udziału procentowego albumin w rozdziale elektroforetycznym białek w surowicy krwi (Tabl. 4).

Tabela 4. Uśrednione parametry biochemiczne stanu odżywienia w grupie badanej u pacjentów z obniżoną i prawidłową wartością Z-score

Parametr	Grupa badana	ZN+ Z-score \leq -1,00	ZN+Z-score \geq -1,00
Hemoglobina [g/dl]	13,06 \pm 1,44	13,25 \pm 1,38	12,94 \pm 1,49
Cholesterol całkowity [mg/dl]	207,15 \pm 53,06	205,21 \pm 62,72	208,29 \pm 47,98
Białko całkowite [g/dl]	6,59 \pm 0,83	6,84 \pm 0,57	6,44 \pm 0,92
Albuminy [%]	59,89 \pm 8,50	59,08 \pm 9,22	60,39 \pm 8,21

ZN zespół nerczycowy
 Z-score liczba odchyłeń standardowych masy kostnej pacjenta w odniesieniu do masy kostnej równowiekowej grupy kontrolnej odpowiadającej danej płci

Ocena antropometryczna pacjentów obejmowała pomiar masy ciała, wzrostu oraz wyliczenie wskaźnika masy ciała (ang. body mass index, BMI). Uzyskane wyniki pomiarów odniesiono do wartości referencyjnych dla wieku i płci wskazanych na siatkach centylowych wysokości, masy ciała i wskaźnika masy ciała dzieci i młodzieży w Polsce, pochodzących z wielośrodkowego badania OLAF [160].

Szczegółowy wywiad lekarski, obejmujący wszystkich pacjentów z grupy badanej, przeprowadzono w oparciu o ankietę, która pozwoliła na uzyskanie informacji o wieku zachorowania na zespół nerczycowy, wyniku biopsji nerki (o ile była przeprowadzona), czasie trwania i przebiegu choroby podstawowej, dotychczasowym sposobie leczenia i współwystępowaniu schorzeń dodatkowych, ze szczególnym uwzględnieniem chorób układu kostno-stawowego oraz innych schorzeń przewlekłych, stanów niedoborów żywieniowych i unieruchomienia, skutkujących zwiększonym ryzykiem wystąpienia obniżonej gęstości mineralnej kości (Tabl. 5; załącznik 3). Pytania dotyczące farmakoterapii, uwzględniały czas, sposób podania i dawkę glikokortykosteroidów oraz dane dotyczące ewentualnej podaży innych preparatów leczniczych, związanych ze wzrostem ryzyka rozwoju osteoporozy, takich jak leki przeciwkrzepliwe, hormony tarczycowe czy leki cytostatyczne (załącznik 3).

Tabela 5. Choroby współwystępujące u pacjentów z grupy badanej z obniżoną i prawidłową wartością Z-score

Schorzenie	ZN+ Z-score≤-1,00	ZN+Z-score≥-1,00
alergia wziewna, nadreaktywność oskrzeli o typie atopii, astma oskrzelowa	2	3
nawracające zakażenia układu moczowego	2	0
moczenie nocne	1	0
przewlekła choroba nerek	1	0
Padaczka	1	0
ADHD	0	1
wada serca	0	1 (ASDII z przeciekiem L-P)
nadciśnienie tętnicze	1	0
nieswoiste choroby zapalne jelit, stan po niedrożności jelit	0	2 (ch. Leśniowskiego-Crohna)
łojotokowe zapalenie skóry	0	1
wady refrakcji	0	1
cukrzyca typu I-ego	0	1
choroba Hashimoto	1	1
choroba Recklinghausena	1	0
Nadwaga	1	2
niedobór masy ciała	0	2
niskorosłość	4	3
złamanie niskoenergetyczne	2 (złamanie kręgu L3, L4; złamanie kości nadgarstka)	1 (złamanie kości ramiennej)

ADHD	zespół nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (ang. attention deficit hyperactivity disorder)
ASDII	ubytek w przegrodzie międzyprzedsionkowej serca typu II (ang. atrial septal defect type II)
ZN	zespół nerczycowy
Z-score	liczba odchyłeń standardowych masy kostnej pacjenta w odniesieniu do masy kostnej równowiekowej grupy kontrolnej odpowiadającej danej płci

W kwestionariuszu szczególną uwagę zwrócono na informacje, dotyczące schorzeń o charakterze dziedzicznym, w tym chorób wielogenowych, dotyczących zarówno samych pacjentów, jak i ich krewnych. Wywiad lekarski obejmował pytania o takie nieprawidłowości i choroby jak opóźnienie psycho-ruchowe, małowłowie, dysmorfia twarzy, głuchota, ślepotą,

wielopalczość, dysplazje kostno-stawowe, wrodzona łamliwość kości, osteoporoza, reumatoidalne zapalenie stawów, wady serca, wady nerek i dróg moczowych, cukrzyca typu I-ego, toczeń układowy, nieswoiste choroby zapalne jelit, alergię, wirusowe zapalenie wątroby i nowotwory.

W celu ochrony danych osobowych pacjentów próbki z krwią zostały zakodowane w chwili ich otrzymania, poprzez nadanie każdej unikalnego numeru, oznaczającego poszczególnych badanych w kolejnych etapach analizy laboratoryjnej.

3.1.2. Grupa kontrolna

Grupę kontrolną stanowiło 101 osób, 62 chłopców i 39 dziewcząt z województwa wielkopolskiego, w wieku od 5 do 12 lat (średnia wieku $9,12 \pm 2,31$ lat), hospitalizowanych w Klinice Otolaryngologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu pod kierownictwem dr hab. Jarosława Szydłowskiego w latach 2010-2012 celem wykonania zabiegu tonsillektomii, adenotomii lub korekty skrzywienia przegrody nosa. U żadnego z pacjentów, należących do grupy kontrolnej, nie stwierdzono objawów zespołu nerczycowego oraz chorób układu kostno-stawowego. Żaden z pacjentów nie był wcześniej leczony systemowo glikokortykosteroidami przez okres co najmniej 3 miesięcy. Na podstawie zebranego z rodzicami dzieci wywiadu i przeprowadzonego badania lekarskiego, nie stwierdzono u nikogo z grupy kontrolnej istotnych klinicznie schorzeń, zagrażających zdrowiu lub życiu pacjentów, w tym chorób o podłożu genetycznym, poza jednostką chorobową, będącą przyczyną obecnej hospitalizacji. Opiekunowie prawni pacjentów z grupy kontrolnej przed podpisaniem świadomej zgody na pobranie próbki krwi do badań genetycznych zostali poproszeni o wypełnienie kwestionariusza, zbliżonego do tego, przeznaczonego dla dzieci z grupy badanej, zawierającego szczegółowe pytania o występowanie chorób genetycznie uwarunkowanych u pacjentów i w ich rodzinach, ze szczególnym uwzględnieniem chorób nerek, chorób autoimmunologicznych i schorzeń układu kostnego, w tym osteoporozy (załącznik 4). Celem jednoznacznego wykluczenia obecności białkomoczu nerczycowego w grupie kontrolnej, u wszystkich pacjentów wykonano analizę moczu, obejmującą oznaczenie pH, ciężaru właściwego, obecności białka i glukozy oraz ocenę osadu moczu. Wywiad zebrany z opiekunami dzieci nie wskazywał na wcześniejsze występowanie w grupie kontrolnej przypadków złamańiskoenergetycznych. Żadne z dzieci nie pozostawało pod

stałą opieką ortopedy lub reumatologa i nie wymagało przewlekłe zabiegów rehabilitacyjnych z powodu schorzeń narządu ruchu. Liczba osób z grupy kontrolnej była ponad dwukrotnie wyższa od liczby osób z grupy badanej.

3.1.3. Materiał do badań

Materiał do badań stanowiła krew obwodowa, pobierana do probówek z podłożem EDTA w trakcie rutynowych badań dzieci z grupy badanej i kontrolnej w Klinice Kardiologii i Nefrologii Dziecięcej oraz Klinice Otolaryngologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, skąd następnie odmierzano 200 μ l krwi do probówki typu Eppendorf (1,5ml), celem izolacji całkowitego genomowego DNA z wykorzystaniem systemu kolumnowego. Dalsza analiza genetyczna pobranego materiału została wykonana w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu pod kierownictwem profesora M. Zabla.

3.2. Metody

3.2.1. Ocena densytometryczna pacjentów z grupy badanej

Status tkanki kostnej i potencjalne ryzyko złamania niskoenergetycznego oceniano w kontekście zmian klinicznych na podstawie badania densytometrycznego całego szkieletu i odcinka lędźwiowego kręgosłupa L2-L4 z wykorzystaniem aparatu DPX Lunar (scan mode medium, collimation 1.68mm, current (uA) 750, sample 1,2x1,2mm).

Tabela 6. Parametry promieniowania –aparat GE Lunar

Odcinek lędźwiowy kręgosłupa L2-L4	0.4–4 (μSv)
Skany całego ciała	0.02–5(μSv)

U pacjentów o masie ciała poniżej 30 kg zastosowano odpowiedni pediatryczny tryb pomiarowy, uwzględniający rozmiary ciała dziecka. Należy jednak mieć na uwadze, że wszystkie urządzenia przeznaczone do pomiarów densytometrycznych są pierwotnie kalibrowane w odniesieniu do osób dorosłych, a więc o potencjalnie wyższej gęstości mineralnej kości. Obecność oprogramowania przeznaczonego do pomiarów w grupie

pediatrycznej pozwoliła na uzyskanie możliwie wiarygodnych wyników pomiarów, ale z uwzględnieniem wszystkich trudności interpretacyjnych, wynikających z wieku pacjentów. W przypadku zastosowanej w grupie badanej techniki wachlarza detektorów tzw. fan beam, istnieje ryzyko nieprawidłowości w zakresie odczytu wartości BMD, ze względu na różnice w odległości pomiędzy źródłem promieniowania, a badanym fragmentem kości, wynikające z różnej grubości tkanek miękkich u różnych pacjentów. Skutkuje to różnicami na poziomie odczytu przewidywanej dla potrzeb pomiaru powierzchni kości (ang. bone area, BA) i wtórnie do tego zawartości minerałów w kości (ang. bone mineral concentration, BMC). Celem minimalizacji potencjalnego błędu, zgodnie ze standardami postępowania, zastosowano odpowiednie powiększenie, które powinno wyeliminować nieprawidłowości w odczycie BMD poprzez wzajemne zniesienie się błędów odczytu BMC i BA [155,161].

W celu uniknięcia nieprawidłowości w interpretacji porównawczej wyników pomiędzy poszczególnymi pacjentami, wynikających z odmienności w zakresie budowy i oprogramowania oraz stosowanych algorytmów w dostępnych na rynku medycznym densytometrach, wszystkie pomiary wykonano na tym samym aparacie DPX Lunar. W przypadku próby odniesienia wartości BMD mierzonej jak w grupie badanej z wykorzystaniem aparatów marki GE Lunar, do badań wykonanych z wykorzystaniem aparatu Hologic, należy uwzględnić różnice w wynikach, z wartością BMD ok. 16% niższą w przypadku tego drugiego, ze względu na inny sposób kalibracji, opartej na obecności hydroksyapatytu w kościach.

Badanie densytometryczne było każdorazowo wykonywane w okresie od 3 do 6 miesięcy od włączenia prednizonu w dawce 2mg/kgmc./24h i powtarzane w odstępach 6-miesięcznych celem weryfikacji skuteczności leczenia osłonowego i oceny ewentualnej progresji zmian chorobowych, zgodnie z zaleceniami International Society for Clinical Densitometry [154,159].

Masa kostna pacjentów oceniana była w odniesieniu do masy kostnej równowiekowej grupy kontrolnej odpowiadającej danej płci czyli w oparciu o wskaźnik Z-score. Pod pojęciem prawidłowego wyniku badania densytometrycznego rozumiano wartość Z-score $>-1,00$. Wartość Z-score poniżej $-1,00$ odpowiadała w grupie badanej wartościom poniżej referencyjnych dla pacjentów pediatrycznych to znaczy tzw. niskiej masie kostnej w

odniesieniu do wieku, a poniżej -2,00 niskiej masie kostnej w odniesieniu do wieku, sugerującej zwiększone ryzyko złamania niskoenergetycznego [155,156]. Taka interpretacja wyników badania densytometrycznego pozwoliła w grupie badanej wyodrębnić grupę 14 dzieci, u których stwierdzono cechy mogące świadczyć o rozwijającej się osteopenii lub osteoporozie i grupę 26 pacjentów z potencjalnie prawidłowym obrotem kostnym (Tabl. 7,8).

Tabela 7. Wyniki badania densytometrycznego

Grupa badana – pacjenci z obniżoną gęstością mineralną kości

A) Badanie całego szkieletu

Lp.	Płeć	Wiek (l/m)	BMD (g/cm ²)	Y (%)	Age (%)	T-score	Z-score	BMC (g)
1	♂	11/4	0,967	79	107	-3,16	0,84	1630
2	♂	6/2	0,851	70	106	-4,61	1,30	789
3	♀	5/6	0,780	69	100	-4,31	0,01	755
4	♀	6/2	0,820	73	104	-3,81	0,35	717
5	♂	5/5	0,757	62	97	-5,78	-0,28	613
6	♀	12/0	0,843	75	88	-3,53	-1,43	1066
7	♀	5/10	0,767	68	98	-4,48	-0,15	677
8	♂	8/8	0,803	66	96	-5,21	-0,46	995
9	♀	11/8	0,880	78	96	-3,07	-0,44	1052
10	♂	11/8	0,898	74	100	-4,02	-0,02	1306
11	♂	7/7	0,758	62	92	-5,77	-0,77	753
12	♀	6/2	0,851	76	107	-3,43	0,74	843
13	♀	5/0	0,783	70	100	-4,28	0,05	638
14	♂	11/6	0,989	81	110	-2,89	1,11	1737

BMC zawartość minerału w kości (ang. bone mineral contents)

BMD gęstość mineralna kości (ang. bone mass density)

T-score liczba odchyłeń standardowych masy kostnej pacjenta w odniesieniu do szczytowej masy kostnej odpowiadającej danej płci

Z-score liczba odchyłeń standardowych masy kostnej pacjenta w odniesieniu do masy kostnej równowiekowej grupy kontrolnej odpowiadającej danej płci

B) Badanie odcinka lędźwiowego kręgosłupa L2-L4

Lp.	Płeć	Wiek(l/m)	BMD (g/cm ²)	Y (%)	Age (%)	T- score	Z- score	Z-score Skorygowany	BMC (g)
1	♂	11/4	0,620	50	79	-6,20	-1,68	-1,41	18,66
2	♂	6/2	0,532	43	82	-7,08	-1,21	-1,29	10,29
3	♀	5/6	0,515	43	80	-6,85	-1,29	-1,78	9,03
4	♀	6/2	0,554	46	83	-6,46	-1,10	-2,01	9,82
5	♂	5/5	0,428	35	68	-8,12	-1,98	-2,27	8,91
6	♀	12/0	0,632	53	68	-5,68	-2,96	-1,97	16,96
7	♀	5/10	0,532	44	83	-6,50	-1,12	-1,92	8,77
8	♂	8/8	0,536	43	76	-7,03	-1,70	-1,57	12,19
9	♀	11/8	0,630	52	73	-5,70	-2,30	-1,96	13,23
10	♂	11/8	0,562	45	71	-6,78	-2,26	-2,02	14,11
11	♂	7/7	0,526	42	77	-7,14	-1,54	-1,55	9,44
12	♀	6/2	0,612	51	92	-5,88	-0,52	-1,74	11,68
13	♀	5/0	0,511	43	79	-6,89	-1,33	-2,04	8,54
14	♂	11/6	0,657	53	82	-5,83	-1,42	-1,02	17,78

BMC zawartość minerału w kości (ang. bone mineral contents)

BMD gęstość mineralna kości (ang. bone mass density)

T-score liczba odchyłeń standardowych masy kostnej pacjenta w odniesieniu do szczytowej masy kostnej odpowiadającej danej płci

Z-score liczba odchyłeń standardowych masy kostnej pacjenta w odniesieniu do masy kostnej równowiekowej grupy kontrolnej odpowiadającej danej płci

Tabela 8. Wyniki badania densytometrycznego

Grupa badana – pacjenci z prawidłową gęstością mineralną kości

A) Badanie całego szkieletu

Lp.	Płeć	Wiek (l/m)	BMD (g/cm ²)	Y (%)	Age (%)	T-score	Z-score	BMC (g)
1	♂	7/3	0,888	73	108	-4,15	0,85	1062
2	♀	6/2	0,806	72	102	-3,99	0,17	897
3	♂	9/3	0,967	79	112	-3,16	1,34	1337
4	♂	11/5	0,917	75	102	-3,79	0,21	1485
5	♂	9/3	0,890	74	102	-4,01	0,24	1335
6	♂	7/9	0,860	71	105	-4,49	0,51	957
7	♀	5/8	0,809	72	104	-3,95	0,38	777
8	♂	5/	0,823	67	106	-4,96	0,54	863
9	♂	10/9	1,023	84	116	-2,46	1,79	1744
10	♂	12/10	0,990	82	109	-2,77	0,98	1768
11	♀	10	0,897	80	103	-2,85	0,30	1330
12	♂	5/0	0,814	67	104	-5,07	0,43	1344
13	♀	7/9	0,897	80	111	-2,85	1,15	1085
14	♂	4/11	0,794	65	102	-5,32	0,18	719
15	♀	12/0	1,017	90	106	-1,35	0,75	1944
16	♂	10/11	0,927	76	105	-3,67	0,58	1473
17	♀	5/0	ze względu na niepokój dziecka wykonano wyłącznie badanie odcinka lędźwiowego kręgosłupa					
18	♂	9/0	0,886	73	103	-4,18	0,32	1043
19	♂	6/1	0,855	70	110	-4,57	0,93	812
20	♂	9/2	0,911	75	106	-3,86	0,64	1231

21	♂	8/7	0,919	75	109	-3,76	0,99	1037
22	♀	10/2	0,864	77	99	-3,27	0,12	1141
23	♀	8/7	0,874	78	105	-3,14	0,54	1331
24	♀	6/3	0,810	72	102	-3,94	0,22	876
25	♀	10/3	0,974	87	112	-1,89	1,26	1680
26	♀	12/4	1,181	105	123	0,7	2,80	2440

BMC zawartość minerału w kości (ang. bone mineral contents)

BMD gęstość mineralna kości (ang. bone mass density)

T-score liczba odchyłeń standardowych masy kostnej pacjenta w odniesieniu do szczytowej masy kostnej odpowiadającej danej płci

Z-score liczba odchyłeń standardowych masy kostnej pacjenta w odniesieniu do masy kostnej równowiekowej grupy kontrolnej odpowiadającej danej płci

B) Badanie odcinka lędźwiowego kręgosłupa L2-L4

Lp.	Płeć	Wiek(l/m)	BMD (g/cm ²)	Y (%)	Age (%)	T-score	Z-score	Z-score skorygowany	BMC (g)
1	♂	7/3	0,678	55	100	-5,62	-0,02	0,34	16,06
2	♀	6/2	0,639	53	95	-5,49	-0,25	-0,90	13,31
3	♂	9/3	0,809	65	110	-4,31	0,75	1,45	20,43
4	♂	11/5	0,732	59	93	-5,08	-0,56	-0,23	23,49
5	♂	9/3	0,770	62	101	-4,7	0,09	0,99	17,00
6	♂	7/9	0,690	56	101	-5,5	0,10	0,49	13,74
7	♀	5/8	0,586	49	91	-6,14	-0,58	-0,58	11,27
8	♂	5	0,598	48	96	-6,42	-0,28	0,0	11,65
9	♂	10/9	0,809	65	106	-4,31	0,48	1,06	24,92
10	♂	12/10	0,787	63	97	-4,53	-0,28	-0,20	21,59
11	♀	10	0,713	59	90	-4,87	-0,84	-0,38	17,64
12	♂	5/0	0,530	43	85	-7,07	-0,93	-0,99	9,16

13	♀	7/9	0,706	59	103	-4,94	0,22	0,32	16,01
14	♂	4/11	0,573	46	91	-6,67	-0,53	-0,45	9,09
15	♀	12/0	0,966	81	104	-2,34	0,38	0,40	31,75
16	♂	10/11	0,641	52	84	-5,99	-1,20	-0,81	17,27
17	♀	5/0	0,521	43	81	-6,79	-1,23	-0,58	10,68
18	♂	9/0	0,636	51	87	-6,04	-0,98	-0,57	13,73
19	♂	6/1	0,577	47	92	-6,63	-0,49	-0,40	9,23
20	♂	9/2	0,670	54	91	-5,70	-0,64	-0,17	16,56
21	♂	8/7	0,661	53	93	-5,79	-0,46	0,05	13,32
22	♀	10/2	0,670	56	85	-5,3	-1,22	-0,55	16,87
23	♀	8/7	0,651	54	90	-5,49	-0,73	0,47	16,70
24	♀	6/3	0,679	57	102	-5,20	0,15	-0,87	13,35
25	♀	10/3	0,797	66	101	-4,03	0,05	0,92	23,52
26	♀	12/4	1,078	90	116	-1,22	1,5	0,95	35,19

BMC zawartość minerału w kości (ang. bone mineral contents)

BMD gęstość mineralna kości (ang. bone mass density)

T-score liczba odchyłeń standardowych masy kostnej pacjenta w odniesieniu do szczytowej masy kostnej odpowiadającej danej płci

Z-score liczba odchyłeń standardowych masy kostnej pacjenta w odniesieniu do masy kostnej równowiekowej grupy kontrolnej odpowiadającej danej płci

Celem poprawy wiarygodności otrzymanych standardowych danych skategoryzowanych i uniknięcia nieprawidłowej interpretacji parametrów, odnoszących się do pacjentów z pogranicza norm referencyjnych, wyniki pomiarów gęstości mineralnej kości odnoszono do norm ciągłych opracowanych dla populacji dzieci warszawskich, uwzględniających oprócz płci i wieku także dane antropometryczne pacjentów. Sposób obliczenia wartości skorygowanego wskaźnika Z-score oparto na podstawie wyników badań z 2009r., prowadzonych w Zakładzie Biochemii i Medycyny Doświadczalnej IP Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie (Tabl. 9)[158].

Tabela 9. Wzór ogólny na wartość Z-score dla populacji dzieci warszawskich wg interpretacji Jaworskiego i Płudowskiego.

Z-score = (wynik badania BMC_{L2-L4} – wartość należna BMC_{L2-L4} wg wieku) / odchylenie standardowe

Równania dla badanych parametrów wg wieku (♀-dziewczęta; ♂-chłopcy; SD-odchylenie standardowe)

Odcinek lędźwiowy kręgosłupa L2-L4 w projekcji Ap - BMC [g]

♀ średnia	$1,56344 \cdot 10^{-3} \cdot \text{wiek}^5 - 9,586543 \cdot 10^{-2} \cdot \text{wiek}^4 + 2,211095 \cdot \text{wiek}^3 - 23,6512 \cdot \text{wiek}^2 + 118,683 \cdot \text{wiek} - 211,1114$
SD	$-0,0112816 \cdot \text{wiek}^3 + 0,353405 \cdot \text{wiek}^2 - 2,804736 \cdot \text{wiek} + 8,482414$
♂ średnia	$-0,0100938 \cdot \text{wiek}^4 + 0,4503345 \cdot \text{wiek}^3 - 6,84777 \cdot \text{wiek}^2 + 44,337 \cdot \text{wiek} - 89,196$
SD	$(-6,70129 \cdot 10^{-2} \cdot \text{wiek}^5 + 32,0851 \cdot \text{wiek}^4 - 571,904 \cdot \text{wiek}^3 + 4794,393 \cdot \text{wiek}^2 - 18722 \cdot \text{wiek} + 29337,07) / 1000$

Metoda DXA mierzy zawartość minerału w kości (BMC) oraz powierzchnię kości (BA), na podstawie których oblicza wartość BMD jako stosunek BMC/BA. BMD w tak rozumianym pomiarze densytometrycznym stanowi zatem stosunek ilości minerału kostnego do obszaru skanowanego. Ponieważ mamy do czynienia nie z obrazem trójwymiarowym, ale z dwuwymiarowym, który nie uwzględnia wielkości pacjenta, metoda ta nie ocenia rzeczywistej całkowitej wartości BMD, ale wyłącznie powierzchniową gęstość mineralną kości, co powoduje, że u pacjentów niskorosłych, w tym u dzieci, może dochodzić do przekłamań w ocenie wyników z tendencją do niedoszacowania wartości BMD u najmłodszych pacjentów. W celu uniknięcia powyższych nieprawidłowości i uwzględnienia różnic w wielkości kości u poszczególnych pacjentów, wykorzystano tzw. metodę wolumetryczną, pozwalającą określić obliczoną gęstość mineralną kości (ang. bone mineral apparent density, BMAD) dla odcinka lędźwiowego kręgosłupa, opierając się na formule matematycznej, bez konieczności narażania pacjentów na promieniowanie związane z badaniem QCT (załącznik 5) [155, 163].

Wzór na BMAD w odcinku lędźwiowym kręgosłupa L2-L4 (wg interpretacji Krögera i wsp.)

BMADLS = BMDLS × [4/(π × szerokość)], gdzie:

BMADLS – obliczona gęstość mineralna kości dla odcinka lędźwiowego kręgosłupa na wysokości od drugiego do czwartego kręgu

szerokość- średnia szerokość kręgosłupa na wysokości od drugiego do czwartego kręgu lędźwiowego

3.2.2. Izolacja całkowitego genomowego DNA w krwi obwodowej

Izolacja całkowitego genomowego DNA w krwi obwodowej została przeprowadzona z wykorzystaniem systemu kolumnowego ze złożem krzemionkowym QIAamp DNA Mini Blood firmy QIAGEN, który pozwala na uzyskanie w przybliżeniu ok. 6 µg DNA z 200 µl krwi obwodowej świeżej lub mrożonej na poziomie pojedynczej kolumny. Do momentu izolacji DNA, 1,5ml probówki typu Eppendorf opisane kodem należnym dla poszczególnych pacjentów z 200µl krwi obwodowej, przechowywano w temperaturze -80°C. Proces wirowania i izolacji miał miejsce w temperaturze pokojowej [164].

