UNIWERSYTET
WARMIŃSKO-MAZURSKI
W OLSZTYNIE

WYDZIAŁ: Biologii i Biotechnologii
Dziedzina: nauk ścisłych i przyrodniczych
Dyscyplina: nauki biologiczne

mgr inż. Dominika Marta Rozmus

Rozprawa doktorska

Wpływ wybranych polimorfizmów w genach *VDBP* i *VDR* na stężenie witaminy D oraz jej transportera u pacjentów ze zdiagnozowanym obluzowaniem endoprotezy stawu biodrowego

The effect of selected polymorphisms in the *VDBP* and *VDR* genes on vitamin D concentration and its transporter in patients diagnosed with hip joint endoprosthesis loosening

Praca wykonana w Katedrze Biochemii Wydziału Biologii i Biotechnologii

dr hab. Anna Cieślińska, prof. UWM, Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

dr hab. n. med. lek. Janusz Płomiński, prof. CMKP, Klinika Chirurgii Urazowej Narządu Ruchu i Ortopedii, Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny im. prof. Adama Grucy CMKP w Otwocku

Olsztyn, 2025

Spis treści

Wykaz artykułów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej 4
Wykaz skrótów 5
Streszczenie w języku polskim 6
Słowa kluczowe 7
Abstract 8
Keywords 9
Wstęp 10
Endoprotezoplastyka całkowita stawu biodrowego 10
Czynniki ryzyka obluzowania i powikłania w endoprotezoplastyce 12
Polimorfizmy genetyczne 14
Witamina D 15
Rola witaminy D 15
Synteza witaminy D 16
Białko wiążące witaminę D (VDBP) 19
Receptor wiążący witaminę D (VDR) 20
Znaczenie badań dla rozwoju dyscypliny 23
Cel 24
Hipotezy badawcze 25
Zadania badawcze 26
Materiały i metody 27
Rekrutacja pacjentów 27
Pobranie materiału biologicznego 29
Izolacja DNA 29
Genotypowanie polimorfizmów 29
Oznaczanie stężeń białek VDBP i VDR 30
Oznaczenie stężenia 25(OH)D 30
Analiza statystyczna 30
Wyniki 31
Zadanie badawcze 1 31
Zadanie badawcze 2 34
Wnioski 36
Podsumowanie 37

Spis literatury 38
Spis rycin 49
Spis tabel 50
Wkład autorów w powstanie artykułów 51
Finansowanie 52
Współpraca 53
Komisja Bioetyczna 54
Opublikowane prace wchodzące w skład rozprawy 55
Oświadczenia kandydata oraz współautorów dotyczące ich wkładu w przygotowanie opublikowanych artykułów naukowych 98

Wykaz artykułów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska obejmuje dwa oryginalne artykuły naukowe, opublikowane w latach 2024-2025, które koncentrują się na roli witaminy D, białek VDBP i VDR oraz wybranych polimorfizmów występujących w ich genach, w procesie obluzowania endoprotezy stawu biodrowego.

Artykuły wchodzące w skład rozprawy doktorskiej:

1. **Rozmus, D.,** Fiedorowicz, E., Grzybowski, R., Płomiński, J., i Cieślińska, A. (2024). *VDR* Gene Polymorphisms (*BsmI*, *FokI*, *TaqI*, *ApaI*) in Total Hip Arthroplasty Outcome Patients. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(15), 8225. https://doi.org/10.3390/ijms25158225

   MEIN[1]= 140 pkt, IF[2] = 4,9

2. **Rozmus, D.**, Fiedorowicz, E., Płomiński, J., i Cieślińska, A. (2025). Vitamin D Binding Protein Gene Polymorphisms (rs4588 and rs7041) and VDBP Levels in Total Hip Replacement Outcomes. *Nutrients*, *17*(3), 378. https://doi.org/10.3390/nu17030378;

   MEIN[1]= 140 pkt, IF[2] = 4,8

Sumarycznie: 280 punktów MEIN[1], IF[2] = 9,7

[1] Liczba punktów na podstawie komunikatu Ministra Edukacji i Nauki w sprawie wykazu czasopism naukowych z dnia 5 stycznia 2024 roku
[2] IF – wskaźnik Impact Factor czasopisma w roku publikacji

Wykaz skrótów

1,25(OH)$_2$D – 1,25-dihydroksywitamina D (kalcytriol, aktywna forma witaminy D)

25(OH)D – 25-hydroksywitamina D (kalcydiol, metabolit witaminy D)

7-DHC – 7-dehydrocholesterol

BMI – wskaźnik masy ciała (Body Mass Index)

CBE – Centralna Baza Endoprotezoplastyk

CYP – Cytochrom P450 (rodzina enzymów biorąca udział w m. in. metabolizmie witaminy D)

M-CSF – czynnik stymulujący kolonie makrofagów (macrophage colony-stimulating factor)

NFZ – Narodowy Fundusz Zdrowia

PGE2 – prostaglandyna E2 (prostaglandin E2)

PM – błona okołoprotezowa (periprosthetic membrane)

RANKL – ligand aktywatora receptora jądrowego czynnika κ B (Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand)

RE – Rejestr Endoprotezoplastyk

rTHA – rewizyjna całkowita endoprotezoplastyka stawu biodrowego (Revision Total Hip Arthroplasty)

RXR – receptor retinoidowy X (Retinoid X Receptor)

THA – całkowita endoprotezoplastyka stawu biodrowego (Total Hip Arthroplasty)

THR – całkowita endoprotezoplastyka stawu biodrowego (Total Hip Replacement)

TNFα – czynnik martwicy nowotworów (Tumor Necrosis Factor α)

UVB – promieniowanie ultrafioletowe B (Ultraviolet B)

VDBP – białko wiążące witaminę D (Vitamin D Binding Protein)

VDRE – element odpowiedzi na witaminę D (Vitamin D Response Element)

VDR – receptor witaminy D (Vitamin D Receptor)

VEGF – czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (Vascular Endothelial Growth Factor)

Streszczenie w języku polskim

Witamina D oraz jej szlak metaboliczny, w tym białko wiążące witaminę D (VDBP) i receptor witaminy D (VDR), odgrywają ważną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu układu kostno-stawowego. Związek między niedoborem witaminy D a rozwojem schorzeń ortopedycznych wskazuje na możliwość zwiększenia ryzyka obluzowania endoprotez stawu biodrowego u pacjentów z niskim poziomem witaminy D. Polimorfizmy genów *VDBP* oraz *VDR*, poprzez oddziaływanie na poziomie molekularnym, mogą wpływać na biodostępność witaminy i jej wiązanie do receptora.

Celem badania było określenie związku między polimorfizmami pojedynczych nukleotydów (SNP) w genach *VDR* (TaqI – rs731236, ApaI – rs7975232, BsmI – rs1544410, FokI – rs2228570) i *VDBP* (rs4588, rs7041), a stężeniami białka VDBP oraz 25(OH)D w surowicy pacjentów po przebytej endoprotezoplastyce stawu biodrowego. W badaniu wzięli udział pacjenci po endoprotezoplastyce stawu biodrowego (CA - bez obluzowania, L - z obluzowaniem) oraz grupa kontrolna (C).

Genotypowanie polimorfizmów w genach *VDR* i *VDBP* przeprowadzono za pomocą metod PCR-RFLP oraz qPCR z sondami TaqMan. Stężenia badanych białek i 25(OH)D w surowicy oznaczono za pomocą testów immunoenzymatycznych ELISA. Analizy statystyczne obejmowały obliczenie współczynników szans (OR) oraz testy istotności i korelacji.

Badania wykazały, że warianty *Tt*, *tt* (TaqI), *BB*, *Bb* (BsmI) oraz *FF*, *Ff* (FokI) w genie *VDR* częściej występowały u pacjentów z obluzowaniem, podobnie jak haplotyp *AtBF*, podczas gdy haplotyp *aTbf* dominował w grupie kontrolnej. Wariant *GG* w miejscu polimorficznym rs4588 oraz haplotyp *GT* (rs7041/rs4588) genu *VDBP* występowały częściej u osób z obluzowaniem protezy. Obniżone stężenia witaminy D u pacjentów ortopedycznych wskazują na możliwą rolę tej witaminy w procesach osteointegracji i procesach naprawczych po przeprowadzonej endoprotezoplastyce stawu biodrowego, a podwyższone poziomy białek VDR i VDBP mogą wskazywać na możliwy mechanizm kompensacyjny.

Słowa kluczowe

Receptor witaminy D; VDR; ApaI; TaqI; BsmI; FokI; rs731236; rs7975232; rs1544410; rs2228570; obluzowanie protezy; artroskopia; białko wiążące witaminę D; VDBP; witamina D; 25(OH)D; rs7041; rs4588; wymiana stawu biodrowego; nutrigenomika; THA, THR

Abstract

The vitamin D metabolic pathway, including vitamin D-binding protein (*VDBP*) and the vitamin D receptor (*VDR*), plays a crucial role in the proper functioning of the musculoskeletal system. The association between vitamin D deficiency and the development of orthopedic disorders suggests a potential increased risk of hip prosthesis loosening in patients with low vitamin D levels. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *VDBP* and *VDR* genes may influence vitamin D bioavailability and its receptor binding through molecular interactions.

The aim of this study was to determine the association between SNPs in the *VDR* (TaqI – rs731236, ApaI – rs7975232, BsmI – rs1544410, FokI – rs2228570) and *VDBP* (rs4588, rs7041) genes and the serum concentrations VDBP, and vitamin D (25(OH)D) in patients after total hip arthroplasty. The study included patients after total hip arthroplasty without prosthesis loosening (CA—control arthroplasty), patients with a loosened hip prosthesis (L—loosening), and a control group (C).

Genotyping of *VDR* and *VDBP* polymorphisms was performed using PCR-RFLP and qPCR with TaqMan genotyping assay. Serum concentrations of VDR, VDBP, and the inactive form of 25(OH)D were determined using ELISA immunoassays. Statistical analyses included odds ratio (OR) calculations as well as significance and correlation tests.

Studies have shown that the *Tt*, *tt* (TaqI), *BB*, *Bb* (BsmI), and *FF*, *Ff* (FokI) variants in the VDR gene were more frequently observed in patients with loosening, as was the *AtBF* haplotype, whereas *aTbf* haplotype was more prevalent in control group. Possible linkage disequilibrium between polymorphisms in the *VDR* gene influenced VDR protein levels. GG variant in rs4588 polymorphic site and *GT* haplotype (rs7041/rs4588) of the *VDBP* gene were more frequent in the prosthesis loosening group. Decreased vitamin D levels among orthopedic patients suggest a potential role of this vitamin in osteointegration and bone repairing processes following total hip arthroplasty, while higher levels of VDR and VDBP may indicate a possible compensatory mechanism.

Keywords

Vitamin D receptor; VDR; ApaI; TaqI; BsmI; FokI; rs731236; rs7975232; rs1544410; rs2228570; prosthesis loosening; arthroscopy; vitamin D binding protein; VDBP; vitamin D; 25(OH)D; rs7041; rs4588; hip joint replacement; nutrigenomics; THA; THR

Wstęp

Organizm człowieka to złożona struktura, której funkcjonowanie opiera się na współdziałaniu miliardów komórek i tkanek. Szacuje się, że ciało człowieka składa się z ponad 37 bilionów komórek (Bianconi i in., 2013), które tworzą wszystkie układy, a w tym m. in. układ kostno-stawowy. Szkielet człowieka składa się z 206 kości (Neumann i Gest, 2020) oraz ponad 600 mięśni, które odpowiadają za ruch i stanowią 40% masy ciała (Feng i in., 2022; Noto i in., 2025). W wyniku ewolucji funkcje motoryczne odegrały ważną rolę w przetrwaniu ludzkiego gatunku, umożliwiając dwunożny chód i wyprostowanie ciała. Przystosowania te przyczyniły się do zmniejszenia wydatków energetycznych związanych z ruchem, co miało decydujące znaczenie dla efektywności poruszania się (Vaughan, 2003).

Proces starzenia się organizmu prowadzi do stopniowego osłabienia zdolności motorycznych, co objawia się pogorszeniem koordynacji, elastyczności, siły i wytrzymałości motorycznej. Zmiany te mogą wynikać z wielu czynników, takich jak zmniejszenie liczby naczyń włosowatych w mięśniach szkieletowych, utrata masy mięśniowej, zmniejszenie gęstości kości i zawartości minerałów, a także redukcji liczby oraz rozmiaru synaps i zmian w regulacji hormonalnej (Hollmann i in., 2007). Rezultatem tych procesów jest spadek objętości i masy kostnej, który może prowadzić do osteoporozy oraz podwyższać ryzyko złamań i urazów (Roberts i in., 2016). Do najczęstszych schorzeń układu kostnego należą choroby zwyrodnieniowe stawów. Przeważnie dotyczą one stawów biodrowych, kolanowych i kręgosłupa. Schorzenia te charakteryzują się bólem, ograniczeniem ruchomości, co ostatecznie prowadzi do upośledzenia ich funkcji (Buckwalter i Martin, 1995; Stomberg i Öman, 2006). Gdy leczenie nieoperacyjne nie przynosi poprawy, alternatywą dla stawów pozostaje endoprotezoplastyka, która stanowi efektywną metodę poprawy jakości życia pacjentów (Apostu i in., 2017).

Endoprotezoplastyka całkowita stawu biodrowego

Na wzrost liczby pacjentów ze schorzeniami zwyrodnieniowymi układu kostno-stawowego mają wpływ różne czynniki, w tym wiek, płeć, BMI (wskaźnik masy ciała, ang. *Body Mass Index*), osteoporoza, schorzenia hormonalne, czy cukrzyca. Osteoporoza to jedna z przyczyn złamań końca bliższego kości udowej, a w populacji osób starszych przyczynia się ona do zwiększenia ryzyka urazów kostnych oraz zwiększenia ryzyka śmiertelności w tej

grupie pacjentów (Migliorini i in., 2022). Endoprotezoplastyka całkowita stawu biodrowego (THA, *ang. Total Hip Arthroplasty*; THR, *ang. Total Hip Replacement*) jest metodą leczenia polegającą na zaimplantowaniu trzpienia protezy w końcu bliższym kości udowej oraz panewki protezy stawu w przygotowanej loży kostnej miednicy (The HEALTH Investigators, 2019).

Endoprotezoplastyka całkowita stawu biodrowego, stosowana od ponad 100 lat, jest jednym z najczęściej wykonywanych i najbardziej udanych zabiegów ortopedycznych (Knight i in., 2011). Jej głównym celem jest redukcja bólu i powrót pacjenta do normalnego życia (Stomberg i Öman, 2006).

Operacja nie jest jednak równoznaczna z końcem leczenia choroby. Badania wykazały, że około 10% pacjentów po przebytej całkowitej endoprotezoplastyce stawu biodrowego nie wykazuje istotnej poprawy funkcjonalnej do 5 lat po przebytym zabiegu (Blom i in., 2016; Ferguson i in., 2018), a 7-23% pacjentów nadal odczuwa umiarkowany lub nawet silny ból okolicy stawu biodrowego (Blom i in., 2016). Po zabiegu protezoplastyki, obserwuje się postępujące zużycie elementów protezy, dochodzi do osteolizy wokół trzpienia i panewki, a w konsekwencji możliwe jest obluzowanie endoprotezy. Pacjenci odczuwają nawracający ból, doświadczają ograniczenia sprawności kończyny, powracają do chodzenia o kulach, co ostatecznie skutkuje koniecznością przeprowadzenia rewizyjnej endoprotezoplastyki stawu (Apostu i in., 2017).

Według statystyk, główną przyczyną obluzowania endoprotez są reakcje zapalne - aseptyczne (55,2%), procesy septyczne (7,5%), zwichnięcia i złamania okołoprotezowe (18,8%) oraz błędy związane z niewłaściwym osadzeniem elementów protezy (3,8%) (Sieczka i in., 2017; Yang i in., 2020). Zarówno aseptyczne, jak i septyczne obluzowania spowodowane są obecnością cząsteczek zużycia implantu. Obluzowania aseptyczne są związane z przewlekłym stanem zapalnym spowodowanym aktywacją miejscowych komórek odpornościowych poprzez kontakt z cząsteczkami zużycia implantu. Obluzowania septyczne są spowodowane obecnością przewlekłej infekcji w miejscu implantu. Obluzowanie endoprotezy może mieć także podłoże mechaniczne (złamania okołoprotezowe). Ponadto naukowcy zwracają uwagę na przyczyny biologiczne, które ostatecznie prowadzą do osteolizy kości i w jej miejsce pojawia się tkanka łączna (Hodges i in., 2021).

Dane pochodzące z Narodowego Funduszu Zdrowia (NFZ) w Polsce, opracowane na podstawie Centralnej Bazy Endoprotezoplastyk (CBE) oraz Rejestru Endoprotezoplastyk (RE) NFZ, wskazują, że w ramach umów z NFZ w 2022 roku w Polsce wykonano 105 299

endoprotezoplastyk stawowych, z czego 64 694 (61%) to endoprotezoplastyki stawu biodrowego. W tej grupie 54 677 stanowią endoprotezoplastyki całkowite, 9 391 - częściowe, a 616 – zabiegi rewizyjne, które nie obejmowały wymiany elementów wszczepu. W 2024 roku wykonano ponad 64 000 zabiegów całkowitej endoprotezoplastyki stawu biodrowego (https://shiny.nfz.gov.pl/app/re_endoprotezy). Na Ryc. 1 zaprezentowano liczbę zabiegów endoprotezoplastyki w latach 2005-2024 w Polsce (stan na 16.02.2025).



Ryc. 1. Liczba zabiegów endoprotezoplastyk stawu biodrowego w latach 2005-2024 w Polsce (źródło: NFZ)

Czynniki ryzyka obluzowania i powikłania w endoprotezoplastyce

Na wynik końcowy i trwałość wszczepienia implantu ma wpływ wiele czynników. Pożądanymi zjawiskami są:

- osteointegracja (czyli wrastanie kości w implant, poprawiające jego stabilność; definiowana jako bezpośrednie strukturalne i funkcjonalne połączenie między kością a powierzchnią implantu oraz stanowiąca końcowy etap kaskady procesów gojenia kości wokół implantu (Aghaloo i in., 2019; Shirazi i in., 2022),
- osteoindukcja (stymulacja osteogenezy, czyli powstawania nowej tkanki kostnej),
- zwiększona waskularyzacja (zwiększone ukrwienie, wspierające gojenie i funkcjonalność implantu).

Do niepożądanych zjawisk należą między innymi infekcje, powstanie włóknistej otoczki, korozja, czy procesy zapalne prowadzące do osteolizy i uszkodzenia tkanki kostnej, a ostatecznie do obluzowania endoprotezy (Lewallen i in., 2015).

Osteoliza występuje w przypadku implantów cementowych i bezcementowych (Kim i in., 2023). Jest to biologiczna reakcja na cząsteczki zużycia implantu (Lübbeke i in., 2011). Proces ten rozpoczyna się od mechanicznego zużycia powierzchni stawowej i uwalniania cząstek zużycia implantu. Następnie cząsteczki ulegają fagocytozie, co aktywuje osteoklasty i makrofagi, prowadząc do resorpcji kości (Landgraeber i in., 2014).

Błona okołoprotezowa (ang. *periprostethicmembrane*, PM) powstaje na granicy kość - proteza po wszczepieniu endoprotezy i jest budowana przez gęstą sieć kolagenową wytwarzaną przez fibroblasty. Formujące ją komórki wpływają na utrzymanie długoterminowej homeostazy tkanek okołoprotezowych oraz odpowiedź na reakcje zapalne, angiogenezę, odkładanie kolagenu i przebudowę tkanki włóknistej (Yin i in., 2023).

Kość jest nieustannie niszczona przez osteoklasty (wielojądrzaste komórki wywodzące się z linii monocytarno-makrofagowej, które odpowiadają za resorpcję kości) i odbudowywana przez osteoblasty (które tworzą kość), co sprzyja zachowaniu homeostazy wapniowej organizmu (Kim i in., 2020; Mun i in., 2020).

W proces osteolizy zaangażowanych jest wiele komórek, takich jak fibroblasty (Tsutsumi i in., 2009), limfocyty, makrofagi, osteoklasty czy osteoblasty. Makrofagi pełnią rolę głównego komórkowego mediatora osteolizy, uczestnicząc w resorpcji kości i przekształcając się w osteoklasty, co prowadzi do szybciej postępującej degradacji kości. Makrofagi, osteoblasty, osteoklasty i fibroblasty, obecne w błonie okołoprotezowej, uwalniają różne czynniki zapalne, np. cytokiny, takie jak interleukiny (IL-6, IL-1α, IL-1β, TNF-α), PGE2, RANKL i kolagenazy, M-CSF, VEGF. Nasilają one reakcję zapalną, prowadząc do tzw. burzy cytokinowej i dalszej progresji procesu osteolizy (Connors i in., 2022; Yin i in., 2023).

THA w znacznym stopniu poprawia jakość życia pacjentów, jednak zabieg nie jest wolny od powikłań. Dane wskazują, że około 10% pacjentów wymaga operacji rewizyjnej spowodowanej obluzowaniem endoprotezy (Drobniewski i in., 2025; Hodges i in., 2021) w czasie 10 lat od zabiegu wykonania pierwotnej endoprotezoplastyki stawu biodrowego, około 20% po 15 latach od zabiegu, około 27% po 20 latach od zabiegu (Drobniewski i in., 2025).

Do powikłań i niepożądanych zdarzeń związanych z THA, uznanych przez międzynarodową organizację zrzeszającą ekspertów w dziedzinie chirurgii stawu biodrowego

(Hip Society), należą między innymi: krwawienia, powikłania związane z gojeniem rany pooperacyjnej, choroba zakrzepowo-zatorowa, zaburzenia neurologiczne, uszkodzenia naczyń, zwichnięcia, złamania okołoprotezowe, awulsja mięśnia odwodziciela, głęboka infekcja okołoprotezowa, heterotopowe kostnienie, zużycie powierzchni nośnych, osteoliza, obluzowanie implantu, złamanie implantu. W rezultacie może prowadzić to do ponownej operacji, zabiegu rewizyjnego z wymianą elementów protezy, powtórnej hospitalizacji lub zwiększonego ryzyka zgonu (Healy i in., 2016).

W przypadku wymienionych niepowodzeń po THA istnieje możliwość przeprowadzenia endoprotezoplastyki rewizyjnej stawu biodrowego (ang. *revision Total Hip Arthroplasty*, rTHA). Do najczęstszych wskazań do rTHA należą: zwichnięcia/niestabilność (21,85%), mechaniczne obluzowania (19,74%), inne mechaniczne powikłania (17,38%) oraz infekcje (15,10%) (Patel i in., 2023).

Procesy zapalne oraz silne reakcje immunologiczne, wywołane obecnością protezy, koncentrowały badania głównie na lokalnych zmianach wokół komponentów protezowych. Ostatnie doniesienia sugerują, że jakość i metabolizm tkanki kostnej mają wpływ na proces osteointegracji, podobnie jak zaburzenia metabolizmu wapnia i fosforu, związane z rolą witaminy D w organizmie człowieka (Page i in., 2018; Waris i in., 2010).

Literatura naukowa potwierdza ważną rolę witaminy D w równowadze mineralnej kości, a jej aktywna forma ($1,25(OH)_2D$) może również działać jako bioaktywne białko, które wspomaga proces osteogenezy (Javed i in., 2016) poprzez regulację homeostazy wapnia i fosforu w organizmie oraz, wraz z parathormonem, wspiera mineralizację kości (Fleet, 2017; Holick, 2007; Zmijewski i Carlberg, 2020).

Polimorfizmy genetyczne

Odpowiedź organizmu na aktywną formę witaminy D zależy od czynników wewnętrznych i zewnętrznych, które mogą wpływać na kolejne etapy jej syntezy, metabolizm i modulować jej stężenie. Jednym z istotnych czynników są zmiany na poziomie genetycznym, takie jak mutacje genetyczne (Płomiński i in., 2022).

Mutacje genetyczne, w zależności od ich lokalizacji w genomie, mogą zmieniać wszystkie etapy ekspresji genu. Gdy występują w elementach regulatorowych transkrypcji, mogą wpływać na ekspresję mRNA. Mutacje pojawiające się w genach, takie jak polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (*ang. single nucleotide polymorphism*, SNP), mogą mieć wpływ na

składanie mRNA, eksport z jądra do cytoplazmy, stabilność oraz translację białek. Gdy mutacja znajduje się w sekwencji kodującej i prowadzi do zmiany aminokwasu (mutacja nonsynonimiczna), może modyfikować aktywność białka. Nawet jeśli mutacja jest synonimiczna (tj. nie zmienia aminokwasu na inny), może wpływać na szybkość translacji białka lub czas życia mRNA. Natomiast jeśli mutacja powoduje powstanie przedwczesnego kodonu stop, skutkuje to syntezą skróconego lub nieaktywnego białka (Hunt i in., 2009; McCarroll i in., 2006; Orr i Chanock, 2008).

Witamina D

Rola witaminy D

Witamina D klasyfikowana jest jako prohormon steroidowy o szerokim zakresie działania, który wpływa na ekspresję genów oraz procesy proliferacji, a także różnicowania i aktywacji komórek (Courbebaisse i Cavalier, 2020; Feldman i in., 2014).

Obecnie stężenie nieaktywnej formy 25(OH)D w surowicy uważa się za najlepszy wskaźnik zasobów witaminy D w organizmie (Lips, 2001), a jej okres półtrwania to około 15 dni. $1,25(OH)_2D$ nie jest uważana za wskaźnik o większej wiarygodności, ze względu na bardzo krótki okres półtrwania w surowicy (kilka godzin) i ścisłą regulację przez wapń, fosforany i parathormon (Jacquillet i Unwin, 2019; Jones i in., 1998). Poziomy metabolitów witaminy D 25(OH)D i $1,25(OH)_2D$ są laboratoryjnie trudniejsze do zmierzenia niż inne tego typu związki ze względu na ponad dziesięciokrotnie niższą koncentrację w porównaniu do np. hormonów tarczycy czy kortyzolu (Bouillon, 2016).

Istnieje wiele różnych klasyfikacji niedoboru, niewystarczającego poziomu oraz nadmiaru witaminy D stosowanych w diagnostyce, które różnią się między sobą (Tabela 1 na podstawie Alshahrani i Aljohani, 2013; Płudowski i in., 2023).

Tabela 1. Klasyfikacja poziomu 25(OH)D w diagnostyce laboratoryjnej

Poziom 25(OH)D [ng/ml]	Poziom 25(OH)D [nmol/L]	Klasyfikacja
<20	<50	Ostry niedobór
20-30	50-75	Niedobór
30-50	75-125	W normie dla krajów środkowoeuropejskich, w tym Polski
50-90	125-225	W normie dla krajów słonecznych
>100	>250	Nadmiar
>150	>325	Toksyczność

Poziomy witaminy D korelują z gęstością kości, integracją protez oraz poprawą funkcji nerwowo-mięśniowych, co może mieć daleko idące konsekwencje w procesach gojenia kości czy występowania ryzyka złamań (Patton i in., 2012). Niedobory witaminy D są związane z licznymi schorzeniami, od zaburzeń mineralizacji kości po przewlekłe choroby, takie jak cukrzyca, choroby sercowo-naczyniowe, nowotwory, stwardnienie rozsiane, reumatoidalne zapalenie stawów czy gruźlica (Garland i in., 2006; Holick, 2005; Lappe i in., 2007; Liu i in., 2006).

Witamina D moduluje również reakcje immunologiczne poprzez działanie na wiele komórek układu odpornościowego, takich jak limfocyty B i T, monocyty, makrofagi, komórki dendrytyczne czy neutrofile (Aribi i in., 2023), co może mieć znaczenie w przypadku obluzowania endoprotez, również w patogenezie osteolizy indukowanej cząstkami zużycia implantu (Dyskova i in., 2017). Ponadto, niższe poziomy witaminy D obserwuje się u pacjentów z infekcjami stawów okołoprotezowych, w porównaniu z tymi, u których dochodzi do aseptycznego obluzowania implantów (Emara i in., 2020; Kenanidis i in., 2020).

Synteza witaminy D

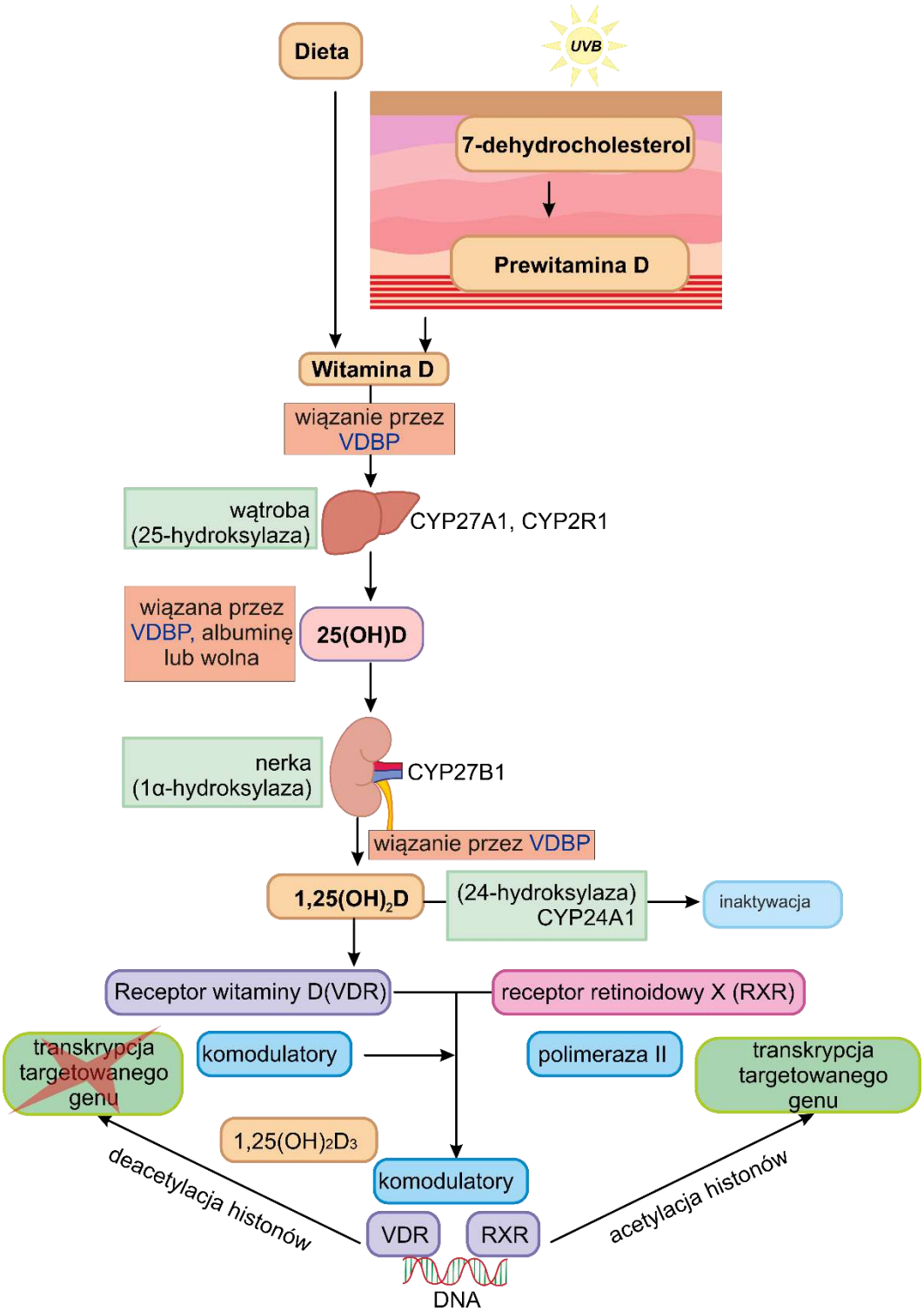
Witamina D może być syntetyzowana endogennie w skórze z 7-dehydrocholesterolu (7- DHC) pod wpływem promieniowania UVB (Kennel i in., 2010; Young i in., 2021). Człowiek może dostarczać ją do organizmu również z diety i suplementów (Pludowski i in., 2018). Istnieją dwie główne formy witaminy D: D_2 (ergokalcyferol), występująca w grzybach,

drożdżach i roślinach oraz D_3 (cholekalcyferol), która jest formą zwierzęcą (Al Mheid i Quyyumi, 2017; Javed i in., 2016; Kennel i in., 2010). Witamina D magazynowana jest w tkance tłuszczowej, ale została również wykryta w tkance mięśniowej i w wątrobie (Park i Han, 2021).

Fotoprodukcja witaminy D w skórze rozpoczyna się od syntezy 7-dehydrocholesterolu. 7-DHC jest obecny w błonie komórkowej naskórka i skóry właściwej (Bikle, 2011; Holick i Slominski, 2024). Pod wpływem promieniowania UVB pochodzącego ze światła słonecznego dochodzi do fotodegradacji pierścienia B 7-DHC, co prowadzi do produkcji trzech izomerów: tachysterolu, lumisterolu oraz prewitaminy D_3 (Żmijewski, 2022). Prewitamina D_3 następnie ulega izomeryzacji termicznej w błonie komórkowej, przekształcając się w cholekalcyferol. Wyprodukowany cholekalcyferol jest transportowany do przestrzeni zewnątrzkomórkowej i dociera do naczyń włosowatych w skórze właściwej (Bikle, 2011; Holick i Slominski, 2024), a później do wątroby przy udziale białka wiążącego witaminę D (Jung i in., 2011).

Enzymy wątrobowe (CYP27Al, CYP2Rl, CYP2Cl1, CYP3A4, CYP2D25, CYP2J3), będące izoformami białek cytochromu P450 (Ohyama i Yamasaki, 2004; Prosser i Jones, 2004) przekształcają cholekalcyferol w 25-hydroksywitaminę D [25(OH)D, kalcydiol]. Przekształcenie polega na enzymatycznej hydroksylacji w pozycji C25 cholekalcyferolu (Lehmann, 2005; Pike i Meyer, 2020), który jest głównym krążącym metabolitem witaminy D. Następnie związek ten ulega kolejnej hydroksylacji w nerkach (Takeyama i in., 1997; Verroust i in., 2002), gdzie 25-hydroksywitamina D pod wpływem enzymu CYP27B1, przekształcana jest w swoją aktywną formę - 1,25-dihydroksywitaminę D [$1,25(OH)_2D$, 1,25-dihydroksycholekalcyferol, kalcytriol] (Takeyama i in., 1997). Przekształcenie kalcydiolu w kalcytriol może zachodzić również w gruczołach przytarczycznych, komórkach kostnych, w układzie sercowo-naczyniowym oraz w komórkach układu odpornościowego (Pike i Meyer, 2020).

Receptor witaminy D (VDR) jest kluczowym elementem szlaku metabolicznego związanego z odpowiedzią komórkową na działanie witaminy D. Funkcjonuje on jako czynnik transkrypcyjny, który wiąże aktywny metabolit witaminy D - $1,25(OH)_2D$, z docelowymi komórkami (Zmijewski i Carlberg, 2020). Związany z ligandem VDR heterodimeryzuje z receptorem retinoidowym X (RXR) (Carlberg i in., 1993) i moduluje ekspresję wielu genów, w tym zwiększa ekspresję 24-hydroksylazy (CYP24A1), która jest odpowiedzialna za degradację $1,25(OH)_2D$ (Jones i in., 2018). Szlak syntezy witaminy D został przedstawiony na ryc. 2.



