

2024

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ

*Sindrom metabolic, sarcopenie și risc de fractură
osteoporotică: interferențe clinice și substrat genetic*

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. POIANĂ CĂTĂLINA

Student-doctorand:

GREERE DANIELA-IOANA-IULIA

2024

Cuprins

Introducere.....	pagina 9
I. Partea generală	
1. Osteoporoza primară - Aspecte clinice și genetice.....	pagina 12
1.1 . Definiție și epidemiologie.....	pagina 12
1.2. Fiziologia remodelării osoase.....	pagina 13
1.3. Etiologia și fiziopatologia osteoporozei.....	pagina 14
1.4. Evaluarea și diagnosticul pacientului cu osteoporoză.....	pagina 15
1.5. Aspecte genetice ale osteoporozei.....	pagina 18
2. Sarcopenia.....	pagina 20
2.1. Fiziopatologia sarcopeniei.....	pagina 20
2.2. Osteoporoza și sarcopenia.....	pagina 21
2.3. Diagnostic, evaluare clinică și paraclinică.....	pagina 22
2.4. Evaluarea calității vieții - Chestionarul Sarqol.....	pagina 23
2.5. Aspecte genetice ale sarcopeniei.....	pagina 24
3. Sindromul metabolic, osteoporoza și gena <i>FTO</i>	pagina 26
3.1. Definiție și epidemiologie.....	pagina 26
3.2. Relația între sindromul metabolic și osteoporoză.....	pagina 27
3.3. Factori patogenici comuni între sindromul metabolic și osteoporoză.....	pagina 28
3.4. Gena <i>FTO</i> și osteoporoza.....	pagina 30

II. Contribuții personale	
4. Ipoteza de lucru și obiectivele generale	pagina 37
5. Studiul 1: Contribuția relativă a componentelor sindromului metabolic legat de obezitate și rezistența la insulină în osteoporoza postmenopauzală.....	pagina 39
5.1. Introducere.....	pagina 39
5.2. Populație și metodologie.....	pagina 40
5.3. Rezultate.....	pagina 45
5.4. Discuții.....	pagina 56
5.5. Concluzii.....	pagina 66
6. Studiul 2: Cartografia haplotipurilor relevă asocierea genei <i>FTO</i> cu osteoporoza postmenopauzală.....	pagina 67
6.1. Introducere.....	pagina 67
6.2. Pacienți și metode.....	pagina 68
6.3. Rezultate.....	pagina 70
6.4. Discuții.....	pagina 86
6.5. Concluzii.....	pagina 89
7. Studiul 3: Analiza bioinformatică în genetica osteoporozei și a sindromului metabolic.....	pagina 90
7.1. Introducere	pagina 90
7.2 Material și metode.....	pagina 93
7.3. Rezultate.....	pagina 108
7.4. Discuții.....	pagina 120
8. Concluzii și contribuții personale	pagina 128
Bibliografie.....	pagina 133
Anexe.....	pagina 157

CONTEXT ȘTIINȚIFIC INTERNAȚIONAL, OBIECTIVE ȘI IPOTEZĂ DE LUCRU.

CONTEXT ȘTIINȚIFIC INTERNAȚIONAL. Osteoporoza (OP) este cea mai frecventă boală metabolică osoasă cu o prevalență de 18,3% la nivel mondial (Salari et al., 2021). În România, prevalența la persoanele cu vârsta > 50 de ani a fost estimată a fi 20,5 % la femei și 6,2 % la bărbați (Grigorie et al., 2013). Privind fractura de fragilitate, este estimat că una din trei femei și unul din cinci bărbați cu vârsta > 50 de ani vor suferi cel puțin o fractură osteoporotică (Kanis et al., 2000).

În prezent, OP este diagnosticată prin măsurarea *densității minerale osoase* (DMO) sau a obiectivării fracturilor de fragilitate. Timp de mulți ani, cercetarea în domeniul OP s-a concentrat asupra metodelor de evaluare a țesutului osos (DMO sau markeri de turnover osos) și, mai recent, asupra predispoziției genetice. Dacă genetica OP a început să fie înțeleasă prin studiul câtorva *sindroame genetice mendeliene*, în ultimii ani analiza genetică a bolilor complexe a dus la un progres remarcabil și în domeniul OP. În ultimii zece ani, introducerea așa-numitelor studii GWAS (*Genome-Wide Association Studies*) a permis evidențierea genelor responsabile de apariția OP sau a fracturilor de fragilitate.

Cercetarea în domeniul OP la Institutul Național de Endocrinologie „C.I. Parhon” efectuată de grupul condus de Prof. Univ. Dr. Cătălina Poiană a fost inițiată în acest context internațional, competitiv pe plan internațional și care implică o dezvoltare mai ales în domeniile bioinformaticii, statisticii și noilor metode de genotipare a genomului. Genetica bolilor complexe *nemendeliene* prezintă dificultăți enorme, din cauza naturii lor poligenice, precum și a mării diversități. Cu toate acestea, finalizarea secvențierii genomului uman în 2003 (*Human Genome Project*) și descoperirea SNP-urilor (*single nucleotide polymorphisms*), ca și dezvoltarea programului internațional HapMap sau a Proiectului 1000 Genomes (1KGP) au deschis noi perspective în utilizarea markerilor genetici. Ca și alte boli complexe, precum bolile cardiovasculare, obezitatea, *diabetul zaharat de tip 2* (DZT2) sau chiar boli neurodegenerative, OP a profitat de aceste progrese.

În acest context internațional, pe parcursul acestei teze, am efectuat un stagiul doctoral în *Laboratorul de Endocrinologie Moleculară*, la IURC (*Institut Universitaire de Recherche Clinique*) din Montpellier (Franța), sub îndrumarea Prof. Florin Grigorescu,

cercetător la INSERM, care mi-a permis să mă familiarizez cu noile metode bioinformatică și de genotipare. Acest stagiu mi-a permis, de asemenea, să emit noi ipoteze de lucru, profitând în același timp de expertiza clinică a Institutului „C.I. Parhon”.

Ne-am ales ca temă de cercetare relația dintre OP și rezistența la insulină, în special în legătură cu *obezitatea și sindromul metabolic* (SMet). Motivația alegerii acestei teme a pornit de la contextul actual din literatura internațională privind incidența SMet în OP, cu rezultate extrem de variate, chiar contradictorii (Greere et al., 2023; Wong et al., 2016). Trebuie menționat că prevalența OP și a fracturilor de fragilitate este de așteptat să crească și ea în următorul deceniu, dat fiind fenomenul de îmbătrânire a populației. La această tendință participă numeroși factori, precum creșterea prevalenței obezității și a diabetului zaharat (în special a DZT2), care s-ar asocia și cu un risc mai mare de fractură, independent de DMO.

Din cauza prevalenței, OP este considerată o serioasă problemă de sănătate publică, având în vedere că la nivel global, mai mult de 200 de milioane de oameni suferă de această afecțiune. În Statele Unite ale Americii și Europa, 30% din femeile aflate la postmenopauză poartă acest diagnostic, iar cel puțin 40% din aceste femei și 15-30% din bărbații cu OP vor suferi una sau mai multe fracturi de fragilitate (Clynes et al., 2020).