Po rozmrożeniu w temperaturze pokojowej, krew w ilości 200 µl umieszczano wraz z 200 µl buforu lizującego AL w nowej probówce Eppendorf (1,5ml), opisanej stosownym kodem i zawierającej 20 µl Proteinazy K. Przez okres 15 sekund probówka pozostawała na mieszadle typu vortex, a następnie przez 10 minut w bloku grzejmym o temperaturze 56°C w celu strawienia białek związanych z DNA i uzyskania lizy erytrocytów, o czym świadczyła zmiana jej zabarwienia na kolor brunatno-zielony. Po kilkusekundowym odwirowaniu, do probówki dodawano 200 µl czystego etanolu (>96%) i celem zmieszania substratów umieszczano ponownie na czas 15 sekund na mieszadle typu vortex.

Tak uzyskaną zawartość probówki nanoszono na oznaczoną tym samym numerem kodowym kolumnę QIAamp Mini (Tabl. 10), przeznaczoną do izolacji DNA, którą umieszczano w wirówce na okres 1 minuty, gdzie była poddawana wirowaniu z szybkością 8000 rpm. Celem wirowania było zależne od pH środowiska i obecności soli chaotropowych, związanie DNA z podłożem krzemionkowym, przy równoczesnym przejściu rozpuszczalnika przez złożo. Tak uzyskaną kolumnę krzemionkową ze związanym DNA umieszczano w nowej probówce odbierającej i w celu usunięcia zanieczyszczeń nanoszono na nią 500 µl buforu płuczającego AW1, a następnie poddawano 1 minutowemu wirowaniu z szybkością 8000rpm. Stara

próbówka wraz z supernatantem, należąc do grupy skażonych odpadów biologicznych. podlegała dalszej utylizacji.

Po zastosowaniu buforu płuczącego AW1, kolumnę ze złożem krzemionkowym ponownie umieszczano w kolejnej próbówce odbierającej, natomiast pozostały supernatant wyrzucano do pojemnika na skażone odpady biologiczne. Drugie przemywanie złoża krzemionkowego ze związanym DNA miało miejsce przy wykorzystaniu 500 µl buforu płuczącego AW2 i procesu wirowania, któremu poddawano kolumnę z prędkością 14000 rpm przez okres 4 minut.

Kolejnym etapem izolacji DNA było odzyskanie związanego kwasu dezoksyrybonukleinowego ze złoża krzemionkowego. W tym celu kolumnę umieszczano w nowej, oznakowanej numerem kodowym próbówce Eppendorf (1,5ml) i dodawano 200 µl buforu elucyjnego AE, o składzie strzeżonym tajemnicą i patentem producenta. Przez kolejnych 5 minut od dodania buforu AE kolumnę inkubowano w temperaturze pokojowej, a następnie przez 1 minutę poddawana była wirowaniu z prędkością 8000 rpm, co pozwoliło otrzymać wyizolowany, całkowity genomowy DNA w próbówce Eppendorf, wykorzystywany bezpośrednio po izolacji do kolejnych etapów badań. Kolumnę wyrzucano.

Tabela 10. Wykorzystane odczynniki do izolacji całkowitego genomowego DNA

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
Kit do izolacji DNA: QIAamp DNA Mini Blood	QIAGEN	51106
Bufor lizujący AL (Lysis buffer)		
Bufor płuczący 1 AW1 (Wash buffer 1)		
Bufor płuczący 2 AW2 (Wash buffer 2)		
Bufor elucyjny AE (Elution buffer)		
Proteinaza K		
Alkohol etylowy bezwodny (EtOH) 99,8%	POCH	396480111

3.2.3. Pomiar stężenia DNA

Pomiaru ilości wyizolowanego genomowego DNA, którego stężenie było wyrażone w ng/ μ l, dokonano metodą spektrofotometryczną przy wykorzystaniu urządzenia Nano-Drop ND-1000 firmy NanoDrop ThermoScientific. Pomiar stosunku absorbancji przy fali 260 nm do fali o długości 280 nm pozwolił dodatkowo na ocenę jakościową otrzymanego w wyniku procesu izolacji materiału genetycznego. Za czystością otrzymanego DNA przemawiał wynik pomiaru w granicach referencyjnych od 1,8 do 2,0. Wartości przekraczające wskazane normy mogą sugerować zanieczyszczenie badanego materiału genetycznego takimi substancjami jak sole, fenol czy związki białkowe [165].

Celem kalibracji, na punkt pomiarowy nanoszono pipetą 1 μ l czystej wody, nie zawierającej nukleaz firmy Ambion, po wcześniejszym włączeniu komputera, sprzężonego ze spektrofotometrem oraz wybraniu w programie obsługującym urządzenie opcji pomiaru stężenia DNA. Pomiaru próby ślepej dokonywano z wykorzystaniem buforu elucyjnego AE z zestawu do izolacji DNA firmy Qiagen, w którym pozostawał zawieszony izolat DNA. Badanie to polegało na wprowadzeniu pipetą 1 μ l buforu AE w miejsce pomiarowe i wykonaniu próby ślepej czyli oceny tła. Pomiaru stężenia próbki właściwej, zawierającej wyizolowany genomowy DNA, dokonywano po uprzednim przetarciu miejsca pomiarowego czystą ligniną. Kolejnym krokiem było ponowne naniesienie pipetą 1 μ l izolatu na miejsce pomiarowe. Po odczytaniu wartości stężenia DNA, oceniano stopień jego czystości poprzez odniesienie do tabel z wartościami referencyjnymi i wyliczenie stosunku wartości absorbancji próbki przy fali 260nm/280nm.

3.2.4. PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem sond typu TaqMan

W celu analizy 12 wybranych SNP genu *LRP5* wykonano genotypowanie z wykorzystaniem techniki reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. real-time polymerase chain reaction, real-time PCR) i sond molekularnych typu TaqMan.

W reakcji PCR w skład mieszaniny reakcyjnej wchodzi trisfosforany deoksyrybonukleotydów, startery oraz oczyszczony, wyizolowany DNA, stanowiący matrycę dla termostabilnej polimerazy DNA. Podstawową zaletą metody jest krótki czas, potrzebny do uzyskania licznych kopii dowolnej sekwencji DNA [166]. Podgrzanie mieszaniny do 95°C w

pierwszym cyklu reakcji, prowadzi do pęknięcia wiązań wodorowych pomiędzy zasadami azotowymi i rozdzielenia kwasu nukleinowego na dwa pojedyncze łańcuchy. Przyłączanie się starterów do matrycy wymaga obniżenia temperatury do wartości w granicach od 45-70 °C. Ponowny wzrost temperatury o ok. 2°C umożliwia syntezę nici komplementarnej na matrycy z udziałem polimerazy DNA. Wielokrotność powtórzeń, w tym przypadku 40 cykli, umożliwia uzyskanie odpowiednio wysokiej liczby kopii. Początkowe powielanie produktu jest powolne, co wynika z czasu potrzebnego starterom na skanowanie DNA w poszukiwaniu komplementarnych fragmentów. Wraz ze wzrostem liczby kopii powielanego fragmentu DNA w środowisku reakcji, rośnie jej tempo. Wprowadzenie technik opartych na emisji fluorescencji z wykorzystaniem barwników interkalujących i sond molekularnych, pozwoliło na śledzenie przebiegu reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

Technika PCR z wykorzystaniem sond molekularnych związana jest ze zjawiskiem bezpromienistego rezonansowego transferu energii (ang. fluorescence resonance energy transfer, FRET). Podczas tego procesu na skutek przenoszenia energii pomiędzy fluorochromami dochodzi do zjawiska świecenia. W metodzie TaqMan wykorzystuje się sondy molekularne tj. znakowane barwnikiem fluorescencyjnym o znanej długości światła i zaopatrzone w wygaszacz oligonukleotydy komplementarne względem danej sekwencji DNA. Są one znakowane na końcach 5' barwnikiem reporterowym np. karboksyfluoresceiną (FAM) lub VIC (nazwa zastrzeżona przez firmę ABI, USA), a na końcach 3' barwnikiem tłumiącym fluorescencję tzw. wygaszaczem (quencher) np. 6-karboksylo-tetrametylorodaminą (TAMRA) lub kwasem 4-(4'-dimetylo-aminofenyloazo) benzoesowym. W chwili przyłączania starterów do matrycy sonda hybryduje do DNA, które ulega amplifikacji. Wydłużanie powstającego produktu przez polimerazę, powoduje zniesienie działania wygaszacza i aktywację barwnika fluorescencyjnego, odbieraną przez określony detektor w termocyklerze. W dalszej kolejności sonda zostaje zdegradowana przez, wykazującą aktywność egzonukleazy 5'→3' polimerazę Taq. Wzrost fluorescencji stanowi efekt uwolnienia, związanych z sondą barwników.

W badaniu na matrycy uzyskanego DNA przeprowadzono ilościowy RQ-PCR w czasie rzeczywistym w technologii TaqMan przy użyciu Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), zawierającego polimerazę, DTP oraz sole. W reakcji wykorzystano ponadto odczynnik Predesigned SNP Genotyping Assay, zawierający specyficzne startery oraz sondy

komplementarne do poszukiwanych sekwencji DNA, znakowane różnymi znacznikami (Applied Biosystems) (Tabl. 11-14). Pierwszy etap przygotowania reakcji RQ-PCR stanowiło rozcieńczenie DNA. W tym celu do objętości 20 µl DNA dodawano 30 µl wody wolnej od nukleaz, uzyskując końcową objętość 50 µl. Na pojedynczą reakcję przypadało 5 µl rozcieńczonego DNA. Szybkość i stosunkowo niski koszt techniki PCR, pozwoliły na przeprowadzenie testu skriningowego w grupie badanej i grupie kontrolnej. Do przeprowadzenia reakcji wykorzystano termocykler Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR i płytki 96 dołkowe w objętości 2,5 µl. W celu uzyskania określonej ilości kopii powielanego odcinka DNA opisany cykl PCR powtórzono 40-krotnie.

Do przeprowadzenia reakcji stosowano sondy o następujących sekwencjach:

Tabela 11. Sondy TaqMan Applied Biosystems zastosowane w reakcji RQ-PCR

SNP	VIC	FAM	nazwa sondy Applied Biosystems (assay ID)	ABI MAF	HapMap MAF	AIF	STOCK
rs3736228	C	T	C__25752205_10	Brak	CEPH [T] 0.12	AIF 2	40x
rs491347	A	G	C___780085_10	Brak	CEPH [C] 0.2	AIF 2	40x
rs312009	C	T	C___976102_10	Brak	CEPH [T] 0.22	AIF 2	40x
rs556442	A	G	C___780057_10	Caucasians [G] 0.38	CEPH [G] 0.24	AIF 1	40x
rs1784235	C	T	C___3043346_10	Brak	CEPH [C] 0.2	AIF 1	40x
rs41494349	A	G	C__86538412_10	Brak	Brak	AIF 1	40x
rs2306862	C	T	C__16194976_10	Caucasians [T] 0.22	CEPH [T] 0.13	AIF 1	40x
rs3736229	C	T	C__27473759_10	Brak	Brak	AIF 2	40x
rs312016	C	T	C___976104_10	Brak	CEPH [A]	AIF	40x

					0.32	2	
rs4988300	G	T	C___3161759_10	Brak	CEPH [T] 0.44	AIF 2	40x
11 rs634008	C	T	C___976113_10	Brak	Brak	AIF 3	40x
rs312023	A	G	C___3161768_10	Brak	CEPH [G] 0.43	AIF 3	40x

AIF opis TaqMan Array card (ang. assai information file)
 CEPH Fundacja Jean Dausset- Centrum Badań nad Polimorfizmami Genów Ludzkich (fr. Jean Dausset-Centre d'Etude du Polymorphisme Humain)
 FAM karboksyfluoresceina (ang. carboxyfluorescein)
 SNP polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism)
 STOCK stężenie
 VIC barwnik reporterowy 5', nazwa zastrzeżona przez firmę ABI

Tabela 12. Parametry programu amplifikacyjnego reakcji real-time PCR z sondami TaqMan

Etap reakcji sekwencjonowania	Wstępna denaturacja	Denaturacja	Annealing / Elongacja	Liczba cykli
Temp. / czas	95°C / 10 min	92°C / 15 sek.	60°C / 1 min	40

Tabela 13. Odczynniki wykorzystane do reakcji real-time PCR z sondami typu TaqMan

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
Custom TaqMan® SNP Genotyping Assay, small scale, Human	Applied Biosystems	4331349
TaqMan Genotyping Master Mix	Applied Biosystems	4371355
Woda wolna od nukleaz (Nuclease-free water, not DEPC-treated)	Ambion, Applied Biosystems	AM9930

Tabela 14. Skład mieszaniny reakcyjnej real-time PCR z sondami typu TaqMan

Odczynnik	Dodawana objętość
Custom TaqMan® SNP Genotyping Assay, small scale, Human (sondy TaqMan + startery)	0,25 µl
TaqMan Genotyping Master Mix	2,5 µl
Nuclease-free water, not DEPC-treated	0,25 µl
Genomowy DNA	2 µl
Całkowita objętość reakcji PCR	5 µl

3.3. Analiza polimorfizmów i metoda statystyczna

Przeszukiwanie sekwencji DNA w miejscu występowania danego polimorfizmu pojedynczego nukleotydu genu *LRP5* prowadzono w programie Sequence Analysis v.5.2. Dane dotyczące lokalizacji polimorfizmów SNP pochodziły z baz danych dbSNP NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) oraz SNPper (<http://snpper.chip.org>). W programie Microsoft Excel stworzono pliki, pozwalające skatalogować genotypy, dotyczące poszczególnych polimorfizmów, niezależnie od ich zróżnicowania. Analizie poddano wszystkie dwanaście wybranych polimorfizmów genu *LRP5* uzyskanych w reakcji PCR w czasie rzeczywistym z udziałem sond TaqMan. Otrzymane wyniki pozwoliły na ocenę częstości alleli i genotypów w grupie pacjentów z zespołem nerczycowym i obniżoną gęstością mineralną kości oraz z prawidłową wartością BMD, a także w grupie kontrolnej, z wykorzystaniem programu statystycznego Haploview.

Istotność statystyczną różnic w częstości występowania poszczególnych SNP genu *LRP5* pomiędzy pacjentami z dwóch grup badanych i grupy kontrolnej oszacowano przy pomocy testu dokładnego Fishera w programie GraphPad InStat 3. Za różnice statystycznie istotne uznano wartości funkcji testowej przy poziomie istotności $p < 0,05$. Powiązanie występowania określonego wariantu danego polimorfizmu z wystąpieniem niekorzystnych zmian w gęstości mineralnej kości oceniano na podstawie obliczenia ilorazu szans (ang. odds ratio, OR), którego wartość istotnie mniejsza od jedności sugeruje znaczenie ochronne

danego wariantu polimorfizmu dla wystąpienia niekorzystnych zmian kostnych, większa zaś od jedności może wskazywać na podwyższone ryzyko rozwoju osteopenii lub osteoporozy.

3.4. Ocena bloków haplotypowych

W oparciu o badane dwanaście polimorfizmów pojedynczego nukleotydu genu *LRP5* analizowano bloki haplotypowe. Badaniem objęte były SNP kodujące oraz niekodujące, zlokalizowane na pograniczu intron-ekson. Obliczenia przeprowadzono z osobna dla każdej z dwóch grup badanych i grupy kontrolnej oraz dla powyższych grup ujętych wspólnie. W tym celu wykorzystano program Haploview (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>), oparty na trzech algorytmach tj. Gabriel, regule 4 gamet (ang. four gamete rule, 4GR) oraz rdzeniu niezrównoważenia sprzężeń (ang. solid spine of LD, SSLD). Najwyższą wiarygodność, a co za tym idzie minimalizację ryzyka wystąpienia wyników fałszywie dodatnich w zakresie powiązań pomiędzy badanymi SNP, zapewnia wykorzystanie algorytmu Gabriel. [95,96].

Celem określenia struktury genu *LRP5*, w pracy wykorzystano wartość matematyczną R^2 , będącą miarą niezrównoważenia sprzężeń, dostarczającą informacji o potencjalnym prawdopodobieństwie występowania powiązań pomiędzy analizowanymi SNP i ich wspólnej segregacji [97,98]. Wartość R^2 szacunkowo powinna wynosić około 0,7 (70%). W formacie txt utworzono zakodowany numerycznie plik, zawierający dane dotyczące badanych SNP, w tym informacje dotyczące ich lokalizacji wyrażonej liczbowo, pochodzące z bazy danych dbSNP NCBI. Po stworzeniu pliku dotyczącego lokalizacji SNP, na obliczenie wartości niezrównoważenia sprzężeń pozwoliło wykorzystanie programu Haploview. Uzyskane wyniki przedstawiono w postaci R^2 i oceny w skali szarości, gdzie kolor czarny w schematycznej wizualizacji struktury genu oznaczał wysoką kosegregację pary SNP, a kolor biały odpowiadał brakowi sprzężenia pomiędzy nimi. Wartości R^2 dla par SNP przedstawiono w postaci liczb na diagramie, odpowiadających parom SNP, zbiegającym się w określonym kwadracie. Celem uniknięcia fałszywie dodatnich wyników, sugerujących istnienie bloków haplogenowych pomiędzy poszczególnymi SNP w przypadkach, gdy w rzeczywistości nie dochodzi do ich wspólnej segregacji, analizę oparto wyłącznie na algorytmie Gabriel z pominięciem algorytmów 4 Gamete Rule oraz Solid Spine of LD.

4. Wyniki

4.1. Uzyskanie materiału do badań genetycznych i opracowanie bazy danych

Ilości DNA wyizolowanego z leukocytów krwi obwodowej pacjentów z grup badanych i grupy kontrolnej mieściły się w granicach od 3,6 ng/μl do 60,0 ng/μl tj. w zakresie pozwalającym na przeprowadzenie analizy genetycznej. Na podstawie pomiaru stosunku absorbancji fal o długości 260/280 nm stwierdzono, że na 40 próbek uzyskanych od pacjentów z dwóch grup badanych 4 nie mieściły się w przedziale 1,8-2,0, co świadczy o obecności zanieczyszczeń pod postacią soli lub białek. Podobny wynik stwierdzono w przypadku 26 próbek ze 101 badanych w grupie kontrolnej. W pozostałych 36 próbkach pochodzących z grup badanych oraz 75 próbkach grupy kontrolnej wynik pomiaru absorbancji fal o długości 260/280 nm mieścił się w granicach 1,8-2,0, wskazując na wysoką jakość materiału uzyskanego do badań genetycznych. Wyniki pomiaru stężenia DNA i stosunku absorbancji fal 260/280 nm u pacjentów z grup badanych i grupy kontrolnej przedstawiono w załącznikach 6, 7 i 8.

4.2. Analiza polimorfizmów SNP w genie *LRP5*

Analiza sekwencji genu *LRP5* metodą TaqMan RQ-PCR pozwoliła na ocenę 12 wybranych polimorfizmów pojedynczego nukleotydu i określenie odpowiadających im genotypów u pacjentów z zespołem nerczycowym w wieku od 5 do 12 lat leczonych glikokortykosteroidami, podzielonych na dwie grupy badane ze względu na prawidłową bądź obniżoną gęstość mineralną kości oraz w grupie kontrolnej dzieci zdrowych. Ocenie poddano 12 następujących SNP, zlokalizowanych w odcinkach kodujących (n=5) i niekodujących (n=7) genu *LRP5*, wybranych na podstawie doniesień literaturowych: rs3736228, rs491347, rs312009, rs556442, rs1784235, rs41494349, rs2306862, rs3736229, rs312016, rs4988300, rs634008 i rs31202. Największa liczba badanych polimorfizmów występowała w obrębie intronu 1. Pozostałe zlokalizowane były w eksonach 2, 7, 10, 13, 15 i 19 oraz w intronie 7 i sekwencji 5'UTR. Szczegółowe informacje dotyczące wariantów nukleotydowych polimorfizmów i ich lokalizacji w genie oraz częstości występowania w populacji północno- i zachodnioeuropejskiej zawiera tabela 15.

Tabela 15. Analizowane SNP genu *LRP5* (w oparciu o International HapMap Project)

Lp.	Nazwa SNP	Warianty nukleotydowe	Lokalizacja w genie	Częstość występowania genotypów w populacji europejskiej (na podstawie CEPH)		
				C/C	C/T	T/T
1	rs3736228	C/T	Ekson 18	0,739	0,243	0,018
2	rs491347	A/G	Intron 7	0,067	0,283	0,650
3	rs312009	C/T	5'UTR	0,045	0,324	0,631
4	rs556442	A/G	Ekson 15	0,097	0,363	0,540
5	rs1784235	C/T	Intron 13	0,051	0,288	0,661
6	rs41494349	A/G	Ekson 2	brak danych		
7	rs2306862	C/T	Ekson 10	0,708	0,265	0,027
8	rs3736229	C/T	Ekson 19	brak danych		
9	rs312016	C/T	Intron 2	0,517	0,317	0,167
10	rs4988300	G/T	Intron 1	0,301	0,450	0,248
11	rs634008	C/T	Intron 1	0,230	0,442	0,327
12	rs312023	A/G	Intron 1	brak danych		

CEPH Fundacja Jean Dausset- Centrum Badań nad Polimorfizmami Genów Ludzkich (fr. Jean Dausset-Centre d'Etude du Polymorphisme Humain)

SNP polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism)

Wśród analizowanych polimorfizmów rs3736229 (C) u wszystkich pacjentów z grup badanych i grupy kontrolnej występował tylko w jednym z wariantów allelicznych. SNP rs41494349 (A) także występował w pojedynczym, homozygotycznym wariacie allelicznym u wszystkich pacjentów w grupach badanych i u 101 z 102 pacjentów w grupie kontrolnej. W nawiasach podano warianty nukleotydowe wykryte u wszystkich przebadanych osób. Pozostałe SNP wykazywały różnorodność wariantów allelicznych. W grupie badanej 7 polimorfizmów rs312009, rs556442, rs1784235, rs312016, rs4988300, rs634008 i rs312023 występowało w 3 różnych wariantach genotypowych. Pozostałe 3 polimorfizmy rs3736228, rs491347 i rs2306862 występowały pod postacią 2 różnych wariantów genotypowych. Dane dotyczące występowania poszczególnych genotypów polimorfizmów SNP w genie *LRP5* dla obydwu grup badanych i grupy kontrolnej przedstawiono w załącznikach 9,10 i 11. Zgodnie z

prawem równowagi HWE (Hardy-Weinberg Equilibrium), w przypadku żadnego z ocenianych SNP u pacjentów w grupach badanych i grupie kontrolnej, polimorfizmy nie występowały wyłącznie w układach heterozygotycznych.

Powyższe dane stanowiły podstawę do analizy statystycznej 10 SNP, które występowały w więcej niż jednym wariacie allelicznym. Były to SNP: rs3736228, rs491347, rs312009, rs556442, rs1784235, rs2306862, rs312016, rs4988300, rs634008 oraz rs312023. Analizę przeprowadzono w oparciu o program GraphPad InStat 3. W przypadku dwóch SNP rs41494349 i rs3736229 zarówno dla grup badanych jak i grupy kontrolnej nie otrzymano wyniku zgodnego z prawem niezrównoważenia Hardy-Weinberga, ponieważ powyższe SNP występowały wyłącznie w jednym wariacie allelicznym. Pozostałe 10 SNP w obu badanych grupach i w grupie kontrolnej były zgodne z prawem HWE. Częstość alleli i genotypów badanych polimorfizmów w grupach pacjentów z obniżoną i prawidłową gęstością mineralną kości oraz w grupie kontrolnej obliczone na podstawie danych z genotypowania przedstawia tabela 16.

Tabela 16. Częstości alleli i genotypów zbadanych polimorfizmów SNP w genie *LRP5* u pacjentów w grupach badanych i w grupie kontrolnej.

