

УТИЦАЈ Pro12Ala ГЕНОТИПА У ОКВИРУ PPARG ГЕНА НА  
ПАРАМЕТРЕ ОСТЕОПОРОЗЕ КОД ПОСТМЕНОПАУЗАЛНИХ ЖЕНАБранко Беровић,<sup>1</sup> Тамара Филиповић,<sup>2</sup> Марија Хркаловић,<sup>2</sup> Нела Максимовић,<sup>1,3</sup> Дијана Перовић<sup>1,3</sup><sup>1</sup> Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд, Србија<sup>2</sup> Институт за рехабилитацију, Београд, Србија<sup>3</sup> Институт за хуману генетику, Београд, СрбијаTHE IMPACT OF THE Pro12Ala GENOTYPE OF THE PPARG GENE ON  
THE OSTEOPOROSIS PARAMETERS IN POSTMENOPAUSAL WOMENBranko Beronja,<sup>1</sup> Tamara Filipović,<sup>2</sup> Marija Hrkalović,<sup>2</sup> Nela Maksimović,<sup>1,3</sup> Dijana Perović<sup>1,3</sup><sup>1</sup> Faculty of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia<sup>2</sup> Institute of Physical Therapy, Belgrade, Serbia<sup>3</sup> Institute of Human Genetics, Belgrade, Serbia

## Сажетак

Постменопаузална остеопороза је системска болест скелета коју карактерише смањење коштане масе и нарушавање микроархитектуре коштаног ткива што резултује повећаном коштаном фрактурибилношћу. Златни стандард за постављање дијагнозе остеопорозе представља DXA (двоструко-енергетска X-зрачна апсорпциометрија), док се различити биомаркери из крви и урина користе у процени метаболичке активности кости. PPAR- $\gamma$  припада класи нестероидних нуклеарних рецептора. Овај рецептор је доминантно изражен у адипоцитима, али је присутан и у остеобластима. Оба наведена типа деле заједничку прекурсорску ћелију. Скорашња истраживања указала су на значај PPAR- $\gamma$  у ремоделовању коштаног ткива. Супституција Ц у Г у егзону гена који кодира овај протеин (PPARG) доводи до замене пролина у аланин на позицији 12, што доводи до његове смањене транскрипционе активности. Примарни циљ истраживања је испитивање повезаности између генотипа Pro12Ala полиморфизма у PPARG гену и вредности измерене минералне коштане густине (МКГ) код жена у постменопаузи. Секундарни циљ представља анализа повезаности наведеног генског полиморфизма са биохемијским параметрима остеопорозе. У студију су укључене 82 пацијенткиње са постменопаузалном остеопорозом. Генотип Pro12Ala одређен је реакцијом ланчане полимеризације и анализом полиморфизма дужине рестрикционих фрагмената (PCR-RFLP). Резултати: код 14 (17%) испитаница је утврђено постојање Pro12Ala варијанте (ЦГ генотип) у оквиру PPARG гена, док је Pro12Pro (ЦЦ генотип) детектована код 68 (83%). Није утврђена статистички значајна разлика у остеодензитометријским параметрима МКГ у односу на испитивани генотип. Међутим, носиоци Г алела (Pro12Ala варијанта) имали су значајно више вредности Beta-CTx, биохемијског маркера разградње коштаног ткива ( $p = 0,019$ ). Код жена са постменопаузалном остеопорозом није доказана повезаност Pro12Ala полиморфизма гена за PPARG са МКГ, али је могуће да генотип утиче на серумски ниво Beta-CTx, и тиме на појачану коштану разградњу.

**Кључне речи:** постменопаузална остеопороза, PPARG, Pro12Ala полиморфизам, биомаркери постменопаузалне остеопорозе, Beta-CTx

## Abstract

Postmenopausal osteoporosis is a systemic skeletal disease characterized by a decrease in bone mass and disruption of the bone microarchitecture, resulting in increased fragility. DXA scan (dual-energy X-ray absorptiometry) is the "gold standard" for the diagnosis of osteoporosis, while different serum or urine biomarkers are used in the measurement of bone turnover. PPAR- $\gamma$  belongs to the family of nonsteroid nuclear receptors. It is predominantly expressed in adipocytes but it could be found in osteoblasts. Both types share a common precursor cell. Recent studies have indicated the important role of PPAR- $\gamma$  in bone remodeling. Substitution of C to G in an exon of the gene coding for this protein (PPARG) results in Pro to Ala amino acid change at position 12, leading to decreased transcriptional activity of PPARG. The aim of our research was to determine the association between the genotype Pro12Ala polymorphism of the PPARG gene and the value of measured bone mineral density (BMD) as well as biochemical parameters of osteoporosis in postmenopausal women. 82 patients with postmenopausal osteoporosis were included in the study. The analysis of the Pro12Ala genotype of the PPARG gene was done by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The Pro12Ala variant (CG genotype) was found in 14 respondents (17%), while the Pro12Pro (CC genotype) was present in 68 patients (83%). There was no statistically significant difference between BMD values concerning the genotype. However, carriers of the G allele (Pro12Ala variant) had significantly higher levels of serum Beta-CTx, a biochemical marker of bone degradation ( $p=0.019$ ). There was no association found between the Pro12Ala genotype of the PPARG gene and BMD in women with postmenopausal osteoporosis, but the genotype could affect serum Beta-CTx levels indicating increased bone degradation.