Ryc. 2. Szlak syntezy i metabolizmu witaminy D (opracowanie własne za pomocą programu SciPainter)

Białko wiążące witaminę D (VDBP)

Białko VDBP

Białko wiążące witaminę D jest α2-globuliną surowicy o masie cząsteczkowej 52–59 kDa. Początkowo było nazywane „składnikiem grupy" (ang. *Group component; Gc*), po tym jak w 1959 roku zostało wyizolowane z frakcji α2-globulin osocza (Hirschfeld, 2009). Skrót DBP (ang. *vitamin D Binding Protein*) został przyjęty od zdolności wiązania i transportu analogów witaminy D (Gomme i Bertolini, 2004). Po odkryciu innych właściwości tego białka, takich jak stymulacja makrofagów, została przyjęta inna nazwa - czynnik aktywujący makrofagi (ang. *Globulin component Macrophage Activating Factor,* GcMAF; ang. *vitamin D Binding Protein Macrophage Activating Factor,* DBP-MAF) (Chun, 2012; Gomme i Bertolini, 2004). Obecnie w publikacjach naukowych przyjmuje się najczęściej skróty DBP lub VDBP.

Oprócz wiązania metabolitów witaminy D, VDBP wiąże kwasy tłuszczowe (Williams i in., 1988), monomery aktyny (Van Baelen i in., 1977), megalinę (Nykjaer i in., 1999), a także membrany proteoglikanów w leukocytach (Metcalf i in., 1991).

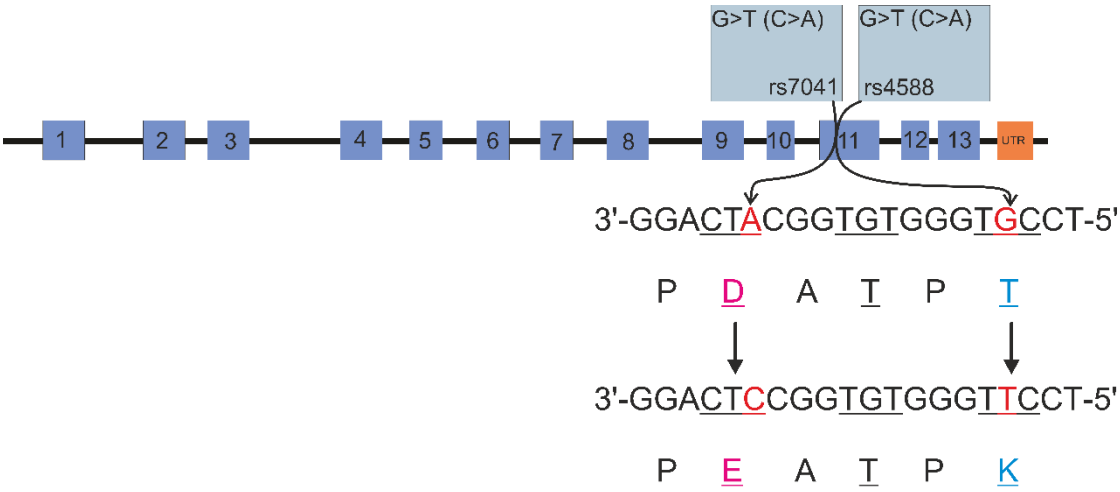
Białko VDBP składa się z 458 aminokwasów, przyjmując strukturę związaną wiązaniami disiarczkowymi, zbudowaną z trzech domen, które można podzielić na dwie powtarzające się, homologiczne domeny o długości 186 aminokwasów (domeny I i II) oraz krótszą domenę składającą się z 86 reszt na końcu karboksylowym (domena III). W sekwencji aminokwasowej zidentyfikowano dwa regiony wiążące: domenę wiążącą witaminę D, zlokalizowaną między resztami 35 a 49 (domena I) oraz domenę wiążącą aktynę między resztami 373 a 403 (domeny II i III) (Owens i in., 2018).

Gen kodujący białko VDBP

Gen *VDBP* kodujący białko (35 kb DNA z 13 eksonami i 12 intronami) znajduje się na długim ramieniu chromosomu 4 (4q12-q13). VDBP należy do rodziny białek wiążących albuminę (Cooke i Haddad, 1989; Song i in.; Speeckaert i in., 2006) i gen *VDBP* jest zlokalizowany w pobliżu genów kodujących albuminę, alfa-fetoproteinę i afaminę (znaną również jako α-albumina). Produkty białkowe tych genów są głównie syntetyzowane i wydzielane przez hepatocyty. Ponadto ekspresja genu *VDBP* występuje również w komórkach nerek, jąder, trzustki oraz w adipocytach (White i Cooke, 2000).

Polimorfizmy genu kodującego białko VDBP

Do najczęściej badanych polimorfizmów genu kodującego VDBP należą rs7041 i rs4588, które zlokalizowane są w obrębie eksonu 11 (Braun i in., 1992). Polimorfizm rs4588 (C>A) powoduje zmianę aminokwasu z treoniny na lizynę (Thr->Lys; T436K) (Doğan i in., 2023). Polimorfizm rs7041 (G>T) powoduje zmianę aminokwasu z kwasu asparaginowego na kwas glutaminowy (Asp->Glu; D432E) (Fu i in., 2016). Schemat poglądowy genu *VDBP* z zaznaczonymi miejscami polimorficznymi jest przedstawiony na Ryc. 3 (na podstawie Doğan i in., 2023, Fu i in., 2016).



Ryc. 3. Schemat genu *VDBP* z polimorfizmami eksonu 11: rs4588 i rs7041 i efektami w kodowanym białku (opracowanie własne za pomocą programu SciPainter)

Receptor wiążący witaminę D (VDR)

Białko VDR

Receptor witaminy D jest członkiem rodziny czynników transkrypcyjnych wiążących DNA (Molnár i in., 2006). VDR jest obecny w różnych tkankach, w tym na komórkach nabłonka jelitowego, kanalikach nerkowych, osteoblastach, chondrocytach, limfocytach T i makrofagach. Ma znaczenie w regulacji ekspresji genów zaangażowanych w rozwój organów, metabolizm kości oraz funkcjonowanie układu odpornościowego (Dong i in., 2020; Wang i in., 2012). VDR działa preferencyjnie jako heterodimer z receptorem retinoidowym X (RXR) na specyficznych sekwencjach DNA w regionach promotorowych genów docelowych $1,25(OH)_2D$, określanych jako elementy odpowiedzi na $1,25(OH)_2D$ (ang. *Vitamin D response elements*, VDREs) (Oñate i in., 1995).

Białko VDR składa się z 427 aminokwasów i należy do rodziny receptorów jądrowych, które charakteryzują się modułową, dwudomenową budową. Zbudowane są z domeny wiążącej DNA (*ang. DNA binding Domain*; DBD) oraz domeny wiążącej ligand (*ang. ligand binding domain*; LBD) (Carlberg, 2023; Haussler i in., 2013).

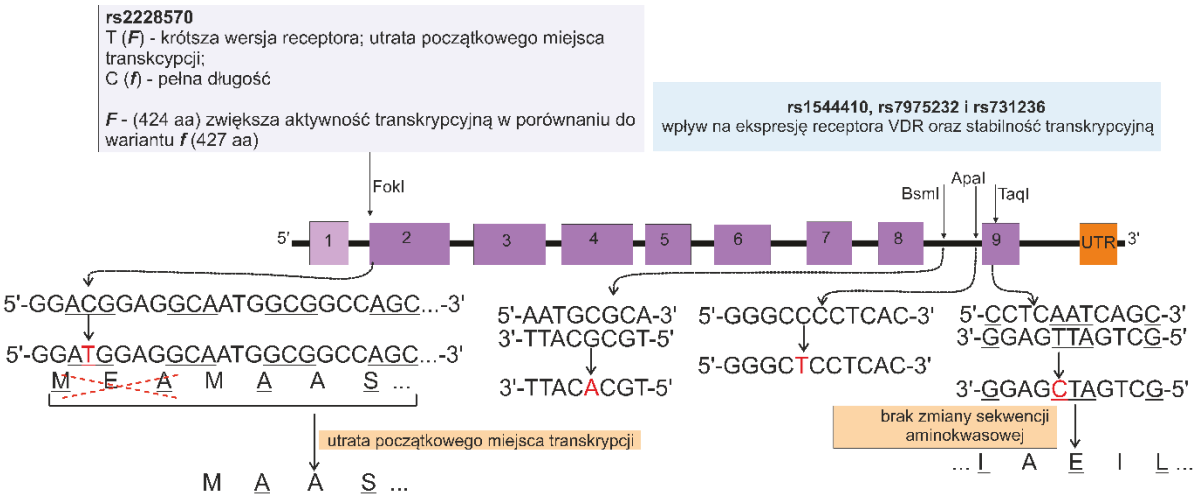
Domena LBD jest bardziej konserwatywna pod względem swojej trójwymiarowej struktury niż konkretnej sekwencji aminokwasowej. Oznacza to, że dla tej domeny bardziej istotna jest jej przestrzenna konfiguracja niż dokładna kolejność aminokwasów, z których jest zbudowana. Ta struktura przestrzenna jest kluczowa, ponieważ pozwala jej wiązać odpowiednie cząsteczki, takie jak witamina D (Carlberg, 2023; Haussler i in., 2013).

Gen kodujący VDR

Gen *VDR* kodujący receptor witaminy D zlokalizowany jest w regionie 12q13-14 chromosomu ludzkiego. Obejmuje on około 100 kb i zawiera co najmniej pięć regionów promotorowych, osiem eksonów kodujących białko oraz sześć eksonów nieulegających translacji, które podlegają alternatywnemu splicingowi (Annamaneni i in., 2011). Gen *VDR* jest wysoce polimorficzny. Zawiera ponad 900 wariantów allelicznych (Usategui-Martín i in., 2022).

Polimorfizmy genu kodującego białko VDR

Przedstawione w pracy polimorfizmy genu kodującego *VDR* to TaqI (rs731236), BsmI (rs1544410), ApaI (rs7975232), FokI (rs2228570) (Jurutka i in., 2000). Ich lokalizację i działanie przedstawia rycina 4 (na podstawie Uitterlinden i in., 2004, Awasthi, Manger i Khare, 2023, Zhang i in., 2020).



Ryc. 4. Schemat genu *VDR* z polimorfizmami FokI, TaqI, ApaI, BsmI i ich wpływ na kodowanie białko (opracowanie własne za pomocą programu SciPainter)

Znaczenie badań dla rozwoju dyscypliny

Poziom witaminy D w surowicy zależy nie tylko od diety, suplementacji czy wpływu promieniowania UVB na skórę, ale także od sprawnego działania szlaku metabolicznego i czynników genetycznych wpływających na jego funkcjonowanie. Czynnikiem genetycznym mającym wpływ na metabolizm witaminy D mogą być mutacje pojedynczego nukleotydu – SNP.

SNP mogą zmieniać kodowane aminokwasy (mutacje niesynonimiczne), pozostawać neutralne (synonimiczne) lub występować w regionach niekodujących. Oddziałują również na aktywność promotora (ekspresję genu), konformację mRNA (stabilność, strukturę i składanie białek) oraz subkomórkową lokalizację mRNA lub protein. Zmiany te mogą wpływać na procesy komórkowe, funkcje białek oraz odpowiedź komórki na zastosowaną terapię i potencjalnie przyczyniać się do rozwoju chorób.

Identyfikacja wariantów SNP związanych z predyspozycją do określonych chorób pozwala na ocenę ryzyka ich wystąpienia, co umożliwia wdrożenie ukierunkowanej profilaktyki i spersonalizowanego monitorowania zdrowia. Takie podejście znacząco zwiększa efektywność działań prewencyjnych oraz indywidualizację opieki medycznej. Wpisuje się również w nurt nutrigenomiki – dziedziny nauki badającej wpływ składników diety na ekspresję genów oraz interakcje między genotypem a sposobem odżywiania. Dzięki temu możliwe jest dostosowanie diety do indywidualnych predyspozycji genetycznych, co sprzyja zapobieganiu chorobom i ograniczaniu ich negatywnych skutków dla organizmu.

VDR, jako białko wiążące aktywną formę witaminy D, reguluje ekspresję wielu genów, warunkując efektywność metabolizmu i dalszej sygnalizacji witaminy D. Z kolei białko VDBP odpowiada za transport i regulację biodostępności witaminy D, pośrednio modulując poziom witaminy D oraz odpowiedź organizmu na suplementację. Określenie poziomu tych białek, wraz z identyfikacją SNP, może pomóc w ocenie ryzyka obluzowania endoprotezy oraz, w razie potrzeby, dostosowaniu dawek witaminy D w celu uzupełnienia jej niedoborów.

Cel

Celem pracy było określenie frekwencji alleli i/lub genotypów/haplotypów w miejscach polimorficznych genów kodujących *VDR* (ApaI, TaqI, BsmI, FokI) i *VDBP* (rs4588, rs7041) oraz stężeń witaminy D i białka VDBP u pacjentów z obluzowaniem endoprotezy.

Badanie przeprowadzono w trzech grupach:

1. Grupa pacjentów po THA z obluzowaniem endoprotezy stawu biodrowego (L).
2. Grupa pacjentów po THA bez obluzowania endoprotezy stawu biodrowego (CA).
3. Grupa kontrolna – osoby zdrowe, bez schorzeń ortopedycznych (C).

Hipotezy badawcze

Znaczenie witaminy D w procesach kościotworzenia nadal pozostaje w obszarze zainteresowania badaczy, a dostępne dane literaturowe wskazują na jej istotny wpływ na zdrowie układu kostnego oraz procesy związane z metabolizmem kości. Na podstawie istniejących danych dotyczących roli witaminy D postawiono następujące hipotezy badawcze:

1. Frekwencje alleli i/lub genotypów/haplotypów w miejscach polimorficznych ApaI, TaqI, BsmI, FokI w genie *VDR* oraz rs7041 i rs4588 w genie *VDBP* różnią się pomiędzy pacjentami z obluzowaną endoprotezą stawu biodrowego a pacjentami bez obluzowania oraz zdrowymi osobami.
2. Istnieją różnice w poziomach białka VDBP oraz witaminy D (25(OH)D) w surowicy pomiędzy pacjentami z obluzowaną endoprotezą stawu biodrowego a pacjentami bez obluzowania oraz zdrowymi osobami.

Zadania badawcze

W celu weryfikacji powyższych hipotez zostały zaplanowane dwa zadania badawcze.

Zadanie 1. Określenie frekwencji alleli i genotypów w wybranych miejscach polimorficznych (ApaI, BsmI, FokI, TaqI) w genie *VDR* oraz poziomów witaminy D (25(OH)D) u pacjentów ze zdiagnozowanym obluzowaniem endoprotezy stawu biodrowego.

Zadanie oparte było na analizie czterech polimorfizmów genu kodującego receptor VDR: ApaI (rs7975232), TaqI (rs731236), BsmI (rs1544410) i FokI (rs2228570) metodą PCR-RFLP oraz oznaczeniu stężenia 25(OH)D metodą immunoenzymatyczną (ELISA).

Dodatkowo oznaczono także poziom białka VDR (ELISA). Wyniki z zadania 1 zostały przedstawione w publikacji I.

Zadanie 2. Określenie frekwencji alleli i genotypów w wybranych miejscach polimorficznych (rs4588, rs7041) w genie *VDBP* oraz poziomów białka VDBP i witaminy D (25(OH)D) u pacjentów ze zdiagnozowanym obluzowaniem endoprotezy stawu biodrowego.

Zadanie polegało na analizie dwóch polimorfizmów genu kodującego białko VDBP (rs4588, rs7041) metodami: qPCR z sondą TaqMan™, PCR-RFLP oraz oznaczeniu stężeń VDBP i 25(OH)D metodą immunoenzymatyczną (ELISA). Wyniki z zadania 2 zostały przedstawione w publikacji II.

Materiały i metody

Rekrutacja pacjentów

Rekrutacja pacjentów do badania odbyła się w latach 2019-2024 we współpracy z Wojewódzkim Szpitalem Specjalistycznym w Olsztynie oraz z Samodzielnym Publicznym Szpitalem Klinicznym im. Profesora Adama Grucy w Otwocku. Uczestnicy badania wyrazili dobrowolną zgodę na udział, a badania zostały zatwierdzone przez lokalne komisje bioetyczne (49/2019, 139/2023).

Badaniem zostały objęte osoby, które na podstawie przeprowadzonego wywiadu lekarskiego, zostały zakwalifikowane do jednej z trzech grup.

Zadanie badawcze 1:

W zadaniu 1 wzięły udział 374 osoby:

- L (ang. *Loosening*) – 54 pacjentów ze zdiagnozowanym obluzowaniem endoprotezy stawu biodrowego (ICD-10: T.84.01), 3 do 12 lat od wszczepienia, średnia wieku = 54,7; SD = 9,0; $n_{kobiety}$=22, $n_{mężczyźni}$=32
- CA (ang. *Control Arthroplasty*) – 76 pacjentów z prawidłowo funkcjonującą endoprotezą stawu biodrowego (ICD-10: Z96.6), bez powikłań w ciągu 3 do 12 lat od wszczepienia, średnia wieku = 54,0; SD = 10,8; $n_{kobiety}$=19, $n_{mężczyźni}$=57
- C (ang. *Control*) – 244 zdrowych ochotników, u których nie stwierdzono chorób ortopedycznych., średnia wieku = 51,0; SD = 9,5; $n_{kobiety}$=120, $n_{mężczyźni}$=124.

Zadanie badawcze 2:

W zadaniu 2 wzięło udział 448 osób:

- L (ang. *Loosening*) – 112 pacjentów ze zdiagnozowanym obluzowaniem endoprotezy stawu biodrowego, (ICD-10: T.84.01), średnia wieku = 53,6; SD = 12,4; $n_{kobiety}$=50, $n_{mężczyźni}$=62
- CA (ang. *Control Arthroplasty*) – 87 pacjentów z prawidłowo funkcjonującą endoprotezą stawu biodrowego (ICD-10: Z96.6), bez powikłań w ciągu 3 do 12 lat od wszczepienia, średnia wieku = 48,8; SD = 14,5; $n_{kobiety}$=25, $n_{mężczyźni}$=62
- C (ang. *Control*) – 249 zdrowych ochotników, u których nie stwierdzono chorób ortopedycznych, średnia wieku = 44,5; SD = 13,2; $n_{kobiety}$=122, $n_{mężczyźni}$=127.

Kryteria włączenia:

Diagnoza obluzowania w grupie z obluzowaniem (L) została potwierdzona badaniem klinicznym i radiologicznym. Objawy obluzowania obejmowały ból w obrębie kończyny dolnej podczas obciążania, ból w pachwinie lub udzie, uczucie niestabilności stawu, zwichnięcie stawu, a także trzaski i klikanie. Kryteria radiograficzne obejmowały obecność okołoprotezowych przejaśnień szerszych niż 2 mm lub migrację elementów protezy większą niż 4 mm (porównawcze badania radiologiczne).

Kryterium włączenia do grupy bez obluzowania (CA) był brak obluzowania endoprotezy stawu biodrowego co najmniej po 3 latach od momentu wszczepienia.

Kryterium włączenia do grupy kontrolnej (C) był brak historii schorzeń ortopedycznych.

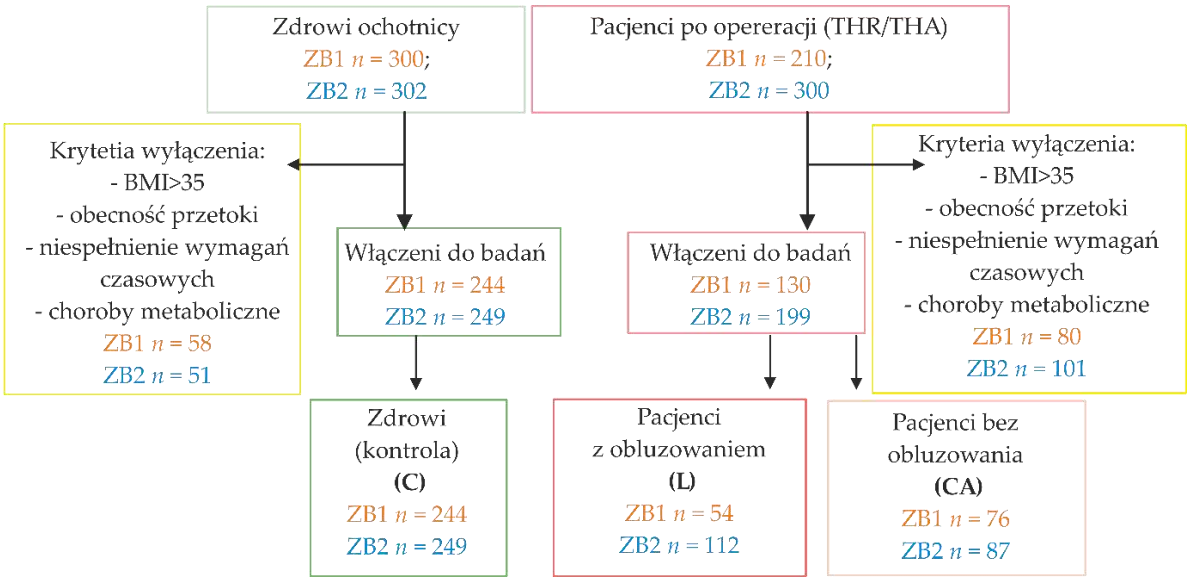
Te same kryteria włączenia zastosowano w obu zadaniach badawczych.

Kryteria wykluczenia:

Kryteriami wykluczenia z badania dla wszystkich grup (L, CA, C) były: BMI>35, osteoporoza, schorzenia reumatyczne, błędy operacyjne, schorzenia metaboliczne, cukrzyca, schorzenia tarczycy, trwające procesy zapalne.

Te same kryteria wyłączenia zastosowano w obu zadaniach badawczych.

Schemat doboru uczestników do zadań badawczych 1 i 2 pokazany jest na rycinie 5.



Ryc. 5. Rekrutacja pacjentów do zadań badawczych 1 i 2, gdzie ZB1 – zadanie badawcze nr 1, ZB2 – zadanie badawcze nr 2 (opracowanie własne za pomocą programu SciPainter)

Pobranie materiału biologicznego

Materiał biologiczny (5 ml krwi obwodowej i 5 ml surowicy) został pobrany od uczestników przez wykwalifikowaną kadrę. Próbki były przewiezione do Katedry Biochemii i przechowywane w -80°C.

Izolacja DNA

Izolację DNA przeprowadzono za pomocą zestawu Blood Mini DNA Isolation Kit (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska) i przechowywano w -20°C.

Genotypowanie

Genotypowanie przeprowadzono metodą PCR-RFLP (ang. *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*, reakcja łańcuchowa polimerazy – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych). Amplifikację materiału genetycznego przeprowadzono z użyciem DreamTaq™ Green Master Mix (Thermo Scientific, Stany Zjednoczone). Enzymy restrykcyjne FastDigest™ stosowano zgodnie z instrukcją producenta: FokI (rs2228570), BsmI (rs1544410), TaqI (rs731236), ApaI (rs7975232) i BsuRI (rs7041);

Thermo Scientific, Stany Zjednoczone). Produkty PCR rozdzielano elektroforetycznie na żelu agarozowym (2,5%). Wybrane losowo próbki potwierdzono sekwencjonowaniem.

Genotypowanie rs4588 przeprowadzono metodą qPCR z użyciem sond TaqMan™ Genotyping przy użyciu Universal TaqMan Master Mix i systemu Quant Studio 3 (Thermo Scientific, Stany Zjednoczone).

Oznaczanie stężeń białek VDBP i VDR

Stężenia białka VDBP oznaczano testem immunoenzymatycznym ELISA (EiAab Science Co, China). Dodatkowo oznaczono białko VDR (ELISA, Biorbyt, Wielka Brytania). Pomiar absorbancji wykonano na urządzeniu Asys UVM-340 (Biochrome, Wielka Brytania).

Oznaczenie stężenia 25(OH)D

Stężenie witaminy oznaczono testem immunoenzymatycznym ELISA (Domeditec Diagnostics, Niemcy). Pomiar absorbancji wykonano na urządzeniu Asys UVM-340 (Biochrome, Wielka Brytania).

Analiza statystyczna

Analizy statystyczne przeprowadzono przy pomocy programu GraphPad Prism 10.2.3 (GraphPad Software, CA, Stany Zjednoczone). Porównania między grupami analizowano testem ANOVA lub jego nieparametrycznym odpowiednikiem (test Kruskalla-Wallisa), a różnice analizowano testem post-hoc: Tukeya (po teście ANOVA) lub Dunna (po teście Kruskalla-Wallisa) przy istotności $p<0,05$. Korelacje analizowano testem Spearmana. Analizy genotypowe, haplotypowe oraz LD wykonano w programie SHEsis (Shen i in., 2016; Shi He, 2005). Iloraz szans (OR) i test chi-kwadrat przeanalizowano w programie MedCalc (MedCalc Software, Belgia).

Wyniki

Zadanie badawcze 1

Analiza frekwencji genotypów wykazała, że we wszystkich badanych grupach (z obluzowaniem, bez obluzowania i kontrolnej) w miejscu polimorficznym ApaI w genie *VDR* najczęściej występuje heterozygota *Aa (*stanowi ponad 50% genotypów). Ponadto w grupie kontrolnej (grupa C) częściej występuje homozygota recesywna *aa* (25,82%), a w grupie z obluzowaniem (grupa L) warianty homozygoty dominującej *AA* i homozygoty recesywnej *aa* występują równie często (22,22%). Frekwencja allelu *A* dla wszystkich grup była zbliżona (48-54%).

W miejscu polimorficznym TaqI w genie *VDR*, w grupie kontrolnej (C) najczęściej występuje homozygota dominująca *TT* (45,49%), następnie heterozygota *Tt* (42,62%). Wariantem najrzadziej spotykanym jest *tt* (11,89%). Wariant *tt* z kolei występuje prawie dwa razy częściej w grupie z obluzowaniem endoprotezy (22,22%). Dodatkowo w grupie z obluzowaniem najczęściej występującym wariantem jest heterozygota *Tt* (66,67%), a najrzadziej występującym jest homozygota *TT* (11,11%). W grupie bez obluzowania najczęściej występuje heterozygota *Tt* (48,69%), a najrzadziej homozygota recesywna *tt* (21,05%). Test chi-kwadrat ($\chi 2$ (4, 374) = 25,924; p = 0,000033) wskazuje na istotną statystycznie różnicę w rozkładzie genotypów w badanych grupach. Frekwencja allelu *T* wynosiła 56% dla grupy L, 55% dla CA i 67% dla C.

W miejscu polimorficznym BsmI w genie *VDR* heterozygota *Bb* jest najczęściej występującym wariantem we wszystkich badanych grupach (kontrolna – 59,43%, bez obluzowania – 63,15%, z obluzowaniem – 64,82%). Różnica w częstości dotyczy wariantów *BB* i *bb*, gdzie homozygota dominująca *BB* występuje rzadziej w grupie kontrolnej (13,52%), a częściej w grupie z obluzowaniem – 24,07%. W przypadku homozygoty recesywnej *bb* – proporcja jest odwrotna i występuje ona ponad dwa razy częściej w grupie kontrolnej (27,05%) w porównaniu z grupą z występującym obluzowaniem (11,11%). Test chi-kwadrat ($\chi 2$ (4, 374) = 10,258; p = 0,0363) wykazał statystycznie istotną różnicę w rozkładzie genotypów w badanych grupach. Frekwencja allelu *B* wynosiła 56% dla grup C i L, 51% dla CA .

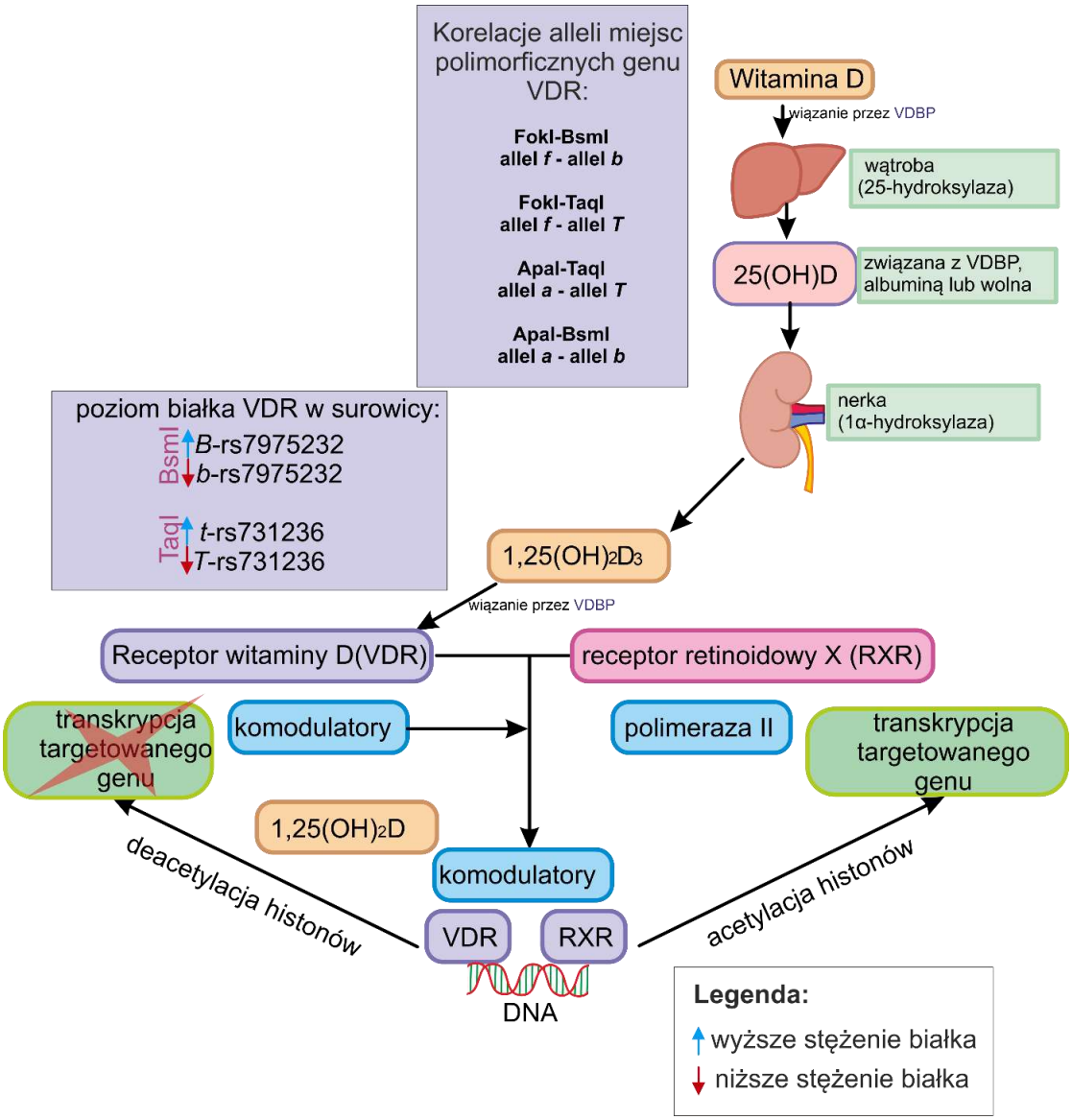
W miejscu polimorficznym FokI w genie *VDR* najczęściej występującym wariantem w obu grupach badanych (z obluzowaniem i bez obluzowania endoprotezy stawu biodrowego) jest heterozygota *Ff*. W grupie z obluzowaniem endoprotezy homozygoty: dominująca *FF*

i recesywna *ff* występują równie często (po 22,22%), natomiast w grupie bez obluzowania genotyp *ff* występuje w przypadku 26,32% badanych, a *FF* w przypadku 21,05%. W grupie kontrolnej procentowy rozkład genotypów jest odmienny, gdyż najczęściej występującymi genotypami są *ff* (48,77%) oraz *Ff* (44,26%). *FF* występuje w grupie kontrolnej tylko u 6,97% badanych. Test chi-kwadrat ($\chi 2$ (4, 374) = 29,084; $p < 0{,}00001$) wskazuje, że wynik jest istotny statystycznie, a różnice w rozkładzie genotypów są nieprzypadkowe. Zatem prawdopodobieństwo, że zaobserwowane różnice między grupami genotypów mogły wystąpić przypadkowo, jest bardzo małe (poniżej 0,00001). Frekwencja allelu *f* wynosiła 71% dla C, 52% dla CA i 50% dla L.

Przeanalizowanie częstości występowania haplotypów w grupach L vs. C dla genu *VDR* pokazały, że najczęściej występującym haplotypem jest *AtBf* (kolejność ApaI, TaqI, BsmI, FokI) – jednak próba nie była istotnie statystycznie ($p = 0{,}406$). Z kolei haplotyp *AtBF* występował w grupie z obluzowaniem 2,5 razy częściej (OR= 2,50 [95% CI 1,50–4,15], $p = 0{,}0003$) w grupach L vs C. Haplotyp *aTbf* był najczęściej występującym w grupie kontrolnej (30,9%), a w grupie z obluzowaniem pojawił się u 19,4% badanych (OR = 0,54 [95% CI 0,32–0,9, $p = 0{,}017$]).

W zadaniu 1 określono także stężenie 25(OH)D oraz dodatkowo białka VDR. Grupy z obluzowaniem i bez obluzowania nie różniły się od siebie wzajemnie, ale zarówno z obluzowaniem i bez obluzowania różniły się z grupą kontrolną, która miała zauważalnie wyższe stężenie witaminy D ($p < 0{,}0001$). W przypadku wyników dla poziomu białka VDR grupy z obluzowaniem i bez obluzowania również się nie różniły od siebie, ale różnicę wykazano pomiędzy grupami z obluzowaniem i bez obluzowania a grupą kontrolną.

Dodatkowo skorelowano również występujące polimorfizmy ze stężeniami białka VDR oraz 25(OH)D. Polimorfizmy BsmI i TaqI wykazały istotną korelację z poziomami białka VDR (BsmI-VDR Rs = -0,20, $p = 0{,}002$; TaqI -VDR Rs = 0,13, $p = 0{,}04$). Allel *B* w polimorfizmie BsmI oraz *t* w polimorfizmie TaqI były powiązane z wyższymi stężeniami białka VDR. Zaobserwowano także zależności między częstością występowania poszczególnych alleli w różnych polimorficznych miejscach: FokI-BsmI: allel *f* powiązany z allelem *b* (Rs=0,19, $p < 0{,}0003$), FokI-TaqI: allel *f* powiązany z allelem *T* (-0,18, $p < 0{,}001$), ApaI-TaqI: allel *a* powiązany z allelem *T* (Rs=-0,20, $p < 0{,}0001$), ApaI-BsmI: allel *a* powiązany z allelem *b* (Rs=-0,23, $p < 0{,}0001$). Podsumowanie wyników zaprezentowano na rycinie 6.