Lp.	Nazwa SNP	Częstość alleli			Częstość genotypów		
		Grupa badana Z-score<-1,00	Grupa badana Z-score>-1,00	Grupa kontrolna	Grupa badana Z-score<-1,00	Grupa badana Z-score>-1,00	Grupa kontrolna
1	rs3736228	C: 0,90 T: 0,10	C: 0,89 T: 0,11	C: 0,87 T: 0,13	CC: 0,79 TT: 0,00 CT: 0,21	CC: 0,85 TT: 0,00 CT: 0,15	CC: 0,77 TT: 0,03 CT: 0,20
2	rs491347	A: 0,86 G: 0,14	A: 0,79 G: 0,21	A: 0,77 G: 0,23	AA: 0,72 GG: 0,00 AG: 0,28	AA: 0,58 GG: 0,00 AG: 0,42	AA: 0,59 GG: 0,06 AG: 0,35
3	rs312009	C: 0,57 T: 0,43	C: 0,50 T: 0,50	C: 0,74 T: 0,26	CC: 0,36 TT: 0,21 CT: 0,43	CC: 0,23 TT: 0,23 CT: 0,54	CC: 0,57 TT: 0,08 CT: 0,35
4	rs556442	A: 0,79	A: 0,71	A: 0,72	AA: 0,57	AA: 0,50	AA: 0,55

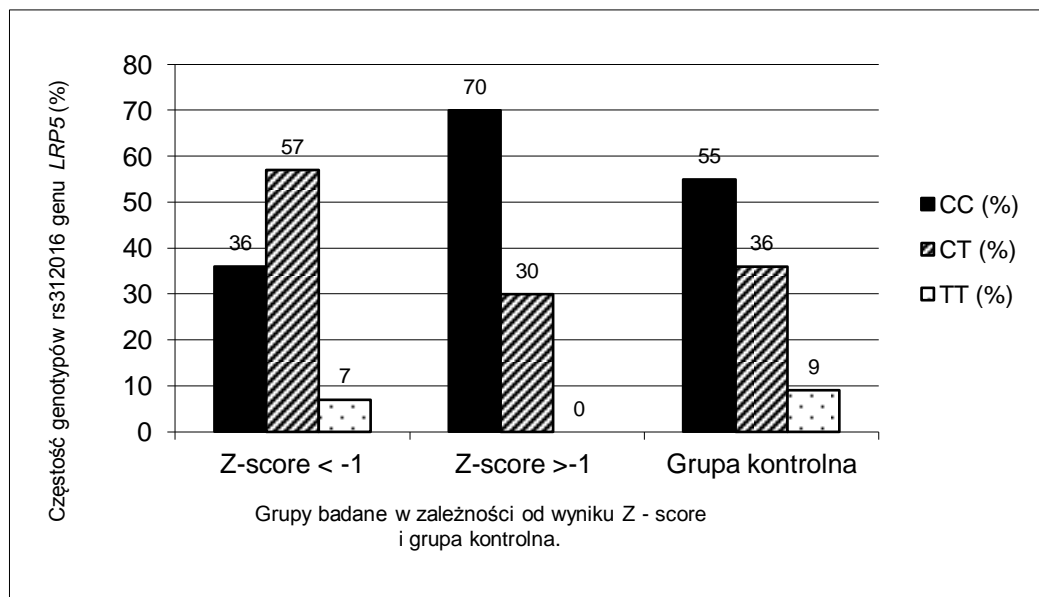
		G: 0,21	G: 0,29	G: 0,28	GG: 0,00 AG: 0,43	GG: 0,04 AG: 0,46	GG: 0,10 AG: 0,35
5	rs1784235	C: 0,14 T: 0,86	C: 0,21 T: 0,79	C: 0,26 T: 0,74	CC: 0,00 TT: 0,72 CT: 0,28	CC: 0,00 TT: 0,58 CT: 0,42	CC: 0,08 TT: 0,56 CT: 0,36
6	rs2306862	C: 0,86 T: 0,14	C: 0,88 T: 0,12	C: 0,84 T: 0,16	CC: 0,71 TT: 0,00 CT: 0,29	CC: 0,77 TT: 0,00 CT: 0,23	CC: 0,71 TT: 0,04 CT: 0,25
7	rs312016	C: 0,64 T: 0,36	C: 0,85 T: 0,15	C: 0,73 T: 0,27	CC: 0,36 TT: 0,07 CT: 0,57	CC: 0,70 TT: 0,00 CT: 0,30	CC: 0,55 TT: 0,09 CT: 0,36
8	rs4988300	G: 0,68 T: 0,32	G: 0,52 T: 0,48	G: 0,55 T: 0,45	GG: 0,43 TT: 0,07 GT: 0,50	GG: 0,23 TT: 0,19 GT: 0,58	GG: 0,35 TT: 0,24 GT: 0,41
9	rs634008	C: 0,32 T: 0,68	C: 0,42 T: 0,58	C: 0,46 T: 0,54	CC: 0,07 TT: 0,43 CT: 0,50	CC: 0,19 TT: 0,35 CT: 0,46	CC: 0,24 TT: 0,33 CT: 0,43
10	rs312023	A: 0,68 G: 0,32	A: 0,58 G: 0,42	A: 0,56 G: 0,44	AA: 0,43 GG: 0,07 AG: 0,50	AA: 0,35 GG: 0,19 AG: 0,46	AA: 0,34 GG: 0,22 AG: 0,44

SNP polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism)
Z-score liczba odchyłeń standardowych masy kostnej pacjenta w odniesieniu do masy kostnej
równowiekowej grupy kontrolnej odpowiadającej danej płci

Analiza otrzymanych wyników przy pomocy testu dokładnego Fishera wskazuje na istnienie różnicy w częstości występowania wariantów SNP rs312016 genu *LRP5* (CC/CT/TT) na granicy istotności statystycznej pomiędzy pacjentami z zespołem nerczycowym i obniżoną gęstością mineralną kości, a pacjentami z zespołem nerczycowym i prawidłowym wynikiem badania densytometrycznego. Otrzymana dla tej korelacji wartość p wyniosła 0,05 tzn. była na granicy istotności statystycznej z dokładnością do dwóch miejsc po przecinku. Wariant SNP rs312016 CC występował w grupie badanej o prawidłowej wartości BMD istotnie częściej niż w grupie badanej z wartością Z-score <-1,00, a jego ekspresja wykazywała

tendencję spadkową w przypadku pacjentów cechujących się niekorzystną przebudową kostną. Wartość ilorazu szans OR dla rs312016 wyniosła 4,050, co może wskazywać na powiązanie występowania wariantu CT z wystąpieniem niekorzystnych zmian w gęstości mineralnej kości u dzieci z zespołem nerczycowym leczonych glikokortykosteroidami. W przypadku SNP rs312016 zwraca również uwagę występowanie polimorfizmu TT u jednego z pacjentów w grupie badanej z obniżoną wartością BMD, liczącą 14 osób (częstość 0,07), podczas, gdy wariant ten nie występował w ogóle w 26 osobowej grupie badanej pacjentów, u których nie obserwowano zmian kostnych. Dodatkowo pojedynczy allel T SNP 312016 występował istotnie częściej w grupie z $Z\text{-score} < -1,00$, niż u dzieci o prawidłowym wyniku badania densytometrycznego, co może wskazywać na związaną z nim predyspozycję do rozwoju osteoporozy, pomimo iż nie tworzył bloków w analizie HaploView z innymi SNP (Ryc. 1).

Rycina 1 Częstość występowania genotypów rs312016 genu *LRP5* w grupach badanych w zależności od wartości Z-score oraz w grupie kontrolnej



W przypadku pozostałych jedenastu SNP, w tym najczęściej opisywanego w literaturze w odniesieniu do ryzyka rozwoju osteoporozy rs3736228, nie stwierdzono obecności istotnych statystycznie różnic w częstości występowania poszczególnych ich wariantów pomiędzy pacjentami z zespołem nerczycowym i obniżoną gęstością mineralną kości, pacjentami z zespołem nerczycowym i prawidłową gęstością mineralną kości oraz grupą kontrolną dzieci zdrowych. Otrzymane wartości p były większe od 0,05 i mieściły się w

przedziale od 0,2529 do 1,0000. Zakres wartości obliczonego ilorazu szans OR wynosił od 0,5455 do 2,240. Otrzymane wyniki analizy statystycznej przedstawiono w tabelach 17-36.

Tabela 17. Analiza statystyczna SNP rs3736228 genu *LRP5* w grupach badanych

SNP rs3736228	warianty genotypowe		
grupa badana	CT	CC	CT/CC
ZN+Z-score \leq -1,00	3(8%)	11(28%)	14(35%)
ZN+Z-score \geq -1,00	6(15%)	20(50%)	26(65%)
ogół pacjentów	9(23%)	31(78%)	40(100%)

p=1,0000; OR=0,9091
95% przedział ufności:
0,1892 do 4,367 (wg. Woolf'a)

SNP polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism)
ZN zespół nerczycowy
Z-score liczba odchyłeń standardowych masy kostnej pacjenta w odniesieniu do masy kostnej
równowiekowej grupy kontrolnej odpowiadającej danej płci

Tabela 18. Analiza statystyczna SNP rs491347 genu *LRP5* w grupach badanych

SNP rs491347	warianty genotypowe		
grupa badana	AG	AA/GG	AG/AA/GG
ZN+Z-score \leq -1,00	4(10%)	10(25%)	14(35%)
ZN+Z-score \geq -1,00	11(28%)	15(38%)	26(65%)
ogół pacjentów	15(38%)	25(63%)	40(100%)

p=0,5024; OR=0,5455
95% przedział ufności:
0,1350 do 2,205(wg. Woolf'a)

SNP polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism)
ZN zespół nerczycowy
Z-score liczba odchyłeń standardowych masy kostnej pacjenta w odniesieniu do masy kostnej
równowiekowej grupy kontrolnej odpowiadającej danej płci

Tabela 19. Analiza statystyczna SNP rs312009 genu *LRP5* w grupach badanych

SNP rs312009	warianty genotypowe		
grupa badana	CT	TT/CC	CT/TT/CC
ZN+Z-score≤-1,00	6(15%)	8(20%)	14(35%)
ZN+Z-score≥-1,00	14(35%)	12(30%)	26(65%)
ogół pacjentów	20(50%)	50(50%)	40(100%)

p=0,7411; OR=0,6429

95% przedział ufności:
0,1735 do 2,382 (wg. Woolf'a)

SNP polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism)
 ZN zespół nerczycowy
 Z-score liczba odchyłeń standardowych masy kostnej pacjenta w odniesieniu do masy kostnej
 równowiekowej grupy kontrolnej odpowiadającej danej płci

Tabela 20. Analiza statystyczna SNP rs556442 genu *LRP5* w grupach badanych

SNP rs556442	warianty genotypowe		
grupa badana	AG	AA	total
ZN+Z-score≤-1,00	6(15%)	8(20%)	14(35%)
ZN+Z-score≥-1,00	13(33%)	13(33%)	26(65%)
ogół pacjentów	19(48%)	21(53%)	40(100%)

p=0,7475; OR=0,7500

95% przedział ufności:
0,2027 do 2,776 (wg. Woolf'a)

SNP polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism)
 ZN zespół nerczycowy
 Z-score liczba odchyłeń standardowych masy kostnej pacjenta w odniesieniu do masy kostnej
 równowiekowej grupy kontrolnej odpowiadającej danej płci

Tabela 21. Analiza statystyczna SNP rs1784235 genu *LRP5* w grupach badanych

SNP rs1784235	warianty genotypowe			
grupa badana	CT	TT	CT/TT	p=0,5024; OR=0,5455
ZN+Z-score≤-1,00	4(10%)	10(25%)	14(35%)	95% przedział ufności:
ZN+Z-score≥-1,00	11(28%)	15(38%)	26(65%)	0,1350 do 2,20 (wg. Woolf'a)
ogół pacjentów	15(38%)	25(63%)	40(100%)	

SNP polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism)
 ZN zespół nerczycowy
 Z-score liczba odchyłeń standardowych masy kostnej pacjenta w odniesieniu do masy kostnej
 równowiekowej grupy kontrolnej odpowiadającej danej płci

Tabela 22. Analiza statystyczna SNP rs2306862 genu *LRP5* w grupach badanych

SNP rs2306862	warianty genotypowe			
grupa badana	CT	CC	CT/CC	p=1,0000; OR=0,8000
ZN+Z-score≤-1,00	4(10%)	10(25%)	14(35%)	95% przedział ufności:
ZN+Z-score≥-1,00	6(15%)	20(50%)	26(65%)	0,200 do 3,200 (wg. Woolf'a)
ogół pacjentów	10(25%)	30(75%)	40(100%)	

SNP polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism)
 ZN zespół nerczycowy
 Z-score liczba odchyłeń standardowych masy kostnej pacjenta w odniesieniu do masy kostnej
 równowiekowej grupy kontrolnej odpowiadającej danej płci

Tabela 23. Analiza statystyczna SNP rs312016 genu *LRP5* w grupach badanych

SNP rs312016	warianty genotypowe		
grupa badana	CT/TT	CC	CT/TT/CC
ZN+Z-score≤-1,00	9(23%)	5(13%)	14(35%)
ZN+Z-score≥-1,00	8(20%)	18(45%)	26(65%)
ogół pacjentów	17(43%)	23(58%)	40(100%)

p=0,0525; OR=4,050
95% przedział ufności:
1,024 do 16,012 (wg. Woolf'a)

SNP polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism)
 ZN zespół nerczycowy
 Z-score liczba odchyień standardowych masy kostnej pacjenta w odniesieniu do masy kostnej
 równowiekowej grupy kontrolnej odpowiadającej danej płci

Tabela 24. Analiza statystyczna SNP rs4988300 genu *LRP5* w grupach badanych

SNP rs4988300	warianty genotypowe		
grupa badana	GT	GG/TT	GT/GG/TT
ZN+Z-score≤-1,00	7(18%)	7(18%)	14(35%)
ZN+Z-score≥-1,00	15(38%)	11(28%)	26(65%)
ogół pacjentów	22(56%)	18(46%)	40(100%)

p=0,7442; OR=0,7333
95% przedział ufności:
0,1988 do 2,705 (wg. Woolf'a)

SNP polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism)
 ZN zespół nerczycowy
 Z-score liczba odchyień standardowych masy kostnej pacjenta w odniesieniu do masy kostnej
 równowiekowej grupy kontrolnej odpowiadającej danej płci

Tabela 25. Analiza statystyczna SNP rs634008 genu *LRP5* w grupach badanych

SNP rs634008	warianty genotypowe		
grupa badana	CT	TT/CC	CT/TT/CC
ZN+Z-score \leq -1,00	7(18%)	7(18%)	14(35%)
ZN+Z-score \geq -1,00	12(30%)	14(35%)	26(65%)
ogół pacjentów	19(48%)	21(53%)	40(100%)

p=1,0000; OR=1,167
95% przedział istotności:
0,3176 do 4,286 (wg. Woolf'a)

SNP polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism)
 ZN zespół nerczycowy
 Z-score liczba odchyłeń standardowych masy kostnej pacjenta w odniesieniu do masy kostnej
 równowiekowej grupy kontrolnej odpowiadającej danej płci

Tabela 26. Analiza statystyczna SNP rs312023 genu *LRP5* w grupach badanych

SNP rs312023	warianty genotypowe		
grupa badana	AG	AA/GG	AG/AA/GG
ZN+Z-score \leq -1,00	7(18%)	7(18%)	14(35%)
ZN+Z-score \geq -1,00	12(30%)	14(35%)	26(65%)
ogół pacjentów	19(48%)	21(53%)	40(100%)

p=1,0000; OR=1,167
95% przedział ufności:
0,3176 do 4,286 (wg. Woolf'a)

SNP polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism)
 ZN zespół nerczycowy
 Z-score liczba odchyłeń standardowych masy kostnej pacjenta w odniesieniu do masy kostnej
 równowiekowej grupy kontrolnej odpowiadającej danej płci

Tabela 27. Analiza statystyczna SNP rs3736228 genu *LRP5* w grupie badanej z zespołem nerczycowym i obniżoną gęstością mineralną kości oraz w grupie kontrolnej

SNP rs3736228	warianty genotypowe			
Pacjenci	CT	CC	CT/CC	p=1,0000; OR=1,105
ZN+Z-score≤-1,00	3(3%)	11(10%)	14(12%)	95% przedział ufności:
grupa kontrolna	20(17%)	81(70%)	101(88%)	0,2814 do 4,336 (wg. Woolf'a)
ogół pacjentów	23(20%)	92(80%)	115(100%)	

SNP polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism)
 ZN zespół nerczycowy
 Z-score liczba odchyłeń standardowych masy kostnej pacjenta w odniesieniu do masy kostnej
 równowiekowej grupy kontrolnej odpowiadającej danej płci

Tabela 28. Analiza statystyczna SNP rs491347 genu *LRP5* w grupie badanej z zespołem nerczycowym i obniżoną gęstością mineralną kości oraz w grupie kontrolnej

SNP rs491347	warianty genotypowe			
pacjenci	AG	AA/GG	AG/AA/GG	p=0,7696; OR=0,7543
N+Z-score≤-1,00	4(3%)	10(9%)	14(12%)	95% przedział ufności:
grupa kontrolna	35(30%)	66(57%)	101(88%)	0,2204 do 2,2581 (wg. Woolf'a)
ogół pacjentów	39(34%)	77(66%)	115(100%)	

SNP polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism)
 ZN zespół nerczycowy
 Z-score liczba odchyłeń standardowych masy kostnej pacjenta w odniesieniu do masy kostnej
 równowiekowej grupy kontrolnej odpowiadającej danej płci

Tabela 29. Analiza statystyczna SNP rs312009 genu *LRP5* w grupie badanej z zespołem nerczycowym i obniżoną gęstością mineralną kości oraz w grupie kontrolnej

SNP rs312009	warianty genotypowe			
pacjenci	CT	TT/CC	CT/TT/CC	p=0,7680; OR=1,354
ZN+Z-score≤-1,00	6(5%)	8(7%)	14(12%)	95% przedział ufności:
grupa kontrolna	36(31%)	65(57%)	101(88%)	0,4355 do 4,211 (wg. Woolf'a)
ogół pacjentów	42(37%)	73(63%)	115(100%)	

SNP polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism)
 ZN zespół nerczycowy
 Z-score liczba odchyłeń standardowych masy kostnej pacjenta w odniesieniu do masy kostnej
 równowiekowej grupy kontrolnej odpowiadającej danej płci

Tabela 30. Analiza statystyczna SNP rs556442 genu *LRP5* w grupie badanej z zespołem nerczycowym i obniżoną gęstością mineralną kości oraz w grupie kontrolnej

SNP rs556442	warianty genotypowe			
pacjenci	AG	AA	AG/AA	p=0,7728; OR=1,243
ZN+Z-score≤-1,00	6(5%)	8(7%)	14(12%)	95% przedział ufności:
grupa kontrolna	38(33%)	63(55%)	101(88%)	0,4006 do 3,860 (wg. Woolf'a)
ogół pacjentów	44(38%)	71(62%)	115(100%)	

SNP polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism)
 ZN zespół nerczycowy
 Z-score liczba odchyłeń standardowych masy kostnej pacjenta w odniesieniu do masy kostnej
 równowiekowej grupy kontrolnej odpowiadającej danej płci

Tabela 31. Analiza statystyczna SNP rs1784235 genu *LRP5* w grupie badanej z zespołem nerczycowym i obniżoną gęstością mineralną kości oraz w grupie kontrolnej

SNP rs1784235	warianty genotypowe			
pacjenci	CT	TT/CC	CT/TT/CC	p=0,7678; OR=0,7222
ZN+Z-score≤-1,00	43(4%)	10(9%)	14(12%)	95% przedział ufności:
grupa kontrolna	36(31%)	65(57%)	101(88%)	0,2113 do 2,469 (wg. Woolf'a)
ogół pacjentów	40(35%)	75(65%)	115(100%)	

SNP polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism)
 ZN zespół nerczycowy
 Z-score liczba odchyłeń standardowych masy kostnej pacjenta w odniesieniu do masy kostnej
 równowiekowej grupy kontrolnej odpowiadającej danej płci

Tabela 32. Analiza statystyczna SNP rs2306862 genu *LRP5* w grupie badanej z zespołem nerczycowym i obniżoną gęstością mineralną kości oraz w grupie kontrolnej

SNP rs2306862	warianty genotypowe			
pacjenci	CT	CC	CT/CC	p=0,7489; OR=1,216
ZN+Z-score≤-1,00	4(3%)	10(9%)	14(12%)	95% przedział ufności:
grupa kontrolna	25(22%)	76(66%)	101(88%)	0,3502 do 4,222 (wg. Woolf'a)
ogół pacjentów	29(25%)	86(75%)	115(100%)	

SNP polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism)
 ZN zespół nerczycowy
 Z-score liczba odchyłeń standardowych masy kostnej pacjenta w odniesieniu do masy kostnej
 równowiekowej grupy kontrolnej odpowiadającej danej płci

Tabela 33. Analiza statystyczna SNP rs312016 genu *LRP5* w grupie badanej z zespołem nerczycowym i obniżoną gęstością mineralną kości oraz w grupie kontrolnej

SNP rs312016	warianty genotypowe			
pacjenci	CT/ TT	CC	CT/TT/CC	p=0,2529; OR=2,240
ZN+Z-score≤-1,00	9(8%)	5(4%)	14(12%)	95% przedział ufności:
grupa kontrolna	45(39%)	56(49%)	101(88%)	0,7010 do 7,158 (wg. Woolf'a)
ogół pacjentów	54 (47%)	61(53%)	115(100%)	

SNP polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism)
 ZN zespół nerczycowy
 Z-score liczba odchyłeń standardowych masy kostnej pacjenta w odniesieniu do masy kostnej
 równowiekowej grupy kontrolnej odpowiadającej danej płci

Tabela 34. Analiza statystyczna SNP rs4988300 genu *LRP5* w grupie badanej z zespołem nerczycowym i obniżoną gęstością mineralną kości oraz w grupie kontrolnej

SNP rs4988300	warianty genotypowe			
pacjenci	GT	GG,/TT	GT/GG/TT	p=0,5761; OR=1,405
ZN+Z-score≤-1,00	7(6%)	7(6%)	14(12%)	95% przedział ufności: 0,4583 do
grupa kontrolna	42(37%)	59(51%)	101(88%)	4,306 (wg. Woolf'a)
ogół pacjentów	49(43%)	66(57%)	115(100%)	

SNP polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism)
 ZN zespół nerczycowy
 Z-score liczba odchyłeń standardowych masy kostnej pacjenta w odniesieniu do masy kostnej
 równowiekowej grupy kontrolnej odpowiadającej danej płci

Tabela 35. Analiza statystyczna SNP rs634008 genu *LRP5* w grupie badanej z zespołem nerczycowym i obniżoną gęstością mineralną kości oraz w grupie kontrolnej

SNP rs634008	warianty genotypowe			
pacjenci	CT	TT/CC	CT/TT/CC	p=0,7819; OR=1,196
ZN+Z-score≤-1,00	7(6%)	7(6%)	14(12%)	95% przedział ufności:
grupa kontrolna	46(40%)	55(48%)	101(88%)	0,3906 do 3,660 (wg. Woolf'a)
ogół pacjentów	53(46%)	62(54%)	115(100%)	

SNP polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism)
 ZN zespół nerczycowy
 Z-score liczba odchyłeń standardowych masy kostnej pacjenta w odniesieniu do masy kostnej
 równowiekowej grupy kontrolnej odpowiadającej danej płci

Tabela 36. Analiza statystyczna SNP rs312023 genu *LRP5* w grupie badanej z zespołem nerczycowym i obniżoną gęstością mineralną kości oraz w grupie kontrolnej

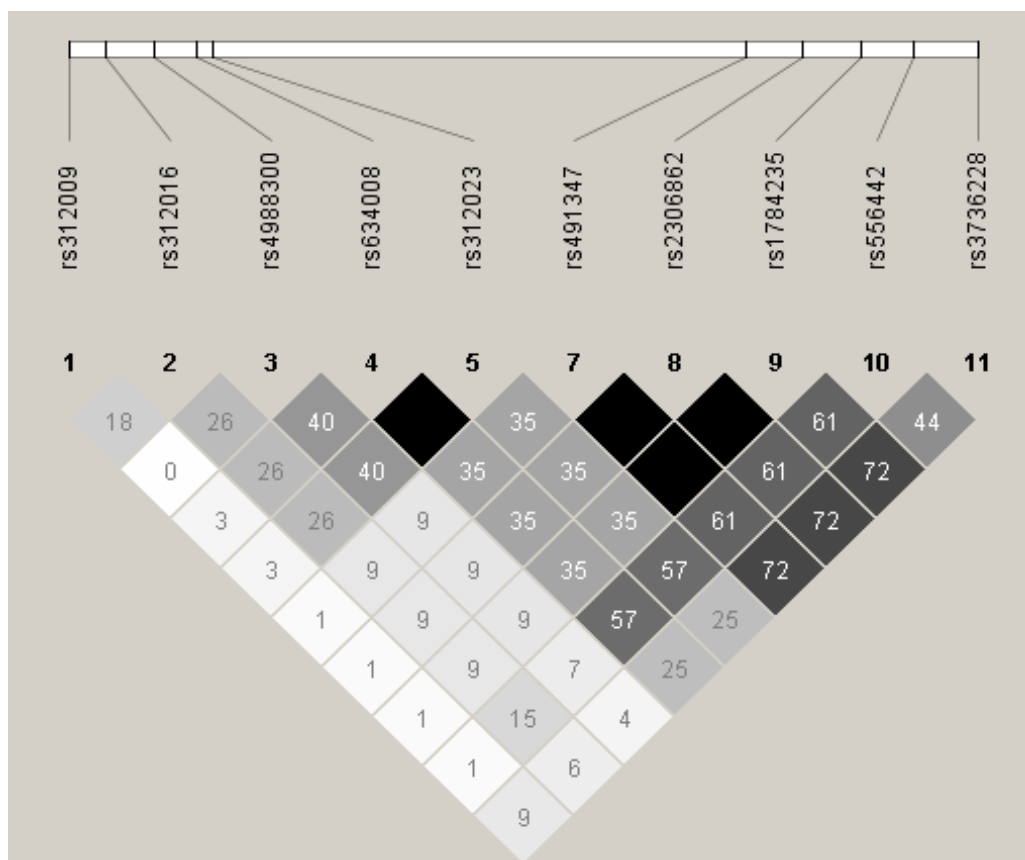
SNP rs312023	warianty genotypowe			
Pacjenci	AG	AA/GG	AG/AA/GG	p=0,7819; OR=1,196
ZN+Z-score≤-1,00	7(6%)	7(6%)	14(12%)	95% przedział ufności:
grupa kontrolna	46(40%)	55(48%)	101(88%)	0,3906 do 3,660 (wg. Woolf'a)
ogół pacjentów	53(46%)	62(54%)	115(100%)	

SNP polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism)
 ZN zespół nerczycowy
 Z-score liczba odchyłeń standardowych masy kostnej pacjenta w odniesieniu do masy kostnej
 równowiekowej grupy kontrolnej odpowiadającej danej płci

4.3. Analiza niezrównoważenia sprzężeń na podstawie bloków haplotypowych

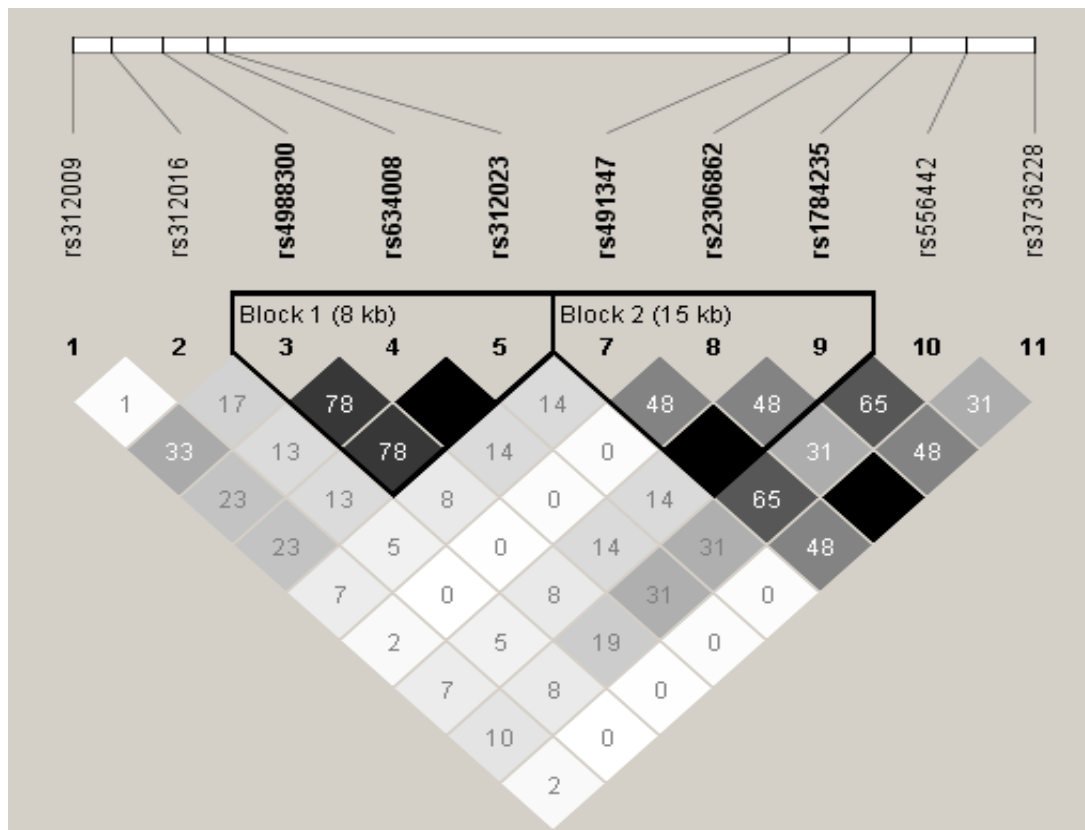
Oceny niezrównoważenia sprzężeń dokonano w oparciu o program Haploview i algorytm Gabriel, na podstawie oznaczonych genotypów, na bazie których obliczono wartość R^2 [95-98]. Analiza porównawcza haplotypów wskazuje, że w grupie pacjentów z zespołem nerczycowym i obniżoną gęstością mineralną kości SNP rs491347, rs2306862, rs1784235 są całkowicie sprzężone, czego nie obserwowano w grupie pacjentów z zespołem nerczycowym i prawidłową gęstością mineralną kości oraz w grupie kontrolnej. Dodatkowo w grupie dzieci z zespołem nerczycowym i wartością $Z\text{-score} \leq -1,00$, w odróżnieniu od dwóch pozostałych grup pacjentów, każdy z powyższych trzech SNP jest sprzężony na tym samym poziomie istotności ($R^2=72$) z SNP rs3736228.