**Key words:** postmenopausal osteoporosis, PPARG, Pro12Ala polymorphism, postmenopausal osteoporosis biomarkers, Beta-CTx

Остеопороза је системска болест скелета коју карактерише смањење коштане масе и нарушавање микроархитектуре коштаног ткива, што резултује повећаном коштаном фрактурибилношћу. Постменопаузална остеопороза, заједно са сенилном, припада типу опште примарне остеопорозе [1]. Најзначајнији параметар остеопорозе је смањење минералне коштане густине – МКГ (енгл. *bone mineral density, BMD*), стога златни стандард у постављању дијагнозе представља остеодензитометрија DXA методом (двоструко-енергетска X-зрачна апсорпциометрија) [2]. Допунски параметар за дијагностику је одређивање метаболичке активности кости (енгл. *turnover*) помоћу биохемијских параметара. Ови параметри могу указати на развој остеопорозе у ранијем стадијуму болести, а могу се поделити на оне који указују на разградњу и оне који указују на стварање коштаног ткива [3]. Најважнији у првој групи су: однос калцијум–креатинин у урину, хидроксипролин, гликозиди хидроксилизина, пиридинолин и деоксиридинолин. Концентрација ових параметара се најчешће одређује у урину, док се Beta-C терминални телопептид колагена типа I (*Beta-CrossLaps*, скр. *Beta-CTx*), као најважнији маркер у процени разградње кости, обично мери у серуму. Маркери формирања коштаног ткива су серумски нивои алкалне фосфатазе, остеокалцин, пропептиди колагена I [4].

Постменопаузална остеопороза је условљена многоструким факторима. Разградња коштаног ткива посредована је повећаном активношћу остеокласта стимулираних недостатком естрогена и присуством проинфламаторних цитокина. Сматра се да губитак коштане масе који се јавља после одстрањења јајника има идентичну патогенезу као остеопороза која се јавља после менопаузе, што недвосмислено указује на улогу полних хормона у регулацији ремоделирања скелета [1]. Међутим, индивидуалне варијације у испољавању болести указују на допунски утицај генских фактора и фактора из окружења. Најчешће навођени средински фактори ризика су релативна неактивност, која настаје у процесу старења, протеинско-калоријска малнутриција, снижен индекс телесне масе (ИТМ), недостатак калцијума и фосфата, пушење и алкохолизам [5]. У диференцијалној дијагнози је потребно искључити узроке секундарне остеопорозе попут јатрогених (продужена употреба глукокортикоида, хепарина и левотироксина), као и болести код којих је постменопаузална остеопороза коморбидитет (одређена аутоимунска, ендокринолошка и хематолошка обољења) [6].

Osteoporosis is a systemic skeletal disease characterized by a decrease in bone mass and disruption of bone microarchitecture, resulting in increased bone fragility. Postmenopausal osteoporosis, together with senile osteoporosis, belongs to the type of common primary osteoporosis [1]. The most significant parameter of osteoporosis is the decrease in bone mineral density - BMD, therefore, osteodensitometry using the DXA method (dual-energy X-ray absorptiometry) is the gold standard for diagnosis [2]. An additional diagnostic parameter is the determination of bone metabolism activity i.e. bone turnover using biochemical parameters. These parameters can suggest the development of osteoporosis in an early stage of the disease, and can be divided into those that indicate bone degradation i.e. breakdown and those indicating bone formation [3]. The most important parameters in the first group are urine calcium-creatinine ratio, hydroxyproline, hydroxylysine glycosides, pyridinoline and deoxypyridinoline. The levels of these parameters are most often measured in urine, while the Beta-C terminal telopeptide of type I collagen (*Beta-CrossLaps*, abbreviated *Beta-CTx*), as the most important marker of the bone degradation assessment, is usually tested in serum. Markers that are specific to bone formation include serum levels of alkaline phosphatase, osteocalcin, collagen I propeptides [4].

Postmenopausal osteoporosis is caused by multiple factors. Bone resorption involves the enhanced activity of osteoclasts stimulated by the lack of estrogen and the presence of pro-inflammatory cytokines. It is considered that the loss of bone mass that occurs after the removal of ovaries has the same pathogenesis as osteoporosis that occurs after menopause, which unequivocally indicates the role of sex hormones in the regulation of skeletal remodeling [1]. However, individual variations in the manifestation of the disease suggest the complementary influence of genetic and environmental factors. The most frequently reported environmental risk factors are relative inactivity, which occurs in the aging process, protein-calorie malnutrition, low body mass index (BMI), lack of calcium and phosphate, smoking and alcoholism [5]. The differential diagnosis needs to exclude the causes of secondary osteoporosis such as iatrogenic (long-term use of glucocorticoids, heparin and levothyroxine), as well as diseases with postmenopausal osteoporosis as a comorbidity (specific autoimmune, endocrine and hematologic diseases and disorders) [6].

Genetic factors play a substantial role in the development of primary osteoporosis. It has been observed that parental osteoporotic fractures are a major risk factor for offspring

Генетички фактори играју недвосмислену улогу у настанку примарне остеопорозе. Уочено је да потомци особа са остеопоротичним фрактурама имају и сами снижену МКГ и већи ризик од фрактура, а процењена херитабилност смањене минералне коштане густине је врло висока, од 60 до 90% [7]. Бројне студије асоцијације дале су конфликтне резултате о повезаности различитих кандидата гена чија се улога претпостављала у процесу ремоделовања кости, функцији остеобласта и остеокласта. У новије време, студије асоцијације целокупног генома (енгл. *Genome wide association study*, GWAS) прошириле су панел гена који су повезани са настанком остеопорозе [8, 9].