Ryc. 6. Podsumowanie wyników otrzymanych w zadaniu badawczym numer 1 (opracowanie własne za pomocą programu SciPainter)

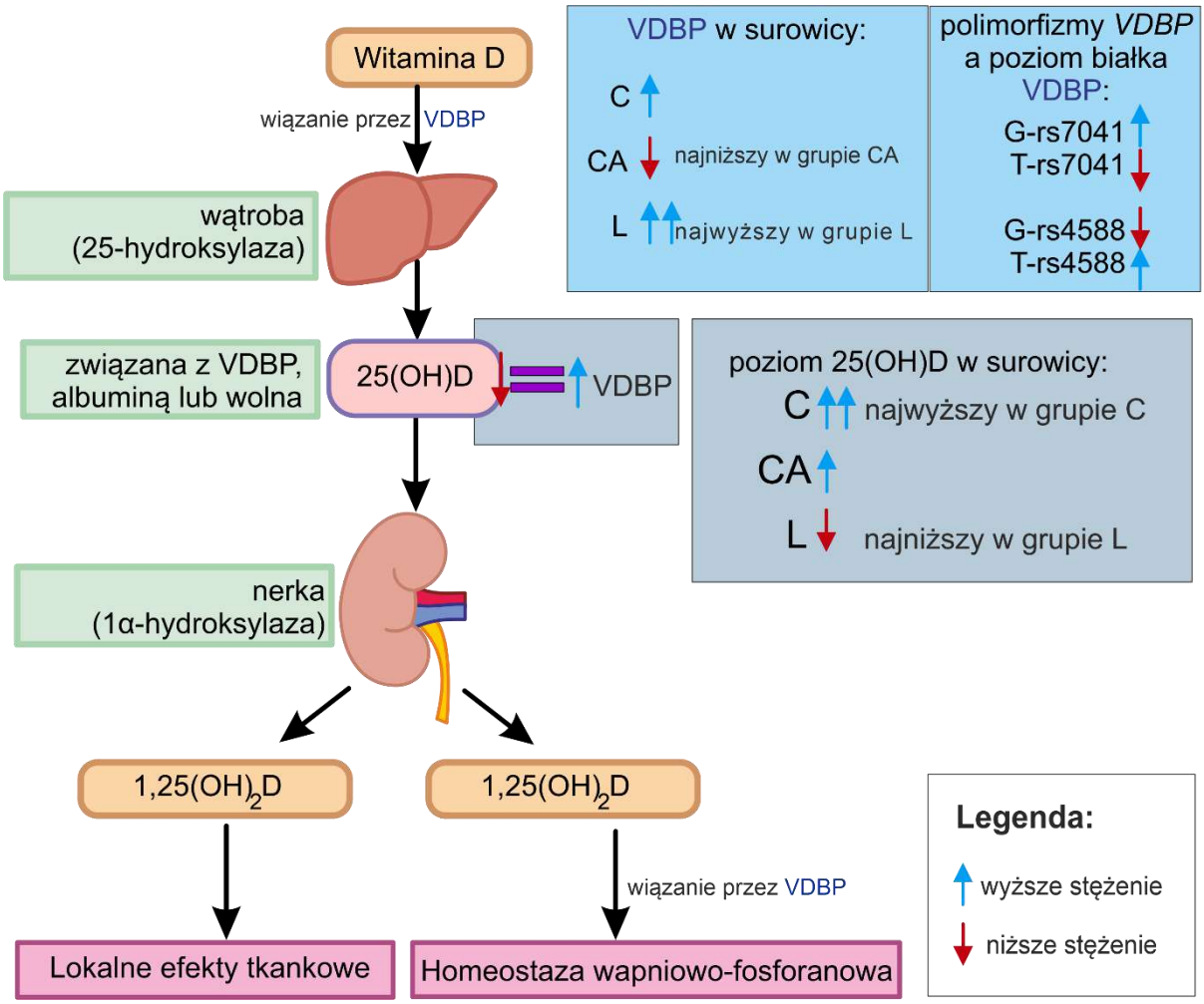
Zadanie badawcze 2

Analiza genotypów wykazała, że w genie *VDBP* w miejscu polimorficznym rs7041 we wszystkich grupach (kontrolnej, bez obluzowania, z obluzowaniem) najczęściej pojawia się genotyp TG (kolejno: 58%, 59,7%, 50,1%). W każdej z wymienionych grup genotyp TT pojawia się częściej niż GG. Wynik chi-kwadrat (χ^2 (4, 448) = 0,3205; p = 0,5242) wskazuje, że nie ma statystycznie istotnej różnicy w rozkładzie genotypów w badanych grupach.

Analiza genotypów wskazała, że w miejscu polimorficznym rs4588 genu *VDBP* we wszystkich badanych grupach (kontrolnej, bez obluzowania, z obluzowaniem) najczęściej występującym genotypem jest TT (kolejno: 47,7%, 68,9%, 45,5%), a najrzadziej występuje TG (kolejno: 15,6%, 9,1%, 10,7%). GG występuje ponad dwa razy częściej w grupie z obluzowaniem (45,7%) niż w grupie bez obluzowania (21,8%). Test chi-kwadrat (χ2 (4, 448) = 16,14, p = 0,0028) wskazuje na statystycznie istotną różnicę w rozkładzie genotypów w badanej próbie.

W zadaniu porównano również stężenia VDBP i 25(OH)D pomiędzy grupami. Analiza statystyczna wykazała istotne różnice w stężeniach pomiędzy grupą z obluzowaniem a grupą bez obluzowania endoprotezy ($p<0,0001$), grupą bez obluzowania endoprotezy a grupą kontrolną ($p<0,0001$), grupą z obluzowaniem a grupą kontrolną ($p<0,05$). Wyniki wskazują na wyższe średnie stężenia VDBP w grupach z obluzowaniem i kontrolnej w porównaniu do grupy bez obluzowania endoprotezy. W analizie stężeń 25(OH)D wykazano istotne różnice pomiędzy grupą kontrolną a grupami z obluzowaniem i bez obluzowania endoprotez, wskazując, że grupa kontrolna ma wyższe średnie stężenie białka VDBP od pozostałych grup.

Wyższe stężenie VDBP było związane z niższym poziomem witaminy D (Rs=-0,23, p = 0,001). W przypadku polimorfizmu rs7041, obecność allelu G była skorelowana z wyższymi stężeniami białka VDBP (Rs=0,20, p = 0,001). Podsumowanie wyników zaprezentowano na rycinie 7.



Ryc. 7. Podsumowanie wyników otrzymanych w zadaniu badawczym nr 2 (opracowanie własne za pomocą programu SciPainter)

Wnioski

1. **Istnieją statystyczne różnice w częstości występowania alleli i genotypów w miejscach polimorficznych genów: *VDR* (TaqI, BsmI, FokI) i *VDBP* (rs4588) między pacjentami z obluzowaną endoprotezą stawu biodrowego, bez obluzowania endoprotezy a osobami zdrowymi:**

   a) W genie *VDR* u pacjentów z obluzowaniem endoprotezy stawu biodrowego najczęściej występujące genotypy to *Tt* i *tt* w miejscu polimorficznym TaqI, *BB* i *Bb* w miejscu polimorficznym BsmI, a także *FF* i *Ff* w miejscu polimorficznym FokI, co może sugerować ich związek z ryzykiem obluzowania.
   b) W grupie pacjentów z obluzowaniem endoprotezy najczęściej występującym genotypem był GG w miejscu polimorficznym rs4588 genu *VDBP* w porównaniu do grupy bez obluzowania, co może sugerować jego związek ze zwiększonym ryzykiem obluzowania.
   c) Haplotypy i sprzężenia polimorfizmów w badanych genach mogą wpływać na poziom białek kodowanych przez ich geny, prowadząc do modyfikacji dalszych szlaków sygnalizacji molekularnej witaminy D.

2. **Istnieją statystyczne różnice w poziomach białka VDBP oraz witaminy D – 25(OH)D w surowicy pomiędzy pacjentami z obluzowaną endoprotezą stawu biodrowego, a pacjentami bez obluzowania endoprotezy oraz zdrowymi osobami:**

a) Niższe stężenia witaminy D u pacjentów ortopedycznych mogą wskazywać na ważną rolę witaminy D w zdrowiu kośćca oraz jej wpływu na osteointegrację w procesie gojenia i procesy naprawcze po przeprowadzonej protezoplastyce stawu biodrowego.

b) Wyższe stężenia białka VDBP występowały u osób posiadających allel G w miejscu polimorficznym rs7041 genu *VDBP* niezależnie od grupy badanej, co może sugerować potencjalny wpływ tego miejsca polimorficznego na transport i biodostępność witaminy D.

Podsumowanie

Witamina D odgrywa ważną rolę w wielu procesach biologicznych, a w ortopedii jej wyższe stężenie pozytywnie skorelowane jest z prawidłową gęstością kości, czy zmniejszeniem ryzyka złamań. Jej niedobory wiążą się z wieloma schorzeniami, takimi jak osteoporoza, choroby sercowo-naczyniowe, czy reumatoidalne zapalenie stawów.

Niniejsze badania dotyczyły roli witaminy D oraz kluczowych elementów jej szlaku metabolicznego – białka wiążącego witaminę D (VDBP), receptora witaminy D (VDR) i kodujących je genów, które mogą mieć związek z procesem obluzowania endoprotez stawu biodrowego.

Możliwe sprzężenia polimorfizmów w obrębie genu *VDR* mogą wpływać na poziom białka VDR, a także metabolizm witaminy D i oddziaływać na dalsze szlaki sygnalizacyjne, a różnice w występowaniu poszczególnych alleli, genotypów/haplotypów, mogą być skorelowane z poziomami białek, co może wpływać na transport i biodostępność witaminy D.

Wyniki badań wskazują, że polimorfizmy w genach *VDR* i *VDBP* mogą odgrywać potencjalną rolę w ryzyku obluzowania endoprotezy stawu biodrowego, a także w regulacji metabolizmu witaminy D. Zmiany w poziomach białek VDR i VDBP mogą pełnić funkcję kompensacyjną w procesach wychwytu i sygnalizacji witaminy D u pacjentów ortopedycznych. Potwierdzenie działania mechanizmu kompensacyjnego wymaga jednak dalszych badań.

Spis literatury

Aghaloo, T., Pi-Anfruns, J., Moshaverinia, A., Sim, D., Grogan, T., Hadaya, D. (2019). The Effects of Systemic Diseases and Medications on Implant Osseointegration: A Systematic Review. *The International Journal of Oral Maxillofacial Implants*, *34*, s35–s49. https://doi.org/10.11607/jomi.19suppl.g3

Al Mheid, I., Quyyumi, A. A. (2017). Vitamin D and Cardiovascular Disease: Controversy Unresolved. *Journal of the American College of Cardiology*, *70*(1), 89–100. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.05.031

Alshahrani, F., Aljohani, N. (2013). Vitamin D: Deficiency, Sufficiency and Toxicity. *Nutrients*, *5*(9), Article 9.

Annamaneni, S., Bindu, C. H., Reddy, K. P., Vishnupriya, S. (2011). Association of vitamin D receptor gene start codon (Fok1) polymorphism with high myopia. *Oman Journal of Ophthalmology*, *4*(2), 57–62. https://doi.org/10.4103/0974-620X.83654

Apostu, D., Lucaciu, O., Berce, C., Lucaciu, D., Cosma, D. (2017). Current methods of preventing aseptic loosening and improving osseointegration of titanium implants in cementless total hip arthroplasty: A review. *Journal of International Medical Research*. https://doi.org/10.1177/0300060517732697

Aribi, M., Mennechet, F. J. D., Touil-Boukoffa, C. (2023). Editorial: The role of vitamin D as an immunomodulator. *Frontiers in Immunology*, *14*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1186635

Bianconi, E., Piovesan, A., Facchin, F., Beraudi, A., Casadei, R., Frabetti, F., Vitale, L., Pelleri, M. C., Tassani, S., Piva, F., Perez-Amodio, S., Strippoli, P., Canaider, S. (2013). An estimation of the number of cells in the human body. *Annals of Human Biology*, *40*(6), 463–471. https://doi.org/10.3109/03014460.2013.807878

Bikle, D. D. (2011). Vitamin D: An ancient hormone. *Experimental Dermatology*, *20*(1), 7–13. https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2010.01202.x

Blom, A. W., Artz, N., Beswick, A. D., Burston, A., Dieppe, P., Elvers, K. T., Gooberman-Hill, R., Horwood, J., Jepson, P., Johnson, E., Lenguerrand, E., Marques, E., Noble, S., Pyke, M., Sackley, C., Sands, G., Sayers, A., Wells, V., Wylde, V. (2016). Improving patients' experience and outcome of total joint replacement: The RESTORE programme. *Programme Grants for Applied Research*, *4*(12), 1–508. https://doi.org/10.3310/pgfar04120

Bouillon, R. (2016). Free or Total 25OHD as Marker for Vitamin D Status? *Journal of Bone and Mineral Research*, *31*(6), 1124–1127. https://doi.org/10.1002/jbmr.2871

Braun, A., Bichlmaier, R., Cleve, H. (1992). Molecular analysis of the gene for the human vitamin-D-binding protein (group-specific component): Allelic differences of the common genetic GC types. *Human Genetics*, *89*(4), Article 4. https://doi.org/10.1007/BF00194311

Buckwalter, J. A., Martin, J. (1995). Degenerative joint disease. *Clinical Symposia (Summit, N.J.: 1957)*, *47*(2), 1–32.

Carlberg, C. (2023). Genomic signaling of vitamin D. *Steroids*, *198*, 109271. https://doi.org/10.1016/j.steroids.2023.109271

Carlberg, C., Bendik, I., Wyss, A., Meier, E., Sturzenbecker, L. J., Grippo, J. F., Hunziker, W. (1993). Two nuclear signalling pathways for vitamin D. *Nature*, *361*(6413), 657–660. https://doi.org/10.1038/361657a0

Chun, R. F. (2012). New perspectives on the vitamin D binding protein. *Cell Biochemistry and Function*, *30*(6), 445–456. https://doi.org/10.1002/cbf.2835

Connors, J. P., Stelzer, J. W., Garvin, P. M., Wellington, I. J., Solovyova, O. (2022). The Role of the Innate Immune System in Wear Debris-Induced Inflammatory Peri-Implant Osteolysis in Total Joint Arthroplasty. *Bioengineering*, *9*(12), Article 12. https://doi.org/10.3390/bioengineering9120764

Cooke, N. E., Haddad, J. G. (1989). Vitamin D Binding Protein (Gc-Globulin)*. *Endocrine Reviews*, *10*(3), 294–307. https://doi.org/10.1210/edrv-10-3-294

Courbebaisse, M., Cavalier, E. (2020). Vitamin D in 2020: An Old Pro-Hormone with Potential Effects beyond Mineral Metabolism. *Nutrients*, *12*(11), Article 11. https://doi.org/10.3390/nu12113378

Doğan, D., Özcan, E. G., Çakır, D. Ü., Sılan, F. (2023). Genetic influence on urinary vitamin D binding protein excretion and serum levels: A focus on rs4588 Cgt;A polymorphism in the GC gene. *Frontiers in Endocrinology*, *14*. https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1281112

Dong, J., Zhou, Q., Wang, J., Lu, Y., Li, J., Wang, L., Wang, L., Meng, P., Li, F., Zhou, H., Liu, C., Wang, T., Wang, J., Mi, Y., Xu, W.-Y., Deng, J. (2020). Association between variants in vitamin D-binding protein gene and vitamin D deficiency among pregnant women in china. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, *34*(n/a), Article n/a. https://doi.org/10.1002/jcla.23376

Drobniewski, M., Ruzik, K., Gonera, B., Olewnik, Ł., Borowski, A., Triantafyllou, G., Borowski, A. (2025). High Risk of Revision Associated with the L-Cup Titanium Alloy Porous

Coated Acetabular Component in Primary Total Hip Arthroplasty: Minimum Follow-Up of 14 Years. *Journal of Clinical Medicine*, *14*(4), Article 4. https://doi.org/10.3390/jcm14041301

Dyskova, T., Gallo, J., Kriegova, E. (2017). The Role of the Chemokine System in Tissue Response to Prosthetic By-products Leading to Periprosthetic Osteolysis and Aseptic Loosening. *Frontiers in Immunology*, *8*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01026

Emara, A. K., Nageeb, E., George, J., Buttaro, M. A., Higuera, C., Piuzzi, N. S. (2020). Hypovitaminosis D in lower extremity Joint Arthroplasty: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Orthopaedics*, *21*, 109–116. https://doi.org/10.1016/j.jor.2020.03.010

Feldman, D., Krishnan, A. V., Swami, S., Giovannucci, E., Feldman, B. J. (2014). The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nature Reviews. Cancer*, *14*(5), 342–357. https://doi.org/10.1038/nrc3691

Feng, M., Ji, J., Li, X., Ye, X. (2022). Identification of the Exercise and Time Effects on Human Skeletal Muscle through Bioinformatics Methods. *Genetics Research*, *2022*, 9582363. https://doi.org/10.1155/2022/9582363

Ferguson, R. J., Palmer, A. J., Taylor, A., Porter, M. L., Malchau, H., Glyn-Jones, S. (2018). Hip replacement. *The Lancet*, *392*(10158), 1662–1671. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31777-X

Fleet, J. C. (2017). The role of vitamin D in the endocrinology controlling calcium homeostasis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *453*, 36–45. https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.04.008

Fu, L., Borges, C. R., Rehder, D. S., Wong, B. Y. L., Williams, R., Carpenter, T. O., Cole, D. E. C. (2016). Characterization of additional vitamin D binding protein variants. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *159*, 54–59. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.02.022

Garland, C. F., Garland, F. C., Gorham, E. D., Lipkin, M., Newmark, H., Mohr, S. B., Holick, M. F. (2006). The Role of Vitamin D in Cancer Prevention. *American Journal of Public Health*, *96*(2), Article 2. https://doi.org/10.2105/AJPH.2004.045260

Gomme, P. T., Bertolini, J. (2004). Therapeutic potential of vitamin D-binding protein. *Trends in Biotechnology*, *22*(7), 340–345. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.05.001

Haussler, M. R., Whitfield, G. K., Kaneko, I., Haussler, C. A., Hsieh, D., Hsieh, J.-C., Jurutka, P. W. (2013). Molecular Mechanisms of Vitamin D Action. *Calcified Tissue International*, *92*(2), 77–98. https://doi.org/10.1007/s00223-012-9619-0

Healy, W. L., Iorio, R., Clair, A. J., Pellegrini, V. D., Della Valle, C. J., Berend, K. R. (2016). Complications of Total Hip Arthroplasty: Standardized List, Definitions, and Stratification

Developed by The Hip Society. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, *474*(2), 357–364. https://doi.org/10.1007/s11999-015-4341-7

Hirschfeld, J. (2009). Immune-electrophoretic demonstration of qualitative differences in human sera and their relation to the haptoglobins. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*, *47*(2), Article 2. https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1959.tb04844.x

Hodges, N. A., Sussman, E. M., Stegemann, J. P. (2021). Aseptic and septic prosthetic joint loosening: Impact of biomaterial wear on immune cell function, inflammation, and infection. *Biomaterials*, *278*, 121127. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.121127

Holick, M. F. (2005). The Vitamin D Epidemic and its Health Consequences. *The Journal of Nutrition*, *135*(11), 2739S-2748S. https://doi.org/10.1093/jn/135.11.2739S

Holick, M. F. (2007). Vitamin D Deficiency. *New England Journal of Medicine*, *357*(3), 266–281. https://doi.org/10.1056/NEJMra070553

Holick, M. F., Slominski, A. T. (2024). Chapter 3—Photobiology of vitamin D. W M. Hewison, R. Bouillon, E. Giovannucci, D. Goltzman, M. Meyer, J. Welsh (Red.), *Feldman and Pike' s Vitamin D (Fifth Edition)* (s. 27–45). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91386-7.00006-4

Hollmann, W., Strüder, H. K., Tagarakis, C. V., King, G. (2007). Physical activity and the elderly. *European journal of cardiovascular prevention and rehabilitation*, *14*(6), 730–739. https://doi.org/10.1097/HJR.0b013e32828622f9

Hunt, R., Sauna, Z. E., Ambudkar, S. V., Gottesman, M. M., Kimchi-Sarfaty, C. (2009). Silent (synonymous) SNPs: Should we care about them? *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *578*, 23–39. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-411-1_2

Jacquillet, G., Unwin, R. J. (2019). Physiological regulation of phosphate by vitamin D, parathyroid hormone (PTH) and phosphate (Pi). *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *471*(1), 83–98. https://doi.org/10.1007/s00424-018-2231-z

Javed, F., Malmstrom, H., Kellesarian, S. V., Al-Kheraif, A. A., Vohra, F., Romanos, G. E. (2016). Efficacy of Vitamin D3 Supplementation on Osseointegration of Implants. *Implant Dentistry*, *25*(2), 281. https://doi.org/10.1097/ID.0000000000000390

Jones, G., Prosser, D. E., Kaufmann, M. (2018). Chapter 5—The Activating Enzymes of Vitamin D Metabolism (25- and 1α-Hydroxylases). W D. Feldman (Red.), *Vitamin D (Fourth Edition)* (s. 57–79). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809965-0.00005-7

Jones, G., Strugnell, S. A., DeLuca, H. F. (1998). Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiological Reviews*, *78*(4), 1193–1231.

https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.4.1193

Jung, K.-H., Kim, T.-H., Sheen, D.-H., Lim, M.-K., Lee, S.-K., Kim, J.-Y., Park, H., Chae, S.-C., Shim, S.-C. (2011). Associations of Vitamin D Binding Protein Gene Polymorphisms with the Development of Peripheral Arthritis and Uveitis in Ankylosing Spondylitis. *The Journal of Rheumatology*, *38*(10), Article 10. https://doi.org/10.3899/jrheum.101244

Jurutka, P. W., Remus, L. S., Whitfield, G. K., Thompson, P. D., Hsieh, J.-C., Zitzer, H., Tavakkoli, P., Galligan, M. A., Dang, H. T. L., Haussler, C. A., Haussler, M. R. (2000). The Polymorphic N Terminus in Human Vitamin D Receptor Isoforms Influences Transcriptional Activity by Modulating Interaction with Transcription Factor IIB. *Molecular Endocrinology*, *14*(3), 401–420. https://doi.org/10.1210/mend.14.3.0435

Kenanidis, E., Kakoulidis, P., Karponis, D., Tsiridis, E. (2020). The Effect of Perioperative Vitamin D Levels on the Functional, Patient-Related Outcome Measures and the Risk of Infection Following Hip and Knee Arthroplasty: A Systematic Review. *Patient Related Outcome Measures*, *11*, 161–171. https://doi.org/10.2147/PROM.S261251

Kennel, K. A., Drake, M. T., Hurley, D. L. (2010). Vitamin D deficiency in adults: When to test and how to treat. *Mayo Clinic Proceedings*, *85*(8), 752–757; quiz 757–758. https://doi.org/10.4065/mcp.2010.0138

Kim, J.-M., Lin, C., Stavre, Z., Greenblatt, M. B., Shim, J.-H. (2020). Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. *Cells*, *9*(9), Article 9. https://doi.org/10.3390/cells9092073

Kim, Park, J.-W., Jang, Y.-S., Kim, E.-J. (2023). Minimum 30-Year Results of Bilaterally Implanted Cemented and Cementless Total Hip Arthroplasty in Patients Younger Than 50 Years. *The Journal of Arthroplasty*, *38*(5), 873–879. https://doi.org/10.1016/j.arth.2022.11.003

Knight, S. R., Aujla, R., Biswas, S. P. (2011). Total Hip Arthroplasty—Over 100 years of operative history. *Orthopedic Reviews*, *3*(2), e16. https://doi.org/10.4081/or.2011.e16

Landgraeber, S., Jäger, M., Jacobs, J. J., Hallab, N. J. (2014). The Pathology of Orthopedic Implant Failure Is Mediated by Innate Immune System Cytokines. *Mediators of Inflammation*, *2014*(1), 185150. https://doi.org/10.1155/2014/185150

Lappe, J. M., Travers-Gustafson, D., Davies, K. M., Recker, R. R., Heaney, R. P. (2007). Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: Results of a randomized trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *85*(6), 1586–1591. https://doi.org/10.1093/ajcn/85.6.1586

Lehmann, B. (2005). The Vitamin D3 Pathway in Human Skin and its Role for Regulation of Biological Processes. *Photochemistry and Photobiology*, *81*(6), 1246–1251. https://doi.org/10.1562/2005-02-02-IR-430

Lewallen, E. A., Riester, S. M., Bonin, C. A., Kremers, H. M., Dudakovic, A., Kakar, S., Cohen, R. C., Westendorf, J. J., Lewallen, D. G., Van Wijnen, A. J. (2015). Biological Strategies for Improved Osseointegration and Osteoinduction of Porous Metal Orthopedic Implants. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, *21*(2), 218–230. https://doi.org/10.1089/ten.teb.2014.0333

Lips, P. (2001). Vitamin D Deficiency and Secondary Hyperparathyroidism in the Elderly: Consequences for Bone Loss and Fractures and Therapeutic Implications. *Endocrine Reviews*, *22*(4), 477–501. https://doi.org/10.1210/edrv.22.4.0437

Liu, P. T., Stenger, S., Li, H., Wenzel, L., Tan, B. H., Krutzik, S. R., Ochoa, M. T., Schauber, J., Wu, K., Meinken, C., Kamen, D. L., Wagner, M., Bals, R., Steinmeyer, A., Zügel, U., Gallo, R. L., Eisenberg, D., Hewison, M., Hollis, B. W., … Modlin, R. L. (2006). Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science (New York, N.Y.)*, *311*(5768), 1770–1773. https://doi.org/10.1126/science.1123933

Lübbeke, A., Garavaglia, G., Barea, C., Stern, R., Peter, R., Hoffmeyer, P. (2011). Influence of patient activity on femoral osteolysis at five and ten years following hybrid total hip replacement. *The Journal of Bone Joint Surgery British Volume*, *93-B*(4), 456–463. https://doi.org/10.1302/0301-620X.93B4.25868

McCarroll, S. A., Hadnott, T. N., Perry, G. H., Sabeti, P. C., Zody, M. C., Barrett, J. C., Dallaire, S., Gabriel, S. B., Lee, C., Daly, M. J., Altshuler, D. M., The International HapMap Consortium. (2006). Common deletion polymorphisms in the human genome. *Nature Genetics*, *38*(1), 86–92. https://doi.org/10.1038/ng1696

Metcalf, J. P., Thompson, A. B., Gossman, G. L., Nelson, K. J., Koyama, S., Rennard, S. I., Robbins, R. A. (1991). GcGlobulin Functions as a Cochemotaxin in the Lower Respiratory Tract: A Potential Mechanism for Lung Neutrophil Recruitment in Cigarette Smokers. *American Review of Respiratory Disease*, *143*(4_pt_1), Article 4_pt_1. https://doi.org/10.1164/ajrccm/143.4_Pt_1.844

Migliorini, F., Maffulli, N., Trivellas, M., Eschweiler, J., Hildebrand, F., Betsch, M. (2022). Total hip arthroplasty compared to bipolar and unipolar hemiarthroplasty for displaced hip fractures in the elderly: A Bayesian network meta-analysis. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*. https://doi.org/10.1007/s00068-022-01905-2

Molnár, F., Peräkylä, M., Carlberg, C. (2006). Vitamin D Receptor Agonists Specifically Modulate the Volume of the Ligand-binding Pocket*. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(15), 10516–10526. https://doi.org/10.1074/jbc.M513609200

Mun, S. H., Park, P. S. U., Park-Min, K.-H. (2020). The M-CSF receptor in osteoclasts and beyond. *Experimental Molecular Medicine*, *52*(8), 1239–1254. https://doi.org/10.1038/s12276-020-0484-z

Neumann, P. E., Gest, T. R. (2020). How many bones? Every bone in my body. *Clinical Anatomy*, *33*(2), 187–191. https://doi.org/10.1002/ca.23425

Noto, R. E., Leavitt, L., Edens, M. A. (2025). Physiology, Muscle. W *StatPearls*. StatPearls Publishing. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532258/

Nykjaer, A., Dragun, D., Walther, D., Vorum, H., Jacobsen, C., Herz, J., Melsen, F., Christensen, E. I., Willnow, T. E. (1999). An Endocytic Pathway Essential for Renal Uptake and Activation of the Steroid 25-(OH) Vitamin D3. *Cell*, *96*(4), 507–515. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80655-8

Ohyama, Y., Yamasaki, T. (2004). Eight cytochrome P450s catalyze vitamin D metabolism. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, *9*, 3007–3018. https://doi.org/10.2741/1455

Oñate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M.-J., O'Malley, B. W. (1995). Sequence and Characterization of a Coactivator for the Steroid Hormone Receptor Superfamily. *Science*, *270*(5240), 1354–1357. https://doi.org/10.1126/science.270.5240.1354

Orr, N., Chanock, S. (2008). Chapter 1 Common Genetic Variation and Human Disease. W *Advances in Genetics* (T. 62, s. 1–32). Academic Press. https://doi.org/10.1016/S0065-2660(08)00601-9

Owens, D. J., Allison, R., Close, G. L. (2018). Vitamin D and the Athlete: Current Perspectives and New Challenges. *Sports Medicine*, *48*(1), 3–16. https://doi.org/10.1007/s40279-017-0841-9

Page, R. S., Pai, V., Eng, K., Bain, G., Graves, S., Lorimer, M. (2018). Cementless versus cemented glenoid components in conventional total shoulder joint arthroplasty: Analysis from the Australian Orthopaedic Association National Joint Replacement Registry. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*, *27*(10), 1859–1865. https://doi.org/10.1016/j.jse.2018.03.017

Park, C. Y., Han, S. N. (2021). The Role of Vitamin D in Adipose Tissue Biology: Adipocyte Differentiation, Energy Metabolism, and Inflammation. *Journal of Lipid and Atherosclerosis*, *10*(2), 130–144. https://doi.org/10.12997/jla.2021.10.2.130

Patel, I., Nham, F., Zalikha, A. K., El-Othmani, M. M. (2023). Epidemiology of total hip arthroplasty: Demographics, comorbidities and outcomes. *Arthroplasty*, *5*, 2. https://doi.org/10.1186/s42836-022-00156-1

Patton, C. M., Powell, A. P., Patel, A. A. (2012). Vitamin D in Orthopaedics. *JAAOS - Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, *20*(3), 123–129. https://doi.org/10.5435/JAAOS-20-03-123

Pike, J. W., Meyer, M. B. (2020). The unsettled science of nonrenal calcitriol production and its clinical relevance. *The Journal of Clinical Investigation*, *130*(9), 4519–4521. https://doi.org/10.1172/JCI141334

Płominski, J., Grzybowski, R., Fiedorowicz, E., Sienkiewicz-Szlapka, E., Rozmus, D., Krol-Grzymala, A., Jarmolowska, B., Kordulewska, N., Cieslinska, A. (2022). Vitamin D Metabolic Pathway Components in Orthopedic Patientes-Systematic Review. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES*, *23*(24). https://doi.org/10.3390/ijms232415556

Pludowski, P., Holick, M. F., Grant, W. B., Konstantynowicz, J., Mascarenhas, M. R., Haq, A., Povoroznyuk, V., Balatska, N., Barbosa, A. P., Karonova, T., Rudenka, E., Misiorowski, W., Zakharova, I., Rudenka, A., Łukaszkiewicz, J., Marcinowska-Suchowierska, E., Łaszcz, N., Abramowicz, P., Bhattoa, H. P., Wimalawansa, S. J. (2018). Vitamin D supplementation guidelines. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *175*, 125–135. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.01.021

Płudowski, P., Kos-Kudła, B., Walczak, M., Fal, A., Zozulińska-Ziółkiewicz, D., Sieroszewski, P., Peregud-Pogorzelski, J., Lauterbach, R., Targowski, T., Lewiński, A., Spaczyński, R., Wielgoś, M., Pinkas, J., Jackowska, T., Helwich, E., Mazur, A., Ruchała, M., Zygmunt, A., Szalecki, M., … Misiorowski, W. (2023). Guidelines for Preventing and Treating Vitamin D Deficiency: A 2023 Update in Poland. *Nutrients*, *15*(3), Article 3. https://doi.org/10.3390/nu15030695

Prosser, D. E., Jones, G. (2004). Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends in Biochemical Sciences*, *29*(12), 664–673. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.10.005

Roberts, S., Colombier, P., Sowman, A., Mennan, C., Rölfing, J. H. D., Guicheux, J., Edwards, J. R. (2016). Ageing in the musculoskeletal system: Cellular function and dysfunction throughout life. *Acta Orthopaedica*, *87*(sup363), 15–25. https://doi.org/10.1080/17453674.2016.1244750

Shen, J., Li, Z., Chen, J., Song, Z., Zhou, Z., Shi, Y. (2016). SHEsisPlus, a toolset for genetic

studies on polyploid species. *Scientific Reports*, *6*(1), 24095. https://doi.org/10.1038/srep24095

Shi, Y. Y., He, L. (2005). SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci. *Cell Research*, *15*(2), 97–98. https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290272

Shirazi, S., Ravindran, S., Cooper, L. F. (2022). Topography-mediated immunomodulation in osseointegration; Ally or Enemy. *Biomaterials*, *291*, 121903. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121903

Sieczka, Ł., Bohatyrewicz, A., Pituch, S. (2017). Endoprotezy stawów biodrowych wczoraj i dziś. *Rheumatology Forum*, *3*(4), Article 4.

Song, Y.-H., Naumova, A. K., Liebhaber, S. A., Cooke, N. E. (b.d.). *Physical and Meiotic Mapping of the Region of Human Chromosome 4q11–q13 Encompassing the Vitamin D Binding Protein DBP/Gc-Globulin and Albumin Multigene Cluster*. 8.

