Mgr inż. Maria Jopek

Wpływ polimorfizmów 575C>T genu RANK i -643C>T genu RANKL na gęstość mineralną kości u kobiet po menopauzie

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: dr hab. n. med. Monika Szpotańska-Sikorska

I Katedra i Klinika Położnictwa i Ginekologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2026 r.

Słowa kluczowe: osteoporoza, gęstość mineralna kości, RANK, RANKL

Key words: osteoporosis, bone mineral density, RANK, RANKL

Składam serdeczne podziękowania
Pani dr. hab. n.med. Monice Szpotańskiej-Sikorskiej
za opiekę naukową, cenne wskazówki, życzliwość oraz wsparcie
merytoryczne podczas pisania niniejszej pracy doktorskiej.
Dziękuję za poświęcony czas oraz motywację do dalszego rozwoju
naukowego.

Niniejszą rozprawę doktorską dedykuję mojej Rodzinie - bez Waszego
wsparcia, cierpliwości i wyrozumiałości ta praca by nie powstała.

Spis treści

Wykaz rycin i tabel 6

Wykaz skrótów 9

Streszczenie 11

1. Wstęp 13

1.1 Definicja i klasyfikacja osteoporozy 14

1.2 Epidemiologia 15

1.3 Etiopatogeneza 18

1.3.1 Fizjologia remodelingu tkanki kostnej 18

1.3.2 Regulacja remodelingu tkanki kostnej 20

1.3.3 Szlak sygnałowy RANK/RANKL/OPG 21

1.4 Czynniki zwiększające ryzyko rozwoju osteoporozy 24

1.5 Manifestacje kliniczne i powikłania osteoporozy 26

1.6 Diagnostyka osteoporozy 28

1.6.1 Ocena kliniczna i czynniki ryzyka 28

1.6.2 Kalkulator FRAX w ocenie ryzyka złamań 29

1.6.3 Badania obrazowe w osteoporozie. 32

1.6.4 Kryteria rozpoznania osteoporozy 34

1.7 Badania laboratoryjne w diagnostyce różnicowej osteoporozy 36

1.7.1 Markery biochemiczne 36

1.7.2 Badania analityczne w diagnostyce osteoporozy 38

1.8 Leczenie osteoporozy 39

1.8.1 Leczenie farmakologiczne 39

1.8.2 Postępowanie niefarmakologiczne i fizjoterapia 43

1.9 Cele pracy 46

2. Materiały i metody 47

2.1 Grupa badana 47

2.2 Izolacja DNA 48

2.3 Analiza jakościowa i ilościowa 49

2.4 Wykrywanie polimorfizmów 575C>T genu RANK i -643C>T genu RANKL metodą real-time PCR 51

2.5 Analiza statystyczna 55
3. Wyniki 57
3.1 Charakterystyka populacji 57
3.2 Analiza rozkładu częstości genotypów i alleli dla polimorfizmu 575C>T w genie RANK i -643C>T w genie RANKL 60
3.3 Analiza genotypów i ich korelacji z parametrami klinicznymi 67
3.4 Korelacje danych densytometrycznych z wybranymi parametrami klinicznymi 73
4. Dyskusja 74
5. Wnioski 79
Bibliografia 80

Wykaz rycin i tabel

Rycina 1. Szacowana częstość występowania osteoporozy w populacji 50+ w roku 2019 w wybranych państwach europejskich 16
Rycina 2. Estymowana ilość zachorowań na osteoporozę (w mln) w Polsce w latach 2013-2024 17
Rycina 3. Stosunek chorobowości rejestrowanej do wielkości populacji wg płci i grup wiekowych (2024 r.) 18
Rycina 4. Schemat remodelingu tkanki kostnej obejmujący etapy aktywacji, resorpcji, formowania i mineralizacji nowej tkanki kostnej 19
Rycina 5. Czynniki wpływające na szlak sygnałowy RANK/RANKL/OPG. 23
Rycina 6. Typowe lokalizacje złamań osteoporotycznych oraz zestawianie kości o prawidłowej strukturze i kości osteoporotycznej 27
Rycina 7. Schemat oceny ryzyka złamań osteoporotycznych z wykorzystaniem kalkulatora FRAX. Ryzyko przekraczające 10% w zakresie głównych złamań osteoporotycznych lub 3% w odniesieniu do złamania kości szyjki udowej stanowi wskazanie do dalszej diagnostyki i wdrożenia leczenia. 30
Rycina 8. Kryteria oceny ryzyka złamań osteoporotycznych u osób powyżej 50. roku życia na podstawie T-score, obecności złamań niskoenergetycznych oraz kalkulatora FRAX. 35
Rycina 9. Proponowany algorytm postępowania farmakologicznego u kobiet i mężczyzn po 50 r. ż. w zależności od ryzyka złamań. 42
Rycina 10. Analiza krzywych topnienia produktów dla poszczególnych genotypów w genie RANK (rs1805034) w reakcji real-time PCR. 53
Rycina 11. Piki krzywych topnienia dla poszczególnych genotypów w genie RANK (rs1805034) w reakcji real-time PCR. 54
Rycina 12. Analiza krzywych topnienia produktów dla poszczególnych genotypów w genie RANKL (rs9533156) w reakcji real-time PCR. 54
Rycina 13. Piki krzywych topnienia dla poszczególnych genotypów w genie RANKL (rs9533156) w reakcji real-time PCR. 55
Rycina 14. Populacja badana z podziałem na grupy. 57
Rycina 15. Rozkład częstości alleli w grupie kobiet w wieku postmenopauzalnym z uwzględnieniem podziału na grupy kobiet z osteopenią, osteoporozą, kobiety z T-score>-1 dla polimorfizmów RANK (a.) i RANKL (b.). 61

Rycina 16. Rozkład częstości genotypów w grupie kobiet w wieku okołomenopauzalnym z uwzględnieniem podziału na grupy kobiet z osteopenią, osteoporozą, kobiety z T-score>-1 dla polimorfizmów RANK (a.) i RANKL (b.). 64
Rycina 17. Porównanie rozkładu częstości genotypów w grupie badanej (kobiety z osteopenią lub osteoporozą) z grupą kontrolną (kobiety zdrowe) dla polimorfizmu RANK 575C>T..... 66
Rycina 18. Porównanie rozkładu częstości genotypów w grupie badanej (kobiety z osteopenią lub osteoporozą) z grupą kontrolną (kobiety zdrowe) dla polimorfizmu RANKL -643C>T..... 67
Rycina 19. Korelacje danych densytometrycznych z wiekiem i BMI pacjentek w poszczególnych grupach. 73

Tabela 1. Kryteria rozpoznania osteoporozy wg WHO..... 34
Tabela 2. Markery obrotu kostnego. 37
Tabela 3. Diagnostyka różnicowa chorób metabolicznych kości na podstawie oceny gospodarki wapniowo-fosforanowej (46). 39
Tabela 4. Skuteczność przeciwzłamaniowa zatwierdzonych metod leczenia osteoporozy pomenopauzalnej. 41
Tabela 5. Charakterystyka ogólna grupy badanej..... 48
Tabela 6. Warunki reakcji real-time PCR..... 52
Tabela 7. Skład mieszaniny reakcyjnej..... 52
Tabela 8. Charakterystyka badanej populacji kobiet w wieku postmenopauzalnym z uwzględnieniem podziału na 3 grupy kobiet: z osteopenią, z osteoporozą i zdrowe 58
Tabela 9. Rozkład częstości alleli dla polimorfizmów RANK 575C>T i RANKL -643C>T w grupie kobiet z osteopenią, z osteoporozą oraz u kobiet zdrowych w wieku okołomenopauzalnym. 60
Tabela 10. Rozkład częstości genotypów dla polimorfizmów RANK 575C>T i RANKL 62
Tabela 11. Częstość występowania alleli polimorfizmu RANK 575C>T i RANKL -643C>T w grupie kobiet z osteopenią lub osteoporozą, o prawidłowych wartościach T-score oraz ogółem w populacji kobiet w wieku postmenopauzalnym..... 65

Tabela 12. Częstość występowania genotypów polimorfizmu RANK 575C>T i RANKL -643C>T w grupie kobiet z osteopenią lub osteoporozą, o prawidłowych wartościach T-score oraz ogółem w populacji kobiet w wieku postmenopauzalnym 65
Tabela 13. Zestawienie genotypów ze średnimi wartościami parametrów klinicznych w grupie kobiet z osteopenią, osteoporozą i kobiet z prawidłowym T-score dla polimorfizmu 575C>T genu RANK. 67
Tabela 14. Zestawienie genotypów ze średnimi wartościami parametrów klinicznych w grupie kobiet z osteopenią, osteoporozą i kobiet z prawidłowym T-score dla polimorfizmu -643C>T genu RANKL..... 70
Tabela 15. Zestawienie częstości występowania polimorfizmu 575C>T genu RANK wśród różnych populacji. 75
Tabela 16. Zestawienie częstości występowania polimorfizmu -643C>T genu RANKL wśród różnych populacji 77

Wykaz skrótów

WHO- ang. World Health Organization, Światowa Organizacja Zdrowia

TNF- ang. Tumor Necrosis Factors, czynniki martwicy nowotworów

RANK- ang. Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B, aktywator receptora jądrowego czynnika kappa B

RANKL- ang. Receptor Activator of Nuclear Factor−κB Ligand, ligand aktywatora receptora jądrowego czynnika kappa B

OPG- ang. Osteoprotegerin, osteoprotegeryna

OCIF- ang. osteoclastogenesis inhibitory factor

TRAF- ang. TNF receptor associated factors

NFZ- Narodowy Fundusz Zdrowia

GIS- Główny Inspektorat Sanitarny

M-CSF- ang. Macrophage Colony Stimulating Factor, czynnik stymulujący kolonie makrofagowe

BMP-2- ang. Bone Morphogenic protein-2, białko morfogenetyczne kości

PTH- ang. Parathormone, parathormon

TNFα - ang. Tumor Necrosis Factor α, nowotworowy czynnik martwicy α

BMD- ang. Bone Mineral Density, gęstość mineralna kości

BMI- ang. Body Mass Index, wskaźnik masy ciała

DXA- ang. Dual Energy X-ray Absorptiometry, dwuwiązkowa absorpcjometria rentgenowska

IOF- ang. International Osteoporosis Foundation, Międzynarodowa Fundacja Osteoporozy bALP- ang. bone Alkaline Phosphatase, frakcja kostna alkalicznej fosfatazy,

P1CP- ang. Procollagen type I Carboxyterminal Propeptide, C—końcowy propeptyd prokolagenu typu I

PINP- ang. Procollagen I Aminoterminal Propeptide, N -końcowy propeptyd kolagenu typu I OC- ang. Osteocalcin, osteokalcyna

HYD- ang. Hydroxyproline, hydroksyprolina

PYD- ang. Pyridinoline, pirydynolina

DPD- ang. Deoxypyridinoline, deoksypirydynolina

NTX- ang. Collagen Type I Crosslinked C-telopeptide, N- końcowy usieciowiony telopeptyd łańcucha α- kolagenu typu I

CTX- ang. Collagen Type I Crosslinked C-telopeptide, C- kolagenowy usieciowiony telopeptyd łańcucha α-kolagenu typu I

Streszczenie

Osteoporoza to znaczący problem zdrowotny i społeczny, prowadzący do zwiększonego ryzyka złamań kości, niepełnosprawności i obniżonej jakości życia. Choroba wynika z przewagi procesów resorpcji nad tworzeniem kości, co obniża gęstość mineralną kości (BMD). Kluczową rolę w regulacji tych procesów odgrywa szlak sygnałowy RANK/RANKL/OPG, odpowiadający za osteoklastogenezę.

W badaniu przeanalizowano polimorfizmy genów RANK (575C>T, rs1805034) i RANKL (-643C>T, rs9533156) oraz ich wpływ na BMD. W tym celu wykorzystując technikę real-time PCR przeprowadzono analizę genetyczną u 493 kobiet po menopauzie rasy kaukaskiej, które były pacjentkami Szpitala Klinicznego nr 1 Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie. Otrzymane wyniki poddano analizie i sprawdzono potencjalny wpływ badanych polimorfizmów na gęstość mineralną kości oraz ryzyko wystąpienia osteopenii lub osteoporozy. Nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności między częstością badanych genotypów a BMD czy występowaniem osteoporozy w badanej populacji.

Wyniki przeprowadzonych badań sugerują, że badane polimorfizmy szlaku sygnałowego RANK/RANKL/OPG, odpowiadającego za osteoklastogenezę nie wpływają na rozwój osteoporozy i osteopenii. Konieczne jest zatem kontynuowanie badań nad markerami genetycznymi, które umożliwią określenie zwiększonego ryzyka wystąpienia tej choroby oraz mogłyby wspierać rozwój terapii spersonalizowanej.

Summary

“The Impact of 575C>T Polymorphism in the RANK Gene and -643C>T Polymorphism in the RANKL Gene on Bone Mineral Density in Postmenopausal Women”

Osteoporosis is a significant health and social issue, leading to an increased risk of bone fractures, disability, and reduced quality of life. The disease results from an imbalance between bone resorption and formation processes, which reduces bone mineral density (BMD). The RANK/RANKL/OPG signaling pathway plays a crucial role in regulating these processes, as it is responsible for osteoclastogenesis.

This study analyzed polymorphisms in the RANK gene (575C>T, rs1805034) and the RANKL gene (-643C>T, rs9533156), as well as their impact on BMD. Genetic analysis was conducted using real-time PCR on 493 postmenopausal Caucasian women who were patients of Clinical Hospital No. 1 of the Pomeranian Medical University in Szczecin, Poland. The obtained results were analyzed to assess the potential influence of the studied polymorphisms on bone mineral density and the risk of developing osteopenia or osteoporosis.

No statistically significant associations were found between genotype frequencies and BMD or the occurrence of osteoporosis in the studied population.

The results suggest that the analyzed polymorphisms do not affect the development of osteoporosis or osteopenia. Further research on genetic markers is essential to better determine the increased risk of developing this disease and to potentially support the development of personalized therapies.

1. Wstęp

Osteoporoza stanowi jedno z najczęstszych przewlekłych schorzeń układu kostnego i jest istotnym problemem zdrowia publicznego w starzejących się populacjach. Znaczenie tej choroby wynika głównie z jej powikłań w postaci złamań niskoenergetycznych, które prowadzą do znaczącego obniżenia jakości życia pacjentów oraz generowania wysokich kosztów leczenia. (1).

Częstość występowania osteoporozy zależy od wieku, płci oraz badanej populacji. Szacuje się, że na świecie częstość występowania osteoporozy u dorosłych wynosi około 19,7%, przy czym dużą rolę odgrywa zróżnicowanie regionalne- od około 8,0% w Oceanii do 26,9% w Afryce. Zauważa się również wyższy wskaźnik występowania tej choroby w krajach rozwijających się w porównaniu z krajami rozwiniętymi (2). Pod względem płci osteoporoza występuje częściej u kobiet niż u mężczyzn i ryzyko jej wystąpienia wzrasta wraz z wiekiem (3).

Rozwój osteoporozy zależy od współdziałania szeregu czynników (dziedzicznych) oraz modyfikowalnych (zależnych od stylu życia człowieka). Do pierwszej grupy należą głównie cechy biologiczne takie jak płeć żeńska, rasa biała lub azjatycka, wczesne zakończenie miesiączkowania (przed 40. rokiem życia, szczególnie w wyniku owariektomii) a także przypadki osteoporozy w rodzinie i choroby współistniejące (np. nadczynność tarczycy, niewydolność nerek). Jednocześnie wiele czynników zależy od stylu życia, tj.: stosowanie niektórych leków (np. glikokortykosteroidów, leków przeciwpadaczkowych), czynniki hormonalne, zmniejszona aktywność fizyczna, stosowanie używek (np. palenie papierosów, spożywanie dużej ilości alkoholu) oraz niskie spożycie wapnia i witaminy D (1). Uwzględnienie powyższych czynników ma ogromne znaczenie w ocenie ryzyka osteoporozy oraz działań profilaktycznych i terapeutycznych.

Na szczególną uwagę zasługuje genetyczne podłoże tej choroby. Jednym z głównych mechanizmów regulujących metabolizm tkanki kostnej jest szlak RANK/RANKL/OPG. Jego zasadniczą rolą jest udział w procesie różnicowania i aktywacji osteoklastów. Za regulację tego szlaku odpowiadają cząsteczki należące do rodziny ligandów i receptorów martwicy nowotworu (TNF, ang. Tumor necrosis factors): RANK (ang. receptor activator of nuclear factor kappa B), RANKL (ang. receptor activator of nuclear factor−κB ligand) oraz OPG (ang. osteoprotegerin) (4). Zaburzenie funkcjonowania tego układu może

prowadzić do zwiększonej aktywności osteoklastów, a co się z tym wiąże do zwiększonej resorpcji kości.

Ważną kwestią wydaje się zatem poznanie polimorfizmów genetycznych genów kodujących cząsteczki biorące udział w szlaku RANK/RANKL/OPG, gdyż mogą one wpływać na regulację metabolizmu kostnego oraz predysponować do rozwoju osteoporozy. Identyfikacja takich wariantów genetycznych może w przyszłości przyczynić się do wcześniejszego rozpoznania osób z podwyższonym ryzykiem choroby oraz umożliwić bardziej ukierunkowane postępowanie profilaktyczne i terapeutyczne, co mogłoby znacząco poprawić efektywność leczenia.

1.1 Definicja i klasyfikacja osteoporozy

W roku 1994 WHO zdefiniowało osteoporozę jako schorzenie będące układową chorobą szkieletu, w której dochodzi do zmniejszenia masy kości, upośledzenia mikroarchitektury tkanki kostnej, a w konsekwencji do pogorszenia ich jakości. Wiąże się to ze zmniejszeniem wytrzymałości i odporności na złamania (dotyczy to w szczególności kości biodrowej i kręgosłupa) (5,6).

Osteoporozę można sklasyfikować ze względu na lokalizację oraz etiologię. Ze względu na lokalizację możemy wyróżnić jej dwa typy: miejscową- obejmującą okolice układu kostnego, które są pod wpływem czynników działających na nie patogennie (np. stan zapalny) i uogólnioną, która dotyczy całego układu kostnego w konsekwencji defektów metabolicznych, unieruchomienia czy procesów inwolucyjnych.

Klasyfikacja etiologiczna wyróżnia osteoporozę idiopatyczną (młodzieńczą), inwolucyjną oraz wtórną.

Osteoporoza idiopatyczna (młodzieńcza) występuje głównie u dzieci i młodzieży, a jej przyczyna nie została do tej pory poznana. Choroba ta wiąże się z zaburzeniem wzrastania w stosunku do norm wiekowych.

Osteoporoza inwolucyjna jest związana z przyspieszonym ubytkiem masy kostnej i można wyróżnić jej dwa typy. Osteoporoza inwolucyjna typu I (postmenopauzalna) dotyczy kobiet w piątej do siódmej dekadzie życia i jest następstwem ubytku masy kostnej związanej z zakończeniem czynności endokrynologicznej jajników. W jej przebiegu dochodzi głównie do złamań bliższego odcinka kości promieniowej oraz złamania kompresyjne kręgów, szczególnie odcinka piersiowego i lędźwiowego- od Th4 do L5.

Osteoporoza inwolucyjna typu II dotyka zarówno kobiety, jak i mężczyzn głównie po 70. roku życia. Jej główną przyczyną jest zmniejszona aktywność osteoblastów oraz obniżony poziom witaminy D_3. Złamania dotyczą głównie bliższej części kości udowej i trzonów kręgów (1).

Osteoporoza wtórna jest spowodowana czynnikami innymi niż proces starzenia. Choroba ta może być następstwem chorób przewlekłych, trwających dłużej niż 6 tygodni takich jak: choroby przewodu pokarmowego bądź tkanki łącznej, reumatoidalne zapalenie stawów, nadczynność przytarczyc, nadczynność tarczycy, nowotwory, choroby nerek i wątroby, cukrzyca czy przewlekłe niedożywienie. Osteoporoza wtórna może objawiać się bólem, obniżeniem napięcia mięśniowego, złamaniami i deformacją układu kostnego oraz spadkiem wartości szczytowej masy kostnej. Szczególną postacią osteoporozy wtórnej jest osteoporoza jatrogenna, która wystąpić w następstwie przewlekłego stosowania niektórych leków (np. glikokortykosteroidów, leków przeciwdrgawkowych, heparyny) lub z powodu długotrwałego unieruchomienia z przyczyn chirurgicznych bądź ortopedycznych (7).

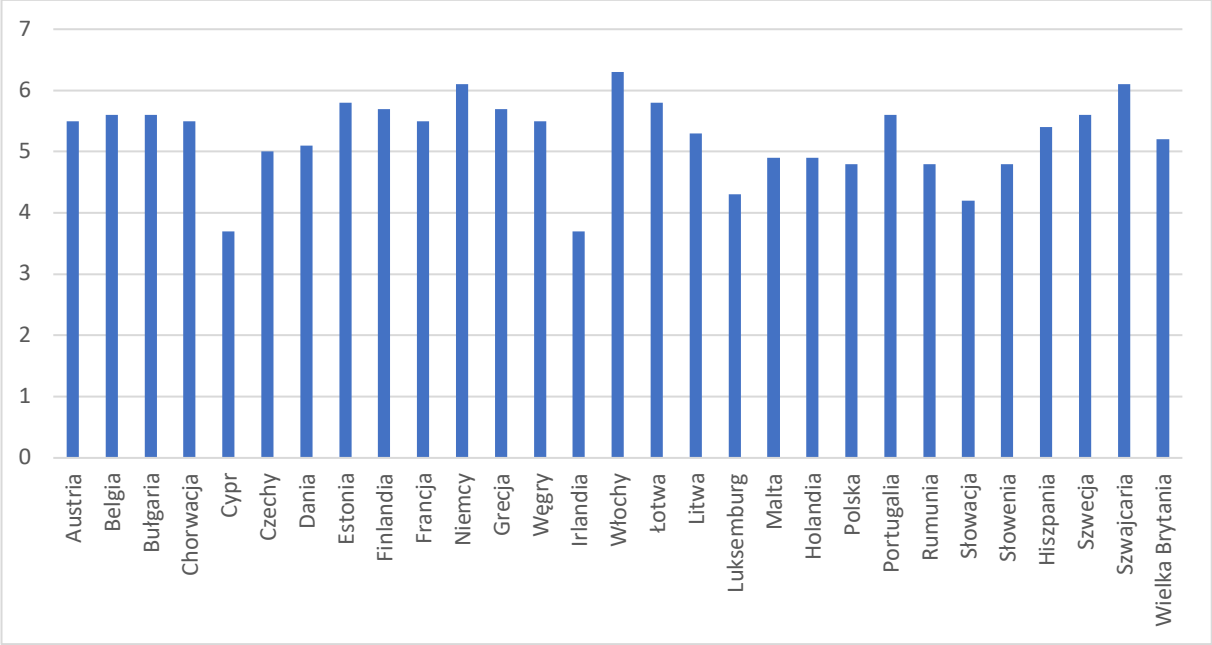
1.2 Epidemiologia

Osteoporoza jest problemem ogólnoświatowym i ze względu na dużą częstość występowania została uznana przez WHO za chorobę cywilizacyjną. Choroba ta jest głównie problemem starzejących się społeczeństw, ponieważ częstość jej występowania wzrasta wraz wiekiem.

Na świecie osteoporoza występuje częściej u kobiet niż u mężczyzn. Szacuje się, że choroba ta dotyka 15,4% kobiet i 4,3% mężczyzn, co w dużej mierze związane jest ze spadkiem stężenia estrogenów we krwi po menopauzie. Mimo większej częstości osteoporozy u kobiet, konsekwencje kliniczne tego schorzenia u mężczyzn są znacznie poważniejsze. W Stanach Zjednoczonych osteoporoza dotyczy 1-2 mln mężczyzn i chociaż stanowią oni około 29% złamań osteoporotycznych w tym kraju, to wskaźnik śmiertelności jest znacznie wyższy niż u kobiet. Szacuje się, że jeden na trzech mężczyzn, którzy doznają złamania biodra, umrze w ciągu roku od urazu (3).

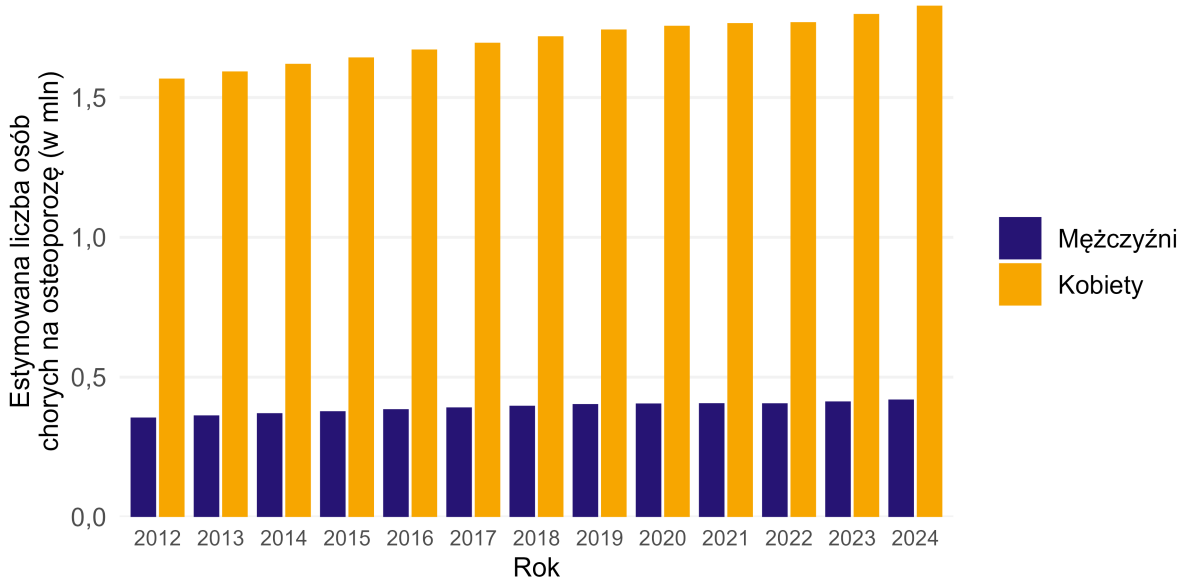
Skalę problemu w Europie szczegółowo pokazały dane otrzymane w ramach projektu SCOPE (ang. Scorecard for osteoporosis in Europe) opublikowane w raporcie z 2021 roku. Projekt ten obejmował 27 krajów Unii Europejskiej oraz Szwajcarię i Wielką Brytanię. Umożliwiał on kompleksową analizę i porównanie jakości opieki nad

pacjentami z osteoporozą oraz kosztów leczenia. Według danych SCOPE w 2019 roku osteoporoza dotknęła 32 milionów mieszkańców w tym 6,5 mln mężczyzn i 25,5 mln kobiet powyżej 50 roku życia. Spośród wszystkich państw objętych badaniem najwięcej chorych odnotowano w Niemczech, gdzie na osteoporozę zachorowało 1,2 mln mężczyzn oraz 4,5 mln kobiet (8). Szacowaną częstość występowania osteoporozy w populacji powyżej 50. roku życia w roku 2019 w wybranych państwach europejskich przedstawia Rycina 1.