Рецептори активирани пролифератором пероксизома (енгл. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* – PPAR) представљају породицу нестероидних нуклеарних рецептора у оквиру које је највише описиван PPAR- $\gamma$ . Овај транскрипциони фактор је доминантно изражен у белим адипоцитима и глатким мишићним ћелијама, мање је заступљен у миокарду, ендотелу и макрофагима (остеокластима) [10]. Удруженост примарне остеопорозе са повећањем броја адипоцита у коштаном сржи указује на потенцијално постојање спреге између ова два механизма. Треба истаћи ембрионалну сличност остеобласта, остеокласта и адипоцита [11]. Глитазони (тиазолидиндиони ТЗД) су најзначајнији синтетички агонисти PPAR- $\gamma$  који се користе у терапији инсулинске резистенције тако што повећавају осетљивост на инсулин, преузимање и потрошњу глукозе у мишићима и масном ткиву. Међутим, уочено је да нежељени ефекат примене ових лекова може бити развој остеопорозе [12]. Додатни експерименти на анималним моделима су показали да специфични антагонисти PPAR- $\gamma$  спречавају активацију остеокласта и смањују ресорпцију кости [13, 14].

PPAR- $\gamma$  се налази у четири изоформе ( $\gamma$ 1,  $\gamma$ 3,  $\gamma$ 4 и  $\gamma$ 2), а кодиран је једним геном, *PPARG*, који се налази на кратком краку трећег хромозома (3p25.2) (10). Најчешћи полиморфизам овог гена у људи је замена пролина аланином (Pro12Ala) у екзону Б, (rs1801, Ц > Г), са фреквенцијом алела између 2% и 23% у различитим етничким групама. Замена пролина аланином на позицији 12. аминокиселине смањује активност самог протеина за 30–50% [15]. Скорашња истраживања указала су на повезаност овог полиморфизма са ремоделовањем коштаног ткива [16, 17].

Циљ истраживања је утврђивање повезаности између генотипа Pro12Ala полиморфизма у *PPARG* гену и вредности измерене МКГ и биохемијских параметара остеопорозе код жена у постменопаузи.

osteoporosis-related fractures, as well as for heritable reduced BMD values, with the estimated heritability of low bone mineral density being very high and ranging from 60 to 90% [7]. Numerous association studies have yielded conflicting results related to the association of different candidate genes that were suspected to play a role in the process of bone remodeling, osteoblast and osteoclast function. More recently, genome wide association studies (GWAS) have expanded the gene panels associated with the development of osteoporosis [8, 9].

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR) is a member of the nonsteroidal nuclear receptor superfamily, of which PPAR- $\gamma$  is the one most widely described. This transcription factor is predominantly expressed in white adipocytes and smooth muscles, and less represented in myocardium, endothelium and macrophages (osteoclasts) [10]. Primary osteoporosis associated with an increase in the number of adipocytes in the bone marrow indicates the potential existence of a coupling between these two mechanisms. The embryonic similarity of osteoblasts, osteoclasts and adipocytes should be noted [11]. Glitazones (thiazolidinediones or TZDs) are the most important synthetic PPAR- $\gamma$  agonists used in the treatment of insulin resistance by increasing insulin sensitivity, glucose uptake and consumption in muscle and adipose tissue. However, it has been observed that the side effects of these medications may include the development of osteoporosis [12]. Additional experiments on animal models have shown that specific PPAR- $\gamma$  antagonists prevent osteoclast activation and reduce bone resorption [13, 14].

PPAR- $\gamma$  exists in four isoforms ( $\gamma$ 1,  $\gamma$ 3,  $\gamma$ 4 and  $\gamma$ 2), and is encoded by one gene, *PPARG*, located on the short arm of the third chromosome (3p25.2) (10). The most common polymorphism of this gene in humans is a proline-to-alanine substitution (Pro12Ala) in exon B, (rs1801, C > G), with an allele frequency between 2% and 23% in different ethnic groups. The proline for alanine substitution at the amino acid position 12 reduces the activity of the protein itself by 30-50% [15]. Recent studies have indicated the association between this type of polymorphism with bone remodeling [16, 17].

The aim of the study was to determine the association between the genotype of the Pro12Ala polymorphism in the *PPARG* gene and the value of the measured BMD and biochemical parameters of osteoporosis in postmenopausal women.

## Материјал и методе

### Испитаници

Истраживање је обухватило 82 испитаника женског пола, прегледаних и праћених у Институту за рехабилитацију, Сокобањска, Београд. Све испитанице су биле у периоду постменопаузе, дефинисаном на основу престанка менструалних циклуса у периоду од најмање годину дана. Такође, код свих жена је потврђена дијагноза примарне остеопорозе или остеопеније мерењем минералне коштане густине (МКГ) квантитативном методом остеодензитометрије (*Hologic, Discovery C, DXA® Series*) на лумбалној кичми (L1-L4) и куку (врат бутне кости). Дензитометријска дијагноза остеопорозе интерпретирана је сходно препорукама Светске здравствене организације на основу Т-скора који је дефинисан као број стандардних девијација (СД) пацијентове МКГ изнад или испод просечне МКГ младе одрасле особе [2]. Мерен је и З-скор који одговара одступању у вредностима које би одговарале здравим особама истих година. Прикупљени су и подаци о биохемијским маркерима коштаног метаболизма из серума (укупна алкална фосфатаза, остеокалцин, Beta-CTx) и вредности рутинских биохемијских анализа из крви и урина које су имале за циљ искључење секундарних узрока остеопорозе.

### Молекуларно-генетичка анализа

Молекуларно-генетичке анализе су спроведене на Институту за хуману генетику Медицинског факултета у Београду.