Speeckaert, M., Huang, G., Delanghe, J. R., Taes, Y. E. C. (2006). Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism. *Clinica Chimica Acta*, *372*(1–2), Article 1–2. https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.03.011

Stomberg, M. W., Öman, U.-B. (2006). Patients undergoing total hip arthroplasty: A perioperative pain experience. *Journal of Clinical Nursing*, *15*(4), 451–458. https://doi.org/10.1111/j.1365-2702.2006.01363.x

Takeyama, K., Kitanaka, S., Sato, T., Kobori, M., Yanagisawa, J., Kato, S. (1997). 25-Hydroxyvitamin D3 1α-Hydroxylase and Vitamin D Synthesis. *Science*, *277*(5333), 1827–1830. https://doi.org/10.1126/science.277.5333.1827

The HEALTH Investigators. (2019). Total Hip Arthroplasty or Hemiarthroplasty for Hip Fracture. *New England Journal of Medicine*, *381*(23), 2199–2208. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1906190

Tsutsumi, R., Xie, C., Wei, X., Zhang, M., Zhang, X., Flick, L. M., Schwarz, E. M., O'Keefe, R. J. (2009). PGE2 Signaling Through the EP4 Receptor on Fibroblasts Upregulates RANKL and Stimulates Osteolysis1*. *Journal of Bone and Mineral Research*, *24*(10), 1753–1762. https://doi.org/10.1359/jbmr.090412

Usategui-Martín, R., De Luis-Román, D.-A., Fernández-Gómez, J. M., Ruiz-Mambrilla, M., Pérez-Castrillón, J.-L. (2022). Vitamin D Receptor (VDR) Gene Polymorphisms Modify the Response to Vitamin D Supplementation: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*, *14*(2), 360. https://doi.org/10.3390/nu14020360

Van Baelen, H., Bouillon, R., De Moor, P. (1977). Binding of 25-hydroxycholecalciferol in

tissues. *Journal of Biological Chemistry*, *252*(8), 2515–2518. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)40488-1

Vaughan, C. L. (2003). Theories of bipedal walking: An odyssey. *Journal of Biomechanics*, *36*(4), 513–523. https://doi.org/10.1016/S0021-9290(02)00419-0

Verroust, P. J., Birn, H., Nielsen, R., Kozyraki, R., Christensen, E. I. (2002). The tandem endocytic receptors megalin and cubilin are important proteins in renal pathology. *Kidney International*, *62*(3), 745–756. https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2002.00501.x

Wang, Y., Zhu, J., DeLuca, H. F. (2012). Where is the vitamin D receptor? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *523*(1), 123–133. https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.04.001

Waris, V., Waris, E., Sillat, T., Konttinen, Y. T. (2010). BMPs in periprosthetic tissues around aseptically loosened total hip implants. *Acta Orthopaedica*, *81*(4), 420–426. https://doi.org/10.3109/17453674.2010.492765

White, P., Cooke, N. (2000). The Multifunctional Properties and Characteristics of Vitamin D-binding Protein. *Trends in Endocrinology Metabolism*, *11*(8), 320–327. https://doi.org/10.1016/S1043-2760(00)00317-9

Williams, M. H., Van Alstyne, E. L., Galbraith, R. M. (1988). Evidence of a novel association of unsaturated fatty acids with Gc (Vitamin D-binding protein). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *153*(3), 1019–1024. https://doi.org/10.1016/S0006-291X(88)81330-5

Yang, Q., Wang, J., Xu, Y., Chen, Y., Lian, Q., Zhang, Y. (2020). Incidence and risk factors of in-hospital prosthesis-related complications following total hip arthroplasty: A retrospective Nationwide Inpatient Sample database study. *International Orthopaedics*, *44*(11), 2243–2252. https://doi.org/10.1007/s00264-020-04682-y

Yin, Z., Gong, G., Liu, X., Yin, J. (2023). Mechanism of regulating macrophages/osteoclasts in attenuating wear particle-induced aseptic osteolysis. *Frontiers in Immunology*, *14*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1274679

Young, A. R., Morgan, K. A., Harrison, G. I., Lawrence, K. P., Petersen, B., Wulf, H. C., Philipsen, P. A. (2021). A revised action spectrum for vitamin D synthesis by suberythemal UV radiation exposure in humans in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *118*(40), e2015867118. https://doi.org/10.1073/pnas.2015867118

Zmijewski, M., Carlberg, C. (2020). Vitamin D receptor(s): In the nucleus but also at membranes? *Experimental Dermatology*, *29*(9), 876–884. https://doi.org/10.1111/exd.14147

Żmijewski, M. A. (2022). Nongenomic Activities of Vitamin D. *Nutrients*, *14*(23), Article 23.

https://doi.org/10.3390/nu14235104

Spis rycin

Ryc. 1. Liczba zabiegów endoprotezoplastyk stawu biodrowego w latach 2005-2024..... 12
Ryc. 2. Szlak syntezy i metabolizmu witaminy D 18
Ryc. 3. Schemat genu *VDBP* z polimorfizmami eksonu 11: rs4588 i rs7041 i efektami w kodowanym białku 20
Ryc. 4. Schemat genu *VDR* z polimorfizmami FokI, TaqI, ApaI, BsmI i ich wpływ na kodowanie białko 22
Ryc. 5. Rekrutacja pacjentów do zadań badawczych 1 i 2 29
Ryc. 6. Podsumowanie wyników otrzymanych w zadaniu badawczym numer 1..... 33
Ryc. 7. Podsumowanie wyników otrzymanych w zadaniu badawczym numer 2..... 35

Spis tabel

Tabela 1. Klasyfikacja poziomu 25(OH)D w diagnostyce laboratoryjnej..... 16

Wkład autorów w powstanie artykułów

Projekt badań oraz realizację eksperymentów, a także metodologię, oprogramowanie i analizę formalną przeprowadziły Dominika Rozmus i Anna Cieślińska. Ewa Fiedorowicz wniosła wkład w analizę formalną, badania, pisanie i edycję. Zasoby do badania zostały dostarczone przez Romana Grzybowskiego i Janusza Płomińskiego (IJMS) oraz przez Annę Cieślińską i Janusza Płomińskiego (Nutrients). Za zarządzanie danymi odpowiedzialne były Dominika Rozmus i Anna Cieślińska. Pisanie oryginalnego szkicu było zadaniem Anny Cieślińskiej, Dominiki Rozmus, Janusza Płomińskiego, Ewy Fiedorowicz i Romana Grzybowskiego (IJMS) oraz Anny Cieślińskiej, Dominiki Rozmus i Janusza Płomińskiego (Nutrients). Przegląd i edycję manuskryptu zakończyli Anna Cieślińska, Dominika Rozmus, Janusz Płomiński, Ewa Fiedorowicz i Roman Grzybowski (IJMS) oraz Anna Cieślińska, Dominika Rozmus, Janusz Płomiński i Ewa Fiedorowicz (Nutrients). Za wizualizację odpowiadały Dominika Rozmus i Anna Cieślińska. Nadzór nad projektem i badaniami sprawowali Janusz Płomiński i Anna Cieślińska. Administrację projektu prowadziły Anna Cieślińska i Dominika Rozmus, a pozyskiwanie funduszy zapewniła Anna Cieślińska.

Finansowanie

Badania nie otrzymały finansowania ze źródeł zewnętrznych.

Współpraca

Badania powstały we współpracy z Wojewódzkim Szpitalem Specjalistycznym w Olsztynie oraz Szpitalem Klinicznym im. prof. Adama Grucy w Otwocku. Współpraca była kluczowa dla realizacji badań. Szpitale umożliwiły rekrutację pacjentów oraz zapewniły dostęp do infrastruktury potrzebnej do pobierania i przechowywania próbek, jak również wsparcie w zakresie dokumentacji medycznej. Dzięki zaangażowaniu personelu medycznego obu placówek możliwe było sprawne przeprowadzenie badań, spełnienie wymagań proceduralnych oraz zapewnienie zgodności z zasadami etyki badań naukowych. Wszyscy pacjenci zostali zapoznani z dokumentacją i wyrazili dobrowolną zgodę na udział w badaniu.

Komisja Bioetyczna

Badanie zostało zatwierdzone przez lokalne Komisje Bioetyczne, które oceniły jego zgodność z obowiązującymi standardami etycznymi. Certyfikacja uzyskana od lokalnych Komisji Bioetycznych (49/2019 oraz 139/2023) zapewnia, że badanie było przeprowadzane z pełnym poszanowaniem praw i dobra uczestników oraz zgodnie z międzynarodowymi wytycznymi dotyczącymi badań naukowych na ludziach. Wymogi etyczne obejmowały m.in. zapewnienie dobrowolności uczestnictwa, uzyskanie świadomej zgody oraz ochronę prywatności i danych osobowych uczestników.

Opublikowane prace wchodzące w skład rozprawy

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Article

VDR Gene Polymorphisms (*BsmI, FokI, TaqI, ApaI*) in Total Hip Arthroplasty Outcome Patients

Dominika Rozmus [1], Ewa Fiedorowicz [1], Roman Grzybowski [2], Janusz Płomiński [3] and Anna Cieślińska [1,*]

[1] Department of Biochemistry, Faculty of Biology and Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, 1A Oczapowskiego Street, 10-719 Olsztyn, Poland; dominika.rozmus@uwm.edu.pl (D.R.); ewa.kuzbida@uwm.edu.pl (E.F.)
[2] Department of Orthopedics and Traumatology, Collegium Medicum, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Aleja Warszawska 30, 11-041 Olsztyn, Poland; roman.grzybowski@uwm.edu.pl
[3] Department of Orthopedics, Centre of Postgraduate Medical Education, Gruca Orthopaedic and Trauma Teaching Hospital, Konarskiego 13, 05-400 Otwock, Poland; plominsky@poczta.onet.pl
* Correspondence: anna.cieslinska@uwm.edu.pl

Abstract: A total hip arthroplasty (THA) can improve quality of life, but loosening of the hip prosthesis is a complex problem in which vitamin D may also play a role. The Vitamin D Receptor (VDR) is involved in the response of cells to the action of vitamin D, and its genetic variability raises the question of whether individual differences could influence the risk of prosthesis loosening. The aim of this study was to investigate the relationship between *VDR* single nucleotide polymorphisms (SNPs) (*ApaI*, *BsmI*, *FokI* and *TaqI*) and the serum VDR and 25(OH)D levels in three groups of patients: (1) arthroscopy patients after THA without loosening of the prosthesis (CA—Control Arthroplasty), (2) patients after THA with loosened hip prostheses (L—Loosening) and (3) the control group (C—Control). Our results suggest that the genotypes *tt* of *TaqI*, *BB* of *BsmI*, and *FF* of *FokI* may influence the *VDR* effect in patients with loosened protheses. Our results showed that the ACAC haplotype (AtBF) was over two times more frequent in the L group than in CA + C: OR =2.35 [95% CI 1.44–3.83; $p = 0.001$]. There was no significant correlation between the VDR and serum 25(OH)D levels, but there were differences between studied groups.

Keywords: VDR; vitamin D receptor; vitamin D; loosening of hip prothesis; arthroscopy

check for updates

Citation: Rozmus, D.; Fiedorowicz, E.; Grzybowski, R.; Płomiński, J.; Cieślińska, A. *VDR* Gene Polymorphisms (*BsmI*, *FokI*, *TaqI*, *ApaI*) in Total Hip Arthroplasty Outcome Patients. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 8225. https://doi.org/10.3390/ijms25158225

Academic Editor: Andrzej Slominski

Received: 26 April 2024
Revised: 23 July 2024
Accepted: 25 July 2024
Published: 27 July 2024

Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Total hip arthroplasty (THA) is a procedure that has been performed for more than 100 years and has remained one of the most successful orthopedic operations since its inception [1]. The increasing incidence of osteoporosis and bone-related trauma in the elderly population has led to an increase in hip fractures and the risk of patient mortality [2]. One of the options in cases of injury is total hip arthroplasty (THA), in which the femoral head and acetabulum are replaced with prosthetic components [3]. This medical procedure improves quality of life but is not without complications. THA complications/adverse events and their definitions have been endorsed by the Hip Society, including bleeding, wound complication, thromboembolic disease, neural deficit, vascular injury, dislocation/instability, periprosthetic fracture, abductor muscle avulsion, deep periprosthetic joint infection, heterotopic ossification, wear of bearing surfaces, osteolysis, implant loosening, cup dislodgement, implant fracture, reoperation, revision, readmission and death [4]. According to statistics, the main causes of prosthesis loosening are inflammatory reactions (septic in 7.5%/aseptic in 55.2%), dislocations and prosthesis fractures (18.8%) and other surgical errors (3.8%) [5,6]. Another study examined two groups of patients, (1) THA and (2) THA revision (rTHA), with the most common concomitant diseases in both groups being hypertension and chronic lung disease. The rTHA indications included dislocation/instability (21.85%), followed by mechanical loosening (19.74%), other mechanical

complications (17.38%), and infection (15.10%). The five most common concomitant diseases in the THA group are hypertension (60.46%), obesity (15.11%), chronic lung disease (14.37%), hypothyroidism (13.68%) and uncomplicated diabetes (13.67%). In rTHA, the five most prevalent comorbidities are hypertension (59.74%), deficiency anemia (17.51%), chronic lung disease (16.92%), fluid/electrolyte disorders (15.74%) and hypothyroidism (14.81%) [7]. The problem of inflammation and the strong immune reaction caused by wearing the prostheses has not yet been solved, and research to date has focused on the local processes around the prosthetic components. Recent reports suggest that the quality and metabolism of bone tissue influence the process of osseointegration [8,9], as does a disturbance in calcium phosphate metabolism related to the role of vitamin D in the human body [10,11]. Osseointegration was originally defined as a direct structural and functional connection between bone and the surface of an implant. Osseointegration can be described as the final step in a cascade of processes involved in bone healing around implants. Osseointegration and implant success are influenced by systemic factors such as metabolic bone diseases [12,13].

The role of vitamin D, an important element of the endocrine system, in bone health is well documented. It controls calcium and phosphate homeostasis throughout the body, as well as, together with parathyroid hormone, bone mineralization [14–17]. As a secosteroid prohormone with wide-ranging regulatory effects, it influences gene expression and affects cell proliferation, differentiation and activation [18]. The metabolic pathway of vitamin D activation is shown in Figure 1 below.

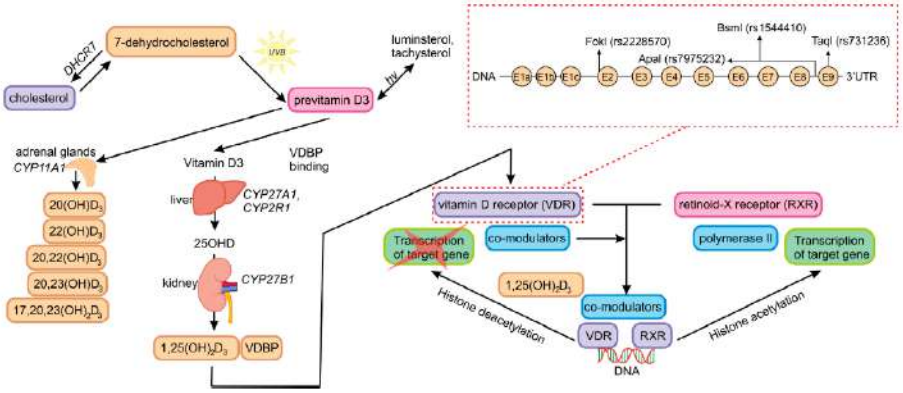


Figure 1. Metabolic pathway of vitamin D and the role of VDR (Vitamin D Receptor) in signaling based on Płomiński et al. (2022), Slominski A.T. (2024), Holick (2024) and Slominski R.M. (2021) [16,19–21].

In orthopedic surgery, vitamin D levels correlate with bone density, reduction in the rate of osteoporotic fractures, integration of prostheses and improved neuromuscular function [22]. Vitamin D deficiency is associated with numerous diseases ranging from bone mineralization disorders to chronic diseases such as diabetes, cardiovascular disease, cancer, multiple sclerosis, rheumatoid arthritis and tuberculosis [23–26].

Epidemiological data have shown that an increasing number of orthopedic patients are at risk of vitamin D deficiency, which can have far-reaching consequences in terms of bone healing and fracture risk [22]. Vitamin D modulates immune reactions, which are of critical importance in connection with the loosening of protheses. Hypovitaminosis has been found in patients with total hip and also with knee arthroplasty [10]. In addition, patients suffering from periprosthetic joint infection of the hip and knee appear to have lower vitamin D levels than patients with aseptic loosening of the implants [11].

The Vitamin D Receptor (VDR) is a component of the metabolic pathway involved in the cellular response to vitamin D action [17]. As a member of the nuclear receptor

superfamily, it functions as a ligand-induced transcription factor [17,27] and binds the active vitamin D metabolite 1,25-dihydroxycholecalciferol ($1,25(OH)_2D$) to the target cell [17]. *VDR* is expressed in various tissues, including intestinal epithelial cells, renal tubules, parathyroid cells, keratinocytes of the skin, breast epithelium, the pancreas, the pituitary gland, osteoblasts, chondrocytes, monocytes, macrophages, T lymphocytes and germinal tissue. Its role in the regulation of gene expression involved in organ development, cell proliferation and differentiation, calcium and phosphate homeostasis in bone metabolism, immune system function and the detoxification of xenobiotics is well documented [28,29]. Although Figure 1 presents mostly canonical vitamin D metabolic pathway activation, novel pathways have already been discovered [30]. They include the role of lumisterol and tachysterol, which may be activated by CYP11A1, and their metabolites act not only on VDR but also other nuclear receptors, such as LXRα/β, RAR-related orphan receptor α/γ and peroxisome proliferator–activated receptor-γ [21,30,31].

The *VDR* gene, which consists of 12 exons, is located on the long arm of the 12 chromosome (12q13.11) [32]. It has several polymorphisms, and the most common SNP-like alterations in the *VDR* have been found and named as *FokI* (rs2228570), *ApaI* (rs7975232), *BsmI* (rs1544410) and *TaqI* (rs731236) [33]. A standardized nomenclature of *VDR* polymorphisms is shown in Table 1.

Table 1. Nomenclature of common polymorphisms in the VDR (Vitamin D Receptor) gene.

rs Number	SNP Name	Alleles
rs7975232	*ApaI* (Apa 1)	A (T), a (C)
rs1544410	*BsmI* (Bsm 1)	B (A), b (G)
rs2228570	*FokI* (Fok 1)	F (C), f (T)
rs731236	*TaqI* (Taq 1)	T (T), t (C)

The polymorphisms and the extent of expression of genes involved in the vitamin D metabolic pathway may be an important element in the effect of vitamin D on the human body, including disorders in the skeletal system and the problem of loosening of orthopedic prostheses [34–38].

The genetic variability of the *VDR* gene raises the question of whether individual differences could influence the risk of hip prosthesis loosening. The study is of crucial importance in the context of hip replacements, as vitamin D deficiency is particularly common in older populations. Therefore, this study aims to gain new insights by investigating the relationship between *VDR* polymorphisms (*ApaI*, *BsmI*, *FokI* and *TaqI*) and serum VDR protein levels in three groups of patients: (1) a group of arthroscopy patients after THA without prosthesis loosening, (2) patients after THA with a loosened hip prosthesis and (3) the control group (healthy subjects).

2. Results

2.1. ORs and Allele/Genotype Frequencies

The observed genotype frequencies of *ApaI*, *BsmI* and *TaqI* polymorphisms in *VDR* in the study groups corresponded to the Hardy–Weinberg equilibrium. Our results suggest that the *tt* of *TaqI*, *BB* of *BsmI* and *FF* of *FokI* genotypes may influence the *VDR* action in loosening prothesis patients. Tables 2–5 show the detailed individual genotypes, allele frequencies and the associations with prosthesis loosening for each investigated SNP.

Table 2. Genotype frequencies with logistic regression analysis of the dominant and recessive model of ApaI in VDR (Vitamin D Receptor) gene polymorphisms and χ^2 in the studied groups and the associations with prosthesis loosening.

Genotypes	Control [*n* (%)] C	Control Arthroplasty [*n* (%)] CA	Loosening [*n* (%)] L
AA	53 (21.72)	19 (25.00)	12 (22.22)
Aa	128 (54.46)	44 (57.90)	30 (55.56)
aa	63 (25.82)	13 (17.10)	12 (22.22)
Genotype χ^2 (4, 374) = 2.54; p = 0.6375			
Frequency (F) of the alleles			
F_A	0.48 (48)	0.54 (54)	0.50 (50)
F_a	0.52 (52)	0.46 (46)	0.50 (50)
OR (95% CI; *p*-value)			
	C vs. CA + L	C vs. L	CA vs. L
dominant	0.68 (0.41–1.17; <0.0001)	0.82 (0.41–1.66; 0.0006)	1.39 (0.58–3.32; 0.0594)
recessive	0.88 (0.54–1.47; 0.0001)	0.97 (0.48–1.98; 0.0751)	1.17 (0.51–2.66; p = 0.71)
AA	-	-	-
vs. *Aa*	0.99 (0.58–1.68; 0.97)	1.04 (0.59–2.56; 0.03)	1.08 (0.46–2.55; 0.86)
vs *aa*	0.67 (0.36–1.29; 0.24)	0.84 (0.24–2.99; 0.0001)	1.46 (0.50–4.35; 0.49)

Table 3. Genotype frequencies with logistic regression analysis of the dominant and recessive model of TaqI in VDR (Vitamin D Receptor) gene polymorphisms and χ^2 in the studied groups and the associations with prosthesis loosening.

Genotypes	Control [*n* (%)] C	Control Arthroplasty [*n* (%)] CA	Loosening [*n* (%)] L
TT	111 (45.49)	23 (30.26)	6 (11.11)
Tt	104 (42.62)	37 (48.69)	36 (66.67)
tt	29 (11.89)	16 (21.05)	12 (22.22)
Genotype χ^2 (4, 374) = 25.924; p = 0.000033			
Frequency (F) of the alleles			
F_T	0.67 (67)	0.55 (55)	0.56 (56)
F_t	0.33 (33)	0.45 (45)	0.44 (44)
OR (95% CI; *p*-value)			
	C vs. CA + L	C vs. L	CA vs. L
dominant	2.04 (1.15–3.60; 0.0146)	1.13 (0.52–2.42; 0.75)	1.07 (1.46–2.49; 0.97)
recessive	2.91 (1.79–4.72; <0.0001)	6.68 (2.76–16.18; p < 0.0001)	3.47 (1.30–9.25; 0.01)
TT	-	-	-

Table 3. *Cont.*

Genotypes	Control [*n* (%)] C	Control Arthroplasty [*n* (%)] CA	Loosening [*n* (%)] L
vs. *Tt*	2.67 (1.62–4.46; 0.0001)	6.40 (2.59–15.83; 0.0001)	1.72 (0.97–3.08; 0.07)
vs. *tt*	3.70 (1.91–7.17; 0.0001)	7.66 (2.65–22.14; 0.0002)	2.88 (0.89–9.36; 0.08)

Table 4. Genotype frequencies with logistic regression analysis of the dominant and recessive model of BsmI in VDR (Vitamin D Receptor) gene polymorphisms and χ^2 in the studied groups and the associations with prosthesis loosening.

Genotypes	Control [*n* (%)] C	Control Arthroplasty [*n* (%)] CA	Loosening [*n* (%)] L
BB	33 (13.52)	15 (19.74)	13 (24.07)
Bb	145 (59.43)	48 (63.15)	35 (64.82)
bb	66 (27.05)	13 (17.11)	6 (11.11)
Genotype χ^2 (4, 374) = 10.258; p = 0.0363			
Frequency (F) of the alleles			
F_B	0.56 (56)	0.51 (51)	0.56 (56)
F_b	0.44 (44)	0.49 (49)	0.44 (44)
OR (95% CI; *p*-value)			
	C vs. CA + L	C vs. L	CA vs. L
dominant	0.46 (0.26–0.81; 0.0071)	0.34 (0.14–0.82; 0.02)	0.61 (0.32–1.71; 0.34)
recessive	0.57 (0.33–0.99; 0.0475)	0.49 (0.24–1.01; 0.06)	0.78 (0.33–1.80; 0.55)
BB	-	-	-
vs. *Bb*	0.67 (0.38–1.20; 0.18)	0.62 (0.29–1.29; 0.20)	0.84 (0.36–1.99; 0.69)
vs. *bb*	0.34 (0.17–0.70; 0.0031)	0.23 (0.08–0.66; 0.0064)	0.53 (0.16–1.80; 0.31)

Table 5. Genotype frequencies with logistic regression analysis of the dominant and recessive model of FokI in VDR (Vitamin D Receptor) gene polymorphisms and χ^2 in the studied groups and the associations with prosthesis loosening.

Genotypes	Control [*n* (%)] C	Control Arthroplasty [*n* (%)] CA	Loosening [*n* (%)] L
FF	17 (6.97)	16 (21.05)	12 (22.22)
Ff	108 (44.26)	40 (52.63)	30 (55.56)
ff	119 (48.77)	20 (26.32)	12 (22.22)
Genotype χ^2 (4, 374) = 29.084; p < 0.00001			
Frequency (F) of the alleles			
F_F	0.29 (29)	0.47 (48)	0.50 (50)
F_f	0.71 (71)	0.53 (52)	0.50 (50)

Table 5. *Cont.*

Genotypes	Control [*n* (%)] C	Control Arthroplasty [*n* (%)] CA	Loosening [*n* (%)] L
	OR (95% CI; *p*-value)		
	C vs. CA + L	C vs. L	CA vs. L
dominant	0.34 (0.21–0.55; <0.0001)	0.30 (0.15–0.60; 0.0006)	0.80 (0.35–1.81; 1.0)
recessive	0.27 (0.15–0.52; 0.0001)	0.26 (0.21–1.08; 0.08)	0.93 (0.40–2.18; 1.0)
FF	-	-	-
vs. *Ff*	0.39 (0.20–0.77; 0.0066)	0.39 (0.17–0.91; 0.03)	1.00 (0.41–2.42; 1.0)
vs. *ff*	0.16 (0.08–0.33; <0.0001)	0.14 (0.06–0.37; 0.0001)	0.80 (0.28–2.25; 0.67)

2.2. Linkage Disequilibrium (LD)

LD refers to the non-random association of alleles at a pair of genetic loci [39].

The results show that *ApaI* and *TaqI* (LD = 0.59) and *TaqI* and *BsmI* (LD = 0.74) have a higher association frequency than expected in the L vs. C group and *TaqI* with *BsmI* (LD = 0.68) in L vs. CA + C. Figure 2 shows the above results.

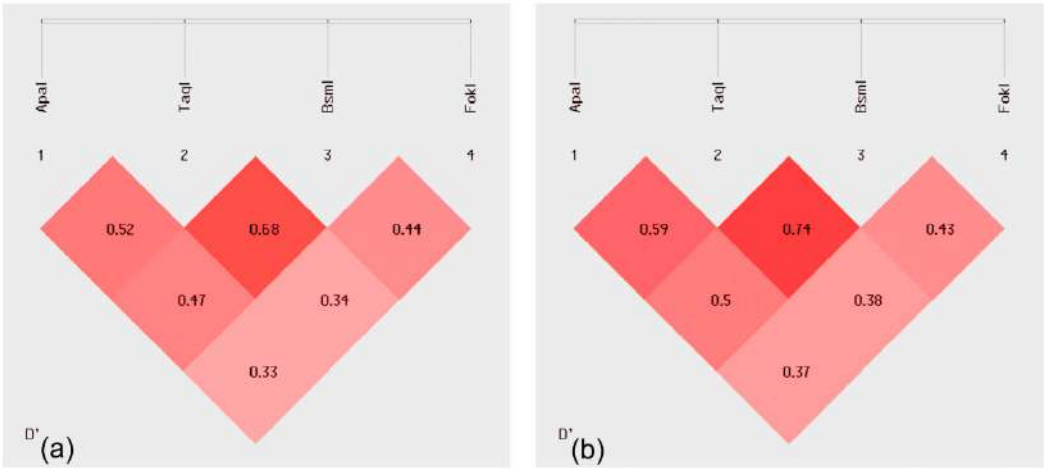


Figure 2. Linkage disequilibrium between *Apa*, *Taq*, *Bsm* and *FokI* in all studied groups: (**a**) L vs. CA + C, (**b**) L vs. CA. The more intense color, the higher LD result is.

2.3. Haplotype Analysis of Loci

A haplotype analysis of the loci is presented in Table 6 (L vs. CA + C) and Table 7 (L vs. C).

Table 6. Haplotype analysis of the loci *ApaI*, *TaqI*, *BsmI* and *FokI* SNPs in the *VDR* (*Vitamin D Receptor*) gene in the groups L vs. CA + C.

Haplotype	Case (Freq)	Control (Freq)	χ^2	Fisher's *p*	Pearson's *p*	OR [95% CI]
ACAT	11 (0.101)	80 (0.125)	0.463	0.632	0.496	0.79 [0.41–1.55]
ACAC	28 (0.259)	83 (0.129)	12.276	0.001	0.0004	2.35 [1.44–3.83]
CTGT	23 (0.212)	178 (0.278)	1.996	0.196	0.157	0.70 [0.43–1.15]
ATGT	6 (0.055)	79 (0.123)	4.227	0.047	0.039	0.42 [0.18–0.98]
CTAT	7 (0.064)	26 (0.040)	1.282	0.305	0.257	1.64 [0.69–2.87]
ATAT	1 (0.009)	30 (0.046)	3.291	0.07	0.069	0.19 [0.03–1.41]
ATAC	2 (0.018)	23 (0.035)	0.867	0.561	0.351	0.51 [0.12–2.18]
CCAC	5 (0.046)	18 (0.028)	1.023	0.359	0.311	1.68 [0.61–4.62]
CTGC	5 (0.046)	50 (0.078)	1.374	0.319	0.241	0.57 [0.22–1.47]

Haplotypes with frequency < 0.03 were ignored. Global result: total control = 320, total case = 54. Global χ^2 is 24.452, Fisher's *p* is NA, Pearson's *p* is 0.001.

Table 7. Haplotype analysis of the loci *ApaI*, *TaqI*, *BsmI* and *FokI* SNPs in the *VDR* (*Vitamin D Receptor*) gene in groups L vs. C.

Haplotype	Case (Freq)	Control (Freq)	χ^2	Fisher's *p*	Pearson's *p*	OR [95% CI]
ACAT	11 (0.101)	64 (0.131)	0.689	0.521	0.406	0.75 [0.38–1.48]
ACAC	28 (0.259)	60 (0.122)	13.055	0.0008	0.0003	2.50 [1.50–4.15]
CTGT	21 (0.194)	151 (0.309)	5.694	0.018	0.017	0.54 [0.32–0.9]
ATGT	6 (0.055)	65 (0.133)	5.079	0.021	0.024	0.38 [0.16–0.91]
CTAT	7 (0.064)	21 (0.043)	0.937	0.319	0.333	1.54 [0.64–3.72]
CTGC	7 (0.064)	41 (0.084)	0.440	0.695	0.506	0.76 [0.33–1.73]
ATAT	1 (0.009)	24 (0.049)	3.506	0.064	0.061	0.18 [0.02–1.35]

Haplotypes with frequency <0.03 were ignored. Total control = 244, total case = 54. Global χ^2 is 24.448, Fisher's *p* is NA, Pearson's *p* is 0.0004.

Haplotype analysis of the loci *ApaI*, *TaqI*, *BsmI* and *FokI* SNPs in the *VDR* gene in groups L vs. C showed that *ACAC* haplotype (*AtBF*) was over two times more frequent in the L group than CA + C: OR = 2.35 [95% CI 1.44–3.83; $p = 0.001$] and than C group OR = 2.50 [1.50~4.15; $p = 0.0008$]. The *CTGT* (*aTbf*) haplotype showed a protective effect against THA (C group), while it was less frequent in the L group (OR = 0.54; 95%CI = 0.32–0.90; $p = 0.017$].

The *ATGT* (*ATbf*) haplotype was less frequent in the L group (OR = 0.42; 95%CI = 0.18–0.98; $p = 0.039$) compared to CA + C and C (OR = 0.38; 95%CI =0.16–0.91; $p = 0.024$).

2.4. VDR and 25(OH)D Levels and Correlations

Our results showed higher serum 25(OH)D levels in the C group (Figure 3) compared to the group of arthroscopy patients after THA without loosening of the prosthesis and patients after THA with loosened hip prostheses. The comparison between the groups was carried out using ANOVA and the non-parametric Tukey (HSD) test. In 25(OH)D, one-way ANOVA showed the following differences between groups: F = 30.05, $p < 0.0001$. The Tukey (HSD) test results showed differences between L vs. C, L + CA vs. C and CA vs. C ($p < 0.0001$). There were no significant differences between other groups ($p > 0.7112$).

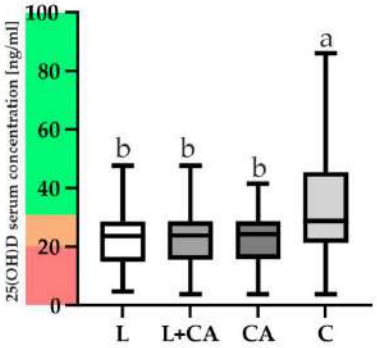


Figure 3. Comparison of 25(OH)D serum concentration in all studied groups with difference analysis, where letter b presents the groups that do not differ from each other and letter a differs from groups marked with letter b. The figure also presents vitamin D concentrations on a scale: red—deficiency, orange—insufficiency, green—sufficiency. Whiskers of the boxplot show the min to max range of concentrations, while a solid line indicates the median.

There were differences in 25(OH)D concentrations between groups which were marked as a and b (Figure 3).

Our results show that the mean of VDR serum level in the C group is lower compared to other groups. In terms of VDR concentration, one-way ANOVA showed there are differences between groups: F =43.19, $p < 0.0001$, df =3. Tukey (HSD) test results showed there are differences between L vs. C, L vs. CA + C and CA vs. C ($p < 0.0001$). Differences were not shown among other groups ($p > 0.8524$).

There were differences in VDR concentrations between groups which were marked as a and b (Figure 4).

The Spearman's rank correlation presented in Figure 5 shows correlations between polymorphisms and 25(OH)D and VDR serum concentrations. The more positive the correlation, the bluer the graph, and the more negative the correlation, the pinker it is. Significant correlations are also marked with a red *p*-value on the graph. *BsmI* and *TaqI* show a strong correlation, which is also demonstrated by LD. VDR and 25(OH)D show a weak negative correlation but with no significance in *p*-value.

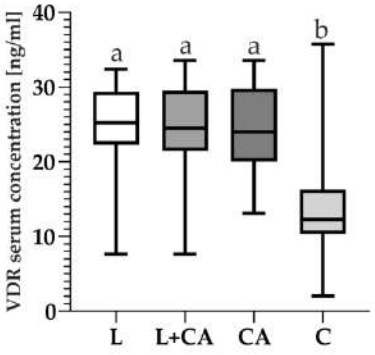


Figure 4. Comparison of VDR (Vitamin D Receptor) serum concentration in all studied groups with difference analysis, where letter a presents groups that do not differ from each other, while letter b differs from groups marked with letter a. Whiskers of the boxplot show the min to max range of concentrations, while a solid line indicates the median.

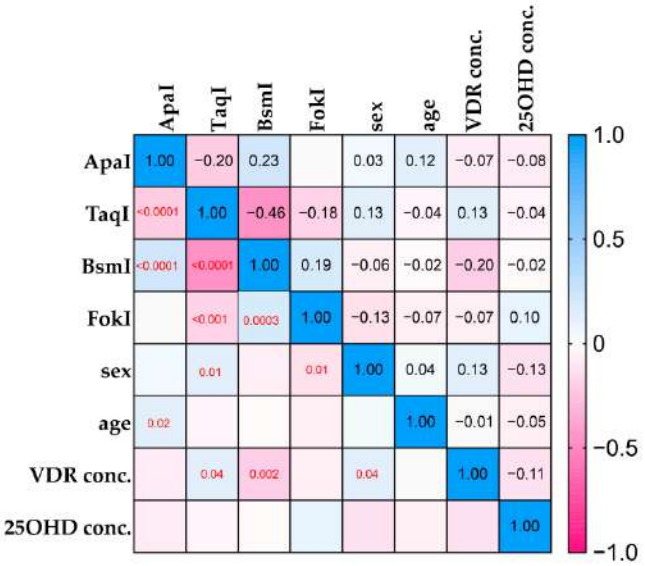


Figure 5. Heatmap of Spearman's rank correlation with *p*-values (red) marked only for significant results.