Rycina 2 Niezrównoważenie sprzężeń w genie *LRP5* dla pacjentów z zespołem nerczycowym i obniżoną gęstością mineralną kości, w oparciu o algorytm Gabriel.



W grupie dzieci z zespołem nerczycowym i prawidłowym wynikiem badania densytometrycznego kości stwierdzono obecność bloku haplotypowego pomiędzy SNP rs4988300, rs634008 i rs312023, którego obecności nie stwierdzono w grupie pacjentów z obniżoną gęstością mineralną kości, ze względu na dwukrotnie słabsze sprzężenie pomiędzy SNP rs4988300 i rs634008.

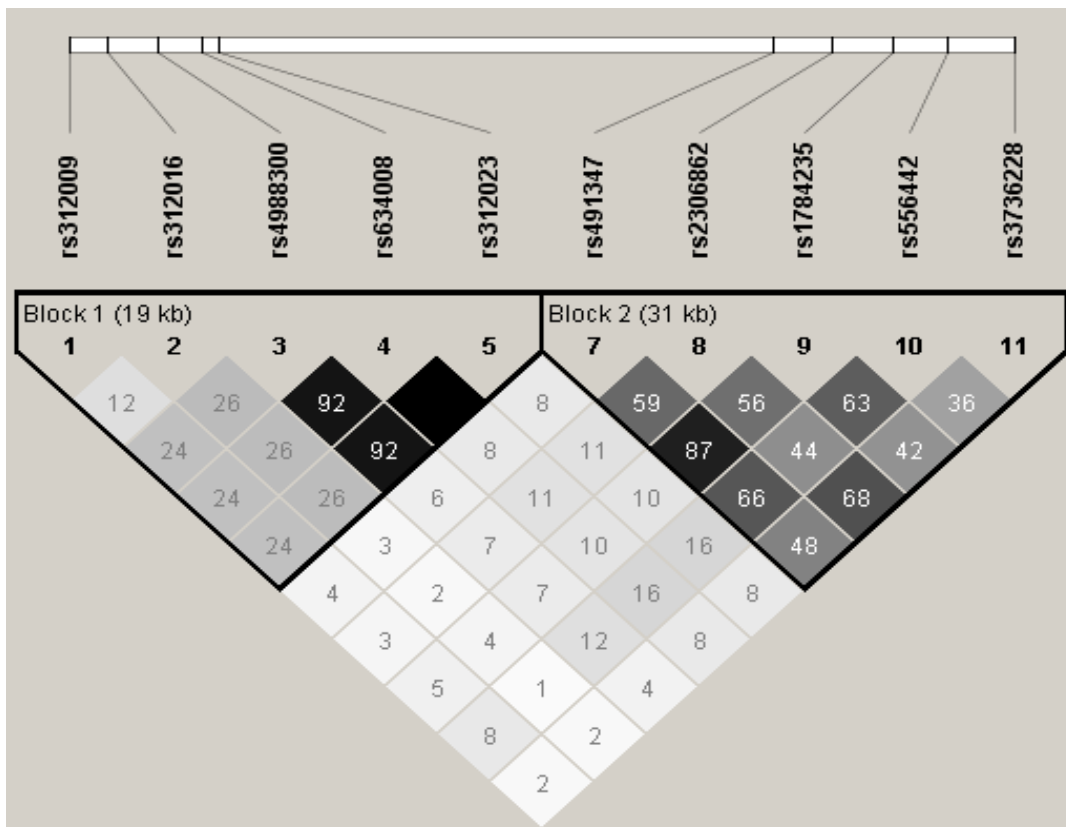
Rycina 3 Niezrównoważenie sprzężeń w genie *LRP5* dla pacjentów z zespołem nerczycowym i prawidłową gęstością mineralną kości, w oparciu o algorytm Gabriel.



Analiza porównawcza ocenianych dwóch grup badanych w odniesieniu do grupy kontrolnej, wskazuje na znacznie większe podobieństwo struktury genu *LRP5* w zakresie badanych polimorfizmów pomiędzy grupą dzieci z zespołem nerczycowym i prawidłową strukturą kostną i grupą kontrolną dzieci zdrowych, niż w przypadku dzieci z zespołem nerczycowym i obniżoną gęstością mineralną kości. Różnice w częstości występowania bloków haplotypowych wykazano również w przypadku porównania struktury genu *LRP5* pomiędzy dziećmi z IZN i nieprawidłową wartością Z-score, a grupą dzieci z zespołem

nerczycowym i prawidłową wartością Z-score oraz dziećmi zdrowymi z grupy kontrolnej, stanowiących wspólnie grupę odniesienia. W przypadku takiej korelacji haplotyp CGCG w pierwszym bloku występował istotnie częściej u pacjentów w grupie odniesienia w stosunku do dzieci z białkomoczem nerczycowym i nieprawidłowym obrazem densytometrycznym kości.

Rycina 4 Niezrównoważenie sprzężeń w genie *LRP5* dla pacjentów z grupy kontrolnej, w oparciu o algorytm Gabriel.



5. Omówienie wyników i dyskusja

O zmienności ludzkiego genomu w około 80% przypadków decydują polimorfizmy pojedynczego nukleotydu, stanowiące efekt mutacji, selektywnie utrwalonych w danej populacji, z którą pozostają w ścisłym związku w zakresie częstości występowania określonych alleli. Identyfikacja genotypów i haplotypów, powiązanych z określonymi chorobami, pozwala na wyselekcjonowanie SNP, zarówno pełniących istotną rolę ochronną, jak i sprzyjającą zapadalności na poszczególne schorzenia, w tym zaburzenia metabolizmu kostnego [93]. W grupie pacjentów obarczonych predyspozycją genetyczną do rozwoju zmian osteoporotycznych, wystąpienie dodatkowego, środowiskowego czynnika spustowego, takiego jak podaż glikokortykosteroidów, może stanowić punkt wyjścia dla spadku gęstości mineralnej kości i początek niekorzystnej przebudowy jej mikrostruktury.

Współczesna wiedza medyczna pozwala stwierdzić, że jednym z najistotniejszych czynników odpowiedzialnych za indukcję procesu zapalnego, obejmującego miąższ nerek i uszkodzenie ich struktury, skutkujące progresją przewlekłej choroby nerek, jest obecność białkomoczu [167]. W przypadku pacjentów pediatrycznych do wystąpienia białkomoczu najczęściej dochodzi w przebiegu idiopatycznego zespołu nerczycowego. Podstawę leczenia immunosupresyjnego idiopatycznego zespołu nerczycowego, zgodnie z wytycznymi Międzynarodowej Federacji ds. Leczenia Chorób Nerek u Dzieci, stanowią glikokortykosteroidy, na które to leczenie według aktualnych doniesień odpowiada aż ok. 90% pacjentów w wieku poniżej 18 roku życia z IZN [146]. Długotrwała terapia glikokortykosteroidami w standardowej dawce tj. 2mg prednizonu/kg mc./24h może jednak powodować istotne ryzyko rozwoju osteoporozy [168]. Szacuje się, że wśród pacjentów leczonych w okresie co najmniej 3 miesięcy steroidami w dawce minimalnej, odpowiadającej 7,5 mg prednizonu lub 1,875 µg budesonidu dziennie u ok. 30-50% z nich dochodzi do obniżenia gęstości mineralnej kości w zakresie do 15% rocznie, a u co trzeciego do wystąpienia, często początkowo bezobjawowych,iskoenergetycznych złamań kości [169,170]. Zmiany te, szczególnie w populacji osób młodych, obserwowane są w pierwszej kolejności w odcinku lędźwiowym kręgosłupa. W objętej powyższym badaniem 40-osobowej grupie dzieci z IZN leczonych prednizonem w standardowej dawce, zredukowanej stopniowo w okresie 6 miesięcy, tylko u 35% doszło do spadku gęstości mineralnej kości, podczas gdy u pozostałych 65% pacjentów w wieku przedpokwitaniowym wartość Z-score w kontroli

densytometrycznej w odcinku lędźwiowym kręgosłupa wynosiła $> -1,00$, co jest zbliżone do danych szacunkowych z doniesień literaturowych. Obserwowane niekorzystne zmiany w mikroarchitekturze kości, zgodnie z przewidywaniami, w grupie badanej dotyczyły wyłącznie odcinka lędźwiowego kręgosłupa, przy prawidłowej wartości BMD w badaniu całego szkieletu.

Mechanizm działania steroidów jest złożony i obejmuje hamowanie replikacji i powstawania osteoblastów oraz ich zdolności przylegania do macierzy kostnej z równoczesnym wzbudzeniem apoptozy komórek linii osteoblastycznej. Na poziomie komórkowym glikokortykosteroidy powodują także zmniejszenie produkcji kolagenu typu I i zmniejszenie aktywności czynników wzrostowych takich jak IGF-1,2; Il-1 czy TGF-beta, a także prostaglandyny E i osteokalcyny [171]. Wyrazem pośredniego, endokrynnego oddziaływania steroidów na kość jest hamowanie wydzielania luteiny (LH), androgenów nadnerczowych, a także estrogenów i testosteronu produkowanych w gonadach oraz obniżenie pod ich wpływem jelitowej resorpcji wapnia i fosforanów z równoczesnym nasilaniem hiperkalciurii i wtórną nadczynnością przytarczyc [172]. Jednak pomimo doniesień, jednoznacznie sugerujących niekorzystny wpływ glikokortykosteroidów na zwiększenie obrotu kostnego, na podstawie danych z piśmiennictwa i obserwacji własnych wynika, iż tylko u części pacjentów leczonych GKS w wieku przedpokwitaniowym, dochodzi do rozwoju niepożądanych zmian kostnych. W przybliżeniu u około dwóch trzecich dzieci leczonych kortykosteroidami nie stwierdza się istotnego obniżenia wartości BMD w badaniu densytometrycznym, co nasuwa uzasadnione pytanie o istnienie innego, niezależnego od czynników środowiskowych i nie podlegającego modyfikacji, molekularnego podłoża zmian kostnych.

Przeprowadzona analiza miała na celu ocenę dwunastu polimorfizmów genu *LRP5* jako potencjalnego podłoża molekularnego niekorzystnej przebudowy kostnej i rozwoju ryzyka złamania niskoenergetycznego kości u dzieci z Wielkopolski, w wieku przedpokwitaniowym, leczonych glikokortykosteroidami z powodu idiopatycznego zespołu nerczycowego oraz znalezienie powiązania zmian na poziomie DNA, w tym niezrównoważenia sprzężeń wybranych SNP z ryzykiem obniżenia wartości BMD ocenianej w badaniu densytometrycznym [173].

Punktem wyjścia dla każdej dyskusji, dotyczącej wiarygodności prezentowanych wyników przeprowadzonych badań molekularnych jest odpowiedni dobór homogennej grupy pacjentów. Blisko trzy-letni okres obserwacji pozwolił na wyselekcjonowanie stosunkowo licznej jak dla populacji dziecięcej, bo liczącej 40 osób, grupy badanej, obejmującej dzieci obojga płci, w wieku od 5 do 12 lat z idiopatycznym zespołem nerczycowym. Wszyscy pacjenci byli przedstawicielami rasy kaukaskiej i pochodzili z obszaru obejmującego w przybliżeniu ok. 29 826 km² zamieszkanego przez 3455477 mieszkańców, co nie jest bez znaczenia w przypadku próby oceny częstości występowania określonych zmienności sekwencji DNA na poziomie zamiany pojedynczego nukleotydu [174]. Wiadomo bowiem, że kosegregacja, czyli współdziedziczenie SNP w postaci sprzężonych ze sobą alleli, jest często cechą charakterystyczną dla danej populacji i mającą kluczowe znaczenie dla podatności na określone schorzenie [94].

Na podstawie badań prowadzonych w populacji dzieci polskich, przyjęto, że do ok. 11r.ż. tempo przyrostu BMC i BMD w grupie dziewcząt i chłopców jest podobne i przebiega liniowo, natomiast skokowy przyrost masy kostnej, związany ze skokiem pokwitaniowym, następuje u dziewczynek między 11 a 14 r.ż., a u chłopców pomiędzy 13 a 15 r.ż. [175]. Przed okresem pokwitania roczna kumulacja minerału w kości wynosi ok. 3-4% i gwałtownie wzrasta ok. 2,5-krotnie w pierwszych latach dojrzewania w obrębie szkieletu osiowego, podczas gdy zmiany w szkielecie obwodowym zachodzą znacznie wolniej. Wynika to z faktu, iż szkielet osiowy jest w tym okresie w większym stopniu podatny na działanie hormonów płciowych niż hormonu wzrostu. Mając na uwadze powyższe dane, za górną granicę wieku pacjentów w grupie badanej przyjęto 12 rok życia, z uwzględnieniem indywidualnego toku wzrastania poszczególnych pacjentów śledzonego przy pomocy siatek centylowych OLAF [160]. Wyznaczenie górnej granicy wieku dla grupy badanej uwzględniało również stopień zaawansowania dojrzewania płciowego, ocenianego na podstawie skali Tannera, co usprawiedliwia pominięcie w bieżącej analizie problemu wpływu androgenów i estrogenów na metabolizm kostny i pozwoliło na wspólną ocenę pacjentów obojga płci.

Wywiad zebrany od rodziców chorych dzieci, przeprowadzone badanie przedmiotowe i badania laboratoryjne, stanowiły podstawę dla wykluczenia w grupie badanej z obniżoną gęstością mineralną kości innych, niż długotrwała podaż glikokortykosteroidów, przyczyn osteoporozy wtórnej takich jak zapalne układowe choroby

reumatyczne, swoiste i nieswoiste zapalenia stawów i kości, wady wrodzone i zwyrodnienia narządu ruchu, zespoły złego wchłaniania, choroba trzewna, niewydolność/marskość wątroby, niewydolność zewnątrzwydzielnicza trzustki, jadłowstręt psychiczny, stany niedożywienia, pierwotna nadczynność przytarczyc, nadczynność tarczycy, przewlekłe unieruchomienie, stan po urazach narządu ruchu, przewlekła niewydolność nerek (stadium III-V), zespoły porażenne, stwardnienie rozsiane, choroby zwyrodnieniowe ośrodkowego układu nerwowego oraz choroby nowotworowe [176]. Schorzenia predysponujące do zmian metabolizmu kostnego obserwowano w prawdzie w grupie badanej, ale w populacji dzieci o prawidłowym wyniku badania densytometrycznego kości. W grupie tej odnotowano jeden przypadek zapalenia tarczycy Hashimoto, jeden przypadek cukrzycy typu I-ego i dwa przypadki choroby Leśniowskiego-Crohna. Schorzeń tych nie stwierdzono w grupie dzieci z obniżoną gęstością mineralną kości z wyjątkiem dziewczynki z zapaleniem tarczycy Hashimoto, rozpoznanym na kilka lat przed wystąpieniem IZN, znajdującej się w eutyreozy w chwili włączenia glikokortykosteroidów.

Status tkanki kostnej i potencjalne ryzyko złamania niskoenergetycznego oceniano w kontekście zmian klinicznych na podstawie badania densytometrycznego całego szkieletu i odcinka lędźwiowego kręgosłupa L2-L4 metodą DEXA zgodnie ze stanowiskiem Polskiego Towarzystwa Osteoartrologii i Wielodyscyplinarnego Forum Osteoporotycznego w sprawie standardów diagnostyki i leczenia osteoporozy w Polsce [177]. Stanowisko to pozostaje zgodne z opinią National Osteoporosis Foundation i National Institutes of Health (USA) oraz National Osteoporosis Society (UK), które w swoich zaleceniach wskazują na kluczowe znaczenie oceny densytometrycznej gęstości mineralnej kości w odcinku lędźwiowym kręgosłupa i sugerują oparcie decyzji terapeutycznej na wartości wskaźnika Z w przypadku najmłodszych pacjentów bez zmian zwyrodnieniowych. W prezentowanej pracy zgodnie z zaleceniami WHO i International Society for Clinical Densitometry (ISCD) za kluczowe miejsce pomiaru uznano odcinek lędźwiowy kręgosłupa, a rozpoznanie osteoporozy oparto na najniższym wyniku pomiaru. W ocenie densytometrycznej kręgosłupa oprócz odcinka L2-L4, brano również pod uwagę pomiar w odcinku L1-L4, zalecany przez część autorów, ze względu na częstsze statystycznie występowanie złamań w obrębie kręgu L1. W przypadku grupy badanej u jednego z pacjentów z wartością wskaźnika Z L2-L4 równą -1,57 stwierdzono złamanie kompresyjne kręgosłupa w odcinku L3-L4. Drugi przypadek złamania odnotowano w

grupie badanej u pacjenta z wartością wskaźnika Z L2-L4 równą -1,41. Przypadek ten dotyczył kości nadgarstka, która to lokalizacja jest trzecią, co do częstości występowania złamań niskoenergetycznych w populacji europejskiej.

Parametry techniczne aparatu Lunar DPX stanowiły wyznacznik dolnej granicy wiekowej grupy badanej, stanowiącej 5 rok życia. Obecność oprogramowania przeznaczonego do pomiarów w grupie pacjentów pediatrycznych pozwoliła na uzyskanie możliwie wiarygodnych wyników, ale z uwzględnieniem wszystkich trudności interpretacyjnych, wynikających z wieku pacjentów i odmienności antropometrycznych pomiędzy nimi. Stąd też oprócz oceny masy kostnej pacjentów w odniesieniu do masy kostnej równowiekowej grupy kontrolnej odpowiadającej danej płci, czyli w oparciu o wskaźnik Z-score, posłużono się normami ciągłymi opracowanymi dla populacji dzieci warszawskich, co miało na celu trafniejszą kwalifikację pacjentów z pogranicza grup referencyjnych [158]. Odniesienie gęstości mineralnej kości do norm ciągłych, zamiast do norm skategoryzowanych wyników badań densytometrycznych, według interpretacji Jaworskiego i Płudowskiego, pozwoliło na weryfikację przynależności poszczególnych pacjentów do grup badanych w zależności od wartości skorygowanego wskaźnika Z dla odcinka L2-L4 kręgosłupa. W przypadku dwóch pacjentów taka interpretacja wyników badania densytometrycznego zdecydowała o zakwalifikowaniu ich do grupy o prawidłowych parametrach kostnych, podczas gdy pierwotna wartość Z-score wskazana przez densytmeter sugerowała u nich możliwość wystąpienia osteopenii. U jednej pacjentki posłużenie się normami ciągłymi zaowocowało przesunięciem jej do grupy wysokiego ryzyka złamania niskoenergetycznego, na co nie wskazywał pierwotny wynik badania DEXA. Przykłady te potwierdzają konieczność odnoszenia wyników badań do wartości referencyjnych i płynnego obliczania wartości wskaźnika Z, także na granicach przedziałów danych, w grupie pacjentów w okresie wzrostu i rozwoju, z wykorzystaniem norm ciągłych, celem uniknięcia nieprawidłowych decyzji terapeutycznych.

Technika absorpcjometrii dwóch promieni X (DEXA) umożliwia pomiar zawartości minerału w kości (BMC) oraz powierzchni kości (BA), na podstawie których oblicza wartość BMD jako stosunek BMC/BA. Ponieważ mamy do czynienia nie z obrazem trójwymiarowym, ale z dwuwymiarowym, który nie uwzględnia wielkości pacjenta, metoda ta nie ocenia rzeczywistej całkowitej wartości BMD, ale wyłącznie powierzchniową gęstość mineralną

kości, co powoduje, że u pacjentów niskorosłych, w tym u dzieci, może dochodzić do przekłamań w ocenie wyników z tendencją do niedoszacowania wartości BMD u najmłodszych pacjentów. W tej sytuacji cennym uzupełnieniem pozostają ilościowe metody ultradźwiękowe (QUS) i obwodowa tomografia komputerowa (QCT), pozwalające ocenić strukturę i właściwości mechaniczne kości [178]. Wobec braku możliwości wykonania pomiaru trójwymiarowego, podjęto próbę wyliczenia w oparciu o formułę matematyczną wartości wolumetrycznej gęstości mineralnej kości (BMAD), wyrażonej w g/cm³, dla odcinka lędźwiowego kręgosłupa [155,163].

W grupie badanej za punkt krytyczny obecności osteopenii przyjęto obniżenie masy kostnej powyżej jednego odchylenia standardowego, a w przypadku osteoporozy powyżej dwóch odchylen standardowych w odniesieniu do równowiekowej grupy kontrolnej. Zmiany te obserwowano tylko u 14 z 40 badanych z idiopatycznym zespołem nerczycowym leczonych glikokortykosteroidami w dawce 2mg/kg mc./24h przez okres 3 miesięcy. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstości występowania zmian o charakterze osteopenii czy osteoporozy pomiędzy pacjentami z grupy badanej w zależności od rozpoznania histopatologicznego kłębuszkowego zapalenia nerek ($p=0,21$). Nie wykazano również, aby w okresie pierwszych 6 miesięcy obserwacji od momentu włączenia GKS istniała znamienna statystycznie różnica pomiędzy pacjentami ze steroidoopornością, a streoidozależnością, w zakresie częstości występowania obniżonej gęstości mineralnej kości ($p=0,09$).

Dotychczasowe badania w populacji osób dorosłych wskazują, że niezależnie od parametrów antropometrycznych, zmienność międzyosobnicza w zakresie szczytowej masy kostnej w ok. 80% jest uwarunkowana genetycznie [179]. Nasuwa się pytanie czy zatem również w okresie wzrastania różnice w zakresie wyjściowej wartości gęstości mineralnej kości i stopień odpowiedzi na czynniki ryzyka, takie jak glikokortykosteroidy, w postaci zaburzeń metabolizmu kostnego, mają podłoże genetyczne? Jeśli tak, to czy pełni ono zasadniczą rolę w kształtowaniu mikroarchitektury kości niezależnie od teorii mechanostatu Frosta [180]? W niniejszej pracy podjęto próbę odpowiedzi na pytanie czy u pacjentów w wieku przedpokwitaniowym leczonych GKS istnieje zależność pomiędzy częstością występowania i nie zrównoważeniem sprzężeń w blokach haplotypowych wybranych SNP

genu *LRP5*, a ryzykiem obniżenia wartości BMD i co za tym idzie ryzykiem złamania niskoenergetycznego.

Przebłonowa lipoproteina LRP5 odgrywa kluczową rolę w proliferacji, różnicowaniu, adhezji i migracji wielu komórek ustroju, w tym osteoblastów oraz rozwoju szkieletu, poprzez transdukcję sygnału szeregu białkowego Wnt z otoczenia do wnętrza komórki, jako koreceptor dla białek z rodziny Frizzled [181]. Zainteresowanie białkiem LRP5 w kontekście zmian metabolizmu kostnego związane było z wielośrodkowymi badaniami takimi jak GWASs FHS100K, Icelandic deCODE czy UK-NL, których wyniki sugerowały, że część powszechnie występujących polimorfizmów genu *LRP5* może znacząco wpływać na gęstość mineralną kości [182, 183].

Obecność pojedynczych polimorfizmów nie musi świadczyć o zwiększonym lub zmniejszonym ryzyku rozwoju choroby, ale analiza zależności pomiędzy poszczególnymi SNP i ich współwystępowanie w określonych zespołach może decydować o skłonności do zachorowania. SNP stanowią efekt mutacji, a ich skłonność do współdziedziczenia określana mianem niezrównoważenia sprzężeń ma charakter selektywnie utrwalony w danej populacji, z którą pozostają w ścisłym związku w zakresie częstości występowania określonych alleli [94]. Aby wykazać różnice w sposobie dziedziczenia wybranych SNP pomiędzy pacjentami z grupy badanej z obniżoną wartością BMD, a pacjentami z grupy odniesienia o prawidłowym wyniku badania densytometrycznego kości, przeprowadzono analizę, obejmującą dużą, bo liczącą 141 pacjentów, populację dzieci.