O problemă suplimentară printre femeile postmenopauzale, în special la vârste înaintate, este apariția complicațiilor metabolice, incluzând obezitatea, DZT2 și SMet, toate caracterizate de *rezistența la insulină* (RI). Această RI are o patogeneză complexă, în care insulina și IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*), cunoscuți pentru impactul asupra creșterii, homeostaziei glucozei și duratei de viață, joacă roluri cruciale. Mecanismele implicate în RI și rolul SMet în patogeneza OP nu sunt înțelese complet. Atunci când SMet este explorat, literatura raportează rezultate contradictorii (Wong et al., 2016). Unele studii sugerează o prevalență ridicată a SMet în OP (interpretată ca efect patogen), în timp ce altele raportează o prevalență mai mică (interpretată ca efect protector). În plus, OP și *sarcopenia* sunt două afecțiuni cu morbiditate semnificativă, a căror frecvență crește odată cu înaintarea în vârstă. Parametrii sistemului muscular se corelează pozitiv cu masa osoasă sau DMO, iar explicațiile pentru aceste corelații sunt multiple. Ipoteza mecanostatului, (introdusă de Frost în 1964) sugerează că răspunsul scheletului diferă selectiv în funcție de amplitudinea și deformarea osoasă printr-un efect mecanic. Astfel, efortul fizic întreține

buna funcționare a componentelor sistemului musculoscheletal, dar mulți factori (*vitamina D, testosteronul, hormonul de creștere/ IGF-1 și estrogenii*) pot avea efect asupra creșterii musculare și osoase. De notat este că sarcopenia se asociază și cu risc crescut de cădere, cu efect nefast în OP prin producerea fracturilor de fragilitate.

Tema generală a acestei teze privește relația între SMet, obezitate și patologia OP primare la femeia postmenopauzală, incluzând OP simplă sau severă cu fracturi de fragilitate.

OBIECTIVE. În fața rezultatelor contradictorii din literatură asupra relației între SMet și OP, obiectivul general a fost acela de a *identifica factorii clinici sau genetici care ar putea explica aceste contradicții*. Mai precis, ne-am propus să studiem *relația complexă* între obezitate, SMet și OP printr-o abordare clinică, pe de-o parte, și pe de altă parte prin abordarea factorilor genetici care ar putea interveni în patologia obezității și OP cu sau fără fracturi, motiv pentru care ne-am orientat către o genă far a obezității, gena *FTO (fat mass and obesity associated-gene)*.

Mai precis, în cursul acestei teze, ne-am propus următoarele **obiective specifice**:

- 1) Recrutarea la *Institutul Național de Endocrinologie C.I. Parhon* a unei populații de femei în perioada postmenopauzală cu și fără OP printr-un protocol prospectiv.
- 2) Studiul relației posibile între RI *in vivo*, SMet, obezitatea și OP cu și fără fracturi.
- 3) Investigarea rolului posibil a genei *FTO* în SMet și OP cu și fără fracturi.

IPOTEZĂ DE LUCRU. Pentru studiul clinic, am emis ca ipoteză stabilirea unei relații complexe între gradul de obezitate și RI la nivel sistemic. RI însoțește deseori femeia după menopauză prin apariția SMet și a diverselor complicații cardiovasculare, dar această situație se complică enorm privind cel puțin trei aspecte fundamentale:

- a) Studii recente din Universitatea Columbia (SUA) au pus în evidență existența unei *rezistențe la insulină specifică în os (« bone insulin resistance »)* care se găsește într-o relație complexă cu RI sistemică prin secreția unor hormoni regulatori ca de exemplu osteocalcina (OCN) sau leptina (Karsenty, G. și Ferron, M., 2012).
- b) Un alt aspect fundamental este legat de observația că țesutul *măduvei osoase* care produce din celulele stem diversele celule ale osului (*osteoblaste și osteoclaste*) este un țesut cu totul particular. În măduva osoasă adipocitele recunosc o proliferare majoră și

rămân, în pofida RI periferice, foarte sensibile la insulină (Tencerova et al., 2019) și pot urma un proces de *îmbătrânire* cu consecințe majore asupra metabolismului osos.

- c) Gena *FTO* participând în mod incontestabil la patogenia obezității și a SMet, merită o analiză în cadrul OP, emițind ipoteza că SNP-uri ale acestei gene (intronul 1) vor edifica modalitatea prin care obezitatea sau SMet influențează OP (Zhang et al., 2019).

În domeniul geneticii OP, ipoteza noastră de lucru a fost pertinentă. Ne-am pus întrebarea care ar fi rolul posibil al unei gene de obezitate (Frayling et al., 2007) în cadrul relației complexe între variația *indexului de masă corporală* (IMC) și RI. S-a dovedit că această ipoteză a produs rezultate extraordinare, capabile să modifice toate ipotezele de lucru în domeniul OP. Strategia pe care ne-am propus-o a fost originală și diferită de studiile GWAS. În loc să ne bazăm pe un număr mare de indivizi, am preferat o colecție redusă ($n \approx 200$), dar bine caracterizată clinic și biologic, pentru care am aplicat strategii originale și eficiente de cartografiere fină de haplotipuri (*fine scale mapping*).

REZULTATE

STUDIUL 1: Contribuția relativă a componentelor sindromului metabolic legat de obezitate și rezistența la insulină în osteoporoza postmenopauzală

Acest prim studiu și-a propus să analizeze contribuția SMet în patogenia OP printr-o analiză a corelației dintre **criteriile cumulative de SMet**, RI, obezitatea și DMO în rândul pacienților noștri cu OP, cu și fără fracturi (Greere et al., 2024a). În perioada 28 Mai 2020 - 1 aprilie 2022 am recrutat 188 de femei postmenopauzale cu și fără OP, excluzând toate formele de *ostoporoză secundară* sau boli cronice (cu excepția DZT2). Protocolul de cercetare a fost supus Comitetului de Etică și cercetarea s-a realizat conform regulilor internaționale și a declarației de la Helsinki (2024). Pentru fiecare pacient a fost obținut un consimțământ scris după informarea printr-o scrisoare. Pacienții au primit un cod unic și colecția de ADN a fost anonimată. Toți pacienții au beneficiat de o serie de analize de laborator pentru a stabili profilul hormonal și metabolic. O atenție particulară a fost acordată investigării prin DEXA (Dual X-ray absorptiometry analysis) cu stabilirea DMO și a scorului TBS (*Trabecular Bone Score*) pentru coloana lombară la L1-L4. OP a fost definită conform *Asociației Americane a Endocrinologilor Clinici* (AACE) și ghidurilor

Fundației Naționale pentru Osteoporoză și anume: 1) Scorul T -2,5 DS (deviații standard) sau mai mic la coloana lombară, col femural, femur proximal total sau 1/3 din radius; 2) Fractură de coloană sau șold în urma unui traumatism de intensitate scăzută, indiferent de valoarea DMO; 3) scor T între -1,0 și -2,5 DS și fracturi de fragilitate ale humerusului proximal, pelvisului sau antebrățului distal; 4) Scorul T între -1,0 și -2,5 DS și probabilitate ridicată de fractură conform FRAX®, bazat pe pragurile specifice țării (Kanis et al., 2019). Scorul FRAX PLUS (TBS) pentru evaluarea unui risc pe 10 ani pentru fracturi de fragilitate a fost calculat pe site-ul web specific țării (<https://www.fraxplus.org/>). OP severă a fost diagnosticată pe baza criteriilor OMS, și anume asocierea scorului T egal sau mai mic de -2,5 SD (de exemplu, < -3) și fracturi de fragilitate.