Геномска ДНК изолована је исољавањем (*Salting out*), применом модификоване методологије по Miller-у [18]. Анализа полиморфизма *PPARG* гена вршена је реакцијом ланчане полимеризације и анализом полиморфизма дужине рестрикционих фрагмената (PCR-RFLP) методом. За умножавање одговарајућег региона у PCR реакцији коришћени су прајмери секвенце:

- Forward прајмер: 5' ЦАА ГЦЦ ЦАГ ТЦЦ ТТТ ЦТГ ТГ 3'
- Reverse прајмер 5' ЦАГ ААА ГЦГ АТТ ЦЦТ ТЦА ЦТГ 3'.

Реакциона смеша за сваки узорак се састојала од: 17,7 μл воде, 2,5 μл пуфера, 2 μл раствора магнезијум хлорида, 0,25 μл нуклеотида, по 0,5 μл сваког прајмера (forward и reverse), 0,1 μл Taq полимеразе. Услови PCR реакције изведене у апарату *Thermal Cycler 2720* (*Applied Biosystems, USA*), за смешу од 25 μл били су: 35 циклуса денатурације 94 °C/30 s, хибридизација прајмера 63 °C/30 s и елонгација 72 °C/45 s. PCR продукт је имао дужину 247 бп. По завршетку амплификације вршена је рестрикција PCR продукта Msp I

## Material and methods

### Respondents

The study included 82 female respondents, examined and monitored at the Institute of Physical Therapy, Sokobanjska, Belgrade. All respondents were postmenopausal, defined on the basis of the cessation of menstrual cycles for at least one year. Also, all the women have a diagnosis of primary osteoporosis or osteopenia confirmed by measuring bone mineral density (BMD) using the quantitative method of osteodensitometry (*Hologic, Discovery C, DXA® Series*) at the lumbar spine (L1-L4) and hip (femoral neck). The densitometric diagnosis of osteoporosis was interpreted in accordance with the recommendations of the World Health Organization based on a T-score, which is defined as the number of standard deviation units (SD) a patient's BMD score is above or below the young adult BMD mean [2]. A Z-score was also calculated, which represents the number of deviations away from the mean value of a healthy person of the same age. Data were also collected on serum biochemical markers of bone metabolism (total alkaline phosphatase, osteocalcin, Beta-CTx) as well as the values of routine biochemical blood and urine tests aimed at excluding secondary causes of osteoporosis.

### Molecular genetic testing

The molecular genetic tests were performed at the Institute of Human Genetics of the Faculty of Medicine in Belgrade.

Genomic DNA was isolated by salting out, using the modified methodology introduced by Miller [18]. The *PPARG* gene polymorphism was analyzed by the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms (PCR-RFLP) method. To amplify a specific region in the PCR reaction, the sequence primers were used as follows:

- Forward primer: 5' CAA GCC CAG TCC TTT CTG TG 3'
- Reverse primer 5' CAG AAA GCG ATT CCT TCA CTG 3'.

The reaction mix for each sample consisted of: 17.7 μl of water, 2.5 μl of buffer, 2 μl of magnesium chloride solution, 0.25 μl of nucleotides, 0.5 μl of each primer (forward and reverse), 0.1 μl of Taq polymerase. The PCR reaction was performed by using a *Thermal Cycler 2720* (*Applied Biosystems, USA*) with the following conditions for a 25 μl reaction mixture: 35 denaturation cycles at 94°C/30s, hybridization at 63°C/30s and elongation at 72°C/45s. The PCR product had a length of 247 bp. After the completion of the amplification, the PCR product restriction was performed using *MspI* restriction enzyme at 37°C for 120 minutes. The electrophoresis was conducted on an 8% polyacrylamide gel and run at a voltage of 230 V in 1xTBE buffer. *Syber safe DNA stain* (*Life Technologies, USA*) was used to stain

рестрикционим ензимом на 37 °C током 120 минута. Електрофореза је урађена на 8% полиакриламидном гелу и вршена је у 1xTBE пуферу при напону од 230 V. За бојење гела коришћена је Syber safe DNA боја (*Life Technologies, USA*). Гелови су визуелизовани на трансилуминатору (*ETX-F20.M, Vilber*). Уочене две траке од 217 бп и 30 бп одговарале су генотипу ЦЦ, три траке од 247, 217 и 30 бп означавале су генотип ЦГ. Присуство једне траке од 247 бп одговарало би генотипу ГГ, али он није детектован на испитиваном узорку.

### Статистичка обрада података

Статистичка анализа је извршена помоћу SPSS 20 програмског пакета. Описне варијабле исказане су бројевима и процентима, а континуалне средњим вредностима и стандардним девијацијама. Аналитичке методе примењене у статистичкој обради података су Т-тест у случају нормалне расподеле и *Mann-Whitney* тест код података који нису имали карактеристике нормалне расподеле. Као допунска анализа урађена је и мултипла регресиона анализа. Р вредности < 0,05 сматране су статистички значајним.

### Резултати

Испитане су 82 жене животне доби од 47 до 70 година. Менопауза код испитаница је наступила у периоду од 34. до 55. године (просечна вредност 49 година).

Молекуларно-генетичком анализом код 14 испитаница (17%) утврђено је постојање Pro12Ala полиморфизма (ЦГ генотип) у оквиру гена за PPAR- $\gamma$ , док је *wild-type* Pro12Pro (ЦЦ генотип) био присутан код њих 68 (83%). Хомозиготни генотип за ређи алел није детектован. Учесталост чешћег Ц алела је износила 91,46% а ређег Г 8,54% (Графикон 1 и 2). Фотографија ДНК фрагмента на гел електрофорези и тумачење резултата приказани су на слици (Слика 1).