Oceniono 12 wybranych SNP genu *LRP5*: rs3736228, rs491347, rs312009, rs556442, rs1784235, rs41494349, rs2306862, rs3736229, rs312016, rs4988300, rs634008 oraz rs312023. W doniesieniach literaturowych, dotyczących w większości populacji osób dorosłych, głównie kobiet rasy kaukaskiej oraz w licznych pracach, pochodzących z Chin i Japonii, wśród polimorfizmów genu *LRP5*, wiązanych z ryzykiem rozwoju niekorzystnych zmian kostnych, jednym z najczęściej opisywanych był SNP rs3736228 (Ala1330Val). W 2008r. na łamach The Journal of the American Medical Association opublikowano wyniki wielośrodkowej analizy dotyczącej korelacji pomiędzy zmiennościami w zakresie genów *LRP5* i *LRP6*, a ryzykiem rozwoju osteoporozy. Badanie prowadzone w 18 ośrodkach w Europie i Ameryce Północnej, w tym w Polsce, objęło 37534 osoby. Na jego podstawie

stwierdzono, że obecność wariantu Val1330 stanowi czynnik ryzyka złamania patologicznego kręgow, które udokumentowano u 1988 z 20096 pacjentów, posiadających SNP rs3736228 [184]. W tym samym roku w czasopiśmie The Lancet opublikowano wielośrodową pracę, w której u 2094 dorosłych kobiet przebadano 314075 SNP, związanych z różnymi genami, podejrzanymi o potencjalny udział w rozwoju osteoporozy. Wpływ na obniżenie gęstości mineralnej kości potwierdzono tylko w przypadku dwóch SNP rs4355801 genu osteoprotegeryny i rs3736228 genu *LRP5* [185]. Jest to zgodne z doniesieniami Funakoshi i wsp. z 2011r., gdzie na podstawie badania densytometrycznego ponad 800 dorosłych mężczyzn, stwierdzono znamienne niższą średnią wartość BMD w odcinku dystalnym kości promieniowej u osób z polimorfizmem rs3736228 (Val;Val), niezależnie od stanu odżywienia pacjentów, w stosunku do osób z genotypem CC (Ala;Ala) [186]. Część autorów pisze nie tylko o związanej z zamianą aminokwasów predyspozycji do wystąpienia jednostki chorobowej, jaką jest osteoporoza u osób z polimorfizmem Ala1330Val, ale też o istotnych modyfikacjach w zakresie ścieżki sygnałowej Wnt pod wpływem zmienionego produktu białkowego genu *LRP5* [187;188]. W odróżnieniu od doniesień w piśmiennictwie, w prezentowanej pracy nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstości występowania SNP rs3736228 pomiędzy grupą badaną dzieci z obniżoną gęstością mineralną kości, a grupą pacjentów o prawidłowych wynikach pomiaru densytometrycznego kości leczonych glikokortykosteroidami ($p= 1,0000$; $OR=0,9091$). Nie ujawniono również istotnej statystycznie różnicy pomiędzy dziećmi z Z-score $< -1,00$, a zdrowymi pacjentami z grupy kontrolnej ($p= 1,0000$; $OR= 1,105$), pomimo iż w obu przypadkach zastosowano test bezpośredni Fishera dedykowany małym grupom pacjentów. Nie uwidoczono również znamienych statystycznie różnic pomiędzy obojgiem płci w trakcie porównywania częstości występowania poszczególnych wariantów SNP rs3736228. Wobec tak licznych doniesień literaturowych, brak przełożenia obniżonej gęstości mineralnej kości na zwiększoną częstość występowania wariantu (Val;Val) można tłumaczyć stosunkowo małą liczebnością grupy dzieci z idiopatycznym zespołem nerczycowym i wartością wskaźnika Z $< -1,00$ oraz wiekiem pacjentów. Brak istotności statystycznej różnicy w częstości występowania polimorfizmu rs3736228, a rozwojem niekorzystnej przebudowy kostnej w grupie badanej może wskazywać, że omawiany SNP ma znaczenie przede wszystkim jako predyktor rozwoju osteoporozy w grupie pacjentów dorosłych i nie wpływa na obraz densytometryczny kości przed osiągnięciem szczytowej masy kostnej. Dalszego wyjaśnienia wymaga również

nasuwająca się hipoteza, że rs3736228 genu *LRP5* stanowić może podłoże molekularne dla obniżenia gęstości mineralnej kości, ale związanej ze zmianami na poziomie osi estrogenowo-androgenowej, co nie ma bezpośredniego przełożenia na stan szkieletu osiowego u dzieci poniżej 12 roku życia. Potwierdzeniem tego mogą być doniesienia Paternoster i wsp. z 2010r., w których wskazuje się na rolę rs3736228 *LRP5* w rozwoju osteoporozy w grupie pacjentów młodocianych, ale ze średnią wieku dla obojga płci równą 15,5 lat, a więc znacznie starszych niż w przypadku prezentowanej pracy [189].

Przeprowadzona analiza otrzymanych wyników wskazuje natomiast na istnienie różnicy w częstości występowania wariantów SNP rs312016 genu *LRP5* (CC/CT/TT) na granicy istotności statystycznej, nie uwzględnionego w powyższych badaniach, pomiędzy pacjentami z zespołem nerczycowym i obniżoną gęstością mineralną kości, a pacjentami z zespołem nerczycowym i prawidłowym wynikiem badania densytometrycznego. Otrzymana dla tej korelacji wartość p wyniosła 0,05 tzn. była na granicy istotności statystycznej z dokładnością do dwóch miejsc po przecinku. W populacji europejskiej, zgodnie z danymi HapMap Project, częstość występowania poszczególnych genotypów dla SNP rs312016 wynosi odpowiednio CC 0,517, CT 0,317; TT 0,167, co stanowi wynik porównywalny do grupy kontrolnej (CC 0,55; CT 0,36; TT 0,09). W grupie badanej u dzieci z IZN i obniżoną wartością wskaźnika Z częstość występowania poszczególnych genotypów była odmienna i wynosiła odpowiednio CC 0,360; CT 0,570; TT 0,07. Wariant SNP rs312016 CC występował w grupie badanej o prawidłowej wartości BMD istotnie częściej niż w grupie badanej z wartością Z -score $<-1,00$, a jego ekspresja wykazywała tendencję spadkową w przypadku pacjentów cechujących się niekorzystną przebudową kostną. Wartość ilorazu szans OR dla rs312016 wyniosła 4,050, co może wskazywać na powiązanie występowania wariantu CT z wystąpieniem niekorzystnych zmian w gęstości mineralnej kości u dzieci z zespołem nerczycowym leczonych glikokortykosteroidami. W porównaniu z grupą kontrolną i danymi populacyjnymi, pochodzącymi z baz SNP, w grupie badanej u dzieci z IZN i prawidłową gęstością mineralną kości znamienne częściej występował wariant CC, bo z częstością 0,70, co może wskazywać na jego znaczenie ochronne. W przypadku SNP rs312016 zwraca również uwagę występowanie polimorfizmu TT u jednego z pacjentów w grupie badanej z obniżoną wartością BMD, liczącą 14 osób (częstość 0,07), podczas, gdy wariant ten nie występuje w ogóle w 26 osobowej grupie badanej pacjentów, u których nie obserwowano zmian

kostnych. Dodatkowo pojedynczy allel T SNP 312016 występował istotnie częściej w grupie z $Z\text{-score} < -1,00$, niż u dzieci o prawidłowym wyniku badania densytometrycznego, co może wskazywać na związaną z nim predyspozycję do rozwoju osteoporozy, pomimo iż nie tworzył bloków w analizie HaploView z innymi SNP. Wnioski te są zgodne z doniesieniami Bollerslev'a i wsp. z 2005r., który to na łamach czasopisma Bone opublikował pracę dotyczącą niekorzystnego wpływu wybranych polimorfizmów genu *LRP5* na obniżenie gęstości mineralnej w obrębie szyjki kości udowej w grupie dorosłych kobiet [190]. Dwa lata później w tym samym periodyku Douglas i wsp. również w populacji żeńskiej, wskazują na wpływ, aż trzech SNP genu *LRP5* zlokalizowanych podobnie jak rs312016 w intronie 2 tj. rs4988330; rs312778 i rs4988331, na pogorszenie wartości BMD, zarówno w obrębie krętarza kości udowej jak i w odcinku lędźwiowym kręgosłupa [188]. Jednakże autorzy artykułu nie stwierdzają istotnej statystycznie korelacji pomiędzy występowaniem polimorfizmu rs312016, a ryzykiem rozwoju osteoporozy. W kontekście powyższych doniesień, przeprowadzona analiza wskazuje na dalszą konieczność kontynuowania badań nad znaczeniem SNP rs312016 dla progresji niekorzystnej przebudowy kostnej w rozszerzonej w stosunku do dotychczasowej grupie badanej dzieci w wieku przedpokwitaniowym. Badania te, obejmując odpowiednio dużą grupę pacjentów i grupę kontrolną dzieci zdrowych, mają szansę ujawnić w populacji dzieci polskich istnienie potencjalnej predyspozycji morfologicznej, obecnej przy urodzeniu i nie podlegającej modyfikacji, do rozwoju zmian osteoporotycznych, która może się ujawnić we wczesnym okresie rozwoju w przypadku zadziałania niekorzystnych czynników środowiskowych.

W przypadku pozostałych SNP pomimo licznych doniesień w piśmiennictwie sugerujących ich potencjalny związek z obniżeniem gęstości mineralnej kości, nie stwierdzono obecności istotnych statystycznie różnic w częstości występowania poszczególnych ich wariantów pomiędzy pacjentami z zespołem nerczycowym i obniżoną gęstością mineralną kości, pacjentami z zespołem nerczycowym i prawidłową gęstością mineralną kości oraz grupą kontrolną dzieci zdrowych. Otrzymane wartości p mieściły się w przedziale od 0,2529 do 1,0000, a zakres wartości obliczonego ilorazu szans OR wyniósł od 0,5455 do 2,240. Również częstość SNP 491347, wskazywanego przez wielu autorów jako znaczący dla rozwoju osteoporozy, nie różniła się pomiędzy populacjami badanymi w istotny statystycznie sposób [191]. Co ciekawe, opublikowana przed dwoma laty w The European

Journal of Endocrinology analiza wpływu polimorfizmów genów ścieżki sygnałowej Wnt *LRP5* i *LRP6* na metabolizm kostny, również nie wykazała związku badanych SNP genu *LRP5* z obniżeniem gęstości mineralnej kości. Stwierdzono wówczas natomiast zależność pomiędzy wybranymi SNP, a częstością złamańiskoenergetycznych [192]. W przypadku prezentowanej pracy, wyniki badań molekularnych również odnoszono do wartości BMD, a nie do częstości złamań. Być może dalsza, przykładowo 5-letnia obserwacja badanych pacjentów pod kątem częstości złamańiskoenergetycznych pozwoli na weryfikację dotychczasowych wniosków.

Analiza niezrównoważenia sprzężeń wybranych SNP genu *LRP5* zwraca uwagę na istotne różnice w jego strukturze, występujące pomiędzy badanymi grupami pacjentów z zespołem nerczycowym i prawidłową wartością wskaźnika Z, zespołem nerczycowym i obniżoną wartością wskaźnika Z oraz grupą kontrolną dzieci zdrowych. W grupie pacjentów z zespołem nerczycowym i obniżoną gęstością mineralną kości SNP rs491347, rs2306862, rs1784235 są całkowicie sprzężone i tworzą blok haplotypowy, czego nie obserwuje się w grupie pacjentów z zespołem nerczycowym i prawidłową gęstością mineralną kości oraz w grupie kontrolnej. Dodatkowo w grupie dzieci z zespołem nerczycowym i wartością Z-score $\leq -1,00$, w odróżnieniu od dwóch pozostałych grup pacjentów, każdy z powyższych trzech SNP jest sprzężony na tym samym, wysokim poziomie istotności ($R^2=72$) z SNP rs3736228. Różnice w częstości występowania bloków haplotypowych wykazano również w przypadku porównania struktury genu *LRP5* pomiędzy dziećmi z IZN i nieprawidłową wartością Z-score, a grupą dzieci z zespołem nerczycowym i prawidłową wartością Z-score oraz dziećmi zdrowymi z grupy kontrolnej, stanowiących wspólnie grupę odniesienia. Najważniejszym wnioskiem, wynikającym z przeprowadzonej analizy porównawczej wydaje się fakt znacznie większego podobieństwa struktury genu *LRP5* w zakresie badanych polimorfizmów pomiędzy grupą dzieci z zespołem nerczycowym i prawidłową strukturą kostną i grupą kontrolną dzieci zdrowych, niż w przypadku dzieci z zespołem nerczycowym i obniżoną gęstością mineralną kości. Zależności między parami SNP rs491347, rs2306862, rs1784235, rs556442 i rs3736228 są znacznie słabsze u pacjentów z prawidłowym wynikiem badania densytometrycznego i w grupie kontrolnej, niż u osób z wartością Z-score $< -1,00$, co może sugerować, iż na poziomie DNA zachodzą silniejsze relacje w zakresie powyższych polimorfizmów w przypadku wystąpienia osteoporozy. Jest to jednak tylko hipoteza, przy rozważaniu której należy

uwzględnić zmienność struktury genu pod wpływem różnych mutacji. W grupie dzieci z zespołem nerczycowym i prawidłowym wynikiem badania densytometrycznego kości stwierdzono natomiast obecność bloku haplotypowego pomiędzy SNP rs4988300, rs634008 i rs312023, którego obecności nie stwierdzono w grupie pacjentów z obniżoną gęstością mineralną kości ze względu na dwukrotnie słabsze sprzężenie pomiędzy SNP rs4988300 i rs634008. Podobnie zatem można oczekiwać, że obecność tego bloku może mieć znaczenie ochronne dla szkieletu osiowego w zakresie zmian metabolizmu kostnego pod wpływem czynników środowiskowych.

Wyniki przeprowadzonych badań, w założeniu autorki pracy, mogą w przyszłości pozwolić na wyselekcjonowanie grupy zarówno zwiększonego ryzyka populacyjnego rozwoju osteoporozy, również w wieku późniejszym, niezależnie od płci, masy ciała i wyjściowych parametrów oceny densytometrycznej w wieku dziecięcym oraz grupy pacjentów dziecięcych, leczonych glikokortykosteroidami o potencjalnym niekorzystnym rokowaniu w zakresie ryzyka rozwoju zmian kostnych. W tej ostatniej grupie pozwoliłoby to na ewentualną modyfikację działań profilaktycznych i uniknięcie, prowadzących niejednokrotnie do trwałego kalectwa, powikłań w postaci, najczęstszych w tej grupie wiekowej, patologicznych złamań kręgow. Ma to szczególne znaczenie z punktu widzenia możliwości kontynuacji, niejednokrotnie skutecznej w leczeniu idiopatycznego zespołu nerczycowego, steroidoterapii, jak również długości i jakości życia pacjentów, a także związanych z leczeniem zachowawczym, operacyjnym oraz rehabilitacją, kosztów społecznych i nakładów finansowych. Jest to zwłaszcza istotne w grupie pacjentów poniżej 18 roku życia, ze względu na znaczne ograniczenie wykorzystania bisfosfonianów i brak skutecznego leczenia proanabolicznego w zaawansowanym stadium osteoporozy. Wśród ekspertów definicja osteoporozy w wieku dziecięcym i kwestia podjęcia decyzji terapeutycznych, dotyczących najmłodszych pacjentów, wciąż budzą wiele kontrowersji. Znalezienie molekularnego podłoża niekorzystnych zmian kostnych, pozwoliłoby wyselekcjonować pacjentów wysokiego ryzyka istotnego obniżenia wartości BMD i zastosować u nich wyjściowo bardziej intensywne leczenie profilaktyczne, przy równoczesnym braku rezygnacji z często wielomiesięcznej steroidoterapii w grupie pozostałych pacjentów z idiopatycznym zespołem nerczycowym, dla których terapia ta może okazać się skuteczną ochroną przed rozwojem schyłkowej

niewydolności nerek. Ponadto, badanie polimorfizmów pozwoliłoby oszacować ryzyko zachorowania na osteoporozę również u członków rodzin chorych dzieci.

6. Wnioski

- 6.1. Polimorfizm rs312016 oraz blok haplotypowy pomiędzy polimorfizmami rs491347, rs2306862 i rs1784235 genu *LRP5* może stanowić potencjalny czynnik ryzyka, predysponujący do rozwoju niekorzystnych zmian gęstości mineralnej kości w grupie dzieci w wieku przedpokwitaniowym z zespołem nerczycowym leczonych glikokortykosteroidami.

- 6.2. Blok haplotypowy pomiędzy polimorfizmami rs4988300, rs634008 i rs312023 genu *LRP5* może stanowić czynnik protekcyjny, chroniący przed rozwojem niekorzystnych zmian gęstości mineralnej kości w grupie dzieci w wieku przedpokwitaniowym z zespołem nerczycowym leczonych glikokortykosteroidami.

- 6.3. Określenie struktury genu *LRP5* opartej na polimorfizmie pojedynczych nukleotydów u dzieci z zespołem nerczycowym wydaje się być przydatne w przewidywaniu zmian kostnych w trakcie leczenia glikokortykosteroidami.

7. Piśmiennictwo

1. Waugh E, Lam M, Hawker G i in. Risk factors for low bone mass in healthy 40-60 year old women: A systematic review of the literature. *Osteoporos Int.* 2009; 20: 1-21
2. Consensus development conference (1993) Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis. *Am J Med.* 1994: 646-650
3. Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis and Therapy. *JAMA.* 2001; 856: 785-794
4. World Health Organization Scientific Group. On the Assessment of osteoporosis at primary health care level. Summary Meeting Report. Brussels, Belgium 5-7 May 2004
5. Report of a WHO Study Group (1994): Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. *World Health Organ Tech Rep Ser* 843:1-129
6. The world health report 2004: changing history. Geneva, World Health Organization, 2004
7. Ström O, Borgström F, Kanis J i in. International Osteoporosis Foundation (IOF) and European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA)(2011): Osteoporoza: ciężar, regulacje prawne opieki zdrowotnej i możliwości w Unii Europejskiej. International Osteoporosis Foundation and National Osteoporosis Foundation 2011
8. Nieradko-Iwanicka B, Borzęcki A. Osteoporoza jako problem pediatriczny. *Probl Hig Epidemiol.* 2009; 90: 27-31
9. Ralston S. Zapobieganie osteoporozie i jej leczenie. Science Press LTD, Londyn 2002; 1-45
10. Saganowska R, Lalik B. Osteoporoza u dzieci i młodzieży. *Przegl. Pediatr.* 2006; 36: 143-150
11. van Staa T, Leufkens H, Cooper C. The epidemiology of corticosteroid-induced osteoporosis: a meta-analysis. *Osteoporosis Int.* 2002; 13: 777-787
12. Feldstein A, Elmer P, Nichols G i in. Practice patterns in patients at risk for glucocorticoid-induced osteoporosis. *Osteoporosis Int.* 2005; 16: 2168-2174
13. Kiryłów E, Kamiński G. Miejsce biochemicznych markerów obrotu kostnego w zaleceniach diagnostyczno-leczniczych osteoporozy. *Pol. Merk. Lek.* 2008; XXV, 148, 386
14. Sikorska S. Measurement of structural parameters of trabecular bone Rusing fuzzy logic. *Mechanika.* 2010; 107: 239-246
15. Filip R. Własności strukturalne i materiałowe tkanki kostnej a ryzyko złamań. *Reumatologia.* 2007; 47: 154-157
16. Guan M, Yao W, Liu R i in. Directing mesenchymal stem cells to bone to augment bone formation and increase bone mass. *Nature Medicine.* 2012; 18: 456-462
17. Staines K, Pollard A, McGonnell I i in. Cartilage to bone transitions in health and disease. *J Endocrinol.* 2013; 10: 219
18. Lupu F, Terwilliger J, Lee K i in. Roles of Growth Hormone and Insulin-like Growth Factor 1 in Mouse Postnatal Growth. *Developmental Biology.* 2001; 229: 141-162
19. Parfitt A, Travers R, Rauch F i in. Structural and cellular changes during bone growth in healthy children. *Bone.* 2000; 27: 487-494
20. Hadjidakis D, Androulakis I. Bone remodeling. *Ann NY Acad Sci.* 2006; 1092:385-396
21. Raisz L. Physiology and Pathophysiology of Bone Remodeling. *Clinical Chemistry.* 1999; 45: 1353-1358
22. Stawińska N, Ziętek M, Kochanowska I. Molekularne procesy resorpcji kości i ich potencjał terapeutyczny w leczeniu chorób przyzębia i osteoporozy *Dent. Med. Probl.* 2005; 42: 627-635

23. Bellido T, Ali A, Gubrij I i in. Chronic elevation of PTH in mice reduces expression of sclerostin by osteocytes: a novel mechanism for hormonal control of osteoblastogenesis. *Endocrinology*. 2005; 146: 4577–4583
24. Keller H, Kneissel M. SOST is a target gene for PTH in bone. *Bone*. 2005; 37: 148–158
25. Takeshita S, Fumoto T, Matsuoka K i in. Osteoclast-secreted CTHRC1 in the coupling of bone resorption and formation. *J Clin Invest*. 2013; 123: 3914–3924
26. Witas H, Wujcicka W. Genetyczne wyznaczniki osteoporozy. *Postępy biologii komórki*. 2007; 34: 495-509
27. Teitelbaum S, Ross F. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet*. 2003; 4: 638-649
28. Glantschnig H, Fisher J, Wesolowski G i in. M-CSF, TNF α and RANK ligand promote osteoclast survival by signaling through mTOR/S6 kinase. *Bone Biology and Osteoporosis Research. Cell Death Differ*. 2003; 10: 1165-1177
29. Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T i in. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature*. 1990; 345: 442-444
30. Baron R. Polarity and membrane transport in osteoclasts. *Connect Tissue Res*. 1989; 20: 109-120
31. Takahashi N, Ejiri S, Yanagisawa S i in. Regulation of osteoclast polarization. *Odontology*. 2007; 95: 1-9
32. Ruoslati E. RGD and Rother recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1996; 12: 697-715
33. Teitelbaum S. Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *Am J Pathol*. 2007; 170: 427-435
34. Crockett J, Mellis D, Scott D i in. New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: focus on the RANK/RANKL axis. *Osteoporos Int*. 2011; 22: 1-20
35. Takayanagi H, Kim S, Matsuo K i in. RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon-beta. *Nature*. 2002; 416: 744-749
36. Arai A, Mizoguchi T, Harada S i in. c- Fos plays an essential role in the upregulation of RANK expression in osteoclast precursors within the bone microenvironment. *J Cell Sci*. 2012; 125: 2910–2917
37. Weinstock-Guttman B, Hong J, Santos R i in. Interferon-beta modulates bone-associated cytokines and osteoclast precursor activity in multiple sclerosis patients. *Mult Scler*. 2006; 12: 541-550
38. Edwards J, Mundy G. Advances in osteoclast biology: old findings and new insights from mouse models. *Nat Rev Rheumatol*. 2011; 7: 235-243
39. Schramek D, Leibbrandt A, Sigl V i in. Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progestin-driven mammary cancer. *Nature*. 2010; 468: 98-102
40. Schoppet M, Preissner K, Hofbauer L. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2002; 22: 549–553
41. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*. 2001; 142: 5050–5055
42. Aubin J., Bonnellye E. Osteoprotegerin and its Ligand: A New Paradigm for Regulation of Osteoclastogenesis and Bone Resorption. *Osteoporos Int*. 2000; 11: 905-913

43. Raisz L. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest.* 2005; 115: 3318-3325
44. Lee S, Lorenzo J. Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology.* 1999; 140: 3552-3561
45. Hartikka H. Genetic factors in bone disorders: Osteogenesis imperfect, juvenile osteoporosis and stress fractures. Oulu University Press Oulu 2005:15-40.
46. Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature.* 1981; 287: 795-801
47. Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E i in. The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell.* 1987; 50: 649-657
48. Tsukamoto A, Grosschedl R, Guzman R i in. Expression of the int-1 gene in transgenic mice is associated with mammary gland hyperplasia and adenocarcinomas in male and female mice. *Cell.* 1988; 55: 619-625
49. Logan C, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Cell Dev. Bio.* 2004; 20:781-810
50. Siegfried E, Perrimon N. *Drosophila* wingless: a paradigm for the function and mechanism of Wnt signaling. *Bioessays.* 1994 ; 16: 395-404
51. Mitchell D, Vasudevan A. Protein palmitoylation by a family of DHHC protein S acyltransferases. *J. Lipid Res.* 2006; 47: 1118–1127
52. Rao T, Kühl M. An Updated Overview on Wnt Signaling Pathways: A Prelude for More. *Circulation Research.* 2010; 106: 1798–1806
53. Yuko K, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis.* 2008; 4: 68-75
54. Carron C, Pascal A, Djiane A i in. Frizzled receptor dimerization is sufficient to activate the Wnt/beta-catenin pathway. *J Cell Sci.* 2003; 116: 2541-2550
55. Axelrod J, Miller J, Shulman J i in. Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wingless signaling pathways. *Genes & Dev.* 1998; 12: 2610-2622
56. MacDonald B, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental Cell.* 2009; 17: 9–26
57. Ding Y, Dale T. Wnt signal transduction: kinase cogs in a nano-machine? *Trends Biochem Sci* 2002; 27: 327-329
58. Shimizu N, Kawakami K, Ishitani T. Visualization and exploration of Tcf/Lef function using a highly responsive Wnt/ β -catenin signaling-reporter transgenic zebrafish. *Dev Biol.* 2012; 370: 71-85
59. Chen D, Zhao M, Mundy G. Bone Morphogenetic Proteins. *Growth Factors.* 2004; 22: 233-241
60. Świst K., Pajtasz-Piasecka E. The influence of transcription factors on CD4+ Tcell differentiation. *Postępy Hig Med Dosw.* 2011; 65: 414-426
61. Tranah G, Taylor B, Lui L i in. For the Study of Osteoporotic Fractures (SOF) Research Group (2008) Genetic Variation in Candidate Osteoporosis Genes, Bone Mineral Density and Fracture Risk: The Study of Osteoporotic Fractures. *Calcif Tissue Int.* 2008; 83: 155-166
62. McGuigan F, Larzenius E, Callreus M i in. Variation in BMP2 Gene: Bone Mineral Density and Ultrasound in Young Adult and Elderly Women. *Calcif Tissue Int.* 2007; 81: 254-262