3. Discussion

The loosening of prostheses can be caused by many factors. These include a reduction in bone mineral density (BMD) [40], unrecognized osteoporosis (OP) or vitamin D deficiency [41]. Vitamin D is important for bone development, skeletal remodeling and fracture repair, which is why the vitamin D metabolic pathway should be investigated in more detail. Higher vitamin D levels are beneficial, and adequate calcium and vitamin D intake to prevent secondary hyperparathyroidism, leading to further bone loss, is the best indicator of adequate calcium and vitamin D intake in any patient [42]. To our knowledge, there are no studies on polymorphisms in the VDR gene in THA patients. Therefore, we base our results on data from publications related to bone diseases (mainly BMD). Some studies clearly showed that patients with a vitamin D deficiency had worse preoperative

Harris hip scores (Mann–Whitney test, $p = 0.018$) and were significantly less likely to have an excellent outcome after total hip arthroplasty ($p = 0.038$). Vitamin D levels were found to be positively associated with both pre- and post-operative Harris hip scores [43].

The study by Berg et al. showed that the *VDR* genotype in a highly endemic osteoporosis area did not predict premenopausal bone mass, postmenopausal bone loss or later osteoporosis and fracture risk [44].

Regarding polymorphisms of the *VDR* gene in a Caucasian population, the meta-analysis in 2020 [45] shows that *FokI* is associated with osteoporosis ($OR_{dominant} = 1.15$; 95% CI = 0.96–1.38. $p = 0.12$), as is *TaqI* ($OR_{dominant} = 1.31$; 95% CI = 1.12–1.53. $p = 0.001$). In that study, no other polymorphism was associated with the disease [45].

The study of Vandevyver et al. [46] showed no significant correlation between the *VDR* polymorphisms of *BsmI*, *ApaI*, *TaqI* and BMD, while Nguyen et al. demonstrated a significant correlation between the *TaqI* polymorphism and BMD [47], with the *TaqI-CC* (*tt*) genotype being associated with an increased risk of hip fracture (OR = 2.6; 95%CI = 1.2–5.3) and BMD.

In Poland, Horst-Sikorska et al. examined a group of 187 patients with osteoporosis and compared them with 19 healthy subjects. The *VDR* polymorphism *TaqI* with T allele was significantly associated with BMD, while the *ApaI* aa variant, the *BsmI* bb variant and the TT *Taq* variant occurred most frequently in patients with a higher of fracture risk in the Polish osteoporotic population [48].

Another study was conducted in Turkey by Uysal et al. in which postmenopausal women were recruited ($n = 200$ with osteoporosis, $n = 146$ healthy controls). The study confirmed differences in the distribution of *BsmI* frequencies, resembling Caucasians in the Turkish population, while the frequency of the *Taq* genotype did not resemble either Caucasians or Asians. The *VDR* haplotypes *bbAATT* and *bbTtAa* were more frequent in the osteoporosis group compared to the healthy control group [49]. The results of our studies show that the *TT* genotype of *TaqI*, the *BB* of *BsmI* and the *ff* of *FokI* were more frequent in the control group (Tables 3–5) and that the *ACAC* haplotype was 2.5 times more frequent in the group of THA patients (Table 7).

For our study, CA + L group results are important to note as they show not only the correlations for prostheses loosening but the tendency towards the total hip arthroplasty procedure overall. For *FokI*, *BsmI*, *TaqI* and *ApaI* (Tables 2–5), *p*-values where <0.01, while haplotype analysis showed *ACAC* correlations (Tables 6 and 7) in the CA + L and C groups ($p < 0.001$).

It is important to note that we found many studies linking bone health, BMD and osteoporosis; however, in most of them, the groups were significantly smaller and the statistical analyzes performed in the reviewed studies did not include ORs, calculated frequencies or full haplotype analyses. Comparisons based on percentages and numbers between groups without access to other data did not provide us with the right material for discussion and comparison with our data. Therefore, we summarize the available data in Table 8, where most of the important information was collected.

Table 8. Summary of studies investigating *VDR* role in bone diseases.

Results	Study Cohort	Case	References
FokI—Ff genotype strongly associated with femoral hip BMD compared to the control group, which had the lowest hip BMD; *TaqI—TT* genotype associated with the lowest hip BMD compared to the control; *tt* genotype—highest hip BMD *ApaI—Aa* correlated with the lowest mean of BMD; *aa* genotype correlated with highest hip BMD; *BsmI—bb* genotype correlated with the lowest hip BMD, while the *BB* genotype had the highest hip BMD.	*N* = 65 of osteoporosis patients; *N* = 30 controls	BMD	[40]

Table 8. *Cont.*

Results	Study Cohort	Case	References
ApaI—No significant difference was found between the different genotypes with regard to the occurrence of osteoporosis with osteoporotic fractures.	Total of 378 patients N = 235 BMD cases; N = 65 decreasing BMD patients	BMD	[50]
The genotypes of *BsmI*, *TaqI*, and *FokI* were not significantly associated with BMD; *ApaI*—*AA* genotype had a higher lumbar spine BMD than the individuals with the *aa VDR* genotype.	N = 83	BMD	[51]
ApaI—BMD was lower in patients with genotype aa compared to genotype *AA*.	N = 136 woman (75—osteoporosis, 37—osteopenia and 24—normal BMD)	BMD	[46]
Bsm/Apa/Taq BB/AA/tt (AATTCC) haplotype was a risk factor for OP (OR: 5.66), while *BbaaTT (AGCCTT)* had a protective effect (OR = 0.10).	N = 147 postmenopausic women; (71 OP and 76 controls)	BMD	[52]
VDR polymorphisms are not associated with the risk of hip fractures.	N = 126 (67 with fractures, 59 healthy)	BMD	[53]
FokI is associated with osteoporosis ($OR_{ff+Ff\ vs.\ FF}$ = 1.19); *TaqI* is associated with osteoporosis ($OR_{TT+Tt\ vs.\ tt}$ = 1.35).	N = 6880 cases and n = 8049 controls (meta-analysis)	BMD	[45]
TaqI—*CC* (*tt*) genotype associated with increased risk of hip fracture (OR = 2.6; 95%CI = 1.2–5.3) and BMD.	N = 677 postmenopausal women, n = 69 hip fracture status	BMD	[47]
TaqI—low BMD has been associated with the *tt* (or *AA* or *BB*) genotype.	N = 43 osteoporotic postmenopausal women N = 139 healthy women	BMD	[54]
No association between the *VDR* genotype and osteoporosis.	N = 118 premenopausal women	BMD	[44]
BsmI—(*GG*) *bb* genotype had a femoral neck bone density of 0.79 standard deviations lower than individuals with *BB* genotype.	N = 44 osteoporosis; N = 44 controls	BMD	[55]
ApaI, *BsmI*, *TaqI*—no correlation between the *VDR* genotypes and BMD.	N = 84 osteoporosis woman N = 807 controls	BMD	[56]
ApaI and *FokI*—no association between genotypes and BMD *BsmI*—*BB* + *Bb* genotypes more frequent in patients with osteoporotic fractures; *TaqI*—*TT*-genotyped patients had a higher BMD compared to *Tt* or *tt*.	N = 192 osteoporosis patients, = 207 controls	BMD	[57]
FokI—(*TT*) *ff* genotype had a significantly lower BMD at the hip than those with the *Ff* genotype; the difference between the two homozygous genotypes (*FF* vs. *ff*) was not significant at any point; *ApaI*, *BsmI* and *TaqI* polymorphisms were not associated with BMD.	N = 114 postmenopausal women including n = 33 healthy controls and n = 65 osteoporotic	BMD	[58]
TaqI with *T* allele was significantly associated with BMD, while the *Apa aa* variant, the *Bsm bb* variant and the *TT Taq* variant occurred most frequently in groups with higher fracture risk.	N = 187 osteoporotic patients, n = 19 controls	BMD	[48]
Bsm/Apa/Taq: bbAATT and *bbTtAa* were more frequent in the osteoporosis group compared to the healthy control group.	n = 200 with osteoporosis, n = 146 healthy controls	BMD	[49]
FokI—(*F*) *C* allele nearly associated with the development of osteoporosis compared to control (OR = 1.783, 95%CI = 0.98–3.25, p = 0.058).	N—120 postmernopausal women (n = 88 non osteoporotic, 144—osteopenic, n = 88 osteoporotic)	BMD	[59]

Vitamin 25(OH)D levels and deficiency have been well studied in many diseases and are the most commonly measured parameter for estimating vitamin D levels in the body due to its stability and long half-life [60,61]. Our results showed higher serum 25(OH)D levels in the C group (Figure 3) compared with the group of arthroscopy patients after THA without loosening of the prosthesis and patients after THA with loosened hip prostheses, which is consistent with the results of other researchers [16,62–64]. On the other hand, the mean value of the VDR serum concentrations is lower in the C group than in groups L and CA, although the values are higher in this group (Figure 4). In addition, the Spearman's rank correlation Heat Map (Figure 5) showed a weak correlation between certain VDR and 25(OH)D levels, although the range of the C group suggests that 25(OH)D levels are higher on average in healthy patients. The results obtained suggest that VDR concentrations do not differ significantly between the tested and control groups. We could not find any other studies on VDR levels in similar study groups. Serum VDR levels may vary according to the physiological state of the body, depend on blood levels of 1,25(OH)2D and genetic variants [34,65,66] and may also show differential gene expression in different tissues. According to Verlinden et al. (2019), a role of osteoclastic *VDR* signaling in mice in the control of bone homeostasis has not been established, but in research by Nakamichi et al., 2017, the increase in bone mass was mediated by the suppression of bone resorption by VDR in osteoblasts [67,68].

4. Materials and Methods

4.1. Characteristics of Control and Patients Groups

A total of 374 Caucasian subjects were recruited between 2019 and 2024 at the The Voivodal Specialistic Hospital in Olsztyn, Poland. All required data were collected from patients as medical records and/or a completed questionnaire. All participants gave informed consent for the study, which was in accordance with ethical standards of the Declaration of Helsinki. The research was certified by the Bioethics Commissions (49/2019 and 139/2023).

The patients were divided into three groups: (1) 54 subjects from a group of patients with a hip transplant in whom the transplant was rejected (L—Loosening); (2) 76 subjects from a group of patients with a hip transplant in which the transplant is functioning correctly (CA—Control Arthroplasty); (3) 244 from a group of healthy volunteers (C—Control). The description of the group can be found in Table 9. ANOVA results showed there are significant differences in age among groups ($F = 3.045$, $p = 0.0488$). Post hoc Tukey (HSD) results indicated differences between groups, and they are presented in Table 9. There is a significant difference in age between CA and C.

Table 9. Patients characteristics.

Characteristics	L (n = 54)	CA (n = 76)	C (n = 244)	p-Value (L vs. CA/L vs. C/CA vs. C)
Age: years mean (SD)	52.7 (9.0)	54.0 (10.8)	51 (9.5)	0.74/0.46/0.05 *
Gender: n (%)				
Female	22 (41)	19 (25)	120 (49)	
Male	32 (59)	57 (75)	124 (51)	
			χ^2 (2, 374) = 13.9573	0.0009

* post hoc test: Tukey (HSD).

In groups L and CA, diagnosis was confirmed by clinical examination and radiographs, and both have a cementless prosthesis. Dominant symptoms of loosening were pain in lower limb on weight bearing, pain in the groin or thigh, new popping or clicking sounds, joint instability and dislocation or subluxation (partial dislocation) of the joint, which

occurred 3 to 12 years after the initial prosthetic surgery. The diagnosis of loosening was based on insensitive radiographic criteria (periprosthetic radiolucent lines wider than 2 mm, prosthetic migration of more than 4 mm). Exclusion criteria included patients with a fistula, those who experienced a faulty surgical technique and those who did not fulfill the time criteria. Another exclusion criterion was patients' BMI > 35. We did not include patients with osteoporosis and rheumatic diseases in the study group (these diseases have been shown to have an impact on the prosthesis survival). Therefore, we did not include patients with loosening who had fractures in this study.

4.2. Biological Material Collection

Approximately 5.0 mL of peripheral blood and 5.0 mL of serum were collected from a total of 374 participants. The biological material was immediately transported to the laboratory and used for analysis or stored at −80 °C. DNA was isolated using the Blood Mini DNA Isolation Kit and a purification procedure (A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland) and diluted to a concentration of 20 ng/µL. The DNA was stored at −20 °C and awaited further analysis.

4.3. VDR Polymorphisms Genotyping

The mixture for amplification in a volume of 17.5 µL consisted of DreamTaq™ Green Master Mix (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), specific primers, the DNA matrix and nuclease-free water (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The yield and specificity of the PCR products were evaluated by electrophoresis in 2.5% agarose gel (Promega, Fitchburg, WI, USA) and staining with GelGreen Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Fremont, CA, USA). The amplified fragments were digested with the restriction enzymes listed in Table 10 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions and visualized on a 2.5% agarose gel. DNA sequencing of randomly selected samples after amplification was performed to confirm correct genotyping by an external company. Table 10 shows primers, conditions, enzymes and amplicon characteristics. The methods were adapted from previous studies [69].

Table 10. PCR primers, conditions, enzymes used and amplicon characteristics.

SNP	Primer Sequence for PCR	Enzyme	PCR Conditions	PCR-RFLP Amplicon
Fok-I rs2228570	Fok1R: 5-ATGGAAACACCTTGCTT CTTCTCCCTC-3 Fok11F: 5-AGCTGGCCCTGGC ACTGACTCtGGCTCT-3	FokI	Initial denaturation: 94 °C/3 min denaturation: 94 °C/30 s. annealing: 61 °C/30 s. synthesis: 72 °C/30 s. number of cycles: 35	ff: 198, 69 FF: 267 Ff: 267, 198, 69 PCR product: 267
Bsm-I rs1544410	Bsm1F: 5-CGGGGAGTAT GAAGGACAAA-3 Bsm1R: 5-CCATCTCTCAGG CTCCAAAG-3	BsmI	Initial denaturation: 94 °C/3 min denaturation: 94 °C/30 s. annealing: 64 °C/30 s. synthesis: 72 °C/30 s. number of cycles: 35	bb: 243, 105 BB: 348 Bb: 348, 243, 105 PCR product: 348
Taq-I rs731236	Taq1F: 5-GGATCCTAA ATGCACGGAGA-3 Taq1R: 5-AGGAAAGGGGT TAGGTTGGA-3	TaqI	Initial denaturation: 94 °C/3 min denaturation: 94 °C/30 s. annealing: 62 °C/30 s. synthesis: 72 °C/30 s. number of cycles: 35	tt: 225, 200, 205 TT: 425, 205 Tt: 425, 225, 200, 205 PCR product: 630
Apa-I rs7975232		ApaI		aa: 484, 146 AA: 630 Aa: 630, 484, 146 PCR product: 630

Figure 6 shows the electropherograms of the *ApaI*, *TaqI*, *BsmI* and *FokI* genotypes.

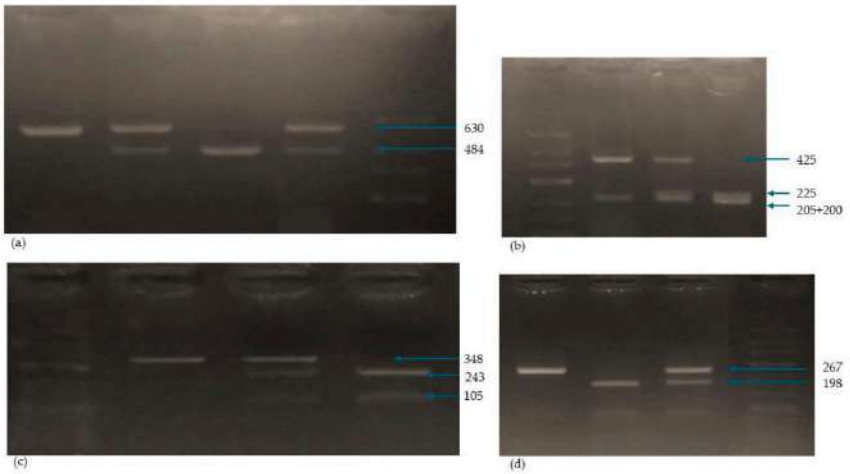


Figure 6. Electrophoregram of *Apa I* (**a**), *Taq I* (**b**), *Bsm I* (**c**) and *Fok I* (**d**) genotyping. *Apa*: Path 1: *AA* (630 bp), Path 2 and 4: *Aa* (630, 483 bp), Path 3: *aa* (484, 146 bp)–fragment of 146 bp not shown, Path 4: molecular marker. *Taq*: Path 1: molecular marker, Path 2: *TT* (425, 205 bp), Path 3: *Tt* (435, 225, 205, 200 bp), Path 4: *tt* (225, 205, 200 bp). Bsm: Path 1: molecular marker, Path 2: *BB* (348 bp), Path 3: *Bb* (348, 243, 105 bp), Path 4: *bb* (243, 105 bp). *Fok*: Path 1: *FF* (267 bp), Path 2: *ff* (198, 69 bp), Path 3: Ff (267, 198, 69 bp)–fragment of 69 bp not shown, Path 4: molecular marker.

4.4. VDR Serum Levels

Serum VDR levels were measured in two replicates using an ELISA kit (Biorbyt, UK). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 10.2.3 (GraphPad Software, Inc., Solana Beach, CA, USA). All kit components were stored at room temperature before use. The standard was reconstituted in 1.0 mL dilution buffer and shaken gently after 10 min to avoid foaming. Tubes containing 0.5 mL dilution buffer were used to dilute the standard solution, performing a double dilution series each time. The dilution points were 40 ng/mL, 20 ng/mL, 10 ng/mL, 5 ng/mL, 2.5 ng/mL, 0.625 ng/mL and blank 0 ng/mL. Reagents A and B were vortexed, centrifuged and diluted (1:100). The wash solution concentrate was diluted with distilled water (1:30). The samples were diluted (1:1) with PBS (pH = 7.1, 0.01 mol/L). All standard curve dilutions with blank and the analyzed samples were added to the plate with a volume of 100 µL and incubated at 37 °C for 2 h. The liquid was removed and 100 µL of the working solution of detection reagent A was added to each well. After a second 1 h incubation at 37 °C, the solution was aspirated and the plate was washed with 350 µL of wash solution (1 min). The liquid was removed and the plate was washed a total of 3 times. After the final third wash, the wash buffer was removed by decantating and blotted onto absorbent paper. The next step was the addition of 100 µL of Detection Reagent B to each well and the third incubation for 1 h at 37 °C. The aspiration and washing procedures were repeated 5 times with 350 µL of wash solution. After the last tapping against absorbent paper, 90 µL of substrate solution was added to each well and the plate was incubated at 37 °C for 15 min. Then, 50 µL of the stop solution was added to stop the reaction. The microplate was immediately illuminated with the Asys UVM-340 (Biochrome, Cambridge, UK) at 450 nm.

4.5. 25(OH)D Serum Levels

Serum levels of 25(OH)D were measured with an ELISA test in two repeats (Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel, Germany). Statistical analysis was performed with GraphPad

Prism. The standard curve of concentrations and two controls were prepared using the calibrators in the kit by reconstitution in 1 mL of distilled water. An amount of 25(OH)D conjugate concentrate was prepared at a dilution of 1:100. The HRP conjugate was prepared at a dilution of 1:200 approximately 2 h prior to use by mixing the following 3 reagents in the following order: conjugate buffer, concentrated buffer, vortex, concentrated HRP, vortex. The wash solution was diluted with water (1:200). An amount of 50 µL each of calibrator, control and sample were added to the appropriate wells together with 150 µL of the incubation buffer. The plate was incubated for 2 h at room temperature on a plate shaker (400 rpm). The liquid was aspirated, and the plate was washed 3 times with 350 µL of wash solution and aspirated each time. Then, 200 µL of working HRP conjugate solution was added into each well, and the plate was incubated for another 30 min at room temperature on a plate shaker (400 rpm). The liquid was aspirated and the plate was washed 3 times. The chromogenic solution was added at a volume of 100 µL. The plate was incubated for 15 min at room temperature on a plate shaker (400 rpm). After incubation, 100 µL of the stop solution was added into each well. The absorbance was measured at 450 nm with 650 nm reference immediately after addition of the stop solution.

4.6. Statistical Analysis

The relative association between allelic/genetic groups was assessed by calculating the odds ratios (ORs) and *p*-values in MedCalc "https://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php (accessed on 10 May 2024)". ORs, as a measure of relative risk with 95% confidence intervals (95% CI), were estimated with logistic regression models and used to compare the allele frequencies in all of the studied groups. The LD and complete haplotype analyses (genotype distribution, Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) and chi-square test) were performed in SHEsis online "http://shesisplus.bio-x.cn/SHEsis.html (accessed on 10 May 2024)". Vitamin 25(OH)D and VDR concentration results were presented as means ± standard deviations (SD) (GraphPad Software, Inc., CA, USA). The means of the tested and control groups were compared using ANOVA and a post hoc Tukey (HSD) test was applied with $p < 0.05$ (GraphPad Software, Inc., CA, USA). A Spearman's correlation test was performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., CA, USA).

5. Conclusions

In conclusion, this study indicates a possible genetic predisposition indicated by *VDR* polymorphisms associated with vitamin D deficiency in the etiology of prosthesis loosening. Our study found an association of *VDR* SNPs gene frequencies between the control group and the group of arthroscopy patients after THA and with THA but without prosthesis loosening. There was no association with VDR serum levels after surgery despite the differences in the occurrence of *VDR* genotypes, which may indicate that VDR serum levels may not be a good prognostic factor as they may vary according to the physiological state of the body.

Author Contributions: Conceptualization, A.C. and D.R.; methodology, D.R. and A.C.; software, D.R. and A.C.; validation, D.R. and A.C.; formal analysis, D.R., A.C. and E.F.; investigation, D.R., A.C. and E.F.; resources, R.G. and J.P.; data curation, D.R. and A.C.; writing—original draft preparation, A.C., D.R., J.P., E.F. and R.G.; writing—review and editing, A.C., D.R., J.P., E.F. and R.G.; visualization, D.R. and A.C.; supervision, J.P. and A.C.; project administration, A.C., D.R.; funding acquisition, A.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Local Bioethics Commissions (49/2019 and 139/2023).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Detailed information is available upon request from the corresponding author.

Acknowledgments: The authors sincerely thank all the patients who participated in this study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Knight, S.R.; Aujla, R.; Biswas, S.P. Total Hip Arthroplasty—Over 100 Years of Operative History. *Orthop. Rev.* **2011**, *3*, e16. [CrossRef]
2. Migliorini, F.; Maffulli, N.; Trivellas, M.; Eschweiler, J.; Hildebrand, F.; Betsch, M. Total Hip Arthroplasty Compared to Bipolar and Unipolar Hemiarthroplasty for Displaced Hip Fractures in the Elderly: A Bayesian Network Meta-Analysis. *Eur. J. Trauma Emerg. Surg.* **2022**, *48*, 2655–2666. [CrossRef] [PubMed]
3. Bhandari, M.; Einhorn, T.A.; Guyatt, G.; Schemitsch, E.H.; Zura, R.D.; Sprague, S.; Frihagen, F.; Guerra-Farfán, E.; Kleinlugtenbelt, Y.V.; et al.; HEALTH Investigators. Total Hip Arthroplasty or Hemiarthroplasty for Hip Fracture. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *381*, 2199–2208. [CrossRef] [PubMed]
4. Healy, W.L.; Iorio, R.; Clair, A.J.; Pellegrini, V.D.; Della Valle, C.J.; Berend, K.R. Complications of Total Hip Arthroplasty: Standardized List, Definitions, and Stratification Developed by The Hip Society. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2016**, *474*, 357–364. [CrossRef] [PubMed]
5. Sieczka, Ł.; Bohatyrewicz, A.; Pituch, S. Endoprotezy stawów biodrowych wczoraj i dziś. *Rheumatol. Forum* **2017**, *3*, 216–221.
6. Yang, Q.; Wang, J.; Xu, Y.; Chen, Y.; Lian, Q.; Zhang, Y. Incidence and Risk Factors of In-Hospital Prosthesis-Related Complications Following Total Hip Arthroplasty: A Retrospective Nationwide Inpatient Sample Database Study. *Int. Orthop.* **2020**, *44*, 2243–2252. [CrossRef] [PubMed]
7. Patel, I.; Nham, F.; Zalikha, A.K.; El-Othmani, M.M. Epidemiology of Total Hip Arthroplasty: Demographics, Comorbidities and Outcomes. *Arthroplasty* **2023**, *5*, 2. [CrossRef] [PubMed]
8. Page, R.S.; Pai, V.; Eng, K.; Bain, G.; Graves, S.; Lorimer, M. Cementless versus Cemented Glenoid Components in Conventional Total Shoulder Joint Arthroplasty: Analysis from the Australian Orthopaedic Association National Joint Replacement Registry. *J. Shoulder Elb. Surg.* **2018**, *27*, 1859–1865. [CrossRef]
9. Waris, V.; Waris, E.; Sillat, T.; Konttinen, Y.T. BMPs in Periprosthetic Tissues around Aseptically Loosened Total Hip Implants. *Acta Orthop.* **2010**, *81*, 420–426. [CrossRef]
10. Emara, A.K.; Nageeb, E.; George, J.; Buttaro, M.A.; Higuera, C.; Piuzzi, N.S. Hypovitaminosis D in Lower Extremity Joint Arthroplasty: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Orthop.* **2020**, *21*, 109–116. [CrossRef]
11. Kenanidis, E.; Kakoulidis, P.; Karponis, D.; Tsiridis, E. The Effect of Perioperative Vitamin D Levels on the Functional, Patient-Related Outcome Measures and the Risk of Infection Following Hip and Knee Arthroplasty: A Systematic Review. *Patient Relat. Outcome Meas.* **2020**, *11*, 161–171. [CrossRef] [PubMed]
12. Shirazi, S.; Ravindran, S.; Cooper, L.F. Topography-Mediated Immunomodulation in Osseointegration; Ally or Enemy. *Biomaterials* **2022**, *291*, 121903. [CrossRef] [PubMed]
13. Aghaloo, T.; Pi-Anfruns, J.; Moshaverinia, A.; Sim, D.; Grogan, T.; Hadaya, D. The Effects of Systemic Diseases and Medications on Implant Osseointegration: A Systematic Review. *Int. J. Oral Maxillofac. Implant.* **2019**, *34*, s35–s49. [CrossRef] [PubMed]
14. Holick, M.F. Resurrection of Vitamin D Deficiency and Rickets. *J. Clin. Investig.* **2006**, *116*, 2062–2072. [CrossRef] [PubMed]
15. Fleet, J.C. The Role of Vitamin D in the Endocrinology Controlling Calcium Homeostasis. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2017**, *453*, 36–45. [CrossRef] [PubMed]
16. Plominski, J.; Grzybowski, R.; Fiedorowicz, E.; Sienkiewicz-Szlapka, E.; Rozmus, D.; Krol-Grzymala, A.; Jarmolowska, B.; Kordulewska, N.; Cieslinska, A. Vitamin D Metabolic Pathway Components in Orthopedic Patientes—Systematic Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 15556. [CrossRef] [PubMed]
17. Zmijewski, M.A.; Carlberg, C. Vitamin D Receptor(s): In the Nucleus but Also at Membranes? *Exp. Dermatol.* **2020**, *29*, 876–884. [CrossRef]
18. Feldman, D.; Krishnan, A.V.; Swami, S.; Giovannucci, E.; Feldman, B.J. The Role of Vitamin D in Reducing Cancer Risk and Progression. *Nat. Rev. Cancer* **2014**, *14*, 342–357. [CrossRef] [PubMed]
19. Slominski, A.T.; Tuckey, R.C.; Jenkinson, C.; Li, W.; Jetten, A.M. Chapter 6—Alternative Pathways for Vitamin D Metabolism. In *Feldman and Pike's Vitamin D*, 5th ed.; Hewison, M., Bouillon, R., Giovannucci, E., Goltzman, D., Meyer, M., Welsh, J., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2024; pp. 85–109. ISBN 978-0-323-91386-7.
20. Holick, M.F.; Slominski, A.T. Chapter 3—Photobiology of Vitamin D. In *Feldman and Pike's Vitamin D*, 5th ed.; Hewison, M., Bouillon, R., Giovannucci, E., Goltzman, D., Meyer, M., Welsh, J., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2024; pp. 27–45. ISBN 978-0-323-91386-7.
21. Slominski, R.M.; Raman, C.; Elmets, C.; Jetten, A.M.; Slominski, A.T.; Tuckey, R.C. The Significance of CYP11A1 Expression in Skin Physiology and Pathology. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2021**, *530*, 111238. [CrossRef]
22. Patton, C.M.; Powell, A.P.; Patel, A.A. Vitamin D in Orthopaedics. *JAAOS J. Am. Acad. Orthop. Surg.* **2012**, *20*, 123–129. [CrossRef]
23. Lappe, J.M.; Travers-Gustafson, D.; Davies, K.M.; Recker, R.R.; Heaney, R.P. Vitamin D and Calcium Supplementation Reduces Cancer Risk: Results of a Randomized Trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **2007**, *85*, 1586–1591. [CrossRef] [PubMed]
24. Garland, C.F.; Garland, F.C.; Gorham, E.D.; Lipkin, M.; Newmark, H.; Mohr, S.B.; Holick, M.F. The Role of Vitamin D in Cancer Prevention. *Am. J. Public Health* **2006**, *96*, 252–261. [CrossRef] [PubMed]

25. Liu, P.T.; Stenger, S.; Li, H.; Wenzel, L.; Tan, B.H.; Krutzik, S.R.; Ochoa, M.T.; Schauber, J.; Wu, K.; Meinken, C.; et al. Toll-like Receptor Triggering of a Vitamin D-Mediated Human Antimicrobial Response. *Science* **2006**, *311*, 1770–1773. [CrossRef]
26. Holick, M.F. The Vitamin D Epidemic and Its Health Consequences. *J. Nutr.* **2005**, *135*, 2739S–2748S. [CrossRef] [PubMed]
27. Kato, S. The Function of Vitamin D Receptor in Vitamin D Action. *J. Biochem.* **2000**, *127*, 717–722. [CrossRef] [PubMed]
28. Wang, Y.; Zhu, J.; DeLuca, H.F. Where Is the Vitamin D Receptor? *Arch. Biochem. Biophys.* **2012**, *523*, 123–133. [CrossRef]
29. Dong, J.; Zhou, Q.; Wang, J.; Lu, Y.; Li, J.; Wang, L.; Wang, L.; Meng, P.; Li, F.; Zhou, H.; et al. Association between Variants in Vitamin D-Binding Protein Gene and Vitamin D Deficiency among Pregnant Women in China. *J. Clin. Lab. Anal.* **2020**, *34*, e23376. [CrossRef] [PubMed]
30. Slominski, A.T.; Kim, T.-K.; Janjetovic, Z.; Slominski, R.M.; Li, W.; Jetten, A.M.; Indra, A.K.; Mason, R.S.; Tuckey, R.C. Biological Effects of CYP11A1-Derived Vitamin D and Lumisterol Metabolites in the Skin. *J. Investig. Dermatol.* **2024**. [CrossRef] [PubMed]
31. Slominski, A.T.; Kim, T.-K.; Slominski, R.M.; Song, Y.; Janjetovic, Z.; Podgorska, E.; Reddy, S.B.; Song, Y.; Raman, C.; Tang, E.K.Y.; et al. Metabolic Activation of Tachysterol$_3$ to Biologically Active Hydroxyderivatives That Act on VDR, AhR, LXRs, and PPARγ Receptors. *FASEB J.* **2022**, *36*, e22451. [CrossRef]
32. VDR Vitamin D Receptor [*Homo sapiens* (Human)]—Gene—NCBI. Available online: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=7421 (accessed on 8 November 2020).
33. Latacz, M.; Rozmus, D.; Fiedorowicz, E.; Snarska, J.; Jarmołowska, B.; Kordulewska, N.; Savelkoul, H.; Cieślińska, A. Vitamin D Receptor (VDR) Gene Polymorphism in Patients Diagnosed with Colorectal Cancer. *Nutrients* **2021**, *13*, 200. [CrossRef]
34. Uitterlinden, A.G.; Fang, Y.; Bergink, A.P.; van Meurs, J.B.J.; van Leeuwen, H.P.T.M.; Pols, H.A.P. The Role of Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms in Bone Biology. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2002**, *197*, 15–21. [CrossRef]
35. Li, S.-S.; Gao, L.-H.; Zhang, X.-Y.; He, J.-W.; Fu, W.-Z.; Liu, Y.-J.; Hu, Y.-Q.; Zhang, Z.-L. Genetically Low Vitamin D Levels, Bone Mineral Density, and Bone Metabolism Markers: A Mendelian Randomisation Study. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 33202. [CrossRef] [PubMed]
36. Jiang, L.L.; Zhang, C.; Zhang, Y.; Ma, F.; Guan, Y. Associations between Polymorphisms in *VDR* Gene and the Risk of Osteoporosis: A Meta-Analysis. *Arch. Physiol. Biochem.* **2022**, *128*, 1637–1644. [CrossRef] [PubMed]
37. Zendehdel, A.; Arefi, M. Molecular Evidence of Role of Vitamin D Deficiency in Various Extraskeletal Diseases. *J. Cell. Biochem.* **2019**, *120*, 8829–8840. [CrossRef]
38. Krasniqi, E.; Boshnjaku, A.; Wagner, K.-H.; Wessner, B. Association between Polymorphisms in Vitamin D Pathway-Related Genes, Vitamin D Status, Muscle Mass and Function: A Systematic Review. *Nutrients* **2021**, *13*, 3109. [CrossRef] [PubMed]
39. Waples, R.S. Practical Application of the Linkage Disequilibrium Method for Estimating Contemporary Effective Population Size: A Review. *Mol. Ecol. Resour.* **2024**, *24*, e13879. [CrossRef] [PubMed]
40. Ahmed, R.R.; Mostafa, A.O.; Saleh, E.M.; Nasr, H.; Effat, L. Study of Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms in Egyptian Patients with Primary Osteoporosis. *Egypt. J. Pure Appl. Sci.* **2015**, *53*, 1–11. [CrossRef]
41. Bottai, V.; Dell'Osso, G.; Celli, F.; Bugelli, G.; Cazzella, N.; Cei, E.; Guido, G.; Giannotti, S. Total Hip Replacement in Osteoarthritis: The Role of Bone Metabolism and Its Complications. *Clin. Cases Miner. Bone Metab.* **2015**, *12*, 247–250. [CrossRef] [PubMed]
42. Russell, L.A. Osteoporosis and Orthopedic Surgery: Effect of Bone Health on Total Joint Arthroplasty Outcome. *Curr. Rheumatol. Rep.* **2013**, *15*, 371. [CrossRef]
43. Nawabi, D.H.; Chin, K.F.; Keen, R.W.; Haddad, F.S. Vitamin D Deficiency in Patients with Osteoarthritis Undergoing Total Hip Replacement: A CAUSE FOR CONCERN? *J. Bone Jt. Surg. Br. Vol.* **2010**, *92*, 496–499. [CrossRef]
44. Berg, J.P.; Falch, J.A.; Haug, E. Fracture Rate, Pre- and Postmenopausal Bone Mass and Early and Late Postmenopausal Bone Loss Are Not Associated with Vitamin D Receptor Genotype in a High-Endemic Area of Osteoporosis. *Eur. J. Endocrinol.* **1996**, *135*, 96–100. [CrossRef] [PubMed]
45. Yadav, U.; Kumar, P.; Rai, V. Vitamin D Receptor (VDR) Gene FokI, BsmI, ApaI, and TaqI Polymorphisms and Osteoporosis Risk: A Meta-Analysis. *Egypt. J. Med. Hum. Genet.* **2020**, *21*, 15. [CrossRef]
46. Nguyen, T.V.; Esteban, L.M.; White, C.P.; Grant, S.F.; Center, J.R.; Gardiner, E.M.; Eisman, J.A. Contribution of the Collagen I α1 and Vitamin D Receptor Genes to the Risk of Hip Fracture in Elderly Women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2005**, *90*, 6575–6579. [CrossRef] [PubMed]
47. Horst-Sikorska, W.; Wawrzyniak, A.; Celczyńska-Bajew, L.; Marcinkowska, M.; Dabrowski, S.; Kalak, R.; Słomski, R. Polymorphism of VDR Gene--the Most Effective Molecular Marker of Osteoporotic Bone Fractures Risk within Postmenopausal Women from Wielkopolska Region of Poland. *Endokrynol. Pol.* **2005**, *56*, 233–239. [PubMed]
48. Uysal, A.R.; Sahin, M.; Gürsoy, A.; Güllü, S. Vitamin D Receptor Gene Polymorphism and Osteoporosis in the Turkish Population. *Genet. Test.* **2008**, *12*, 591–594. [CrossRef] [PubMed]
49. Wu, J.; Shang, D.-P.; Yang, S.; Fu, D.-P.; Ling, H.-Y.; Hou, S.-S.; Lu, J.-M. Association between the Vitamin D Receptor Gene Polymorphism and Osteoporosis. *Biomed. Rep.* **2016**, *5*, 233–236. [CrossRef] [PubMed]
50. Bell, N.H.; Morrison, N.A.; Nguyen, T.V.; Eisman, J.; Hollis, B.W. *Apa* I Polymorphisms of the Vitamin D Receptor Predict Bone Density of the Lumbar Spine and Not Racial Difference in Bone Density in Young Men. *J. Lab. Clin. Med.* **2001**, *137*, 133–140. [CrossRef] [PubMed]
51. Dundar, U.; Solak, M.; Kavuncu, V.; Ozdemir, M.; Cakir, T.; Yildiz, H.; Evcik, D. Evidence of Association of Vitamin D Receptor *Apa* I Gene Polymorphism with Bone Mineral Density in Postmenopausal Women with Osteoporosis. *Clin. Rheumatol.* **2009**, *28*, 1187–1191. [CrossRef] [PubMed]