**Графикон 1.** Учесталост генотипова полиморфизма Pro12Ala PPAR $\gamma$  у испитиваном узорку.

the gel. The gels were visualized with a transilluminator (*ETX-F20.M, Wilber*). The two bands of 217 bp and 30 bp were observed for the CC genotype, three bands of 247, 217 and 30 bp were indicative of the CG genotype. The presence of a single band of 247 bp would represent the GG genotype, but it was not detected in the tested sample.

### Statistical data analysis

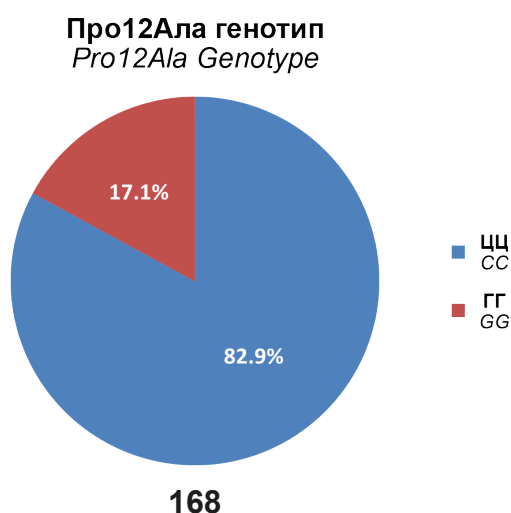
Statistical analysis was performed using the SPSS 20 software package. The descriptive variables are expressed in numbers and percentages, and the results for continuous variables are expressed as mean values and standard deviations. The analytical methods applied in statistical data analysis included a T-test for normal distribution of the data, and a Mann-Whitney test was used with the distribution being non-normal. As a supplementary analysis, a multiple regression analysis was performed. P values < 0.05 were considered to be statistically significant.

### Results

There were 82 women aged between 47 and 70 examined. Menopause occurred in the respondents between ages 34 and 55 (mean value 49 years of age).

Molecular genetic analysis indicated the presence of the Pro12Ala polymorphism (CG genotype) of the PPAR- $\gamma$  gene in 14 respondents (17%), while the wild-type Pro12Pro (CC genotype) was present in 68 of them (83%). No homozygous genotype for a rare allele was detected. The frequency of the common C allele was 91.46% and it was 8.54% for the rare G allele (Charts 1 and 2). The photograph of DNA electrophoresis and results interpretation are given in Figure 1.

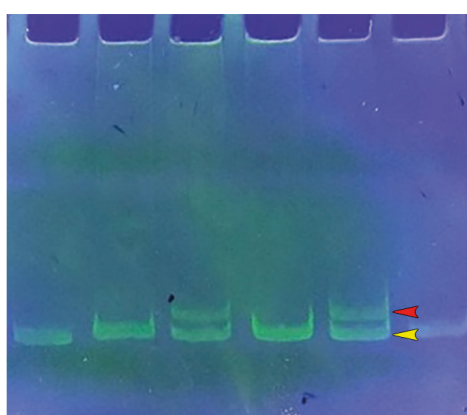
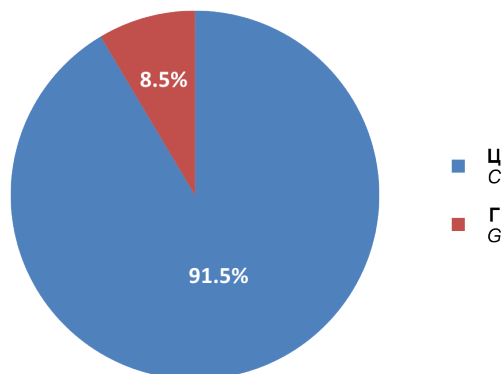
**Chart 1.** Frequency of genotypes of the Pro12Ala PPAR $\gamma$  polymorphism in the examined sample



**Графикон 2.** Учесталост алела полиморфизма Pro12Ala *PPARG* у испитиваном узорку.

**Chart 2.** Allele frequencies of the Pro12Ala *PPARG* polymorphism in the examined sample.

**Алели Про12Ала полиморфизма**  
*Pro12Ala Allele Polymorphism*



■ Трака 247 бп  
*Band 247 bp*  
■ Трака 217 бп  
*Band 217 bp*

**Слика 1.** Фотографија ДНК фрагмената на гел електрофорези након PCR-RFLP методе.

**Легенда:** Две траке на гелу од 247 бп и 217 бп означавају хетерозиготни генотип ЦГ, доња трака од 217 бп означава ЦЦ генотип. Мали фрагмент од 30 бп, присутан у оба генотипа, настао након дејства рестрикционог ензима се не види на гелу. Хомозиготни ГГ генотип није детектован у нашем узорку.

Резултати остеодензитометрије су изражени апсолутним вредностима у  $g/cm^2$  за вредности минералне коштане густине и у стандардним девијацијама (СД), тј. Т и З скору како за лумбалну кичму (Л1-Л2) тако и за врат бутне кости. Анализом података није добијена статистичка значајност у разликама добијених вредности МКГ у односу на генотип Pro12Ala полиморфизма (Табела 1).

**Figure 1.** Photo of the DNA fragments in gel electrophoresis after the PCR-RFLP method.

**Legend:** The two bands visible on the gel, of 247 bp and 217 bp respectively, indicate the heterozygous CG genotype, and the lower band of 217 bp indicates the CC genotype. A small fragment of 30 bp, present in both genotypes, and generated by the restriction enzyme is not visible on the gel. No homozygous GG genotype was detected in our sample.