O atenție particulară a fost de asemenea acordată testelor de forță musculară și de performanță fizică utilizând ca teste: forța de strângere a mâinii (HGS) măsurată bilateral, testul ridicării de pe scaun (CST), viteza de mers (GS), testul Timed Up and Go (TUG) și scorul Tinetti. Pentru a obține un rezumat al testelor musculare am compus un instrument statistic (SUM^{stat}) luând în considerare 0, 1, 2, 3, 4 sau toate cele 5 teste cu valori în afara valorilor normale (0/1).

Diagnosticul de SMet s-a bazat pe prezența a cel puțin 3 dintre criteriile *Programului Național de Educație pentru Colesterol (NCEP) și Grupului de tratament pentru adulți-III (ATP-III)*. RI a fost evaluată folosind HOMA-IR (*homeostasis model assesment*) sau ca o variabilă nominală definită ca având valori peste limita de 1,92, calculată din nivelul de insulină *à jeun* la subiecții fără OP de greutate normală + 2 SEM, așa cum s-a descris anterior (Haydar et al. , 2019).

Analiza statistică. Puterea statistică a fost calculată în programul Raosoft (www.Raosoft.com), iar variabilele au fost testate prin teste non-parametrice Man-Whitney U test sau Kruskal-Wallis. În ANOVA factorul de interacțiune α a fost fixat la 5%. Variabilele nominale au fost analizate folosind testul χ^2 . În regresia logistică pentru SMet am folosit metoda descendentă pentru a determina valorile P, *odds ratio* (OR) și intervalul de confidență (IC) de 95%. Analiza a fost inițiată comparând controlii având DMO normală sau osteopenie (non-OP) cu subiecții OP. Analiza corelației dintre DMO și HOMA-IR cu criteriile cumulative de SMet a fost efectuată în ANOVA. DMO a fost analizată la toate situsurile anatomice. Statisticile pentru SMet au luat în considerare variația DMO în funcție

de gradul de obezitate (*centilele* de IMC) cu valori limită specifice: 21,0, 23,8, 27,2, 31,1, respectiv 35,5 kg/m². **Punctul de inflexiune** al DMO a fost obținut prin inspecția valorilor reziduale, calculate ca diferența dintre valorile măsurate ale DMO și valorile prezise pe baza relației dintre DMO și IMC în populația non-OP. Analiza s-a extins după **noua stratificare a pacienților** cu OP fie cu greutate normală (lean OP), fie supraponderali sau obezi (OW/OB) pe baza **punctului de inflexiune de 27,2 kg/m²**. Semnificația a fost considerată în toate cazurile la $P < 0,05$. Analiza statistică a fost efectuată folosind Statview 5.0, Abacus Concepts, Berkeley, CA, descris anterior (Attaoua et al. 2008, Haydar et al. 2019).

Rezultate. Pacienții cu OP au prezentat o prevalență de 2 ori mai mică a obezității (bazată pe IMC) și de 6 ori mai rară a obezității centrale (bazată pe circumferința abdominală). OP severă cu fracturi de fragilitate a reprezentat 48,3% din cazurile de OP. Nu a existat nicio diferență semnificativă în prevalența RI sau a valorilor HOMA-IR. DMO a fost scăzută la toate situsurile anatomice, la fel ca și scorul TBS (L1-L4). La pacienții cu OP, SMet a fost de 1,7 ori mai puțin prevalent decât la subiecții non-OP ($p < 0,031$), concordant cu reducerea de 2,3 ori a obezității și a prevalenței tuturor celor cinci criterii ATPIII pentru SMet.

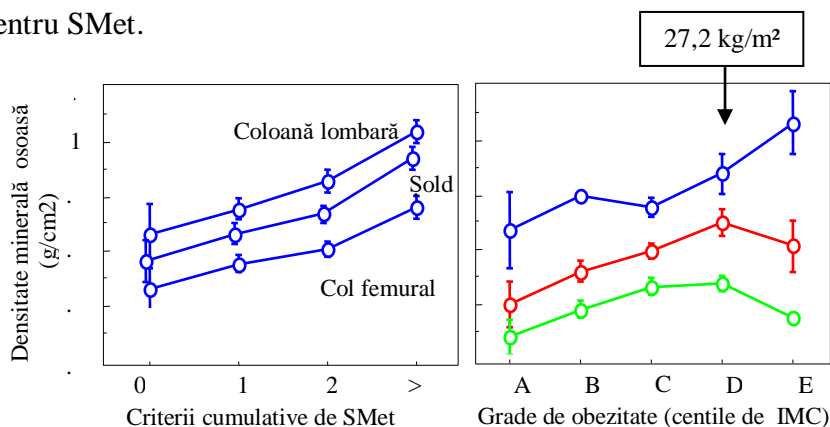


Figura 1. Corelația dintre DMO și criteriile cumulative de SMet sau gradul de obezitate.

Un rezultat important a fost observația că există o **bună corelație între criteriile cumulative de SMet și DMO la toate situsurile anatomice, inclusiv radiusul** (Figura 1). Variația DMO se poate explica prin criteriile cumulative de SMet ($p < 0,0001$, $\alpha = 0,99$, ANOVA), ca și indicele HOMA-IR ($p < 0,0001$, $\alpha = 0,99$), fără nicio diferență între indivizii cu sau fără OP. Înțelegerea rolului componentelor SMet rămâne esențială

deoarece, pe de o parte, o creștere a criteriilor cumulative de MetS sugerează acumularea de anomalii metabolice, iar pe de altă parte, IMC crescut se asociază cu DMO mai mare, având rolul de a reduce riscul de OP.

În fața acestei situații, ne-am propus să reevaluăm contribuția relativă a SMet în OP după noua stratificarea subiecților (slabi și supraponderali/obezi) bazată pe punctul de inflexiune (IMC de 27,2 kg/m²). Am urmărit în etapa următoare profilurile pacienților cu OP cu și fără SMet. În regresia logistică, cele mai influente componente în SMet la persoanele slabe au fost glicemia ($p < 0,0031$, OR 4,14, 95% CI [1,44-11,05]), nivelul de TG ($p < 0,0126$, OR 6,82, 95% CI [1,4-33,12]]) și HTA ($p < 0,0012$, OR 11,1, 95% CI [2,14-56,55]). O imagine complet diferită a fost obținută pentru pacienții OW/OB cu și fără SMet. Componentele determinante pentru SMet au fost niveluri mai ridicate ale glicemiei, HbA1c și TG și, în special, indicele HOMA-IR (mai mare de până la 3,8). Astfel, în regresia logistică, componentele influente pentru SMet la pacienții OW/OB au fost doar doi factori: HbA1c cu $p < 0,0037$, OR 9,6, 95% CI [1,64-55,6] și, cu semnificație similară, RI cu $p < 0,0076$, OR 6,7, IC 95% [1,49-30,8]. Aceste date au indicat că RI *per se* a apărut ca factor influent în primul rând la pacienții cu OP mai obezi și stratificați după IMC corespunzător punctului de inflexiune al DMO.