52. Zambrano-Morales, M.; Borjas, L.; Fernández, E.; Zabala, W.; de Romero, P.; Pineda, L.; Morales-Machín, A. Association of the vitamin D receptor gene BBAAtt haplotype with osteoporosis in post-menopausic women. *Investig. Clin.* **2008**, *49*, 29–38.
53. Quevedo, L.I.; Martínez, B.M.; Castillo, N.M.; Rivera, F.N. Vitamin D receptor gene polymorphisms and risk of hip fracture in Chilean elderly women. *Rev. Med. Chil.* **2008**, *136*, 475–481.
54. Riggs, L.B.; Nguyen, T.V.; Melton, J.L., III; Morrison, N.A.; O'Fallon, W.M.; Kelly, P.J.; Egan, K.S.; Sambrook, P.N.; Muhs, J.M.; Eisman, J.A. The Contribution of Vitamin D Receptor Gene Alleles to the Determination of Bone Mineral Density in Normal and Osteoporotic Women. *J. Bone Miner. Res.* **1995**, *10*, 991–996. [CrossRef] [PubMed]
55. Houston, L.A.; Grant, S.F.A.; Reid, D.M.; Ralston, S.H. Vitamin D Receptor Polymorphism, Bone Mineral Density, and Osteoporotic Vertebral Fracture: Studies in a UK Population. *Bone* **1996**, *18*, 249–252. [CrossRef] [PubMed]
56. Vandevyver, C.; Wylin, T.; Cassiman, J.; Raus, J.; Geusens, P. Influence of the Vitamin D Receptor Gene Alleles on Bone Mineral Density in Postmenopausal and Osteoporotic Women. *J. Bone Miner. Res.* **1997**, *12*, 241–247. [CrossRef] [PubMed]
57. Langdahl, B.L.; Gravholt, C.H.; Brixen, K.; Eriksen, E.F. Polymorphisms in the Vitamin D Receptor Gene and Bone Mass, Bone Turnover and Osteoporotic Fractures. *Eur. J. Clin. Investig.* **2000**, *30*, 608–617. [CrossRef] [PubMed]
58. Zajíčková, K.; Žofková, I.; Bahbouh, R.; Křepelová, A. Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms, Bone Mineral Density and Bone Turnover: FokI Genotype Is Related to Postmenopausal Bone Mass. *Physiol. Res.* **2002**, *51*, 501–509. [CrossRef] [PubMed]
59. González-Mercado, A.; Sánchez-López, J.Y.; Regla-Nava, J.A.; Gámez-Nava, J.I.; González-López, L.; Duran-Gonzalez, J.; Celis, A.; Perea-Díaz, F.J.; Salazar-Páramo, M.; Ibarra, B. Association Analysis of Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms and Bone Mineral Density in Postmenopausal Mexican-Mestizo Women. *Genet. Mol. Res.* **2013**, *12*, 2755–2763. [CrossRef] [PubMed]
60. Shah, I.; Akhtar, M.K.; Hisaindee, S.; Rauf, M.A.; Sadig, M.; Ashraf, S.S. Clinical Diagnostic Tools for Vitamin D Assessment. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2018**, *180*, 105–117. [CrossRef] [PubMed]
61. Tsuprykov, O.; Chen, X.; Hocher, C.-F.; Skoblo, R.; Yin, L.H.; Hocher, B. Why Should We Measure Free 25(OH) Vitamin D? *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2018**, *180*, 87–104. [CrossRef] [PubMed]
62. Mirhosseini, N.; Rainsbury, J.; Kimball, S.M. Vitamin D Supplementation, Serum 25(OH)D Concentrations and Cardiovascular Disease Risk Factors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Cardiovasc. Med.* **2018**, *5*, 87. [CrossRef]
63. Autier, P.; Boniol, M.; Pizot, C.; Mullie, P. Vitamin D Status and Ill Health: A Systematic Review. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **2014**, *2*, 76–89. [CrossRef]
64. Basit, S. Vitamin D in Health and Disease: A Literature Review. *Br. J. Biomed. Sci.* **2013**, *70*, 161–172. [CrossRef] [PubMed]
65. Ogunkolade, B.-W.; Boucher, B.J.; Prahl, J.M.; Bustin, S.A.; Burrin, J.M.; Noonan, K.; North, B.V.; Mannan, N.; McDermott, M.F.; DeLuca, H.F.; et al. Vitamin D Receptor (VDR) mRNA and VDR Protein Levels in Relation to Vitamin D Status, Insulin Secretory Capacity, and VDR Genotype in Bangladeshi Asians. *Diabetes* **2002**, *51*, 2294–2300. [CrossRef] [PubMed]
66. Agliardi, C.; Guerini, F.R.; Saresella, M.; Caputo, D.; Leone, M.A.; Zanzottera, M.; Bolognesi, E.; Marventano, I.; Barizzone, N.; Fasano, M.E.; et al. Vitamin D Receptor (VDR) Gene SNPs Influence VDR Expression and Modulate Protection from Multiple Sclerosis in HLA-DRB1*15-Positive Individuals. *Brain Behav. Immun.* **2011**, *25*, 1460–1467. [CrossRef] [PubMed]
67. Nakamichi, Y.; Udagawa, N.; Suda, T.; Takahashi, N. Mechanisms Involved in Bone Resorption Regulated by Vitamin D. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2018**, *177*, 70–76. [CrossRef] [PubMed]
68. Verlinden, L.; Janssens, I.; Doms, S.; Vanhevel, J.; Carmeliet, G.; Verstuyf, A. Vdr Expression in Osteoclast Precursors Is Not Critical in Bone Homeostasis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2019**, *195*, 105478. [CrossRef]
69. Cieślińska, A.; Kostyra, E.; Fiedorowicz, E.; Snarska, J.; Kordulewska, N.; Kiper, K.; Savelkoul, H.F.J. Single Nucleotide Polymorphisms in the Vitamin D Receptor Gene (VDR) May Have an Impact on Acute Pancreatitis (AP) Development: A Prospective Study in Populations of AP Patients and Alcohol-Abuse Controls. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1919. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

nutrients

MDPI

Article

Vitamin D Binding Protein Gene Polymorphisms (rs4588 and rs7041) and VDBP Levels in Total Hip Replacement Outcomes

Dominika Rozmus [1,*], Ewa Fiedorowicz [1], Janusz Płomiński [2] and Anna Cieślińska [1]

[1] Department of Biochemistry, Faculty of Biology and Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, 10-719 Olsztyn, Poland; ewa.kuzbida@uwm.edu.pl (E.F.); anna.cieslinska@uwm.edu.pl (A.C.)
[2] Orthopaedic and Trauma Teaching Hospital, 05-400 Otwock, Poland; plominsky@poczta.onet.pl
* Correspondence: dominika.rozmus@uwm.edu.pl

Abstract: Background: Total hip replacement (THR) significantly improves patients' quality of life; however, prosthesis loosening remains a significant complication. Vitamin D, essential for calcium homeostasis and bone mineralization, is transported and stabilized by vitamin D binding protein (VDBP). Common single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the VDBP gene, rs4588 and rs7041, may influence serum vitamin D levels and potentially impact THR outcomes. This study aimed to analyze the association between these SNPs, serum levels of VDBP and 25(OH)D, and their potential roles in THR outcomes. **Methods:** The study included three patient groups: (1) patients undergoing arthroscopy after a THR without prosthesis loosening (CA—Control Arthroplasty), (2) patients with hip prosthesis loosening (L—Loosening), and (3) a control group (C—Control). Genotyping of rs4588 and rs7041 in the VDBP gene was conducted using PCR-RFLP and TaqMan Genotyping real-time PCR. Serum levels of VDBP and 25(OH)D were measured using ELISA. Comparisons between groups were performed using statistical analyses, including odds ratios (OR) and significance testing (p-values). **Results:** There are significant differences in VDBP concentrations between the groups: L vs. CA ($p < 0.0001$), L vs. C ($p = 0.0118$), L vs. L + CA ($p = 0.0013$), CA vs. C ($p < 0.0001$), and CA vs. L + CA ($p < 0.0001$), and in 25(OH)D concentrations between groups: L vs. C ($p < 0.0001$), CA vs. C ($p = 0.0008$), and C vs. L + CA ($p < 0.0001$). **Conclusions:** The study findings suggest a protective role of 25(OH)D against prosthesis loosening in THR. The rs4588 SNP in the VDBP gene may increase the risk of loosening, while differences in VDBP and 25(OH)D concentrations between patient groups highlight their potential importance in THR outcomes.

Keywords: vitamin D binding protein; vitamin D; 25(OH)D; rs7041; rs4588; total hip replacement; nutrigenomics

Academic Editor: Maurizio Cutolo

Received: 18 December 2024
Revised: 17 January 2025
Accepted: 17 January 2025
Published: 21 January 2025

Citation: Rozmus, D.; Fiedorowicz, E.; Płomiński, J.; Cieślińska, A. Vitamin D Binding Protein Gene Polymorphisms (rs4588 and rs7041) and VDBP Levels in Total Hip Replacement Outcomes. *Nutrients* **2025**, *17*, 378. https://doi.org/10.3390/nu17030378

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Total hip replacement (THR)/Total Hip Arthroplasty (THA) is a standard procedure for the treatment of end-stage hip osteoarthritis, providing pain relief and improved joint function. The available statistical data show that the main causes of prosthesis loosening are inflammation: septic (7.5%), aseptic (55.2%), and dislocations and broken prostheses (18.8%)—this group also includes surgical errors that constitute 3.8% and events not mentioned in the statistics [1,2]. In the case of failed THRs, revision total hip replacement is a salvage procedure with increased surgical risks, including sepsis, infection of the

prosthetic joint, prolonged operative time and anesthetic exposure, increased blood loss, higher treatment costs, and longer hospital stay [3].

According to the statistics, Switzerland is the country with the highest number of THRs performed (322.6 procedures on 100,000 citizens). In the range of 250–300 procedures per 100,000 citizens are performed also in Germany, Austria, Finland, Belgium, Norway, and the Netherlands. In the range of 200–249 are performed in France, Denmark, Iceland, Iceland, Sweden, and Luxembourg. A total of 183.1 procedures have been formed in Poland, while Canada has performed 152.7, Israel 73, Korea 64.2, and Mexico 6.9 per 100,000 citizens, presenting the lowest number of surgeries "www.statista.com (accessed on 3 January 2025)" [4]. According to the American Association of Hip and Knee Surgeons, the data suggest that hip replacements have an annual failure rate in the range of 0.5–1.0% [5].

The data indicate that, in Poland in 2024, 64,140 total hip replacements were performed, and these accounted for 57.4% of all endoprosthetic procedures. Primary THRs constituted 92.6% of all THRs, while revision THRs—7.4% [6].

The Swedish arthroplasty register showed that, in 2022, 20,568 primary hip replacements were registered [7]. The national report of Norway states 9396 primary operations, 112 reoperations, and 1172 revisions in 2021, which presents a total of total 10,680 surgeries [8]. The report from the UK shows 108,558 primary THRs and 6659 revision THRs were performed in 2023 [9].

The role of vitamin D, an important element of the endocrine system, in bone health is well documented. In addition, one of the problems associated with vitamin D metabolism is the loosening of hip prostheses [10], which is best defined as migration caused by poor locking, poor bone quality, or premature bone resorption [11]. The action of vitamin D (VD) influences the proper function of many organs in the body [12], and the best known role of its active form (1,25-dihydroxyvitamin D; 1,25$(OH)_2$D) is the regulation of calcium and phosphorus metabolism, and the maintenance of the proper condition of the skeletal system [13,14].

Vitamin D circulating in the human body requires a transporter, a serum alpha2-globulin called the vitamin D binding protein (*VDBP*) [15,16], or originally a "group specific component"—Gc [17]. The *VDBP* is produced in the liver by hepatic parenchymal cells [18] under the control of estrogen, glucocorticoids, and inflammatory cytokines, but not vitamin D itself [19]. Animal studies suggest that the *VDBP* prevents the degradation of 25(OH)D, which prolongs 25(OH)D half-life, and has a protective effect against vitamin D deficiency [20].

Vitamin D can enter the human body in two ways: it can be supplied by food [21] (vitamin D_2 or D_3 [22]) and absorbed via the intestine [21] or it can be produced in the skin (vitamin D_3) during sun exposure under UVB radiation [23] (a wavelength of 290–315 nm [24], with the optimal peak at 295 nm) from 7-DHC [25]. These forms must be hydroxylated in the two most important organs, the liver and the kidneys, in order to become active. Therefore, they are transported by the *VDBP* to each of the organs where the inactive form is metabolized (hydroxylated) [24]. The first organ to metabolize vitamin D is the liver, where vitamin D is hydroxylated to 25(OH)D by CYP2R1 (25-hydroxylase). Subsequently, 25(OH)D is transported to the *VDBP* to other tissues, such as the kidney, where it is metabolized to 1,25$(OH)_2$D by another enzyme—CYP27B1 (1-α-hydroxylase) [19]. There are also other enzymes involved in hydroxylation processes, such as the enzyme CYP11A1, which leads to the formation of vitamin D hydroxymetabolites that better protect the skin from DNA damage and oxidative stress. These metabolites promote keratinocyte differentiation; have anti-inflammatory, anti-fibrogenic, and anti-cancer properties; and inhibit cell proliferation in a structure-dependent manner [26,27].

The metabolic pathway of vitamin D is shown in Figure 1. All VD metabolites are transported by the VDPB to the target tissues, where the effect of VD is mediated by the VDR (Vitamin D Receptor), a nuclear receptor found in every cell of the body [18].

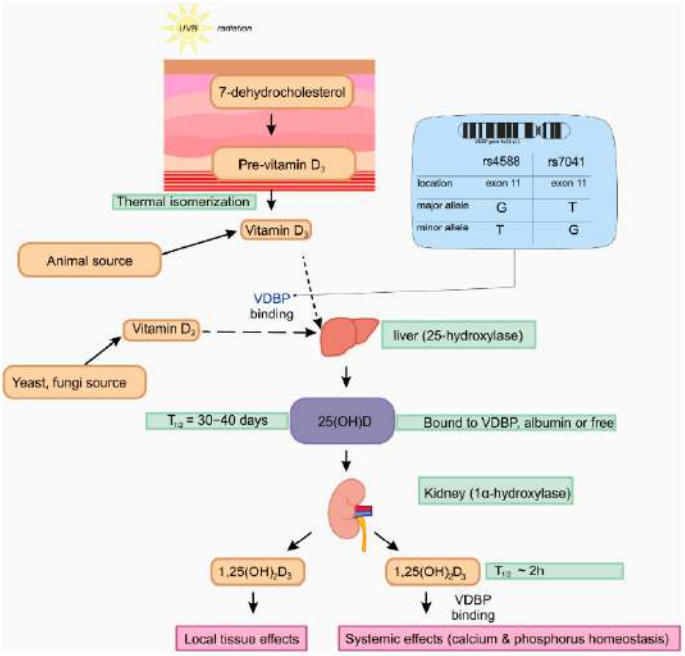


Figure 1. Metabolic pathway of vitamin D. Figure was made with SciPaitner beta; "www.sci-painter.com (accesed on 20 January 2025)".

We previously examined the association of the VDR in prostheses loosening [28] among Total Hip Arthroplasty (THA)/THR patients, and the findings prompted us to expand our research to other factors concerning the metabolic pathway of vitamin D, like the vitamin D binding and transporter protein, which also might have an influence on prostheses loosening.

The *VDBP* gene is a 35 kb DNA consisting of 13 exons and 12 introns located on the long arm of chromosome 4 (4q12-q13) [29]. The *VDBP* is also known to bind extracellular actin and facilitate the transport of fatty acids. Additionally, it seems to safeguard the complement factor C5a from proteolytic degradation, thereby enhancing its function as a chemotactic protein [30]. The *VDBP* has a single binding site for all vitamin D metabolites, forming a large circulating pool of 25(OH)D that helps prevent the rapid onset of vitamin D deficiency [31]. The vitamin D binding properties of the *VDBP*, combined with its potential direct effects on bone resorption, have gained significant scientific interest regarding its role in bone metabolism and health. This interest is increased further by the discovery of notable interindividual variations in *VDBP* levels. The research findings suggest a connection between these variations and differences in bone density [32].

Rs7041 and rs4588 single nucleotide polymorphisms (SNPs) are located in exon 11 of the *VDBP* gene [33] and generate three major isoforms of the *VDBP*, including GC-1F, also known as a wild type, GC1S, and GC-2 [34] (Figure 1). These haplotypes are known to regulate the concentration of the *VDBP*, its affinity for 25 OH vitamin D, and thereby affect the levels of free vitamin D [35].

It has been found that rs4588 and rs7041 are associated with many diseases, such as tuberculosis, diabetes mellitus, obesity, chronic obstructive pulmonary disease, and others [36]. According to the NCBI frequency information, in rs4588 (G > T) among the European population, the most common allele is G (72%) [37], and in rs7041 (T > G) it is G (53%) [38].

The genetic variability in the *VDBP* gene and the role of vitamin D in bone remodeling raise the question of whether individual differences can influence the risk of hip prosthesis loosening. This study is of crucial importance in the context of hip replacement, as vitamin D deficiency as well as THRs are particularly common in older populations. The aim of this study is therefore to investigate the relationship between *VDBP* polymorphisms (rs4588 and rs7041), serum *VDBP* protein, and 25(OH)D levels in three groups of patients: (1) a group of arthroscopy patients after receiving THRs without prosthesis loosening, (2) patients after receiving THRs with a loosened hip prosthesis, and (3) the control group (healthy subjects).

This study's objective was to investigate the relationship between the two most-common single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the vitamin D binding protein (*VDBP*) gene (rs4588 and rs7041), the serum levels of *VDBP* and 25(OH)D, and their potential roles in prosthesis loosening following a total hip replacement (THR) in a case–control study. This study aims to explore whether these genetic and biochemical factors contribute to prosthesis stability and patient outcomes.

We hypothesize that genetic variations in the *VDBP* gene (rs4588 and rs7041) and differences in the serum levels of *VDBP* and 25(OH)D are associated with an increased risk of prosthesis loosening after a THR. Specifically, lower 25(OH)D levels and specific *VDBP* SNPs may influence the likelihood of this complication.

2. Materials and Methods

2.1. Characteristic of Patients and Control Groups

2.1.1. Recruitment and Sample Collection

Patients were recruited for this case–control study between 2019 and 2024, and the samples were collected each year between November and March at the Voivodal Specialistic Hospital in Olsztyn, Poland, and the Gruca Orthopaedic and Trauma Teaching Hospital in Otwock, Poland. All the required data were collected from patients as medical records and/or a completed questionnaire. All participants provided informed consent for the study, which was in accordance with the ethical standards of the Declaration of Helsinki. This research was certified by the Bioethics Commissions (49/2019 and 139/2023).

The patients were divided into three groups: (1) a group of patients with a hip replacement in whom the transplant was rejected (L—Loosening); (2) a group of patients with a hip replacement in whom the transplant was functioning correctly and there was no loosening (CA—Control Arthroplasty); and (3) a group of healthy volunteers (C—Control). The study sample was carefully selected to focus on patients with specific characteristics of prosthetic loosening, ensuring homogeneity. The characteristics of groups, including age and gender, are shown in Table 1.

Table 1. Characteristics of groups.

Characteristics	L (*n* = 112)	CA (*n* = 87)	C (*n* = 249)	*p*-value (L vs. CA; L vs. C; CA vs. C)
Age: years mean (SD)	53.57 (12.37)	48.77 (14.52)	44.53 (13.23)	0.0156/<0.0001/0.344 *
Gender: n (%)				
Female:	50 (45)	25 (29)	122 (49)	
Male:	62 (55)	62 (71)	127 (51)	
		χ^2 (2, 448) = 10.7693		0.0046

* non parametric Anova: Kruskal-Wallis.

This case–control study followed the STROBE guidelines.

2.1.2. Exclusion and Inclusion Criteria

Rigorous inclusion and exclusion criteria, based on clinical and radiographic assessments, were applied to maintain the integrity of the findings. In groups L and CA, the diagnosis was confirmed through clinical examinations and radiographs, and both groups had cementless prostheses. The primary symptoms of loosening included pain in the lower limb during weight bearing, pain in the groin or thigh, new popping or clicking sounds, joint instability, and the dislocation or subluxation (partial dislocation) of the joint. These symptoms appeared 3 to 12 years after the initial prosthetic surgery. Loosening was diagnosed based on specific radiographic criteria, including periprosthetic radiolucent lines wider than 2 mm or prosthetic migration greater than 4 mm. Exclusion criteria were patients with a fistula, those who experienced surgical errors, and those who did not meet the time criteria. Patients with a BMI over 35 were also excluded. Additionally, individuals with osteoporosis and rheumatic diseases were not included, as these conditions affect prosthesis survival. Therefore, patients with loosening due to fractures were not part of this study.

Inclusion criteria for control group: healthy subjects with no orthopedic medical history. The flowchart of the patients' enrollment is presented in Figure 2.

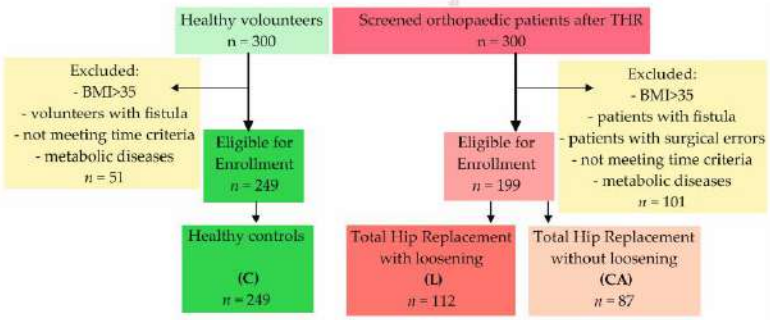


Figure 2. Flowchart of patient and volunteer enrollment.

2.2. Biological Material Collection

Approximately 5 mL of peripheral blood and 5 mL of serum were collected from each participant in the seasons of late autumn and winter (November–March) in the years 2019–2023. Blood collection took place during a follow-up visit, during which prosthesis component loosening was confirmed based on clinical and radiological examinations. The samples were immediately transported to the laboratory, where they were either analyzed directly or stored at −80 °C for future use. DNA was extracted and purified using the Blood Mini DNA Isolation Kit and Sherlock AX (A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland). The extracted DNA was diluted to a concentration of 20 ng/µL in preparation for genetic analysis and stored at −20 °C until further processing. Serum, which, due to its condition, was not suitable for testing, was rejected.

2.3. Concentration Assessment and Calculation

25(OH)D and the *VDBP* were assessed using ELISA assays, and the data were calculated and used as continuous variables in the statistical analysis.

2.3.1. 25(OH)D Serum Concentration

Serum levels of 25(OH)D were determined using an ELISA assay (n = 199), performed in two runs, with a kit from Demeditec Diagnostics GmbH (Kiel, Germany). Statistical analysis was conducted using GraphPad Prism software. A standard curve was generated, and two controls were prepared by reconstituting the kit's calibrators in 1 mL of distilled water. A 25(OH)D conjugate concentrate was diluted at a ratio of 1:100. The HRP conjugate was diluted at 1:200 and prepared approximately 2 h before use by combining the following reagents in order: conjugate buffer, concentrated buffer, vortexing, then adding concentrated HRP, and vortexing again. The wash solution was diluted with water at 1:200. In each appropriate well, 50 µL of the calibrator, control, and sample were added along with 150 µL of incubation buffer. The plate was then incubated for 2 h at room temperature on a plate shaker at 400 rpm. Following incubation, the liquid was aspirated, and the plate was washed three times with 350 µL of wash solution, with aspiration after each wash. Next, 200 µL of the working HRP conjugate solution was added to each well, and the plate was incubated again for 30 min at room temperature on the plate shaker (400 rpm). After this, the liquid was aspirated, and the plate was washed three more times. A chromogenic solution (100 µL) was added to each well, and the plate was incubated for 15 min at room temperature on the shaker at 400 rpm. Finally, 100 µL of stop solution was added to each well, and the absorbance was read at 450 nm with a 650 nm reference immediately after the addition of the stop solution.

2.3.2. Vitamin D Binding Protein Concentration

The *VDBP* was measured (n = 284) using an ELISA assay: "Human Gc/*VDBP*" (Cat. No E1810h, EIAab Science Co., Wuhan, China). The procedure followed the manual added to the kit: standard curves were made by reconstituting the standards with 1 mL of sample diluent (7000 pg/mL) and making seven serial dilutions. The sample diluent served also as a zero standard (0 pg/mL). Reagents A and B were diluted to working concentrations of 1:100 with diluents A and B, respectively. Before pipetting, the reagents were mixed thoroughly. A total of 100 µL of standards, blanks, and samples was added to each well and covered with the plate sealer for the whole incubation time. Samples were incubated for 2 h at 37 °C. Detection reagent A working solutions of 100 µL were added to each well and covered with a plate sealer. The samples were incubated for another 1 h at 37 °C. Wells were aspirated and washed for a total of three times with washing buffer diluted with distilled water. After washing and the aspirating process, 100 µL of detection reagent B was added and covered with a plate sealer, and the samples were incubated for another 1 h at 37 °C. After incubation, the aspiration and washing processes were repeated. The substrate working solution in the amount of 100 µL was added to each well. After 20 min, the reaction was stopped using the stop solution and absorbance was measured at 450 nm with Asys UVM-340 (Biochrome, Cambridge, UK). Samples whose results were too high compared to the standard absorbance curve were measured again with the same kit in duplicates after dilution twice with the sample diluent. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 10.2.3 (GraphPad Software, Inc., Solana Beach, CA, USA).

2.4. Genotyping

2.4.1. *rs7041*

The mixture for amplification at a volume of 17.5 μL consisted of the DreamTaq™ Green Master Mix (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA); specific primers (F: 5-ctggcagagcgactaaaagc-3; R: 5-ccaggaaaagcctgtcacat-3; Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA) based on the studies of Harsini [39] and Wang [40], with their own modifications made using the online primer design tool (Primer3Plus, version: 3.3.0); and the DNA matrix and nuclease-free water (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) in the Mastercycler Nexus (Eppendorf, Hamburg, Germany). The steps employed were as follows: initialization at 95 °C for 5 min, and 35 cycles of denaturation at 95 °C for 60 s, annealing at 60 °C for 60 s, and elongation at 72 °C for 60 s. Afterwards, the last cycle mixture was incubated for 10 min at 72 °C for the final extension and then cooled at 4 °C before further analysis. The yield and specificity of the PCR product (248 bp) were evaluated by electrophoresis in 2.5% agarose gel (Promega, Fitchburg, WI, USA) and staining with GelGreen Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Fremont, CA, USA). The amplified fragments were digested with the restriction enzyme BsurRI (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), according to the manufacturer's instructions, and visualized on 2.5% agarose gel (TT: 248 bp; TG: 248, 220, 28 bp; GG: 220, 28 bp). Sample size $n = 448$. The DNA sequencing of randomly selected samples after amplification was performed to confirm correct genotyping by an external company.

2.4.2. *rs4588*

The mixture for genotyping was prepared in a volume of 10 μL per reaction and consisted of 5.0 μL of a TaqMan™ Universal PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), 4.0 μL of distilled water, 0.5 μL of a TaqMan™ SNP Genotyping Assay, human (G/T allele, Assay ID: C_8278879_10; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), and 0.5 μL of DNA (20 ng/μL). The reaction was performed in Quant Studio 3 on a default genotyping program (Applied Biosystem, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Samples were analyzed in duplicates using a dedicated program: QuantStudio 3/5 Real-Time PCR Software (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Sample size $n = 448$.

2.5. Statistical Analysis

The relative association between allelic/genetic groups was assessed by calculating the odds ratios (ORs) and *p*-values in MedCalc "https://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php (accessed on 14 October 2024)". ORs, as a measure of the relative risk with 95% confidence intervals (95% CIs), were estimated with logistic regression models and used to compare the allele frequencies in all of the studied groups. The complete haplotype analyses (genotype distribution and chi-square test) were performed on SHEsis online "http://shesisplus.bio-x.cn/SHEsis.html (accessed on 16 October 2024)". Vitamin 25(OH)D and *VDBP* concentration results are presented as median ± standard deviation (S_D; GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Normal distribution was tested using the Shapiro–Wilk test in GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Comparisons between the tested and control groups were compared using (non-parametric alternative to ANOVA) the Kruskal–Wallis test for three or more groups, where $p < 0.05$ was considered as a significant difference, with Dunn's multiple comparison test as a post hoc test in GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). A Spearman's correlation test was performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Analysis was performed using the group type and coded ordinally to represent

health status, where 0 = healthy Control (C), 1 = Control Arthroplasty (CA), and 2 = arthroplasty with Loosening (L). In rs4588/7041, the coding was 0 = TT, 1 = TG, and 2 = GG.

3. Results

Between 2019 and 2024 (November to March), 448 Caucasian participants enrolled in this study. The patients were categorized into three groups: (1) 112 individuals from a group of patients with hip replacements in which the transplant was rejected due to loosening (L—Loosening); (2) 87 individuals from a group of patients with functioning hip replacements and no loosening (CA—Control Arthroplasty); and (3) 249 healthy volunteers (C—Control).

3.1. Frequencies

Table 2 presents the information on frequencies in the three research groups. For example, among rs7041 in group C, there are 50 subjects with TT (F_{TT} = 0.20; meaning 20%), 144 heterozygous TG (F_{TG} = 0.58; meaning 58%), and 55 subjects with GG (F_{GG} = 0.22, meaning 22%), and in L there are 23 subjects with TT (F_{TT} = 0.20.5, meaning 20.50%), 56 heterozygous TG (F_{TG} = 0.50, meaning 50.1%), and 33 subjects with GG (F_{GG} = 0.294, meaning 29.4%).

Table 2. Genotype frequencies with logistic regression analysis of the dominant and recessive models of rs7041 and rs4588 in *VDBP* gene polymorphisms and χ^2 in the studied groups and the associations with prosthesis loosening.

	rs7041			***rs4588***		
Genotype	**Control [*n* (%)]**	**Control Arthroplasty [*n* (%)]**	**Loosening [*n* (%)]**	**Control [*n* (%)]**	**Control Arthroplasty [*n* (%)]**	**Loosening [*n* (%)]**
	C	**CA**	**L**	**C**	**CA**	**L**
TT	50 (20)	15 (17.2)	23 (20.5)	119 (47.7)	60 (68.9)	51 (45.5)
TG	144 (58)	52 (59.7)	56 (50.1)	39 (15.6)	8 (9.1)	12 (10.7)
GG	55 (22)	20 (22.9)	33 (29.4)	91 (36.5)	19 (21.8)	49 (43.7)
	Genotype χ^2 (4, 448) = 0.3205; p = 0.5242			Genotype χ^2 (4, 448) = 16.14; p = 0.0028		
	L vs. CA + C	**L vs. C**	**L vs. CA**	**L vs. CA + C**	**L vs. C**	**L vs. CA**
Dominant OR	0.68	0.68	0.72	1.36	1.55	2.49
(95% CI; *p*)	(0.43–1.11; 0.12)	(0.41–1.12; 0.13)	(0.38–1.36; 0.31)	(0.69–2.67; 0.38)	(0.78–3.08; 0.21)	(1.14–5.42; 0.02)
Recessive OR	2.8	2.8	2.8	1.02	0.97	0.93
(95% CI; *p*)	(1.71–4.59; <0.0001)	(1.69–4.65; 0.0001)	(1.56–5.00; 0.0005)	(0.67–1.55; 0.93)	(0.62–1.51; 0.87)	(0.55–1.56; 0.78)
TT OR	1 (reference)					
vs. TG OR	1.23	1.18	1.42	1.57	1.26	3.33
(95% CI; *p*)	(0.71–2.17; 0.46)	(0.66–2.12; 0.57)	(0.67–3.02; 0.36)	(0.99–2.47; 0.06)	(0.78–2.03; 0.34)	(1.66–6.68; 0.0007)
vs. GG OR	0.80	0.77	0.93	1.75	1.75	5.44
(95% CI; *p*)	(0.43–1.51; 0.50)	(0.40–1.48; 0.43)	(0.40–2.19; 0.87)	(0.85–3.58; 0.13)	(0.83–3.65; 0.14)	(2.17–13.67; 0.0003)

3.2. Logistic Regression Analysis of rs4588 and rs7041

Logistic regression analysis pointed out that the most common genetic variant in *rs7041* is recessive, which, for every group comparison, L vs. CA +C, L vs. C, and L vs. CA

show 2.8-times-higher according to the odds ratio ($OR_{recessive}$ = 2.8) (*p:* <0.0001, 0.0001, and 0.0005, respectively).