The results of osteodensitometry are expressed as absolute values in  $g/cm^2$  for bone mineral density and as standard deviations (SD) i.e., T and Z scores for both the lumbar spine (L1-L2) and the femoral neck. The data analysis determined no statistical significance in the differences between the BMD values found in relation to the genotype of Pro12Ala polymorphism (Table 1).

**Табела 1.** Остеодензитометријске вредности минералне коштане густине (МКГ) у зависности од генотипа Pro12Ala PPARG.

| Генотип<br><i>Genotype</i> | DXA CB ± SD<br><i>DXA Mean ± SD</i>  |                                      |   |   |   |   |
|----------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---|---|---|---|
|                            | Т-скор Л1-Л2<br><i>T-score L1-L2</i> | З-скор Л1-Л2<br><i>Z-score L1-L2</i> | Т-скор<br>врата фемура<br><i>T-score<br/>femoral neck</i> | З-скор<br>врата фемура<br><i>Z-score<br/>femoral neck</i> | МКГ<br>Л1-Л2 у g%cm2<br><i>BMD<br/>L1-L2 in g%cm2</i> | МКГ<br>врата фемура у g%cm2<br><i>BMD<br/>femoral neck in g%cm2</i> |
| ЦЦ / CC                    | -2,66 ± 0,75                         | -2,10 ± 0,99                         | -2,61 ± 0,684   | -1,76 ± 1,04  | 0,837 ± 0,106   | 0,743   |
| ГГ / GG                    | -2,75 ± 0,62                         | -2,14 ± 1,10                         | -2,36 ± 0,689   | -1,43 ± 0,97  | 0,819 ± 0,118   | 0,700   |
| p / p                      | 0,693                                | 0,917                                | 0,233   | 0,293   | 0,575   | 0,200   |

**Table 1.** Osteodensitometry values of bone mineral density (BMD) based on the Pro12Ala PPARG genotype.

Средње вредности најважнијих биохемијских параметара формирања кости (алкална фосфатаза – АЛП и остеокалцин) и коштане разградње (BetaCTx), као и резултати њихове статистичке анализе у односу на генотип испитиваног полиморфизма приказани су у табели 2. Нивои укупне алкалне фосфатазе у серуму су били нижи код носилаца ЦГ у односу на испитанице ЦЦ генотипа (72,612 према 61,857 U/l), као и нивои остеокалцина (25,925 према 24,381 g/l), али та разлика није достигла статистичку значајност. Међутим, код носилаца Ala варијанте, тј. Г алела средње вредности, BetaCTx биле су значајно више (654,493 према 539,974 pg/ml; p = 0,019). Након примене мултипле регресионе анализе уз коваријабле: нивои витамина Д, парат хормона (ПТХ), тирео-стимулишућег хормона (ТСХ), АЛП и индекса телесне масе (ИТМ), разлика у вредностима BetaCTx у односу на генотип је остала у рангу статистичке значајности (p = 0,021; β = 0,253). Поред тога, уочена је и значајна повезаност вредности BetaCTx и витамина Д (p = 0,048; β = -0,220), као и BetaCTx и АЛП (p = 0,004; β = 0,330) [11].

Mean values of the most important biochemical parameters of bone formation (alkaline phosphatase - ALP and osteocalcin) and bone degradation (BetaCTx), as well as the results of the statistical analysis in relation to the genotype of the examined polymorphism are shown in Table 2. The levels of total alkaline phosphatase in serum, as well as osteocalcin levels (25,925 vs. 24,381 g/l), were lower in the CG carriers compared to the respondents of CC genotype (72,612 vs. 61,857 U/l), but the difference value has not reached the level of statistical significance. However, the mean values of BetaCTx were significantly higher in the carriers of the Ala variant i.e. G allele (654.493 vs. 539.974 pg/ml; p = 0.019). After the application of a multiple regression analysis with the following covariables: levels of vitamin D, parathormone (PTH), thyroid-stimulating hormone (TSH), ALP and body mass index (BMI), the difference in BetaCTx values in relation to the genotype remained within the range of statistical significance (p = 0.021; β = 0.253). In addition, a significant correlation was found between the values of BetaCTx and vitamin D (p = 0.048; β = -0.220), as well as the values of BetaCTx and ALP (p = 0.004; β = 0.330) [11].

**Табела 2.** Параметри коштаног метаболизма (формирања и ресорпције кости) у зависности од генотипа Pro12Ala PPARG.

**Table 2.** Parameters of bone metabolism (bone formation and bone resorption) based on the Pro12Ala PPARG genotype.

| Генотип<br><i>Genotype</i> | АЛП (U/l)<br><i>ALP (U/l)</i> | Остеокалцин (g/l)<br><i>Osteocalcin (g/l)</i> | Beta-CTx pg/ml<br><i>Beta-CTx pg/ml</i> |
|----------------------------|-------------------------------|---|---|
| ЦЦ / CC                    | 72,612 ± 27,612               | 25,925 ± 11,101                               | 539,974 ± 222,534                       |
| ГГ / GG                    | 61,857 ± 15,221               | 24,381 ± 10,206                               | 654,493 ± 140,321                       |
| p / p                      | 0,693                         | 0,633   | 0,019                                   |

## Дискусија

У нашем истраживању учесталост ређег алела Pro12Ala полиморфизма у оквиру PPARG гена износила је 8,54%, а учесталост хетерозиготног генотипа 17%, што се уклапа у податке добијене у популацијама беле расе европског порекла (Подаци преузети са

## Discussion

In our study, the frequency of the rare allele of the Pro12Ala polymorphism in the PPARG gene was 8.54%, and the frequency of the heterozygous genotype was 17%, which corresponds to the data obtained in Caucasian populations of European origin (Data downloaded