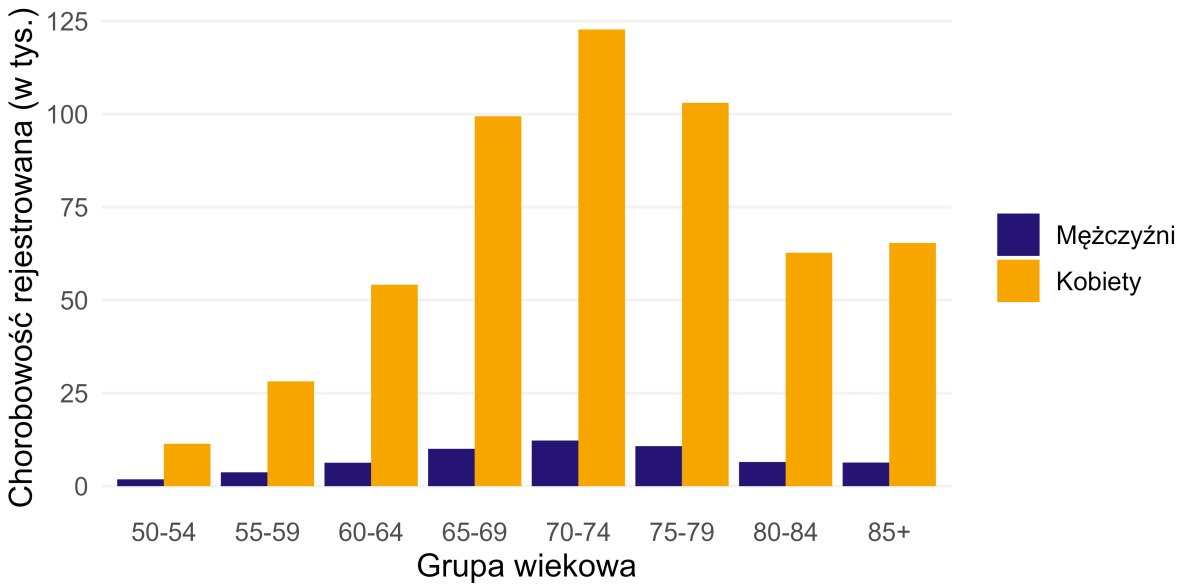
Rycina 1. Szacowana częstość występowania osteoporozy w populacji 50+ w roku 2019 w wybranych państwach europejskich (na podstawie Kanis i wsp., 2021) (8).

W Polsce osteoporoza stanowi bardzo poważny problem. Na podstawie danych Narodowego Funduszu Zdrowia (NFZ) oraz Głównego Inspektoratu Sanitarnego (GIS) oszacowano ilość zachorowań w Polsce na lata 2012-2024 z podziałem na płeć. Dane te wskazują na stopniowy wzrost liczby chorych w analizowanym okresie (od 1,93 mln w 2012 do 2,25 mln w 2024 roku). Oszacowano, że w ciągu 12 lat w przypadku kobiet liczba pacjentek, u których stwierdzono osteoporozę wzrosła z około 1,57 mln w 2012 do 1,83 mln w 2024 roku. W tym samym czasie liczba chorych mężczyzn wzrosła z około 0,36 mln w 2012 do 0,42 mln w 2024 roku (9). Przedstawione dane wyraźnie pokazują, że osteoporoza znacznie częściej występuje u kobiet, ale wzrost zanotowano w obu analizowanych grupach. Szacowaną liczbę osób chorych na osteoporozę z podziałem na płeć przedstawiono na Rycinie 2.



Rycina 2. Estymowana ilość zachorowań na osteoporozę (w mln) w Polsce w latach 2013-2024 (wg obliczeń NFZ i GUS) (9).

Analiza chorobowości rejestrowanej w Polsce wskazuje na wyraźną zależność częstości występowania osteoporozy od wieku. Obserwuje się systematyczny wzrost zachorowań wraz z wiekiem, a największą częstość obserwuje się w grupach wiekowych powyżej 65 r. roku życia. Znaczne różnice w częstości występowania pomiędzy grupami kobiet i mężczyzn zauważa się w starszych grupach wiekowych, gdzie liczba przypadków osteoporozy w populacji kobiet jest wielokrotnie wyższa niż u mężczyzn. Chorobowość rejestrowaną w zależności od płci i grup wiekowych przedstawia Rycina 3.



Rycina 3. Stosunek chorobowości rejestrowanej do wielkości populacji wg płci i grup wiekowych (2024 r.) (wg obliczeń NFZ i GUS) (9).

Dane wskazują, że wśród mężczyzn odnotowuje się zwiększenie liczby chorych z 0,1% w grupie wiekowej 50-54 lat do 2,7% w grupie wiekowej powyżej 85. Roku życia. U kobiet wartości te są znacznie wyższe i rosną z 0,9% w grupie osób w wieku 50-54 lat do ponad 11% w grupie wiekowej powyżej 75 roku życia i starszych. Dane te pokazują silny związek ze starzeniem się organizmu oraz zmianami hormonalnymi zachodzącymi u kobiet po menopauzie (9).

Wyniki wskazują, że osteoporoza stanowi wciąż rosnący problem zdrowia publicznego. Wraz ze starzeniem się populacji spodziewa się dalszego wzrostu zachorowań w kolejnych dekadach. Z tego względu szczególnego znaczenia nabiera identyfikacja czynników ryzyka oraz mechanizmów, które miałby wpływ na zaburzenie metabolizmu tkanki kostnej.

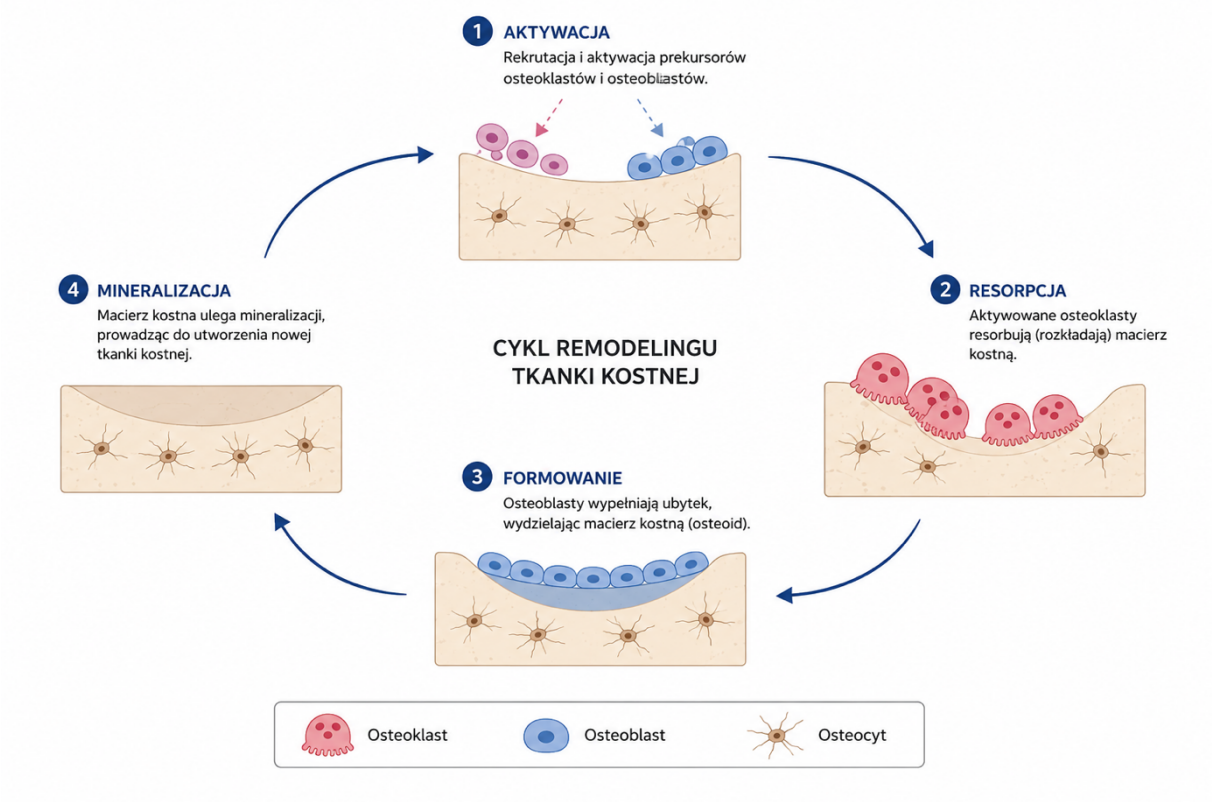
1.3 Etiopatogeneza

1.3.1 Fizjologia remodelingu tkanki kostnej

Tkanka kostna jest strukturą metabolicznie aktywną i ulega przebudowie przez całe życie człowieka. Proces ten nazywany jest remodelingiem i polega na cyklicznym usuwaniu starej lub uszkodzonej tkanki i zastępowaniu jej nowo powstałą tkanką. Jest to proces kluczowy dla utrzymania prawidłowej struktury i wytrzymałości kości, a jego

prawidłowy przebieg jest uzależniony od wielu czynników, które regulują jego równowagę pomiędzy resorpcją a tworzeniem tkanki kostnej (10,11).

Cykl przebudowy obejmuje kilka następujących po sobie etapów, do których zalicza się: aktywację osteoblastów i osteocytów, dojrzewanie osteoklastów, resorpcję oraz formowanie i mineralizację nowej tkanki kostnej. Na rycinie 4. przedstawiono schemat remodelingu tkanki kostnej oraz jego główne etapy.



Rycina 4. Schemat remodelingu tkanki kostnej obejmujący etapy aktywacji, resorpcji, formowania i mineralizacji nowej tkanki kostnej. Źródło: opracowanie własne na podstawie literatury (10–12).

W pierwszym etapie dochodzi do rekrutacji prekursorów osteoklastów i osteoblastów do miejsca przebudowy kości. Po ich aktywacji, komórki te zaczynają syntetyzować i wydzielać cząsteczki, które pobudzają receptory na powierzchni osteoklastów i preosteoklastów co prowadzi do ich różnicowania i dojrzewania. Osteoklasty ulegają aktywacji i rozpoczynają proces resorpcji kości polegający na wydzielaniu przez te komórki enzymów proteolitycznych degradujących macierz kostną oraz kwasów rozpuszczających jej składniki mineralne kości. Po zakończeniu tego etapu do zresorbowanej kości przyłącza się pojedyncza warstwa osteoblastów, które wypełniają

świeży ubytek poprzez wydzielanie cienkiej warstwy kolagenowej macierzy kostnej. Macierz ta ulegnie mineralizacji prowadząc do utworzenia nowej tkanki kostnej.
W procesie remodelingu biorą udział trzy rodzaje komórek: osteoklasty, osteoblasty i osteocyty. Osteoklasty wywodzą się z linii mieloidalnych komórek macierzystych układu krwiotwórczego i pełnią funkcję komórek kościogubnych. Z kolei osteoblasty powstają z komórek mezenchymalnych i odpowiadają za tworzenie tkanki kostnej (11). Część osteoblastów ulega przemianom zarówno pod względem morfologicznym jak i funkcjonalnym przekształcając się w osteocyty- dojrzałe komórki kostne zlokalizowane w jamkach kostnych. Do ich najważniejszych funkcji należy odbieranie bodźców mechanicznych, regulacja metabolizmu mineralnego oraz utrzymanie komunikacji z innymi komórkami w obrębie macierzy kostnej, co jest niezbędne do utrzymania prawidłowej architektury kostnej (12).
Remodeling tkanki kostnej jest kluczowym procesem dla utrzymania wytrzymałości szkieletu oraz pozwala na utrzymaniu prawidłowej funkcji metabolicznej tkanki kostnej (11). Proces ten umożliwia jej adaptację do zmiany obciążeń mechanicznych, zmian hormonalnych oraz zmiennego zapotrzebowania metabolicznego organizmu. Mechanizm ten umożliwia również naprawę mikrouszkodzeń w strukturze kości oraz odpowiada za utrzymanie prawidłowej homeostazy wapniowo-fosforanowej organizmu. Kości stanowią rezerwuar tych pierwiastków, a procesy resorpcji i formowania nowej tkanki kostnej umożliwiają regulację ich stężenia w organizmie (12).

Prawidłowy remodeling kości opiera na równowadze pomiędzy aktywnością osteoblastów i osteoklastów. Dynamizm przebudowy tkanki kostnej powinien równoważyć ilość zresorbowanej przez osteoklasty kości w celu utrzymania stałej masy kostnej i odpowiedniej odporności kości na złamania. Zaburzenie tej równowagi może doprowadzić do pogorszenia mikroarchitektury kości i zmniejszenia jej masy co stanowi podstawowy mechanizm rozwoju osteoporozy (11).

1.3.2 Regulacja remodelingu tkanki kostnej

Remodeling tkanki kostnej jest procesem ściśle regulowanym przez liczne szlaki sygnałowe, które zapewniają prawidłową stabilność i strukturę tkanki kostnej. Obejmują one złożone interakcje pomiędzy komórkami kostnymi oraz działanie wielu czynników sygnałowych. Aktywność osteoklastów i osteoblastów kontrolowana jest przez szereg szlaków sygnałowych, czynników transkrypcyjnych oraz mediatorów hormonalnych i

cytokinowych, od których zależy zachowanie równowagi pomiędzy procesami resorpcji i kościotworzenia. Do najważniejszych mechanizmów regulujących metabolizm tkanki kostnej należą szlak RANK/RANKL/OPG, odpowiadający przede wszystkim za regulację osteoklastogenezy, szlak sygnałowy Wnt/β-kateniny kontrolujący różnicowanie i aktywność osteoblastów oraz czynniki transkrypcyjne, takie jak RUNX2, odgrywające kluczową rolę w procesie osteoblastogenezy. Zaburzenia funkcjonowania tych mechanizmów mogą prowadzić do zachwiania równowagi pomiędzy resorpcją a tworzeniem kości, co w konsekwencji sprzyja rozwojowi osteoporozy (10). Spośród wymienionych układów regulujących metabolizm tkanki kostnej największe znaczenie ma szlak RANK/RANKL/OPG, który jest kluczowym regulatorem osteoklastogenezy.

1.3.3 Szlak sygnałowy RANK/RANKL/OPG

Szlak sygnałowy RANK/RANKL/OPG jest jednym z kluczowych układów regulujących remodeling tkanki kostnej i odgrywa istotną rolę w patogenezie osteoporozy. Został on zidentyfikowany w latach 90. XX wieku, a jego odkrycie pozwoliło na lepsze zrozumienie mechanizmów różnicowania, aktywacji oraz przeżycia osteoklastów (13). Jednocześnie stało się podstawą do opracowania nowoczesnych leków antyresorpcyjnych takich jak denosumab (10).

W szlaku tym uczestniczą trzy podstawowe cząsteczki: receptor aktywujący jądrowy czynnik κB (RANK), jego ligand (RANKL) oraz osteoprotegeryna (OPG).

Receptor aktywujący jądrowy czynnik κB (RANK) jest białkiem błonowym należącym do rodziny receptorów czynnika martwicy nowotworów (TNF). Występuje głównie na powierzchni prekursorów osteoklastów oraz dojrzałych osteoklastów, a także na komórkach dendrytycznych (14). RANK pełni funkcję receptora dla ligandu RANKL, a ich wzajemna interakcja jest niezbędna do różnicowania, aktywacji oraz przeżycia osteoklastów, regulując w ten sposób proces resorpcji i przebudowy kości. Po związaniu z RANKL dochodzi do uruchomienia wewnątrzkomórkowych kaskad sygnałowych obejmujących między innymi rekrutację białek adaptorowych TRAF (ang. TNF receptor associated factors), aktywację NF-κB oraz szlaków MAPK. Procesy te prowadzą do aktywacji czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za osteoklastogenezę oraz modulację odpowiedzi immunologicznej (15).

Osteoprotegeryna (OPG) to polipeptyd należący do nadrodziny czynników martwicy nowotworów, znanej również jako TNFRS 11B lub czynnik hamujący osteoklastogenezę (OCIF, ang. osteoclastogenesis inhibitory factor) (14). Cząsteczka ta jest rozpuszczalnym

receptorem-wabikiem (ang. decoy receptor) RANKL, wytwarzany głównie przez osteoblasty, który zapobiega tworzeniu się osteoklastów i resorpcji kości przez osteoklasty poprzez hamowanie interakcji RANKL–RANK (16). Osteoprotegeryna syntetyzowana jest w wielu rodzajach tkanek, w tym w płucach, sercu, nerkach, wątrobie, grasicy, węzłach chłonnych, szpiku kostnym, osteoblastach, komórkach mięśni gładkich naczyń, limfocytach B i chondrocytach stawowych (14). Główną rolą OPG w szlaku metabolicznym jest wiązanie ligandu RANKL z wysokim powinowactwem, co zapobiega interakcji z receptorem RANK na powierzchni osteoklastów. W efekcie dochodzi do zahamowania osteoklastogenezy oraz resorpcji kości, co sprawia, ze osteoprotegeryna pełni funkcję negatywnego regulatora obrotu kostnego (15).

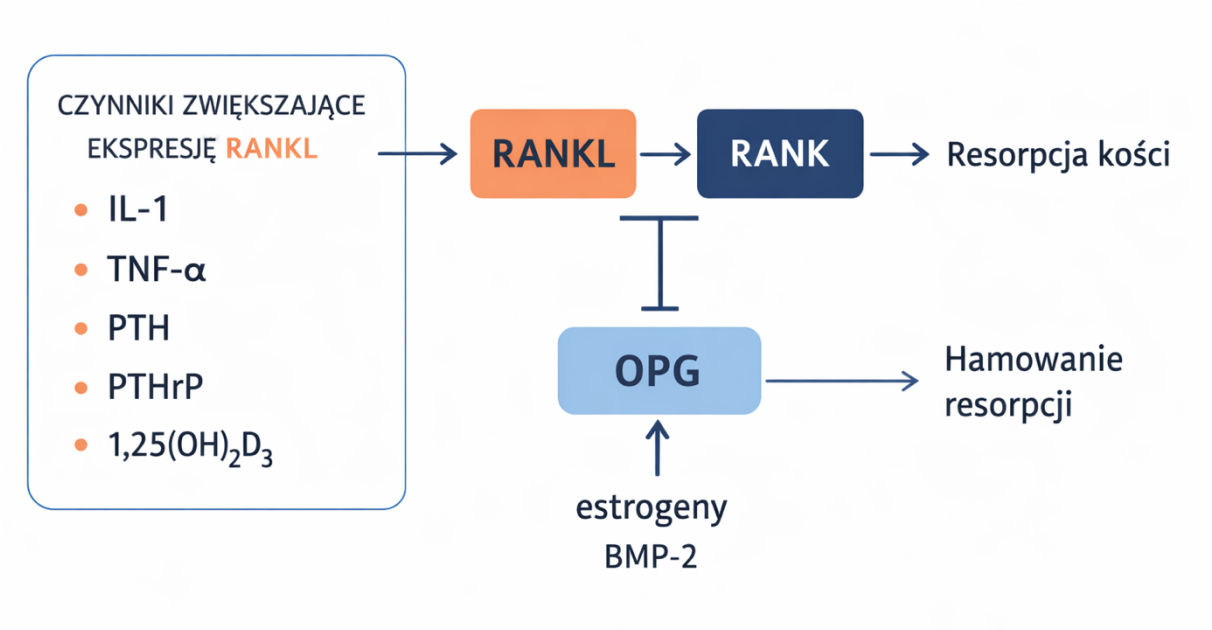
Aktywacja szlaku RANK/RANKL/OPG poprzedzona jest działaniem czynnika stymulującego tworzenie kolonii makrofagów (M-CSF, ang. macrophage colony-stimulating factor), który produkowany jest głównie przez osteocyty oraz osteoblasty. Czynnik ten stymuluje ekspresję receptora RANK na powierzchni prekursorów osteoklastów, co umożliwia ich dalsze różnicowanie i dojrzewanie pod wpływem RANKL. Związanie RANKL z receptorem RANK prowadzi do uruchomienia kaskady sygnałowej obejmującej m. in. cząsteczki TRAF6, NF-κB oraz c-Fos, co skutkuje aktywacją kluczowego czynnika transkrypcyjnego NFATc1 odpowiedzialnego za ekspresję genów osteoklastów (4).

RANKL może być wytwarzany przez różne typy komórek, w tym osteoblasty, osteocyty oraz chondrocyty, jednak to osteocyty – jako komórki wyczuwające zmiany mechaniczne oraz mikrouszkodzenia w obrębie macierzy kostnej – odgrywają szczególnie istotną rolę w inicjacji przebudowy kości. W odpowiedzi na zmiany w obciążeniu mechanicznym osteocyty zwiększają produkcję RANKL, co prowadzi do nasilenia osteoklastogenezy (17,18).

Aktywność szlaku RANK/RANKL/OPG podlega również regulacji przez liczne czynniki hormonalne i prozapalne. Do czynników zwiększających ekspresję osteoprotegeryny należą estrogeny oraz białko morfogenetyczne kości-2 (BMP-2), które hamują osteoklastogenezę. Z kolei takie czynniki jak aktywna postać witaminy D_3 ($1,25(OH)_2D_3$), parathormon (PTH), białko pokrewne parathormonowi (PTHrP), interleukina-1 (IL-1) oraz czynnik martwicy nowotworu α (TNF-α) stymulują produkcję RANKL, nasilając proces resorpcji kości. Szczególne znaczenie ma spadek stężenia estrogenów obserwowany u kobiet po menopauzie, który prowadzi do zwiększonej produkcji cytokin proresorpcyjnych oraz przewagi RANKL nad OPG. W konsekwencji

dochodzi do zwiększonej aktywności osteoklastów i utraty masy kostnej. Wykazano również, że u kobiet po menopauzie poziom RANKL w limfocytach i szpiku kostnym jest wyższy niż u kobiet przed menopauzą lub stosujących hormonalną terapię zastępczą (19).

Na Rycinie 5. Przedstawiono schemat przedstawiający wpływ wyżej wymienionych cząsteczek na szlak sygnałowy RANK/RANKL/OPG.



Rycina 5. Czynniki wpływające na szlak sygnałowy RANK/RANKL/OPG. Estrogen i białko morfogeniczne kości-2 (BMP-2, ang. bone morphogenic protein-2) indukują ekspresję osteoprotegeryny (OPG), podczas gdy 1,25(OH)$_2$ witamina D3, PTH, PTHrp, IL-1 oraz TNF-α (nowotworowy czynnik martwicy α, ang. Tumor necrosis factor α) indukuje wytwarzanie RANKL. OPG jest receptorem z powinowactwem do RANKL i blokuje jego wiązanie do RANK. Stosunek RANKL do OPG określa tempo osteoklastogenezy. Opracowanie własne wg Kenkre, 2018 (4).

Podsumowując, zaburzenie równowagi pomiędzy OPG a RANKL przyczynia się do zwiększanie aktywności osteoklastów i resorpcji kości, co stanowi jedne z podstawowych patomechanizmów osteoporozy.

W ostatnich latach rośnie zainteresowanie genetycznymi aspektami funkcjonowania tego układu, w tym analizą polimorfizmów genów RANK i RANKL jako potencjalnych markerów ryzyka osteoporozy. Jednym z najczęściej badanych wariantów jest polimorfizm 575C>T w genie RANK (rs1805034), który powoduje substytucję waliny na alaninę w kodonie 192 w eksonie 6. Wyniki badań dotyczących wpływu tego

polimorfizmu na gęstość mineralną kości (BMD) są jednak niejednoznaczne – część autorów wskazuje na brak istotnego wpływu tej zmiany na BMD, podczas gdy inne badania sugerują możliwy związek z osteoporozą (20, 21).

Innym interesującym wariantem genetycznym jest polimorfizm −643C>T w regionie promotorowym genu RANKL. Zidentyfikowane zmiany w regionie promotora i 5′-UTR mogą wpływać na poziom ekspresji RANKL i być związane z obniżoną gęstością mineralną kości oraz zwiększonym ryzykiem złamań niskoenergetycznych. Badania przeprowadzone przez Mencej i wsp. wykazały, że polimorfizmy te zwiększają aktywność transkrypcyjną genu RANKL, co może prowadzić do nadprodukcji białka i zaburzenia równowagi pomiędzy RANKL a OPG, sprzyjając rozwojowi osteoporozy (22, 23).

Konieczne są jednak dalsze badania w celu potwierdzenia wpływu tych wariantów na metabolizm tkanki kostnej oraz ich potencjalnej przydatności w diagnostyce molekularnej osteoporozy.

1.4 Czynniki zwiększające ryzyko rozwoju osteoporozy

Istnieje wiele czynników, które mogą powodować zwiększone ryzyko rozwoju osteoporozy. Ich działanie może w sposób samodzielny lub synergistyczny doprowadzić do spadku gęstości kości. Czynniki ryzyka można podzielić na niemodyfikowalne, niezależne od człowieka oraz modyfikowalne, związane ze stylem życia, chorobami współwystępującymi oraz dietą (1, 24, 25).

Do czynników niemodyfikowalnych należą wiek, płeć, grupa etniczna oraz predyspozycje genetyczne. Osteoporoza, dotyka cztery razy częściej kobiet niż mężczyzn i dotyczy ona najczęściej kobiet rasy białej i Azjatek (1). Istotną rolę w patogenezie osteoporozy odgrywają także czynniki genetyczne, które wpływają na gęstość mineralną kości oraz podatność na złamania. Dotychczas zidentyfikowano 150 genów, które mogą być związane ze zwiększonym metabolizmem kostnym i zwiększonym ryzykiem osteoporozy.

Do czynników modyfikowalnych, na które człowiek ma częściowy wpływ zalicza się: masę ciała, choroby współistniejące oraz stosowane leczenie farmakologiczne. Badania wykazały, że u kobiet po menopauzie z osteoporozą, wraz ze wzrostem BMI wzrasta również gęstość mineralna kości. Stwierdzono również, że wyższe wartości BMI mają ochronny wpływ tkanki tłuszczowej na wartość BMD. Należy podkreślić jednak, że

nadwaga i otyłość mogą nasilać osteoporozę u kobiet w wieku postmenopauzalnym (26). Istotny wpływ na gęstość mineralną kości mają także choroby współistniejące, w tym choroby endokrynologiczne (nadczynność przytarczyc, kory nadnerczy, tarczycy, cukrzyca, jadłowstręt psychiczny), gastroenterologiczne (zaburzenia trawienia, resekcje żołądka i jelit, zespoły złego wchłaniania), zaburzenia czynnościowe nerek, choroby tkanki łącznej, układu oddechowego czy też hematologiczne. Ryzyko wystąpienia osteoporozy wtórnej może być spowodowane spowodować zażywaniem niektórych leków, np. glikokortykosteroidów, hormonów tarczycy, tetracyklin lub leków moczopędnych (1).

Do istotnych czynników wpływających na ryzyko należą dieta oraz aktywność fizyczna. Dieta bardzo wpływa na jakość kości. Kluczową rolę odgrywa podaż substancji odżywczych, szczególnie wapnia, witaminy D3 oraz białka, które pomagają utrzymać prawidłową strukturę i mineralizację kości (24). W okresie intensywnego wzrostu zapotrzebowanie na wapń wynosi około 1500 mg/ dzień, natomiast u osób dorosłych wartość mieści się w zakresie 1000 a 1200 mg na dobę (27). W przypadku spadku stężenia wapnia w surowicy uruchamiają się tzw. procesy wyrównawcze polegające na zwiększeniu syntezy aktywnej witaminy D_3 oraz parathormonu (PTH). Odpowiadają one za utrzymanie prawidłowego poziomu wapnia. Witamina D_3 zwiększa wchłanianie tego pierwiastka z przewodu pokarmowego, natomiast parathormon mobilizuje wapń z kości i powoduje jego reabsorpcję w nerkach. Długotrwały niedobór wapnia może powodować nadmierne wydzielanie tego hormonu co w konsekwencji może doprowadzić do zmniejszenia gęstości mineralnej kości. Witamina D3 ma duży wpływ na regulację gospodarki wapniowo-fosforanowej. Ułatwia ona wchłanianie wapnia działając bezpośrednio na komórki kostne, co umożliwia prawidłową mineralizację (27). Przyjmuje się, że dawka witaminy D_3 jaką powinni przyjmować mieszkańcy Europy Środkowowschodniej wynosi 800-1000 j.m. / dobę (24).