Pentru a vizualiza această situație, am reprezentat grafic valorile reziduale ale DMO raportat la valorile prezise pe baza corelației DMO-IMC de la subiecții controlii. S-a adeverit că în OP, valorile DMO pentru SMet au fost relativ mai mici decât cele prezise, lucru valabil pentru toate situsurile anatomice și proporțional cu criteriile cumulative de SMet.

În concluzie, în această primă lucrare, am caracterizat SMet și componentele sale la femeile în postmenopauză cu OP, evaluând concomitent RI măsurată prin indexul HOMA-IR, printr-o analiză a corelației dintre DMO și criteriile cumulative ale SMet în raport cu gradele de obezitate. Contribuția mea personală în acest domeniu a constat în observarea unei relații neliniare, bifazice, între DMO și IMC, evidențiindu-se o scădere vizibilă a DMO după o valoare a IMC de 27,2 kg/m². Aceste date sunt importante pentru studiile asupra SMet la pacienții cu OP, care sunt adesea limitate la simpla raportare a prevalenței acestui sindrom.

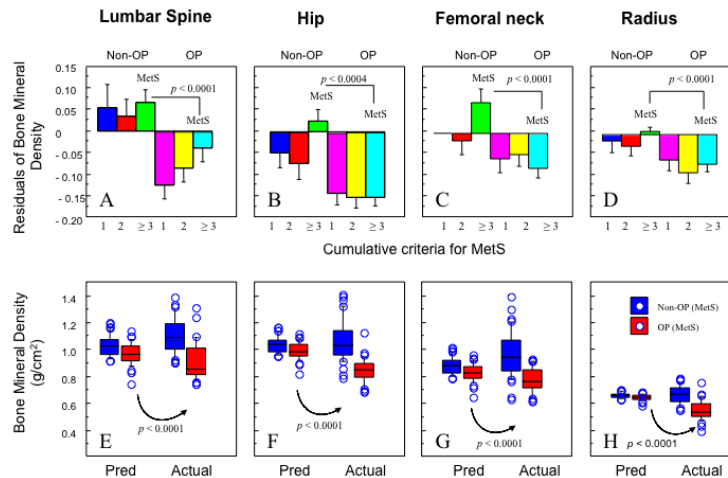


Figura 2. DMO la diferite situsuri anatomice la pacienții cu OP și SMet în comparație cu valorile prezise pe baza IMC. Valorile estimate ale DMO în funcție de IMC au fost calculate în regresie liniară la subiecții fără osteoporoză (non-OP). Valorile estimate au fost apoi comparate cu valorile reale în non-OP și OP cu SMet împreună (panourile E, F, G și H) cu afișarea valorilor reziduale (panourile A, B, C și D).

Identificarea efectelor nocive ale SMet în contextul OP este esențială, deoarece, prin prisma definiției, pacienții cu SMet includ o proporție mai mare de persoane cu obezitate și, în consecință, cu o DMO *relativ* crescută care ar putea sugera un efect protector. Datele noastre indică, de fapt, o valoare de DMO *relativ scăzută* în OP, comparativ cu valorile prezise pe baza relației IMC-DMO observată la subiecții control.

STUDIUL 2: Cartografia haplotipurilor relevă asocierea genei *FTO* cu osteoporoza postmenopauzală

Interacțiunea dintre obezitate și OP este complexă, deoarece femeile obeze, prin încărcarea mecanică sau producția de estrogen de către țesutul adipos, au adesea o DMO mai mare, interpretată ca având rol protector. Însă creșterea DMO nu se traduce neapărat reducerea riscului de fractură, fenomen cunoscut sub numele de „*paradoxul obezității*” (Rinonapoli et al., 2021). Printre numeroșii factori care ar putea contribui la un risc crescut de fracturi, predispoziția genetică joacă un rol determinant. Un studiu recent de meta-analiză bivariată GWAS a indicat trei locusuri (2p23.2, 16q12.2 și 18q21.32) cu efect pleiotrop atât asupra obezității, cât și asupra OP și care corespund genelor *TRMT61B* (TRNA metiltransferaza 61B), *FTO* (*fat mass and on-besity associated gene*) și genei

MC4R a receptorului de Melanocortina 4 (Pei et al., 2020). În urma descoperirii genei *FTO* ca genă far a obezității, *FTO* a atras o atenție particulară și în alte boli metabolice, precum DZT2, steatoza hepatică non-alcoolică, HTA, bolile cardiovasculare și mai recent OP (Frayling et al., 2007; Li et al., 2020). Gena *FTO* codifică o *Fe(II) oxigenaza dependentă de 2-oxoglutarat* care joacă un rol în *reglarea epigenetică transcripțională*, funcționând ca o demetilază a ARNm, mai ales în demetilarea de N(6)-metiladenozină (m6A) (Chen et al., 2020). Studiile pe culturi celulare și modele animale transgenice au implicat *FTO* în adipogeneză, apoptoza adipocitară și diferențierea *celulelor stem mezenchimale ale măduvei osoase* în adipocite sau osteoblaste. Pe lângă expresia sa în țesutul adipos, creier, mușchi și inimă, gena *FTO* este exprimată în măduva osoasă, fiind un candidat promițător pentru predispoziția genetică la OP (Zhang et al., 2019). Investigațiile privind rolul *FTO* în OP, în special la femeile aflate în menopauză, sunt foarte limitate. Guo et al. 2011 a identificat șase SNP-uri în intronul 8 al genei *FTO* asociate cu creșterea DMO la nivelul șoldului. Similar, alte studii au raportat mai multe SNP-uri în intronul 1 al *FTO* asociate cu fractura de șold, însa fără a afecta DMO (De Dios et al., 2024; Tran et al., 2013).