The results of the analysis for rs4588 and rs7041 show that, in the groups analyzed, there is a difference between L vs. CA when it comes to rs4588 frequencies (p = 0.002). The results show that, in L vs. CA, genotype TT is more frequent than TG with $OR_{TT\ vs.TG}$ = 3.33 and p = 0.0007 or than GG with $OR_{TT\ vs.\ GG}$ = 5.44 and p = 0.003. The data are available in Table 2.

Analysis of haplotypes showed that the frequency of G/T is more common in group L than CA + C OR = 1.459, p = 0.014, while the G/G haplotype is less frequent (OR = 0.306, p = 0.002). In the haplotype analysis, there is also an indication that the G/T haplotype occurs more frequently in group L than in group C (OR = 1.558; 95% CI = 1.135~2.141; p = 0.005), while G/G occurs less in group L than in group C (OR = 0.27; 95% CI = 0.121~0.605; p = 0.007). The haplotype analysis is presented in the Table 3.

Table 3. Haplotype analyses of rs7041 and 4588 in L vs. CA + C, L vs. CA, and L vs. C, with genotype frequencies and OR.

L vs. CA + C Haplotype rs7041/4588	**Loosening (Freq)**	**Control Arthroplasty + Control (Freq)**	χ^2	**Fisher's *p***	**Pearson's *p***	**OR [95% CI]**
TT	34 (0.151)	117 (0.174)	0.597	0.472	0.439	0.848 [0.56–1.286]
TG	68 (0.303)	209 (0.311)	0.043	0.867	0.834	0.965 [0.695–1.34]
GT	115 (0.513)	282 (0.419)	5.983	0.016	0.014	1.459 [1.077–1.976]
GG	7 (0.031)	64 (0.095)	9.427	0.001	0.002	0.306 [0.138–0.678]
L vs. CA haplotype rs7041/4588	**Loosening (freq)**	**Control Arthroplasty (freq)**	χ^2	**Fisher's *p***	**Pearson's *p***	**OR [95% CI]**
TT	34 (0.151)	17 (0.097)	2.564	0.13	0.109	1.652 [0.889–3.07]
TG	68 (0.303)	65 (0.373)	2.156	0.163	0.142	0.73 [0.48–1.111]
GT	115 (0.513)	81 (0.465)	0.898	0.364	0.343	1.211 [0.814–1.801]
GG	7 (0.031)	11 (0.063)	2.317	0.148	0.127	0.478 [0.181–1.259]
L vs. C haplotype rs7041/4588	**Loosening (freq)**	**Control (freq)**	χ^2	**Fisher's *p***	**Pearson's *p***	**OR [95% CI]**
TT	34 (0.151)	100 (0.2)	2.456	0.121	0.117	0.712 [0.465–1.09]
TG	68 (0.303)	144 (0.289)	0.154	0.724	0.694	1.071 [0.759–1.512]
GT	115 (0.513)	201 (0.403)	7.565	0.007	0.005	1.558 [1.135–2.141]
GG	7 (0.031)	53 (0.106)	11.459	0.0004	0.0007	0.27 [0.121–0.605]

Haplotypes with a frequency < 0.03 are ignored.

3.3. VDBP Concentration

3.3.1. *VDBP* Among the Studied Groups

In group L, the mean concentration was 2.4 ng/mL, with an S_D of 2.6 ng/mL and median of 1.6 ng/mL. In the CA group, the mean was 0.37 ng/mL with an S_D of 0.55 ng/mL and median of 0.21 ng/mL. Group C's mean concentration was 1.1 ng/mL with an S_D of 1.0 ng/mL and median of 0.57 ng/mL. There were significant differences between the studied groups (p < 0.0001). The differences in *VDBP* concentrations are shown in Figure 3.

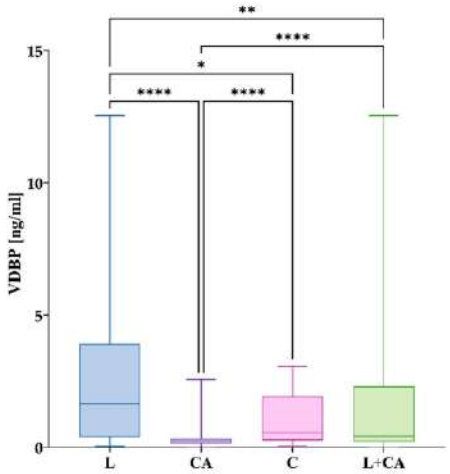


Figure 3. Differences *VDBP* serum concentrations between studied groups. The box plot shows the values in each group studied with whiskers pointing to the min. to max. values, while the lines inside the boxes show medians. Post hoc comparisons after the Kruskal–Wallis test were performed with Dunn's multiple comparisons test. Figure shows results with $p < 0.05$, where *: $p < 0.05$ (significant at 5%); **: $p < 0.01$ (significant at 1%); ****: $p < 0.0001$ (significant at 0.01%).

3.3.2. *VDBP* Concentrations in Haplotypes Among the Studied Groups

Groups C, L, and CA were grouped according to mixed rs7041/rs4588 haplotypes and compared for significant differences in the *VDBP* concentration. The differences are shown in Figure 4. The analysis of *VDBP* concentrations was divided across the groups, which is why each haplotype is visible within a given subgroup on the chart. Looking at the top of the chart, the TT/TT designation can be seen for the groups C, CA, and L.

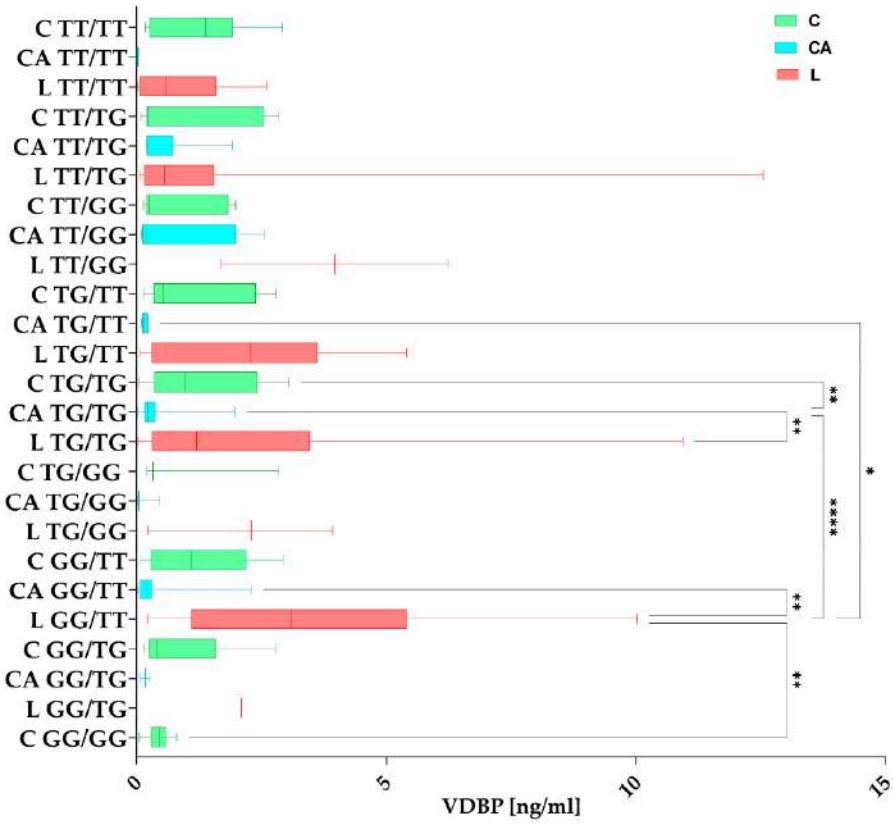


Figure 4. Differences between haplotypes and *VDBP* concentrations among the studied groups (C—Control, green; CA—Control Arthroplasty, blue; L—Loosening, red). The box plot shows the values in each group studied with whiskers pointing to the min. to max. values, while the lines inside the boxes show medians. Post hoc comparisons after Kruskal–Wallis tests were performed with Dunn's multiple comparisons test. Figure shows results with $p < 0.05$, where *: $p < 0.05$ (significant at 5%); **: $p < 0.01$ (significant at 1%); ****: $p < 0.0001$ (significant at 0.01%).

3.4. 25(OH)D Concentration

3.4.1. 25(OH)D Among the Studied Groups

In group L, the mean concentration was 18.17 ng/mL with an SD of 14.30 ng/mL and a median of 14.16 ng/mL. CA had a higher mean concentration of 20.63 ng/mL with a median of 19.88 ng/mL and SD of 10.11 ng/mL. Group C had the highest mean of 36.44 ng/mL with a median of 32.94 ng/mL and SD of 24.07 ng/mL. Differences among the groups are shown in Figure 5.

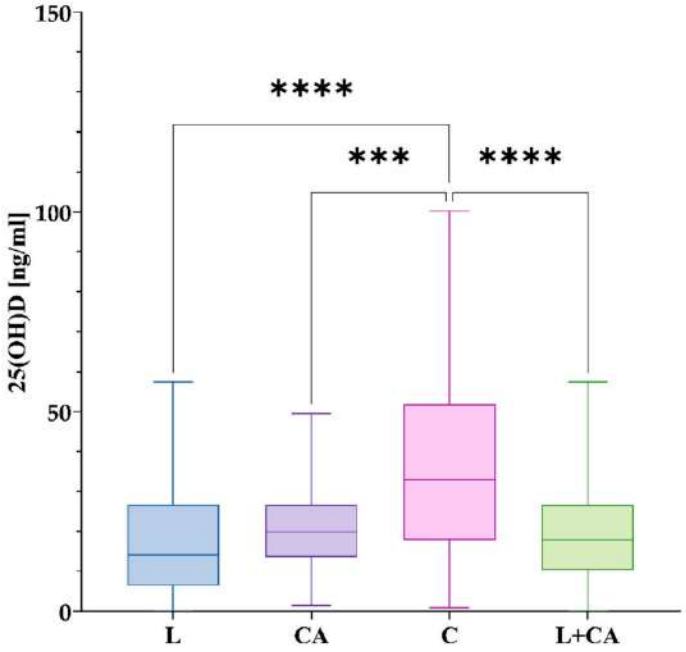


Figure 5. Differences in 25(OH)D concentrations between the studied groups. The box plot shows the values in each group studied with whiskers pointing to min. to max. values, while the lines inside the boxes show medians. Post hoc comparisons after Kruskal–Wallis tests were performed with Dunn's multiple comparisons test. Figure shows results with $p < 0.05$, where ***: $p < 0.001$ (significant at 0.1%); ****: $p < 0.0001$ (significant at 0.01%).

3.4.2. 25(OH)D Concentrations in Haplotypes Among the Studied Groups

Groups C, L, and CA were grouped according to mixed rs7041/rs4588 haplotypes and compared for significant differences in the 25(OH)D concentration. For example, rs7041/rs4588 mixed haplotypes are shown separately at the top, and C TT/TT (green) shows the concentration in the control group with the TT/TT haplotype, CA TT/TT (blue) shows the concentration in the Control Arthroplasty group with the TT/haplotype, and L TT/TT (red) shows the concentration in the Loosening group with the TT/TT haplotype.

Differences between haplotypes and 25(OH)D concentration are shown in Figure 6.

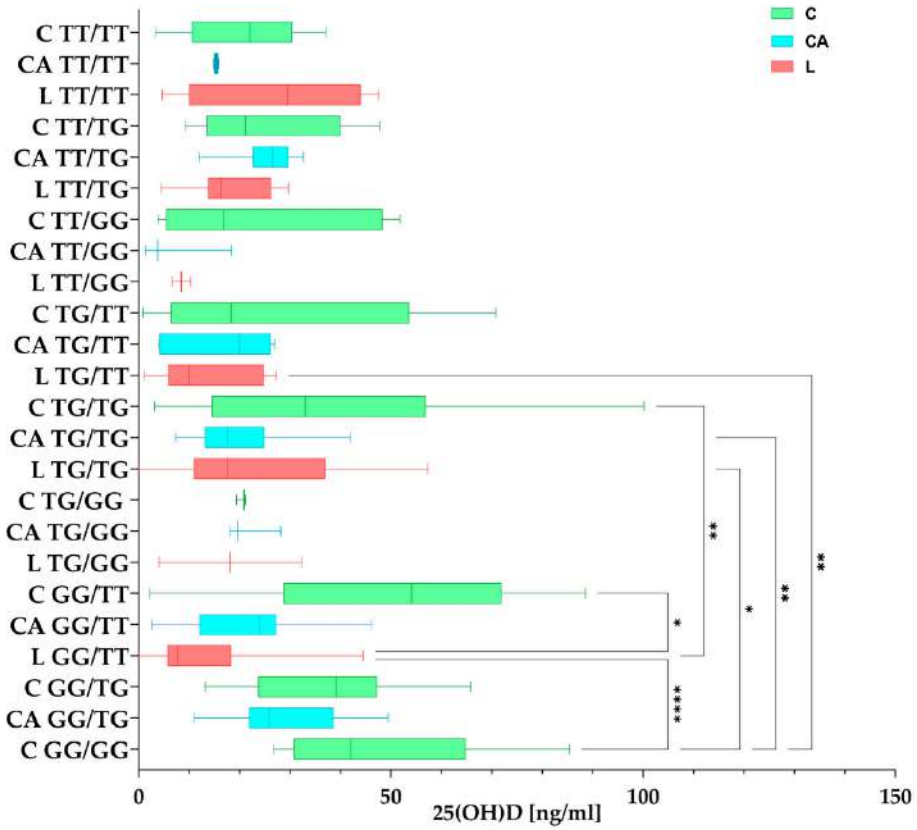


Figure 6. Differences between haplotypes and 25(OH)D concentrations among the studied groups (C—Control, green; CA—Control Arthroplasty, blue; L—Loosening, red). The box plot shows the values in each group studied with whiskers pointing to min. to max. values, while the lines inside the boxes show medians. Post hoc comparisons after Kruskal–Wallis tests were performed with Dunn's multiple comparisons test. Figure shows results with $p < 0.05$, where *: $p < 0.05$ (significant at 5%); **: $p < 0.01$ (significant at 1%); ****: $p < 0.0001$ (significant at 0.01%).

3.5. Correlation Between Variables

The analysis of correlations showed there is a significant correlation between certain variables. The analysis indicates weak negative relationship between serum levels of 25(OH)D and the VDBP, showing that, as the 25(OH)D levels increase, the levels of the VDBP tend to decrease ($R_s = -0.23$; $p = 0.001$). Another weak but significant correlation was found between VDBP levels and rs7041, where the results suggest a weak positive correlation where patients with the G-allele variant (GG, GT) of the VDBP gene have slightly higher VDBP serum levels compared to the homozygous TT variant ($R_s = 0.20$; $p = 0.001$). A negative correlation was discovered between rs7041 and rs4588, where the data imply that the G-allele in rs7041 is present, and there is a greater likelihood of the T-allele being present in rs4588 ($R_s = -0.18$, $p = 0.0001$). There is also a moderate negative association between the group type (L, CA, and C) and 25(OH)D levels, where 25(OH)D levels tends to increase in the observed CA and L groups ($R_s = -0.34$, $p < 0.0001$) suggesting the protective effects of 25(OH)D among healthy subjects. Statistical significance indicates a weak

positive correlation for 25(OH)D and rs4588 G-allele variants (GG, GT) of the VDBP gene, where 25(OH)D levels tend to increase ($R_s = 0.13$; $p = 0.045$). The heatmap of correlations is shown in Figure 7.

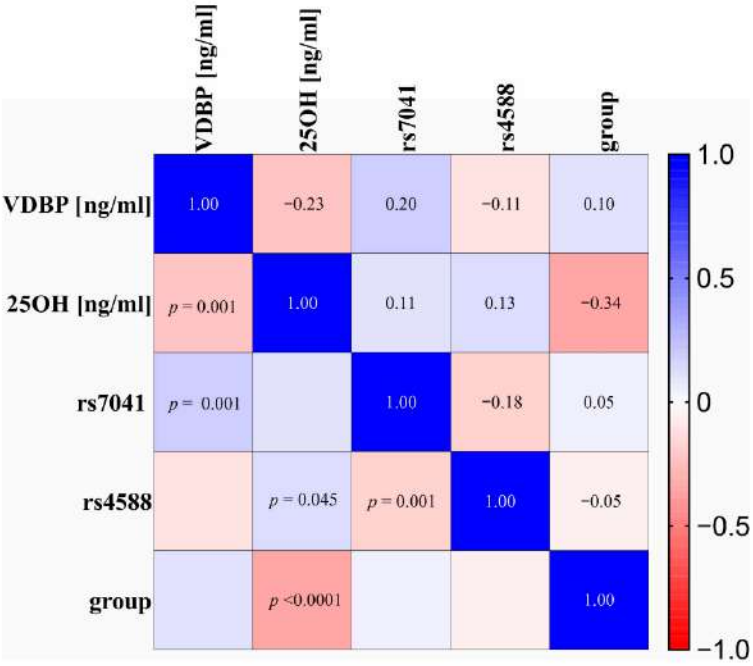


Figure 7. Heatmap of Spearman rank correlation coefficients for associations between both 25(OH)D and *VDBP* serum concentrations, genetic variants of the *VDBP* gene (*rs4588* and *rs7041*), and group type (L, CA, and C) with added *p*-values for significant results. Colors represent the direction and strength of each correlation, where red shades represent negative and blue shades represent positive correlations. Analysis was performed using the group type and coded ordinally to represent health status, where 0 = healthy Control (C), 1 = Control Arthroplasty (CA), and 2 = arthroplasty with Loosening (L). In *rs4588/7041* coding was 0 = TT, 1 = TG, and 2 = GG.

4. Discussion

This study investigated the role of genetic variations in the *VDBP* gene (rs4588 and rs7041) and serum levels of *VDBP* and 25(OH)D in relation to prosthesis stability and the risk of loosening after a total hip replacement (THR). Consistent with the study's hypothesis, significant differences in serum concentrations and genotype frequencies were observed among the groups. The L group, associated with prosthesis loosening, exhibited the lowest mean levels of 25(OH)D (18.17 ng/mL) while higher levels of *VDBP* (2.4 ng/mL) compared to higher levels of 25(OH)D were exhibited in the CA (20.63 ng/mL and lower *VDBP*—0.37 ng/mL) and C groups (36.44 ng/mL and 1.1 ng/mL, respectively). Statistical analyses revealed correlations suggesting that higher 25(OH)D levels were linked to lower *VDBP* levels. Additionally, weak positive correlations were identified between rs7041 G allele variants and higher *VDBP* levels, as well as between rs4588 G allele variants and increased 25(OH)D levels. Genotypic analysis highlighted a recessive model for rs7041 and a dominant model for rs4588 as significant predictors. Haplotype analysis showed that the G/T haplotype was more frequent in the L group, while the G/G haplotype was

less common. These findings indicate that specific genetic variants and altered serum levels of 25(OH)D and *VDBP* may contribute to prosthesis instability, supporting this study's objective of identifying biochemical and genetic factors associated with this complication.

A review of the literature shows that only a few studies have investigated vitamin D in the context of total hip replacement (THR) or total knee arthroplasty (TKA). Moreover, most researchers have focused exclusively on the measurement of vitamin D (25(OH)D) levels in preoperative or postoperative groups [41–44]. There are not many publications on other vitamin D metabolic pathway components, which prompts us to continue our research on THR patients and VD metabolism, including other factors, such as receptors [28] or the major transport protein—the *VDBP*.

Vitamin D serum concentration not only depends on diet, supplementation, or the effects of UVB radiation on the skin, but also on genetic factors. One of these is SNPs, single nucleotide polymorphisms, which can influence gene functions, such as phenotypic variation. The assignment of functions to SNPs is necessary to advance the development of preventive medicine [45]. SNPs can change coded amino acids (nonsynonymous) [46], remain silent (synonymous) [47], or occur in non-coding regions. They can influence promoter activity (gene expression), the conformation of messenger RNA (mRNA) (affecting its stability, structure, and protein folding), and the subcellular localization of mRNAs or proteins. These changes can affect cellular processes and the cellular response to therapeutic targets, functions of proteins, and potentially contribute to disease development [47,48]. There are many recent studies linking the effects of *VDBP* polymorphisms to *VDBP* and/or vitamin D status or *VDBP* status to vitamin D status [35,49–55]. There are studies on vitamin D status among total hip or total knee arthroplasty patients [41], however these studies do not include *VDBP* levels or its gene variations. We would like to extend this knowledge to include the structures of *VDBPs* that are essential for proper metabolism in the body—not only vitamin D, but also the transporter protein.

We recently analyzed SNPs in the *VDR* gene and its correlation with 25(OH)D serum levels [28]. The results have prompted us to expand our research on other proteins involved in the VD pathway, such as the *VDBP*.

Vitamin D is a nutrient that plays a great role in the calcium and phosphorous homeostasis and maintenance of muscle mass and bone health [56]. In addition, higher VD levels have been linked to a reduced risk of rickets and various autoimmune, infectious, and allergic diseases [57]. The *VDBP* as a VD transporter is a key component that binds and transports VD metabolites to the liver and kidneys or other organs where they are activated through hydroxylations [26,58,59].

Da Cunha et al. investigated the association between 25(OH)D levels and outcomes in 110 patients undergoing a total hip replacement. They found a weak correlation between 25(OH)D levels and changes in peak strength and peak power. The authors hypothesized that patients with higher 25(OH)D levels experienced better muscle recovery after a THR [60]. This could confirm the role of vitamin D in achieving positive outcomes after surgery. Our results support the hypothesis that median 25(OH)D serum concentration levels are higher in the Control Arthroplasty group, where no loosening occurred. We want to highlight the differences in the sample testing, as our results were obtained using ELISA on serum, whereas de Cunha et al. used peripheral venous blood samples analyzed with liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry and included only 110 subjects.

The prevalence of a low vitamin D status in patients undergoing a THR was determined by Unnanuntana et al. [61] in a group of 200 patients, including 88 men and 112 women. Preoperative diagnoses were OA (187 patients), osteonecrosis (six patients), development of hip dysplasia (three patients), and post-traumatic OA (four patients). Approximately 40% of patients in Unnanantana et al.'s study was found to have low serum

vitamin D levels. Our findings support this, as orthopedic patients in the L and CA groups exhibited lower serum vitamin D levels compared to the healthy subjects. Unnanuntana used a laboratory radioreceptor assay in contrast to our ELISA. However, overall results suggest that the orthopedic patient group (L + CA) has an overall lower vitamin D status than the non-orthopedic group, emphasizing the critical role of vitamin D in maintaining a healthy bone status. This is further supported by the findings of Hussain et al. [62] whose research on a cohort of 9235 participants demonstrated a significant correlation between higher serum 25(OH)D concentrations and an increased risk of hip arthroplasty for osteoarthritis (OA) in men. The authors stated that the underlying mechanisms linking serum 25(OH)D concentrations and the risk of hip OA requiring hip arthroplasty remain unclear. However, it has been suggested that increased bone mineral density (BMD) is also associated with vitamin D status and its regulatory effects on the bone formation process [62]. Hussain et al. used a direct competitive chemiluminescent immunoassay [62], which is a different and more sensitive technique. However, it is similar to other immunoassays, as both rely on antigen–antibody binding specificity to detect the presence or concentration of a target molecule. Bone health is a complex issue that also involves sex hormones. The differences in 25(OH)D levels and the risk of hip arthroplasty outcomes between men and women might occur due to sex-specific differences. With aging, the pathophysiology of bone loss differs between males and females. In elderly women, there is an increased rate of bone remodeling with a negative remodeling balance, where bone resorption exceeds formation, leading to bone loss and the disruption of bone microarchitecture. In elderly men, aging primarily results in reduced bone formation and low bone turnover [63–65]. Our studies did not support the differences in THR outcomes according to gender and showed the opposite result for 25(OH)D action, indicating a moderate negative association between group type (L, CA, and C) and 25(OH)D levels, with 25(OH)D levels tending to be higher in non-orthopedic groups. This suggests a protective effect of 25(OH)D in healthy individuals. In a study conducted by Maier et al. involving a total of 1083 patients scheduled for elective knee or hip arthroplasty, it was found that serum vitamin D levels were inversely related to the length of stay in the orthopedic department when compared to patients with normal vitamin D levels. In multivariate analyses, the length of stay remained significantly associated with 25(OH)D levels [66]. The results of 25(OH)D measurements are based on chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) technology, which also differs from standardized ELISA. These results support our findings, where most orthopedic patients exhibit significant 25(OH)D deficiencies. Our data show a moderate inverse relationship between vitamin D levels and group type, with lower vitamin D concentrations observed in patients with prosthesis loosening compared to healthy individuals and those with prostheses without loosening. This could contribute to poor THR or TKA outcomes in the future, highlighting the importance of vitamin D status for bone health.

Kim Hong Seok et al. published a study comparing vitamin D deficiency in elderly patients undergoing hip fracture surgery (HFS) and elective primary total hip replacement (THR). The study included 70 HFS patients (42 women and 28 men) and 100 THR patients (74 women and 26 men). The results showed lower vitamin D levels in THR patients compared to the HFS group. In the HFS group, vitamin D deficiency was more pronounced in sarcopenic patients, with an insufficiency found in 80% of HFS patients and 36% of THR patients [62]. Our results support these findings and point to low serum vitamin D level as a predictive factor of prostheses loosening. It is important to note that Kim Hong Seok et al. used a radioactive isotope (I-125) to measure 25(OH)D, which differs from ELISA.

Another study by Traven et al., which aligns with our findings, demonstrates that lower vitamin D levels are associated with an increased risk of complications following

orthopedic surgery. A retrospective review of 126 revision THR patients found that low vitamin D levels were not linked to a 30-day re-admission risk, but were associated with increased 90-day complications, including periprosthetic joint infections. Vitamin D deficiency was more prevalent in the TJA revision population (55%) compared to the general population (8%). Patients with low vitamin D had a higher rate of postoperative complications (20.3%) than those with normal levels (8.8%, $p < 0.001$) [67]. The authors did not disclose which method was used to determine 25(OH)D concentrations.

On the other hand, our results are not supported by Zajonz et al., who studied the significance of vitamin D in periprosthetic infections after a THR and TKA. They found no significant differences in 25(OH)D levels between the groups, although there was a difference in the calcium levels [68]. Similar studies were published by Visser et al. who conducted a study involving 87 patients scheduled for a THA. Of these, 23 were classified as vitamin D deficient, 32 as insufficient, and 32 as sufficient. The authors found no relationship between pre-surgery vitamin D status and post-surgery physical performance, potentially due to seasonal fluctuations in vitamin D levels during sample collection (September to March). The study does not explicitly mention the method used for detecting 25(OH)D levels [69].

To our knowledge, there is no study linking susceptibility to THR to *VDBP* serum levels or genetic variability, such as *rs4588* or *rs7041*. However, there are some studies linking *VDBP* and its genetic variants to bone-related diseases, bone mass, or bone formation. Studies investigating the effects of *VDBP* on bone health are mostly limited to bone metabolism and focus on osteoporosis as a heterogeneous group of bone disease characterized by a low skeletal mass.

Low *VDBP* levels as a part of vitamin D metabolism have been associated with low BMD and could be considered as a novel, non-invasive biomarker for the early detection of osteoporosis. As *VDBP* levels were significantly lower in the postmenopausal women group, it could potentially be a simple biomarker for osteopenia and osteoporosis [70].

The researchers not only focus on *VDBP* levels, but also on investigating the major genetic forms of *VDBP* variants, as they show differences in affinity for 25(OH)D and 1,25$(OH)_2$D. According to Bhan, GC2 (Asp/Lys) has the lowest affinity to 25(OH)D, GC1S has an intermediate affinity, and GC1F has the highest affinity to 25(OH)D. In summary, the combination of various alleles may influence not only the levels, but *VDBP* action on target tissues, including bones [71].

The study of Takiar et al. did not provide conclusive data on the *VDBP* and the association of *rs4588* or *rs7041* with fracture risk, although 25(OH)D deficiency levels were associated with a higher incidence of hospitalized fractures [72]. As the vitamin D deficiency results support our studies, we find that genetic factors of rs4588 and rs7041 in the *VDBP* may be predictive, as our results reveal. Specifically, the analysis of rs4588 and rs7041 revealed significant associations in the studied groups. For rs4588, there was a notable difference in allele frequencies between the L and CA groups ($p = 0.002$). Contingency analysis further demonstrated overall associations between genetic variants (genotypes) and implant loosening in the L group compared to CA + C ($\chi^2 = 7.565$, $p = 0.005$) and L compared to C ($\chi^2 = 16.87$, $p = 7.51 \times 10^{-4}$).

Logistic regression analysis for rs4588 indicated a higher likelihood in L vs. CA ($OR_{dominant} = 2.42$, $p = 0.02$). Additionally, the TT genotype was significantly more common in L vs. CA compared to TG ($OR_{TT \text{ vs. } TG} = 3.33$, $p = 0.0007$) or GG ($OR_{TT \text{ vs. } GG} = 5.44$, $p = 0.003$). These genetic findings, coupled with the observed associations between vitamin D deficiency and the outcomes, support the role of both genetic and vitamin D-related factors in influencing postoperative complications.

Li et al. found that VDBP levels and genetic variants are associated with 25(OH)D, which is also confirmed by our studies. The TT variant of rs7041 was more frequent (0.543)

than TG (0.370) and GG (0.74), and rs4588 GT was as frequent (0.436) as GG (0.446), but TT had the lowest frequency (0.118) among the studied postmenopausal women [73].

A summary of all the findings above is presented in Table 4.

Table 4. Summary table of the correlations and significant differences in *VDBPs* or 25(OH)D among cases on bone-related diseases or procedures (THA/TKA).

Results	Study Cohort	Case	References
	25(OH)D Conc.		
Weak correlation between 25(OH)D levels and peak stretch or peak power	110 subjects	THR	[60]
23 vitamin D-deficient, 32 vitamin D-insufficient, and 32 vitamin D-sufficient patients; 25(OH)D status not related to performance after surgery	87 subjects	THR	[69]
40% of patients were noted to have low 25(OH)D levels	200 subjects; 187—osteoarthritis (OA), 6—osteonecrosis, 3—hip dysplasia, and post-traumatic OA—4	THR	[74]
Correlation of increased 25(OH)D serum concentrations and increased risk of total hip replacements in OA among males, but not among females	9135 subjects	THR, BMD	[62]
Insufficient serum levels of 25-OH-D were observed in 86% of patients, with over 60% classified as vitamin D deficient	1083 subjects	THR/TKA	[66]
25(OH)D levels lower among patients for THR n for HFS	70 subjects for HFS; 100 subjects for THR	HFS, primary THR	[75]
No association of 25(OH)D with a re-admission risk, but elevated risk of 90-day complications and periprosthetic joint infections	126 subjects	revision THR	[67]
No significant differences in 25(OH)D and studied groups	240 subjects	THR/TKA, osteoporosis	[68]
Deficient levels of 25(OH)D associated with increased fracture risk. Racial differences in fracture risk may be related to differences in bioavailable vitamin D due to the single nucleotide polymorphism	12,781 middle-aged subjects	fracture risk	[72]
	VDBP conc.		
Low VDBP serum levels are associated with a low BMD	425 postmenopausal women	BMD	[70]
	VDBP SNP		
TT variants of rs7041 were more frequent (0.543) than TG (0.370) and GG (0.74) and rs4588 GT was as frequent (0.436) as GG (0.446), but TT had the lowest frequency (0.118) rs4588 has no association with blood VDBP	967 postmenopausal women	BMD	[73]
No independent association of rs4588 and rs7041 with fractures	12,781 middle-aged subjects	fracture risk	[72]

The limitation of this study is the potential imbalance of sample sizes across groups, which could introduce bias and reduce the precision of statistical comparisons. If the sample size in one group is much smaller than in others, it may result in the overestimation or underestimation of effects, particularly in smaller or less representative groups, like the L group. However, frequency calculations did not present that risk.

Another limitation is the reliance on serum measurements of 25(OH)D, which can be influenced by various factors, such as time of year (this is why we limited the serum measurements to autumn/winter), diet, or recent supplementation, leading to potential variability in and the imprecision of these measurements. The lack of longitudinal data also limits the ability to track changes over time and assess the long-term impact of genetic and biochemical factors on prosthesis stability. Furthermore, genetic factors other than the studied SNPs (*rs7041* and *rs4588*) may also play a role in prosthesis loosening but were not considered, which could lead to residual confounding. Lastly, selection bias could arise if patients with prosthesis loosening are not representative of the general population or if they differ systematically from patients in other groups, affecting the external validity of the findings. While this study found significant associations, these effects may be influenced by uncontrolled variables, limiting the generalizability of the results to broader populations.

The statistical analysis provided shows the relationship between variables, but it is important to note that the Spearman rank correlation measures the strength and direction of a monotonic relationship between two variables. While it can identify statistically significant correlations, even weak correlations may achieve significance in large sample sizes, which does not imply a strong predictive value.

The results from similar studies should be considered, as they can help validate the findings or highlight potential discrepancies. While some studies have suggested associations between vitamin D levels and bone health, and genetic variations influencing prosthesis outcomes, the findings in this study should be viewed cautiously, given the multiplicity of analyses conducted.

Overall, while this study presents promising associations between genetic and biochemical factors and prosthesis stability, further research, especially longitudinal studies with larger, more balanced sample sizes, is needed to confirm these findings and determine their clinical relevance. Additionally, addressing other potential confounding factors and exploring other genetic variations related to prosthesis loosening would be important for further refining our understanding of the mechanisms involved.

This study's focus on a specific complication of THR—prosthesis loosening—means that the results may not be applicable to other complications or outcomes related to THR, such as infection or revision surgery. This narrow focus reduces the broader applicability of the findings to the overall patient population undergoing hip replacement surgeries.

5. Conclusions

Diagnostic tests usually measure 25(OH)D, the primary inactive metabolite of vitamin D. However, it is crucial to also consider other components involved in the metabolism and transport of vitamin D (as shown in Figure 1) and to include additional parameters that could be associated with pathological conditions in the body. Furthermore, a simple and informative approach could be to identify SNP mutations in the *VDBP* gene that may indicate a predisposition to VD deficiency. Once a SNP is identified, it remains unchanged for life. The negative correlation between *VDBP* and 25(OH)D associated with higher *VDBP* levels in orthopedic patients indicates that an adaptive or compensating mechanism may be present in this group in response to a lower vitamin D status. The correlation between vitamin D and *VDBP* levels with prosthesis loosening could help identify high-risk patients. By assessing both genetic and biochemical markers preoperatively, clinicians could stratify patients based on their risk of implant instability and tailor their follow-up care accordingly. This could involve more frequent monitoring for signs of loosening or earlier intervention if necessary.