Istotne dla prawidłowego rozwoju i funkcjonowania szkieletu jest również podaż białka. Należy jednak zachować ostrożność, jeśli chodzi o jego ilość, bowiem zbyt duże jego stężenie w surowicy krwi powoduje obniżenie pH płynów ustrojowych, co z kolei może doprowadzić do mobilizacji wodorowęglanów, m.in. z kości, w celu jego zneutralizowania. W procesach metabolizmu kostnego biorą również witaminy A, B6, C oraz K, a także pierwiastki: fluor, cynk, magnez, potas oraz chrom, dlatego również one powinny znaleźć się w diecie. Są one niezbędne do prawidłowego funkcjonowania enzymów i prawidłowej produkcji kolagenu- podstawowego białka macierzy kostnej.

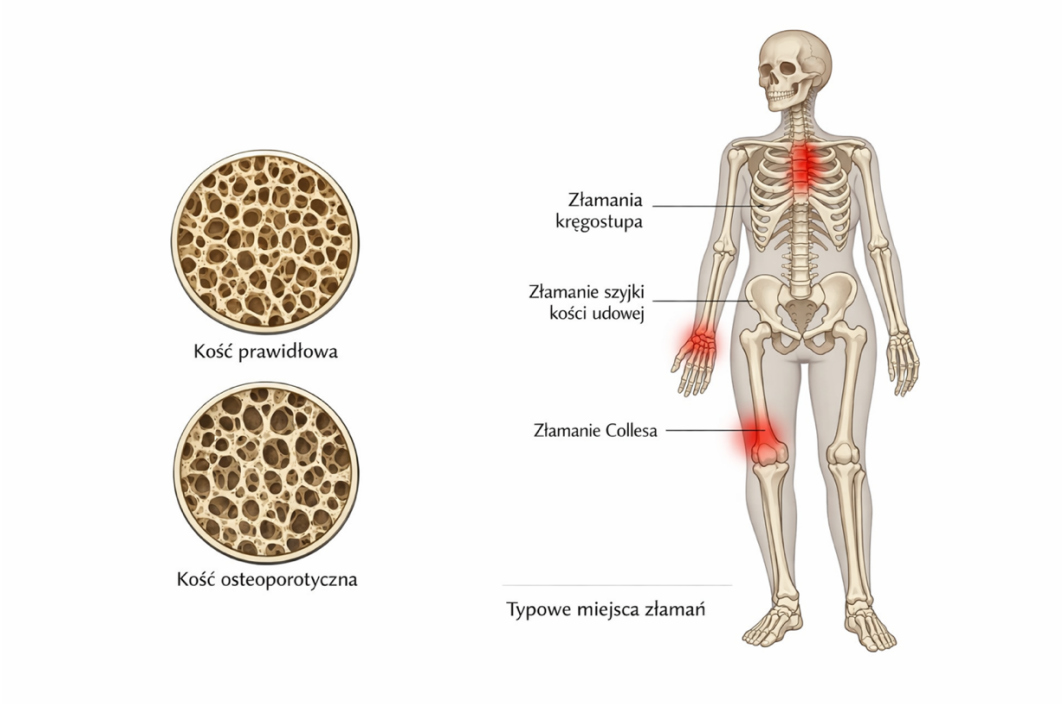
Niektóre składniki diety mogą wpływać negatywnie na metabolizm kostny. Nadmierne spożycie sodu oraz fosforanów zwiększa wydalanie wapnia wraz z moczem (kalcurię), co może spowodować zmniejszenie stężenia wapnia w surowicy. Podobny efekt może powodować nadmierne spożycie kawy kofeinowej, która nasila wydalanie wapnia z organizmu.

Istotnym elementem profilaktyki osteoporozy jest również codzienna aktywność fizyczna. Obciążenie mechaniczne kości zwiększa aktywność osteoblastów i sprzyja procesom kościotworzenia. Odpowiednia aktywność fizyczna sprzyja wytrzymałości i odporności kości na urazy (27).

1.5 Manifestacje kliniczne i powikłania osteoporozy

Jednym z największych wyzwań w diagnostyce osteoporozy jest początkowy brak objawów klinicznych. Choroba może rozwijać się bez wyraźnych symptomów, co sprawia, że często nie zostaje rozpoznana przez wiele lat. Zmiany w strukturze kostnej postępują stopniowo i nie powodują dolegliwości aż do wystąpienia złamań (28). W wielu przypadkach pierwszym objawem klinicznym jest dopiero złamanie osteoporotyczne, które może pojawić się w wyniku niewielkiego urazu lub codziennych czynności. Brak specyficznych objawów sprawia, że osteoporoza jest diagnozowana dopiero na podstawie zaawansowanych zmian kostnych (29).

Najczęstszą manifestacją osteoporozy są tzw. złamania niskoenergetyczne, określane również jako złamania osteoporotyczne. Powstają one w wyniku działania niewielkiej siły urazu, która u osoby z prawidłową strukturą kostną nie doprowadziłaby do złamania Do takich sytuacji zalicza się m.in. upadek z wysokości własnego ciała lub uraz o prawdopodobnie niewielkiej energii (29–31). Do charakterystycznych lokalizacji dla złamań osteoporotycznych należą kręgosłup, bliższy koniec kości udowej oraz bliższy koniec kości promieniowej. Najczęstsze. Miejsca złamań osteoporotycznych oraz różnice w strukturze kości prawidłowej i osteoporotycznej przedstawiono na Rycinie 6.



Rycina 6. Typowe lokalizacje złamań osteoporotycznych oraz zestawianie kości o prawidłowej strukturze i kości osteoporotycznej. Opracowanie własne na podstawie Voelker R. (32)

Do najczęstszych powikłań złamań osteoporotycznych należą złamania kości promieniowej typu Collesa, czyli złamanie dalszej nasady kości promieniowej powstające w wyniku upadku na najczęściej wyprostowaną kończynę górną. Złamanie to jest jedną z pierwszych manifestacji u kobiet. Kolejną istotną lokalizacją jest bliższy koniec kości udowej, który należy do jednych najpoważniejszych powikłań. Występują one u osób starszych i są następstwem upadku z wysokości własnego ciała. Złamania te mają istotne znaczenie, ponieważ mogą doprowadzić do spadku sprawności ruchowej, konieczności leczenia operacyjnego i obniżenia jakości życia pacjentek po menopauzie (29,30).

Do częstych lokalizacji złamań osteoporotycznych należą również złamania kompresyjne kręgów kręgosłupa, szczególnie w odcinku piersiowym i lędźwiowym kręgosłupa (Th4-L5) (1). Złamania te mogą występować nawet bez wyraźnego urazu lub podczas wykonywania codziennych czynności. W wielu przypadkach prowadzą do stopniowego zmniejszenia wysokości trzonów kręgowych, co skutkuje obniżeniem wzrostu pacjenta. Charakterystycznym objawem zaawansowanej osteoporozy jest także rozwój kifozy piersiowej, określanej potocznie jako „wdowi garb" (30,31). Złamania kręgów mogą ponadto powodować przewlekły ból pleców oraz prowadzić do ograniczenia sprawności ruchowej i znacznego pogorszenia jakości życia pacjentów (29).

Warto podkreślić, że wystąpienie pierwszego złamania osteoporotycznego zwiększa ryzyko kolejnych złamań. Szacuje się, że po pierwszym złamaniu ryzyko wystąpienia następnego wrasta od 2 do nawet 10 razy. Ryzyko złamania bliższego końca kości udowej zwiększa się około dwukrotnie po złamaniu kości promieniowej, 2,5-krotnie po złamaniu kręgosłupa oraz nawet sześciokrotnie po wcześniejszym złamaniu bliższego końca kości udowej (30).

1.6 Diagnostyka osteoporozy

Rozpoznanie osteoporozy jest procesem wieloetapowym, który obejmuje ocenę ryzyka złamań, badania obrazowe oraz laboratoryjne. Wczesna identyfikacja ryzyka umożliwia wprowadzenie wczesnych działań profilaktycznych i terapeutycznych, co pozwala zmniejszyć ryzyko złamań osteoporotycznych. W diagnostyce wykorzystuje się zarówno ocenę kliniczną, narzędzia oceny ryzyka złamań, jak i badania densytometryczne i laboratoryjne.

1.6.1 Ocena kliniczna i czynniki ryzyka

Ocena kliniczna ryzyka złamań i wysunięcie podejrzenia osteoporozy wymaga dokładnego przeprowadzenia badania przedmiotowego i podmiotowego. Wczesna identyfikacja chorych zagrożonych złamaniem pozwala na szybkie wdrożenie profilaktyki i dalszej diagnostyki.

Rozpoznanie osteoporozy przebiega zazwyczaj dwuetapowo. W pierwszym etapie lekarz, najczęściej lekarz podstawowej opieki zdrowotnej, dokonuje wstępnej oceny ryzyka złamań oraz identyfikuje pacjentów wymagających dalszej opieki specjalistycznej (33). W ocenie tej uwzględnia się podstawowe dane kliniczne, takie jak wiek i płeć pacjenta, wystąpienie złamań niskoenergetycznych w wywiadzie oraz obecność chorób współistniejących mogących wpływać na metabolizm tkanki kostnej.

Istotnym elementem oceny klinicznej jest szczegółowy wywiad lekarski. Powinien on obejmować informacje dotyczące przebytych złamań niskoenergetycznych, występowania osteoporozy lub złamań szyjki kości udowej u członków rodziny, a także obecności chorób przewlekłych mogących wpływać na metabolizm kostny. Należy również uwzględnić stosowanie leków, które mogą prowadzić do zmniejszenia gęstości mineralnej kości, takich jak glikokortykosteroidy, leki przeciwpadaczkowe czy heparyny (28). Do istotnych czynników ryzyka należą także niska masa ciała (BMI < 18 kg/m^2),

stosowanie używek oraz wystąpienie chirurgicznej, farmakologicznej lub przedwczesnej menopauzy. W przypadku kobiet szczególną uwagę należy zwrócić na okres menopauzy, który wiąże się ze spadkiem stężenia estrogenów i przyspieszoną utratą masy kostnej (33–36).

W badaniu przedmiotowym należy zwrócić uwagę na budowę, postawę ciała i ewentualne deformacje kręgosłupa. Charakterystycznym objawem złamań osteoporotycznych kręgosłupa jest ubytek wzrostu wynikający ze złamań kompresyjnych trzonów. Ubytek przekraczający 4 cm w stosunku do wzrostu maksymalnego może sugerować złamanie. Należy również ocenić siłę mięśniową, przeprowadzić ocenę równowagi oraz ocenić ryzyko upadków, które stanowią główną przyczynę złamań osteoporotycznych (35).

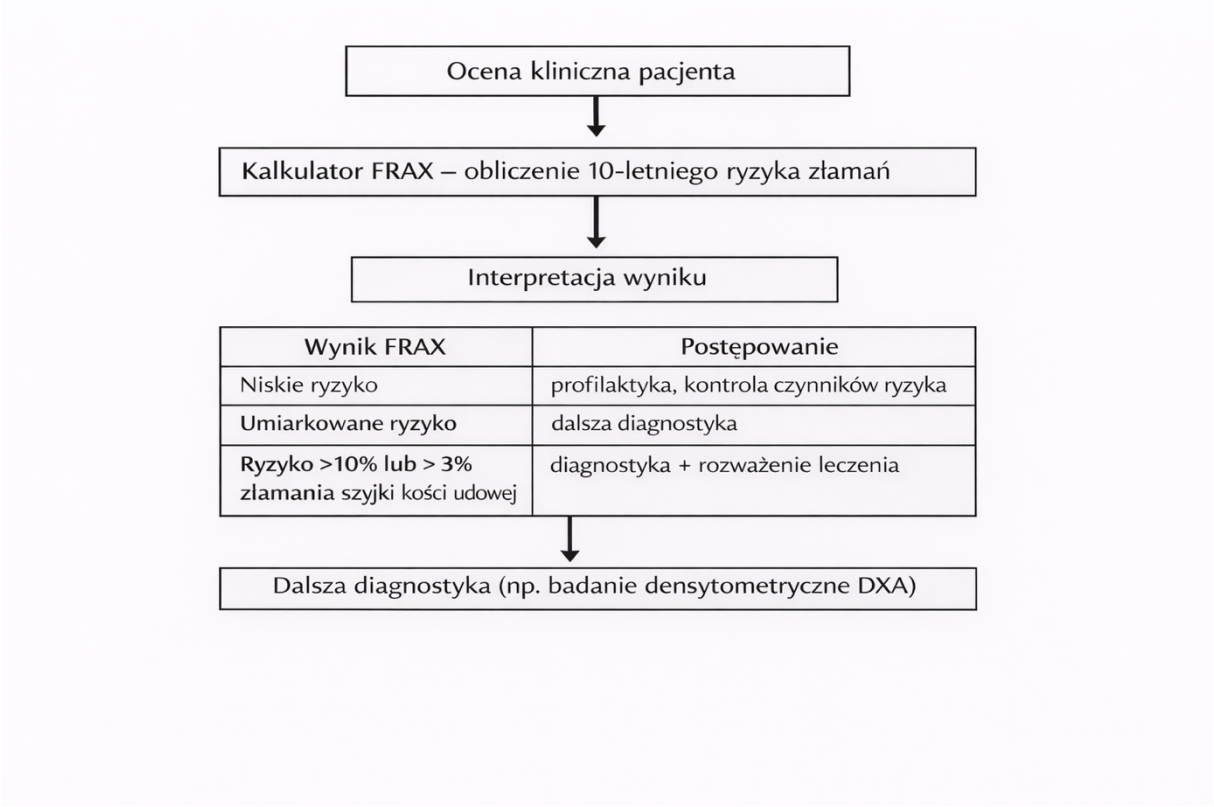
Wstępna ocena kliniczna pozwala na identyfikację pacjentów wymagających pogłębionej diagnostyki w kierunku osteoporozy. Na jej podstawie podejmowana jest decyzja o dalszym postępowaniu diagnostycznym, obejmującym m.in. ocenę ryzyka złamań przy użyciu narzędzi prognostycznych oraz wykonanie badań obrazowych i laboratoryjnych.

1.6.2 Kalkulator FRAX w ocenie ryzyka złamań

Kolejnym etapem oceny klinicznej i diagnostyki osteoporozy jest oszacowanie 10-letniego ryzyka złamań osteoporotycznych. Do tego celu wykorzystuje się kalkulator FRAX (ang. Fracture Risk Assessment Tool), który jest skomputeryzowanym algorytmem opracowanym w celu oceny indywidualnego ryzyka złamań. Narzędzie to zostało zatwierdzone do tego celu przez Światową Organizację Zdrowia w 2008 roku (37).

Kalkulator FRAX umożliwia oszacowanie 10-letniego prawdopodobieństwa wystąpienia głównych złamań osteoporotycznych oraz złamania bliższego końca kości udowej. Głównymi lokalizacjami złamań osteoporotycznych są złamania kręgosłupa, bliższego końca kości udowej, bliższego końca kości ramiennej oraz dalszego końca kości promieniowej. Narzędzie to może być stosowane zarówno z uwzględnieniem wartości gęstości mineralnej kości (BMD), jak i bez niej, co umożliwia ocenę ryzyka nawet w sytuacji braku badania densytometrycznego. Zastosowanie kalkulatora FRAX w praktyce klinicznej pozwala na identyfikację pacjentów znajdujących się w grupie zwiększonego ryzyka złamań osteoporotycznych jeszcze przed wykonaniem badania densytometrycznego.

Algorytm FRAX uwzględnia zestaw klinicznych czynników ryzyka złamań, takich jak: wiek, płeć, masa ciała, wzrost, występowanie złamań bliższego końca kości udowej u rodziców, palenie tytoniu, spożywanie alkoholu, stosowanie glikokortykosteroidów w przeszłości lub obecnie, reumatoidalne zapalenie stawów oraz obecność chorób mogących prowadzić do wtórnej osteoporozy (38). Na Rycinie 7. przedstawiono schemat oceny ryzyka złamań osteoporotycznych z użyciem kalkulatora FRAX.



Rycina 7. Schemat oceny ryzyka złamań osteoporotycznych z wykorzystaniem kalkulatora FRAX. Ryzyko przekraczające 10% w zakresie głównych złamań osteoporotycznych lub 3% w odniesieniu do złamania kości szyjki udowej stanowi wskazanie do dalszej diagnostyki i wdrożenia leczenia. Opracowano na podstawie Głuszko P. i wsp. (2023) oraz Schini M. i wsp. (2024) (35, 38).

Uzyskany wynik pozwala na zakwalifikowanie pacjenta do odpowiedniej grupy ryzyka złamań. Przyjmuje się, że ryzyko przekraczające 10% w zakresie głównych złamań osteoporotycznych lub powyżej 3% w odniesieniu do złamania szyjki kości udowej

stanowi wskazanie do dalszej diagnostyki lub wdrożenia interwencji terapeutycznej, w tym leczenia farmakologicznego (35).

Pomimo szerokiego zastosowania w praktyce klinicznej kalkulator FRAX posiada również pewne ograniczenia. Jednym z najczęściej wskazywanych problemów jest ograniczona liczba uwzględnianych czynników ryzyka oraz ich binarny charakter, ponieważ w większości przypadków narzędzie uwzględnia jedynie odpowiedzi „tak" lub „nie". W konsekwencji niektóre czynniki zależne od liczby lub dawki nie są w pełni odzwierciedlone w algorytmie. Dotyczy to między innymi liczby przebytych złamań, ilości spożywanego alkoholu czy dawki stosowanych glikokortykosteroidów. Do innych ograniczeń należy brak uwzględnienia gęstości mineralnej kości w obrębie kręgosłupa lędźwiowego oraz brak oceny właściwości strukturalnych i materiałowych tkanki kostnej. W literaturze naukowej podejmowano próby modyfikacji wyników FRAX w celu ograniczenia tych niedoskonałości. W niektórych badaniach zaproponowano arytmetyczne korekty uzyskanych wartości ryzyka, które uwzględniały dodatkowe czynniki kliniczne. Przykładem może być uwzględnienie liczby upadków w ciągu ostatniego roku poprzez zastosowanie odpowiednich współczynników korygujących prawdopodobieństwo złamań. Należy również podkreślić, że algorytm FRAX został skalibrowany dla poszczególnych populacji na podstawie częstości złamań oraz śmiertelności w danym kraju (37,38).

Narzędzie to przeznaczone jest przede wszystkim dla kobiet po menopauzie oraz mężczyzn w wieku powyżej 50 lat i nie jest zalecane do stosowania u młodszych dorosłych ani u dzieci. Ponadto kalkulator FRAX nie został zwalidowany u pacjentów, którzy są aktualnie leczeni farmakologicznie z powodu osteoporozy lub byli leczeni w przeszłości. W takich przypadkach interpretacja uzyskanego wyniku powinna uwzględniać indywidualną ocenę kliniczną pacjenta (37).

W przypadku stwierdzenia podwyższonego ryzyka złamań konieczne jest przeprowadzenie dalszej diagnostyki, której kluczowym elementem jest wykonanie badania densytometrycznego metodą dwuwiązkowej absorpcjometrii rentgenowskiej (DXA, ang. Dual Energy X-ray Absorptiometry). W kolejnym etapie postępowania diagnostycznego przeprowadza się diagnostykę różnicową, identyfikuje wszystkie czynniki ryzyka oraz prowadzi edukację pacjenta w zakresie ich modyfikacji (33).

1.6.3 Badania obrazowe w osteoporozie.

Badania obrazowe stanowią istotny element diagnostyki osteoporozy oraz jej powikłań w postaci złamań niskoenergetycznych. Umożliwiają one identyfikację złamań osteoporotycznych oraz ocenę zmian strukturalnych w obrębie układu kostnego.
Podstawowym badaniem obrazowym stosowanym w diagnostyce urazów układu kostnego jest konwencjonalne badanie radiograficzne (RTG). Jest to metoda powszechnie dostępna i szeroko stosowana w praktyce klinicznej, niewymagająca specjalnego przygotowania pacjenta. Standardowo zdjęcia rentgenowskie wykonuje się w dwóch projekcjach prostopadłych do siebie. W przypadku kości długich zaleca się, aby na zdjęciach uwidoczniony był przynajmniej jeden sąsiadujący staw, co umożliwia identyfikację ewentualnych zwichnięć lub podwichnięć towarzyszących złamaniom. W razie potrzeby możliwe jest wykonanie zdjęć celowanych, pozwalających na dokładniejszą ocenę fragmentu kości, w którym podejrzewa się obecność zmian patologicznych (39). Radiografia konwencjonalna cechuje się jednak stosunkowo niską czułością w wykrywaniu wczesnych zmian osteoporotycznych, ponieważ cechy zmniejszonej gęstości mineralnej kości stają się widoczne dopiero przy znacznej utracie masy kostnej. W przypadku utrzymującego się podejrzenia złamania mimo prawidłowego obrazu w badaniu RTG zaleca się powtórzenie badania radiologicznego po kilku dniach (40,41).

W diagnostyce różnicowej złamań osteoporotycznych kręgosłupa należy uwzględnić możliwość występowania innych chorób, takich jak szpiczak mnogi. W przypadku pojedynczych zmian ogniskowych w kościach konieczne jest również wykluczenie zmian nowotworowych lub innych schorzeń. W sytuacjach, gdy lokalizacja złamania jest trudna do określenia w badaniu RTG lub istnieje podejrzenie zmian wieloogniskowych, pomocna może być scyntygrafia kości. Badanie to polega na dożylnym podaniu radiofarmaceutyku zawierającego dwufosfoniany znakowane technetem-99m, które gromadzą się w miejscach zwiększonego metabolizmu kostnego. Dzięki temu możliwe jest uwidocznienie ognisk przebudowy kostnej oraz identyfikacja zmian niewidocznych w konwencjonalnym badaniu radiologicznym (39). Scyntygrafia może być wykonywana jako badanie całego ciała, co umożliwia wykrycie złamań osteoporotycznych lub innych zmian kostnych, które nie były wcześniej podejrzewane klinicznie lub nie są widoczne w badaniu radiograficznym (42). W diagnostyce różnicowej złamań kompresyjnych kręgosłupa zastosowanie znajdują również

tomografia komputerowa (CT) oraz rezonans magnetyczny (MRI). Metody te charakteryzują się większą swoistością niż radiografia w różnicowaniu złamań osteoporotycznych i zmian nowotworowych. Tomografia komputerowa umożliwia dokładną ocenę architektury kostnej oraz deformacji płytek granicznych trzonów kręgowych. Rezonans magnetyczny pozwala natomiast na ocenę zmian w obrębie szpiku kostnego oraz wykrycie obrzęku szpiku charakterystycznego dla świeżych złamań. Metoda ta jest szczególnie przydatna w różnicowaniu złamań osteoporotycznych ze złamaniami patologicznymi o etiologii nowotworowej poprzez ocenę stopnia zajęcia szpiku kostnego (42).

Ze względu na ograniczoną czułość konwencjonalnych metod obrazowania w ocenie wczesnych zmian osteoporotycznych szczególne znaczenie w diagnostyce choroby ma ilościowa ocena gęstości mineralnej kości wykonywana metodą densytometrii DXA.

1.6.3.1 Densytometria DXA

Podstawową metodą stosowaną w diagnostyce osteoporozy jest densytometria metodą dwuwiązkowej absorpcjometrii promieniowania rentgenowskiego (DXA, ang. Dual-energy X-ray Absorptiometry). Badanie to umożliwia ilościową ocenę gęstości mineralnej kości (BMD, ang. Bone Mineral Density). Pomiar densytometryczny wykonywany jest najczęściej w obrębie odcinka lędźwiowego kręgosłupa (L1–L4) oraz bliższego końca kości udowej u pacjenta leżącego w pozycji na plecach na stole densytometru. Analiza wyników odbywa się z wykorzystaniem specjalistycznego oprogramowania, które porównuje uzyskane wartości gęstości mineralnej kości z wartościami referencyjnymi dla populacji. Wyniki badania przedstawiane są w postaci wartości bezwzględnych BMD oraz wskaźników T-score i Z-score. Wskaźnik T-score określa odchylenie wyniku pacjenta od średniej wartości dla młodej, zdrowej populacji referencyjnej, natomiast Z-score odnosi wynik do populacji dobranej pod względem wieku i płci. Pomiar densytometryczny obejmuje zazwyczaj ocenę takich obszarów anatomicznych jak szyjka kości udowej, krętarz większy oraz okolica międzykrętarzowa, a także średnią wartość dla bliższego końca kości udowej (39).

Mimo że densytometria metodą DXA jest uznawana za złoty standard w diagnostyce osteoporozy, metoda ta posiada również pewne ograniczenia. Pomiar BMD wykonywany w badaniu DXA ma charakter dwuwymiarowy i nie pozwala na bezpośrednie rozróżnienie kości korowej i beleczkowej. Na wynik badania mogą wpływać także zmiany zwyrodnieniowe kręgosłupa, osteofity lub zwapnienia w obrębie tkanek

miękkich, co może prowadzić do zawyżenia wartości BMD. Należy również podkreślić, że gęstość mineralna kości stanowi jedynie jeden z czynników determinujących wytrzymałość kości i nie odzwierciedla w pełni jej właściwości strukturalnych (43).

1.6.4 Kryteria rozpoznania osteoporozy

Densytometryczne kryteria rozpoznawania osteoporozy zostały opracowane przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) i opierają się na pomiarze gęstości mineralnej kości metodą DXA. Rozpoznanie osteoporozy u kobiet po menopauzie oraz u mężczyzn powyżej 50. roku życia ustala się na podstawie wartości wskaźnika T-score wyrażonego jako liczba odchyleń standardowych od szczytowej masy kostnej młodej populacji referencyjnej.

U dzieci, młodzieży oraz młodych dorosłych interpretacja wyników densytometrycznych opiera się na wartości wskaźnika Z-score, który określa odchylenie gęstości mineralnej kości od średniej wartości dla populacji dobranej pod względem wieku i płci.

Zgodnie z kryteriami WHO wyróżnia się kilka kategorii diagnostycznych opartych na wartości wskaźnika T-score. Osteopenia oznacza niewielkie obniżenie gęstości mineralnej kości i stanowi czynnik ryzyka rozwoju osteoporozy. Rozpoznanie osteoporozy stawia się w przypadku wartości T-score równej lub niższej niż −2,5 odchylenia standardowego (44).

Kryteria ustalone przez WHO zostały pokazane w tabeli poniżej (Tabela 1.)

Tabela 1. Kryteria rozpoznania osteoporozy wg WHO (44).