În acest context, ne-am propus ca obiectiv a investiga gena *FTO* în OP de postmenopauză prin analiza a cinci SNP-uri în intronul 1 asociate anterior cu obezitatea (Greere et al., 2024b). Cartografierea haplotipurilor folosind ADN-ul fazat a dezvăluit asocieri și mai puternice cu OP și cu fracturile de fragilitate, în corelație cu reducerea DMO. Studiul a fost realizat pe populația deja descrisă în Studiul 1 pentru care ADN-ul genomic a fost extras folosind Kit-ul Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, SUA). Cinci SNP-uri din intronul 1 al genei *FTO* (rs8057044, rs8050136, rs9939609, rs62033406, rs9930506) au fost selectate pe baza studiilor anterioare în populațiile Franceze și Române (Haydar et al., 2019; Attaoua et al., 2008). Am genotipat în plus un SNP rs3736228 în gena *LRP5* identificată ca genă candidată din studiile de GWAS. Genotiparea a fost efectuată prin test de discriminare alelelor (tehnica KASPar de la LCG Genomics, Teddington, Marea Britanie). Pentru ADN-ul fazat, haplotipurile au fost reconstruite în populație utilizând programul PHASE 2.1 și vizualizate pentru harta *dezechilibrului de legătură* (DL) în HAPLOVIEW 3.1. Predicțiile activității transcripționale au fost examinate în programul HaploReg v.4.1 (<http://archive.broadinstitute.org/mammals/haploreg>).

Analiza statistică. Analiza a fost efectuată în programul StatView 5.0 (Abacus Concepts, Berkeley, CA), similar cu studiul anterior. Regresia logistică a fost efectuată prin metoda descendentă pentru a obține asocierea SNP-urilor, iar corecțiile Bonferroni au fost efectuate în programul Rv3.2.1. Harta de DL dintre SNP-uri a fost calculată în baza de date NIH (<https://ldlink.nih.gov>) și în HAPLOVIEW 3.1. Corelația genotip-fenotip a fost realizată în populația OP și rezultatele pentru *perechile de haplotipuri* au fost corelate cu cele de la SNP-urile independente pe ADN nefazat. Pentru DMO au fost testate toate situsurile anatomice și valorile au fost ajustate pentru IMC. Asocierea genetică a fost efectuată comparând subiecții non-OP (controlii) cu subiecții OP (cazuri).

Rezultate. Asocierea genetică. Cinci SNP-uri din gena *FTO* (rs8057044, rs8050136, rs9939609, rs62033406 și rs9930506) și un SNP din gena *LRP5* (rs3736228) au prezentat o MAF (*minor allele frequency*) comparabilă cu populațiile Europene. Rezultate preliminare au arătat că modelul genetic cel mai semnificativ este cel „over-dominant”. Astfel, în regresia logistică, SNP rs9930506 (GA) s-a asociat cu OP cu OR importantă, în timp ce asocierea markerilor rs8057044 (GA) și rs9939609 (TA) a apărut numai ca o tendință. Asocierea markerului rs9930506 a fost **confirmată după corecția Bonferroni** ($P < 0,0175$). Nu a fost detectată nicio asociere pentru markerul rs3736228 în gena *LRP5*. Important, toate cele cinci SNP-uri au fost asociate semnificativ cu OP severă cu fracturi, printre care rs9939609 a avut un efect *protector*, iar celelalte un efect *patogen*. Asocierile cu OP severă și fractura au fost susținute și ele de **corecția Bonferroni** pentru rs8057044 ($P < 0,013$) și pentru rs9930506 ($P < 0,001$). Analiza condițională a arătat că markerii rs9930506 și rs9939609 se asociază independent ($P < 0,0001$ și, respectiv, 0,01) în blocul de DL corespunzător. SNP-urile rs8057044 și rs9930506 s-au găsit într-un DL redus ($r^2 = 0,70$). Prin urmare, pentru investigarea corelațiilor ulterioare am considerat trei SNP-uri rs8057044, rs9939609 și rs9930506 ca SNP-uri lider.

Haplotype Mapping. Pentru a înțelege efectele biologice ale SNP-urilor, am efectuat cartografierea haplotipurilor folosind programul PHASE. În total 9 haplotipuri au fost reconstruite în populație, care au fost apoi atribuite indivizilor dizigoți ca **perechi de haplotipuri**. Două haplotipuri (H1 și H9) au fost mai frecvente ($> 40\%$), în timp ce altele (H2 până la H8) au fost rare sau foarte rare. În populație au fost identificate 17 perechi de haplotipuri, cu **trei perechi frecvente**: H1/H1 (24,5%), H1/H9 (35,6%) și H9/H9 (20,2%).

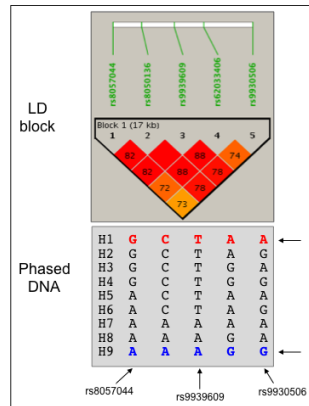


Figura 3. Harta de dezzechilibru de legătura a SNP-urilor din intronul 1 al genei *FTO* și haplotipurile reconstruite cu programul PHASE.

Un rezultat surprinzător a apărut din **analiza perechilor de haplotipuri**. În timp ce perechea H1/H1 a rămas ne semnificativă, **H9/H9 a fost asociată cu OP severă cu efect protector**. Din contră, perechea **heterozigotă H1/H9 a fost asociată atât cu OP, cât și cu OP severă cu OR ridicat**, mai ales la persoanele rezistente la insulină cu un OR de 3,92, 95% CI [1,48-10,367], $P < 0,0029$. Pentru a înțelege consecințele metabolice, variațiile OR au fost examinate în funcție de prezența sau absența SMet sau a componentelor sale. Când populația a fost stratificată drept cu și fără SMet, o asociere semnificativă a fost detectată pentru **H1/H9 în absența SMet** ($P < 0,03$, OR 1,9, 95% CI [1,043-3,626]), absența nivelurilor scăzute de HDL-C ($P < 0,0057$, OR 2,3, 95% CI [1,249-4,242]), la persoanele cu **HTA** cu $P < 0,0093$, OR 2,5, 95% CI [1,228-5,148] și în special la **femeile cu nivel crescut de TG** ($P < 0,0079$, OR 4,58, 95% CI [1,35-15,98]). Același tablou a fost obținut pentru asocierea H1/H9 în subpopulația OP cu fracturi, OR pentru perechea H1/H9 fiind crescută până la 9,1 ($P < 0,0067$) la indivizii cu nivel crescut de TG. Aceste date indică în mod concordant că perechea de haplotipuri H1/H9 este patogenă pentru OP și fracturi, mai ales în funcție de prezența RI, a unui nivel crescut de TG și HTA.

Corelația genotip –fenotip. Pentru a analiza consecințele metabolice și alterările osoase, am examinat corelația genotip-fenotip în OP. **Purtătorii haplotipurilor H1/H9 au prezentat un fenotip mai slab** (12,2% obezitate) și atribuit genotipurilor heterozigote GA, TA sau GA ale rs8057044, rs9939609 și, respectiv, rs9930506. În ciuda fenotipului mai slab, această combinație de SNP-uri (H1/H9) s-a dovedit a fi patogenă pentru os, fiind asociată cu 53% fracturi și o prevalență mai mare a modificărilor musculare (51%). Prin contrast, purtătorii **homozigoți H9/H9** purtând alele AA, AA și GG ale celor trei SNP-uri

lider au fost mai obezi (30,2% obezitate), cu o circumferință mai mare a taliei (97,2 cm), cu obezitate centrală (86%) și valori mai mari de TA sistolică. Purtătorii homozigoți H1/H1 ai alelelor GG, TT și AA ale SNP-urilor au prezentat un fenotip intermediar. Nu am găsit efecte asupra indexului HOMA-IR, RI ca variabilă nominală, glicemiei *à jeun* sau SMet, deși la purtătorii H1/H1 a existat o tendință către o prevalență mai mare (39,3%) a SMet și niveluri scăzute de HDL-C (46,4%, $P < 0,0003$). Aceste din urmă efecte pot fi determinate de efectul dominant al genotipului AA rs9930506. În următoarea etapă, atenția noastră s-a concentrat asupra **metabolismului osos**, în special a DMO, scorului TBS și markerilor de turnover osos. Purtătorii perechii patogene H1/H9 au prezentat valori mai mici de DMO la toate situsurile anatomice, în timp ce H9/H9 au aratat valori mai mari.