63. Sammar M, Sieber C, Knaus P. Biochemical and functional characterization of the Ror2/BRIb receptor complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009; 381: 1–6
64. Kagermeier-Schenk B, Wehner D, Özhan-Kizil G i in. Waif1/5T4 Inhibits Wnt/ β -Catenin Signaling and Activates Noncanonical Wnt Pathways by Modifying LRP6 Subcellular Localization. *Developmental Cell.* 2011; 21: 1129-1143
65. Aqueda L, Velázquez-Cruz R, Urreiziti R i in. Functional relevance of the BMD-associated polymorphism rs312009: novel involvement of RUNX2 in LRP5 transcriptional regulation. *J Bone Miner Res.* 2011; 26: 1133-1144
66. Jiao X, Ventruto V, Trese M i in. Autosomal recessive familial exudative vitreoretinopathy is associated with mutations in LRP5. *Am J Hum Genet.* 2004; 75: 878-884
67. Funakoshi Y, Omori H, Yada H i in. A1330V polymorphism of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene and bone mineral density in Japanese male workers. *Environ Health Prev Med.* 2011; 16: 106-112
68. Estrada K, Styrkarsdottir U, Evangelou E i in. Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. *Nat Genet.* 2012; 44: 491-501
69. Koller D, Ichikawa S, Johnson M i in. Contribution of the LRP5 gene to normal variation in peak BMD in women. *J Bone Miner Res.* 2005; 20: 75-80
70. Yadav V, Ryu J, Suda N i in. Lrp5 Controls Bone Formation by Inhibiting Serotonin Synthesis in the Duodenum. *Cell.* 2008; 135: 825-837
71. Streeten E, McBride D, Puffenberger E i in. Osteoporosis-pseudoglioma syndrome: description of 9 new cases and beneficial response to bisphosphonates. *Bone.* 2008; 43: 584-590
72. Gong Y, Vikkula M, Boon L i in. Osteoporosis-pseudoglioma syndrome, a disorder affecting skeletal strength and vision, is assigned to chromosome region 11q12-13. *Am J Hum Genet.* 1996; 59: 146-151
73. van Meurs J, Trikalinos T, Ralston S i in. GENOMOS Study. Large-scale analysis of association between LRP5 and LRP6 variants and osteoporosis. *JAMA.* 2008; 299: 1277-1290
74. Li G, Deng H, Kung A i in. Identification of genes for bone mineral density variation by computational disease gene identification strategy. *J Bone Miner Metab.* 2011; 26: 1133-1144
75. Haraguchi S, Kitajima S, Takagi A i in. Transcriptional regulation of Mesp1 and Mesp2 genes: differential usage of enhancers during development. *Mech Dev.* 2001; 108: 59-69
76. Horst-Sikorska W, Kalak R, Wawrzyniak A i in. Analiza asocjacji genów metabolizmu i struktury tkanki kostnej z gęstością mineralną kości oraz występowaniem złamań w populacji polskiej. *Ortopedia Traumatologia Rehabilitacja* 2005; 7: 48-50
77. Carter C. Monogenic disorders. *J Med Genet,* 1977, 14: 316-320
78. Genin E, Feingold J, Clerget-Darpoux F. Identifying modifier genes of monogenic disease: strategies and difficulties. *Hum Genet.* 2008; 124: 357–368
79. Sandman K, Reeve J. Structure and functional relationships of archaeal and eukaryotic histones and nucleosomes. *Arch. Microbiol.* 2009; 173: 165–169
80. Liu L, Li Y, Tollefsbol T. Gene-Environment Interactions and Epigenetic Basis of Human Diseases. *Curr Issues Mol Biol.* 2008; 10: 25–36
81. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet.* 2003; 33: 245–254

82. Risch N. Searching for genetic determinants In the new millennium. *Nature*. 2000; 405: 847-856
83. Donis-Keller H, Green P, Helms C. A genetic linkage map of the human genome. *Cell*. 1987; 51: 319-337
84. Holliday R. Mechanisms for the control of gene activity during development. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 1990; 65: 431-471
85. Lupski J. Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet*. 1998; 14: 417-422
86. Kozłowska J, Łaczmńska I. Genetic instability – its significance in cancer development and laboratory diagnostics. *Journal of Oncology*. 2010; 60: 548-553
87. Collins F, Brooks L, Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome research*. 1998; 8: 1229-1231
88. Levy S, Sutton G, Ng P. The diploid genome sequence of an individual human. *PLoS Biol*. 2007; 5: 254
89. Cohen J. Sorting Out Chromosome Errors. *Science*. 2002; 6: 2164-2166
90. Gu W, Zhang F, Lupski J. Mechanisms for human genomic rearrangements. *PathoGenetics*. 2008; 1: 4
91. Varela M, Amos W. Heterogeneous distribution of SNPs in the human genome: Microsatellites as predictors of nucleotide diversity and divergence. *Genomics*. 2010; 95: 151-159
92. Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for Mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet*. 2003; 33: 228-237
93. Zhao L, Li S, Khalid N. A method for assessment of disease associations with single nucleotide polymorphism haplotypes and environmental variables in case-control studies. *Am J Hum Genet*. 2003; 72: 1231-1250
94. Schaid D, Rowland C, Tines D. Score tests for association between traits and haplotypes when linkage phase is ambiguous. *Am J Hum Genet*. 2002; 70: 425-434
95. Pritchard J, Przeworski M. Linkage disequilibrium in humans: models and data. *Am J Hum Genet*. 2001; 69: 1-14
96. Devlin B, Risch N. A Comparison of Linkage Disequilibrium Measures for Fine-Scale Mapping. *Genomics*. 1995; 29: 311-322
97. Gabriel S, Schaffner S, Nguyen H. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*. 2002; 296: 2225-2229
98. Wang W, Barratt B, Clayton D. Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. *Nat Rev Genet*. 2005; 6: 109-118
99. Xu H, George V. A Monte Carlo test of linkage disequilibrium for single nucleotide polymorphisms. *BMC Res Notes*. 2011; 4: 124
100. Kerem B, Rommens J, Buchanan J. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*. 1989; 245: 1073-1080
101. International HapMap Consortium: A haplotype map of the human genome. *Nature*. 2005; 437: 1299-1320
102. Iida K, Nishimura I. Gene expression profiling by DNA microarray technology. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002; 13: 35-50
103. Przybecki Z, Pawełkiewicz M, Wóycicki R. Sekwencjonowanie genomów i rozwój biotechnologii. *Biotechnologia*. 2010; 4: 9-23

104. Karczmarczyk M, Bartoszcze M. Mikromacierze DNA – nowe narzędzie w wykrywaniu czynników biologicznych. *Przeł Epidemiol.* 2006; 60: 803-811
105. Sebastiani P, Lazarus R, Weiss S. Minimal haplotype tagging. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100: 9900–9905
106. Gutin B, Kasper M. Can vigorous exercise play a role in osteoporosis prevention? A review. *Osteoporos Int.* 1992; 2: 55-69
107. Anderson J, Tylavsky F, Halioua L i in. Determinants of Peak Bone Mass in Young Adult Women: A Review. *Osteoporosis Int.* 1993; 3: 32-36
108. Borer K. Physical Activity in the Prevention and Amelioration of Osteoporosis in Women Interaction of Mechanical, Hormonal and Dietary Factors. *Sports Med.* 2005; 35: 779-830
109. Constantini N, Dubnov-Raz G, Chodick G i in. Physical Activity and Bone Mineral Density in Adolescents with Vitamin D Deficiency. *Medicine and Science in Sports and Exercise.* 2010; 42: 646-650
110. Lorentzon M, Eriksson A, Nilsson S i in. Association between physical activity and BMD in young men is modulated by catechol-O-methyltransferase (COMT) genotype: the GOOD study. *J Bone Miner Res.* 2007; 22: 1165-1172
111. Nieves J. Osteoporosis: the role of micronutrients. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 2005; 5: 1232-1239
112. Alp H, Orbak Z, Kermen T i in. Bone mineral density in malnourished children without rachitic manifestations. *Pediatrics international official journal of the Japan Pediatric Society.* 2006; 48: 128-131
113. Institute of Medicine Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride. Washington, DC: National Academy Press. 1997
114. Welten D, Kemper H, Post G i in. A meta-analysis of the effect of calcium intake on bone mass in young and middle aged females and males. *Journal of Nutrition.* 1995; 125: 2802–2813
115. Dibba B, Prentice A, Ceesay M i in. Effect of calcium supplementation on bone mineral accretion in Gambian children accustomed to a low calcium diet. *American Journal of Clinical Nutrition.* 2000; 71: 544–549
116. Prentice A. Diet, nutrition and the prevention of osteoporosis. *Public Health Nutrition.* 2004; 7: 227–243
117. Nieves J, Komar L, Cosman F i in. Calcium potentiates the effect of estrogen and calcitonin on bone mass: review and analysis. *Am J Clin Nutr.* 1998; 67: 18–24
118. Michael F, Holick M. Vitamin D Deficiency. *N Engl J Med.* 2007; 357: 266-228
119. Holick M, Garabedian M. Vitamin D: photobiology, metabolism, mechanism of action, and clinical applications. In: Favus MJ, ed. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism.* 6th ed. Washington, DC: American Society for Bone and Mineral Research. 2006; 129-137
120. Chapuy M, Preziosi P, Maamer M. Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. *Osteoporos Int.* 1997; 7:439-443
121. Nesby-O’Dell S, Scanlon K, Cogswell M. Hypovitaminosis D prevalence and determinants among African American and white women of reproductive age: Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Am J Clin Nutr.* 2002; 76: 187-192

122. Berg K, Kunins H, Jackson J i in. Association between alcohol consumption and both osteoporotic fracture and bone density. *Am J Med.* 2008; 5: 406-418
123. Vanderschueren D, Vandendput L, Boonen S i in. Androgens and bone. *Endocr Rev.* 2004; 25: 389-425
124. Ebeling P. Androgens and osteoporosis. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity.* 2010; 17: 284–292
125. Isidori A, Giannetta E, Pozza C i in Androgens, cardiovascular disease and osteoporosis. *J Endocrinol Invest.* 2005; 28: 73-79
126. Riggs B, Khosla S, Melton L. 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.* 1998; 13: 763–773
127. Garnero P, Sornay-Rendu E, Chapuy M i in. Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 1996; 11: 337–349
128. Gennari C, Agnusdei D, Nardi P i in. Estrogen preserves a normal intestinal responsiveness to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in oophorectomized women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990; 71: 1288–1293.
129. Esbrit P, Alcaraz M. Current perspectives on parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein (PTHrP) as bone anabolik therapies. *Biochem Pharmacol.* 2013; 85: 1417-1423
130. Sahota O, Munday M, San P i in. Vitamin D insufficiency and the blunted PTH response in established osteoporosis: the role of magnesium deficiency. *Osteoporosis Int.* 2006; 17: 1013-1021
131. Przystawski J, Górna I. Osteoporoza u dzieci i młodzieży. *Chem. Toksykol. – XLI.* 2008; 4: 949–956
132. Dominguez L, Muratore M, Quarta E i in. Osteoporosis and diabetes. *Reumatismo.* 2004; 56, 235–41.
133. Hofbauer L, Brueck C, Singh S i in. Osteoporosis in Patients With Diabetes Mellitus *Journal of Bone and Mineral Research.* 2007; 22: 1317–1328
134. Leb G, Warnkross H, Obermayer-Pietsch B. Thyroid Hormone Excess and Osteoporosis. *Acta Med Austriaca.* 1994; 21: 65-67
135. Zonenberg A, Borejszo I, Konstantynowicz J. Metabolizm tkanki kostnej u kobiet przed menopauzą leczonych preparatami lewotyroksyny. *Endokrynol Pol.* 2001; 52: 167-175
136. Kosińska A, Syrenicz A, Kosiński B i in: Osteoporosis in thyroid diseases. *Polish Journal of Endocrinology.* 2005; 56: 185-193
137. Wakasugi M, Wakao R, Tawata M. Changes in bone mineral density in patients with hyperthyroidism after attainment of euthyroidism by dual energy x-ray absorpcjometry. *Thyroid.* 1994; 4: 179-182
138. Zgliczyński S. *Choroby tarczycy.* Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław 2001
139. Serafinowicz E, Wąsikowa R, Iwanicka Z i in. Bone metabolism in adolescent girls with short course of anorexia nervosa. *Endokryn. Diabet. Chor. Przem. Mat. Wieku Rozoj.* 2003; 9: 67-71
140. Leszczyński P, Łącki J, Mackiewicz S. Osteoporoza posterooidowa – patomechanizm, zapobieganie i leczenie. *Postępy Nauk Medycznych.* 2000; 2: 3-7

141. Civitelli R, Ziambaras K. Epidemiology of glucocorticoid-induced osteoporosis. *J Endocrinol Invest.* 2008; 3: 2-6
142. Feldstein A, Elmer P, Nichols G i in. Practice patterns in patients at risk for glucocorticoid-induced osteoporosis. *Osteoporosis Int.* 2005; 16: 2168-2174
143. McClung M. Role of RANKL inhibition in osteoporosis. *Arthritis Research & Therapy.* 2007; 9: 3
144. Tobias J, Chambers T. Glucocorticoids Impair Bone Resorptive Activity and Viability of Osteoclasts Disaggregated from Neonatal Rat Long Bones. *Endocrinology.* 1989; 125: 1290-1295
145. Bellido T, Ali A, Gubrij I i in. Chronic elevation of PTH in mice reduces expression of sclerostin by osteocytes: a novel mechanism for hormonal control of osteoblastogenesis. *Endocrinology.* 2005; 146: 4577–4583
146. Roth K, Amaker B, Chan J. Nephrotic syndrome: pathogenesis and management. *Pediatrics in review.* 2002;23: 237
147. Chesney R. The idiopathic nephrotic syndrome. *Curr Opin Pediatr.* 1999; 11: 158- 161
148. Hallan S, Ritz E, Lydersen S. Combining GFR and albuminuria to classify CKD improves prediction of ESRD. *J Am Soc Nephrol.* 2009; 20:1069-1077
149. Swartz S, Eldin K, Hicks M i in. Minimal change disease with IgM+ immunofluorescence: a subtype of nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2009; 24: 1187-1192
150. Fogo A. Minimal change disease and focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant.* 2001; 16: 74-76
151. Hodson E, Knight J, Willis N i in. Corticosteroid therapy in nephrotic syndrome: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Arch Dis Child.* 2000; 83: 45-51
152. Kanis J, Oden A, Johnell O. The use of clinical risk factors enhances the performance of BMD in the prediction of hip and osteoporotic fractures in men and women. *Osteoporosis Int.* 2007; 18: 1033-1046
153. Leszczyński P, Bolanowski M. New ISCD recommendations for performing and interpretation dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). *Polish Journal of Endocrinology.* 2004; 6: 744-748
154. Leib E, Lewiecki E, Binkley N, Hamdy R, for the International Society for Clinical Densitometry: Official Positions of the International Society for Clinical Densitometry, *J Clin Densitom,* 2004; 7: 1-5
155. van der Sluis I, de Ridder M, Boot A i in. Reference data for bone density and body composition measured with dual energy x ray absorptiometry in white children and young adults. *Arch Dis Child.* 2002; 87: 341-347
156. Binkovitz L, Henwood M. Pediatric DXA: technique and interpretation. *Pediatr Radiol.* 2007; 37: 21-31
157. Misiorowski W, Lorenc R. Osteoporoza. *Standardy Endokrynologii, II wydanie,* 2002; 125-127
158. Jaworski M, Płudowski P. Specific interpretation of bone mineral density and body composition measurements in children and adolescents – categorized and continuous normative data for mechanostat. *Standardy Medyczne Pediatria.* 2009; 6: 292-303
159. Aubrey-Rozier B, Lamy O, Dudler J. Prevention of cortisone-induced osteoporosis: who, when and what? *Rev Med. Suisse.* 2010; 6 : 307-313

160. Kułaga Z, Litwin M, Tkaczyk M i in. Polish 2010 growth references for school-aged children and adolescents. *European Journal of Pediatrics*. 2011; 170: 599-609
161. Smith C, Coombs R, Gibson A. Approaches to adjusting bone mineral content for bone size in children. *Calcif Tissue Int*. 2002; 70: 370
162. Carter D, Bouxsein M, Marcus R. New Approaches for Interpreting Projected Bone Densitometry Data. *J Bone Min Res*. 1992; 7: 137-145
163. Kröger H, Kotaniemi A, Vainio P i in. Bone densitometry of the spine and femur in children by dual-energy x-ray absorptiometry. *Bone Miner*. 1992; 17: 75-85
164. Hoff-Olsen P, Mevag B, Staalstrøm E. Extraction of DNA from decomposed human tissue. An evaluation of five extraction methods for short tandem repeat typing. *Forensic Science International*. 1999; 105: 171–183
165. Słomski R. Analiza DNA, teoria i praktyka. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. 2008; 61-64
166. Mackay M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect*. 2004; 10: 190-212
167. Stahn C, Lowenberg M, Hommes D. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. *Mol Cell Endocrinol*. 2007; 275: 71–78
168. Vestergaard P. Changes in bone turnover, bone mineral and fracture risk induced by drugs used to treat epilepsy. *Curr Drug Saf*. 2008; 3: 168–172
169. Kanis J, Johansson H, Oden A. A meta-analysis of prior corticosteroid use and fracture risk. *J Bone Miner Res*. 2004; 19: 893–899
170. Angeli A, Guglielmi G, Dovio A. High prevalence of asymptomatic vertebral fractures in post-menopausal women receiving chronic glucocorticoid therapy: a cross-sectional outpatient study. *Bone*. 2006; 39: 253–259
171. Canalis E, Mazziotti G, Giustina A i in. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy. *Osteoporos Int*. 2007; 18: 1319–1328
172. van Staa T, Leufkens H, Abenham L. Use of oral corticosteroids and risk of fractures. *J Bone Miner Res*. 2000; 15: 993–1000
173. Aqueda L, Bustamante M, Jurado S i in. A haplotype-based analysis of the LRP5 gene in relation to osteoporosis phenotypes in Spanish postmenopausal women. 2008; 12: 1954-1963
174. Narodowy Spis Powszechny Ludności i Mieszkań 2011 (stan z 31 marca 2011 r.). Warszawa: Główny Urząd Statystyczny. 2012-07-26.
175. Świątkiewicz V, Świątkiewicz J, Kołtan A i in. Ocena masy kostnej w populacji dzieci i młodzieży z województwa kujawsko-pomorskiego w oparciu o badania densytometryczne przedramienia. XI Zjazd Polskiego Towarzystwa Osteoartrologii i Polskiej Fundacji Osteoporozy. V Krakowskie Sympozjum Osteoporozy Kraków 27-29.09.2001
176. Bours S, van Geel T, Geusens P i in. Contributors to Secondary Osteoporosis and Metabolic Bone Diseases in Patients Presenting with a Clinical Fracture. *JCEM*. 2011; 96: 1360-1367
177. Czerwiński E, Lorenc R, Marcinowska-Suchowierska E i in. Stanowisko Polskiego Towarzystwa Osteoartrologii i Wielodyscyplinarnego Forum Osteoporotycznego ws. Standardów diagnostyki i leczenia osteoporozy w Polsce. 21.02.2005r.

178. Baroncelli G. Quantitative ultrasound methods to assess bone mineral status in children: technical characteristics, performance, and clinical application. *Pediatr Res.* 2008; 63: 220-228
179. Slemenda C, Christian J, Williams C i in. Genetic determinants of bone mass in adult women: A reevaluation of the twin model and the potential importance of gene interaction on heritability estimates. *J. Bone Miner. Res.* 1991; 6: 561-567
180. Lorenc R, Kryśkiewicz E. Diagnostyka osteoporozy u dzieci. *Terapia.* 2005; 2: 9-11
181. Zylstra C, Wan C, Van Koeving K i in. Gene targeting approaches in mice: assessing the roles of LRP5 and LRP6 in osteoblasts. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2008; 8: 291–293
182. Yadav V, Ryu J, Suda N. Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum. *Cell.* 2008; 135: 825–837
183. Żymelska K, Benedyk A. Replication study of candidate genes/loci associated with osteoporosis based on genome-wide screening. *Osteoporosis Int.* 2010; 21: 785-795
184. van Meurs J, Trikalinos T, Ralston S i in. for the GENOMOS Study. Large-Scale Analysis of Association Between LRP5 and LRP6 Variants and Osteoporosis. *JAMA.* 2008; 299: 1277-1290
185. Richards B, Rivadeneira F, Inouye M. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study. *The Lancet.* 2008; 371: 1505-1512
186. Funakoshi Y, Omori H, Yada H i in. A1330V polymorphism of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene and bone mineral density in Japanese male Workers. *Environ Health Prev Med.* 2011; 16: 106–112
187. Ezura Y, Nakajima T, Urano T. Association of a single-nucleotide variation (A1330V) in the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene (LRP5) with bone mineral density in adult Japanese women. *Bone.* 2007; 40: 997-1005
188. Douglas P, Kiel D, Ferrari S, Cupples L i in. Genetic variation at the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) locus modulates Wnt signaling and the relationship of physical activity with bone mineral density in men. *Bone.* 2007; 40: 587-596
189. Paternoster L, Ohlsson C, Sayers A i in. OPG and RANK polymorphisms are both associated with cortical bone mineral density: Findings from a Metaanalysis of the Avon Longitudinal Study of Parents and Children and Gothenburg Osteoporosis and Obesity Determinants Cohorts. *JCEM.* 2010; 95: 3940-3948
190. Bollerslev J, Wilson S, Dick I. LRP5 gene polymorphisms predict bone mass and incident fractures in elderly Australian women. *Bone.* 2005; 36: 599–606
191. Xiong D, Lei S, Yang F. Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 5 (LRP5) Gene Polymorphisms Are Associated With Bone Mass in Both Chinese and Whites. *JBMR.* 2007; 22: 385–393
192. Riancho J, Olmos J, Pineda B i in. Wnt receptors, bone mass, and fractures: gene-wide association analysis of LRP5 and LRP6 polymorphisms with replication. *European Journal of Endocrinology.* 2011; 164: 123–131

8. Streszczenie

O zmienności ludzkiego genomu w około 80% przypadków decydują polimorfizmy pojedynczego nukleotydu, stanowiące efekt mutacji, selektywnie utrwalonych w danej populacji, z którą pozostają w ścisłym związku w zakresie częstości występowania poszczególnych alleli. Określone SNP oraz tworzone przez nie bloki haplotypowe, wynikające z ich skłonności do współdziedziczenia, określanej mianem niezrównoważenia sprzężeń, niejednokrotnie stanowią czynnik ochronny lub predysponujący do rozwoju konkretnego schorzenia. Zarówno identyfikacja częstości występowania pojedynczych polimorfizmów jak i analiza zależności pomiędzy poszczególnymi SNP i ich współwystępowanie w określonych zespołach mogą ułatwić prognozowanie w zakresie zapadalności i przebiegu klinicznego różnorodnych chorób, w tym zaburzeń kostnych. W grupie pacjentów obarczonych predyspozycją genetyczną do rozwoju zmian osteoporotycznych, wystąpienie dodatkowego, środowiskowego czynnika spustowego, takiego jak podaż glikokortykosteroidów, może stanowić punkt wyjścia dla spadku gęstości mineralnej kości i początek niekorzystnej przebudowy jej mikrostruktury.

Idiopatyczny zespół nerczycowy, stanowiący przejaw kliniczny kłębuszkowego zapalenia nerek, dotyka rocznie około 16 na 100.000 dzieci w Polsce. Objawy chorobowe, wynikające z niekontrolowanego wzrostu przepuszczalności bariery filtracyjnej kłębuszków nerkowych, mają charakter nawrotowy i u części pacjentów prowadzą do rozwoju schyłkowej niewydolności nerek. Etiologia IZN, choć wciąż niejednoznaczna i z pewnością wieloczynnikowa, jest od lat wiązana z zaburzeniami równowagi pomiędzy cytokinami puli limfocytów pomocniczych Th1 i Th2 oraz obecnością czynnika zwiększającego przepuszczalność naczyń krwionośnych, prawdopodobnie należącego do grupy interleukin. Wobec powyższych faktów podstawę leczenia IZN stanowią glikokortykosteroidy. Terapia pierwszego rzutu choroby, prednizonem przez okres 4 do 6 miesięcy, w znamiennej dawce początkowej, wynoszącej 2mg/kg mc./24h, może stanowić czynnik spustowy do obniżenia gęstości mineralnej rozwijających się kości, a w konsekwencji doprowadzić do złamania, a nawet trwałego kalectwa. Obserwacje własne i doniesienia literaturowe zwracają jednak uwagę, iż pomimo standaryzacji sposobu leczenia IZN, liczba pacjentów pediatrycznych, u których dochodzi do niekorzystnych przemian kostnych jest ograniczona. Rodzi to pytanie o

dodatkowe, niemodyfikowalne podłoże molekularne ryzyka rozwoju osteoporozy w wieku przedpokwitaniowym.

Przeprowadzona analiza miała na celu ocenę dwunastu polimorfizmów genu *LRP5* rs3736228, rs491347, rs312009, rs556442, rs1784235, rs41494349, rs2306862, rs3736229, rs312016, rs4988300, rs634008 i rs312023 jako potencjalnego podłoża molekularnego niekorzystnej przebudowy kostnej i rozwoju ryzyka złamaniaiskoenergetycznego kości u dzieci z Wielkopolski, w wieku przedpokwitaniowym, leczonych glikokortykosteroidami z powodu idiopatycznego zespołu nerczykowego oraz znalezienie powiązania zmian na poziomie DNA, w tym niezrównoważenia sprzężeń wybranych SNP z ryzykiem obniżenia wartości BMD ocenianej w badaniu densytometrycznym.

Analiza otrzymanych wyników wskazuje na istnienie różnicy na granicy istotności statystycznej w częstości występowania wariantów SNP rs312016 genu *LRP5* (CC/CT/TT) pomiędzy pacjentami z zespołem nerczykowym i obniżoną gęstością mineralną kości, a pacjentami z zespołem nerczykowym i prawidłowym wynikiem badania densytometrycznego. Otrzymana dla tej korelacji wartość *p* wyniosła 0,05. Wariant SNP rs312016 CC występował w grupie badanej o prawidłowej wartości BMD istotnie częściej niż w grupie badanej z wartością *Z*-score <-1,00, a jego ekspresja wykazywała tendencję spadkową w przypadku pacjentów cechujących się niekorzystną przebudową kostną. Wartość ilorazu szans OR dla rs312016 wyniosła 4,050, co może wskazywać na powiązanie występowania wariantu CT z wystąpieniem niekorzystnych zmian w gęstości mineralnej kości u dzieci z zespołem nerczykowym leczonych glikokortykosteroidami. Stwierdzono również, że wariant TT SNP rs312016 obecny u jednego z pacjentów w grupie badanej z obniżoną wartością BMD, nie występował w ogóle w grupie pacjentów, u których nie obserwowano zmian kostnych. Ponadto pojedynczy allel T występował istotnie częściej w grupie z *Z*-score<-1,00, niż u dzieci o prawidłowym wyniku badania densytometrycznego, co może wskazywać na związaną z nim predyspozycję do rozwoju osteoporozy. W przypadku pozostałych jedenastu SNP nie stwierdzono obecności istotnych statystycznie różnic w częstości występowania poszczególnych ich wariantów pomiędzy pacjentami z zespołem nerczykowym i obniżoną gęstością mineralną kości, pacjentami z zespołem nerczykowym i prawidłową gęstością mineralną kości oraz grupą kontrolną dzieci zdrowych.