Kryteria rozpoznania osteoporozy	
Rozpoznanie	Wartość T-score (SD)
Prawidłowa gęstość mineralna kości	-1 i powyżej
Osteopenia	-1 do -2,5
Osteoporoza	-2,5 i poniżej
Osteoporoza zaawansowana	-2,5 i poniżej oraz złamanie osteoporotyczne

Współczesna diagnostyka osteoporozy opiera się jednak nie tylko na ocenie gęstości mineralnej kości, lecz uwzględnia również inne czynniki kliniczne wpływających na ryzyko złamań. W praktyce klinicznej uwzględnia się łącznie wartość

wskaźnika T-score, obecność przebytych złamań niskoenergetycznych oraz wynik oceny 10-letniego ryzyka złamań obliczany z wykorzystaniem kalkulatora FRAX. Połączenie tych parametrów pozwala na zakwalifikowanie pacjenta do odpowiedniej kategorii ryzyka złamań osteoporotycznych oraz podjęcie decyzji dotyczącej dalszego postępowania diagnostycznego i terapeutycznego. Schemat oceny ryzyka złamań przedstawiono na Rycinie 8.

BARDZO WYSOKIE RYZYKO	WYSOKIE RYZYKO	ŚREDNIE / NISKIE RYZYKO
Co najmniej jedno z: Świeże złamanie niskoenergetyczne w lokalizacji głównej w okresie < 1 roku u osoby z T-score ≤ –1,0 lub Liczne złamania główne (≥ 2) lub Złamanie podczas przewlekłego podawania niektórych leków, np. glikokortykosteroidów, inhibitorów aromatazy i innych i/lub Niski T-score < –3,0 i/lub FRAX > 15% dla złamań głównych lub dla BKKU > 4,5%	**Co najmniej jedno z:** Przebyte złamanie niskoenergetyczne w lokalizacji głównej w okresie ostatnich 2 lat i/lub T-score ≤ –2,5 i/lub FRAX 10–15% dla złamań głównych lub dla BBKU 3–4,5%	**Jeśli obecne:** Wiek: pomenopauzalny Bez złamań i T-score > –2,5 i/lub FRAX 5– < 10% średnie ryzyko FRAX < 5% niskie ryzyko

Rycina 8. Kryteria oceny ryzyka złamań osteoporotycznych u osób powyżej 50. roku życia na podstawie T-score, obecności złamań niskoenergetycznych oraz kalkulatora FRAX. BKKU- bliższy koniec kości udowej (35).

Określenie kategorii ryzyka złamań osteoporotycznych ma istotne znaczenie dla dalszego postępowania klinicznego. U pacjentów z niskim lub umiarkowanym ryzykiem zaleca się przede wszystkim działania profilaktyczne, obejmujące modyfikację stylu życia, odpowiednią podaż wapnia i witaminy D oraz zwiększenie aktywności fizycznej. Natomiast pacjentów zakwalifikowanych do grupy wysokiego lub bardzo wysokiego ryzyka złamań konieczne może być wdrożenie leczenia farmakologicznego oraz regularne monitorowanie gęstości mineralnej kości (35).

1.7 Badania laboratoryjne w diagnostyce różnicowej osteoporozy.

1.7.1 Markery biochemiczne

Poza badaniem densytometrycznym w diagnostyce osteoporozy wykorzystuje się również oznaczenia biochemicznych markerów obrotu kostnego we krwi lub moczu. Markery te odzwierciedlają aktualną aktywność procesów resorpcji i kościotworzenia zachodzących w obrębie tkanki kostnej. Na podstawie ich charakterystyki można je podzielić na dwie główne grupy: markery kościotworzenia oraz markery resorpcji kostnej.

Do markerów kościotworzenia zalicza się m.in. frakcję kostną fosfatazy alkalicznej (bALP), osteokalcynę (OC), C-końcowy propeptyd prokolagenu typu I (P1CP) oraz N-końcowy propeptyd prokolagenu typu I (P1NP). W przeszłości w diagnostyce najczęściej wykorzystywano bALP oraz osteokalcynę, jednak ze względu na ich ograniczoną stabilność oraz dużą zmienność dobową stopniowo zaczęto zastępować je bardziej wiarygodnymi markerami.

Obecnie za referencyjny marker syntezy kości uznaje się N-końcowy propeptyd prokolagenu typu I (P1NP), który został wskazany przez International Osteoporosis Foundation (IOF) jako preferowany marker procesu kościotworzenia. P1NP jest fragmentem prokolagenu typu I uwalnianym podczas syntezy kolagenu przez osteoblasty i odzwierciedla intensywność tworzenia nowej tkanki kostnej. Należy podkreślić, że większość krążącego P1NP pochodzi z tkanki kostnej, ponieważ obrót kolagenu typu I w kościach jest znacznie większy niż w innych tkankach organizmu. Z tego względu marker ten uznawany jest za wiarygodny wskaźnik aktywności osteoblastów (45). Dodatkową zaletą P1NP jest stosunkowo niewielka zmienność dobowa, duża stabilność oraz niewielki wpływ przyjmowanych posiłków na jego stężenie, co sprawia, że znajduje on szerokie zastosowanie w monitorowaniu leczenia osteoporozy (46). Należy jednak pamiętać, że podwyższone stężenia P1NP mogą występować również w innych sytuacjach klinicznych, takich jak proces gojenia tkanek, choroby skóry czy włóknienie wątroby (45).

Do markerów resorpcji kostnej zalicza się hydroksyprolinę (HYD), pirydynolinę (PYD), deoksypirydynolinę (DPD), N-końcowy usieciowiony telopeptyd łańcucha α-kolagenu typu I (NTX) oraz C-końcowy usieciowiony telopeptyd łańcucha α-kolagenu typu I (CTX). Obecnie największe znaczenie kliniczne mają markery CTX i NTX, które stanowią fragmenty kolagenu typu I uwalniane podczas resorpcji kości przez osteoklasty.

Ich stężenie odzwierciedla intensywność procesu degradacji macierzy kostnej. Dzięki możliwości oznaczania zarówno w surowicy, jak i w moczu oraz szerokiej dostępności testów diagnostycznych, markery te znajdują zastosowanie w monitorowaniu leczenia osteoporozy (47). W tabeli 2 przedstawiono zestawienie wybranych markerów obrotu kostnego wraz z ich zmiennością dobową oraz materiałem biologicznym wykorzystywanym do oznaczeń.

Tabela 2. Markery obrotu kostnego. Opracowanie własne na podstawie Anyszek i wsp. (2016) i Drwęska-Matelska (2014) (46,47).

Marker obrotu kostnego	Skrót	Zmienność dobowa	Najwyższy poziom w ciągu doby	Pobierany materiał
Kostna frakcja alkalicznej fosfatazy	BAP, b-alp	<10%	Brak informacji	Surowica, osocze
Osteokalcyna	OC	30%	Druga połowa nocy	
N-końcowy propeptyd prokolagenu typu I	P1NP, pINp	<25%	Druga połowa nocy	
C-końcowy propeptyd prokolagenu typu I	P1CP, pICp	<25%	Druga połowa nocy	
Pirydynolina, deoksypirydynolina	PYD, DPD	37%	Nad ranem	Mocz, surowica
N-końcowy usieciowiony telopeptyd łańcucha α kolagenu typu I	NTX	37%	Druga połowa nocy	Surowica, osocze, mocz
C-końcowy usieciowiony telopeptyd łańcucha α kolagenu typu I	CTX	57%	Brak informacji	Mocz, surowica

W praktyce klinicznej markery obrotu kostnego wykorzystywane są przede wszystkim jako badanie pomocnicze, umożliwiające identyfikację pacjentów z przyspieszonym obrotem kostnym. Uważa się, że nasilony obrót metaboliczny kości może stanowić czynnik ryzyka złamań osteoporotycznych. Markery te znajdują również zastosowanie w monitorowaniu skuteczności leczenia farmakologicznego. Należy jednak podkreślić, że żaden z markerów obrotu kostnego nie może być stosowany jako samodzielne narzędzie diagnostyczne osteoporozy, ponieważ ich stężenia nie korelują bezpośrednio z gęstością mineralną kości (46). Na stężenie markerów obrotu kostnego wpływa wiele czynników fizjologicznych i klinicznych. Szczególnie istotną rolę odgrywa status menopauzalny. W okresie przejścia menopauzalnego obserwuje się stopniowy spadek stężenia estrogenów, któremu towarzyszy zwiększenie tempa remodelingu tkanki kostnej oraz wzrost stężenia markerów obrotu kostnego. Największe wartości markerów obserwuje się w późnym okresie okołomenopauzalnym oraz we wczesnym okresie pomenopauzalnym. Podwyższone stężenia markerów mogą utrzymywać się również w kolejnych latach po menopauzie. Na wartości markerów obrotu kostnego mogą wpływać również inne czynniki, takie jak choroby metaboliczne kości, zaburzenia endokrynologiczne czy choroby przewlekłe, co należy uwzględnić przy interpretacji wyników badań (48).

Z tego względu oznaczanie markerów obrotu kostnego może stanowić cenne uzupełnienie diagnostyki osteoporozy oraz narzędzie wspomagające monitorowanie skuteczności leczenia.

1.7.2 Badania analityczne w diagnostyce osteoporozy

Analityczne badania laboratoryjne nie mają kluczowego znaczenia w rozpoznawaniu osteoporozy, jednak ich wykonanie jest istotne w diagnostyce różnicowej chorób metabolicznych kości. National Osteoporosis Society zaleca wykonanie podstawowych badań laboratoryjnych obejmujących morfologię krwi, odczyn Biernackiego (OB), ocenę gospodarki wapniowo-fosforanowej oraz badania oceniające funkcję wątroby i nerek. Do najczęściej wykonywanych oznaczeń należą stężenia wapnia (Ca), fosforanów nieorganicznych (Pi), fosfatazy alkalicznej (ALP), albuminy, kreatyniny oraz hormonów tarczycy (TSH). U mężczyzn zaleca się również oznaczenie stężenia testosteronu.

Istotnym elementem diagnostyki jest także ocena gospodarki wapniowo-fosforanowej obejmująca oznaczenie stężenia wapnia, fosforanów, parathormonu (iPTH), 25-

hydroksywitaminy D [25(OH)D_3] oraz dobowego wydalania wapnia z moczem. Oznaczenie kreatyniny oraz wskaźnika filtracji kłębuszkowej (eGFR) umożliwia dodatkowo ocenę funkcji nerek. Na podstawie uzyskanych wyników możliwe jest przeprowadzenie diagnostyki różnicowej chorób metabolicznych kości (Tabela 3.) (46).

Tabela 3. Diagnostyka różnicowa chorób metabolicznych kości na podstawie oceny gospodarki wapniowo-fosforanowej (46).

Zaburzenie	Badany analit					
	Ca	P	Ca w moczu	iPTH	25(OH)D3	kreatynina
Pierwotna niedoczynność przytarczyc	↑	↓	↑	↑	N	N
Osteodystrofia nerkowa	↑↓	↑↑	-	↑↑	↓↓	↑↑
Osteomalacja	↓	↓	↓	↑	↓	N
Osteoporoza	N	N	N↑	N	N	N

1.8 Leczenie osteoporozy

1.8.1 Leczenie farmakologiczne

Leczenie farmakologiczne osteoporozy u kobiet po menopauzie ma na celu przede wszystkim zmniejszenie ryzyka złamań osteoporotycznych. Obecnie dostępnych jest wiele leków o różnym mechanizmie, które zostały zatwierdzone do zapobiegania i leczenia osteoporozy. Farmakoterapia powinna być uzupełniona dodatkową suplementacją wapnia i witaminy D, a także modyfikacją stylu życia obejmującą właściwą dietę i regularną aktywność fizyczną.

Leki stosowane w terapii osteoporozy można podzielić na dwie podstawowe grupy: leki antyresorpcyjne oraz leki anaboliczne. Do leków antyresorpcyjnych należą estrogeny, selektywne modulatory receptorów estrogenowych (SERM), bisfosfoniany oraz denosumab. Ich działanie polega na hamowaniu aktywności osteoklastów i ograniczaniu resorpcji kości, co prowadzi do zahamowania utraty gęstości mineralnej kości (BMD) (49).

Do najczęściej stosowanych leków antyresorpcyjnych należą bisfosfoniany, takie jak: alendronian, risedronian, kwas zoledronowy. Ich mechanizm działania opiera się na hamowaniu osteoklastów poprzez zmniejszenie ich aktywacji, indukcję apoptozy tych komórek i zaburzenia syntezy kwasu mewalonianowego odpowiedzialnego za funkcjonowanie osteoklastów. W efekcie dochodzi do zmniejszenia resorpcji kości oraz stabilizacji gęstości mineralnej kości (BMD). Najczęstszymi działaniami niepożądanymi bisfosfonianów są dolegliwości ze strony przewodu pokarmowego, takie jak zapalenie przełyku czy dyspepsja. Rzadkimi, lecz poważnymi powikłaniami są atypowe złamania kości udowej oraz martwica kości szczęki (50).

Inną grupą leków antyresorpcyjnych jest denosumab – przeciwciało monoklonalne skierowane przeciwko ligandowi RANKL. Hamuje on różnicowanie i aktywację osteoklastów poprzez blokowanie interakcji RANKL z receptorem RANK, co prowadzi do zahamowania resorpcji kości. Do działań niepożądanych denosumabu zalicza się hipokalcemię, zakażenia skóry oraz, podobnie jak w przypadku bisfosfonianów, ryzyko martwicy kości szczęki (51).

Do leków antyresorpcyjnych należą również selektywne modulatory receptorów estrogenowych (SERM, ang. Selective Estrogen Receptor Modulators). Są to niesteroidowe cząsteczki, które działają na receptory estrogenowe. W zależności od ich umiejscowienia mogą działać jako agoniści lub antagoniści tych receptorów. Do grupy SERM stosowanych w leczeniu osteoporozy należą raloksyfen oraz bazedoksyfen (50). Do działań niepożądanych należą nasilenie uderzeń gorąca, zwiększone ryzyko choroby zakrzepowo-zatorowej oraz możliwy wzrost ryzyka choroby wieńcowej u kobiet (51).

Lekami anabolicznymi są teriparatyd (PTH 1–34) oraz abaloparatyd – syntetyczny analog peptydu podobnego do parathormonu (PTHrP). Preparaty te działają poprzez stymulację aktywności osteoblastów i pobudzanie procesów kościotworzenia prowadząc do zwiększenia masy kostnej oraz poprawy mikroarchitektury kości (49). Leki te przeciwskazane są u osób z nadczynnością przytarczyc, ponieważ mogą zaostrzać u tych pacjentów hiperkalcemię. Nie należy ich również podawać u osób z nowotworami kości lub u chorych ze zwiększonym ryzykiem kostniakomięsaka (50,51).

Najnowszym lekiem stosowanym w terapii osteoporozy jest romosozumab – przeciwciało monoklonalne skierowane przeciwko sklerostynie. Wykazuje ono zarówno działanie anaboliczne, jak i antyresorpcyjne poprzez stymulację tworzenia nowej tkanki kostnej i hamowanie jej resorpcji (29). Jako efekt niepożądany tych leków zauważa się zwiększone ryzyko chorób naczyniowo- sercowych (51).

Badania kliniczne nad lekami wykorzystywanymi u kobiet z osteoporozą w wieku postmenopauzalnym kładą największy nacisk na redukcję ryzyka złamań. Wykazano, że stosowanie terapii przeciwosteoporotycznej zmniejsza ryzyko złamań kości biodrowej o około 40%, złamań kręgów o 30–70%, a w przypadku niektórych leków ryzyko złamań pozakręgowych o 30–40%. W poniższej tabeli (Tabela 4.) przedstawiono skuteczność przeciwzłamaniową najczęściej stosowanych leków w osteoporozie pomenopauzalnej, stosowanych w skojarzeniu z suplementami wapnia i witaminy D, pochodzącymi z randomizowanych i kontrolowanych badań (49).

Tabela 4. Skuteczność przeciwzłamaniowa zatwierdzonych metod leczenia osteoporozy pomenopauzalnej („+" - znaczące zmniejszenie złamań w randomizowanych badaniach klinicznych kontrolowanych placebo o zmiennym czasie trwania (18 miesięcy do 6,8 lat; „-" -nie wykazano efektu w randomizowanych badaniach klinicznych)) (49).

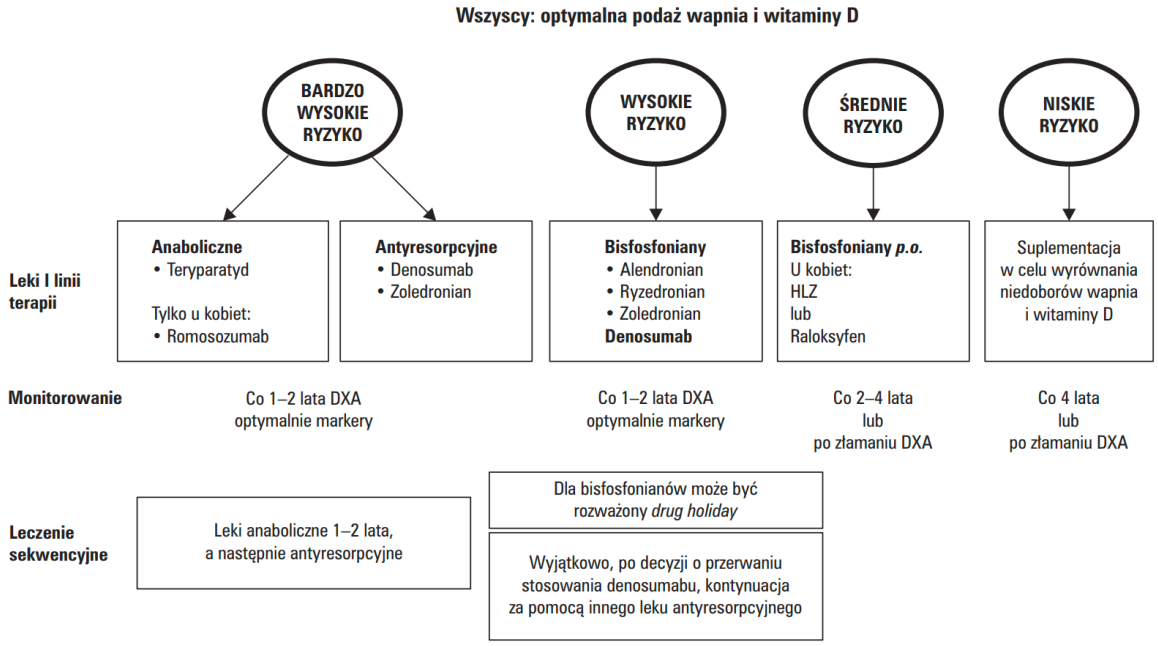
Skuteczność przeciwzłamaniowa zatwierdzonych metod leczenia osteoporozy pomenopauzalnej			
Lek	Złamania kręgów	Złamania pozakręgowe	Złamania kości biodrowej
Alendronian	+	+	+
Risendronian	+	+	+
Ibandronat	+	-	-
Kwas zoledronowy	+	+	+
Hormonalna terapia zastępcza (HTZ)	+	+	+
Raloksyfen/Bazedoksyfen	+	-	-
Teriparatyd	+	+	-
Abaloparatyd	+	+	-
Denosumab	+	+	+
Romozosumab	+	+[1]	+[1]

[1]Leczenie stosowane równocześnie z alendronatem bądź samym alendronatem.

Leczenie osteoporozy jest o tyle trudne, że u większości pacjentów osteoporoza przebiega bezobjawowo, a skuteczność leczenia jest przez nich niewykrywalna.

Wymagana jest zatem skuteczna komunikacja między pacjentem i lekarzem oraz wczesne wykrywanie przypadków nieprzestrzegania zaleceń.

Według najnowszych zaleceń postępowania diagnostycznego i leczniczego w osteoporozie w Polsce pacjenci ze złamaniami niskoenergetycznymi powinni być od razu zaliczeni do grupy pacjentów o wysokim ryzyku złamań i w ich przypadku należy wdrożyć nie tylko leczenie farmakologiczne, ale również ortopedyczne i rehabilitacyjne. U pacjentów z bardzo wysokim ryzykiem złamań w pierwszej kolejności zaleca się zastosowanie leków o działaniu anabolicznym (teraparetyd, romosumab), a w następnej kolejności należy podać leki hamujące resorpcję. Należy również przeprowadzić diagnostykę w kierunku osteoporozy wtórnej, obejmującą badania laboratoryjne oraz ocenę densytometryczną. Poprawny algorytm postępowania przedstawia Rycina 9.



Rycina 9. Proponowany algorytm postępowania farmakologicznego u kobiet i mężczyzn po 50 r. ż. w zależności od ryzyka złamań. DXA- ang. Dual Energy X-ray absorptiometry; HLZ- hormonalne leczenie zastępcze (35).

Leczenie wymaga regularnej kontroli efektywności i bezpieczeństwa. Konieczna jest również weryfikacja pojawiających się nowych czynników złamań (35).

1.8.2 Postępowanie niefarmakologiczne i fizjoterapia

Fizjoterapia stanowi istotny element postępowania niefarmakologicznego w leczeniu i profilaktyce osteoporozy, obok farmakoterapii oraz odpowiedniej diety. Jej podstawą jest kinezyterapia, czyli leczenie ruchem. Zgodnie z teorią piezoelektryczną nacisk mechaniczny działający na tkankę kostną wywołuje powstawanie różnicy potencjałów elektrycznych, co stymuluje procesy kościotworzenia. Z tego względu regularna aktywność fizyczna wywiera korzystny wpływ na strukturę i wytrzymałość kości. Dodatkowo ćwiczenia poprawiają siłę mięśni, elastyczność stawów, postawę ciała, równowagę oraz koordynację ruchową, co przyczynia się do zmniejszenia ryzyka upadków i złamań (52). Szczególnie istotnym elementem rehabilitacji są ćwiczenia oporowe. Obciążenia mechaniczne wywierane na układ kostny stymulują procesy kościotworzenia oraz sprzyjają utrzymaniu prawidłowej struktury tkanki kostnej. Im większe obciążenie szkieletu, tym silniejsza stymulacja procesów przebudowy tkanki kostnej. Istotną rolę odgrywa również intensywność wysiłku fizycznego. Przyjmuje się, że ćwiczenia o średnim i wysokim natężeniu wykazują najkorzystniejszy wpływ na metabolizm kostny, a pojedyncza sesja treningowa powinna trwać co najmniej 30 minut (53). W celu ograniczenia ryzyka upadków zaleca się także wykonywanie ćwiczeń równoważnych. Przykładem takich ćwiczeń są ćwiczenia wykonywane na niestabilnym podłożu, które poprawiają reakcje posturalne oraz uczą pacjentów szybkiego reagowania w sytuacjach zagrożenia utratą równowagi. Pacjenci z osteoporozą często wykazują pogłębioną kifozę piersiową, co może prowadzić do osłabienia mięśni oddechowych oraz zmniejszenia ruchomości klatki piersiowej. Z tego względu zaleca się wykonywanie ćwiczeń oddechowych, których celem jest wspomaganie pracy układu oddechowego oraz poprawa utlenowania tkanek. Ćwiczenia te powinny być łączone z innymi formami aktywności fizycznej oraz uczyć pacjentów prawidłowego toru oddechowego i efektywnego kaszlu.

W kinezyterapii zaleca się również wykonywanie ćwiczeń ogólnorozwojowych oraz ćwiczeń w środowisku wodnym. Korzystny wpływ na stan układu kostno-mięśniowego wykazują również aktywności rekreacyjne, takie jak nordic walking.

W przypadku wystąpienia złamań osteoporotycznych bardzo istotne jest jak najszybsze rozpoczęcie rehabilitacji, ponieważ pozwala to zapobiec powstawaniu trwałych deficytów funkcjonalnych oraz ograniczeniu sprawności ruchowej. W początkowym okresie unieruchomienia stosuje się ćwiczenia zdrowych części ciała (tzw. ćwiczenia

synergistyczne), a następnie stopniowo wprowadza się ćwiczenia izometryczne zapobiegające zanikom mięśniowym. W terapii wykorzystuje się również ćwiczenia oddechowe.

Uzupełnieniem kinezyterapii jest fizykoterapia. W jej ramach wykorzystuje się zabiegi takie jak laseroterapia, magnetoterapia, ultradźwięki czy krioterapia, które mogą wspierać procesy regeneracyjne tkanki kostnej, zmniejszać dolegliwości bólowe oraz poprawiać ogólną sprawność pacjentów. Dodatkowo u pacjentów z osteoporozą stosuje się także balneoterapię (leczenie uzdrowiskowe), peloidoterapię wykorzystującą właściwości lecznicze borowiny oraz krenoterapię polegającą na spożywaniu leczniczych wód mineralnych.

Należy podkreślić, że wszystkie działania fizjoterapeutyczne powinny być indywidualnie dostosowane do stanu zdrowia oraz możliwości funkcjonalnych pacjenta. Istotne jest także unikanie ruchów i ćwiczeń mogących zwiększać ryzyko złamań, takich jak gwałtowne skręty tułowia czy podnoszenie dużych ciężarów (52). W terapii pacjentów z osteoporozą ważną rolę odgrywa również wsparcie psychospołeczne. Pomoc ze strony rodziny, przyjaciół oraz zespołu terapeutycznego może ułatwiać radzenie sobie z chorobą oraz zmniejszać ryzyko izolacji społecznej i depresji, które często towarzyszą chorobom przewlekłym (49).

Pomimo znacznego postępu w diagnostyce i leczeniu osteoporozy choroba ta nadal stanowi istotne wyzwanie dla zdrowia publicznego zarówno w wymiarze społecznym, jak i ekonomicznym. Złamania osteoporotyczne prowadzą do znacznego pogorszenia jakości życia pacjentów, zwiększają śmiertelność oraz generują wysokie koszty opieki zdrowotnej. W związku ze starzeniem się populacji przewiduje się dalszy wzrost liczby zachorowań na osteoporozę w kolejnych dekadach, zarówno w Polsce, jak i w innych krajach rozwiniętych.

W ostatnich latach coraz większą uwagę zwraca się na patomechanizmy osteoporozy, w szczególności na rolę czynników genetycznych w regulacji metabolizmu tkanki kostnej. Szczególne znaczenie przypisuje się szlakowi sygnałowemu RANK/RANKL/OPG, który stanowi jeden z kluczowych elementów regulujących przebudowę tkanki kostnej. Zaburzenia funkcjonowania tego układu mogą prowadzić do zwiększonej aktywności osteoklastów oraz nasilenia procesów resorpcji kości, co w konsekwencji skutkuje zmniejszeniem masy kostnej i rozwojem osteoporozy.

W związku z rosnącym zainteresowaniem genetycznymi uwarunkowaniami osteoporozy coraz większą uwagę poświęca się analizie polimorfizmów genów

zaangażowanych w regulację metabolizmu tkanki kostnej. Badania nad zmiennością genetyczną w obrębie genów związanych ze szlakiem RANK/RANKL/OPG mogą dostarczyć istotnych informacji dotyczących indywidualnej podatności na rozwój osteoporozy oraz jej powikłań w postaci złamań niskoenergetycznych. W związku z tym podjęto badania mające na celu ocenę wybranych wariantów genetycznych genów związanych z metabolizmem tkanki kostnej.

1.9 Cele pracy

Celem pracy była analiza zależności pomiędzy występowaniem wariantów genetycznych genów RANK (575C>T, rs1805034) i RANKL (-643C>T, rs9533156) a parametrami metabolizmu tkanki kostnej w populacji kobiet w wieku postmenopauzalnym.