În această lucrare, am prezentat deci dovezi pentru asocierea unor SNP-uri în intronul 1 al genei *FTO* cu OP și OP severă cu fracturi de fragilitate, **desemnând gena *FTO* ca un candidat promițător pentru OP**. Aceste date consolidează studiile anterioare asupra genei *FTO* și, prin cartografierea haplotipurilor, am oferit noi date în descrierea de biomarkeri pentru predispoziția genetică către OP. **Contribuția mea personală în acest domeniu constă în identificarea SNP-urilor din intronul 1 al genei *FTO* ca fiind asociate cu OP primară și cu OP severă cu fracturi de fragilitate, în concordanță cu reducerea DMO la diferite situsuri anatomice.**

STUDIUL 3: Analiza bioinformatică în genetica osteoporozei și a sindromului metabolic

Este de menționat că domeniul de cercetare în genetică a evoluat enorm în ultimii ani prin introducerea analizei bioinformatică, etapă esențială în prezent, care pune la dispoziția cercetătorilor o serie de baze de date publice. Acest studiu 3 prezintă rezultatele obținute în domeniul bioinformaticii și analizei genetice a OP, realizate în cadrul stagiului de cercetare efectuat în Franța. Înainte de a propune genotiparea genelor candidate (*FTO* sau *LRP5*), am considerat necesar să examinăm datele privind OP, prin analiza bioinformatică a studiilor GWAS și a RI, SMet sau sarcopenie. Nu este deci vorba de o simplă sinteză de literatură, ci de integrarea de date din bazele de date publice și analiza rezultatelor prin programe specifice, având la dispoziție un material informatic de capacitate. Ipoteza a fost că anumite gene ale OP pot fi comune cu cele implicate în RI sau în SMet.

Rezultate. Studiile de GWAS în OP. Din 2007 până în prezent au fost efectuate mai mult de 40 de GWAS-uri în OP și care au identificat mai mult de 518 locusuri asociate cu diferite fenotipuri osteoporotice cu semnificație de GWAS ($P < 10^{-8}$). Ele explică 20% din variabilitatea DMO. Aceste studii au fost deja revizuite în literatura și aici vom prezenta numai aspectele în care noi am avut o **contribuție originală**.

Studiile de GWAS în SMet. De o manieră similară am revizuit și studiile legate de genetica SMet. Există mai mult de 100 de locusuri asociate cu IMC, arătat într-o meta-analiză GWAS pe 340 000 subiecți predominant Europeni, și responsabile pentru 2.7% din variația IMC-ului. Până la acest moment există puține GWAS-uri desfășurate care să aibă ca fenotip SMet. Un studiu în care SMet a fost diagnosticat conform definiției IDF, a inclus 4560 indieni asiatici și nu a găsit nicio asociere semnificativă. A fost raportată totuși o serie de gene influente precum *CETP*, *LPL*, *FADS1*, *FADS2* și *FLJ41733* asociate cu HDL-C ($P < 10^{-6}$) și gena *TCF7L2* asociată cu DZT2 ($P < 10^{-6}$) (Zabaneh și Balding, 2010). O meta-analiză a compactat 13 studii în consorțiu STAMPEED (22 161 subiecți) și a studiat asocieri genetice cu SMet definit de NCEP ATP III. Rezultatele au implicat genele *LPL*, *CETP* și clusterului *APOA5* (*ZNF259*, *BUD13* și *APOA5*). În asociere cu combinații bivariante de componente ale SMet au fost raportate 27 de SNP-uri adnotate la 11 gene, printre care *GCKR*, *C2orf16*, *ZNF512*, *CCDC121*, *ABCB11*, *TFAP2B*, *TRIB1* și *LIPC* (Kraja et al., 2011). Privind RI au fost identificate mai mult de 60 de locusuri prin GWAS, primele 10 ca semnificație statistică și replicare fiind adnotate genelor *IRS1*, *PPARG*, *GRB14*, *PEPD*, *PDGFC*, *MAP3K1*, *ARL15*, *FAM13A*, *RSPO3* și *LYPLAL1*.

Genetica comună între OP, SMet și RI. Aceste studii de sinteză ne-au permis să identificăm bioinformatic genele comune între cele trei afecțiuni prin interogarea site-ului Hugenavigator. Am inclus 174 de gene pentru SMet și 1514 gene pentru RI, care au fost intersectate cu cele 76 de gene de OP (Trajanovska et al. 2018) plus 19 gene comune între OP și fracturile de fragilitate. Remarcabil, foarte puține gene au fost găsite în comun. De exemplu, între genele pentru OP și fracturi de fragilitate, doar trei gene au fost comune cu SMet (*LRP5*, *ESR1* și *F2*). Între genele pentru OP și RI numai 16 gene au fost comune: *TNFRSF11B*, *LRP5*, *TNFSF11*, *ESR1*, *SOST*, *TNFRSF11A*, *CTNNA1*, *F2*, *SOX6*, *RSPO3*, *LEKR1*, *FAM9B*, *PPP1R3B*, *SLC8A1*, *AQP1*, *ETS2*, *MBL2*. Mai mult, când încrucișarea a fost făcută cu genele din sistemul *Wnt*, numai trei gene sunt comune

(*CTNNB1*, *LRP5* și *PPARD*). De remarcat totuși că între genele comune apar pentru prima dată *FTO* și *IRS-1*, în timp ce studiile de GWAS propriu-zise nu au implicat gena *FTO* sau a fost ignorată în OP. Nu există explicații de ce pentru mulți ani gena *FTO* a fost ignorată în OP mai ales că Pei et al în 2020 a arătat efectul pleiotropic al *FTO* în obezitate și DMO.

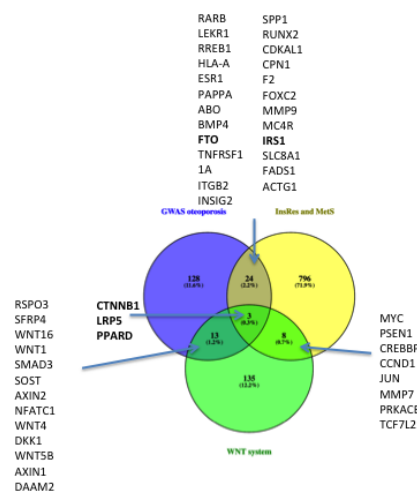


Figura 3. Graficul Venn de încrucișare între genele OP, SMet și RI și genele din sistemul Wnt.