сајта: <https://www.snpedia.com/index.php/Rs1801282>. МКГ измерена помоћу DXA методе (ниво лумбалне кичме и проксималног фемура) незнатно је различита у две групе испитаница (у Т и З скору). Статистичком анализом није уочена повезаност Pro12Ala генотипа са МКГ. Наши резултати су у сагласности са резултатима Yue и сарадника из 2010. године који нису нашли асоцијацију овог полиморфизма са вредностима МКГ код постменопаузалних жена у Кини [19]. С друге стране, у супротности су са резултатима неколико других студија из различитих популација које су показале повезаност Pro12Ala полиморфизма са појавом остеопорозе, нетрауматске фрактуре кука или смањене МКГ [16, 17, 20]. Разлог нерегистровања статистички валидне разлике у нашем узорку може бити специфичан за популацију или је последица недовољног броја испитаника. Међутим, сама метода процене МКГ није толико осетљива на микропромене у костима, из истог разлога се истиче важност праћења биохемијских параметара при мониторингу пацијенткиња са постменопаузалном остеопорозом. Од биохемијских параметара разградње кости у нашем узорку смо добили значајну повезаност Pro12Ala варијанте (ЦГ генотипа) са вишим вредностима Beta-CTx маркера у серуму, који представља beta-C терминални телопептид колагена типа I и ослобађа се у крвоток током деградације кости. У литератури нисмо нашли податак о сличној асоцијацији. Повишене вредности овог маркера срећу се код секундарне остеопорозе узроковане поремећајима попут хипертиреозе и хиперпаратиреозе, као и у малигним болестима са коштаном метастазама [21]. Све наше испитанице су имале Beta-CTx у референтним границама за постменопаузу, а секундарна остеопороза је била критеријум искључења из студије. Варирање овог маркера и у оквиру референтног ранга за животну доб се користи за процену разградње кости и вредан је параметар доброг одговора на терапију остеопорозе [21]. Стога сматрамо да је повезаност виших вредности Beta-CTx са режим ЦГ генотипом од могућег значаја јер може указати на склоност ка повећаној коштаног разградњи код носилаца Ala варијанте у гену за PPAR- $\gamma$ . За прецизније дефинисање ове повезаности неопходно је поновити студију на већем броју пацијенткиња. Уколико би се слична повезаност доказала на већем броју испитаница са нашег поднебља и показала репликативност резултата у другим популацијама, могуће је да би одређивање генотипа за овај полиморфизам постало још релевантнији и поузданији биомаркер склоности ка разградњи коштаног ткива.

## Закључак

У студији је уочена повезаност полиморфизма Pro12Ala гена за PPAR- $\gamma$  са вредностима биохемијског маркера разградње коштаног ткива Beta-CrossLaps код жена

from the website: <https://www.snpedia.com/index.php/Rs1801282>). The BMD measured using the DXA method (lumbar spine and proximal femur level) was slightly different in the two groups of respondents (in T and Z scores). Statistical analysis showed no correlation between the Pro12Ala genotype and BMD. Our findings are in line with the study conducted by Yue et al. in 2010, who found no association between this type of polymorphism and BMD values in postmenopausal women in China [19]. On the other hand, the findings of our study are in contradiction to the results of several other studies in different populations that showed the association between the Pro12Ala polymorphism and the occurrence of osteoporosis, non-traumatic hip fracture or reduced BMD [16, 17, 20]. The reason why no statistically significant difference was found in our sample may be specific to the population or it may be due to an inadequate number of respondents. Nevertheless, the method of BMD assessment is insensitive to changes in bone microstructure, and therefore the importance of monitoring biochemical parameters while monitoring the patients with postmenopausal osteoporosis is emphasized. The biochemical parameters of bone degradation in our sample showed a significant correlation between the Pro12Ala variant (CG genotype) and the elevated serum concentrations of Beta-CTx marker, which represents the beta-C terminal telopeptide of type I collagen and is released into the bloodstream during bone resorption. We have found no information about a similar association in the literature. Increased levels of this marker are found in secondary osteoporosis caused by conditions such as hyperthyroidism and hyperparathyroidism, as well as in malignancies with bone metastases [21]. All our respondents had their Beta-CTx values within the reference range for postmenopausal women, and secondary osteoporosis was the exclusion criterion for the study. The marker variations within the age-specific reference range are also used to assess bone resorption and represent a valuable parameter of assessing response to osteoporosis therapy [21]. Therefore, we believe that the association between elevated Beta-CTx levels and the rare CG genotype may be of relevance because it may suggest a tendency towards increased bone resorption in carriers of the Ala variant of the PPAR- $\gamma$  gene. In order to define the mentioned association more precisely, a replication of the study on a larger sample of patients is necessary. Should a similar association be demonstrated in a larger number of female respondents from our region and should the replicability of the results be shown in other populations, the determination of this type of genetic polymorphism could become a more relevant and more reliable biomarker of bone tissue degradation.

## Conclusion

The study has shown the correlation between the Pro12Ala gene polymorphism of the PPAR- $\gamma$  gene and the levels



са постменопаузалном остеопорозом. Разлика у минералној коштаној густини, као и концентрацији осталих биохемијских параметара ремоделирања коштаног ткива није статистички значајна код пацијенткиња са ЦЦ и ЦГ генотипом.

of the biochemical marker of bone tissue degradation Beta-CrossLaps in women with postmenopausal osteoporosis. The difference in bone mineral density, as well as in the values of other biochemical parameters of bone tissue remodeling, is not statistically significant in female patients with CC and CG genotypes.