Cele szczegółowe

- Analiza zależności pomiędzy wariantami polimorficznymi genów RANK (575C>T, rs1805034) i RANKL (-643C>T, rs9533156) a gęstością mineralną kości (BMD) w populacji kaukaskiej u kobiet w wieku postmenopauzalnym,

- Ocena związku częstości polimorfizmów rs1805034 genu RANK i rs9533156 genu RANKL a ryzykiem wystąpienia osteoporozy i osteopenii w badanej populacji,

- Analiza zależności pomiędzy badanymi wariantami polimorficznymi genów RANK (575C>T, rs1805034) i RANKL (-643C>T, rs9533156) a wybranymi parametrami klinicznymi i densytometrycznymi.

2. Materiały i metody

2.1 Grupa badana

Badaniem objęto 493 niespokrewnione kobiety rasy kaukaskiej będące pacjentkami Szpitala Klinicznego nr 1 Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie. Udział pacjentek w badaniu był zgodny z decyzją Komisji Bioetycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie (nr KB-0012/100/15). Materiał do badań został zebrany w latach 2016 - 2018, a analiza genetyczna została przeprowadzona w latach 2020-2022.Wszystkie uczestniczki zostały poinformowane o celu oraz zakresie prowadzonych badań i wyraziły pisemną, świadomą zgodę na udział w projekcie.

U zakwalifikowanych pacjentek wykonano badanie densytometryczne w Laboratorium Densytometrii Szpitala Klinicznego nr 1 PUM w Szczecinie. Ocenę gęstości mineralnej kości (BMD) przeprowadzono z wykorzystaniem metody podwójnej absorpcjometrii rentgenowskiej (DXA – dual-energy X-ray absorptiometry). W trakcie badania oznaczono wartości BMD oraz parametry T-score i Z-score.

Pomiar gęstości mineralnej kości wykonano w odcinku lędźwiowym kręgosłupa (L2–L4). Badania densytometryczne przeprowadzano zgodnie z procedurą producenta aparatu, przy zachowaniu standardowych warunków pomiarowych oraz regularnej kalibracji urządzenia. Dodatkowo określono wartości BMD odnoszące się do średniej gęstości mineralnej kości dla młodych dorosłych (YA – young adults) oraz średniej gęstości mineralnej kości dla populacji w tym samym wieku (AM – age matched).

U wszystkich pacjentek dokonano również pomiaru masy ciała i wzrostu, na podstawie których obliczono wskaźnik masy ciała BMI (body mass index) według wzoru:

$$\text{BMI} = \text{masa ciała [kg]} / \text{wzrost}^2\ [\text{m}^2]$$

Z każdą uczestniczką przeprowadzono szczegółowy wywiad medyczny obejmujący m.in. informacje dotyczące chorób współistniejących, stosowanego leczenia farmakologicznego, wieku wystąpienia pierwszej miesiączki, wieku menopauzy oraz liczby przebytych ciąż.

Do badania kwalifikowano kobiety spełniające następujące kryteria:

- upływ co najmniej jednego roku od wystąpienia menopauzy,
- brak stosowania hormonalnej terapii zastępczej (HTZ),
- brak przyjmowania leków wpływających na metabolizm tkanki kostnej (m.in. SERM, kalcytoniny, bisfosfonianów, hormonów tarczycy,

glikokortykosteroidów, heparyny, leków przeciwpadaczkowych, analogów GnRH oraz tibolonu).

- Z badania wykluczono pacjentki po obustronnej owariektomii oraz kobiety, u których stwierdzono choroby mogące wpływać na metabolizm tkanki kostnej, takie jak: zaburzenia endokrynologiczne i metaboliczne, choroby hematologiczne, choroby nowotworowe, choroby nerek, choroby autoimmunologiczne, choroby tkanki łącznej.

Charakterystykę badanej populacji przedstawiono w Tabeli 5.

Tabela 5. Charakterystyka ogólna grupy badanej.

Analizowane zmienne (średnie)	Grupa badana
n	493
Wiek	54,37 ± 9,26
Wiek wystąpienia pierwszej miesiączki	12,86 ± 2,08
Wiek wystąpienia ostatniej miesiączki	48,94 ± 4,66
Masa ciała (kg)	63,37 ± 10,68
Wzrost (cm)	161,96 ± 5,69
BMI (kg/m2)	24,21 ± 3,74
BMD L2-L4 (g/cm2)	0,969 ± 0,163
T- score	-1,93 ± 1,31
BMD L2-L4 YA (%)	80,14 ± 13,05
BMD L2-L4 AM (%)	89,70 ± 14,34

± odchylenie standardowe

2.2 Izolacja DNA

Badania genetyczne przeprowadzono w Zakładzie Komórek Macierzystych i Medycyny Regeneracyjnej Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu. Materiałem badawczym było DNA wyizolowane z krwi obwodowej. Do probówki zawierającej etylenodwuaminoczterooctan (EDTA) od każdej pacjentki z okolicy zgięcia łokciowego pobrano około 6ml krwi. Każdą próbkę zamrożono w -20 C. Do izolacji wykorzystano komercyjnie dostępny zestaw „QIAamp DNA Blood Mini Kit”

firmy Qiagen. Do każdej przygotowanej próbówki typu eppendorf dodano 20µl proteinazy K, a następnie 200 µl krwi obwodowej. W kolejnym etapie do powstałej mieszaniny dodano 200 µl buforu do lizy (bufor AL). Zawartość probówki worteksowano i inkubowano przez 20 minut w temperaturze 56°C. Po tym czasie probówkę krótko zwirowano, a następnie dodano 200 µl 96%. etanolu. W kolejnym etapie materiał worteksowano przez około 15 sekund. Zawartość wymieszanej probówki przeniesiono na kolumienkę (QIAamp Mini spin kolumn) umieszczoną w probówce o pojemności 2 ml i wirowano przez 1 minutę z prędkością 8000 rpm. Supernatant został usunięty, a na kolumienkę dodano 500 µl buforu przemywającego AW1. Wirowanie powtórzono i ponownie usunięto supernatant. Procedurę tę powtórzono przy użyciu buforu przemywającego AW2 i próbę zwirowano 3 min przy prędkości 12 000 rpm. W kolejnym etapie kolumienkę umieszczono w probówce typu eppendorf i dodano 200 µl buforu do elucji (bufor AE). Próbę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut i po tym czasie zwirowano w warunkach 8000 rpm w czasie 1 minuty w celu uwolnienia DNA ze złoża. Tak otrzymany DNA poddano analizie jakościowej i ilościowej. Wyizolowane próbki DNA przechowywano w temperaturze -20^{o}C do czasu dalszych analiz genetycznych.

2.3 Analiza jakościowa i ilościowa

Do oceny jakościowej i ilościowej DNA użyto spektrofotometru NanoDrop (Eppendorf). Urządzenie umożliwiło zmierzenie absorbancji przy długościach fali 260 nm (maksimum absorpcji dla DNA) i 280 nm (maksimum absorpcji dla białek). Współczynnik gęstości optycznej OD (ang. optical density) wynosił A_{260}/A_{280}. Za wolny od zanieczyszczeń roztwór DNA przyjęto, gdy wartość OD=A_{260}/A_{280} mieściła się w zakresie między 1.7 a 2.0.

Analizę ilościową przeprowadzono metodą spektofotometryczną. Mierzono absorbancję przy długości fali λ =260 nm a następnie obliczono stężenie DNA według wzoru:

stężenie DNA = absorbancja przy 260 nm x rozcieńczenie x 50

gdzie przyjęto, że A_{260} = 1 dla helisy DNA odpowiada ilości 50 µg/ml.

Otrzymane stężenie mieściło się w przedziale 50 – 75 ng/µl.

Jakość otrzymanych próbek sprawdzono na 1,5% żelach agarozowych z dodatkiem bromku etydyny. Otrzymanie jednolitego pojedynczego prążka świadczyło o wysokiej jakości i czystości DNA.

2.4 Wykrywanie polimorfizmów 575C>T genu RANK i -643C>T genu RANKL metodą real-time PCR

Analiza genetyczna polimorfizmów 575C>T genu RANK i -643C>T genu RANKL została przeprowadzona przy użyciu metody łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (real-time PCR, ang. real-time polymerase chain reaction). Wybrane polimorfizmy dobrano na podstawie wcześniejszych doniesień naukowych wskazujących na ich potencjalny związek z metabolizmem tkanki kostnej i ryzykiem wystąpienia osteoporozy.

PCR w czasie rzeczywistym jest jedną z głównych metod wykorzystywanych m.in. w laboratoriach diagnostycznych. Jest to udoskonalona technika klasycznego PCR, w której oprócz standardowych odczynników (polimeraza, jony magnezu, bufor, matrycowy DNA), wykorzystuje się fluorescencyjnie znakowane cząsteczki reporterowe (barwniki interkalujące, fluorescencyjnie znakowane oligonukleotydy) w celu monitorowania wytwarzania produktów amplifikacji podczas każdego cyklu reakcji PCR (54). Każda reakcja PCR składa się zazwyczaj z 20-40 cykli temperaturowych, z których każdy cykl obejmuje denaturację dupleksów DNA, hybrydyzację starterów flankujących sekwencję docelową oraz wydłużanie starterów przez polimerazę DNA. Każdy cykl skutkuje podwojeniem liczby docelowych cząsteczek DNA i ilość produktu wzrasta wykładniczo. Po pewnym czasie substraty reakcji wyczerpują się, co powoduje zablokowanie reakcji i powoduje osiągnięcie fazy plateau. Dodatkowo PCR w czasie rzeczywistym mierzy ilość produktu po każdym cyklu amplifikacji za pomocą odczytu fluorescencyjnego, co przedstawiane jest w sposób graficzny za pomocą wykresu. Typowy wykres w real time PCR ma postać sigmoidalnej krzywej, w której można wyróżnić fazę linii podstawowej, wykładniczą oraz liniową przechodzącą w fazę plateau (55). Ze względu na wysoką czułość, specyficzność, niskie ryzyko kontaminacji oraz skrócony czas obsługi, a także brak konieczności analizy post-PCR, metoda ta jest jedną z częściej wykorzystywanych w laboratoriach (54).

W celu detekcji pojedynczych polimorfizmów genów wykorzystano amplifikację wybranych fragmentów DNA, które są specyficzne dla miejsca występowania zmian 575C>T genu RANK (rs1805034) oraz -643C>T genu RANKL (rs9533156). Amplifikację wykonano na urządzeniu LightCycler®96 firmy ROCHE Diagnostics. Do reakcji użyto sond hybrydyzacyjnych typu SimpleProbe, które zostały wyznakowane barwnikami fluoroscencyjnymi. Wykrywanie pojedynczych polimorfizmów

nukleotydowych (SNP, ang. Single Nucleotide Polimorphism) oraz analizy otrzymanych wyników dokonano przy użyciu oprogramowania dedykowanego przez producenta (LightCycler®96 Basic Software) na podstawie pomiaru fluorescencji i analizy krzywych topnienia. Do genotypowania wykorzystano zestawy LightSNiP RANK rs1805034 (TIB Molbiol, Berlin, Niemcy) i LightSNiP RANKL rs9533156 (TIB Molbiol, Berlin, Niemcy) zawierające odpowiednio dobrane stężenia sond i starterów dla amplifikowanego fragmentu. Mieszaninę reakcyjną sporządzono według wytycznych producenta. Reakcja real-time PCR dla każdego badanego genu składała się z 45 cykli. Warunki w jakich została przeprowadzona reakcja przedstawiono w poniższej tabeli (Tabela 6).

Tabela 6. Warunki reakcji real-time PCR

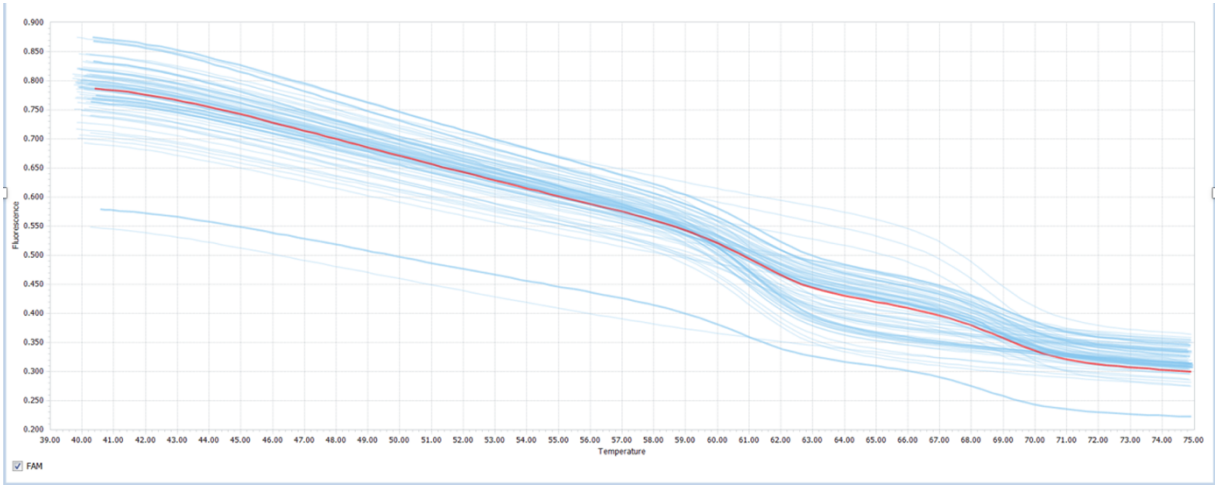
ETAP REAKCJI PCR	TEMPERATURA	CZAS	ILOŚĆ CYKLI
Denaturacja wstępna	95ºC	10 min.	1
Denaturacja	95ºC	10 sek.	45
Hybrydyzacja starterów	60ºC	10 sek.	
Elongacja	72ºC	15 sek.	

Po zakończeniu wszystkich etapów reakcji, w wyniku wzrostu temperatury do wysokości 95ºC następowało topnienie produktów. Mieszaninę reakcyjną dla badanych polimorfizmów sporządzono zgodnie z poniższą tabelą (Tabela 7.).

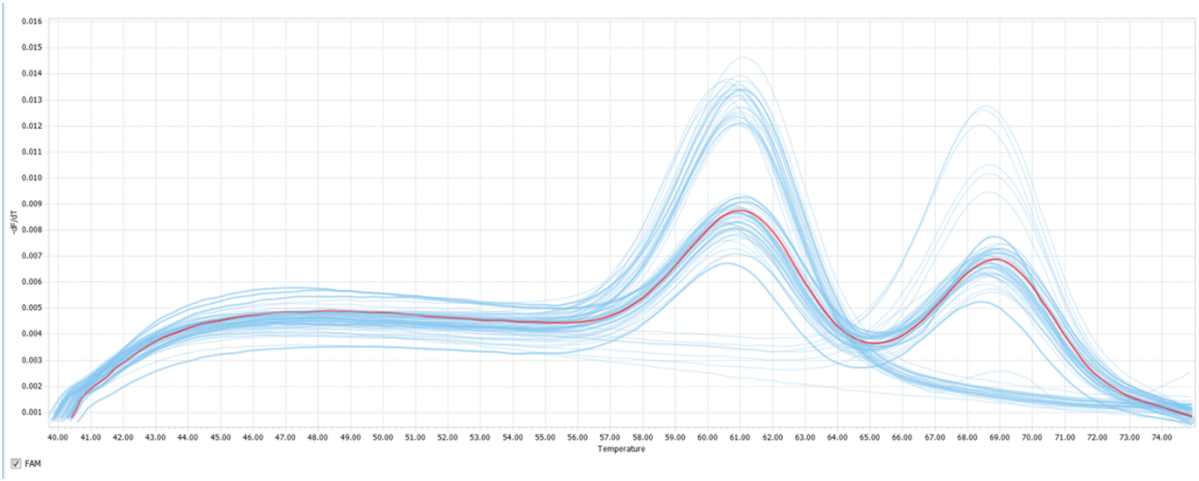
Tabela 7. Skład mieszaniny reakcyjnej.

SKŁADNIKI REAKCJI	1 próbka (ul)
H_2O	6,7
Mieszanina reakcyjna (LightSNiP RANK (rs1805034) lub LightSNiP RANKL (rs 9533156)	0,5
LightCycler 480 Genotyping Master	1
$MgCl_2$ (25mM)	0,8
DNA (50 ng)	1
Objętość końcowa	10

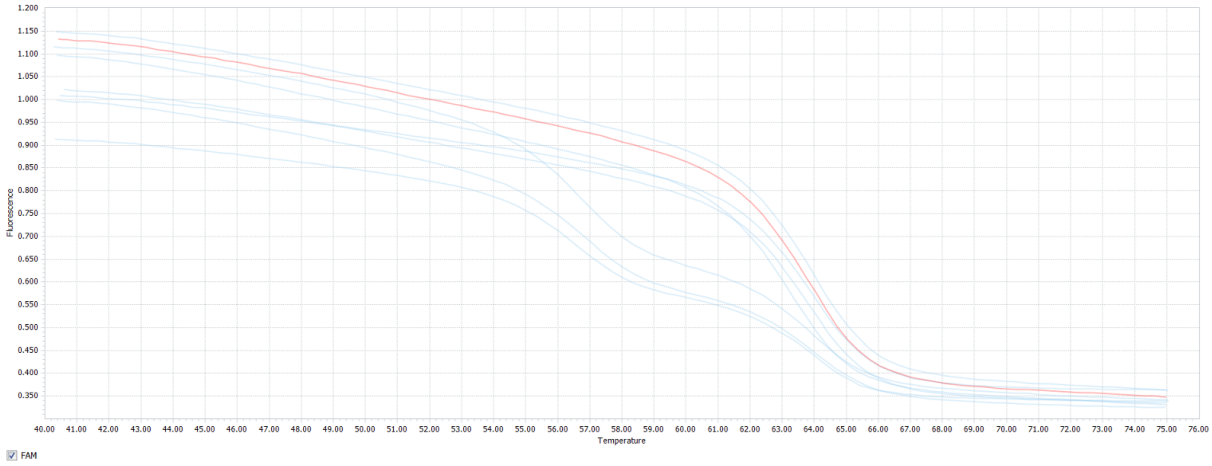
W oparciu o otrzymane wyniki w postaci krzywych topnienia i ich pików, które świadczyły o specyficzności reakcji dla poszczególnych wariantów genetycznych, dokonano analizy genotypów badanych genów. Krzywa topnienia była wykreślana na podstawie pomiaru fluorescencji, którą mierzono co 0,5°C. Gdy mieszanina reakcji osiągała temperaturę topnienia następowała nagła denaturacja produktu, czemu towarzyszyło gwałtowne obniżenie poziomu fluorescencji. Spadek ten przedstawiony został na wykresie w postaci piku. Przykładowe wykresy przedstawiono na poniższych rycinach (Rycina 10, 11, 12, 13).



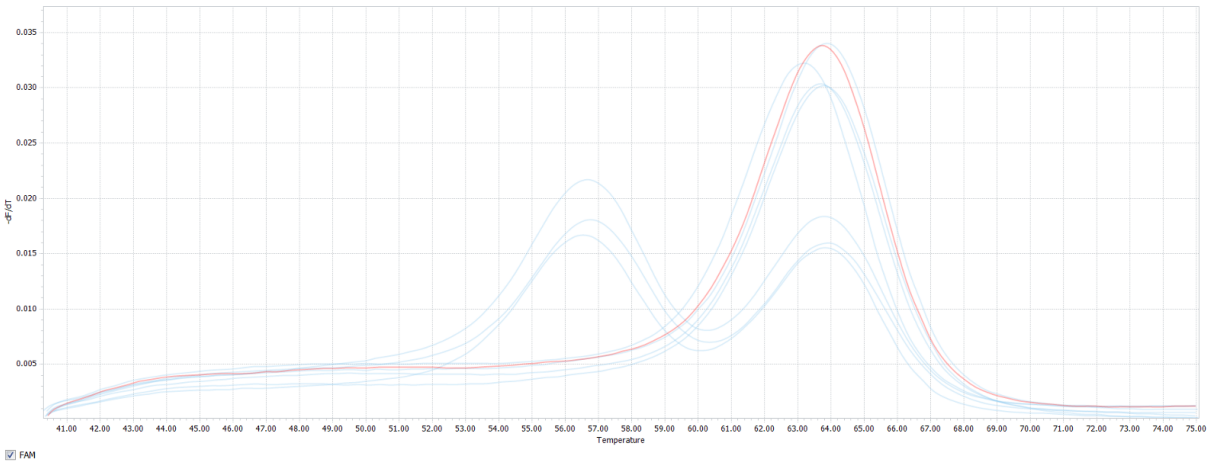
Rycina 10. Analiza krzywych topnienia produktów dla poszczególnych genotypów w genie RANK (rs1805034) w reakcji real-time PCR. Temperatura topnienia (Tm) dla produktów reakcji PCR: Tm dla allelu T=68,75°C, Tm dla allelu C=60,86°C



Rycina 11. Piki krzywych topnienia dla poszczególnych genotypów w genie RANK (rs1805034) w reakcji real-time PCR. Temperatura topnienia (Tm) dla produktów reakcji PCR: Tm dla allelu T=68,75°C, Tm dla allelu C=60,86°C



Rycina 12. Analiza krzywych topnienia produktów dla poszczególnych genotypów w genie RANKL (rs9533156) w reakcji real-time PCR. Temperatura topnienia (Tm) dla produktów reakcji PCR: Tm dla allelu T=56,62°C oraz Tm dla allelu C=63,88°C



Rycina 13. Piki krzywych topnienia dla poszczególnych genotypów w genie RANKL (rs9533156) w reakcji real-time PCR. Temperatura topnienia (Tm) dla produktów reakcji PCR: Tm dla allelu T=56,62°C oraz Tm dla allelu C=63,88°C

2.5 Analiza statystyczna

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono z wykorzystaniem programu Statistica wersja 13.3. (StatSoft, USA) dla systemu Windows. Na potrzeby analizy utworzono bazę danych obejmującą informacje kliniczne dotyczące badanych pacjentek oraz uzyskane wyniki genotypowania polimorfizmów genów RANK i RANKL.

W celu scharakteryzowania badanej populacji przedstawiono zakres wartości analizowanych parametrów klinicznych, określając wartości minimalne i maksymalne. Dla badanych zmiennych obliczono również średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe (SD, standard deviation) oraz błąd standardowy średniej. Wyniki zaprezentowano wraz z 95% przedziałami ufności (PU, confidence interval), wykorzystując jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA, analysis of variance). W kolejnym etapie sprawdzono zgodność rozkładu genotypów z prawem Hardy'ego–Weinberga, obliczając wartości oczekiwane na podstawie równania:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

gdzie p i q oznaczają częstości poszczególnych alleli badanych genów. Uzyskane wartości oczekiwane porównano z wartościami obserwowanymi w badanej populacji.

Różnice w rozkładzie częstości genotypów oraz alleli pomiędzy analizowanymi grupami oceniono z wykorzystaniem testu chi-kwadrat. Zależności pomiędzy parametrami

densytometrycznymi a wybranymi danymi klinicznymi (wiek, BMI) analizowano przy użyciu testu chi-kwadrat Pearsona.

Za poziom istotności statystycznej przyjęto wartość $p < 0,05$.

Wykresy przedstawiające rozkład częstości genotypów i alleli opracowano w programie Microsoft Excel (wersja 16.80) dla systemu macOS. Natomiast wizualizacje zależności pomiędzy wynikami badania densytometrycznego a masą ciała oraz wskaźnikiem BMI wykonano w środowisku R (wersja 4.1.2) (R Foundation for Statistical Computing, Wiedeń, Austria) (56) z wykorzystaniem pakietu SNPassoc (57).

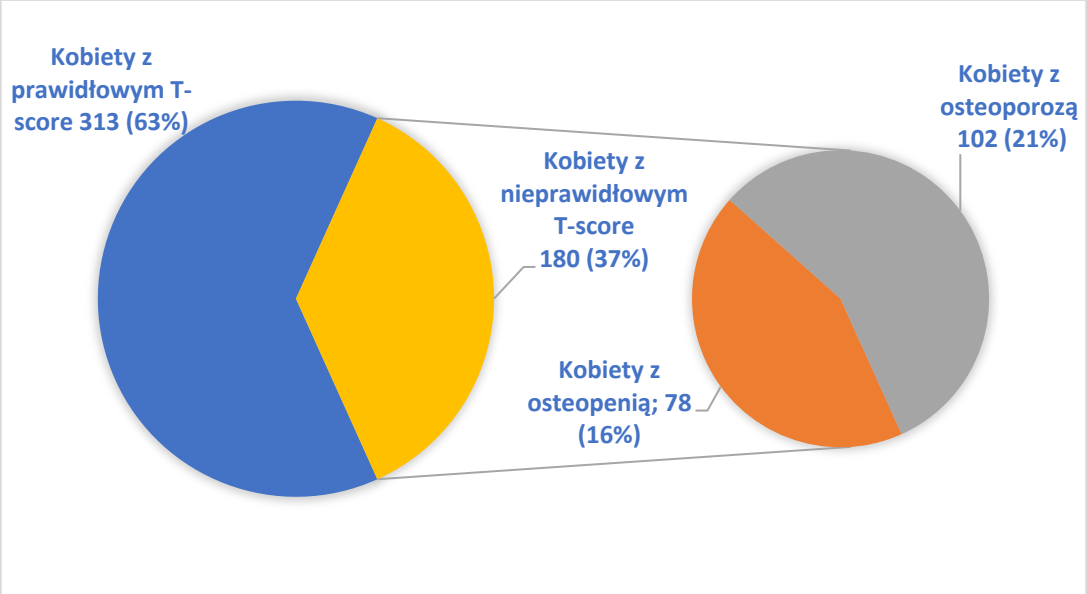
3. Wyniki

3.1 Charakterystyka populacji

W niniejszej pracy w celu przeanalizowania genotypów polimorfizmów 575C>T genu RANK oraz -643C>T genu RANKL zebrano grupę 493 pacjentek w wieku postmenopauzalnym. Grupę podzielono na trzy grupy w zależności od wielkości wskaźnika T-score:

- grupa 1- kobiety z osteopenią (T-score pomiędzy -2,5 a -1) liczyła 78 kobiet
- grupa 2- kobiety z osteoporozą (T-score poniżej -2,5) liczyła 102 kobiety
- grupa 3- kobiety zdrowe (z prawidłową wartością T-score) w wieku postmenopauzalnym liczyła 313 kobiet

Podział badanej populacji na grupy przedstawia wykres poniżej (Rycina 14.).



Rycina 14. Populacja badana z podziałem na grupy.

Wskaźnik Z-score odnosi się do średniego poziomu BMD w populacji referencyjnej dobranej pod względem wieku i płci. Za normę przyjmuje się wartości mieszczące się w zakresie ±1 odchylenia standardowego od tej średniej. Odpowiada to T-score w przedziale od +1 do -1 w odniesieniu do szczytowej masy kostnej. Charakterystykę populacji badanej przedstawiono w Tabeli 8.

Tabela 8. Charakterystyka badanej populacji kobiet w wieku postmenopauzalnym z uwzględnieniem podziału na 3 grupy kobiet: z osteopenią, z osteoporozą i zdrowe (T-score >-1).