Analiza niezrównoważenia sprzężeń wybranych SNP genu *LRP5* wykazała istotne różnice w jego strukturze pomiędzy trzema ocenianymi grupami. W grupie pacjentów z zespołem nerczycowym i obniżoną gęstością mineralną kości stwierdzono obecność bloku haplotypowego pomiędzy SNP rs491347, rs2306862 i rs1784235, czego nie obserwowano w grupie pacjentów z zespołem nerczycowym i prawidłową gęstością mineralną kości oraz w grupie kontrolnej, co może świadczyć o jego znaczeniu jako czynnika predysponującego do rozwoju osteoporozy. W grupie dzieci z zespołem nerczycowym i prawidłowym wynikiem badania densytometrycznego kości stwierdzono natomiast obecność bloku haplotypowego pomiędzy SNP rs4988300, rs634008 i rs312023, którego obecności nie stwierdzono w grupie pacjentów z obniżoną gęstością mineralną kości. Może mieć on zatem znaczenie ochronne dla szkieletu osiowego w zakresie zmian metabolizmu kostnego pod wpływem czynników środowiskowych.

Najważniejszym wnioskiem, wynikającym z przeprowadzonej analizy porównawczej wydaje się fakt znacznie większego podobieństwa struktury genu *LRP5* w zakresie badanych polimorfizmów pomiędzy grupą dzieci z zespołem nerczycowym i prawidłową strukturą kostną i grupą kontrolną dzieci zdrowych, niż w przypadku dzieci z zespołem nerczycowym i obniżoną gęstością mineralną kości. Wyniki przeprowadzonych badań, mogą w przyszłości pozwolić na wyselekcjonowanie grupy pacjentów zwiększonego ryzyka rozwoju osteoporozy, również w wieku późniejszym, niezależnie od płci, masy ciała i wyjściowych parametrów oceny densytometrycznej w wieku dziecięcym oraz grupy pacjentów dziecięcych, leczonych glikokortykosteroidami o potencjalnym niekorzystnym rokowaniu w zakresie ryzyka rozwoju zmian kostnych.

9. Abstract

The variability of the human genome is determined in about 80% by single nucleotide polymorphisms, resulting from mutations selectively established in the population, which are strictly related to the individual alleles incidence. Specific SNPs and their haplotype blocks based on the inclination to the coinheritance referred to as linkage disequilibrium, often constitute a protective or predisposing factor to the development of various disorders. Both the isolated single nucleotide polymorphisms frequency identification and the analysis of their interdependence might be useful forecasting the incidence and clinical course of different diseases, including bone turnover disturbances. In the group of patients affected by a genetic predisposition to the development of osteoporotic changes, the occurrence of additional environmental trigger factors, such as steroidotherapy can lead to the decline in bone mineral density and the beginning of unfavorable remodeling.

Idiopathic nephrotic syndrome, which is the clinical manifestation of chronic glomerulonephritis, annually affecting in approximation 16 per 100,000 children in Poland. The symptoms, resulting from the uncontrolled growth of the permeability of the glomerular filtration barrier, are recurrent and in some patients, leading to the development of end-stage chronic renal failure. The etiology of INS, still ambiguous and certainly multifactorial, has for years been tied with impaired balance between cytokines of Th1 and Th2 helper lymphocytes presence and the blood vessels increasing permeability factor, probably belonging to a group of interleukins. In view of the above the base treatment of the idiopathic nephrotic syndrome remains glucocorticoids. In first episode of INS prednisone supply is continued for a period of four to six months, with a significant initial dose 2mg/kg/24h and can be an important trigger factor for the reduction of bone mineral density of developing skeleton and as a consequence, the presence of pathological fractures, and even permanent disability. However literature sources and own observations note that despite the standardization of INS treatment, the number of pediatric patients who develop bone adverse changes is limited. This raises the question of additional, not modifiable, molecular underpinnings of osteoporosis developing risk in prepubertal age children.

The presented analysis was designed to evaluate the twelve *LRP5* gene single nucleotide polymorphisms rs3736228, rs491347, rs312009, rs556442, rs1784235, rs41494349, rs2306862, rs3736229, rs312016, rs4988300, rs634008 and rs312023 as a potential molecular basis of bone remodeling and the development of low-energy bone fracture risk in prepubertal age children from Greater Poland, treated with corticosteroids because of idiopathic nephrotic syndrome and to find an association at the DNA level, including linkage disequilibrium, between selected SNPs with the risk of lower BMD in the bone densitometry.

The results analysis indicates that there is a statistically significant difference in the incidence of the gene *LRP5* SNP rs312016 (CC / CT / TT) between patients with nephrotic syndrome and decreased bone mineral density, and patients with nephrotic syndrome and normal densytometry scan. The p-value for this correlation was 0,05. SNP rs312016 variant CC occurred in the study group with normal BMD statistically significantly higher than in the study group with Z-score value <-1.00, and his expression showed a downward trend in patients characterized by unfavorable bone remodeling. The value of the odds ratio OR for rs312016 was 4,050, which may indicate a correlation between the occurrence of the variant CT and adverse changes in bone mineral density in children with nephrotic syndrome treated with glucocorticoids. It was also found that SNP rs312016 TT variant present in one of the patients in the study group with low BMD, did not occur at all in the group of patients with no bone lesions, and furthermore a single T allele was much more common in the group of Z-score value <-1.00, than in children with normal densytometry result, which may indicate an association between rs312016 allele T predisposition and the development of osteoporosis. In the remaining eleven SNPs were not found statistically significant differences in the frequency of its individual variants occurrence between patients with nephrotic syndrome and decreased bone mineral density, patients with nephrotic syndrome and normal bone mineral density and a control group of healthy children.

The *LRP5* gene selected SNPs linkage disequilibrium analysis showed significant differences in the structure between the three groups assessed. In patients with nephrotic syndrome and decreased bone mineral density there was detected the haplotype block between SNPs rs491347, rs2306862 and rs1784235, that was not observed in patients with nephrotic syndrome and normal bone mineral density and in

the control group, which may be indicative of its importance as an osteoporosis development predisposing factor. In the group of children with nephrotic syndrome and normal bone densitometry test result was found the presence of haplotype block between SNPs rs4988300, rs634008 and rs312023, that wasn't observed in patients with low bone mineral density. It may act as bone mineral concentration protective factor in the axial skeleton.

The most important conclusion resulting from these comparisons is that *LRP5* gene structure for studied polymorphisms is much more similar between the group of children with nephrotic syndrome and normal bone structure and a control group of healthy children than in children with nephrotic syndrome and decreased bone mineral density. The results of the research have the potential to allow the selection of a group of patients with a high risk of osteoporosis, even in later life, regardless of gender, body weight and baseline characteristics densitometric evaluation in childhood and a group of pediatric patients treated with corticosteroids for potential unfavourable bone mass density prognosis.

10. Aneks

10.1. Wykaz tabel

Tabela 1. Charakterystyka grupy badanej	43
Tabela 2. Ocena średnich wartości parametrów laboratoryjnych w grupie badanej u pacjentów z obniżoną i prawidłową wartością Z-score po 3-6 miesiącach steroidoterapii.....	44
Tabela 3. Ocena średnich wartości wybranych parametrów laboratoryjnych w grupie badanej u pacjentów z obniżoną i prawidłową wartością Z-score.....	45
Tabela 4. Uśrednione parametry biochemiczne stanu odżywienia pacjentów w grupie badanej u pacjentów z obniżoną i prawidłową wartością Z-score.....	46
Tabela 5. Choroby współwystępujące u pacjentów z grupy badanej z obniżoną i prawidłową wartością Z-score	47
Tabela 6. Parametry promieniowania –aparatu GE Lunar	49
Tabela 7. Wyniki badania densytometrycznego	51
Tabela 8. Wyniki badania densytometrycznego	53
Tabela 9. Wzór ogólny na wartość Z-score dla populacji dzieci warszawskich wg interpretacji Jaworskiego i Płudowskiego.....	56
Tabela 10. Wykorzystane odczynniki do izolacji całkowitego genomowego DNA	58
Tabela 11. Sondy TaqMan Applied Biosystems zastosowane w reakcji RQ-PCR.....	61
Tabela 12. Parametry programu amplifikacyjnego reakcji real time PCR z sondami TaqMan	62
Tabela 13. Odczynniki wykorzystane do reakcji real-time PCR z sondami typu TaqMan	62
Tabela 14. Skład mieszaniny reakcyjnej real-time PCR z sondami typu TaqMan	63
Tabela 15. Analizowane SNP genu <i>LRP5</i> (w oparciu o International HapMap Project)	66
Tabela 16. Częstości alleli i genotypów zbadanych polimorfizmów SNP w genie <i>LRP5</i> u pacjentów w grupach badanych i w grupie kontrolnej.	67
Tabela 17. Analiza statystyczna SNP rs3736228 genu <i>LRP5</i> w grupach badanych	70
Tabela 18. Analiza statystyczna SNP rs491347 genu <i>LRP5</i> w grupach badanych	70
Tabela 19. Analiza statystyczna SNP rs312009 genu <i>LRP5</i> w grupach badanych	71
Tabela 20. Analiza statystyczna SNP rs556442 genu <i>LRP5</i> w grupach badanych	71
Tabela 21. Analiza statystyczna SNP rs1784235 genu <i>LRP5</i> w grupach badanych	72
Tabela 22. Analiza statystyczna SNP rs2306862 genu <i>LRP5</i> w grupach badanych	72
Tabela 23. Analiza statystyczna SNP rs312016 genu <i>LRP5</i> w grupach badanych	73
Tabela 24. Analiza statystyczna SNP rs4988300 genu <i>LRP5</i> w grupach badanych	73
Tabela 25. Analiza statystyczna SNP rs634008 genu <i>LRP5</i> w grupach badanych	74
Tabela 26. Analiza statystyczna SNP rs312023 genu <i>LRP5</i> w grupach badanych	74
Tabela 27. Analiza statystyczna SNP rs3736228 genu <i>LRP5</i> w grupie badanej z zespołem nerczycowym i obniżoną gęstością mineralną kości oraz w grupie kontrolnej.....	75
Tabela 28. Analiza statystyczna SNP rs491347 genu <i>LRP5</i> w grupie badanej z zespołem nerczycowym i obniżoną gęstością mineralną kości oraz w grupie kontrolnej.....	75

Tabela 29. Analiza statystyczna SNP rs312009 genu <i>LRP5</i> w grupie badanej z zespołem nerczycowym i obniżoną gęstością mineralną kości oraz w grupie kontrolnej.....	76
Tabela 30. Analiza statystyczna SNP rs556442 genu <i>LRP5</i> w grupie badanej z zespołem nerczycowym i obniżoną gęstością mineralną kości oraz w grupie kontrolnej.....	76
Tabela 31. Analiza statystyczna SNP rs1784235 genu <i>LRP5</i> w grupie badanej z zespołem nerczycowym i obniżoną gęstością mineralną kości oraz w grupie kontrolnej.....	77
Tabela 32. Analiza statystyczna SNP rs2306862 genu <i>LRP5</i> w grupie badanej z zespołem nerczycowym i obniżoną gęstością mineralną kości oraz w grupie kontrolnej.....	77
Tabela 33. Analiza statystyczna SNP rs312016 genu <i>LRP5</i> w grupie badanej z zespołem nerczycowym i obniżoną gęstością mineralną kości oraz w grupie kontrolnej.....	78
Tabela 34. Analiza statystyczna SNP rs4988300 genu <i>LRP5</i> w grupie badanej z zespołem nerczycowym i obniżoną gęstością mineralną kości oraz w grupie kontrolnej.....	78
Tabela 35. Analiza statystyczna SNP rs634008 genu <i>LRP5</i> w grupie badanej z zespołem nerczycowym i obniżoną gęstością mineralną kości oraz w grupie kontrolnej.....	79
Tabela 36. Analiza statystyczna SNP rs312023 genu <i>LRP5</i> w grupie badanej z zespołem nerczycowym i obniżoną gęstością mineralną kości oraz w grupie kontrolnej.....	79

10.2. Wykaz rycin

Rycina 1 Częstość występowania genotypów rs312016 genu <i>LRP5</i> w grupach badanych w zależności od wartości Z-score oraz w grupie kontrolnej.....	69
Rycina 2 Niezrównoważenie sprzężeń w genie <i>LRP5</i> dla pacjentów z zespołem nerczycowym i obniżoną gęstością mineralną kości, w oparciu o algorytm Gabriel et al.	80
Rycina 3 Niezrównoważenie sprzężeń w genie <i>LRP5</i> dla pacjentów z zespołem nerczycowym i prawidłową gęstością mineralną kości, w oparciu o algorytm Gabriel et al.	81
Rycina 4 Niezrównoważenie sprzężeń w genie <i>LRP5</i> dla pacjentów z grupy kontrolnej, w oparciu o algorytm Gabriel et al.....	82

10.3. Wykaz załączników

Załącznik 1. Wzór świadomej zgody na udział w badaniach genetycznych

Załącznik 2 . Zgoda Komisji Bioetycznej na prowadzenie badań naukowych

Załącznik 3. Ankieta dla pacjentów z zespołem nerczycowym leczonych glikokortykosteroidami

Załącznik 4. Ankieta dla osób zdrowych

Załącznik 5. Obliczona gęstość mineralna kości (ang. bone mineral apparent density, BMAD) dla odcinka lędźwiowego kręgosłupa L2-L4 w grupie badanej wg. interpretacji Krögera i wsp.

Załącznik 6. Stężenie DNA i ocena czystości uzyskanego DNA w grupie badanej z zespołem nerczycowym i obniżoną gęstością mineralną kości

Załącznik 7. Stężenie DNA i ocena czystości uzyskanego DNA w grupie badanej z zespołem nerczycowym i prawidłową gęstością mineralną kości

Załącznik 8. Stężenie DNA i ocena czystości uzyskanego DNA w grupie kontrolnej

Załącznik 9. Genotypy polimorfizmów SNP w genie *LRP5* u pacjentów z zespołem nerczycowym i obniżoną gęstością mineralną kości

Załącznik 10. Genotypy polimorfizmów SNP w genie *LRP5* u pacjentów z zespołem nerczycowym i prawidłową gęstością mineralną kości

Załącznik 11. Genotypy polimorfizmów SNP w genie *LRP5* u pacjentów z grupy kontrolnej

Załącznik 1. Wzór świadomej zgody na udział w badaniach genetycznych

INFORMACJE O UDZIALE W BADANIU NAUKOWYM

Cel badania

Osteoporoza jest wieloczynnikowym schorzeniem układu kostnego, prowadzącym do obniżenia gęstości mineralnej kości i niekorzystnej przebudowy ich mikroszkieletu. Dotyka szacunkowo około 75 mln ludzi na świecie. Konsekwencją osteoporozy jest utrata naturalnej wytrzymałości kości na obciążenia, związane z codzienną aktywnością fizyczną, a co za tym idzie zwiększona skłonność do wystąpienia złamania, mogącego prowadzić do trwałego kalectwa. Wśród pacjentów z osteoporozą dużą grupę stanowią osoby leczone glikokortykosteroidami, które niekorzystnie wpływają na metabolizm kostny. Jednym ze schorzeń, wymagających glikokortykosteroidoterapii, jest idiopatyczny zespół nerczycowy, choroba przejawiająca się niekontrolowaną utratą białka z moczem. Dotychczasowe badania wykazały jednak, że osteoporoza może mieć podłoże genetyczne, niezależne od czynników środowiskowych. Zidentyfikowano wiele genów potencjalnie odpowiedzialnych za rozwój niekorzystnych zmian w strukturze kości, wśród nich polimorfizmy czyli różnice na poziomie pojedynczych nukleotydów w genie *LRP5*. Celem naszego badania jest ustalenie czy w populacji dzieci z Wielkopolski w wieku przedpokwitaniowym leczonych glikokortykosteroidami z powodu idiopatycznego zespołu nerczycowego istnieje podłoże genetyczne związane ze zmiennościami w obrębie genu *LRP5*, mogące w sposób niezależny od stosowanej terapii, predysponować do rozwoju osteoporozy. Otrzymane wyniki pozwolą na wyodrębnienie pacjentów wysokiego ryzyka niekorzystnych zmian kostnych w grupie osób leczonych steroidami z powodu idiopatycznego zespołu nerczycowego i objęcie ich wzmożoną profilaktyką zmian kostnych. Aby było to możliwe niezbędne jest odniesienie otrzymanych wyników badań pacjentów do grupy kontrolnej osób zdrowych, które mogą reprezentować Państwa dzieci.

Procedura badania

Udzielenie odpowiedzi na pytania zawarte w specjalnie przygotowanej ankiecie.

Pobrana próbki krwi (10ml).

Poufność

Dane zebrane w czasie Państwa uczestnictwa w badaniu, łącznie z danymi osobowymi, będą traktowane jako poufne. Identyfikacja Państwa danych będzie dokonana poprzez nadanie im numeru ewidencyjnego, co pozwoli na zachowanie ich anonimowości. Weryfikacja danych osobowych odbędzie się wyłącznie w ośrodku badawczym i będzie dokonana przez lekarzy i badaczy uczestniczących w projekcie, pod rygorem zachowania tajemnicy służbowej. Dane te nie będą udostępniane innym podmiotom. Wyniki powyższego badania naukowego mogą być publikowane lub prezentowane w trakcie spotkań naukowych również wyłącznie z zachowaniem anonimowości osób w nim uczestniczących.

ŚWIADOMA ZGODA NA UDZIAŁ W BADANIU

Wyrażam zgodę na udział mojego dziecka w badaniu naukowym dotyczącym molekularnego podłoża osteoporozy.

Zapoznałam/em się z informacją o badaniu i rozumiem jej treść.

Wyrażam zgodę na przechowywanie i przetwarzanie moich / mojego dziecka danych osobowych zebranych dla celów badania. Zostałam/em poinformowana/y, że mam prawo do wglądu do moich / mojego dziecka danych osobowych, do ich poprawiania, uzupełniania bądź wycofania z bazy danych.

Imię i nazwisko:.....

Data:..... Czytelny podpis.....

Załącznik 2. Zgoda Komisji Bioetycznej na prowadzenie badań naukowych część I



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIwersytecie Medycznym
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Collegium Maius
ul. Fredry 10
61-701Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
fax. (+48 61) 854 61 07
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 592/12

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentystry (Dz. U. 1997, Nr 28, poz. 153); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 11 marca 2005 r. w sprawie szczegółowych wymagań Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2005, Nr 57, poz. 500); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. z 2004r. Nr 53, poz. 533 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 4 listopada 2008r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 15 listopada 2010 r. w sprawie wzorów wniosków przedkładanych w związku z badaniem klinicznym, wysokości opłat za złożenie wniosków oraz sprawozdania końcowego z wykonania badania klinicznego (Dz. U. 2010r. nr 222 poz. 1453, z późn. zm.) kierując się Zasadami Prawidłowego Prowadzenia Badań Klinicznych - GCP - opracowanymi w oparciu o Deklarację Helsińską,

Komisja, na posiedzeniu w dniu: 14 czerwca 2012 r.

rozpatrzyła wniosek, który przedstawiła Pani:

dr hab. Danuta Ostalska- Nowicka prof. UM

w sprawie prowadzenia badań w

Klinice Kardiologii i Nefrologii Dziecięcej UM w Poznaniu

Główny badacz: lek. med. Magdalena Silska

Członkowie zespołu

badawczego:

prof. dr hab. Jacek Zachwieja

dr hab. Michał Nowicki prof. UM

mgr Katarzyna Zaorska

prof. dr hab. Elżbieta Kaczmarek

Temat badań:

"Analiza niezrównoważenia sprzężeń genu LRP5 w aspekcie podatności zmian gęstości mineralnej kości u dzieci z zespołem nerczycowym leczonych glikokortykosteroidami".

Komisja wyraża zgodę na prowadzenie badań

KOMISJA BIOETYCZNA
przy
UNIwersytecie Medycznym
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
61-701 Poznań, ul. Fredry 10
tel. (+48) 61 854 62 51, 61 854 60 60
fax (+48) 61 854 61 07

potwierdza się zgodność
z oryginałem

2013 -10- 1 0

Handwritten signature

Przewodniczący Komisji

Handwritten signature

prof. dr hab. med. Paweł Chęciński

Załącznik 2. Zgoda Komisji Bioetycznej na prowadzenie badań naukowych część II

Podpisy członków Komisji Bioetycznej - Dotyczy Uchwały nr 592/12 z dnia 14.06.2012r.

prof. dr hab. JANUSZ WIŚNIEWSKI

prof. dr hab. ZYGMUNT ADAMSKI

dr KRYSZYNA BABIAK

dr hab. MACIEJ KRAWCZYŃSKI prof. UM

mgr JOLANTA ŁOJKO-KOŁODZIEJCZAK

mgr KRYSZYNA MALINGER

dr hab. n. med. ANDRZEJ MARSZAŁEK

dr hab. MACIEJ OWECKI

prof. dr hab. WOJCIECH SŁUŻEWSKI

dr hab. ROBERT SPACZYŃSKI prof. UM

dr med. PIOTR TOMCZAK

prof. dr hab. JOANNA TWAROWSKA-HAUSER

ks. prof. dr hab. JERZY TROSKA

prof. dr hab. HENRYK WYSOCKI

KOMISJA BIOETYCZNA
przy
UNIwersytecie Medycznym
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
61-701 Poznań, ul. Fredry 10
tel. (+48) 61 854 62 51, 61 854 60 60
fax (+48) 61 854 61 07

potwierdza się zgodność
z oryginałem

2013-10-10

Załącznik 2. Zgoda Komisji Bioetycznej na prowadzenie badań naukowych część III

KOMISJA BIOETYCZNA
przy
UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
61-701 Poznań, ul. Fredry 10
tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
fax (+48 61) 854 61 07

SKŁAD OSOBOWY KOMISJI BIOETYCZNEJ

z dnia ...14.06.2012r.

Lp.	Imię i Nazwisko	Specjalność	Miejsce Pracy
1.	Przewodniczący Komisji prof. dr hab. Paweł Chęciński	chirurgia ogólna, naczyniowa i angiologia	Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyniowej oraz Angiologii UM, ZOZ MSWiA ul. Dojazd 34, Poznań
2.	Z-ca Przewodniczącego Komisji prof. dr hab. Janusz Wiśniewski	filozof	Wydział Nauk Politycznych i Dziennikarstwa UAM, ul. Umultowska 89A, Poznań
3.	prof. dr hab. Zygmunt Adamski	dermatologia i wenerologia	Zakład Mikologii Lekarskiej i Dermatologii UM, ul. Juraszów 7/19, Poznań
4.	dr Krystyna Babiak	prawnik	Okręgowa Izba Radców Prawnych w Poznaniu, ul. Chwaliszewo 69, Poznań
5.	dr hab. Maciej Krawczyński prof. UM	genetyka kliniczna, okulistyka	Katedra i Zakład Genetyki Medycznej UM ul. Grunwaldzka 55, Poznań
6.	mgr Jolanta Łojko-Kołodziejczak	pielęgniarka	Pielęgniarka Oddziałowa Izby Przyjęć Pediatrii Szpitala Klinicznego im. Karola Jonschera UM w Poznaniu, ul. Szpitalna 27/33, Poznań
7.	mgr Krystyna Malinger	farmaceuta	Apteka Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego UM, ul. Polna 33, Poznań
8.	dr hab. n. med. Andrzej Marszałek	patomorfologia	Pracownia Mikroskopii Elektronowej Katedry Patomorfologii Klinicznej UM, ul. Przybyszewskiego 49, Poznań
9.	dr hab. n. med. Maciej Owecki	choroby wewnętrzne, endokrynologia	Klinika Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych UM, ul. Przybyszewskiego 49, Poznań
10.	prof. dr hab. Wojciech Służewski	pediatria, neurologia dziecięca, choroby zakaźne	Klinika Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej UM ul. Szpitalna 27/33, Poznań
11.	dr hab. Robert Spaczyński prof. UM	ginekologia i położnictwo	Klinika Niepłodności i Endokrynologii Rozrodu UM, ul. Polna 33, 60-535 Poznań
12.	dr med. Piotr Tomczak	onkologia kliniczna, radioterapia	Klinika Onkologii UM, ul. Szamarzewskiego 82/84, Poznań
13.	prof. dr hab. Joanna Twarowska-Hauser	psychiatria	Klinika Psychiatrii Dorosłych, Zakład Genetyki w Psychiatrii UM, ul. Szpitalna 27/33, Poznań
14.	ks. prof. dr hab. Jerzy Troska	teologia, etyka	Wydział Teologiczny UAM, ul. Wieżowa 2/4, Poznań
15.	prof. dr hab. Henryk Wysocki	choroby wewnętrzne, kardiologia	Klinika Intensywnej Terapii Kardiologicznej i Chorób Wewnętrznych UM ul. Przybyszewskiego 49, Poznań

KOMISJA BIOETYCZNA
przy
UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
61-701 Poznań, ul. Fredry 10
tel. (+48) 61 854 62 51, 61 854 60 60
fax (+48) 61 854 61 07

2013-10-10
z oryginałem

Załącznik 3. Ankieta dla pacjentów z zespołem nercycowym leczonych glikokortykosteroidami

wersja czerwiec 2011 (według prof. dr F. Hildebrandt) – część I

Informacje ogólne o pacjencie:

Nazwisko:.....Imię:.....

data urodzenia:.....

K

M

Wzrost.....cm

Pochodzenie:

polskie

inne europejskie

inne.....

Pacjent z ciąży.....

Poród: siłami natury

poród kleszczowy

cięcie cesarskie

Zespół nercycowy:

Wiek zachorowania:.....

Wynik biopsji nerki:.....

Odpowiedź na glikokortykosteroidy:.....

Inne leki:.....

Zespół nercycowy wśród rodziców/krewnych:

Tak

Nie

Matka

Brat

Ojciec

Siostra

Inni.....