Author Contributions: Conceptualization: A.C. and D.R.; methodology: D.R. and A.C.; software: D.R. and A.C.; validation: D.R. and A.C.; formal analysis: D.R., A.C. and E.F.; investigation: D.R., A.C. and E.F.; resources, A.C. and J.P.; data curation: D.R. and A.C.; writing—original draft preparation: A.C., D.R. and J.P.; writing—review and editing, A.C., D.R., J.P. and E.F.; visualization: D.R. and A.C.; supervision: J.P. and A.C.; project administration: A.C. and D.R.; funding acquisition: A.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was not supported by external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Local Bioethics Committees in Olsztyn and Otwock (49/2019, 25th April 2019 and 139/2023, 21st June 2023, respectively).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The authors confirm that the data supporting the findings of this study are available within the article. Correspondence and requests for materials should be addressed to D.R.

Acknowledgments: The authors sincerely thank all the patients who participated in this study.

Conflicts of Interest: The authors declare no competing interests.

References

1. Sieczka, Ł.; Bohatyrewicz, A.; Pituch, S. Endoprotezy stawów biodrowych wczoraj i dziś. *Rheumatol. Forum* **2017**, *3*, 216–221.
2. Yang, Q.; Wang, J.; Xu, Y.; Chen, Y.; Lian, Q.; Zhang, Y. Incidence and Risk Factors of In-Hospital Prosthesis-Related Complications Following Total Hip Arthroplasty: A Retrospective Nationwide Inpatient Sample Database Study. *Int. Orthop.* **2020**, *44*, 2243–2252. https://doi.org/10.1007/s00264-020-04682-y.
3. Patel, I.; Nham, F.; Zalikha, A.K.; El-Othmani, M.M. Epidemiology of Total Hip Arthroplasty: Demographics, Comorbidities and Outcomes. *Arthroplasty* **2023**, *5*, 2. https://doi.org/10.1186/s42836-022-00156-1.
4. Number of Hip Replacements in OECD-Countries 2021. Available online: https://www.statista.com/statistics/283234/number-of-knee-replacements-in-selected-countries/ (accessed on 3 January 2025).
5. Total Hip Replacement. Available online: https://hipkneeinfo.org/hip-care/total-hip-replacement/ (accessed on 17 January 2025).
6. Rejestr Endoprotez-Default. Available online: https://shiny.nfz.gov.pl/app/re_endoprotezy (accessed on 17 January 2025).
7. W-Dahl, A.; Kärrholm, J.; Rogmark, C.; Nåtman, J.; Bülow, E.; Arani, P.; Mohaddes, M.; Rolfson, O. The Swedish Arthroplasty Register Annual Report 2023. Available online: https://www.researchgate.net/publication/378941757_The_Swedish_Arthroplasty_Register_Annual_Report_2023 (accessed on 17 January 2025).
8. Furnes, O.; Gjertsen, J.-E.; Hallan, G.; Visnes, H.; Gundersen, T.; Fenstad, A.; Dybvik, E.; Stenvik, S.; Kvinnesland, I.; Mulpuri, K.; et al. Yearly Report Norwegian National Advisory Unit on Arthroplasty and Hip Fractures Norwegian Arthroplasty Register Norwegian Cruciate Ligament Register Norwegian Hip Fracture Register Norwegian Paediatric Hip Register Report 2022. Available online: https://www.researchgate.net/publication/366006951_Yearly_Report_Norwegian_National_Advisory_Unit_on_Arthroplasty_and_Hip_Fractures_Norwegian_Arthroplasty_Register_Norwegian_Cruciate_Ligament_Register_Norwegian_Hip_Fracture_Register_Norwegian_Paediatr (accessed on 17 January 2025).
9. Available online: https://reports.njrcentre.org.uk/Portals/0/PDFdownloads/NJR%2021st%20Annual%20Report%202024_Hips.pdf (accessed on 17 January 2025).
10. Kenanidis, E.; Kakoulidis, P.; Karponis, D.; Tsiridis, E. The Effect of Perioperative Vitamin D Levels on the Functional, Patient-Related Outcome Measures and the Risk of Infection Following Hip and Knee Arthroplasty: A Systematic Review. *Patient Relat. Outcome Meas.* **2020**, *11*, 161–171. https://doi.org/10.2147/PROM.S261251.
11. Mjöberg, B. Hip Prosthetic Loosening: A Very Personal Review. *World J. Orthop.* **2021**, *12*, 629–639. https://doi.org/10.5312/wjo.v12.i9.629.

12. Basit, S. Vitamin D in Health and Disease: A Literature Review. *Br. J. Biomed. Sci.* **2013**, *70*, 161–172. https://doi.org/10.1080/09674845.2013.11669951.
13. Charoenngam, N.; Shirvani, A.; Holick, M.F. Vitamin D for Skeletal and Non-Skeletal Health: What We Should Know. *J. Clin. Orthop. Trauma* **2019**, *10*, 1082–1093. https://doi.org/10.1016/j.jcot.2019.07.004.
14. Kim, T.-K.; Slominski, R.M.; Pyza, E.; Kleszczynski, K.; Tuckey, R.C.; Reiter, R.J.; Holick, M.F.; Slominski, A.T. Evolutionary Formation of Melatonin and Vitamin D in Early Life Forms: Insects Take Centre Stage. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **2024**, *99*, 1772–1790. https://doi.org/10.1111/brv.13091.
15. Speeckaert, M.M.; Speeckaert, R.; van Geel, N.; Delanghe, J.R. Chapter One—Vitamin D Binding Protein: A Multifunctional Protein of Clinical Importance. In *Advances in Clinical Chemistry*; Makowski, G.S., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2014; Volume 63, pp. 1–57.
16. Delanghe, J.R.; Speeckaert, R.; Speeckaert, M.M. Behind the Scenes of Vitamin D Binding Protein: More than Vitamin D Binding. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2015**, *29*, 773–786. https://doi.org/10.1016/j.beem.2015.06.006.
17. Hirschfeld, J. Immune-Electrophoretic Demonstration of Qualitative Differences in Human Sera and Their Relation to the Haptoglobins. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **2009**, *47*, 160–168. https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1959.tb04844.x.
18. Pop, T.L.; Sîrbe, C.; Benţa, G.; Mititelu, A.; Grama, A. The Role of Vitamin D and Vitamin D Binding Protein in Chronic Liver Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 10705. https://doi.org/10.3390/ijms231810705.
19. Bikle, D.D.; Schwartz, J. Vitamin D Binding Protein, Total and Free Vitamin D Levels in Different Physiological and Pathophysiological Conditions. *Front. Endocrinol.* **2019**, *10*, 317. https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00317.
20. Safadi, F.F.; Thornton, P.; Magiera, H.; Hollis, B.W.; Gentile, M.; Haddad, J.G.; Liebhaber, S.A.; Cooke, N.E. Osteopathy and Resistance to Vitamin D Toxicity in Mice Null for Vitamin D Binding Protein. *J. Clin. Investig.* **1999**, *103*, 239–251. https://doi.org/10.1172/JCI5244.
21. Macdonald, H.M. Contributions of Sunlight and Diet to Vitamin D Status. *Calcif. Tissue Int.* **2013**, *92*, 163–176. https://doi.org/10.1007/s00223-012-9634-1.
22. Falzone, L. Role of Vitamin D in Health and Disease: How Diet May Improve Vitamin D Absorption. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2023**, *74*, 121–123. https://doi.org/10.1080/09637486.2023.2199179.
23. Holick, M. Environmental Factors That Influence the Cutaneous Production of Vitamin D. *Am. J. Clin. Nutr.* **1995**, *61*, 638S–645S. https://doi.org/10.1093/ajcn/61.3.638S.
24. Lehmann, B.; Meurer, M. Vitamin D Metabolism. *Dermatol. Ther.* **2010**, *23*, 2–12. https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2009.01286.x.
25. Slominski, A.T.; Tuckey, R.C.; Jetten, A.M.; Holick, M.F. Recent Advances in Vitamin D Biology: Something New under the Sun. *J. Investig. Dermatol.* **2023**, *143*, 2340–2342. https://doi.org/10.1016/j.jid.2023.07.003.
26. Slominski, A.T.; Kim, T.-K.; Li, W.; Postlethwaite, A.; Tieu, E.W.; Tang, E.K.Y.; Tuckey, R.C. Detection of Novel CYP11A1-Derived Secosteroids in the Human Epidermis and Serum and Pig Adrenal Gland. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 14875. https://doi.org/10.1038/srep14875.
27. Slominski, A.T.; Tuckey, R.C.; Jenkinson, C.; Li, W.; Jetten, A.M. Chapter 6—Alternative Pathways for Vitamin D Metabolism. In *Feldman and Pike' s Vitamin D*, 5th ed.; Hewison, M., Bouillon, R., Giovannucci, E., Goltzman, D., Meyer, M., Welsh, J., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2024; pp. 85–109, ISBN 978-0-323-91386-7.
28. Rozmus, D.; Fiedorowicz, E.; Grzybowski, R.; Płomiński, J.; Cieślińska, A. VDR Gene Polymorphisms (BsmI, FokI, TaqI, ApaI) in Total Hip Arthroplasty Outcome Patients. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 8225. https://doi.org/10.3390/ijms25158225.
29. Song, Y.-H.; Naumova, A.K.; Liebhaber, S.A.; Cooke, N.E. Physical and Meiotic Mapping of the Region of Human Chromosome 4q11–Q13 Encompassing the Vitamin D Binding Protein DBP/Gc-Globulin and Albumin Multigene Cluster. *Genome Res.* **1999**, *9*, 581–587.
30. Piquette, C.A.; Robinson-Hill, R.; Webster, R.O. Human Monocyte Chemotaxis to Complement-Derived Chemotaxins Is Enhanced by Gc-Globulin. *J. Leukoc. Biol.* **1994**, *55*, 349–354. https://doi.org/10.1002/jlb.55.3.349.
31. Bouillon, R.; Schuit, F.; Antonio, L.; Rastinejad, F. Vitamin D Binding Protein: A Historic Overview. *Front. Endocrinol.* **2020**, *10*, 910. https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00910.
32. Papiha, S.S.; Allcroft, L.C.; Kanan, R.M.; Francis, R.M.; Datta, H.K. Vitamin D Binding Protein Gene in Male Osteoporosis: Association of Plasma DBP and Bone Mineral Density with (TAAA)n-Alu Polymorphism in DBP. *Calcif. Tissue Int.* **1999**, *65*, 262–266. https://doi.org/10.1007/s002239900695.
33. Rozmus, D.; Ciesielska, A.; Płomiński, J.; Grzybowski, R.; Fiedorowicz, E.; Kordulewska, N.; Savelkoul, H.; Kostyra, E.; Cieślińska, A. Vitamin D Binding Protein (VDBP) and Its Gene Polymorphisms—The Risk of Malignant Tumors and Other Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7822. https://doi.org/10.3390/ijms21217822.

34. Usama; Khan, Z.; Ali, A.; Shah, M.; Imran, M. Differential Glycosylation in Mutant Vitamin D-Binding Protein Decimates the Binding Stability of Vitamin D. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2024**, *42*, 5365–5375. https://doi.org/10.1080/07391102.2023.2226742.
35. Quesada-Colloto, P.; Avello-Llano, N.; García-Romero, R.; Garriga-García, M.; Álvarez-Beltrán, M.; Reyes-Domínguez, A.I.; Fernández-Lorenzo, A.E.; Gil-Peña, H.; Gómez-Alonso, C.; García-Gil-Albert, C.; et al. Polymorphisms of the Vitamin D Binding Protein (VDBP) and Free Vitamin D in Patients with Cystic Fibrosis. *Nutrients* **2024**, *16*, 3850. https://doi.org/10.3390/nu16223850.
36. Rozmus, D.; Plomiński, J.; Augustyn, K.; Cieślińska, A. Rs7041 and Rs4588 Polymorphisms in Vitamin D Binding Protein Gene (VDBP) and the Risk of Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 933. https://doi.org/10.3390/ijms23020933.
37. Rs4588 RefSNP Report-dbSNP-NCBI. Available online: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs4588 (accessed on 7 January 2022).
38. Rs7041 RefSNP Report-dbSNP-NCBI. Available online: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs7041 (accessed on 7 January 2022).
39. Murthykumar, K.; Arjunkumar, R.; Jayaseelan, V.P. Association of Vitamin D Receptor Gene Polymorphism (Rs10735810) and Chronic Periodontitis. *J. Investig. Clin. Dent.* **2019**, *10*, e12440. https://doi.org/10.1111/jicd.12440.
40. Wang, H.; Wang, C.; Han, W.; Geng, C.; Chen, D.; Wu, B.; Zhang, J.; Wang, C.; Jiang, P. Association of Leptin and Leptin Receptor Polymorphisms with Coronary Artery Disease in a North Chinese Han Population. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2020**, *53*, e20190388. https://doi.org/10.1590/0037-8682-0388-2019.
41. Brambilla, L.; Peretti, G.M.; Sirtori, P.; Maffulli, N.; Mangiavini, L. Outcome of Total Hip and Total Knee Arthroplasty and Vitamin D Homeostasis. *Br. Med. Bull.* **2020**, *135*, 50–61. https://doi.org/10.1093/bmb/ldaa018.
42. Maniar, R.N.; Patil, A.M.; Maniar, A.R.; Gangaraju, B.; Singh, J. Effect of Preoperative Vitamin D Levels on Functional Performance after Total Knee Arthroplasty. *Clin. Orthop. Surg.* **2016**, *8*, 153–156. https://doi.org/10.4055/cios.2016.8.2.153.
43. Mouli, V.H.; Schudrowitz, N.; Carrera, C.X.; Uzosike, A.C.; Fitz, W.; Rajaee, S.S. High-Dose Vitamin D Supplementation Can Correct Hypovitaminosis D Prior to Total Knee Arthroplasty. *J. Arthroplast.* **2022**, *37*, 274–278. https://doi.org/10.1016/j.arth.2021.10.016.
44. Hegde, V.; Arshi, A.; Wang, C.; Buser, Z.; Wang, J.C.; Jensen, A.R.; Adams, J.S.; Zeegen, E.N.; Bernthal, N.M. Preoperative Vitamin D Deficiency Is Associated With Higher Postoperative Complication Rates in Total Knee Arthroplasty. *Orthopedics* **2018**, *41*, e489–e495. https://doi.org/10.3928/01477447-20180424-04.
45. Fadason, T.; Farrow, S.; Gokuladhas, S.; Golovina, E.; Nyaga, D.; O'Sullivan, J.M.; Schierding, W. Assigning Function to SNPs: Considerations When Interpreting Genetic Variation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2022**, *121*, 135–142. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.08.008.
46. Ramensky, V.; Bork, P.; Sunyaev, S. Human Non-synonymous SNPs: Server and Survey. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 3894–3900. https://doi.org/10.1093/nar/gkf493.
47. Hunt, R.; Sauna, Z.E.; Ambudkar, S.V.; Gottesman, M.M.; Kimchi-Sarfaty, C. Silent (Synonymous) SNPs: Should We Care about Them? *Methods Mol. Biol.* **2009**, *578*, 23–39. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-411-1_2.
48. Shastry, B.S. SNPs: Impact on Gene Function and Phenotype. In *Single Nucleotide Polymorphisms: Methods and Protocols*; Komar, A.A., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2009; pp. 3–22, ISBN 978-1-60327-411-1.
49. Newton, D.A.; Baatz, J.E.; Kindy, M.S.; Gattoni-Celli, S.; Shary, J.R.; Hollis, B.W.; Wagner, C.L. Vitamin D Binding Protein Polymorphisms Significantly Impact Vitamin D Status in Children. *Pediatr. Res.* **2019**, *86*, 662–669. https://doi.org/10.1038/s41390-019-0322-y.
50. Shnar, V.A.; Алексеевна, В., III; Paskidov, D.V.; Владимирович, П.Д.; Bograya, M.M.; Михайловна, Б.М.; Gazatova, N.D.; Денисламовна, Г.Н.; Voronova, S.S.; Сергеевна, В.С.; et al. The association of the rs4588 and rs7041 polymorphisms of the VDBP gene and vitamin D status in obese individuals. *Cytokines Inflamm.* **2024**, *21*, 46–53. https://doi.org/10.17816/CI634869.
51. Zhou, C.; Gan, X.; Ye, Z.; Zhang, Y.; Yang, S.; He, P.; Zhang, Y.; Liu, M.; Wu, Q.; Qin, X. Serum 25-Hydroxyvitamin D, Vitamin D Receptor, and Vitamin-D-Binding Protein Gene Polymorphisms and Risk of Dementia Among Older Adults With Prediabetes. *J. Gerontol. Ser. A* **2024**, *79*, glae015. https://doi.org/10.1093/gerona/glae015.
52. Karcıoğlu Batur, L.; Dokur, M.; Koç, S.; Karabay, M.; Akcay, Z.N.; Gunger, E.; Hekim, N. Investigation of the Relationship between Vitamin D Deficiency and Vitamin D-Binding Protein Polymorphisms in Severe COVID-19 Patients. *Diagnostics* **2024**, *14*, 1941. https://doi.org/10.3390/diagnostics14171941.
53. Karras, S.N.; Dursun, E.; Alaylıoglu, M.; Gezen-Ak, D.; Al Anouti, F.; Pilz, S.; Pludowski, P.; Jude, E.; Kotsa, K. Upregulation of Irisin and Vitamin D-Binding Protein Concentrations by Increasing Maternal 25-Hydrovitamin D Concentrations in Combination with Specific Genotypes of Vitamin D-Binding Protein Polymorphisms. *Nutrients* **2022**, *14*, 90. https://doi.org/10.3390/nu14010090.
54. Maghbooli, Z.; Omidifar, A.; Varzandi, T.; Salehnezhad, T.; Sahraian, M.A. Reduction in Circulating Vitamin D Binding Protein in Patients with Multiple Sclerosis. *BMC Neurol.* **2021**, *21*, 168. https://doi.org/10.1186/s12883-021-02200-0.

55. Yoo, J.-W.; Jung, Y.-K.; Ju, S.; Lee, S.J.; Cho, Y.J.; Jeong, Y.Y.; Lee, J.D.; Cho, M.-C. Serum Vitamin D Binding Protein Level, but Not Serum Total, Bioavailable, Free Vitamin D, Is Higher in 30-Days Survivors than in Nonsurvivors with Sepsis. *Medicine* **2020**, *99*, e20756. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000020756.
56. Aggarwal, R.; Bains, K. Protein, Lysine and Vitamin D: Critical Role in Muscle and Bone Health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2022**, *62*, 2548–2559. https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1855101.
57. Taylor, S.N. Vitamin D in Toddlers, Preschool Children, and Adolescents. *Ann. Nutr. Metab.* **2020**, *76*, 30–41. https://doi.org/10.1159/000505635.
58. Slominski, A.T.; Kim, T.-K.; Shehabi, H.Z.; Semak, I.; Tang, E.K.Y.; Nguyen, M.N.; Benson, H.A.E.; Korik, E.; Janjetovic, Z.; Chen, J.; et al. In Vivo Evidence for a Novel Pathway of Vitamin D3 Metabolism Initiated by P450scc and Modified by CYP27B1. *FASEB J.* **2012**, *26*, 3901–3915. https://doi.org/10.1096/fj.12-208975.
59. Slominski, R.M.; Tuckey, R.C.; Manna, P.R.; Jetten, A.M.; Postlethwaite, A.; Raman, C.; Slominski, A.T. Extra-Adrenal Glucocorticoid Biosynthesis: Implications for Autoimmune and Inflammatory Disorders. *Genes Immun.* **2020**, *21*, 150–168. https://doi.org/10.1038/s41435-020-0096-6.
60. da Cunha, B.M.; Gava, A.D.; de Oliveira, S.B.; de David, A.C.; dos Santos-Neto, L.L. Vitamin d Is Related to Gait Recovery after Total Hip Arthroplasty: A Prospective Analysis. *Gait Posture* **2016**, *50*, 96–101. https://doi.org/10.1016/j.gaitpost.2016.08.014.
61. Unnanuntana, A.; Rebolledo, B.J.; Gladnick, B.P.; Nguyen, J.T.; Sculco, T.P.; Cornell, C.N.; Lane, J.M. Does Vitamin D Status Affect the Attainment of In-Hospital Functional Milestones After Total Hip Arthroplasty? *J. Arthroplast.* **2012**, *27*, 482–489. https://doi.org/10.1016/j.arth.2011.05.023.
62. Hussain, S.M.; Daly, R.M.; Wang, Y.; Shaw, J.E.; Magliano, D.J.; Graves, S.; Ebeling, P.R.; Wluka, A.E.; Cicuttini, F.M. Association between Serum Concentration of 25-Hydroxyvitamin D and the Risk of Hip Arthroplasty for Osteoarthritis: Result from a Prospective Cohort Study. *Osteoarthr. Cartil.* **2015**, *23*, 2134–2140. https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.06.006.
63. Zebaze, R.M.; Ghasem-Zadeh, A.; Bohte, A.; Iuliano-Burns, S.; Mirams, M.; Price, R.I.; Mackie, E.J.; Seeman, E. Intracortical Remodelling and Porosity in the Distal Radius and Post-Mortem Femurs of Women: A Cross-Sectional Study. *Lancet* **2010**, *375*, 1729–1736. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60320-0.
64. Compston, J.E.; Mellish, R.W.E.; Garrahan, N.J. Age-Related Changes in Iliac Crest Trabecular Microanatomic Bone Structure in Man. *Bone* **1987**, *8*, 289–292. https://doi.org/10.1016/8756-3282(87)90004-4.
65. Parfitt, A.M.; Mathews, C.H.; Villanueva, A.R.; Kleerekoper, M.; Frame, B.; Rao, D.S. Relationships between Surface, Volume, and Thickness of Iliac Trabecular Bone in Aging and in Osteoporosis. Implications for the Microanatomic and Cellular Mechanisms of Bone Loss. *J. Clin. Investig.* **1983**, *72*, 1396–1409. https://doi.org/10.1172/JCI111096.
66. Maier, G.S.; Maus, U.; Lazovic, D.; Horas, K.; Roth, K.E.; Kurth, A.A. Is There an Association between Low Serum 25-OH-D Levels and the Length of Hospital Stay in Orthopaedic Patients after Arthroplasty? *J. Orthop. Traumatol.* **2016**, *17*, 297–302. https://doi.org/10.1007/s10195-016-0414-y.
67. Traven, S.A.; Chiaramonti, A.M.; Barfield, W.R.; Kirkland, P.A.; Demos, H.A.; Schutte, H.D.; Drew, J.M. Fewer Complications Following Revision Hip and Knee Arthroplasty in Patients With Normal Vitamin D Levels. *J. Arthroplast.* **2017**, *32*, S193–S196. https://doi.org/10.1016/j.arth.2017.02.038.
68. Zajonz, D.; Prager, F.; Edel, M.; Möbius, R.; Daikos, A.; Fakler, J.K.; Josten, C.; Kratzsch, J.; Roth, A. The Significance of the Vitamin D Metabolism in the Development of Periprosthetic Infections after THA and TKA: A Prospective Matched-Pair Analysis of 240 Patients. *Clin. Interv. Aging* **2018**, *13*, 1429–1435. https://doi.org/10.2147/CIA.S171307.
69. Visser, E.; de Roos, N.M.; Oosting, E.; Endenburg, S.C.; Dronkers, J.J. Association Between Preoperative Vitamin D Status and Short-Term Physical Performance after Total Hip Arthroplasty: A Prospective Study. *Ann. Nutr. Metab.* **2018**, *73*, 252–260. https://doi.org/10.1159/000492938.
70. Martínez-Aguilar, M.M.; Aparicio-Bautista, D.I.; Ramírez-Salazar, E.G.; Reyes-Grajeda, J.P.; De la Cruz-Montoya, A.H.; Antuna-Puente, B.; Hidalgo-Bravo, A.; Rivera-Paredez, B.; Ramírez-Palacios, P.; Quiterio, M.; et al. Serum Proteomic Analysis Reveals Vitamin D-Binding Protein (VDBP) as a Potential Biomarker for Low Bone Mineral Density in Mexican Postmenopausal Women. *Nutrients* **2019**, *11*, 2853. https://doi.org/10.3390/nu11122853.
71. Bhan, I. Vitamin D Binding Protein and Bone Health. *Int. J. Endocrinol.* **2014**, *2014*, e561214. https://doi.org/10.1155/2014/561214.
72. Takiar, R.; Lutsey, P.L.; Zhao, D.; Guallar, E.; Schneider, A.L.C.; Grams, M.E.; Appel, L.J.; Selvin, E.; Michos, E.D. The Associations of 25-Hydroxyvitamin D Levels, Vitamin D Binding Protein Gene Polymorphisms, and Race with Risk of Incident Fracture-Related Hospitalization: Twenty-Year Follow-up in a Bi-Ethnic Cohort (the ARIC Study). *Bone* **2015**, *78*, 94–101. https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.04.029.

73. Li, C.; Chen, P.; Duan, X.; Wang, J.; Shu, B.; Li, X.; Ba, Q.; Li, J.; Wang, Y.; Wang, H. Bioavailable 25(OH)D but Not Total 25(OH)D Is an Independent Determinant for Bone Mineral Density in Chinese Postmenopausal Women. *eBioMedicine* **2017**, *15*, 184–192. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.11.029.
74. Unnanuntana, A.; Saleh, A.; Nguyen, J.T.; Sculco, T.P.; Cornell, C.N.; Mancuso, C.A.; Lane, J.M. Low Vitamin D Status Does Not Adversely Affect Short-Term Functional Outcome After Total Hip Arthroplasty. *J. Arthroplast.* **2013**, *28*, 315–322.e2. https://doi.org/10.1016/j.arth.2012.04.027.
75. Kim, H.S.; Jang, G.; Park, J.W.; Lee, Y.-K.; Koo, K.-H. Vitamin D Deficiency and Sarcopenia in Hip Fracture Patients. *J. Bone Metab.* **2021**, *28*, 79–83. https://doi.org/10.11005/jbm.2021.28.1.79.

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Oświadczenia kandydata oraz współautorów dotyczące ich wkładu w przygotowanie opublikowanych artykułów naukowych

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 18.03.2025

Dr Ewa Fiedorowicz

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Nauki Biologiczne
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem „*VDR* Gene Polymorphisms (*BsmI*, *FokI*, *TaqI*, *ApaI*) in Total Hip Arthroplasty Outcome Patients"

Rozmus Dominika, **Fiedorowicz Ewa**, Grzybowski Roman, Płomiński Janusz, Cieślińska Anna. *VDR* Gene Polymorphisms (*BsmI*, *FokI*, *TaqI*, *ApaI*) in Total Hip Arthroplasty Outcome Patients. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25(15):8225. https://doi.org/10.3390/ijms25158225

mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: na przeprowadzeniu analizy formalnej, uczestnictwie w badaniach, a także w pisaniu i edycji manuskryptu, udziale w tworzeniu oryginalnego szkicu oraz w przeglądzie i edycji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez **Dominikę Rozmus** jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata: **Dominiki Rozmus** polegający na przygotowaniu projektu badań, realizacji eksperymentów, opracowaniu metodologii, oprogramowania i analizy formalnej, a także zarządzaniu danymi. Uczestniczyła w pisaniu oryginalnego szkicu oraz w przeglądzie i edycji manuskryptu. Odpowiadała również za wizualizację oraz administrację badań.

Ewa Fiedorowicz
.....
podpis

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 18.03.2025

Dr hab. n. med. Janusz Płomiński, prof. CMKP

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Nauki Biologiczne
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem „*VDR* Gene Polymorphisms (*BsmI*, *FokI*, *TaqI*, *ApaI*) in Total Hip Arthroplasty Outcome Patients"

Rozmus Dominika, Fiedorowicz Ewa, Grzybowski Roman, Płomiński Janusz, Cieślińska Anna. *VDR* Gene Polymorphisms (*BsmI*, *FokI*, *TaqI*, *ApaI*) in Total Hip Arthroplasty Outcome Patients. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25(15):8225. https://doi.org/10.3390/ijms25158225

mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: dostarczeniu zasobów badawczych, udziale w pisaniu oryginalnego szkicu, przeglądzie i edycji manuskryptu, nadzorze nad projektem i badaniami

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez Dominikę Rozmus jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata: **Dominiki Rozmus** polegający na przygotowaniu projektu badań, realizacji eksperymentów, opracowaniu metodologii, oprogramowania i analizy formalnej, a także zarządzaniu danymi. Uczestniczyła w pisaniu oryginalnego szkicu oraz w przeglądzie i edycji manuskryptu. Odpowiadała również za wizualizację oraz administrację badań.

podpis

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 18.03.2025

Dr n. med. lek. Roman Grzybowski

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Nauki Biologiczne
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem „*VDR* Gene Polymorphisms (*BsmI, FokI, TaqI, ApaI*) in Total Hip Arthroplasty Outcome Patients"

Rozmus Dominika, Fiedorowicz Ewa, **Grzybowski Roman**, Płomiński Janusz, Cieślińska Anna. *VDR* Gene Polymorphisms (*BsmI, FokI, TaqI, ApaI*) in Total Hip Arthroplasty Outcome Patients. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024; 25(15):8225. https://doi.org/10.3390/ijms25158225

mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: dostarczeniu zasobów badawczych, uczestnictwie w pisaniu oryginalnego szkicu oraz w przeglądzie i edycji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez **Dominikę Rozmus** jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata: **Dominiki Rozmus** polegający na przygotowaniu projektu badań, realizacji eksperymentów laboratoryjnych, opracowaniu metodologii, oprogramowania i analizy formalnej, a także zarządzaniu danymi. Uczestniczyła w pisaniu oryginalnego szkicu oraz w przeglądzie i edycji manuskryptu. Odpowiadała również za wizualizację oraz administrację badań.

ORDYNATOR
Oddziału Ortopedii i Traumatologii Narządu Ruchu
Szpitala Specjalistycznego im. K. Czynowy
w Wałbrzychu
dr n. med. Roman Grzybowski
SPECJALISTA CHIRURGII KRAZOWEJ I ORTOPEDII

podpis

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 18.03.2025

dr hab. Anna Cieślińska, prof. UWM

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Nauki Biologiczne
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem „*VDR* Gene Polymorphisms (*BsmI*, *FokI*, *TaqI*, *ApaI*) in Total Hip Arthroplasty Outcome Patients"

Rozmus Dominika, Fiedorowicz Ewa, Grzybowski Roman, Płomiński Janusz, **Cieślińska Anna**. *VDR* Gene Polymorphisms (*BsmI*, *FokI*, *TaqI*, *ApaI*) in Total Hip Arthroplasty Outcome Patients. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25(15):8225. https://doi.org/10.3390/ijms25158225

mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: przygotowaniu projektu badań, realizacji eksperymentów, opracowaniu metodologii, oprogramowania i analizy formalnej, a także zarządzaniu danymi, udziale w pisaniu oryginalnego szkicu oraz w przeglądzie i edycji manuskryptu, wizualizacji oraz administracji projektu, nadzorze nad projektem i badaniami oraz zapewnieniu pozyskania finansowania na badania.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez **Dominikę Rozmus** jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata: **Dominiki Rozmus** polegający na przygotowaniu projektu badań, realizacji eksperymentów, opracowaniu metodologii, oprogramowania i analizy formalnej, a także zarządzaniu danymi. Uczestniczyła w pisaniu oryginalnego szkicu oraz w przeglądzie i edycji manuskryptu. Odpowiadała również za wizualizację oraz administrację badań.

Anna Cieślińska

podpis

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 18.03.2025

dr Ewa Fiedorowicz

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Nauki Biologiczne
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem „*Vitamin D Binding Protein Gene Polymorphisms (rs4588 and rs7041) and VDBP Levels in Total Hip Replacement Outcomes*"

Dominika Rozmus, **Ewa Fiedorowicz**, Janusz Płomiński, Anna Cieślińska. 2025. "Vitamin D Binding Protein Gene Polymorphisms (rs4588 and rs7041) and VDBP Levels in Total Hip Replacement Outcomes" *Nutrients* 17, no. 3: 378. https://doi.org/10.3390/nu17030378

mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na przeprowadzeniu analizy formalnej, uczestnictwie w badaniach oraz w pisaniu i edycji manuskryptu, tworzeniu oryginalnego szkicu oraz w przeglądzie i edycji.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata **Dominiki Rozmus** polegający na przygotowaniu projektu badań, realizacji eksperymentów, opracowaniu metodologii, oprogramowania i analizy formalnej. Była odpowiedzialna za zarządzanie danymi oraz uczestniczyła w pisaniu oryginalnego szkicu. Brała udział w przeglądzie i edycji manuskryptu. Odpowiadała także za administrację projektu oraz przygotowanie wizualizacji.

Ewa Fiedorowicz

.....
podpis

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 18.03.2025

Dr hab. n. med. Janusz Płomiński, prof. CMKP

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Nauki Biologiczne
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem *„Vitamin D Binding Protein Gene Polymorphisms (rs4588 and rs7041) and VDBP Levels in Total Hip Replacement Outcomes"*

Dominika Rozmus, Ewa Fiedorowicz, **Janusz Płomiński**, Anna Cieślińska. 2025. "Vitamin D Binding Protein Gene Polymorphisms (rs4588 and rs7041) and VDBP Levels in Total Hip Replacement Outcomes" *Nutrients* 17, no. 3: 378. https://doi.org/10.3390/nu17030378

mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na dostarczeniu zasobów badawczych, uczestnictwie w pisaniu oryginalnego szkicu oraz w przeglądzie i edycji manuskryptu, a także pełnieniu nadzoru nad projektem i badaniami.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata **Dominiki Rozmus** polegający na przygotowaniu projektu badań, realizacji eksperymentów, opracowaniu metodologii, oprogramowania i analizy formalnej. Była odpowiedzialna za zarządzanie danymi oraz uczestniczyła w pisaniu oryginalnego szkicu. Brała udział w przeglądzie i edycji manuskryptu. Odpowiadała także za administrację projektu oraz przygotowanie wizualizacji.

.....
podpis

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 18.03.2025

dr hab. Anna Cieślińska, prof. UWM

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Nauki Biologiczne
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem „*Vitamin D Binding Protein Gene Polymorphisms (rs4588 and rs7041) and VDBP Levels in Total Hip Replacement Outcomes*"

Dominika Rozmus, Ewa Fiedorowicz, Janusz Płomiński, **Anna Cieślińska**. 2025. "Vitamin D Binding Protein Gene Polymorphisms (rs4588 and rs7041) and VDBP Levels in Total Hip Replacement Outcomes" *Nutrients* 17, no. 3: 378. https://doi.org/10.3390/nu17030378

mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: dostarczeniu zasobów badawczych, zarządzaniu danymi oraz uczestnictwie w pisaniu oryginalnego szkicu, udziale w przeglądzie i edycji manuskryptu , administracji projektu nadzorze nad projektem i badaniami oraz pozyskaniem funduszy na badania.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez **Dominikę Rozmus** jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata: **Dominiki Rozmus** polegający na przygotowaniu projektu badań, realizacji eksperymentów, opracowaniu metodologii, oprogramowania i analizy formalnej. Była odpowiedzialna za zarządzanie danymi oraz uczestniczyła w pisaniu oryginalnego szkicu. Brała udział w przeglądzie i edycji manuskryptu. Odpowiadała także za administrację projektu oraz przygotowanie wizualizacji.

Anna Cieślińska
podpis