## Литература / References

1. Meeta, Harinarayan CV, Marwah R, Sahay R, Kalra S, Babhulkar S. Clinical practice guidelines on postmenopausal osteoporosis: An executive summary and recommendations. *J Midlife Health*. 2013; 4(2):107–26. PubMed PMID: 24082708
2. Cosman F, de Beur SJ, LeBoff MS, Lewiecki EM, Tanner B, Randall S, et al. Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2014; 25:2359–81. <https://doi.org/10.1007/s00198-014-2794-2>. Erratum in: *Osteoporos Int*. 2015; 26:2045–7. <https://doi.org/10.1007/s00198-015-3037-x>
3. Sweet MG, Sweet JM, Jeremiah MP, Galazka SS. Diagnosis and treatment of osteoporosis. *Am Fam Physician*. 2009; 79(3):193-200. PubMed PMID: 19202966
4. Shetty S, Kapoor N, Bondu JD, Thomas N, Paul TV. Bone turnover markers: Emerging tool in the management of osteoporosis. *Indian J Endocrinol Metab*. 2016; 20:846–52. <https://doi.org/10.4103/2230-8210.192914>
5. Hernlund E, Svedbom A, Ivergard M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, et al. Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Arch Osteoporos*. 2013; 8:136. <https://doi.org/10.1007/s11657-013-0136-1>
6. Sheu A, Diamond T. Secondary osteoporosis. *Aust Prescr*. 2016; 39:85–7. <https://doi.org/10.18773/austprescr.2016.038>
7. Clark GR, Duncan EL. The genetics of osteoporosis. *Br Med Bull*. 2015; 113:73–81. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldu042>
8. Yang C, Ren J, Li B, Jin C, Ma C, Cheng C, et al. Identification of gene biomarkers in patients with postmenopausal osteoporosis. *Mol Med Rep*. 2019; 19:1065–73. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9752>
9. Morris JA, Kemp JP, Youlten SE, Laurent L, Logan JG, Chai RC, et al. An atlas of genetic influences on osteoporosis in humans and mice. *Nat Genet*. 2019; 51:258–66. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0302-x>
10. Moore-Carrasco R, Poblete Bustamante M, Gonzalez Guerra O, Leiva Madariaga E, Mujica Escudero V, Aranguel Arellano C, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors: Targets for the treatment of metabolic illnesses (Review). *Mol Med Rep*. 2008; 1:317–24. <https://doi.org/10.3892/mmr.1.3.317>
11. Li Y, Jin D, Xie W, Wen L, Chen W, Xu J, et al. PPAR-gamma and Wnt Regulate the Differentiation of MSCs into Adipocytes and Osteoblasts Respectively. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2018; 13(3):185–92. <https://doi.org/10.2174/1574888X12666171012141908>
12. Beekman KM, Veldhuis-Vlug AG, van der Veen A, den Heijer M, Maas M, Kerckhofs G, et al. The effect of PPARgamma inhibition on bone marrow adipose tissue and bone in C3H/HeJ mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2019; 316(1):E96–E105. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00265.2018>
13. Wan Y, Chong LW, Evans RM. PPAR-gamma regulates osteoclastogenesis in mice. *Nat Med*. 2007; 13:1496–503. <https://doi.org/10.1038/nm1672>
14. Li X, Ning L, Ma J, Xie Z, Zhao X, Wang G, et al. The PPAR-gamma antagonist T007 inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis and counteracts OVX-induced bone loss in mice. *Cell Commun Signal*. 2019; 17(1):136. <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0442-3>

15. Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl MC, Nemesh J, et al. The common PPARGgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet.* 2000; 26(1):76–80. <https://doi.org/10.1038/79216>
16. Rhee EJ, Oh KW, Yun EJ, Jung CH, Park CY, Lee WY, et al. The association of Pro12Ala polymorphism of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene with serum osteoprotegerin levels in healthy Korean women. *Exp Mol Med.* 2007; 39(6):696–704. <https://doi.org/10.1038/emm.2007.76>
17. Dragojevic J, Ostanek B, Mencej-Bedrac S, Komadina R, Prezelj J, Marc J. PPARG gene promoter polymorphism is associated with non-traumatic hip fracture risk in the elderly Slovenian population: a pilot study. *Clin Biochem.* 2011; 44:1085–9. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.06.981>
18. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16:1215. <https://doi.org/10.1093/nar/16.3.1215>
19. Yue H, He JW, Zhang H, Hu WW, Hu YQ, Li M, et al. No association between polymorphisms of peroxisome [corrected] proliferator-activated receptor-gamma gene and peak bone mineral density variation in Chinese nuclear families. *Osteoporos Int.* 2010; 21:873–82. <https://doi.org/10.1007/s00198-009-1028-5>. Erratum in: *Osteoporos Int.* 2010; 21:883. <https://doi.org/10.1007/s00198-009-1028-5>
20. Harslof T, Tofteng CL, Husted LB, Nyegaard M, Borglum A, Carstens M, et al. Polymorphisms of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARGgamma) gene are associated with osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2011; 22(10):2655–66. <https://doi.org/10.1007/s00198-010-1491-z>
21. Bergmann P, Body JJ, Boonen S, Boutsen Y, Devogelaer JP, Goemaere S, et al. Evidence-based guidelines for the use of biochemical markers of bone turnover in the selection and monitoring of bisphosphonate treatment in osteoporosis: a consensus document of the Belgian Bone Club. *Int J Clin Pract.* 2009; 63(1):19–26. <https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2008.01911.x>



### Кореспонденција / Correspondence

Дијана Перовић - Dijana Perović  
[dijanaperovic@gmail.com](mailto:dijanaperovic@gmail.com)