Załącznik 3. Ankieta dla pacjentów z zespołem nercycowym leczonych glikokortykosteroidami

wersja czerwiec 2011 (według prof. dr F. Hildebrandt) – część II

Dodatkowe informacje:

Czy Państwa dziecko cierpi/cierpiało na następujące choroby:

- | | | |
|---|---|--|
| <input type="checkbox"/> Głuchota | <input type="checkbox"/> Niski wzrost | <input type="checkbox"/> Wady układu moczowego |
| <input type="checkbox"/> Ślepota | <input type="checkbox"/> Dysmorfia twarzy | <input type="checkbox"/> Wady serca |
| <input type="checkbox"/> Małogłowie | <input type="checkbox"/> Sześciopalczałość | <input type="checkbox"/> Alergie |
| <input type="checkbox"/> Opóźnienie umysłowe | <input type="checkbox"/> Nowotwory/guzy | <input type="checkbox"/> Cukrzyca typu I-ego |
| <input type="checkbox"/> Cukrzyca typu II-ego | <input type="checkbox"/> deformacje kostne | <input type="checkbox"/> Łamliwość kości |
| <input type="checkbox"/> Osteoporoza | <input type="checkbox"/> Dysplazja kręgowo-nasadowa | |
| <input type="checkbox"/> WZW B/C | <input type="checkbox"/> Choroby autoimmunologiczne | |
| <input type="checkbox"/> Choroby tarczycy | <input type="checkbox"/> Choroby neurologiczne | |
| <input type="checkbox"/> Choroby kory nadnerczy | <input type="checkbox"/> Choroby przewodu pokarmowego | |

Czy ktoś z bliskich pacjenta cierpi na wymienione wyżej choroby? Jeśli tak to kto i na jakie?

- 1.....
- 2.....
- 3.....

Załącznik 3. Ankieta dla pacjentów z zespołem nercycowym leczonych glikokortykosteroidami

wersja czerwiec 2011 (według prof. dr F. Hildebrandt) – część III

Czy Państwa dziecko dziecko przyjmuje/przyjmowało, któreś z poniższych leków:

heparyna acenokumarol lub inne leki przeciwkrzepliwe

metotreksat hormony tarczycowe fenytoina

barbiturany leki nasenne

Załącznik 4. Ankieta dla osób zdrowych

wersja czerwiec 2011 (według prof. dr F. Hildebrandt) – część I

Informacje ogólne o pacjencie:

Nazwisko:.....Imię:.....

data urodzenia:.....

K

M

Wzrost.....cm

Pochodzenie:

polskie

inne europejskie

inne.....

Pacjent z ciąży.....

Poród: siłami natury

poród kleszczowy

cięcie cesarskie

Zespół nerczycowy wśród rodziców/krewnych:

Tak

Nie

Matka

Brat

Ojciec

Siostra

Inni.....

Załącznik 4. Ankieta dla osób zdrowych

wersja czerwiec 2011 (według prof. dr F. Hildebrandt) – część II

Dodatkowe informacje:

Czy Państwa dziecko cierpi/cierpiało na następujące choroby:

- | | | |
|---|---|--|
| <input type="checkbox"/> Głuchota | <input type="checkbox"/> Niski wzrost | <input type="checkbox"/> Wady układu moczowego |
| <input type="checkbox"/> Ślepotą | <input type="checkbox"/> Dysmorfia twarzy | <input type="checkbox"/> Wady serca |
| <input type="checkbox"/> Małogłowie | <input type="checkbox"/> Sześciopalczałość | <input type="checkbox"/> Alergie |
| <input type="checkbox"/> Opóźnienie umysłowe | <input type="checkbox"/> Nowotwory/guzy | <input type="checkbox"/> Cukrzyca typu I-ego |
| <input type="checkbox"/> Cukrzyca typu II-ego | <input type="checkbox"/> deformacje kostne | <input type="checkbox"/> Łamliwość kości |
| <input type="checkbox"/> Osteoporoza | <input type="checkbox"/> Dysplazja kręgowo-nasadowa | |
| <input type="checkbox"/> WZW B/C | <input type="checkbox"/> Choroby autoimmunologiczne | |
| <input type="checkbox"/> Choroby tarczycy | <input type="checkbox"/> Choroby neurologiczne | |
| <input type="checkbox"/> Choroby kory nadnerczy | <input type="checkbox"/> Choroby przewodu pokarmowego | |

Czy Państwa dziecko dziecko przyjmuje/przyjmowało, któreś z poniższych leków:

- | | | |
|--------------------------------------|--|------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> heparyna | <input type="checkbox"/> acenokumarol lub inne leki przeciwkrzepliwe | |
| <input type="checkbox"/> metotreksat | <input type="checkbox"/> hormony tarczycowe | <input type="checkbox"/> fenytoina |
| <input type="checkbox"/> barbiturany | <input type="checkbox"/> leki nasenne | |

Załącznik 5. Obliczona gęstość mineralna kości (ang. bone mineral apparent density, BMAD) dla odcinka lędźwiowego kręgosłupa L2-L4 w grupie badanej wg. interpretacji Krögera i wsp.

Lp.	BMD L2-L4 [g/cm ²]	BMAD L2-L4 [g/cm ²]
Pacjenci o wartości Z-score < -1,00		
1	0,62	0,22
2	0,53	0,23
3	0,51	0,25
4	0,55	0,27
5	0,43	0,18
6	0,63	0,24
7	0,53	0,26
8	0,53	0,22
9	0,63	0,29
10	0,56	0,22
11	0,52	0,22
12	0,61	0,30
13	0,51	0,26
14	0,65	0,23
Pacjenci o wartości Z-score > -1,00		
1	0,67	0,29
2	0,63	0,23
3	0,80	0,32
4	0,73	0,24
5	0,77	0,31
6	0,69	0,31
7	0,58	0,25
8	0,59	0,25
9	0,80	0,28
10	0,78	0,29
11	0,71	0,31
12	0,53	0,24
13	0,70	0,30
14	0,57	0,27
15	0,96	0,35
16	0,64	0,24
17	0,52	0,20
18	0,63	0,27
19	0,57	0,30
20	0,67	0,25
21	0,66	0,28
22	0,67	0,28
23	0,65	0,24
24	0,67	0,31
25	0,79	0,28
26	1,07	0,38

Załącznik 6. Stężenie DNA i ocena czystości uzyskanego DNA w grupie badanej z zespołem nerczycowym i obniżoną gęstością mineralną kości

Lp.	Kod pacjenta	Stężenie DNA [ng/ μl]	Absorbancja fal 260/280 [nm]
1	01-01	16,6	1,83
2	01-02	15,2	1,95
3	01-03	21,2	1,86
4	01-04	22,4	1,82
5	01-05	20,2	1,86
6	01-06	20,0	1,93
7	01-07	9,7	1,74
8	01-08	29,2	1,93
9	01-09	15,5	1,87
10	01-10	46,4	1,85
11	01-11	14,5	1,87
12	01-12	19,5	1,83
13	01-13	40,4	1,87
14	01-14	13,7	1,74

Załącznik 7. Stężenie DNA i ocena czystości uzyskanego DNA w grupie badanej z zespołem nerczycowym i prawidłową gęstością mineralną kości

Lp.	Kod pacjenta	Stężenie DNA [ng/ μ l]	Absorbancja fal 260/280 [nm]
1	02-01	12,9	1,77
2	02-02	18,0	1,86
3	02-03	19,5	1,85
4	02-04	34,5	1,90
5	02-05	12,4	1,85
6	02-06	19,7	1,94
7	02-07	33,9	1,83
8	02-08	15,9	1,90
9	02-09	6,3	1,81
10	02-10	16,4	1,93
11	02-11	18,3	2,05
12	02-12	16,8	1,77
13	02-13	20,4	1,86
14	02-14	38,2	1,89
15	02-15	18,1	1,80
16	02-16	18,0	1,86
17	02-17	40,5	1,90
18	02-18	13,8	1,86
19	02-19	9,6	1,85
20	02-20	22,3	1,95
21	02-21	19,2	1,84
22	02-22	60,0	1,88
23	02-23	38,1	1,82
24	02-24	14,4	1,90
25	02-25	28,7	1,86
26	02-26	11,3	1,94

Załącznik 8. Stężenie DNA i ocena czystości uzyskanego DNA w grupie kontrolnej

Lp.	Kod pacjenta	Stężenie DNA [ng/ μl]	Absorbancja fal 260/280 [nm]
1	03-01	14,8	1,79
2	03-02	20,8	1,86
3	03-03	18,3	1,87
4	03-04	9,3	1,89
5	03-05	10,0	1,93
6	03-06	15,5	1,87
7	03-07	22,3	1,86
8	03-08	14,9	1,66
9	03-09	15,5	1,93
10	03-10	20,8	1,79
11	03-11	23,0	1,85
12	03-12	23,1	1,82
13	03-13	16,5	1,88
14	03-14	24,2	1,78
15	03-15	16,9	1,94
16	03-16	28,8	1,82
17	03-17	21,3	1,83
18	03-18	19,9	1,78
19	03-19	15,9	1,82
20	03-20	19,7	1,88
21	03-21	13,1	1,71
22	03-22	18,6	1,85
23	03-23	20,0	1,95
24	03-24	21,7	1,68
25	03-25	20,0	1,83
26	03-26	19,9	1,80
27	03-27	17,5	1,84
28	03-28	12,3	1,93

29	03-29	15,7	1,96
30	03-30	28,5	1,86
31	03-31	4,0	1,54
32	03-32	17,8	1,75
33	03-33	14,6	1,90
34	03-34	13,5	1,93
35	03-35	21,0	1,90
36	03-36	3,6	1,49
37	03-37	23,5	1,89
38	03-38	34,7	1,80
39	03-39	23,5	1,84
40	03-40	17,7	1,91
41	03-41	47,7	1,86
42	03-42	16,4	1,87
43	03-43	26,2	1,95
44	03-44	20,4	1,74
45	03-45	26,7	1,72
46	03-46	19,7	1,71
47	03-47	19,7	1,68
48	03-48	27,5	1,87
49	03-49	35,4	1,83
50	03-50	23,2	1,93
51	03-51	48,58	1,87
52	03-52	32,0	1,98
53	03-53	39,6	1,87
54	03-54	28,4	1,94
55	03-55	23,2	1,95
56	03-56	15,9	1,94
57	03-57	30,1	1,81

58	03-58	25,4	1,84
59	03-59	19,8	2,00
60	03-60	38,1	1,86
61	03-61	23,4	1,99
62	03-62	24,7	1,82
63	03-63	28,3	1,91
64	03-64	18,3	1,77
65	03-65	25,9	2,06
66	03-66	20,6	1,46
67	03-67	29,5	1,92
68	03-68	60,0	1,84
69	03-69	24,3	1,88
70	03-70	35,3	2,11
71	03-71	39,5	1,96
72	03-72	20,9	1,61
73	03-73	34,1	1,68
74	03-74	41,9	1,81
75	03-75	24,4	1,82
76	03-76	28,4	1,75
77	03-77	57,5	1,79
78	03-78	33,8	1,80
79	03-79	23,6	1,69
80	03-80	29,5	1,78
81	03-81	32,5	1,81
82	03-82	45,2	1,79
83	03-83	38,4	1,83
84	03-84	32,9	1,84
85	03-85	27,6	1,79
86	03-86	26,4	1,83

87	03-87	35,5	1,87
88	03-88	32,7	1,90
89	03-89	43,4	1,88
90	03-90	31,3	1,96
91	03-91	26,8	1,91
92	03-92	22,8	1,97
93	03-93	24,0	1,92
94	03-94	36,5	1,96
95	03-95	30,7	1,93
96	03-96	25,8	1,73
97	03-97	26,6	1,83
98	03-98	32,0	1,91
99	03-99	32,7	1,94
100	03-100	32,3	1,88
101	03-101	28,0	1,81

Załącznik 9. Genotypy polimorfizmów SNP w genie *LRP5* u pacjentów z zespołem nerczycowym i obniżoną gęstością mineralną kości

Lp.	Kod pacjenta	rs3736228	rs491347	rs312009	rs556442	rs1784235	rs41494349	rs2306862	rs3736229	rs312016	rs4988300	rs634008	rs312023
1	01-01	CT	AG	CC	AG	CT	AA	CT	CC	CC	TT	CC	GG
2	01-02	CC	AA	CT	AA	TT	AA	CC	CC	TT	GG	TT	AA
3	01-03	CC	AG	TT	AG	CT	AA	CT	CC	CC	GT	CT	AG
4	01-04	CC	AA	CC	AA	TT	AA	CC	CC	CT	GT	CT	AG
5	01-05	CC	AA	CT	AA	TT	AA	CC	CC	CT	GG	TT	AA
6	01-06	CC	AA	TT	AG	TT	AA	CC	CC	CC	GT	CT	AG
7	01-07	CC	AA	CC	AA	TT	AA	CC	CC	CT	GG	TT	AA
8	01-08	CT	AG	CT	AG	CT	AA	CT	CC	CT	GT	CT	AG
9	01-09	CC	AA	TT	AA	TT	AA	CC	CC	CC	GT	TT	AA
10	01-10	CC	AA	CC	AA	TT	AA	CC	CC	CT	GT	CT	AG
11	01-11	CC	AA	CC	AG	TT	AA	CC	CC	CT	GG	CT	AG
12	01-12	CT	AG	CT	AG	CT	AA	CT	CC	CC	GG	CT	AG
13	01-13	CC	AA	CT	AA	TT	AA	CC	CC	CT	GG	TT	AA
14	11-14	CC	AA	CT	AA	TT	AA	CC	CC	CT	GT	TT	AA

Załącznik 10. Genotypy polimorfizmów SNP w genie *LRP5* u pacjentów z zespołem nerczycowym i prawidłową gęstością mineralną kości

Lp.	Kod pacjenta	rs3736228	rs491347	rs312009	rs556442	rs1784235	rs41494349	rs2306862	rs3736229	rs312016	rs4988300	rs634008	rs312023
1	02-01	CT	AG	TT	AG	CT	AA	CT	CC	CT	GG	TT	AA
2	02-02	CC	AA	CT	AA	TT	AA	CC	CC	CC	GT	CT	AG
3	02-03	CC	AA	TT	AA	TT	AA	CC	CC	CT	GG	TT	AA
4	02-04	CC	AG	CT	AG	CT	AA	CC	CC	CC	GT	CT	AG
5	02-05	CT	AG	CT	AG	CT	AA	CT	CC	CC	GT	CT	AG
6	02-06	CC	AA	CT	AG	TT	AA	CC	CC	CC	GT	CT	AG
7	02-07	CT	AG	CT	AG	CT	AA	CT	CC	CC	TT	CC	GG
8	02-08	CC	AA	CT	AA	TT	AA	CC	CC	CC	GT	CT	AG
9	02-09	CC	AA	CC	AG	TT	AA	CC	CC	CT	GT	CT	AG
10	02-10	CC	AG	CC	AG	CT	AA	CC	CC	CC	TT	CC	GG
11	02-11	CC	AA	CT	AA	TT	AA	CC	CC	CC	GT	TT	AA
12	02-12	CC	AA	CT	AA	TT	AA	CC	CC	CT	GT	CT	AG
13	02-13	CC	AA	TT	AA	TT	AA	CC	CC	CC	GG	TT	AA
14	02-14	CT	AG	CC	AG	CT	AA	CT	CC	CT	GG	TT	AA
15	02-15	CT	AG	CC	AG	CT	AA	CT	CC	CC	GT	CT	AG
16	02-16	CC	AA	CT	AA	TT	AA	CC	CC	CT	GG	TT	AA
17	02-17	CT	AG	CT	GG	CT	AA	CT	CC	CC	TT	CC	GG
18	02-18	CC	AA	CT	AA	TT	AA	CC	CC	CC	GT	TT	AA
19	02-19	CC	AG	CC	AG	CT	AA	CC	CC	CC	TT	CC	GG
20	02-20	CC	AG	TT	AG	CT	AA	CC	CC	CC	GT	CT	AG
21	02-21	CC	AA	TT	AA	TT	AA	CC	CC	CC	GT	CT	AG
22	02-22	CC	AA	CT	AG	TT	AA	CC	CC	CC	GT	CT	AG
23	02-23	CC	AA	TT	AA	TT	AA	CC	CC	CT	GG	TT	AA
24	02-24	CC	AG	CC	AG	CT	AA	CC	CC	CC	TT	CC	GG

25	02-25	CC	AA	CT	AA	TT	AA	CC	CC	CC	GT	TT	AA
26	02-26	CC	AA	CT	AA	TT	AA	CC	CC	CT	GT	CT	AG

Załącznik 11. Genotypy polimorfizmów SNP w genie *LRP5* u pacjentów z grupy kontrolnej

Lp.	Kod pacjenta	rs3736228	rs491347	rs312009	rs556442	rs1784235	rs41494349	rs2306862	rs3736229	rs312016	rs4988300	rs634008	rs312023
1	03-1	CC	AA	CT	AG	CT	AA	CC	CC	CC	GT	CT	AG
2	03-2	CC	AG	CC	AG	CT	AA	CC	CC	CT	GG	TT	AA
3	03-3	CC	AG	CT	AA	CT	AA	CC	CC	CT	GG	TT	AA
4	03-4	CC	AA	CT	AA	CT	AA	CC	CC	CT	GG	TT	AA
5	03-5	CC	AG	CC	AG	CC	AA	CT	CC	CC	TT	CC	GG
6	03-6	CC	AA	CC	AA	CT	AA	CC	CC	CT	GT	CT	AG
7	03-7	CC	AA	CT	AA	TT	AA	CC	CC	CT	GG	TT	AA
8	03-8	CT	AG	CC	GG	CC	AA	TT	CC	CC	TT	CC	GG
9	03-9	CC	AA	TT	AA	TT	AA	CC	CC	CC	GG	TT	AA
10	03-10	CC	AA	CT	AA	TT	AA	CC	CC	CC	GT	CT	AG
11	03-11	CC	AG	CC	AG	CT	AA	CT	CC	CT	GT	CT	AG
12	03-12	CC	AA	TT	AA	TT	AA	CC	CC	CC	GG	TT	AA
13	03-13	CT	AG	CC	AG	CT	AA	CT	CC	CC	TT	CT	AG
14	03-14	CC	AA	CC	AG	TT	AA	CC	CC	CC	TT	CC	GG
15	03-15	CT	AG	CC	AG	CT	AA	CT	CC	CT	GT	CT	AG
16	03-16	CC	AA	CT	AA	TT	AA	CC	CC	CT	GG	TT	AA
17	03-17	CC	AG	CT	AG	CT	AA	CT	CC	CC	GT	CT	AG
18	03-18	CC	AA	CT	AA	TT	AA	CC	CC	CT	GG	TT	AA
19	03-19	CC	AA	CC	AA	TT	AA	CC	CC	CC	TT	CC	GG
20	03-20	CC	AA	CT	AA	TT	AA	CC	CC	CC	GG	TT	AA
21	03-21	CC	AG	CT	AG	CT	AA	CC	CC	CC	GT	CT	AG
22	03-22	CC	AA	CC	AA	TT	AA	CC	CC	TT	GG	TT	AA

23	03-23	CT	AG	CC	GG	CT	AA	CT	CC	CT	GG	CT	AG
24	03-24	CC	AG	CT	AA	CT	AA	CT	CC	CC	GT	CT	AG
25	03-25	CC	AA	CC	AA	TT	AA	CC	CC	TT	GG	TT	AA
26	03-26	CT	AG	CC	AG	CT	AG	CT	CC	CC	TT	CC	GG
27	03-27	CC	AA	CC	AA	TT	AA	CC	CC	CC	TT	CC	GG
28	03-28	CC	AA	CC	AG	TT	AA	CC	CC	CT	GT	CT	AG
29	03-29	CT	GG	CC	GG	CC	AA	CT	CC	CT	GT	CT	AG
30	03-30	CC	AA	CT	AA	TT	AA	CC	CC	CC	GT	CT	AG
31	03-31	CC	AA	CT	AA	TT	AA	CC	CC	CT	GG	TT	AA
32	03-32	CT	AG	CC	AG	CT	AA	CT	CC	CC	TT	CT	AG
33	03-33	CT	AG	CC	AG	CT	AA	CT	CC	CC	TT	CC	GG
34	03-34	CC	AA	CC	AA	TT	AA	CC	CC	TT	GG	TT	AA
35	03-35	CC	AA	CC	AG	TT	AA	CC	CC	CC	TT	CC	GG
36	03-36	CT	AG	CC	AG	CT	AA	CT	CC	CT	GG	CT	AG
37	03-37	CC	AA	TT	AA	TT	AA	CC	CC	CC	GG	TT	AA
38	03-38	CC	AA	CC	AA	TT	AA	CC	CC	CC	TT	CC	GG
39	03-39	CC	AA	CC	AA	TT	AA	CC	CC	CT	GT	CT	AG
40	03-40	TT	GG	CT	GG	CC	AA	TT	CC	CT	GG	TT	AA
41	03-41	CC	AA	CC	AA	TT	AA	CC	CC	TT	GG	TT	AA
42	03-42	CC	AA	CT	AA	TT	AA	CC	CC	CT	GG	TT	AA
43	03-43	CC	AG	CC	AG	CT	AA	CC	CC	CT	GT	CT	AG
44	03-44	CC	AA	CC	AA	TT	AA	CC	CC	TT	GG	TT	AA
45	03-45	CC	AA	CT	AA	TT	AA	CC	CC	CC	GT	CT	AG
46	03-46	CC	AG	CT	AG	CT	AA	CC	CC	CC	GT	CT	AG
47	03-47	CT	AG	CC	AG	CT	AA	CT	CC	CC	TT	CC	GG
48	03-48	CC	AA	CC	AG	TT	AA	CC	CC	TT	GT	CT	AG
49	03-49	CT	GG	CT	GG	CC	AA	CT	CC	CC	GT	CT	AG
50	03-50	CC	AA	CC	AA	TT	AA	CC	CC	TT	GG	TT	AA
51	03-51	CC	AA	CT	AA	TT	AA	CC	CC	CC	GT	CT	AG

52	03-52	CC	AA	CC	AA	TT	AA	CC	CC	CT	GT	CT	AG
53	03-53	CC	AA	CC	AA	TT	AA	CC	CC	CT	GG	TT	AA
54	03-54	CC	AA	TT	AA	TT	AA	CC	CC	CC	GG	TT	AA
55	03-55	CC	AA	CC	AA	TT	AA	CC	CC	TT	GG	TT	AA
56	03-56	CC	AA	CC	AG	TT	AA	CC	CC	CT	GT	CT	AG
57	03-57	CC	AA	CC	AA	TT	AA	CC	CC	TT	GG	TT	AA
58	03-58	CC	AG	CC	AG	CT	AA	CC	CC	CC	TT	CC	GG
59	03-59	CC	AG	CT	AG	CT	AA	CC	CC	CT	GG	TT	AA
60	03-60	CC	AA	CT	AA	TT	AA	CC	CC	CC	GT	CT	AG
61	03-61	CC	AA	CT	AA	TT	AA	CC	CC	CT	GT	CT	AA
62	03-62	CC	AA	CC	AA	TT	AA	CC	CC	CT	GT	CT	AG
63	03-63	CC	AA	CT	AA	TT	AA	CC	CC	CC	GT	CT	AG
64	03-64	CC	AA	TT	AA	TT	AA	CC	CC	CC	GT	CT	AG
65	03-65	CC	AA	CT	AA	TT	AA	CC	CC	CT	GG	TT	AA
66	03-66	CC	AA	CT	AA	TT	AA	CC	CC	CT	GG	TT	AA
67	03-67	CC	AA	CC	AG	TT	AA	CC	CC	CT	GT	CT	AG
68	03-68	CC	AA	TT	AA	TT	AA	CC	CC	CC	GG	TT	AA
69	03-69	CT	AG	CC	AG	CT	AA	CT	CC	CC	GT	CT	AG
70	03-70	CC	AA	CC	AG	TT	AA	CC	CC	CT	GT	CT	AG
71	03-71	CC	AG	CC	AG	CT	AA	CC	CC	CT	GT	CT	AG
72	03-72	CC	AA	CC	AA	TT	AA	CC	CC	CC	TT	CC	GG
73	03-73	CC	AA	CC	AG	TT	AA	CC	CC	CC	TT	CC	GG
74	03-74	CC	AG	CC	GG	CT	AA	CC	CC	CC	TT	CC	GG
75	03-75	CT	AG	CT	AA	CT	AA	CT	CC	CC	GT	CT	AG
76	03-76	CC	AG	CT	AG	CT	AA	CC	CC	CC	GT	CT	AG
77	03-77	CC	AA	TT	AA	TT	AA	CC	CC	CC	GG	TT	AA
78	03-78	CC	AG	CC	AG	CT	AA	CT	CC	CC	TT	CC	GG
79	03-79	CC	AA	CT	AA	TT	AA	CC	CC	CC	GT	CT	AG
80	03-80	CC	AA	CC	AA	TT	AA	CC	CC	CT	GT	CT	AG

81	03-81	CT	GG	CC	GG	CC	AA	TT	CC	CT	GT	CT	AG
82	03-82	CC	AA	CC	AA	TT	AA	CC	CC	CC	TT	CC	GG
83	03-83	CC	AA	CC	AA	TT	AA	CC	CC	CT	GG	TT	AA
84	03-84	CC	AA	CT	AA	TT	CC	CC	CC	CC	GT	CT	AG
85	03-85	CC	AA	CT	AA	TT	CC	CC	CC	CC	GT	CT	AG
86	03-86	CC	AA	TT	AA	TT	CC	CC	CC	CC	GG	TT	AA
87	03-86	CC	AA	CT	AA	TT	CC	CC	CC	CC	GT	CT	AG
88	03-88	CC	AG	CC	AG	CT	CC	CT	CC	CC	TT	CC	GG
89	03-89	CT	AG	CT	AG	CT	CC	CT	CC	CC	GT	CT	AG
90	03-90	CT	AG	CC	GG	CT	CC	CT	CC	CT	GG	TT	AA
91	03-91	CC	AA	CC	AA	TT	CC	CC	CC	CT	GT	CT	AG
92	03-92	TT	GG	CC	GG	CC	AA	TT	CC	CC	TT	CC	GG
93	03-93	CT	AG	CT	AG	CT	AA	CT	CC	CC	GT	CT	AG
94	03-94	CC	AA	CT	AA	TT	AA	CC	CC	CC	GT	CT	AG
95	03-95	CC	AG	CC	AG	CT	AA	CC	CC	CT	GG	TT	AA
96	03-96	CC	AA	CC	AA	TT	AA	CC	CC	CC	TT	CC	GG
97	03-97	CT	AG	CC	AG	CT	AA	CT	CC	CT	GT	CT	AG
98	03-98	TT	GG	CC	GG	CC	AA	CT	CC	CC	TT	CC	GG
99	03-99	CT	AG	CT	AG	CT	AA	CT	CC	CC	GT	CT	AG
100	03-100	CC	AG	CC	AG	CT	AA	CC	CC	CC	TT	CC	GG
101	03-101	CT	AG	CC	AG	CT	AA	CT	CC	CC	TT	CC	GG