Analizowane zmienne	Grupa 1 Kobiety z osteopenią	Grupa2 Kobiety z osteoporozą	Grupa 3 Kobiety zdrowe (T-score > -1)	Ogółem
T-score (n)	76	70	37	183
Średnia (odchylenie standardowe) Mediana Minimum/maksimum Przedział ufności (95%)	-1,77 ± 0,42 -1,73 -2,47/-1,07 -1,91 – (-1,64)	-3,14± 0,49 -3,10 -4,49/-2,26 -3,28 – (-3,00)	0,05 ± 0,96 -0,04 -0,97/3,13 -0,14 – 0,25	-1,93 ± 1,31 -2,08 -4,49/3,13 – (-)
Z-score (n)	53	60	22	135
Średnia (odchylenie standardowe) Mediana Minimum/maksimum Przedział ufności (95%)	-0,70 ± 0,64 -0,76 -2,36/0,77 -0,91 – (-0,49)	-1,66 ± 0,65 -1,78 -3,02/0,98 -1,85 – (-1,46)	0,82± 1,22 0,91 -1,85/2,65 0,50 – 1,14	-0,88 ± 1,16 -1,08 -3,02/2,65 - – (-)
Wiek (n)	77	94	37	208
Średnia (odchylenie standardowe) Mediana Minimum/maksimum Przedział ufności (95%)	53,36 ± 8,85 54 30/77 51,28 – 55,44	55,35 ± 9,38 55 21/78 53,47 – 57,23	53,95 ± 9,81 55 28/71 50,94 – 56,95	54,37 ± 9,26 54,50 21/78 –
Masa urodzeniowa badanych kobiet (n)	28	25	16	69
Średnia (odchylenie standardowe) Mediana Minimum/maksimum Przedział ufności (95%)	3184,23 ±359,57 3200 2500/4500 3017,23 – 3351,23	3120,40 ± 390,01 3100 2470/4500 2950,05-3290,71	3430,00 ± 562,45 3420 2460/5100 3217,12 – 3642,88	3219,10 ± 437,19 3200 2460/5100 –
Wiek wystąpienia pierwszej miesiączki (n)	55	53	22	130
Średnia (odchylenie standardowe) Mediana Minimum/maksimum Przedział ufności (95%)	12,96 ± 2,15 13 9/18 12,41 – 13,52	12,58 ± 2,07 12 9/17 12,02 – 13,15	13,27 ± 1,88 14 10/16 12,40 – 14,15	12,86 ± 2,08 12 9/18 –
Wiek wystąpienia ostatniej miesiączki (n)	59	59	27	145
Średnia (odchylenie standardowe) Mediana Minimum/maksimum Przedział ufności (95%)	49,56 ± 4,88 50 38/60 48,37 – 50,75	47,93 ± 4,69 49 38/60 46,74 – 49,12	49,78 ± 3,77 50 42/58 48,02 – 51,53	48,94 ± 4,66 50 38/60 –
Lata reprodukcyjne (n)	48	49	23	120
Średnia (odchylenie standardowe) Mediana Minimum/maksimum Przedział ufności (95%)	36,67 ± 5,07 37,5 23/49 35,21 – 38,12	35,45 ± 5,05 35 24/48 34,01 – 36,89	36,65 ± 5,28 35 27/48 33,55– 37,76	35,98 ± 5,09 36 23/49 –
Lata od menopauzy (n)	47	49	23	119
Średnia (odchylenie standardowe) Mediana Minimum/maksimum Przedział ufności (95%)	6,72 ± 5,81 5 0/25 5,02 – 8,42	10,27 ± 5,68 10 1/22 8,60 – 11,93	7,83 ± 6,43 6 1/23 5,40 – 10,26	8,39 ± 6,05 7 0/25 –
Liczba ciąż (n)	76	68	37	181
Średnia (odchylenie standardowe) Mediana Minimum/maksimum Przedział ufności (95%)	1,88± 1,15 2 0/6 1,60– 2,16	1,75 ± 1,21 2 0/7 1,45 – 2,05	2,00 ± 1,43 2 0/6 1,60 – 2,40	1,86 ± 1,23 2 0/7 –
Masa ciała (kg) (n)	76	68	37	181

Średnia (odchylenie standardowe) Mediana Minimum/maksimum Przedział ufności (95%)	63,78 ± 10,06 64 41/90 61,44 – 66,11	60,19 ± 8,31 60 43/85 57,73 – 62,66	68,38 ± 13,63 66 50/100 65,04 – 71,72	63,37 ± 10,68 63 41/100 –
Wzrost (cm) (n)	76	68	37	181
Średnia (odchylenie standardowe) Mediana Minimum/maksimum Przedział ufności (95%)	162,38 ± 5,15 162,5 150/175 161,10 – 163,66	160,93 ± 5,69 162 150/175 159,57 – 162,28	162,97 ± 6,58 164 152/180 161,14 – 164,81	161,96 ± 5,69 162 150/176 –
BMI (kg/m2) (n)	76	68	37	181
Średnia (Odchylenie standardowe) Mediana Minimum/maksimum Przedział ufności (95%)	24,18 ± 3,48 24,55 17,30/34,29 23,36 – 25,01	23,36 ± 2,70 23,61 17,10/29,38 22,49 – 24,24	25,82 ± 5,19 24,03 18,33/37,18 24,64 – 27,01	24,21 ± 3,74 24,11 17,10/37,18 –
BMD L2-L4 (g/cm2) (n)	67	61	33	161
Średnia (odchylenie standardowe) Mediana Minimum/maksimum Przedział ufności (95%)	0,98 ± 0,05 0,97 0,90/1,07 0,97 – 1,00	0,82 ± 0,06 0,82 0,66/0,96 0,80 - 0,84	1,22 ± 0,10 1,21 1,08/1,47 1,20 – 1,24	0,97 ± 0,16 0,95 0,66/1,47 –
BMD L2-L4 YA (%) (n)	67	65	33	165
Średnia (odchylenie standardowe) Mediana Minimum/maksimum Przedział ufności (95%)	82,03 ± 4,22 82 75/89 80,66 – 83,40	68,11 ± 5,06 69 55/75 66,71 – 69,50	100,00 ± 8,72 100 86/123 98,04 – 101,96	81,42 ± 13,42 79 53/123 79,76 – 83,07
BMD L2-L4 AM (%) (n)	67	61	33	161
Średnia (odchylenie standardowe) Mediana Minimum/maksimum Przedział ufności (95%)	90,60 ± 6,74 91 79/108 88,71 – 92,48	77,51 ± 6,79 78 60/92 75,53 – 79,49	110,39 ± 11,03 108 92/133 107,71 – 113,08	80,14 ± 13,05 87 55/123 –

W badanej populacji znaczące różnice statystyczne stwierdzono w przypadku takich parametrów jak: lata od ostatniej miesiączki ($p<0,05$), masa ($p<0,001$), BMI ($p=0,05$), a także w przypadku parametrów obrazujących gęstość mineralną kości, tj. T-score, Z-score, BMD L2-L4, BMD L2-L4 YA (%), BMD L2-L4 AM (%) ($P<0,001$).

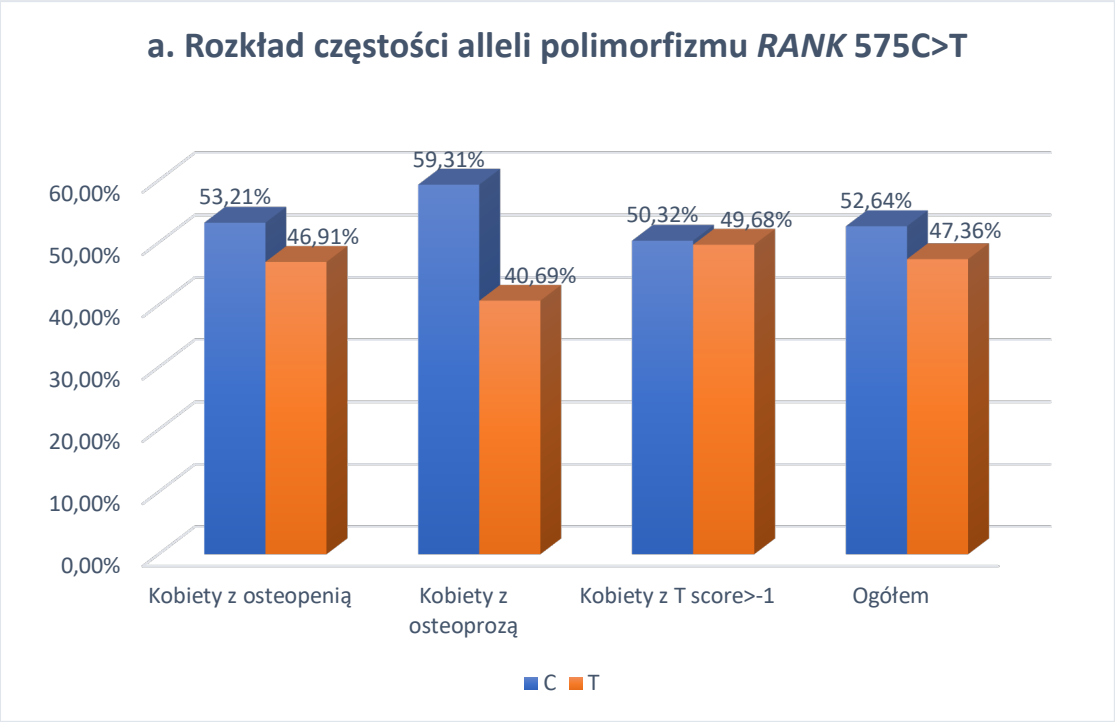
3.2 Analiza rozkładu częstości genotypów i alleli dla polimorfizmu 575C>T w genie RANK i -643C>T w genie RANKL.

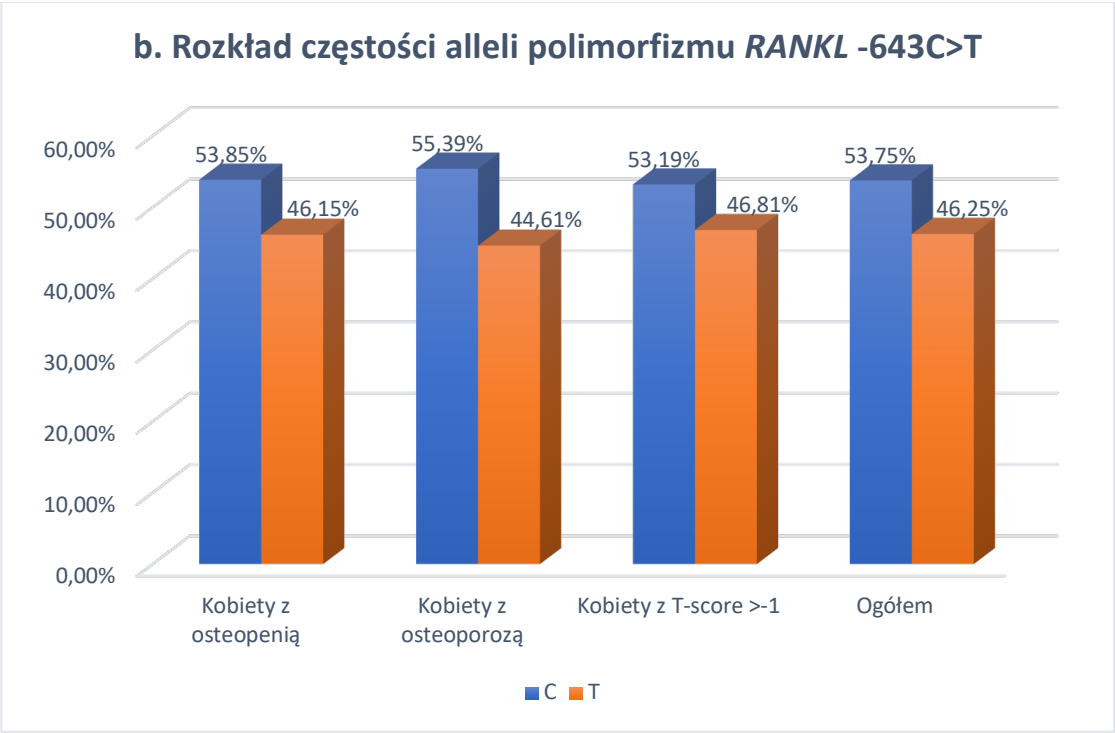
Porównanie częstości występowania alleli dla polimorfizmu 575C>T w genie RANK oraz -643C>T w genie RANKL w grupie kobiet z osteopenią, z osteoporozą i u kobiet z

T- score >-1 przedstawiono w Tabeli 9. W celu lepszego zobrazowania rozkładu alleli i genotypów w badanych polimorfizmach otrzymane wyniki przedstawiono na Rycinie 15.

Tabela 9. Rozkład częstości alleli dla polimorfizmów RANK 575C>T i RANKL -643C>T w grupie kobiet z osteopenią, z osteoporozą oraz u kobiet zdrowych w wieku okołomenopauzalnym.

Allele	Grupa 1 Kobiety z osteopenią	Grupa2 Kobiety z osteoporozą	Grupa 3 Kobiety zdrowe (T-score > -1)	Ogółem
	Wartość obserwowana N (%)	Wartość obserwowana N (%)	Wartość obserwowana N(%)	Wartość obserwowana N (%)
Polimorfizm RANK 575C>T				
C	83 (53,21%)	121 (59,31%)	315 (50,32%)	519 (52,64 %)
T	73 (46,79%)	83 (40,69%)	311 (49,68%)	467 (47,36%)
Polimorfizm RANKL -643C>T				
C	84 (53,85%)	113 (55,39%)	333 (53,19%)	530 (53,75%)
T	72 (46,15%)	91 (44,61%)	293 (46,81%)	456 (46,25%)





Rycina 15. Rozkład częstości alleli w grupie kobiet w wieku postmenopauzalnym z uwzględnieniem podziału na grupy kobiet z osteopenią, osteoporozą, kobiety z T-score>-1 dla polimorfizmów RANK (a.) i RANKL (b.).

Z uzyskanych wyników wynika, że w przypadku polimorfizmu 575C>T genu RANK allel 575C występował częściej w grupie kobiet z osteoporozą niż w pozostałych grupach, natomiast najrzadziej obserwowano go w grupie kobiet z wartością T-score >-1. Z kolei

allel 575T najczęściej występował w grupie kobiet z wartością T-score >-1, ale najrzadziej w grupie kobiet z osteoporozą.

W przypadku polimorfizmu -643C>T genu RANKL allel -643C najczęściej występował w grupie kobiet z osteoporozą, natomiast allel -643T obserwowano najczęściej u kobiet z wartością T-score >-1. W grupie kobiet z osteopenią oraz w grupie kobiet z prawidłową wartością T- score częstość występowania obu alleli była zbliżona.

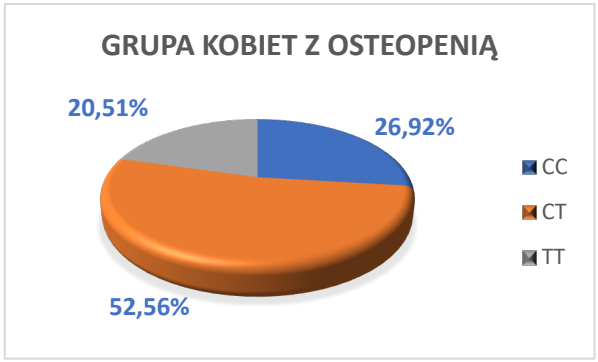
Rozkład częstości genotypów dla analizowanych polimorfizmów był zgodny z równowagą Hardy'ego–Weinberga. Analiza przeprowadzona z wykorzystaniem testu chi-kwadrat nie wykazała istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami ($p>0,05$).

W Tabeli 10. przedstawiono rozkład częstości genotypów analizowanych polimorfizmów w badanych grupach kobiet, natomiast na Rycinie 16. Przedstawiono rozkład częstości alleli w analizowanej populacji.

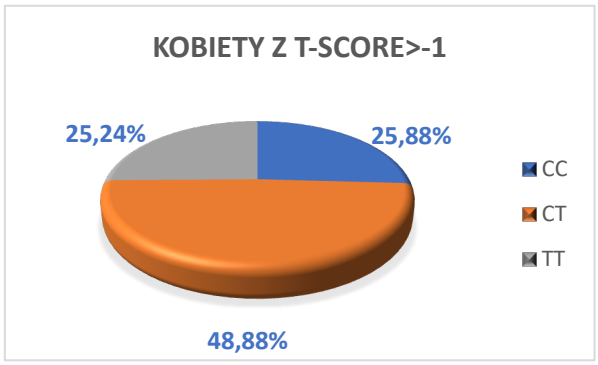
Tabela 10. Rozkład częstości genotypów dla polimorfizmów RANK 575C>T i RANKL -643C>T w grupie kobiet z osteopenią, z osteoporozą oraz u kobiet zdrowych w wieku postmenopauzalnym.

Genotyp	Grupa 1 Kobiety z osteopenią		Grupa2 Kobiety z osteoporozą		Grupa 3 Kobiety zdrowe (T-score > -1)		Ogółem	
	Wartość obserwowana N(%)	Wartość oczekiwana (%)	Wartość obserwowana N (%)	Wartość oczekiwana (%)	Wartość obserwowana N(%)	Wartość oczekiwana	Wartość obserwowana N (%)	Wartość oczekiwana (%)
Polimorfizm RANK 575C>T								
CC	21 (26,92)	31,04	51 (50,00)	31,05	81 (25,88)	31,03	153 (29,44)	31,03
CT	41 (52,56)	46,46	35 (34,31)	45,44	153 (48,88)	46,45	229 (49,64)	46,45
TT	16 (20,51)	22,50	16 (15,69)	22,51	79 (25,24)	22,52	111 (20,92)	22,52
Polimorfizm RANKL -643C>T								
CC	20 (26,30)	26,37	28 (30,67)	26,36	82 (28,30)	26,36	130 (26,39)	28,89
CT	44 (52,40)	54,82	57 (49,42)	54,81	169 (49,80)	54,76	270 (54,77)	49,72
TT	14 (21,30)	18,81	17 (19,90)	18,84	62 (21,91)	18,85	93 (18,86)	21,39

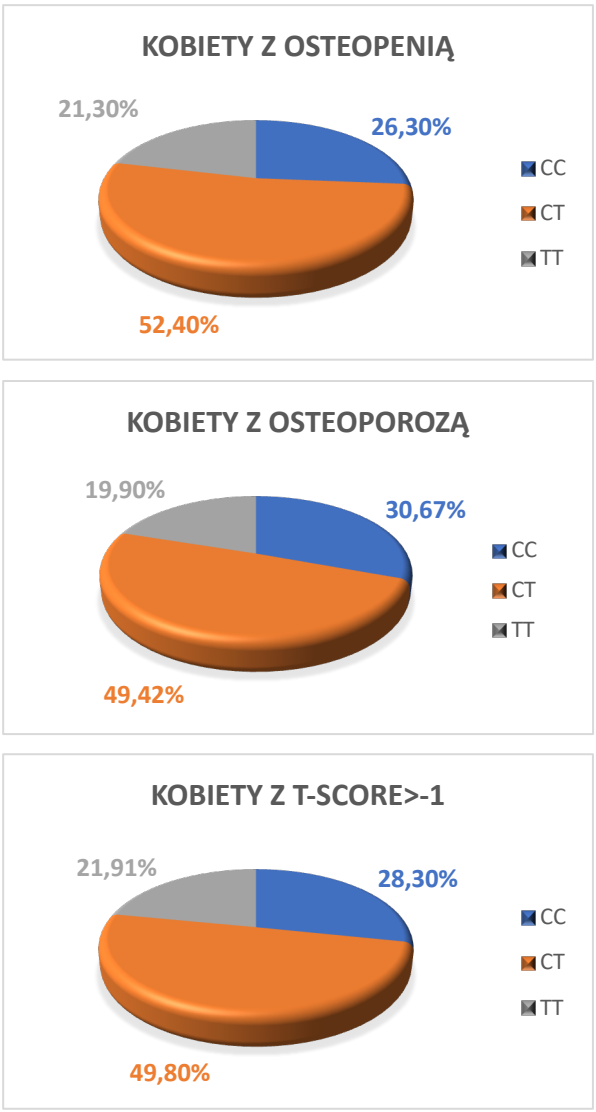
a.) polimorfizm 575C>T genu RANK







b.) polimorfizm -643C>T genu RANKL



Rycina 16. Rozkład częstości genotypów w grupie kobiet w wieku okołomenopauzalnym z uwzględnieniem podziału na grupy kobiet z osteopenią, osteoporozą, kobiety z T-score>-1 dla polimorfizmów RANK (a.) i RANKL (b.).

W analizie rozkładu częstości genotypów polimorfizmu 575C>T genu RANK stwierdzono, że genotyp CC najczęściej występował najczęściej w grupie kobiet z osteoporozą. W grupie kobiet z osteopenią najczęściej obserwowano genotyp CT, natomiast genotyp TT najczęściej występował w grupie kobiet z T-score >-1.

W przypadku polimorfizmu RANKL -643C>T rozkład częstości genotypów był zbliżony we wszystkich analizowanych grupach. Najczęściej występującym genotypem była heterozygota CT, przy czym największa częstość jej występowania odnotowano w grupie kobiet z osteopenią. Najrzadziej obserwowanym genotypem we wszystkich grupach była homozygota TT. Nie stwierdzono istotnych różnic w częstości poszczególnych genotypów pomiędzy analizowanymi grupami kobiet (Tabela 10. i Rycina 16.).

Porównano również rozkład częstości alleli i genotypów pomiędzy kobietami z nieprawidłową wartością T-score (osteopenia i osteoporoza) oraz kobiet z prawidłową wartością T-score (powyżej -1). Rozkład częstości alleli przedstawiono w Tabeli 11., natomiast rozkład genotypów w Tabeli 12.

Tabela 11. Częstość występowania alleli polimorfizmu RANK 575C>T i RANKL -643C>T w grupie kobiet z osteopenią lub osteoporozą, o prawidłowych wartościach T-score oraz ogółem w populacji kobiet w wieku postmenopauzalnym

Allele	Kobiety z osteopenią lub osteoporozą	Kobiety z prawidłowym T-score (T-score > -1)	Ogółem
	Wartość obserwowana N (%)	Wartość obserwowana N(%)	Wartość obserwowana N (%)
Polimorfizm RANK 575C>T			
C	204 (56,67%)	315 (50,32%)	519 (52,64 %)
T	156 (43,33%)	311 (49,68%)	467 (47,36%)
Polimorfizm RANKL -643C>T			
C	197 (54,72%)	333 (53,19%)	530 (53,75%)
T	163 (45,28%)	293 (46,81%)	456 (46,25%)

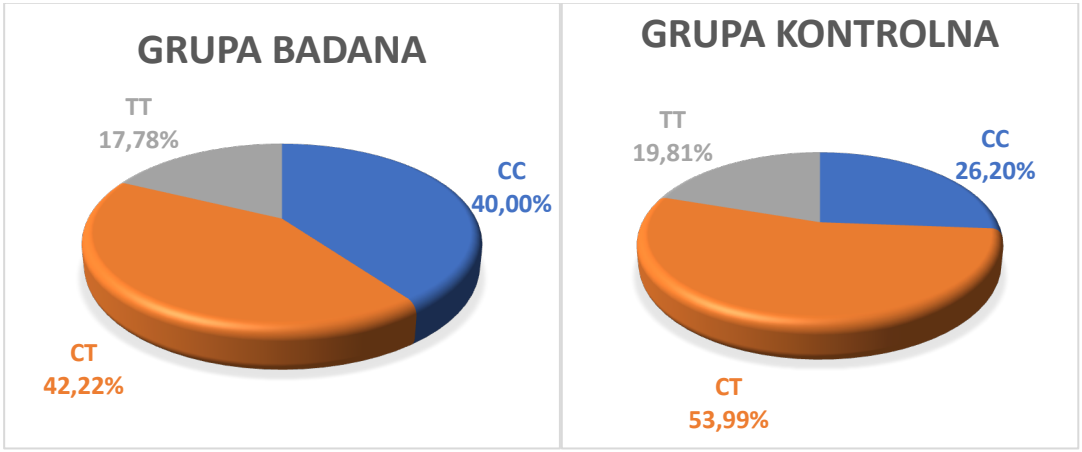
Tabela 12. Częstość występowania genotypów polimorfizmu RANK 575C>T i RANKL -643C>T w grupie kobiet z osteopenią lub osteoporozą, o prawidłowych wartościach T-score oraz ogółem w populacji kobiet w wieku postmenopauzalnym

Genotyp	Grupa badana Kobiety z osteopenią lub osteoporozą	Grupa kontrolna Kobiety z prawidłowym T-score (T-score > -1)	Ogółem
	Wartość obserwowana N (%)	Wartość obserwowana N(%)	Wartość obserwowana N (%)
Polimorfizm 575C>T RANK			
CC	72 (40,00)	81 (25,88)	153 (31,03)
CT	76 (42,22)	153 (48,88)	229 (46,45)
TT	32 (17,78)	79 (25,24)	111 (22,52)
Polimorfizm -643C>T RANKL			
CC	48 (26,67)	82 (26,20)	130 (26,36)
CT	101 (56,11)	169 (53,99)	270 (54,77)
TT	31 (17,22)	62 (19,81)	93 (18,86)

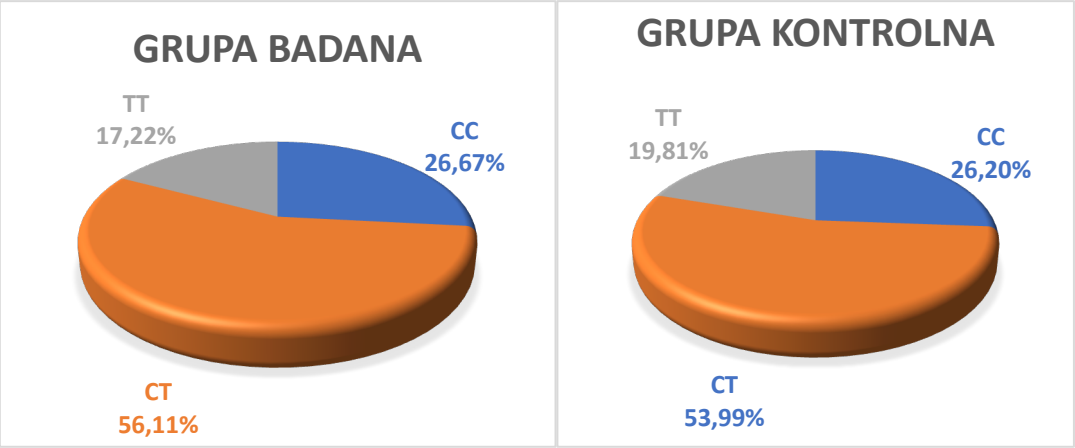
W grupie kobiet z nieprawidłową wartością T-score, jak również w grupie kobiet z prawidłową wartością T-score, stwierdzono, że zarówno w przypadku polimorfizmu genu RANK, jak i genu RANKL najczęściej występującym allelem był allel C.

Analiza częstości genotypów dla polimorfizmu 575C>T genu RANK wykazała, że zarówno u w grupie kobiet z osteopenią i osteoporozą, jak i w grupie kobiet, które miały prawidłową wartość T-score najczęściej występowała heterozygota CT, przy czym jej częstość była większa w grupie kontrolnej. W grupie kobiet z osteopenią lub osteoporozą najrzadziej obserwowano homozygotę TT.

W przypadku polimorfizmu -643C>T genu RANKL najczęściej występującym genotypem również była heterozygota CT, natomiast najrzadziej obserwowano homozygotę TT. Częstość występowania genotypu CC w grupie kobiet z osteopenią lub osteoporozą oraz w grupie kobiet z prawidłową wartością T-score była zbliżona i wynosiła odpowiednio 26,67% i 26,20%. Omówione wyniki przedstawiono na poniższych rycinach (Rycina 17. i Rycina 18.)