Aceste studii realizate pentru a pregăti obiectivele mai precise, au permis elaborarea de noi ipoteze de lucru și arată că studiul bioinformatic devine o etapă incontestabilă în genetică. Am emis ipoteza că gena *FTO* ar putea fi legată într-un fel de OP prin mecanisme încă necunoscute, dar probabil acționând **la nivelul măduvei osoase, prin redirecționarea diferențierii celulelor stem către adipocite în loc de osteoblaste**. Deși nepublicat, am inițiat în aceeași perioadă un studiu de GWAS în SMet, pe colecție de pacienți cu și fără SMet din România, Turcia și Franța, selectând genele implicate în OP. Graficul de tip Manhattan a arătat însă că nicio genă nu a obținut o valoare P semnificativă.

În concluzie, aceste studii au avut o importanță considerabilă în formularea ipotezelor de studiu. Mai mult, aceste date ne dau posibilitatea să revenim asupra genei *FTO* pentru care dispunem de 4000 de SNP-uri, permițând în viitor realizarea unei cartografii dense a haplotipurilor, inegalabilă pe plan internațional.

CONCLUZII

Osteoporoza primară de postmenopauză este o boală complexă cu consecințe semnificative asupra sănătății publice prin creșterea riscului de fracturi. **În Studiul 1 am observat că la pacientele cu OP există o relație neliniară, bifazică între DMO și IMC în care DMO scade semnificativ după o valoare prag a IMC de 27,2 kg/m².** Această observație a permis evidențierea efectului nociv al componentelor SMet asupra metabolismului osos și traduce necesitatea unor protocoale de cercetare mai elaborate, precum și necesitatea adoptării unei atitudini terapeutice individualizate.

OP recunoaște în etiopatogenia sa un rol determinant al predispoziției genetice, beneficiind de apariția unor noi strategii de investigare în genetica moleculară la nivelul întregului genom (GWAS). Fiind de natură poligenică, aplicarea rezultatelor genetice în clinică, ca markeri de predicție, rămâne în continuare un demers dificil. Cauzele sunt multiple, întrucât pe lângă caracterul poligenic, multe gene au efecte pleiotropice.

În Studiul 2 am analizat SNP-uri din intronul 1 al genei *FTO* (rs8057044, rs8050136, rs9939609, rs62033406 și rs9930506) în relație cu OP și fractura de fragilitate, care s-au asociat cu risc crescut de OP (mai ales rs9930506) și OP severă cu fracturi (rs9939609 cu efect protector, iar toate celelalte cu efect patogen). Această lucrare este prima care raportează SNP-ul rs8057044 ca fiind asociat cu OP și riscul de fractură. **Mai mult, cartografierea haplotipurilor folosind ADN-ul fazat a dezvăluit asocieri și mai puternice cu fracturile de fragilitate în OP, determinate de combinații specifice de haplotipuri și în corelație cu reducerea DMO la toate situsurile anatomice studiate.**

Descoperirea implicării genei *FTO* în osteoporoză (Studiul 2), va schimba dramatic cercetarea în patogeneza OP, aducând această boală în domeniul transcriptomicii și, prin urmare, implicând simultan mecanisme epigenetice și genetice, permițând în viitor și stabilirea unor markeri de predicție în clinică. În plus, având în vedere importanța genei *FTO* în obezitate și interacțiunea cu aspectele nutriționale, această genă va deschide noi direcții de cercetare în domeniul terapeutic. Având în vedere relația complexă între obezitate, SMet și OP (așa cum am demonstrat în Studiul 1), nivelul de obezitate ar putea avea un rol modulator asupra relației dintre SMet, RI sistemică și OP, ceea ce face descrierea markerilor genetici predictivi deosebit de importantă.

BIBLIOGRAFIE

- Attaoua, R., Ait El Mkaem, S., Radian, S., Fica, S., Hanzu, F., Albu, A., Gheorghiu, M., Coculescu, M. și Grigorescu, F. (2008). FTO gene associates to metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 373(2), pp.230–234. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.06.039>.
- Chen, X., Hua, W., Huang, X., Chen, Y., Zhang, J. și Li, G. (2020). Regulatory Role of RNA N6-Methyladenosine Modification in Bone Biology and Osteoporosis. *Frontiers in Endocrinology*, 10. doi:<https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00911>.
- Clynes, M.A., Harvey, N.C., Curtis, E.M., Fuggle, N.R., Dennison, E.M. și Cooper, C. (2020). The Epidemiology of Osteoporosis. *British Medical Bulletin*, 133(1). doi:<https://doi.org/10.1093/bmb/ldaa005>.
- De Dios, K., Huynh, N., Tran, T.S., Center, J.R. și Nguyen, T.V. (2024). Association between Fat Mass and Obesity-Related Transcript Polymorphisms and Osteoporosis Phenotypes. *Journal of bone metabolism*, 31(1), pp.48–55. doi:<https://doi.org/10.11005/jbm.2024.31.1.48>.
- Frayling, T.M., Timpson, N.J., Weedon, M.N., Zeggini, E., Freathy, R.M., Lindgren, C.M., Perry, J.R.B., Elliott, K.S., Lango, H., Rayner, N.W., Shields, B., Harries, L.W., Barrett, J.C., Ellard, S., Groves, C.J., Knight, B., Patch, A.-M. , Ness, A.R., Ebrahim, S. și Lawlor, D.A. (2007). A Common Variant in the FTO Gene Is Associated with Body Mass Index and Predisposes to Childhood and Adult Obesity. *Science*, 316(5826), pp.889–894. doi:<https://doi.org/10.1126/science.1141634>.
- Greere, D.**, Grigorescu, F., Manda, D. și Lautier, C. (2023). Insulin Resistance and Pathogenesis of Postmenopausal Osteoporosis. *Acta Endocrinologica*, 19(3), pp.349–363. doi:<https://doi.org/10.4183/aeb.2023.349>.
- Greere, D.**, Grigorescu, F., Manda, D., Voicu, G., Lautier, C., Nitu, I. și Poiana, C. (2024a). Relative Contribution of Metabolic Syndrome Components in Relation to Obesity and Insulin Resistance in Postmenopausal Osteoporosis. *Journal of Clinical Medicine*, 13(9), pp.2529–2529. doi:<https://doi.org/10.3390/jcm13092529>.
- Greere, D.**, Haydar, S., Grigorescu, F., Manda, D., Voicu, G., Lautier, C. și Poiană, C. (2024b). Fine-Scale Haplotype Mapping Reveals an Association of the FTO Gene with Osteoporosis and Fracture Risk in Postmenopausal Women. *Genes*, 15(9). doi:<https://doi.org/10.3390/genes15091152>.
- Grigorie, D., Sucaliuc, A., Johansson, H., Kanis, J.A. și McCloskey, E. (2013). Incidence of Hip Fracture in Romania and the Development of a Romanian FRAX Model. *Calcified Tissue International*, 92(5), pp.429–436. doi:<https://doi.org/10.1007/s00223-013-9697-7>.
- Guo, Y., Liu, H., Yang, T.-L., Li, S.M., Li, S.K., Tian, Q., Liu, Y.-J. și Deng, H.-W. (2011). The Fat Mass and Obesity Associated Gene, FTO, Is Also Associated with Osteoporosis Phenotypes. *PLoS ONE*, 6(11), p.e27312. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027312>.
- Haydar, S., Grigorescu, F., Vintilă, M., Cogne, Y., Lautier, C., Tutuncu, Y., Brun, J.F., Robine, J.M., Pugeat, M., Normand, C., Pouchet, P., Gheorghiu, M.L., Georgescu, C., Badiu, C., Băculescu, N., Renard, E., Ylli, D., Badiou, S., Sutra, T. și Cristol, J.P. (2019). Fine-scale haplotype mapping of MUT, AACS, SLC6A15 and PRKCA genes indicates association with insulin resistance of metabolic syndrome and relationship with branched chain amino acid metabolism or regulation. *PLOS ONE*, [online] 14(3), p.e0214122. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214122>.