Rycina 17. Porównanie rozkładu częstości genotypów w grupie badanej (kobiety z osteopenią lub osteoporozą) z grupą kontrolną (kobiety zdrowe) dla polimorfizmu RANK 575C>T



Rycina 18. Porównanie rozkładu częstości genotypów w grupie badanej (kobiety z osteopenią lub osteoporozą) z grupą kontrolną (kobiety zdrowe) dla polimorfizmu RANKL -643C>T

3.3 Analiza genotypów i ich korelacji z parametrami klinicznymi.

W poniższej pracy zestawiono i porównano średnie wartości danych parametrów klinicznych z genotypami badanych polimorfizmów w grupie kobiet podzielonych ze względu na wartość czynnika T-score. Tabela 13. przedstawia zestawienie dla polimorfizmu 575C>T genu RANK, a Tabela 14. zestawianie dla polimorfizmu -643C>T genu RANKL.

Tabela 13. Zestawienie genotypów ze średnimi wartościami parametrów klinicznych w grupie kobiet z osteopenią, osteoporozą i kobiet z prawidłowym T-score dla polimorfizmu 575C>T genu RANK.

POLIMORFIZM RANK 575C>T									
Analizowane zmienne	Grupa 1 Kobiety z osteopenią			Grupa 2 Kobiety z osteoporozą			Grupa 3 Kobiety z prawidłowym T-score (T-score >-1)		
GENOTYP	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT
T-score									
Średnia	-1,89	-1,68	-1,83	-3,12	-3,16	-3,13	-0,05	0,02	0,41
Minimum	-2,47	-2,45	-2,35	-4,24	-4,49	-3,55	-0,95	-0,97	-0,97
Maksimum	-1,07	-1,08	-1,14	-2,50	-2,26	-2,53	2,26	1,53	3,13
Odch. standardowe	0,46	0,41	0,38	0,53	0,54	0,29	1,06	0,80	1,60
Błąd standardowy	0,10	0,07	0,09	0,11	0,10	0,08	0,37	0,16	0,72
Z-score									
Średnia	-0,81	-0,62	-0,75	-1,64	-1,70	-1,58	0,64	0,93	0,47
Minimum	-2,36	-1,97	-1,47	-2,40	-3,02	-2,27	-0,61	-1,85	0,39
Maksimum	0,13	0,77	0,31	-0,72	-0,08	0,98	2,65	2,62	0,54
Odch. standardowe	0,62	0,69	0,55	0,43	0,69	0,97	1,27	1,31	0,11
Błąd standardowy	0,15	0,14	0,16	0,09	0,13	0,31	0,57	0,34	0,08

Wiek									
Średnia	55,71	53,58	49,75	55,66	54,43	57,38	55,50	53,54	53,40
Minimum	38	30	31	21	23	37	41	34	28
Maksimum	72	77	70	73	75	78	65	71	71
Odch. standardowe	8,64	8,01	10,40	9,28	9,75	8,68	7,45	9,35	16,10
Błąd standardowy	1,88	1,27	2,60	1,64	1,44	2,17	2,63	1,91	7,20
Masa urodzeniowa badanych kobiet [g]									
Średnia	3281,43	3086,15	3283,33	2877,50	3268,18	3173,33	3290	3303,33	4350
Minimum	2800	2500	3100	2670	2470	2940	2950	2460	3600
Maksimum	4500	3420	3600	3120	4500	3400	3450	3800	5100
Odch. standardowe	563,10	266,35	213,70	150,69	512,75	163,30	216,22	432,72	1060,66
Błąd standardowy	212,83	73,87	87,24	53,28	154,60	66,67	96,70	144,24	750
Wiek wystąpienia pierwszej miesiączki									
Średnia	13,11	12,80	13,08	11,94	12,79	13,18	13,67	13,07	13,50
Minimum	9	9	11	9	9	9	11	10	12
Maksimum	17	18	16	16	16	17	16	16	15
Odch. standardowe	2,00	2,53	1,56	1,95	1,98	2,36	2,16	1,86	2,12
Błąd standardowy	0,47	0,51	0,45	0,46	0,40	0,71	0,88	0,50	1,50
Wiek wystąpienia ostatniej miesiączki									
Średnia	50,28	49,79	48,08	48,88	46,86	49,08	47,14	50,29	53
Minimum	40	40	38	40	38	40	42	46	50
Maksimum	57	60	55	56	60	55	54	58	57
Odch. standardowe	4,81	4,71	5,41	4,26	5,03	4,21	3,98	3,20	3,61
Błąd standardowy	1,13	0,89	1,50	1,03	0,93	1,17	1,50	0,78	2,08
Lata reprodukcyjne									
Średnia	37,18	37,30	34,73	36,44	35,43	33,90	31,86	36,79	41
Minimum	23	30	23	28	25	24	27	29	40
Maksimum	44	49	40	47	48	43	39	48	42
Odch. standardowe	5,09	5,10	4,94	4,43	5,32	5,45	4,53	4,90	1,41
Błąd standardowy	1,23	1,14	1,49	1,11	1,11	1,72	1,71	1,31	1,00
Lata od menopauzy									
Średnia	7,59	5,95	6,80	10,31	10,35	10	8	8,21	4,50
Minimum	0	1	1	2	1	4	1	1	4
Maksimum	22	15	25	22	20	17	23	21	5
Odch. standardowe	6,64	4,25	7,32	6,34	5,61	5,29	7,57	6,45	0,71
Błąd standardowy	1,61	0,95	2,31	1,59	1,17	1,67	2,86	1,72	0,50
Liczba ciąż									
Średnia	2,14	1,87	1,56	1,43	1,94	1,86	1,75	2,13	1,80
Minimum	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Maksimum	5	6	3	4	7	4	4	6	3
Odch. standardowe	1,20	1,17	1,03	1,08	1,31	1,17	1,58	1,39	1,64
Błąd standardowy	0,26	0,19	0,26	0,23	0,24	0,31	0,58	0,28	0,73
Masa ciała (kg)									
Średnia	63,76	65,15	60,44	57,91	61,61	60,79	71,38	65,00	79,80
Minimum	44	50	41	44	48	43	53	50	58
Maksimum	82	90	80	73	85	75	95	100	100
Odch. standardowe	10,33	9,63	10,56	7,75	8,52	8,52	13,72	11,73	17,36
Błąd standardowy	2,26	1,54	2,64	1,62	1,53	2,28	4,85	2,39	7,76
Wzrost (cm)									
Średnia	161,52	162,67	162,81	160,39	161,35	160,86	163,75	161,83	167,20
Minimum	150	154	153	150	150	152	155	152	158
Maksimum	172	175	171	168	175	170	172	174	176
Odch. standardowe	5,41	5,12	5,05	5,52	6,19	5,07	5,50	6,72	6,72
Błąd standardowy	1,18	0,82	1,26	1,15	1,11	1,35	1,94	1,37	3,01
BMI (kg/m2)									
Średnia	24,45	24,63	22,75	22,72	23,68	23,71	26,72	24,88	28,93
Minimum	19,23	17,30	17,41	17,10	18,98	17,89	18,33	18,78	21,56
Maksimum	30,46	34,29	29,38	29,38	28,70	27,85	34,89	36,70	37,18
Odch. standardowe	3,22	3,50	3,61	3,07	2,28	2,92	5,39	4,68	6,81
Błąd standardowy	0,70	0,56	0,90	0,64	0,41	0,78	1,91	0,96	3,05
BMD L2-L4 (g/cm^3)									
Średnia	0,97	0,99	0,98	0,82	0,81	0,82	1,23	1,22	1,20
Minimum	0,90	0,91	0,92	0,69	0,66	0,73	1,09	1,08	1,14
Maksimum	1,07	1,07	1,06	0,90	0,96	0,90	1,47	1,38	1,25
Odch. standardowe	0,06	0,05	0,05	0,07	0,07	0,04	0,13	0,10	0,05

Błąd standardowy	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,05	0,02	0,03
BMD L2-L4 YA (%)									
Średnia	81	82,71	81,85	68,64	67,60	68,38	98,88	100,45	99,67
Minimum	75	76	77	58	55	62	86	86	95
Maksimum	89	89	89	75	75	75	123	115	104
Odch. standardowe	4,67	4,12	3,72	5,40	5,41	3,64	11,37	8,38	4,51
Błąd standardowy	1,04	0,71	1,03	1,15	0,99	1,01	4,02	1,79	2,60
BMD L2-L4 AM (%)									
Średnia	90,20	90,62	91,15	79,05	76,73	77	110,25	111,45	103
Minimum	81	80	79	69	60	68	92	92	99
Maksimum	101	105	108	90	92	86	133	131	107
Odch. standardowe	6,18	6,87	7,67	5,81	7,84	5,34	13,36	10,74	4
Błąd standardowy	1,38	1,18	2,13	1,33	1,3	1,54	4,72	2,29	2,31

Tabela 14. Zestawienie genotypów ze średnimi wartościami parametrów klinicznych w grupie kobiet z osteopenią, osteoporozą i kobiet z prawidłowym T-score dla polimorfizmu -643C>T genu RANKL.

POLIMORFIZM RANKL -643C>T									
Analizowane zmienne	Grupa 1 Kobiety z osteopenią			Grupa 2 Kobiety z osteoporozą			Grupa 3 Kobiety zdrowe (T-score >-1)		
GENOTYP	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT
T-score									
Średnia	-1,71	-1,82	-1,72	-3,17	-3,09	-3,24	0,06	0,10	-0,50
Minimum	-2,46	-2,47	-2,45	-4,49	-4,24	-4,24	-0,97	-0,97	-0,95
Maksimum	-1,07	-1,14	-1,17	-2,53	-2,50	-2,26	2,26	3,13	-0,04
Odch. standardowe	0,46	0,41	0,43	0,52	0,45	0,58	1,10	0,93	0,64
Błąd standardowy	0,10	0,06	0,12	0,11	0,08	0,16	0,30	0,20	0,46
Z-score									
Średnia	-0,73	-0,72	-0,56	-1,76	-1,54	-1,79	0,76	1,06	-1,85
Minimum	-1,44	-2,36	-1,27	-2,33	-3,02	-2,68	-0,61	-1,51	-1,85
Maksimum	0,04	0,77	0,11	-1,08	0,98	-0,08	2,65	2,32	-1,85
Odch. standardowe	0,48	0,72	0,51	0,30	0,77	0,70	1,27	1,00	-
Błąd standardowy	0,13	0,13	0,19	0,07	0,14	0,19	0,45	0,28	-
Wiek									
Średnia	53,20	53,56	53,00	54,70	55,10	57,40	54,00	53,91	54,00
Minimum	42	30	31	21	23	47	36	28	49
Maksimum	68	70	77	73	78	66	68	71	59
Odch. standardowe	5,93	9,09	11,79	9,12	10,36	5,74	8,50	11,01	7,07
Błąd standardowy	1,33	1,39	3,15	1,76	1,44	1,48	2,36	2,35	5,00
Masa urodzeniowa badanych kobiet [g]									
Średnia	3241,67	3416,25	3250,00	3237,50	3114,00	2995,71	3297,50	3580,00	3440,00
Minimum	2800	2500	3100	2670	2800	2470	2780	2460	3400
Maksimum	3600	4500	3500	4500	3500	3380	3750	5100	3400
Odch. standardowe	265,36	426,61	173,21	569,88	244,64	321,34	304,81	795,49	-
Błąd standardowy	108,33	106,65	86,60	201,48	77,36	121,46	107,77	300,67	-
Wiek wystąpienia pierwszej miesiączki									
Średnia	12,77	12,86	13,86	11,54	13,21	12,25	13,56	13,00	14,00
Minimum	9	9	12	9	9	9	11	10	14
Maksimum	18	17	16	15	16	17	16	15	14
Odch. standardowe	2,59	2,10	1,46	1,81	1,85	2,42	1,88	2,00	-
Błąd standardowy	0,72	0,36	0,55	0,50	0,35	0,70	0,63	0,58	-
Wiek wystąpienia ostatniej miesiączki									
Średnia	49,24	49,59	50,13	49,07	48,13	46,15	48,09	51,00	50,50
Minimum	40	38	40	40	38	40	44	42	47
Maksimum	56	60	56	56	60	52	52	58	54
Odch. standardowe	4,68	5,03	5,25	4,56	5,09	3,48	2,34	4,26	4,95
Błąd standardowy	1,14	0,86	1,86	1,18	0,91	0,97	0,71	1,14	3,50
Lata reprodukcyjne									
Średnia	35,55	36,84	37,83	36,64	35,77	33,67	34,60	36,82	34,50
Minimum	23	23	34	28	24	25	28	27	33
Maksimum	42	49	44	47	48	40	48	42	36
Odch. standardowe	5,73	5,15	3,49	6,34	4,79	4,16	5,91	5,15	2,12
Błąd standardowy	1,73	0,92	1,42	1,91	0,94	1,20	1,87	1,55	1,50
Lata od menopauzy									
Średnia	5,36	6,97	8,00	8,45	10,88	10,58	8,90	7,91	2,00
Minimum	0	1	1	3	1	2	1	1	2
Maksimum	18	25	22	15	22	20	18	23	2
Odch. standardowe	5,48	5,33	8,92	3,96	6,21	5,88	4,86	7,85	0,00
Błąd standardowy	1,65	0,97	3,64	1,19	1,22	1,70	1,54	2,37	0,00
Liczba ciąż									
Średnia	1,80	1,95	1,77	1,67	1,79	1,77	2,00	2,00	2,00
Minimum	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Maksimum	6	5	3	4	4	7	6	5	4
Odch. standardowe	1,44	1,11	0,83	1,06	1,01	1,88	1,58	1,31	2,83
Błąd standardowy	0,32	0,17	0,23	0,23	0,17	0,52	0,44	0,28	2,00
Masa ciała (kg)									
Średnia	63,45	64,12	63,15	58,62	60,88	60,92	66,77	70,09	60,00
Minimum	41	44	48	46	43	46	50	51	53
Maksimum	82	90	79	73	75	85	88	100	67
Odch. standardowe	10,89	9,71	10,66	6,95	7,85	11,38	10,26	15,56	9,90
Błąd standardowy	2,43	1,46	2,96	1,52	1,35	3,16	2,85	3,32	7,00
Wzrost (cm)									
Średnia	160,85	162,44	164,54	162,05	160,32	160,69	161,62	163,86	162,00
Minimum	153	150	156	152	152	150	152	152	152
Maksimum	168	175	175	168	172	175	174	176	172
Odch. standardowe	4,87	4,96	5,74	4,09	5,45	8,23	7,14	5,78	14,14
Błąd standardowy	1,09	0,76	1,59	0,89	0,94	2,28	1,98	1,23	10,00
BMI (kg/m2)									
Średnia	24,47	24,30	23,36	22,93	23,53	23,62	25,71	26,16	22,79
Minimum	17,51	17,41	17,30	17,10	17,89	19,14	18,33	18,78	22,65
Maksimum	30,86	34,29	28,60	29,38	29,24	28,70	32,89	37,18	22,93
Odch. standardowe	3,80	3,24	3,92	3,06	2,50	2,71	4,61	5,74	0,20
Błąd standardowy	0,85	0,49	1,09	0,67	0,43	0,75	1,28	1,22	0,14
BMD L2-L4 (g/cm^3)									
Średnia	0,99	0,98	0,98	0,82	0,83	0,80	1,23	1,20	1,29
Minimum	0,90	0,90	0,91	0,66	0,69	0,69	1,08	1,09	1,20
Maksimum	1,07	1,06	1,04	0,90	0,96	0,89	1,47	1,38	1,38
Odch. standardowe	0,06	0,05	0,05	0,07	0,06	0,06	0,13	0,08	0,13
Błąd standardowy	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02	0,04	0,02	0,09
BMD L2-L4 YA (%)									
Średnia	82,65	81,64	82,45	68,55	68,34	66,85	100,50	100,42	93,00
Minimum	75	75	76	55	58	58	86	91	86
Maksimum	89	89	87	75	75	74	123	115	100
Odch. standardowe	4,77	4,12	3,93	5,15	4,97	5,32	11,88	6,14	9,90
Błąd standardowy	1,16	0,66	1,19	1,15	0,88	1,48	3,43	1,41	7,00
BMD L2-L4 AM (%)									
Średnia	90,06	90,74	90,91	76,94	78,55	75,77	112,33	108,58	116,00
Minimum	79	80	82	60	65	71	92	92	108
Maksimum	102	108	100	86	91	92	133	125	124
Odch. standardowe	6,54	7,26	5,49	7,08	7,04	5,78	13,57	9,34	11,31
Błąd standardowy	1,59	1,16	1,65	1,72	1,26	1,60	3,92	2,14	8,00

W analizie wariancji ANOVA w badanej populacji wykazano istotne statystycznie różnice dla następujących parametrów: liczby lat od menopauzy ($p=0,03$), masy ciała ($p<0,005$), BMI ($p=0,005$), L2-L4 BMD ($p<0,005$), BMD L2-L4 YA ($p<0,005$), BMD L2-L4 AM ($p<0,005$), T-score ($p<0,005$), Z-score ($p<0,005$).

W dalszej analizie po uwzględnieniu podziału badanej populacji ze względu na wartość

T-score, wykazano pojedyncze istotne statystycznie zależności pomiędzy analizowanymi genotypami a wybranymi parametrami klinicznymi.

W przypadku polimorfizmu RANK 575C>T w grupie kobiet w wieku postmenopauzalnym z prawidłową wartością T-score zaobserwowano różnice w masie urodzeniowej pomiędzy analizowanymi genotypami. Najwyższą średnią masę

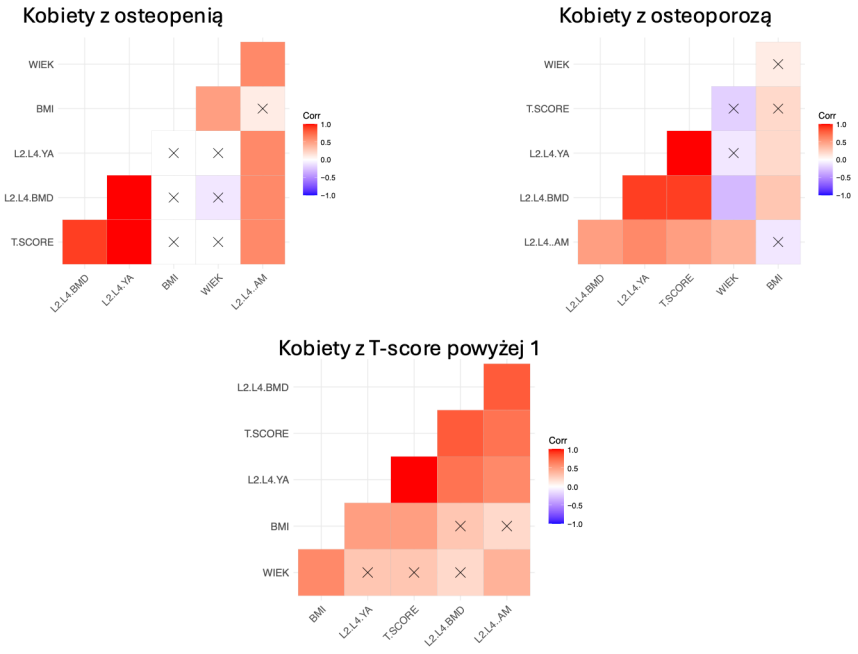
urodzeniową stwierdzono u kobiet z genotypem TT, natomiast niższe wartości obserwowano u kobiet z pozostałymi genotypami.

W przypadku polimorfizmu RANKL -643C>T w grupie kobiet z osteoporozą zaobserwowano różnice wieku wystąpienia pierwszej miesiączki pomiędzy analizowanymi genotypami. Kobiety z genotypem CC charakteryzowały się wcześniejszym wiekiem menarche w porównaniu z kobietami posiadającymi pozostałe genotypy.

Dalsza analiza danych nie wykazała istotnych zależności pomiędzy badanymi polimorfizmami a analizowanymi parametrami klinicznymi.

3.4 Korelacje danych densytometrycznych z wybranymi parametrami klinicznymi

W ostatnim etapie pracy oceniano korelacje danych uzyskanych w badaniu densytometrycznym z wiekiem i BMI pacjentek z uwzględnieniem podziału na trzy grupy. Wszystkie analizowane dane densytometryczne we wszystkich grupach wykazywały wzajemną korelację (Rycina 19.).



X- nieistotne statystycznie przy p < 0,05 (Poprawka Holma)

Rycina 19. Korelacje danych densytometrycznych z wiekiem i BMI pacjentek w poszczególnych grupach.

Stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy BMI i wiekiem w grupie kobiet z osteopenią (r=0,44; p=0,002) oraz w grupie kontrolnej (r=0,45; p=0,025). W grupie kobiet z osteoporozą nie wykazano istotnej korelacji pomiędzy tymi parametrami.

We wszystkich analizowanych grupach większość parametrów densytometrycznych wykazywała wzajemne dodatnie korelacje. Ponadto wykazano dodatnią korelację BMD a parametrem BMD L2-L4 AM, odnoszącym się do średniej wartości gęstości mineralnej kości dla wieku badanych pacjentek. Najsilniejszą korelację tych parametrów stwierdzono w grupie kobiet z osteoporozą (r=0,68; p<0,005). Zaobserwowano również ujemną korelację pomiędzy wiekiem a L2-L4 BMD, określającym gęstość mineralną kości w odcinku lędźwiowym kręgosłupa (r=-0,36; p=0,01).

4. Dyskusja

W niniejszej pracy analizowano związek polimorfizmów 575C>T w genie RANK oraz -643C>T w genie RANKL z gęstością mineralną kości u kobiet w wieku postmenopauzalnym. Analizę oparto na ocenie rozkładu częstości poszczególnych genotypów i alleli w celu sprawdzenia czy występowanie określonego genotypu lub allelu może być związane z rozwojem chorób układu kostnego. Oceniono również, czy częstość badanych polimorfizmów pozostaje w związku z wartością gęstości mineralnej kości oraz wybranymi parametrami klinicznymi u kobiet po menopauzie.

Uzyskane wyniki nie wykazały istotnych statystycznie zależności pomiędzy wariantami genetycznymi RANK 575C>T oraz RANKL -643C>T a występowaniem osteoporozy. Nie wykazano również istotnych statystycznie zależności pomiędzy analizowanymi polimorfizmami a parametrami kostnymi, co sugeruje brak ich istotnego wpływu na gęstość mineralną kości w badanej populacji.

Analiza częstości genotypów wariantów genetycznych RANK 575C>T i RANKL -643C>T w grupie kobiet z osteoporozą i osteopenią oraz w grupie kobiet o prawidłowej wartości T-score również nie wykazała istotnych statystycznie zależności tych wariantów ani z występowaniem choroby układu kostnego, ani z wartościami gęstości mineralnej kości. Brak istotnych statystycznie zależności pomiędzy analizowanymi polimorfizmami a gęstością mineralną kości może wynikać z wieloczynnikowej etiologii osteoporozy. Na rozwój tej choroby wpływają zarówno czynniki genetyczne, jak i środowiskowe, takie jak dieta, poziom aktywności fizycznej, status hormonalny czy poziom witaminy D. W związku z tym pojedyncze warianty genetyczne mogą wywierać stosunkowo niewielki wpływ na ryzyko wystąpienia choroby, a ich znaczenie może ujawniać się dopiero w interakcji z innymi genami lub czynnikami środowiskowymi (58).

W przypadku polimorfizmu RANK 575C>T w grupie kobiet w wieku postmenopauzalnym z prawidłową wartością T-score zaobserwowano różnice w masie urodzeniowej pomiędzy analizowanymi genotypami. Zaobserwowano, że u kobiet, które miały większą masę urodzeniową (powyżej 4000 g), częściej występował genotyp TT, natomiast u kobiet o niższej masie urodzeniowej częściej obserwowano pozostałe genotypy. Wyższa masa urodzeniowa może być związana z wyższymi wartościami BMD oraz BMC (Bone Mineral Content), co może przekładać się na mniejsze ryzyko rozwoju osteoporozy w późniejszym okresie życia (59).

Analiza częstości genotypów wykazała, że genotyp CC występował częściej u kobiet z osteoporozą niż u kobiet z prawidłową wartością T-score. Po zestawieniu kobiet z nieprawidłowym T-score z kobietami o prawidłowej jego wartości zauważono ponadto, że w grupie kobiet z osteopenią lub osteoporozą częstość występowania homozygoty CC była dwukrotnie większa w porównaniu z kobietami o prawidłowej wartości T-score. Analiza częstości alleli wykazała również, że u kobiet z osteoporozą częściej obserwowano allel T w porównaniu z kobietami z osteopenią oraz z grupą kontrolną. Jednocześnie po połączeniu grup kobiet z osteopenią i osteoporozą stwierdzono, że allel C występował częściej w grupie kobiet z nieprawidłową wartością T-score niż w grupie kobiet z prawidłową wartością tego parametru.

Zestawienie wyników własnych oraz innych badaczy dotyczących częstości występowania genotypów polimorfizmu 575C>T genu RANK przedstawiono w Tabeli 15.

Tabela 15. Zestawienie częstości występowania polimorfizmu 575C>T genu RANK wśród różnych populacji.

Polimorfizm 575C>T genu RANK					
Populacja	Źródło	Grupa badana	Częstość genotypów		
			CC	CT	TT
Polska	Badania własne	493 pacjentki w wieku okołomenopauzalnym	153 (31,03)	229 (46,45)	111 (22,52)
Polska	Boroń i wsp. (2014)	570 kobiet w wieku postmenopauzalnym i rozrodczym	94 (23,44)	204 (50,87)	103 (25, 69)
Arabia Saudyjska	Abdi i wsp. (2020)	439 pacjentek z osteopenią	39 (15,48)	118 (46,83)	95 (37,69)
Egipt	Mohamed i wsp. (2016)	348 pacjentek po menopauzie	57 (16,38)	130 (37,36)	161 (46,26)

Analiza literatury nie potwierdza jednoznacznie otrzymanych wyników. Boroń i wsp. (2014) wykazali, że homozygota TT genu RANK nie jest czynnikiem zwiększającym ryzyko osteoporozy, co pozostaje zgodne z wynikami uzyskanymi w niniejszej pracy.

Autorzy ci stwierdzili jednak, że wariant ten może być związany z niższymi wartościami BMD u kobiet z osteoporozą i osteopenią (60). Z kolei Abdi i wsp. (2020) wykazali, że nosicielki homozygoty CC mogą charakteryzować się zwiększonym ryzykiem wystąpienia zaburzeń mineralizacji kości, co w konsekwencji może prowadzić do rozwoju osteopenii w okresie menopauzy. Wyniki te nie zostały potwierdzone w niniejszym badaniu, ponieważ nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy wartościami BMD a analizowanym polimorfizmem RANK (61). Podobne obserwacje przedstawili również Mohamed i wsp. (2016), którzy wykazali, że u pacjentek z genotypem CC częściej rozwija się osteoporoza niż u nosicielek genotypu TT (62). Otrzymany rozkład częstości genotypów polimorfizmu 575C>T był porównywalny z wynikami uzyskanymi przez Boronia i wsp. (2014). Różnice zaobserwowano natomiast w porównaniu z populacją saudyjską i egipską, w których częściej obserwowano genotyp TT (61,62).

W przypadku polimorfizmu RANKL -643C>T w grupie kobiet z osteoporozą zaobserwowano różnice w wieku wystąpienia pierwszej miesiączki pomiędzy analizowanymi genotypami. Wiek wystąpienia pierwszej miesiączki jest jednym z czynników biologicznych mogących wpływać na metabolizm tkanki kostnej. Część badań wskazuje, że wcześniejsza menarche może sprzyjać osiągnięciu wyższej szczytowej masy kostnej ze względu na dłuższy okres ekspozycji organizmu na działanie estrogenów. Istnieją jednak również doniesienia wskazujące na odmienne zależności. W pracy Kopiczko i wsp. (2018) wykazano, że kobiety, u których pierwsza miesiączka wystąpiła w późniejszym wieku, miały większe szanse na prawidłowe wartości BMD w wieku dorosłym (59).

Zestawienie wyników własnych oraz innych badaczy dotyczących częstości występowania genotypów polimorfizmu RANKL -643C>T przedstawiono w Tabeli 16.

Tabela 16. Zestawienie częstości występowania polimorfizmu -643C>T genu RANKL wśród różnych populacji

Polimorfizm -643C>T genu RANKL					
Populacja	Źródło	Grupa badana	Częstość genotypów		
			CC	CT	TT
Polska	Badania własne	493 pacjentki w wieku okołomenopauzalnym	130 (26,36)	270 (54,77)	93 (18,86)
Arabia Saudyjska	Abdi i wsp. (2021)	372 pacjentki po menopauzie	63 (16,94)	151 (40,60)	158 (42,46)
Arabia Saudyjska	Abdi i wsp. (2020)	439 kobiet z osteopenią	81 (18,79)	179 (41,53)	171 (39,68)
Tunezja	Sassi i wsp. (2017)	566 pacjentki po menopauzie	276 (48,8)	221 (39)	69 (12,2)
Słowenia	Mencej i wsp. (2008)	353 pacjentki po menopauzie	87 (21,5)	220 (54,5)	97 (24,0)

W przypadku polimorfizmu -643C>T genu RANKL w niniejszej pracy nie wykazano istotnie statystycznie zależności pomiędzy jego występowaniem a zwiększonym ryzykiem osteoporozy czy zmniejszoną masą kostną. Podobne wyniki uzyskali Mencej i wsp. (2008), którzy nie stwierdzili istotnych statystycznie różnic w częstości występowania genotypów pomiędzy grupą kobiet z osteoporozą a grupą kontrolną (22). We wcześniejszym badaniu Mencej i wsp. (2006) zaobserwowali jednak, że u nosicielek genotypu TT polimorfizmu −643C>T genu RANKL tempo utraty masy kostnej mogło być wyższe w porównaniu z innymi genotypami, co sugeruje potencjalny wpływ tego wariantu na dynamikę zmian w tkance kostnej (63).

Z kolei Abdi i wsp. (2021) wykazali, że polimorfizm 643C>T genu RANKL może być związany z niższą gęstością mineralną kości w odcinku lędźwiowym kręgosłupa oraz ze

zmniejszoną gęstością kości w szyjce kości udowej. Autorzy sugerują również możliwy wpływ tego wariantu genetycznego na poziom witaminy D w osoczu u kobiet (64). Sassi i wsp. (2017) wykazali natomiast, że genotyp CC polimorfizmu RANKL -643C>T może mieć działanie protekcyjne w stosunku do ryzyka wystąpienia osteoporozy (23).

Różnice pomiędzy wynikami badań mogą wynikać z odmienności genetycznych oraz środowiskowych pomiędzy analizowanymi populacjami. Należy również zwrócić uwagę na pewne ograniczenia niniejszego badania. Analiza została przeprowadzona w jednej populacji etnicznej, co może ograniczać możliwość uogólnienia uzyskanych wyników na inne populacje. Ponadto oceniano jedynie wybrane polimorfizmy genów RANK i RANKL, podczas gdy rozwój osteoporozy jest związany z działaniem wielu genów zaangażowanych w metabolizm tkanki kostnej. Uzyskane wyniki mają również znaczenie w kontekście badań nad genetycznymi uwarunkowaniami osteoporozy. Pomimo że analizowane polimorfizmy genów RANK i RANKL nie wykazały istotnego związku z gęstością mineralną kości w badanej populacji, wyniki te stanowią istotny wkład w badania nad genetycznymi uwarunkowaniami osteoporozy. Wskazują one, że pojedyncze warianty genetyczne mogą nie mieć decydującego znaczenia dla rozwoju osteoporozy, a większą rolę mogą odgrywać złożone interakcje pomiędzy czynnikami genetycznymi oraz środowiskowymi. W przyszłości badania genetyczne mogą przyczynić się do identyfikacji markerów pozwalających na wcześniejsze wykrycie osób z podwyższonym ryzykiem osteoporozy oraz umożliwić bardziej spersonalizowane podejście do profilaktyki i leczenia tej choroby.

Na zakończenie warto podkreślić, że niniejsza praca jest jedną z niewielu analizujących polimorfizmy RANK i RANKL w odniesieniu do osteoporozy w populacji polskiej. Uzyskane wyniki wskazują, że analizowane warianty genetyczne nie stanowią głównych czynników ryzyka osteoporozy w badanej populacji kobiet po menopauzie. Jednocześnie obserwowane różnice pomiędzy populacjami wskazują na potrzebę prowadzenia dalszych badań nad genetycznymi uwarunkowaniami metabolizmu tkanki kostnej.

5. Wnioski

1. Analiza rozkładu częstości genotypów i alleli polimorfizmów RANK C575T oraz RANKL C-643T nie wykazała istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupą kobiet z osteopenią i osteoporozą a grupą kobiet z prawidłową wartością T-score. Nie stwierdzono również istotnych zależności pomiędzy badanymi polimorfizmami a wartością gęstości mineralnej kości.
2. Analizowane polimorfizmy genów RANK i RANKL nie wydają się stanowić istotnych czynników ryzyka osteoporozy w analizowanej populacji kobiet.
3. W grupie kobiet w wieku postmenopauzalnym z prawidłowym T-score wykazano zależność pomiędzy polimorfizmem RANK 575C>T a masą urodzeniową, natomiast w grupie kobiet z osteoporozą stwierdzono zależność pomiędzy polimorfizmem RANKL -643C>T a wiekiem wystąpienia pierwszej miesiączki.
4. Analiza korelacji parametrów densytometrycznych z wybranymi danymi klinicznymi wykazała dodatnią korelację pomiędzy BMI a wiekiem w grupie kobiet z osteoporozą oraz w grupie kontrolnej. U kobiet z osteoporozą stwierdzono ujemną korelację pomiędzy wiekiem a gęstością mineralną kości w odcinku lędźwiowym kręgosłupa (L2–L4 BMD). We wszystkich analizowanych grupach wykazano również dodatnie korelacje pomiędzy parametrami densytometrycznymi.

Bibliografia

1. Janiszewska M, Kulik T, Dziedzic M, Żołnierczuk-Kieliszek D, Barańska A. Osteoporoza jako problem społeczny – patogeneza, objawy i czynniki ryzyka osteoporozy pomenopauzalnej. 2015;9.

2. Xiao PL, Cui AY, Hsu CJ, Peng R, Jiang N, Xu XH, et al. Global, regional prevalence, and risk factors of osteoporosis according to the World Health Organization diagnostic criteria: a systematic review and meta-analysis. Osteoporos Int. października 2022;33(10):2137–53. doi:10.1007/s00198-022-06454-3

3. US Preventive Services Task Force, Curry SJ, Krist AH, Owens DK, Barry MJ, Caughey AB, et al. Screening for Osteoporosis to Prevent Fractures: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. JAMA. 26 czerwca 2018;319(24):2521. doi:10.1001/jama.2018.7498

4. Kenkre J, Bassett J. The bone remodelling cycle. Ann Clin Biochem Int J Lab Med. maja 2018;55(3):308–27. doi:10.1177/0004563218759371

5. Szczeklik A. Interna Szczeklika 2022. Kraków: Medycyna Praktyczna : Polski Instytut Evidence Based Medicine; 2022.

6. Guła Zofia, Korkosz Mariusz. Osteoporoza u osób w wieku podeszłym-patogeneza, ocena ryzyka złamań i skuteczność przeciwzłamaniowa leków. Med Wieku Podeszłego. 2011;1(1):23–8.

7. Przysławski J, Górna I. OSTEOPOROZA U DZIECI I MŁODZIEŻY. Bromatol Chem Toksylkologiczna. 2008;XLI(4):949–56.

8. Kanis JA, Norton N, Harvey NC, Jacobson T, Johansson H, Lorentzon M, et al. SCOPE 2021: a new scorecard for osteoporosis in Europe. Arch Osteoporos. grudnia 2021;16(1):82. doi:10.1007/s11657-020-00871-9

9. Narodowy Fundusz Zdrowia. NFZ o zdrowiu. Osteoporoza [Internet]. Warszawa: Narodowy Fundusz Zdrowia; 2025 [cytowane 6 marca 2026]. Report Nr. Dostępne na: https://ezdrowie.gov.pl/portal/home/badania-i-dane/zdrowe-dane/raporty/nfz-o-zdrowiu-osteoporoza

10. Saad FA. Novel insights into the complex architecture of osteoporosis molecular genetics. Ann N Y Acad Sci. lutego 2020;1462(1):37–52. doi:10.1111/nyas.14231

11. Al Saedi A, Stupka N, Duque G. Pathogenesis of Osteoporosis. W: Stern PH, redaktor. Bone Regulators and Osteoporosis Therapy [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2020 [cytowane 8 marca 2026]. s. 353–67. (Handbook of

Experimental Pharmacology). Dostępne na: http://link.springer.com/10.1007/164_2020_358 doi:10.1007/164_2020_358

12. Wu Y, Gan D, Liu Z, Qiu D, Tan G, Xu Z, et al. Osteocytes: master orchestrators of skeletal homeostasis, remodeling, and osteoporosis pathogenesis. Front Cell Dev Biol. 25 września 2025;13:1670716. doi:10.3389/fcell.2025.1670716

13. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. Arthritis Res Ther. 2007;9(Suppl 1):S1. doi:10.1186/ar2165

14. Liu W, Zhang X. Receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL)/RANK/osteoprotegerin system in bone and other tissues (Review). Mol Med Rep. maja 2015;11(5):3212–8. doi:10.3892/mmr.2015.3152

15. Schneeweis LA, Willard D, Milla ME. Functional Dissection of Osteoprotegerin and Its Interaction with Receptor Activator of NF-κB Ligand. J Biol Chem. grudnia 2005;280(50):41155–64. doi:10.1074/jbc.M506366200

16. Udagawa N, Koide M, Nakamura M, Nakamichi Y, Yamashita T, Uehara S, et al. Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways. J Bone Miner Metab. stycznia 2021;39(1):19–26. doi:10.1007/s00774-020-01162-6

17. Xiong J, Piemontese M, Onal M, Campbell J, Goellner JJ, Dusevich V, et al. Osteocytes, not Osteoblasts or Lining Cells, are the Main Source of the RANKL Required for Osteoclast Formation in Remodeling Bone. Heymann D, redaktor. PLOS ONE. 22 września 2015;10(9):e0138189. doi:10.1371/journal.pone.0138189

18. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-hora M, Feng JQ, et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. Nat Med. października 2011;17(10):1231–4. doi:10.1038/nm.2452

19. Hofbauer LC. Clinical Implications of the Osteoprotegerin/RANKL/RANK System for Bone and Vascular Diseases. JAMA. 28 lipca 2004;292(4):490. doi:10.1001/jama.292.4.490

20. Choi JY, Shin A, Park SK, Chung HW, Cho SI, Shin CS, et al. Genetic Polymorphisms of OPG, RANK, and ESR1 and Bone Mineral Density in Korean Postmenopausal Women. Calcif Tissue Int. września 2005;77(3):152–9. doi:10.1007/s00223-004-0264-0

21. Lu Y, Liu P, Recker RR, Deng HW, Dvornyk V. TNFRSF11A and TNFSF11 are associated with age at menarche and natural menopause in white women. Menopause. września 2010;17(5):1048–54. doi:10.1097/gme.0b013e3181d5d523

22. Mencej S, Albagha OME, Prezelj J, Kocjan T, Marc J. Tumour necrosis factor superfamily member 11 gene promoter polymorphisms modulate promoter activity and influence bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. J Mol Endocrinol. czerwca 2008;40(6):273–9. doi:10.1677/JME-08-0003 PubMed PMID: 18502820.

23. Sassi R, Sahli H, Cheour E, Sellami S, El Gaaied ABA. -643C > T RANKL gene polymorphism is associated with osteoporosis in Tunisian postmenopausal women. Climacteric. 4 lipca 2017;20(4):374–8. doi:10.1080/13697137.2017.1315088

24. Diagnostyka i leczenie osteoporozy — zalecenia Polskiego Towarzystwa Reumatologicznego 2015 | Leszczyński | Rheumatology Forum [Internet]. [cytowane 10 marca 2026]. Dostępne na: https://journals.viamedica.pl/rheumatology_forum/article/view/43330/34981

25. Bijelic R, Milicevic S, Balaban J. Risk Factors for Osteoporosis in Postmenopausal Women. Med Arch. lutego 2017;71(1):25–8. doi:10.5455/medarh.2017.71.25-28 PubMed PMID: 28428669; PubMed Central PMCID: PMC5364787.

26. Joanna Głogowska-Szeląg. OCENA ZALEŻNOŚCI MIĘDZY BMD I WSKAŹNIKIEM MASY CIAŁA BMI U KOBIET Z OSTEOPOROZĄ POMENOPAUZALNĄ. Wiad Lek. 2018;LXXI(9):1714–8.

27. Profilaktyka Osteoporozy. Med Po Dyplomie. maja 2004;54–7.

28. Walker MD, Shane E. Postmenopausal Osteoporosis. Solomon CG, redaktor. N Engl J Med. 23 listopada 2023;389(21):1979–91. doi:10.1056/NEJMcp2307353

29. Morin SN, Leslie WD, Schousboe JT. Osteoporosis: A Review. JAMA. 9 września 2025;334(10):894. doi:10.1001/jama.2025.6003

30. Górecki Andrzej, Marczyński Wojciech, Czerwiński Edward, Chmielewski Dariusz. Zasady profilaktyki, rozpoznawania i leczenia osteoporotycznych złamań kości. Postępy Nauk Med. 2008;(6):360–3.

31. Grywalska E, Grafka A, Putowski L, Łopucki M, Roliński J. Komórki macierzyste w leczeniu złamañ towarzyszących osteoporozie – medyczne science fiction czy metoda terapii w przyszłości? Przegląd Menopauzalny. 2011;5.

32. Voelker R. What Is Osteoporosis? JAMA. 27 stycznia 2026;335(4):378. doi:10.1001/jama.2025.17692

33. Czerwiński Edward, Barwecka Małgorzata. Osteoporoza- zapomniana chorba milionów złamań. Lek POZ. 2020;(3):175–9.

34. Tkaczuk-Włach J, Sobstyl M, Jakiel G. Osteoporoza – obraz kliniczny, czynniki ryzyka i diagnostyka. Przegląd Menopauzalny. 2010;9(2):113–7.
35. Głuszko P, Sewerynek E, Misiorowski W, Konstantynowicz J, Marcinowska-Suchowierska E, Blicharski T, et al. Guidelines for the diagnosis and management of osteoporosis in Poland. Update 2022. Endokrynol Pol. 27 lutego 2023;74(1):5–15. doi:10.5603/EP.a2023.0012
36. Dobosz A, Smektała A. Osteoporosis – pathophysiology, symptoms, prevention and treatment. Farm Pol. 28 lipca 2020;76(6):344–52. doi:10.32383/farmpol/125762
37. Farraye FA, Melmed GY, Lichtenstein GR, Barnes EL, Limketkai BN, Caldera F, et al. ACG Clinical Guideline Update: Preventive Care in Inflammatory Bowel Disease. Am J Gastroenterol. lipca 2025;120(7):1447–73. doi:10.14309/ajg.0000000000003541
38. Schini M, Johansson H, Harvey NC, Lorentzon M, Kanis JA, McCloskey EV. An overview of the use of the fracture risk assessment tool (FRAX) in osteoporosis. J Endocrinol Invest. marca 2024;47(3):501–11. doi:10.1007/s40618-023-02219-9 PubMed PMID: 37874461; PubMed Central PMCID: PMC10904566.
39. Barczyk-Gutkowska A, Baron J, Pilch-Kowalczyk J, redaktorzy. Wprowadzenie do diagnostyki obrazowej. Wyd. 2. Katowice: Śląski Uniwersytet Medyczny; 2012. 1 s.
40. Pinto A, Berritto D, Russo A, Riccitiello F, Caruso M, Belfiore MP, et al. Traumatic fractures in adults: missed diagnosis on plain radiographs in the Emergency Department. Acta Biomed Atenei Parm. 19 stycznia 2018;89(1-S):111–23. doi:10.23750/abm.v89i1-S.7015
41. Yu JS, Krishna NG, Fox MG, Blankenbaker DG, Frick MA, Jawetz ST, et al. ACR Appropriateness Criteria® Osteoporosis and Bone Mineral Density: 2022 Update. J Am Coll Radiol. listopada 2022;19(11):S417–32. doi:10.1016/j.jacr.2022.09.007
42. Schneider R. Imaging of Osteoporosis. Rheum Dis Clin N Am. sierpnia 2013;39(3):609–31. doi:10.1016/j.rdc.2013.02.016
43. Li J, She B, He M, Yuan C, Li N. Advances in imaging examination of bone density and bone quality. Endokrynol Pol. 26 lutego 2025;76(1):29–39. doi:10.5603/ep.100805
44. Głuszko P. Osteoporoza. Reumatologia. 2016;Reumatologia Suplement:124–8.
45. Schini M, Vilaca T, Gossiel F, Salam S, Eastell R. Bone Turnover Markers: Basic Biology to Clinical Applications. Endocr Rev. 8 maja 2023;44(3):417–73. doi:10.1210/endrev/bnac031 PubMed PMID: 36510335; PubMed Central PMCID: PMC10166271.

46. Anyszek T, Dembińska-Kieć A, Naskalski JW. Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej. Wyd. 3 popr. i uzup.dodr. Wrocław: Edra Urban & Partner; 2016.
47. Drweska-Matelska N, Wolski H, Seremak-Mrozikiewicz A, Majchrzycki M, Kujawski R, Czerny B. Modern diagnostics of osteoporosis based on the use of biochemical markers of bone turnover. Ginekol Pol. 1 listopada 2014;85:852–9. doi:10.17772/gp/1913
48. Bhattoa HP, Vasikaran S, Trifonidi I, Kapoula G, Lombardi G, Jørgensen NR, et al. Update on the role of bone turnover markers in the diagnosis and management of osteoporosis: a consensus paper from The European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases (ESCEO), International Osteoporosis Foundation (IOF), and International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC). Osteoporos Int. kwietnia 2025;36(4):579–608. doi:10.1007/s00198-025-07422-3
49. Osteoporosis- Treatment [Internet]. Dostępne na: https://www.osteoporosis.foundation/health-professionals/treatment#ref_1
50. Kanis JA, Cooper C, Rizzoli R, Reginster JY. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. Osteoporos Int. 18 stycznia 2019;30(1):3–44. doi:10.1007/s00198-018-4704-5
51. Compston JE, McClung MR, Leslie WD. Osteoporosis. The Lancet. stycznia 2019;393(10169):364–76. doi:10.1016/S0140-6736(18)32112-3
52. Sakowska Joanna, Okurowska-Zawada Bożena, Krajewska-Kułak Elżbieta. Zadania fizjoterapii w leczeniu i zapobieganiu osteoporozie. W: Holistyczny wymiar współczesnej medycyny. T. 7 : praca zbiorowa/ Krajewska-Kułak Elżbieta [i in.] (eds.). Uniwersytet Medyczny w Białymstoku; 2020. s. 199–220.
53. Pietras Marta, Pietras Piotr, Malczewski Daniel, Józefiak-Wójtowicz Anna, Nowicka Katarzyna, Deszczyński Jarosław. Zastosowanie różnych form treningu fizycznego u pacjentek z osteoporozą pomenopauzalną. LVIII. 2016;LVIII(1(143)):50–4.
54. Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J. Real-time PCR detection chemistry. Clin Chim Acta. stycznia 2015;439:231–50. doi:10.1016/j.cca.2014.10.017
55. Quan PL, Sauzade M, Brouzes E. dPCR: A Technology Review. Sensors. 20 kwietnia 2018;18(4):1271. doi:10.3390/s18041271

56. R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [Internet]. Dostępne na: https://www.R- project.org/

57. Juan R Gonzalez, Victor Moreno. SNPassoc: SNPs-Based Whole Genome Association Studies. R package version 2.0-2. 2020.

58. Ralston SH, Uitterlinden AG. Genetics of Osteoporosis. Endocr Rev. 1 października 2010;31(5):629–62. doi:10.1210/er.2009-0044

59. Kopiczko A, Charzewska J, Łopuszańska-Dawid M, redaktorzy. Mineralizacja tkanki kostnej i jej uwarunkowania w różnych etapach ontogenezy. Wydanie I. Warszawa: Akademia Wychowania Fizycznego Józefa Piłsudskiego w Warszawie; 2018. 1 s. (Studia i Monografie / Akademia Wychowania Fizycznego Józefa Piłsudskiego; nr 154).

60. Boroń D, Plewka A, Jędrusik P. Polimorfizm 575C/T genu RANK i jego związek z osteoporozą u kobiet po menopauzie. Ann Acad Med Siles [Internet]. 2014;68(4). Dostępne na: https://annales.sum.edu.pl/Polimorfizm-575C-T-genu-RANK-i-jego-zwiazek-z-osteoporoza-u-kobiet-po-menopauzie,50507,0,2.html

61. Abdi S, Bukhari I, Ansari MGA, BinBaz RA, Mohammed AK, Hussain SD, et al. Association of Polymorphisms in RANK and RANKL Genes with Osteopenia in Arab Postmenopausal Women. Ciaccio M, redaktor. Dis Markers. 9 grudnia 2020;2020:1–7. doi:10.1155/2020/1285216

62. Mohamed RH, Mohamed RH, El-Shahawy EE. Relationship Between RANK and RANKL Gene Polymorphisms with Osteoporosis in Rheumatoid Arthritis Patients. Genet Test Mol Biomark. maja 2016;20(5):249–54. doi:10.1089/gtmb.2015.0227

63. Mencej S, Preželj J, Kocijančič A, Ostanek B, Marc J. Association of TNFSF11 gene promoter polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal women. Maturitas. października 2006;55(3):219–26. doi:10.1016/j.maturitas.2006.03.004

64. Abdi S, Binbaz RA, Mohammed AK, Ansari MGA, Wani K, Amer OE, et al. Association of RANKL and OPG Gene Polymorphism in Arab Women with and without Osteoporosis. Genes. 29 stycznia 2021;12(2):200. doi:10.3390/genes12020200

WN02-305-03/5/2016

POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
W SZCZECINIE
KOMISJA BIOETYCZNA
70-204 Szczecin, ul. Rybacka 1
tel. +48 91 4800 773, fax +48 91 4800 842
e-mail: bioetyka@pum.edu.pl

Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Uchwała nr KB-0012/100/15
Komisji Bioetycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego
w Szczecinie z dnia 05.10.2015 r.

Na podstawie art. 29 ust. 1 ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza i lekarza dentysty (Dz. U. z 05.11.2008 r. Nr 136, poz. 857) oraz § 6 rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480) uchwala się, co następuje:

§ 1

Komisja Bioetyczna Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie /obradująca i wydająca opinię zgodnie z zasadami GCP Good Clinical Practice/ w składzie według listy dołączonej do uchwały, po zapoznaniu się z dokumentacją projektu badawczego pt.:

"Udział wariantów polimorficznych czynników związanych z gęstością mineralną kości u kobiet w okresie okołomenopauzalnym – poszukiwanie markerów terapeutycznych"

Główny Badacz:
- prof. dr hab. n. med. Bogusław Czerny - Zakład Farmakologii Ogólnej i Farmakoekonomiki PUM w Szczecinie

Współbadacze:
- dr n. med. Izabela Uzar,
- dr n. med. Adam Kamiński,
- dr n. med. Daniel Kotrych,
- prof. dr hab. n. med. Maciej Kołban,
- prof. dr hab. med. Andrzej Plewka,
- prof. dr hab. n. med. Agnieszka Seremak-Mrozikiewicz,
- mgr Aleksandra Kowalska

Recenzent badania:
- dr hab. prof. nadzw. PUM Marek Myślak

Lista dokumentów załączonych do wniosku:
- Wniosek do Komisji Bioetycznej PUM w Szczecinie o wyrażenie opinii o projekcie badawczym,
- Opis projektu badawczego,
- Formularz świadomej zgody pacjenta na przeprowadzenie badań,
- Informacja dla pacjenta,
- Lista wszystkich ośrodków biorących udział w badaniu wraz z adresami Komisji Bioetycznych, pod które podlegają,
- Zgody kierowników odpowiednich jednostek na przeprowadzenie badań,

POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
W SZCZECINIE
KOMISJA BIOETYCZNA
70-204 Szczecin, ul. Rybacka 1
tel. +48 91 4800 773, fax +48 91 4800 842
e-mail: bioetyka@pum.edu.pl

stwierdza:

1. ośrodek, w którym ma być przeprowadzone badanie spełnia wymogi dla jego przeprowadzenia,
2. kwalifikacje zawodowe i naukowe kierownika badania gwarantują właściwe przeprowadzenie badania,
3. osoby poddane badaniu zostaną szczegółowo zapoznane z celami i zasadami przeprowadzenia doświadczenia, ze spodziewanymi dla nich korzyściami leczniczymi oraz o ryzyku związanym z poddaniem się eksperymentowi,
4. zagwarantowano w badaniu obowiązek uzyskania świadomej zgody od wszystkich badanych osób lub ich przedstawicieli ustawowych, ochronę danych osobowych uczestników badania oraz możliwości odstąpienia od udziału w eksperymencie w każdym jego stadium.

W związku z powyższym Komisja Bioetyczna PUM wyraża pozytywną opinię o zaprezentowanym badaniu.

§ 2

Wydana opinia dotyczy tylko rozpatrywanego wniosku i przedstawionego projektu; każda zmiana i modyfikacja projektu badawczego wymaga uzyskania odrębnej opinii. Wnioskodawca zobowiązany jest do informowania o wszelkich poprawkach, które mogłyby mieć wpływ na opinię Komisji, o ciężkich lub niespodziewanych zdarzeniach niepożądanych i nieprzewidzianych okolicznościach, o zakończeniu badania i o jego wynikach.

§ 3

Uchwała wchodzi w życie z dniem podjęcia i obowiązuje na okres badania.

PRZEWODNICZĄCY
Komisji Bioetycznej
Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie
prof. dr hab. n. med. Marek Drożdżik

Szczecin, dnia 01.03.2026 r.

OŚWIADCZENIE

Ja, prof. dr hab. n. med. Bogusław Czerny, jako główny badacz projektu badawczego pt. „Udział wariantów polimorficznych czynników związanych z gęstością mineralną kości u kobiet w okresie okołomenopauzalnym", realizowanego za zgodą Komisji Bioetycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie (uchwała nr KB-0012/100/15 z dnia 05.10.2015), niniejszym potwierdzam, że w ramach współpracy badawczej Pani Maria Jopek miała możliwość korzystania z materiału biologicznego (próbek) zgromadzonego w toku realizacji powyższego projektu. Jednocześnie oświadczam, że wszystkie udostępnione próbki były w pełni zanonimizowane i wykorzystywane wyłącznie do celów naukowych, zgodnie z obowiązującymi przepisami prawa, zasadami etyki badań naukowych oraz zakresem zgody Komisji Bioetycznej.

KIEROWNIK
Zakładu Farmakologii Ogólnej
i Farmakoekonomiki
prof. dr hab. n. med. Bogusław Czerny