- Kanis, J.A., Cooper, C., Rizzoli, R. și Reginster, J.-Y. (2019). European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporosis International*, [online] 30(1), pp.3–44. doi:<https://doi.org/10.1007/s00198-018-4704-5>.
- Kanis, J.A. și Glüer, C.-C. (2000). An Update on the Diagnosis and Assessment of Osteoporosis with Densitometry. *Osteoporosis International*, 11(3), pp.192–202. doi:<https://doi.org/10.1007/s001980050281>.
- Karsenty, G. și Ferron, M. (2012). The contribution of bone to whole-organism physiology. *Nature*, [online] 481(7381), pp.314–320. doi:<https://doi.org/10.1038/nature10763>.
- Li Y., Wang J., Huang C., Shen M., Zhan H., Xu K. RNA N6-methyladenosine: a promising molecular target in metabolic diseases, *Cell & Bioscience*. 10 (2020). <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00385-4>.
- Pei, Y., Wei, X., Feng, G., Zhang, H., Yang, X., Zhang, S., Fang, C., Huang, Y., Tian, Q., Deng, H. și Zhang, L. (2020). Bivariate genome-wide association analysis identified three pleiotropic loci underlying osteoporosis and obesity. *Clinical genetics*, 97(5), pp.785–786. doi:<https://doi.org/10.1111/cge.13692>.
- Rinonapoli, G., Pace, V., Ruggiero, C., Ceccarini, P., Bisaccia, M., Meccariello, L. și Caraffa, A. (2021). Obesity and Bone: A Complex Relationship. *ProQuest*, [online] 22(24), p.13662. doi:<https://doi.org/10.3390/ijms222413662>.
- Salari, N., Ghasemi, H., Mohammadi, L., Behzadi, M. hasan, Rabieenia, E., Shohaimi, S. și Mohammadi, M. (2021). The global prevalence of osteoporosis in the world: a comprehensive systematic review and meta-analysis. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, [online] 16(1). doi:<https://doi.org/10.1186/s13018-021-02772-0>.
- Tencerova, M., Frost, M., Figeac, F., Nielsen, T., Ali, D., Lindegaard, J., Andersen, T.L., Haakonsson, A.K., Rauch, A., Madsen, J.S., Ejersted, C., Højlund, K. și Kassem, M. (2019). Obesity-Associated Hypermetabolism and Accelerated Senescence of Bone Marrow Stromal Stem Cells Suggest a Potential Mechanism for Bone Fragility. *Cell Reports*, 27(7), pp.2050–2062.e6. doi:<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.066>.
- Trajanoska, K., Morris, J.A., Oei, L., Zheng, H.-F., Evans, D.M., Kiel, D.P., Ohlsson, C., Richards, J.B. și Rivadeneira, F. (2018). Assessment of the genetic and clinical determinants of fracture risk: genome wide association and mendelian randomisation study. *BMJ*, [online] 362, p.k3225. doi:<https://doi.org/10.1136/bmj.k3225>.
- Tran, B., Nguyen, N.D., Center, J.R., Eisman, J.A. și Nguyen, T.V. (2013). Association between fat-mass-and-obesity-associated (FTO) gene and hip fracture susceptibility. *Clinical Endocrinology*, 81(2), pp.210–217. doi:<https://doi.org/10.1111/cen.12335>.
- Wong, S., Chin, K.-Y., Suhaimi, F., Ahmad, F. și Ima-Nirwana, S. (2016). The Relationship between Metabolic Syndrome and Osteoporosis: A Review. *Nutrients*, [online] 8(6), p.347. doi:<https://doi.org/10.3390/nu8060347>.
- Zabaneh, D. și Balding, D.J. (2010). A Genome-Wide Association Study of the Metabolic Syndrome in Indian Asian Men. *PLoS ONE*, 5(8), p.e11961. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011961>.
- Zhang Q., Riddle R.C., Yang Q., Rosen C.R., Guttridge D.C., Dirckx N., Faugere M.-C., Farber C.R., Clemens T.L. The RNA demethylase FTO is required for maintenance of bone mass and functions to protect osteoblasts from genotoxic damage, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*. 116 (2019) 17980–17989. <https://doi.org/10.1073/pnas.1905489116>.

LISTA CU LUCRĂRILE ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

Articole publicate în reviste de specialitate

1. **Greere, D.**, Grigorescu, F., Manda, D., Lautier, C. și Poiana, C. (2023). Insulin Resistance and Pathogenesis of Postmenopausal Osteoporosis. *Acta Endocrinologica*, 19(3) :349–363. doi:<https://doi.org/10.4183/aeb.2023.349>.
Impact factor 0.7. Date din acest articol se regăsesc în rezumat la pagina 4.
<https://www.acta-endo.ro/Archive/Abstract?doi=2023.349>
2. **Greere, D.**, Grigorescu, F., Manda, D., Voicu, G., Lautier, C., Nitu, I. și Poiana, C. (2024a). Relative Contribution of Metabolic Syndrome Components in Relation to Obesity and Insulin Resistance in Postmenopausal Osteoporosis. *Journal of Clinical Medicine*, 13(9), pp.2529–2529. doi:<https://doi.org/10.3390/jcm13092529>
Impact factor 3.0. Date din acest articol se regăsesc în rezumat la paginile 6-10.
<https://www.mdpi.com/2077-0383/13/9/2529>
3. **Greere, D.**, Haydar, S., Grigorescu, F., Manda, D., Voicu, G., Lautier, C. și Poiană, C. (2024b). Fine-Scale Haplotype Mapping Reveals an Association of the FTO Gene with Osteoporosis and Fracture Risk in Postmenopausal Women. *Genes*, 15(9). doi:<https://doi.org/10.3390/genes15091152>.
Impact factor 2.8. Date din acest articol se regăsesc în rezumat la paginile 10-14.
<https://www.mdpi.com/2073-4425/15/9/1152>